

„Treibermutationen und Checkpoint Proteinexpression  
des Adenokarzinoms der Lunge  
hinsichtlich der Verteilung  
von Subpopulationen immunkompetenter Zellen  
in der direkten Tumorumgebung und des  
Langzeitüberlebens“

Von der Fakultät für Medizin und Gesundheitswissenschaften  
der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

zur Erlangung des Grades eines

Doktor der Medizin, Dr.med.

Genehmigte Dissertation von

Herrn Peter Clemens Zink

Geboren am 14.01.1993 in Kassel

**Gutachterinnen/ Gutachter:**

Herr Prof. Dr. Frank Griesinger

Frau Prof. Dr. Karin Loser

Herr Prof Dr. C.H. Köhne

**Tag der mündlichen Disputation:** Oldenburg, den 2.11.2022

Oldenburg, 2023

Gewidmet meiner Familie

# I) Inhaltsverzeichnis:

I) INHALTSVERZEICHNIS: .....	4
II) ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS: .....	7
III) ABBILDUNGSVERZEICHNIS: .....	8
IV) TABELLENVERZEICHNIS: .....	11
<b>1) EINLEITUNG.....</b>	<b>15</b>
1.1) ALLGEMEINES ZUM LUNGENKARZINOM:.....	15
1.2) TYROSINKINASE INHIBITOREN, TREIBERMUTATIONEN UND IMMUN-CHECKPOINT INHIBITOREN: .....	17
1.3) ) EINFLUSS DER IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN: .....	22
1.4) FRAGESTELLUNG:.....	26
<b>2) MATERIAL UND METHODE: .....</b>	<b>27</b>
2.1) PATIENTENKOLLEKTIV: .....	27
2.2) SCHNITTEANFERTIGUNG UND FÄRBUNG:.....	28
2.2.1) SCHNITTEANFERTIGUNG UND FÄRBETECHNIK: .....	28
2.2.2) IMMUNHISTOCHEMIE .....	30
2.3) IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DER TIL, CHECKPOINT PROTEINE UND P53: .....	30
2.3.1) IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE: .....	33
2.3.2) NEXT GENERATION SEQUENCING:.....	34
2.3.3) FUNKTIONSWEISE DER SEQUENZIERUNG:.....	35
2.3.4) ARBEITSABLAUF NACH STANDARD DES HÄMATOPATHOLOGISCHEN INSTITUTS HAMBURG .....	36
2.3.5) DAS LUNGENPANEL DES HÄMATOPATHOLOGISCHEN INSTITUTS HAMBURG: .....	37
2.4) STATISTISCHE VERFAHREN DER KORRELATIONSANALYSE:.....	42
2.5) ETHIKVOTUM: .....	43
2.6) VERLAUFSDATEN DES HAMBURGER KREBSREGISTERS:.....	44
<b>3) ERGEBNISSE: .....</b>	<b>45</b>
3.1) TUMORSTADIEN.....	45
3.1.1) PATHOLOGISCHE T-STADIEN:.....	45
3.1.2) KLINISCHE TUMORSTADIEN NACH UICC:.....	46
3.2) IMMUNHISTOCHEMIE: .....	47
3.2.1) IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN:.....	47
3.2.1.1) T-ZELLEN: .....	47
3.2.1.2) B-ZELLEN: .....	50
3.2.2) B-FOLLIKELREAKTION:.....	51
3.2.3) IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN NACH TUMORSTADIUM:.....	53
3.2.3.1) PATHOLOGISCHE T-STADIEN UND IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN: .....	54

3.2.3.2) KLINISCHE TUMORSTADIEN NACH UICC UND IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN: .....	58
3.2.4) CHECKPOINT PROTEINE: .....	62
3.2.4.1) PD-1: .....	62
3.2.4.2) PD-L1 NACH SP263 KLON: .....	64
3.3) NEXT GENERATION SEQUENCING: .....	65
3.3.1) TREIBERMUTATIONEN: .....	65
3.3.2) MUTATIONSKONSTELLATIONEN: .....	68
3.4) ÜBERLEBEN UND PROGNOSTISCHE PARAMETER: .....	71
3.5) KORRELATIONSANALYSE: .....	73
3.5.1) TUMORSTADIEN UND SUBPOPULATIONEN IMMUNKOMPETENTER ZELLEN: .....	73
3.5.2) KORRELATIONEN VON PD-1: .....	76
3.5.2.1) PD-1 UND TUMORSTADIEN: .....	76
3.5.2.2) TUMORSTADIEN UND B-FOLLIKEL: .....	77
3.5.2.3) PD-1 UND B-FOLLIKEL: .....	78
3.5.3) ÜBERSICHT KORRELATIONSANALYSE TREIBERMUTATIONEN/ CHECKPOINTPROTEINE UND IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN: .....	79
3.5.3.1) CD3: .....	80
3.5.3.2) CD8: .....	81
3.5.3.3) CD19: .....	82
3.5.3.4) CD20: .....	83
3.5.3.5) Fox-P3: .....	83
3.5.3.6) PD-1: .....	84
3.5.3.7) CD19 FOLLIKEL: .....	84
3.5.3.8) CD20 FOLLIKEL: .....	85
3.5.3.9) PATHOLOGISCHE T-STADIEN: .....	86
3.5.3.10) KLINISCHES TUMORSTADIUM NACH UICC: .....	87
3.5.3.11) PD-L1 UND WEITERE PARAMETER: .....	87
3.5.3.12) TP53 UND IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN: .....	88
3.5.3.13) 5 JAHRES ÜBERLEBEN UND IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN: .....	89
3.5.3.14) 5 JAHRES ÜBERLEBEN UND TREIBERMUTATIONEN: .....	91
3.6) GESAMTÜBERLEBEN: .....	92
3.6.1) CD3 UND GESAMTÜBERLEBEN: .....	92
3.6.2) CD19+ B-FOLLIKEL UND GESAMTÜBERLEBEN: .....	94
3.6.3) CD20 UND GESAMTÜBERLEBEN: .....	97
<b>4) DISKUSSION: .....</b>	<b>100</b>
4.1) PD-L1 EXPRESSION .....	101
4.2) PD-L1 ALS IMMUNHISTOCHEMISCHER UND PROGNOSTISCHER MARKER: .....	102
4.3) TUMORSTADIEN UND EINFLUSS AUF DIE DIREKTE TUMORUMGEBUNG: .....	105
4.4) GESAMTÜBERLEBEN UND 5 JAHRES ÜBERLEBENSRATE: .....	106

4.5) SUBPOPULATIONEN TUMOR INFILTRIERENDER LYMPHOZYTEN ALS PROGNOTISCHE MARKER: .....	107
4.6) B-FOLLIKEL IM TUMORRANDBEREICH: .....	111
4.7) PRÄVALENZ UND KLINISCHE RELEVANZ DER TREIBERMUTATIONEN: .....	114
4.8) KORRELATIONSANALYSE DER TREIBERMUTATIONEN: .....	119
4.9) STELLENWERT DER IMMUNTHERAPIE IN FRÜHEREN TUMORSTADIEN: .....	120
4.10) „LIMITATIONEN DER STUDIE“ .....	121
<b>5) ZUSAMMENFASSUNG: .....</b>	<b>123</b>
<b>6) SUMMARY: .....</b>	<b>124</b>
<b>V) LITERATURVERZEICHNIS: .....</b>	<b>125</b>
<b>VI) EIDESTÄTTLICHE ERKLÄRUNG:.....</b>	<b>152</b>
<b>VII) DANKSAGUNG:.....</b>	<b>152</b>

## II) Abkürzungsverzeichnis:

C:	Grad Celsius
Abb.:	Abbildung
CD:	Cluster of Differentiation
CTLA-4:	cytotoxic lymphocyte associated Protein 4
CUP-Syndrom:	Cancer of unknown primary
DAB:	Diaminobenzidin
DNA:	Desoxyribonucleinacid
Fig.:	Figur
Fox-P3:	Forkhead Box Protein P3
HE:	Hämatoxylin-Eosin
HPF:	High Power Field
HPH:	hämatopathologisches Institut Hamburg
IgA:	Immunglobulin A
IgG:	Immunglobulin G
n:	Fallzahl
NSCLC:	Non-small-cell-lung-cancer bzw. Nicht-kleinzelliges-Lungenkarzinom
OS:	Overall survival bzw. Gesamtüberleben
PD-1:	Programmed cell Death Protein 1
PD-L1:	Programmed cell Death Protein Ligand 1
PFS:	Progression free survival bzw. progressionsfreies Überleben
PGM-1:	Phosphoglucomutase-1
RKI:	Robert Koch Institut
RS:	Response Rate
RTU:	Ready to Use
SCLC:	small cell Lung cancer bzw. kleinzelliges Lungenkarzinom
Tab.:	Tabelle
TcR:	T-Zell-Rezeptor
TILs:	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TNM:	Tumor Node Metastasis
UICC:	Union internationale contre le cancer

### III) Abbildungsverzeichnis:

<u>ABBILDUNG 1: INZIDENZ UND MORTALITÄT DES LUNGENKARZINOMS IN DEUTSCHLAND AUS DEM JAHR 2016</u> .....	16
<u>ABBILDUNG 2: ENTWICKLUNG DES BEKANNTEN TREIBERMUTATIONSSPEKTRUMS IN NSCLCS IN DEN LETZTEN 35 JAHREN</u> .....	19
<u>ABBILDUNG 3:ZEITSTRAHL ZU NEUZULASSUNGEN DER IMMUN- UND MOLEKULARSTRATIFIZIERTEN THERAPIE DES NSCLC DER LETZTEN JAHRE</u> .....	20
<u>ABBILDUNG 4: MECHANISMEN DER ANTITUMORALEN/PROINFLAMMATORISCHEN EFFEKTE, SOWIE IMMUNSUPPRESSIVER AUSWIRKUNGEN VERSCHIEDENER SUBPOPULATIONEN IN DER DIREKTEN TUMORUMGEBUNG VON ADENOKARZINOMEN DER LUNGE</u> .....	24
<u>ABBILDUNG 5: VERLAUFSDATEN DER STUDIENPOPULATION NACH DEM HAMBURGER KREBSREGISTER (STAND 6/2019)</u> .....	44
<u>ABBILDUNG 6: ADENOKARZINOM DER LUNGE MIT HOHER ANZAHL CD3 POSITIVER TUMOR INFILTRIERENDER LYMPHOZYTEN, 100-FACHE VERGRÖßERUNG, CD3-ANTIKÖRPER, POLYMER BASIERTE IMMUNHISTOCHEMIE UND DAB-DETEKTION</u> .....	48
<u>ABBILDUNG 7: ADENOKARZINOM DER LUNGE MIT CD8 POSITIVEN TUMOR INFILTRIERENDEN, ZYTOTOXISCHEN T- LYMPHOZYTEN ZWISCHEN DEN TUMORZELLEN, 200-FACHE VERGRÖßERUNG, CD8 ANTIKÖRPER, POLYMER BASIERTE IMMUNHISTOCHEMIE, DAB-DETEKTION</u> .....	49
<u>ABBILDUNG 8: ADENOKARZINOM DER LUNGE MIT GERINGER ANZAHL AN FOX-P3 POSITIVEN T-SUPPRESSORZELLEN, 400-FACHE VERGRÖßERUNG, FOX-P3 ANTIKÖRPER, POLYMER BASIERTE IMMUNHISTOCHEMIE MIT DAB-DETEKTION</u> .....	49
<u>ABBILDUNG 9: TUMORZELLNESTER EINES ADENOKARZINOMS DER LUNGE UMGEBEN VON CD19 POSITIVEN B-ZELLEN UND PLASMAZELLEN, CD19 ANTIKÖRPER, 200-FACHE VERGRÖßERUNG, POLYMERBASIERTE IMMUNHISTOCHEMIE MIT DAB-DETEKTION</u> .....	51
<u>ABBILDUNG 10: ADENOKARZINOM DER LUNGE MIT CD20 POSITIVEN B-FOLLIKELN IM TUMORRANDBEREICH, CD20 ANTIKÖRPER, 20-FACHE VERGRÖßERUNG, POLYMER BASIERTE IMMUNHISTOCHEMIE MIT DAB BASIERTE DETEKTION</u> .....	52
<u>ABBILDUNG 11: RANDBEREICH EINES ADENOKARZINOMS DER LUNGE MIT STARKER BILDUNG CD19 POSITIVER B-FOLLIKEL, CD19 ANTIKÖRPER, 20-FACHE VERGRÖßERUNG, POLYMERBASIERTE IMMUNHISTOCHEMIE MIT DAB-DETEKTION</u> .....	53
<u>ABBILDUNG 12: TUMORZELLNESTER EINES ADENOKARZINOMS DER LUNGE UMGEBEN VON PD-1 POSITIVEN IMMUNKOMPETENTEN ZELLEN, 400-FACHE VERGRÖßERUNG, ANTIKÖRPERKLON NAT-105, POLYMERBASIERTE IMMUNHISTOCHEMIE MIT DAB-DETEKTION</u> .....	63
<u>ABBILDUNG 13: ADENOKARZINOM DER LUNGE MIT STARKER, MEMBRANSTÄNDIGER PD-L1 EXPRESSION DER TUMORZELLEN, 200-FACHE VERGRÖßERUNG, PD-L1 ANTIKÖRPER (ANTI-KÖRPERKLON SP263), POLYMERBASIERTE IMMUNHISTOCHEMIE UND DAB-DETEKTION</u> .....	64



<u>ABBILDUNG 14: ADENOKARZINOM DER LUNGE MIT GERINGER, NUR LOKALISIERT NACHWEISBARER EXPRESSION VON PD-L1 AUF TUMORZELLEN, 200-FACHE VERGRÖßERUNG, PD-L1 ANTIKÖRPER (ANTI-KÖRPERKLON SP263), POLYMERBASIERTE IMMUNHISTOCHEMIE MIT DAB-DETEKTION.....</u>	65
<u>ABBILDUNG 15: ZUSAMMENSETZUNG DER TREIBERMUTATIONEN IN DER NGS-ANALYSE IN 133 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE NACH DEM LUNGENPANEL DES HÄMATOPATHOLOGISCHEN INSTITUT HAMBURG (HPH).....</u>	67
<u>ABBILDUNG 16: VERTEILUNG DER ERGEBNISSE DES HAMBURGER KREBSREGISTERS.....</u>	71
<u>ABBILDUNG 17: MEDIANE DER CD8+ ZYTOTOXISCHEN T-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT DES KLINISCHEN TUMORSTADIUMS NACH UICC IN 155 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE.....</u>	74
<u>ABBILDUNG 18: MEDIANE DER ANZAHL CD20+ BTILS IN ABHÄNGIGKEIT DER KLINISCHEN TUMORSTADIEN NACH UICC IN 155 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE.....</u>	75
<u>ABBILDUNG 19: ANZAHL PD-1 POSITIVER IMMUNKOMPETENTER ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT DES PATHOLOGISCHEN T-STADIUMS VON 152 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE.....</u>	77
<u>ABBILDUNG 20: VIERFELDERTAFEL ZUR KORRELATION VON CD20+ B-FOLLIKELREAKTIONEN UND DEM KLINISCHEN TUMORSTADIUM NACH UICC IN 155 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST.....</u>	78
<u>ABBILDUNG 21: INTENSITÄT DER B-FOLLIKELREAKTION IM TUMORRANDBEREICH IN DER CD19 FÄRBUNG IN ABHÄNGIGKEIT DER ANZAHL PD-1+ ZELLEN VON 156 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE.....</u>	78
<u>ABBILDUNG 22: B-FOLLIKELREAKTION IN DER CD20 FÄRBUNG IN ABHÄNGIGKEIT DER ANZAHL PD-1+ ZELLEN IM TUMORRANDBEREICH VON 156 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE.....</u>	79
<u>ABBILDUNG 23: VIERFELDERTAFEL ZU KORRELATION ZWISCHEN PD-L1 HIGH-EXPRESSOR TUMOREN UND DER ANZAHL CD3 POSITIVER TILS IN 156 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST.....</u>	81
<u>ABBILDUNG 24: VIERFELDERTAFEL ZUR KORRELATION VON BIOLOGISCHEN TREIBERMUTATIONEN UND CD19+ B-TILS IN 133 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST.....</u>	82
<u>ABBILDUNG 25: VIERFELDERTAFEL ZUR KORRELATION VON BIOLOGISCHEN TREIBERMUTATIONEN UND CD19+ B-FOLLIKEL IN 133 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST.....</u>	85
<u>ABBILDUNG 26: VIERFELDERTAFEL ZUR KORRELATION DER BIOLOGISCHEN TREIBERMUTATIONEN UND CD20+ B-FOLLIKEL IN 133 ADENOKARZIOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST.....</u>	86
<u>ABBILDUNG 27: VIERFELDERTAFEL ZU KORRELATION VON TP53 MUTATIONEN UND FRÜHEM BZW. SPÄTEM PATHOLOGISCHEM T-STADIUM IN 129 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST.....</u>	87

<u>ABBILDUNG 28: VIERFELDERTAFEL ZUR KORRELATION KLINISCH RELEVANTER PD-L1 EXPRESSION &gt;50% UND AUFTRETEN THERAPEUTISCHER TREIBERMUTATIONEN IN 133 ADENOKARZIOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST.</u> .....	88
<u>ABBILDUNG 29: VIERFELDERTAFEL ZUR KORRELATION VON CD19+ B-FOLLIKELREAKTIONEN UND 5 JAHRESÜBERLEBENSRATE BEI 100 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST.</u> .....	90
<u>ABBILDUNG 30: VIERFELDERTAFEL ZUR KORRELATION DER 5-JAHRESÜBERLEBENSRATE UND ANZAHL CD3+ TILS IN 100 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST.</u> .....	91
<u>ABBILDUNG 31: VIERFELDERTAFEL ZUR KORRELATION DER 5-JAHRESÜBERLEBENSRATE UND ANZAHL CD20+ B-TILS IN 100 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST.</u> .....	91
<u>ABBILDUNG 32: KAPLAN MEIER KURVE HINSICHTLICH DES EINFLUSSES VON INFILTRATIONSZAHLEN CD3+ TILS OBERHALB DES MEDIAN (ROT) UND UNTERHALB DES MEDIAN (BLAU) AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN IN DER GESAMTSTUDIENPOPULATION BEI 100 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE.</u> .....	93
<u>ABBILDUNG 33: KAPLAN MEIER KURVE HINSICHTLICH DES PROGNOSTISCHEN EINFLUSSES DER INFILTRATIONSZAHLEN VON CD3+ TILS OBERHALB DES MEDIAN (ROT) UND UNTERHALB DES MEDIAN (BLAU) BEI 10 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE IN DES TUMORSTADIUMS PT3.</u> .....	94
<u>ABBILDUNG 34: KAPLAN MEIER KURVE HINSICHTLICH DES GESAMTÜBERLEBENS IN DER GESAMTPOPULATION BEI 100 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE BEI MÄßIGEN BZW. STARKEN CD19+ B-FOLLIKELREAKTIONEN (ROT) UND KEINEN BZW. SCHWACHEN CD19+ B-FOLLIKELREAKTIONEN (BLAU).</u> .....	95
<u>ABBILDUNG 35: KAPLAN MEIER KURVE DES GESAMTÜBERLEBENS BEI 10 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE DES PATHOLOGISCHEN TUMORSTADIUMS PT3 HINSICHTLICH EINER MÄßIGEN BZW. STARKEN CD19+ B-FOLLIKELREAKTION (ROT/1,00) UND EINER SCHWACHEN BZW. NEGATIVEN CD19+ B-FOLLIKELREAKTION (BLAU/0,0).</u> .....	96
<u>ABBILDUNG 36: KAPLAN MEIER KURVE DES GESAMTÜBERLEBENS BEI 10 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE IM PATHOLOGISCHEN TUMORSTADIUM PT4 HINSICHTLICH EINER MÄßIGEN BZW. STARKEN CD19+ B-FOLLIKELREAKTION (ROT) UND EINER SCHWACHEN BZW. NEGATIVEN CD19+ B-FOLLIKELREAKTION (BLAU).</u> .....	96
<u>ABBILDUNG 37: KAPLAN MEIER KURVE DES GESAMTÜBERLEBENS BEI 16 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE IM KLINISCHEN STADIUM III NACH UICC HINSICHTLICH EINER MÄßIGEN BZW. STARKEN (ROT) UND EINER NEGATIVEN BZW. SCHWACHEN (BLAU) CD19+ B-FOLLIKELREAKTION.</u> .....	97
<u>ABBILDUNG 38: KAPLAN MEIER KURVE DES GESAMTÜBERLEBENS DER GESAMTPOPULATION BEI 100 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE HINSICHTLICH DER ANZAHL VON CD20+ B-TILS IN DER DIREKTEN TUMORUMGEBUNG OBERHALB DES MEDIANS (ROT) BZW. UNTERHALB DES MEDIANS (BLAU).</u> .....	98
<u>ABBILDUNG 39: KAPLAN MEIER KURVE VON 65 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE IM KLINISCHEN TUMORSTADIUM I NACH UICC HINSICHTLICH DER ANZAHL CD20+ B-TILS IN DER DIREKTEN TUMORUMGEBUNG OBERHALB DES MEDIANS (ROT) BZW. UNTERHALB DES MEDIANS (BLAU).</u> .....	99

## IV) Tabellenverzeichnis:

<u>TABELLE 1: KLON, HERSTELLER, VERDÜNNUNG, VORBEHANDLUNG, INKUBATIONSZEIT UND KONTROLLE DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER</u> .....	32
<u>TABELLE 2: KLON, HERSTELLER, VERDÜNNUNG, VORBEHANDLUNG, INKUBATIONSZEIT UND KONTROLLE DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER</u> .....	33
<u>TABELLE 3: ANTEIL UND ANZAHL DER PATHOLOGISCHEN T-STADIEN VON 152 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE IN DER VORLIEGENDEN <u>STUDIENPOPULATION</u></u> .....	46
<u>TABELLE 4: ANTEIL UND ANZAHL DER KLINISCHEN TUMORSTADIEN NACH UICC VON 155 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE IN DER VORLIEGENDEN <u>STUDIENPOPULATION</u></u> .....	46
<u>TABELLE 5: MINIMUM, MAXIMUM, MEDIAN DER MEDIANE DER VERSCHIEDENEN T-ZELLMARKER PRO HIGH POWER FIELD (400-FACHE VERGRÖßERUNG), SOWIE 95% KONFIDENZINTERVALLE BEI 156 FÄLLEN DES ADENOKARZINOMS DER LUNGE</u> .....	48
<u>TABELLE 6: MINIMUM, MAXIMUM, MITTELWERT UND MEDIANE VON B-ZELLSUBPOPULATIONEN PRO HIGH POWER FIELD (400-FACHE VERGRÖßERUNG), SOWIE 95%-KONFIDENZINTERVALL IN 155 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE</u> .....	50
<u>TABELLE 7: KATEGORIEN UND DEREN PROZENTUALE ANTEILE DER B-FOLLIKELREAKTIONEN IN DEN FÄRBUNGEN CD19 UND CD20 BEI 156 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE</u> .....	52
<u>TABELLE 8: MINIMUM, MAXIMUM, MITTELWERT UND MEDIAN DER MEDIANE PRO HIGH POWER FIELD (400-FACHE VERGRÖßERUNG), SOWIE 95%-KONFIDENZINTERVALL DER VERSCHIEDENEN IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN IN 83 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE DES PATHOLOGISCHEN STADIUM PT1</u> .....	56
<u>TABELLE 9: MINIMUM, MAXIMUM, MITTELWERT UND MEDIAN SOWIE 95% KONFIDENZINTERVALL DER VERSCHIEDENEN IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN IN 37 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE DES PATHOLOGISCHEN STADIUM PT2</u> .....	57
<u>TABELLE 10: MINIMUM, MAXIMUM, MITTELWERT UND MEDIAN SOWIE 95% KONFIDENZINTERVALL VON B-ZELLSUBPOPULATIONEN PRO HIGH POWER FIELD (400-FACHE VERGRÖßERUNG) IN 19 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE DES PATHOLOGISCHEN STADIUM PT3</u> .....	57
<u>TABELLE 11: MINIMUM, MAXIMUM, MITTELWERT UND MEDIAN SOWIE 95% KONFIDENZINTERVALL DER VERSCHIEDENEN IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN PRO HIGH POWER FIELD (400-FACHE VERGRÖßERUNG) IN 13 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE DES PATHOLOGISCHEN STADIUM PT4</u> .....	57
<u>TABELLE 12: MINIMUM, MAXIMUM, MITTELWERT UND MEDIAN SOWIE 95% KONFIDENZINTERVALL DER VERSCHIEDENEN IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN PRO HIGH POWER FIELD (400-FACHE VERGRÖßERUNG) IN 99 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE DES KLINISCHEN STADIUM I NACH UICC</u> .....	61
<u>TABELLE 13: MINIMUM, MAXIMUM, MITTELWERT UND MEDIAN SOWIE 95% KONFIDENZINTERVALL VON VERSCHIEDENEN IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN PRO HIGH POWER FIELD (400-FACHE VERGRÖßERUNG) IN 12 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE DES KLINISCHEN STADIUM II NACH UICC</u> .....	61

<a href="#"><u>TABELLE. 14: MINIMUM, MAXIMUM, MITTELWERT UND MEDIAN SOWIE 95% KONFIDENZINTERVALL VON VERSCHIEDENEN IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN PRO HIGH POWER FIELD (400-FACHE VERGRÖßERUNG) IN 26 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE DES KLINISCHEN TUMORSTADIUM III NACH UICC.....</u></a>	<a href="#"><u>61</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE. 15: MINIMUM, MAXIMUM, MITTELWERT UND MEDIAN SOWIE 95% KONFIDENZINTERVALL VON VERSCHIEDENEN IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN PRO HIGH POWER FIELD (400-FACHE VERGRÖßERUNG) IN 18 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE DES KLINISCHEN STADIUM IV NACH UICC.....</u></a>	<a href="#"><u>62</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE 16: MINIMUM, MAXIMUM, MITTELWERT UND MEDIAN SOWIE 95%- KONFIDENZINTERVALL DER PD-1+ TILS PRO HIGH POWER FIELD (400-FACHE VERGRÖßERUNG) BEI 156 FÄLLEN DES ADENOKARZINOMS DER LUNGE .....</u></a>	<a href="#"><u>63</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE 17: KATEGORIEN UND ANTEILE UNTERSCHIEDLICHER PD-L1 EXPRESSIONEN IN 156 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE. ....</u></a>	<a href="#"><u>64</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE 18: MUTATIONSKONSTELLATIONEN BEI EGFR MUTATIONEN IN 133 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE. ....</u></a>	<a href="#"><u>68</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE 19: MUTATIONSKONSTELLATIONEN BEI KRAS MUTATIONEN IN 133 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE. ....</u></a>	<a href="#"><u>69</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE 20: MUTATIONSKONSTELLATIONEN BEI IMMUNHISTOCHEMISCH DETEKTIERTER ALK EXPRESSION IN 58 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE.....</u></a>	<a href="#"><u>69</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE 21: MUTATIONSKONSTELLATIONEN BEI BRAF MUTATIONEN IN 133 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE. ....</u></a>	<a href="#"><u>70</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE 22: GESAMTÜBERLEBEN UND ANTEIL VERSTORBENE IN ABHÄNGIGKEIT DES KLINISCHEN TUMORSTADIUMS BEI 99 PATIENTEN MIT ADENOKARZINOMEN DER LUNGE .....</u></a>	<a href="#"><u>72</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE 23: MEDIANE DER IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT DES PATHOLOGISCHEN T-STADIUMS BEI 152 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE. ....</u></a>	<a href="#"><u>73</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE 24: MEDIANE DER IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT DER KLINISCHEN TUMORSTADIEN NACH UICC BEI 155 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE. ....</u></a>	<a href="#"><u>73</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE 25: KORRELATIONEN VON CD3 UND PD-L1, SOWIE DEN SUBGRUPPEN VON TREIBERMUTATIONEN VON 156 (PD-L1) BZW. 133 (TP53 UND TREIBERMUTATIONEN) ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST. ....</u></a>	<a href="#"><u>80</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE 26: KORRELATION VON CD8 UND PD-L1 SOWIE DEN SUBGRUPPEN DER TREIBERMUTATIONEN IN 156 (PD-L1) BZW. 133 (TP53 UND TREIBERMUTATIONEN) ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST. ....</u></a>	<a href="#"><u>81</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE 27: P-WERTE DER KORRELATIONEN VON CD19 MIT TREIBERMUTATIONSSUBGRUPPEN, TP53 UND PD-L1 IN 156 (PD-L1) BZW. 133 (TP53 UND TREIBERMUTATIONEN) ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST. ....</u></a>	<a href="#"><u>82</u></a>
<a href="#"><u>TABELLE 28: P-WERTE DER KORRELATIONEN VON CD20 MIT TREIBERMUTATIONSSUBGRUPPEN, TP53 UND PD-L1 IN 156 (PD-L1) BZW. 133 (TP53 UND TREIBERMUTATIONEN) ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST. ....</u></a>	<a href="#"><u>83</u></a>

<a href="#"><u>TABELLE 29: P-WERTE DER KORRELATIONEN VON FOX-P3 MIT TREIBERMUTATIONSSUBGRUPPEN, TP53 UND PD-L1 IN 156 (PD-L1) BZW. 133 (TP53 UND TREIBERMUTATIONEN) ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST</u></a> .....	83
<a href="#"><u>TABELLE 30: P-WERTE DER KORRELATIONEN VON PD-1+ TILS MIT TREIBERMUTATIONSSUBGRUPPEN, TP53 UND PD-L1 IN 156 (PD-L1) BZW. 133 (TP53 UND TREIBERMUTATIONEN) ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST</u></a> .....	84
<a href="#"><u>TABELLE 31: P-WERTE DER KORRELATIONEN VON CD19 FOLLIKELN MIT TREIBERMUTATIONSSUBGRUPPEN, TP53 UND PD-L1 IN 156 (PD-L1) BZW. 133 (TP53 UND TREIBERMUTATIONEN) ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST</u></a> .....	84
<a href="#"><u>TABELLE 32: P-WERTE DER KORRELATIONEN VON CD20 FOLLIKELN MIT TREIBERMUTATIONSSUBGRUPPEN, TP53 UND PD-L1 IN 156 (PD-L1) BZW. 133 (TP53 UND TREIBERMUTATIONEN) ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST</u></a> .....	85
<a href="#"><u>TABELLE 33: P-WERTE DER KORRELATIONEN DER PATHOLOGISCHEN TUMORSTADIEN MIT TREIBERMUTATIONSSUBGRUPPEN, TP53 UND PD-L1 IN 133 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST</u></a> .....	86
<a href="#"><u>TABELLE 34: P-WERTE DER KORRELATIONEN DER KLINISCHEN TUMORSTADIEN NACH UICC MIT DEN TREIBERMUTATIONEN, TP53 UND PD-L1 IN ADENOKARZINOMEN DER LUNGE IN 155 (PD-L1) BZW. 133 (TP53 UND TREIBERMUTATIONEN) ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST</u></a> .....	87
<a href="#"><u>TABELLE 35: P-WERTE DER KORRELATIONEN VON PD-L1 MIT TREIBERMUTATIONSSUBGRUPPEN, TP53 UND KRAS IN 133 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST</u></a> .....	87
<a href="#"><u>TABELLE 36: P-WERTE DER KORRELATIONEN VON TP53 MIT DEN IMMUNZELLSUBPOPULATIONEN IN 133 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST</u></a> .....	88
<a href="#"><u>TABELLE 37: P-WERTE DER KORRELATIONEN DER 5-JÜR BZW. VITALSTATUS MIT DEN IMMUNZELLMARKERN UND PD-L1 IN 100 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST</u></a> .....	89
<a href="#"><u>TABELLE 38: P-WERTE DER KORRELATION DER 5 JÜR UND DER VERSCHIEDENEN GRUPPEN VON THERAPIERELEVANTEN MUTATIONEN IN 100 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES FISHER'S EXACT TEST</u></a> .....	91
<a href="#"><u>TABELLE 39: P-WERTE DER KORRELATIONSANALYSE VON CD3 UND DEM GESAMTÜBERLEBEN IN MONATEN BEI DEN UNTERSCHIEDLICHEN T-STADIEN IN 97 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES LOG-RANK-TEST</u></a> .....	92
<a href="#"><u>TABELLE 40: P-WERTE DER KORRELATIONSANALYSE VON CD3 UND DEM GESAMTÜBERLEBEN IN MONATEN IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN TUMORSTADIEN NACH UICC BEI 99 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES LOG-RANK-TEST</u></a> .....	92
<a href="#"><u>TABELLE 41: P-WERTE HINSICHTLICH DER KORRELATION DES GESAMTÜBERLEBENS IN MONATEN UND DER ANZAHL CD19+ B-FOLLIKEL IM TUMORRANDBEREICH IN DEN</u></a>	

<u>SUBGRUPPEN DER PATHOLOGISCHEN TUMORSTADIEN BEI 97 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES LOG-RANK-TEST. ....</u>	94
<u>TABELLE 42: P-WERTE HINSICHTLICH DER KORRELATION DES GESAMTÜBERLEBENS IN MONATEN UND DER ANZAHL CD19+ B-FOLLIKEL IM TUMORRANDBEREICH IN DEN SUBGRUPPEN DER KLINSICHEN TUMORSTADIEN NACH UICC BEI 99 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES LOG-RANK-TEST. ....</u>	94
<u>TABELLE 43: P-WERTE HINSICHTLICH DER KORRELATION DES GESAMTÜBERLEBENS IN MONATEN MIT DER ANZAHL CD20+ B-TILS IN DIREKTER TUMORUMGEBUNG HINSICHTLICH DER PATHOLOGISCHEN T-STADIEN BEI 97 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES LOG-RANK-TEST. ....</u>	97
<u>TABELLE 44: P-WERTE HINSICHTLICH DER KORRELATION DES GESAMTÜBERLEBENS IN MONATEN MIT DER ANZAHL CD20+ B-TILS IN DER DIREKTEN TUMORUMGEBUNG HINSICHTLICH DER KLINISCHEN TUMORSTADIEN NACH UICC BEI 99 ADENOKARZINOMEN DER LUNGE ANHAND DES LOG-RANK-TEST.....</u>	97

## 1) Einleitung

### 1.1) Allgemeines zum Lungenkarzinom:

Weltweit stellt das Lungenkarzinom den häufigsten malignen Tumor dar. Auch in Deutschland ist das Lungenkarzinom der zweithäufigste Tumor bei Männern und der dritthäufigste Tumor bei Frauen<sup>1</sup>. Mit 1,8 Millionen Neudiagnosen und 1,6 Millionen Todesfällen pro Jahr weltweit, ist das Lungenkarzinom der gefährlichste Tumor überhaupt<sup>2</sup>. Besonders tragisch stellt sich dies vor dem Hintergrund dar, dass hinsichtlich der Risikofaktoren ein Großteil dieser Tumore vermeidbar ist.

Schon in den 50er Jahren wurde das Rauchen in aktiver und passiver Form als wichtigster Risikofaktor identifiziert<sup>3</sup>.

Von den etwa 50000 Neuerkrankungen an Lungentumoren in Deutschland wurden etwa 90% durch die dauerhafte Exposition mit Tabakrauch in Verbindung gebracht<sup>1</sup>.

Weitere Risikofaktoren stellen eine Vielzahl von inhalativen Noxen, wie z.B. Asbest, Quarzstäube, aromatische Kohlenwasserstoffe oder ionisierende Strahlungen dar. Diese treten jedoch nicht flächendeckend auf, sodass sie vor allem für bestimmte Berufsgruppen wie Dachdecker, Werftarbeiter oder Strahlentherapeuten relevant sind<sup>1</sup>.

Bedingt durch das Rauchverhalten vor etwa 20 bis 30 Jahren, liegt das Verhältnis der Anzahl von Neuerkrankungen zwischen den Geschlechtern etwa 2:1 zu Ungunsten der Männer. Da sich das Rauchverhalten der Geschlechter in den letzten Jahren jedoch zunehmend angeglichen hat, zeigt sich auch ein relativer Anstieg der Neudiagnosen bei den Frauen im Vergleich zu den Männern<sup>2</sup>.

Passend zu dieser Entwicklung zeigt sich auch bei den histologischen Subtypen in den letzten Jahrzehnten ein Wandel von dem Rauch- und Alkoholabusus assoziierten Plattenepithelkarzinom hin zum Adenokarzinom, welches entgegen der anderen Subtypen deutlich häufiger bei Frauen auftritt<sup>2</sup>.

Das Lungenkarzinom bezeichnet einen bösartigen Tumor welcher aus entdifferenzierten Zellen der Bronchialschleimhaut und dem Lungenparenchym entsteht.

Für die Therapie ist hierbei die histologische Einteilung in das seltenere kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC) und das etwa 4mal häufigere Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) entscheidend. Das NSCLC wiederum kann histologisch in weitere Subtypen unterschieden werden, wobei der häufigste Subtyp das Adenokarzinom darstellt<sup>1</sup>.

Auch die Prognose der Erkrankung ist ungünstig. 5 Jahre nach Erstdiagnose sind nur noch etwa 15% der Patienten am Leben. In den letzten 20 Jahren hatte sich bis zum Auftreten von neuen Therapieansätzen die Prognose nicht entscheidend verbessert<sup>4</sup>.

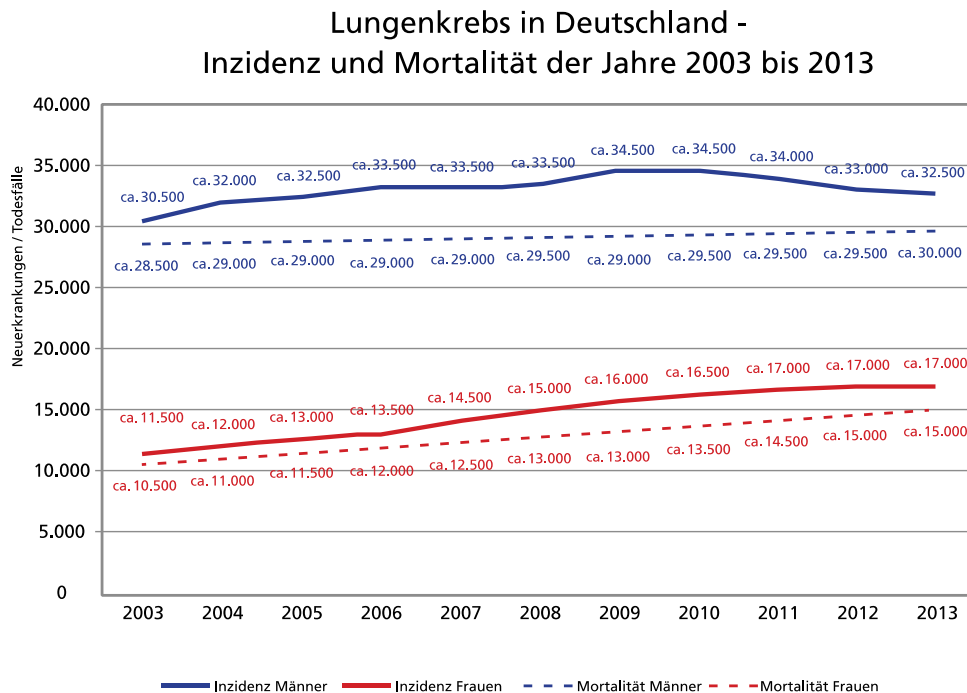


Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität des Lungenkarzinoms in Deutschland aus dem Jahr 2016

(Eigene Darstellung orientiert an Quelle: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Atlas der Krebsinzidenz und -mortalität in Deutschland (GEKID-Atlas). Datenlieferung: März 2016, Lübeck, 2016. Verfügbar über: <http://www.gekid.de>

Bisher standen zur Therapie je nach Stadium der Erkrankung die Komponenten der Operation, Strahlentherapie und der Chemotherapie zur Verfügung.

Die Resektion des Tumors kann hierbei jedoch meist nur kombiniert oder in frühen Stadien angewendet werden, welche aufgrund eines langen symptomfreien Intervalls bei der Erstdiagnose häufig bereits überschritten wurden.

Bis zum Stadium IIIB wird schließlich, bei zu Beginn noch kurativer Intention, eine kombinierte Radio-/Chemotherapie durchgeführt. Im lokal weit fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium IV hingegen bleibt meist nur eine palliative Chemotherapie, welche häufig aus einer Kombination mit Cisplatin oder Carboplatin besteht<sup>5</sup>.

Diese Wirkstoffe sind unter anderem stark hämatotoxisch und führen oft zu erheblichen Nebenwirkungen<sup>5</sup>.



Dies hat neben einer starken Einschränkung der Lebensqualität der Patienten oft einen vorzeitigen Therapieabbruch oder eine Abschwächung des Therapieregimes zur Folge. Einen neuen Therapieansatz mit deutlich besserer Verträglichkeit und Lebenszeitverlängerung bieten die Wirkstoffe der molekular stratifizierten Therapie. Dazu gehört vor allem die Gruppe der Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI).

Ein weiterer Therapieansatz hat sich in jüngerer Zeit im Rahmen der Immuntherapie entwickelt. Ein dezidierteres Verständnis tumorimmunologischer Prozesse hat zur Etablierung einer ganz neuen Medikamentenklasse, der Checkpoint Inhibitoren, geführt.

## **1.2) Tyrosinkinase Inhibitoren, Treibermutationen und Immun-Checkpoint Inhibitoren:**

Durch die fortschreitenden Möglichkeiten der molekulargenetischen Analyse von Tumorzellen, lassen sich Lungenkarzinome nicht nur nach ihrem histologischen Erscheinungsbild, sondern auch hinsichtlich ihres genetischen Profils, unterteilen<sup>6 7</sup>. Für die genetische Einteilung sind verschiedene Genabschnitte entscheidend, welche per Mutation, Translokation oder Amplifikation, Einfluss auf die Entstehung und Progression des Tumors haben. Diese Gruppe von Genen wird als Treibermutationen bezeichnet. Je nach histologischem Subtyp des Lungenkarzinoms können verschiedene Treibermutationen in unterschiedlicher Häufigkeit nachgewiesen werden. Warum es zu Häufungen einer bestimmten Mutation bei einem Subtyp kommt, sowie die genaue Prävalenz jener Mutationen, ist noch nicht gänzlich geklärt.

Unterteilt man die Lungenkarzinome in die histologischen Subgruppen der SCLCs und den NSCLCs (Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und großzelliges Karzinom), zeigen sich unterschiedliche Profile in der Häufigkeit von Treibermutationen. So sind bei den SCLCs nur selten Treibermutationen nachweisbar (nur 6-7% der Fälle zeigen die häufigste Treibermutation FGFR-1)<sup>8 9</sup>. Bei den Plattenepithelkarzinomen der Lunge hingegen sind bei insgesamt etwa einem Drittel der Fälle Treibermutationen nachweisbar, von denen etwa 20% auf die FGFR-1 und ca. 4% auf die PIK3CA Mutation entfallen. Alle anderen Mutationen wie N-RAS oder H-RAS hingegen sind deutlich seltener<sup>10 11 12</sup>.

Die meisten Treibermutationen hingegen sind beim Nicht-plattenepithelialen NSCLC nachweisbar. Hier zeigt sich in 67% der Fälle eine Treibermutation. Die häufigste dieser Mutationen ist die KRAS-Mutation, welche bei ungefähr einem Drittel aller Fälle nachweisbar ist. Weitere häufige Gen-Alterationen finden sich in EGFR (10,43%), MET (4%), ALK (2-6%) und BRAF (1-3%). Weitere Aberrationen wie ROS-1 sind mit nur etwa 1% eher selten<sup>13 14</sup>.

Die Treibermutationen haben durch die Entwicklung neuer Therapieansätze wie den TKI im Rahmen der molekular stratifizierten Therapie eine zunehmende therapeutische Relevanz. Seit im Jahr 2001 der ABL-TKI Imatinib, als revolutionäres Medikament in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie<sup>15</sup>, als Vertreter der ersten Generation der TKIs zugelassen wurde, sind auch für das NSCLC eine Vielzahl weiterer Substanzen dieser Medikamentengruppe zugelassen worden<sup>16 17 18 19</sup>.

Auch bei dem nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinom ist es durch den Einsatz dieser neuen Medikamente gelungen, dem Patienten ein längeres progressionsfreies Überleben bei erhöhten Remissionsraten und geringem Nebenwirkungsprofil im Vergleich zur Chemotherapie zu ermöglichen<sup>20 21 22 23</sup>.

Die wichtigsten Wirkstoffe sind hierbei die EGFR-Inhibitoren Gefitinib, Erlotinib (erste Generation), Afatinib (zweite Generation) und Osimertinib (Drittgenerations-TKI). Afatinib zeigte in den LUX-Lung Studien bei Erstlinientherapie hinsichtlich der Verträglichkeit, der Remissionsrate und dem progressionsfreien Überleben eine signifikante Überlegenheit gegenüber dem Polychemotherapiekonzepten mit Cisplatin/Pemetrexet<sup>24</sup> oder Cisplatin/Gemcitabin<sup>25</sup>. Bei Vorliegen einer Deletion im EGFR Exon 19 konnte zudem in den gleichen Studien ein Überlebensvorteil von etwa 12 Monaten beobachtet werden.

Der häufigste Resistenzmechanismus gegen EGFR-TKI ist die Punktmutation T790M, die jedoch erfolgreich mit dem TKI der dritten Generation Osimertinib behandelt werden kann<sup>26 27</sup>.

Neben der besonderen therapeutischen Wirksamkeit von Osimertinib bei dem genannten Resistenzmechanismus, zeigte sich in der FLAURA-Studie auch ein signifikanter Vorteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens und dem Nebenwirkungsprofil gegenüber den Standard-TKIs der Erstlinientherapie. Des Weiteren verfügt Osimertinib über eine deutlich bessere ZNS-Aktivität im Vergleich zu anderen TKIs und ist daher bei Patienten mit Hirnmetastasen vorzuziehen<sup>28</sup>.

Weitere TKIs zur Behandlung des NSCLCs stellen die Kinase Inhibitoren der Treibermutation ALK dar. Gemäß der Leitlinie erfolgt bei Nachweis einer MET oder ROS-1 Mutation zunächst eine Therapie mit dem ALK-Inhibitor Crizotinib, der bei allen 3 der genannten Mutationen Wirkung gezeigt hat<sup>21 29 30 31 32 33</sup>. Der spezifischere ALK Inhibitor Alectinib ist, wie der Wirkstoff Ceritinib<sup>34 35</sup>, ein ALK Inhibitor der zweiten Generation und stellt mittlerweile die erste Wahl bei der Therapie von ALK positiven NSCLCs dar<sup>36 37 38</sup>. Zudem wurden die Optionen in den letzten Jahren durch Lorlatinib, als ersten Vertreter der

ALK Inhibitoren der dritten Generation, erweitert<sup>39</sup>. In klinischen Studien konnte zusätzlich auch bei ROS-Translokationen eine Wirksamkeit von ALK-Inhibitoren nachgewiesen werden<sup>31 32 40 41 39</sup>, wobei ebenfalls ROS-spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren Bestandteil derzeitiger Forschungen sind<sup>42 43</sup>. Des Weiteren wurde kürzlich eine Kombinationstherapie für BRAF V600E-mutierte Lungenkarzinome zugelassen<sup>44 45 46</sup>. Weitere Treibermutationen sind beim Lungenkarzinom bekannt und entsprechende stratifizierte Therapien werden derzeit in einer Vielzahl von Studien auf Wirksamkeit untersucht<sup>47</sup>. Weitere Gene, die in Zukunft potentiell therapierbare genetische Aberrationen beinhalten können, sind zum Beispiel FGFR1-3,  $\beta$ -Catenin, PIK3CA, AKT, DDR2, Her2, MET, MEK. Zusätzlich zu den bereits genannten Treibermutationen können sogenannte Passengermutationen wie beispielsweise TP53 oder PTEN auftreten. Diese können durchaus zusätzlich zu Treibermutationen vorhanden sein, während sich Treibermutationen gegenseitig ausschließen<sup>48</sup>. Ein Vorliegen von 2 verschiedenen Treibermutationen hingegen ist sehr selten und deutet eher auf das Vorliegen eines Zweitkarzinoms hin. Häufig sind Begleitmutationen von prognostischer Bedeutung und können das Therapieansprechen auf TKI oder Chemotherapie deutlich negativ beeinflussen<sup>49 50 51</sup>, was deren Testung primärdiagnostisch sinnvoll macht. Aus dieser deutlichen Zunahme der Therapie-relevanten Treibermutationen resultiert die Notwendigkeit immer umfangreicherer und sensitiverer diagnostischer Tests. Das Institut für Hämatopathologie Hamburg (HpH) hat ein umfassendes Next Generation Sequencing (NGS)-Panel etabliert, mit dessen Hilfe 17 therapierelevante Gene auf Aberrationen untersucht werden können.

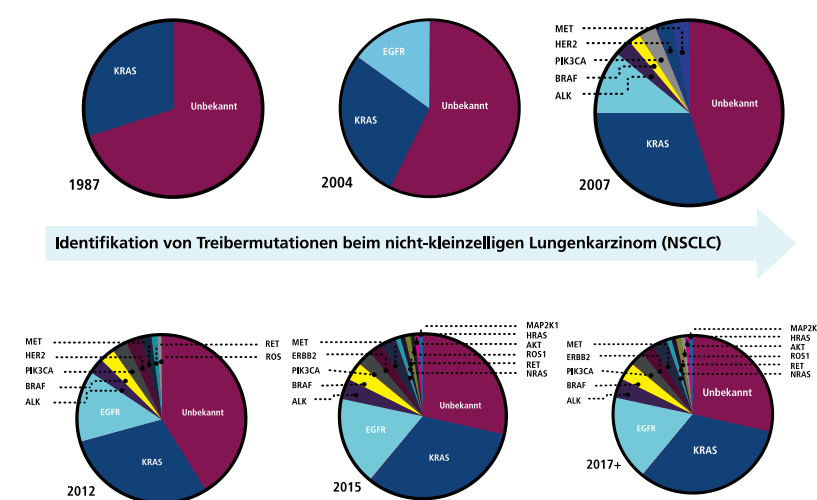


Abbildung 2: Entwicklung des bekannten Treibermutationsspektrums in NSCLCs in den letzten 35 Jahren (Eigene Darstellung orientiert an Quelle: <https://www.trillium.de/zeitschriften/trillium-krebsmedizin/ausgaben-2019/heft-62019/diagnostik-in-der-onkologie/cme-beitrag-prozessoptimierung-im-molekularpathologischen-labor-strategien-fuer-eine-beschleunigte-nsclc-diagnostik.html>)

#### Neuzulassungen von Medikamenten der molekularstratifizierten Therapie und Immuntherapie des NSCLC

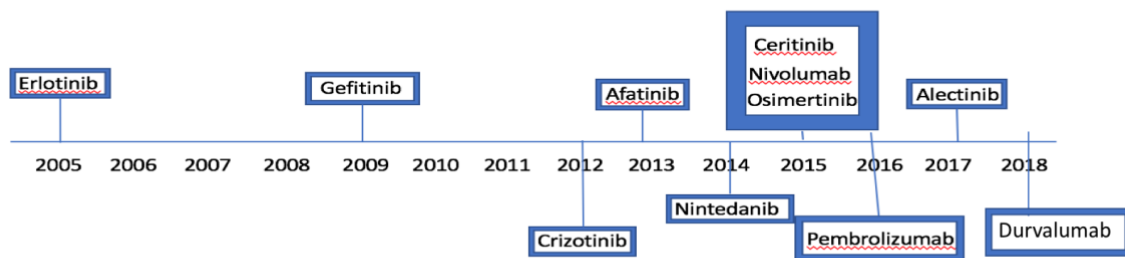


Abbildung 3: Zeitstrahl zu Neuzulassungen der Immun- und molekularstratifizierten Therapie des NSCLC der letzten Jahre (Quelle: Powerpoint 2018, eigene Darstellung)

Immuncheckpoint-Inhibitoren stellen mittlerweile im klinischen Alltag einen festen Bestandteil in der Behandlung von fortgeschrittenen NSCLCs dar. Ihre Wirkweise liegt in der Blockade der immunmodulatorischen Proteine PD-1, PD-L1 sowie CTLA-4. Somit wird eine Interaktion der Checkpoint-Proteine mit ihren Liganden wie dem B7 Protein oder PD-L1/PD-L2 verhindert. Hierdurch kann eine Re-aktivierung des Immunsystems mit Verbesserung des antitumoralen Effektes erreicht werden. Hierbei sind mit den PD-1 Antikörpern Pembrolizumab und Nivolumab sowie der PD-L1 Antikörper Atezolizumab und Durvalumab bereits vier Wirkstoffe für die Behandlung zugelassen<sup>52 53 54 55 56</sup>.

Unter entsprechenden Voraussetzungen bei einem histologischen Nachweis von mehr als 50% PD-L1 exprimierender Tumorzellen, ist Pembrolizumab bereits als Erstlinientherapie zugelassen, während Nivolumab erst als Zweitlinientherapie, unabhängig von der PD-L1 Expression, zum Einsatz kommen kann. Hierbei zeigte sich in den Zulassungsstudien eine Überlegenheit dieser Antikörper gegenüber der Standardchemotherapie wie z.B. Docetaxel<sup>53</sup>. Diese Überlegenheit zeigte sich anhand der Ansprechraten, dem Langzeitüberleben und dem Nebenwirkungsprofil. Hinsichtlich der guten Erfolge in der bisherigen klinischen Anwendung werden weitere Präparate entwickelt sowie das Anwendungsspektrum der bereits verwendeten Antikörper, mit Hinsicht auf eine Ausweitung der Indikationen, auf frühere Therapiezeitpunkte, überprüft<sup>56 57</sup>.

Zur Auswahl von geeigneten Patienten müssen jedoch auch negative Prädiktoren für die Immuntherapie berücksichtigt werden. Hierzu gehören auch die Treibermutationen wie KRAS oder EGFR, da hier ein anderer Mechanismus für die Onkogenese zugrunde liegt. So zeigen die Checkpoint Inhibitoren keine Wirkung, wenn durch eine aktivierende Mutation eine konstitutiv aktivierte Signalkaskade vorliegt<sup>58 59</sup>.

Ein positiver Raucherstatus oder ionisierende Strahlungen hingegen erhöht die Ansprechrate, sowie die Effektivität einer Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren<sup>60 61 62</sup>. Aufgrund einer langfristigen Exposition gegenüber mutagenen Noxen zeigt sich bei jenen Tumoren eine höhere Mutationslast mit einer deutlich immunogeneren Antigenexpression, welche vom Immunsystem leichter zu detektieren ist<sup>63 64</sup>.

Der immunhistochemische PD-L1 Status hat sich ebenfalls als wichtiger prädiktiver Marker für ein gutes Ansprechen auf eine Immuntherapie herausgestellt. In den Zulassungsstudien der PD-1 Inhibitoren zeigt sich ein besseres und häufigeres Ansprechen bei „high-expressor“ Tumoren mit mehr als 50% PD-L1 positiver Tumorzellen. Eine fehlende PD-L1 Expression hingegen ist mit einem deutlich geringeren Therapieerfolg assoziiert<sup>52 53</sup>.

Es kristallisiert sich anhand der Daten in den Zulassungsstudien also heraus, dass der PD-L1-Status des Tumors ausschlaggebend für das Ansprechen einer Immuntherapie sein kann.

Dennoch können auch Patienten von einer Immuntherapie, insbesondere mit PD-L1 Inhibitoren<sup>65</sup> profitieren, deren Tumore kein PD-L1 exprimieren<sup>65 66</sup>.

Es ist zu vermuten, dass der PD-L1-Tumorstatus nicht als alleingültiger prädiktiver Marker gilt, sondern dass andere Faktoren, wie die „Tumor Mutation Burden“ (TMB) oder die Anzahl potentieller Effektorzellen, zusätzlich wichtig sind.

Unklar ist weiterhin der Stellenwert von PD-1 als Biomarker bei der Patientenselektion für die Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren. In den Keynote-Studien wurde kein Zusammenhang zwischen der Prognose oder den Ansprechraten bei Patienten mit Checkpoint-Inhibitor-Therapie und der Expression von PD-1 auf den immunkompetenten Zellen beobachtet<sup>52 57 67</sup>.

PD-1 stellt das Zielprotein der beiden Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab dar und übernimmt zentrale Aufgaben in der Regulation der Immunantwort durch regulatorische T-Zellen. Wir untersuchten die Expression von PD-1 auf den TILs und den Zusammenhang zum Tumorstadium sowie der Zusammensetzung der Immunzellen in der direkten Tumorumgebung. Damit bekamen wir erste Einblicke hinsichtlich einer möglichen Relevanz des Therapiezeitpunktes in der Tumorprogression und der Verteilung von Immunzellen sowie deren PD-1 Expression in der Tumorumgebung.

Bei unseren vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich bereits eine signifikante Abnahme von PD-1 positiven Immunzellen in den fortgeschrittenen pathologischen Tumorstadien (pT4) gegenüber den frühen pathologischen Tumorstadien (pT1-pT3), was auf ein höheres therapeutisches Potential der Checkpoint-Inhibitoren in diesen Stadien hindeuten könnte<sup>68</sup>.

### **1.3) Einfluss der Immunzellsubpopulationen auf das Gesamtüberleben:**

Trotz der großen Erfolge der Immuncheckpointinhibitoren bleibt weiterhin unklar warum der Großteil der Patienten weiterhin kein, oder ein nur begrenztes, Ansprechen auf die therapeutischen Antikörper zeigt.

Dies hat zu einer erneuten Fokussierung auf die immunkompetenten Zellen der direkten Tumorumgebung geführt.

Neben dem Nachweis von prognostisch günstigen Effekten einer hohen Anzahl von TILs auf das Gesamtüberleben bzw. dem progressionsfreien Überleben, konnte dies auch für die einzelnen Subpopulationen der Immunzellen, wie der T-Zellreihe, der B-Zellen, sowie vereinzelt für das mononukleäre Phagozytensystem, nachgewiesen werden<sup>69 70 71</sup>. Zugleich sind auch immunsuppressive Mechanismen für alle genannten Zellreihen beobachtet worden. Hinsichtlich der immunhistochemischen Marker konnte bereits ein Nachweis für den prognostisch günstigen Effekt des Pan-T-Zellmarkers CD3 nachgewiesen werden<sup>70</sup>. Dieser enthält jedoch die beiden Immunzellsubpopulationen der CD4+ T-Helferzellen sowie der zytotoxischen CD8+ T-Zellen, welche bei der Abwehr von Erregern und Tumorzellen unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Bei beiden Subpopulationen wurde bei hoher Dichte von Immunzellen im Bereich des Tumorgewebes ein prognostisch günstiger Einfluss auf das Gesamtüberleben des Patienten beschrieben<sup>72 73 74 75</sup>. Die pathophysiologische Aufgabe der CD4+ T-Helfer Zellen ist die Koordination der T-Zellantwort, welche anhand von Antigenpräsentation, Zytokinexpression und Steuerung der T-Zelldifferenzierung sowie T-Zellproliferation, beeinflusst wird.

Die CD8+ zytotoxischen T-Zellen hingegen sind nach entsprechender Differenzierung und Aktivierung für die Eliminierung des entsprechenden Antigens durch Granzym B mit resultierender Lyse der Zielzellen verantwortlich und können die Immunreaktion durch die Sekretion von Interferon-Gamma weiter verstärken.

Statistisch konnten für jede Subpopulation Hinweise für einen positiven prognostischen Effekt nachgewiesen werden. Aufgrund des pathophysiologischen Hintergrunds ist zudem von einer synergistischen Verstärkung der beiden Zellmarker bei adäquatem Größenverhältnis der Zellgruppen auszugehen. Die Effektivität der vorhandenen Immunzellen scheint, neben der Aktivität und Anwesenheit von anderen Immunzellen, ebenfalls von der Lokalisation im Tumorgewebe abhängig zu sein. So zeigen intraepitheliale TILs eine geringere Auswirkung auf die Prognose wie TILs welche im Tumorstroma lokalisiert sind<sup>76</sup>.

Eine weitere wichtige Subpopulation, welche in den letzten Jahren verstärkt untersucht wurde sind die Tumor-infiltrierenden B-Zellen. Diese treten je nach Lokalisation und Entwicklungsstadium als naive B-Zelle, vorwiegend im Keimzentrum von sogenannten TLS

(tertiary lymphoid structures), aktivierte B-Zelle oder Plasmazelle auf. Diese werden größtenteils von dem B-Zellmarker CD20 erfasst, welcher ebenfalls in einigen Studien bereits einen prognostisch positiven Effekt auf das Gesamtüberleben gezeigt hat. Dies gilt hierbei für die TLS in der direkten Tumorumgebung sowie die B-Zellen im Tumorstroma<sup>77 78</sup>. Zudem wurde in Studien, welche die B-Zellen nach entsprechender Selektion nach Aktivitätssignaturen in verschiedene Gruppen einteilten, ebenfalls ein positiver Einfluss von aktivierten B-Zellen auf die CD8+- und CD4+ T-Zellen, beschrieben<sup>79 80</sup>. Ein positiver Einfluss der B-TILs auf das Gesamtüberleben ist hierbei ebenfalls bereits beschrieben worden, wobei aufgrund der komplexeren Differenzierungswege und Wirkungsmechanismen mehrere Marker beurteilt werden müssen. So zeigt sich für den Marker CD20 ein positiver Effekt auf das Langzeitüberleben, während die Studienlage für CD138, welcher charakteristisch für einige Plasmazellen ist, weniger eindeutig scheint<sup>81</sup>.

Neben den antitumoralen Effekten der immunkompetenten Zellen in der direkten Tumorumgebung sind jedoch ebenfalls Mechanismen der Immunsuppression bekannt, welche eine adäquate Immunantwort verhindern und somit einen Krankheitsprogress ermöglichen. Hierzu gehören die regulatorischen T-Zellen sowie die Subpopulation der regulatorischen B-Zellen. Beide Zellreihen können über verschiedene Mechanismen, wie der Expression von immunsuppressiven Zytokinen wie TGF-beta, IL-10 oder IL-35 zu einer Hemmung der Proliferation von Immunzellen sowie deren Inaktivierung oder sogar Apoptose beitragen. Bei den regulatorischen T-Zellen konnte in aktuellen Studien durch den immunhistochemischen Marker Fox-P3 bereits eine inverse Korrelation zwischen Zelldichte in der direkten Tumorumgebung und dem Gesamtüberleben beschrieben werden, wobei ein deutlich größerer Zusammenhang zum Gesamtüberleben meist anhand der Gesamtkonstellation mit anderen Immunzellmarkern wie z.B. CD8 beobachtet werden konnte<sup>82 83</sup>. Es werden weitere immunsuppressive Mechanismen wie die Bindung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-2 oder die Konkurrenz mit anderen antigenpräsentierenden Zellen um potentielle Effektorzellen vermutet<sup>84 85</sup>.

Da bei den regulatorischen B-Zellen bislang kein zuverlässiger immunhistochemischer Marker verfügbar ist, welcher die Unterscheidung von aktiven B-Zellen und Bregs ermöglicht, ist die eindeutige Analyse der Bregs mit den herkömmlichen immunhistochemischen Methoden nur sehr eingeschränkt möglich<sup>86</sup>.

Weiterhin ist ebenfalls nicht eindeutig geklärt, ob die immunsuppressiven Effekte bloß Ausdruck einer physiologischen Gegenreaktion aufgrund einer massiven Immunreaktion gegen den Tumor sind oder gezielt durch Signalwege des Tumors induziert werden können<sup>86</sup>.

Die genauen Zusammenhänge der Immunzell-Subpopulationen untereinander sowie mit dem Tumor sind weiterhin nicht ausreichend verstanden. Dennoch ist aufgrund der vorliegenden Daten von großem therapeutischem Potential auszugehen, welches durch die Bestrebungen zur Entwicklung zusätzlicher Selektionsmarker erschlossen werden könnte. Hierfür gibt es bereits einige Bestrebungen zur Entwicklung von Immunoscores, welche neben dem TNM-Stadium und den histopathologischen Kriterien, zur weiteren Präzisierung bei der Auswahl des Therapieregimens, hilfreich sein könnten<sup>87</sup>.

Eine Pilotstudie aus dem Jahr 2021 gibt ebenfalls deutliche Hinweise auf ein mögliches therapeutisches Potential der Immunzellen. Hier hatten sich Therapieregime, welche die Extrahierung von TILs mit anschließender Aufbereitung und Reinfundierung verwenden, als effektive und gut verträgliche Therapiemethode bei Patienten mit fehlendem Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren erwiesen<sup>88</sup>.

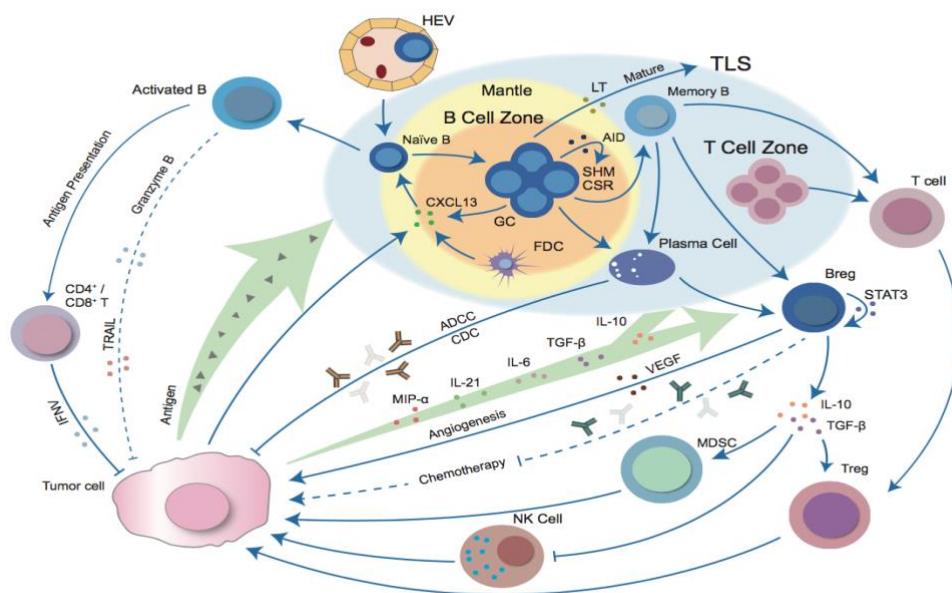


Abb.4: Mechanismen der antitumoral/proinflammatorischen Effekte, sowie immunsuppressiver Auswirkungen verschiedener Subpopulationen in der direkten Tumorumgebung von Adenokarzinomen der Lunge.

(Eigene Darstellung orientiert an Quelle: Wang SS, Liu W, Ly D, Xu H, Qu L, Zhang L. Tumor-infiltrating B cells: their role and application in anti-tumor immunity in lung cancer. *Cell Mol Immunol.* 2019 Jan;16(1):6-18. doi: 10.1038/s41423-018-0027-x. Epub 2018 Apr 8. PMID: 29628498; PMCID: PMC6318290.)

Die oben genannten Erkenntnisse deuten darauf hin, dass eine Berücksichtigung der Zusammensetzung der Immunzellsubpopulationen der direkten Tumorumgebung für die Patientenselektion und Therapieplanung relevant sein könnte.

Aktuell erfolgt die Selektion von potentiellen Patienten zur Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren ausschließlich über den PD-L1 Expressionsstatus des Tumors.



Die Expressionsdynamik des Checkpointproteins PD-L1 unterliegt einer gewissen Heterogenität. Die Expression kann sich lokal oder zwischen Primarius und Metastase durchaus unterscheiden und häufig besteht gerade bei kleinen Lungenbiopsien das Problem, dass bei sehr begrenztem Tumormaterial keine umfassende Diagnostik erstellt werden kann. Hier wäre es hilfreich durch die Evaluation der TIL einen zusätzlichen Parameter in die diagnostische Beurteilung mit einfließen zu lassen. Dieser Zusammenhang sollte in der vorliegenden Arbeit näher untersucht und zusätzlich mit den Daten zur Molekulargenetik korreliert werden.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Abhängigkeit der Immunreaktion vom pathologischen und klinischen Tumorstadium, da nach bisheriger Leitlinie der Therapiezeitpunkt ausschließlich im fortgeschrittenen, inoperablen Stadium lokalisiert ist. Aus unseren vorangegangenen Untersuchungen der direkten Tumorumgebung konnten wir bereits die absoluten Zahlen und relativen Verhältnisse der Immunzellsubpopulationen (B-Zellen, zytotoxische T-Zellen, PD-1 positive T-Zellen und regulatorische T-Zellen) ermitteln, welche in der vorliegenden Arbeit weiter mit den Daten des Langzeitüberlebens und der molekulargenetischen Analyse korreliert wurden<sup>68</sup>.

Auch bei der molekularstratifizierten Therapie ist die Bedeutung des Tumorstadiums auf den Therapieerfolg noch unklar. Nach neuesten Bestrebungen wird die Tauglichkeit dieser neuartigen Therapien auch bei früheren Stadien von Tumoren überprüft<sup>89</sup>.

#### **1.4) Fragestellung:**

Im Rahmen unserer vorangegangenen Untersuchungen an Immunzellsubpopulationen und der Expression von Checkpoint-Proteinen, konnten wir einen Einblick in die Verteilung der Expressionsstärke der Proteine PD-1/PD-L1 des „programmed death pathways“, der Anzahl der immunkompetenten Zellen der verschiedenen Subpopulationen im Tumorstroma, sowie der Anzahl von B-Follikeln im Tumorrandbereich und deren Abhängigkeit vom pathologischen Tumorstadium, erhalten. Dort zeigte sich eine signifikant geringere Anzahl PD-1 positiver T-Zellen sowie eine tendenziell geringere Anzahl zytotoxischer T-Zellen in den fortgeschrittenen Tumorstadien gegenüber den frühen Tumorstadien. Dies zeigte sich anhand der im Tumorstroma lokalisierten TIL's sowie den im Tumorrandbereich lokalisierten B-Follikeln. Auf Basis dieser vorausgegangenen Ergebnisse sollte in der vorliegenden Arbeit die Entzündungsreaktion der direkten Tumorumgebung in den unterschiedlichen Tumorstadien von Adenokarzinomen der Lunge nach UICC und der Expression des Checkpointproteins PD-L1, anhand der Verteilung von Immunzellsubpopulationen der B-Zellreihe (CD19+ und CD20+ B-TILs), T-Zellreihe (CD3, CD8, PD-1 und Fox-P3) und der randständigen B-Folikellanzahl (CD19+ und CD20+), untersucht werden.

Dazu wurden alle Tumorproben mittels NGS auf das Vorliegen therapeutisch relevanter Genalterationen untersucht. Dies erfolgte zum Einen zum Vergleich mit den bisherigen Prävalenzen aus deutschen und internationalen Studienkollektiven der letzten Jahre, sowie zur Untersuchung eines möglichen Unterschiedes der Immunreaktion auf Tumore mit Treibermutationen anhand der genannten Immunzellmarker sowie eines möglichen Einflusses auf den Status der PD-L1 Expression.

Zuletzt sollte neben den Zusammenhängen von klinischem Tumorstadium, Treibermutationen und Tumor-assoziiertes Immunreaktion der Einfluss der einzelnen Phänomene auf das Gesamtüberleben der einzelnen Patienten überprüft werden, um bekannte prognostische Einflüsse der unterschiedlichen Biomarker zu bestätigen und mögliche neue Einflüsse zu identifizieren.

## **2) Material und Methode:**

### **2.1) Patientenkollektiv:**

Aus dem Archiv des Institutes für Hämatopathologie Hamburg wurden retrospektiv 179 Resektate von bereits diagnostizierten Adenokarzinomen der Lunge ermittelt. Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen erfolgten gemeinsam mit der Leitung des Institutes Prof. Dr. M. Tiemann (Facharzt für Pathologie).

Um eine Vergleichbarkeit und Repräsentanz der Fälle gewährleisten zu können, wurden die Fälle nach definierten Einschlusskriterien ausgewählt. Die Fälle mussten die gesicherte Diagnose eines Adenokarzinoms der Lunge beinhalten sowie in den Jahren 2013 bis 2015 operiert worden sein. Zudem musste es sich um ein Resektat handeln, welches über ausreichend Tumorgewebe zur molekulargenetischen und Immunhistochemischen Analyse verfügt.

Anhand der, zu den Resektaten passenden, histopathologischen Befunde wurde das pathologische T-Stadium (pT1-pT4) und klinische Stadium (UICC I-IV) der Tumore ermittelt. In 3 Fällen handelte es sich um Fernmetastasen (M1a), welche dem klinischen Stadium IV zugeordnet wurden. Bei einem Fall war keine Angabe zum klinischen und pathologischen Tumorstadium angegeben, sodass dieser von der statistischen Analyse ausgeschlossen wurde.

Da in einigen Fällen keine genauen Angaben zum klinischen Stadium nach UICC gemacht wurde, gingen wir bei fehlender Einsendung von Lymphknotenmaterial oder Fernmetastasen im Verlauf von einem klinisch und radiologisch unauffälligen Befund, zum Entnahmezeitpunkt des Primarius, aus.

Die Operationen erfolgten hauptsächlich in der Thoraxchirurgie des Asklepios Krankenhauses Harburg, sowie in einigen wenigen Fällen in der Thoraxchirurgie des Asklepios Krankenhauses Barmbek.

Da für einige Patienten eine Vielzahl von Tumorblöcken im Archiv vorlag, wurde anhand der bereits vorhandenen, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten, Schnitte der tumorreichste Block herausgesucht, welcher für die Anfertigung aller immunhistochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen verwendet wurde. Somit wurde pro Fall nur ein Block verwendet.

Zur Selektion der geeignetsten Blöcke erfolgte eine Kontrolle der zuvor gestellten Diagnose sowie die Ermittlung der absoluten Menge des Tumorgewebes für die Schnitthanfertigung und

die molekulargenetische Analyse. Hierfür musste entsprechend der Tumorblock mit dem größten Tumoranteil ermittelt werden.

Von den zu Beginn untersuchten 179 Fällen entsprachen 156 den gegebenen Kriterien. Die Sequenzierung per NGS konnten bei 133 der 156 Fälle durchgeführt werden. Bei den fehlenden 23 Fällen war eine Sequenzierung aufgrund mangelnder DNA-Qualität nicht möglich.

Bei 42 Patienten konnte den Krankenakten weitere maligne Neoplasien in ihrer Vorgeschichte entnommen werden.

## **2.2) Schnitteinanfertigung und Färbung:**

### **2.2.1) Schnitteinanfertigung und Färbetechnik:**

Zur Herstellung der Untersuchungspräparate werden die Paraffinblöcke auf 0° Celsius heruntergekühlt und mit einem Rotationsmikrotom (Modell RM 2255 der Firma Leica, Nussloch Deutschland) in 2-3 Mikrometer dünne Scheiben geschnitten.

Diese werden in einem Wasserbad bei etwa 25° Celsius auf einen Objektträger aufgezogen.

Es erfolgt anschließend eine Trocknung bei etwa 60° Celsius in einem Brutschrank der Firma Memmert (Schwabach, Deutschland) sowie eine Routinefärbung mit Hämatoxylin-Eosin mit einem Linearfärber der Firma Leica (Nussloch, Deutschland).

Vor dem Färbeprozess ist eine Rehydrierung und eine Entparaffinierung der Schnitte erforderlich. Dies erfolgt durch eine spezielle Lösung (EZ Preparation Concentrate der Firma Roche Diagnostics, Mannheim Deutschland) sowie die Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe.

Der Färbeprozess selbst erfolgte automatisiert durch einen Färbeautomaten des Modells „Benchmark ultra“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland). Ausnahmen stellten hierbei die Antikörper für Fox-P3 und ALK dar. Diese wurden mit einem Bond-Max Automaten der Firma Leica Biosystems (Nussloch, Deutschland) gefärbt.

Bei dem Färbeprozess erfolgt zunächst eine Erhitzung der Schnitte auf etwa 100° Celsius, um die Epitope für die Antikörper zugänglich zu machen sowie um Aldehydquervernetzungen zu öffnen, welche beim Konservierungsprozess durch Formalin entstehen.

Anschließend muss eine Behandlung mit einer „Cell Conditioning Solution“ (Roche Diagnostics) durchgeführt werden und eine Inkubation mit Wasserstoffperoxid erfolgen, um eine Aktivität der endogenen Peroxidase zu ermöglichen.

Anschließend kann der gewünschte Antikörper in der vorgeschriebenen Verdünnung hinzugegeben und für die entsprechende Zeit inkubiert werden. Die Inkubation erfolgt hierbei bei einer Temperatur von etwa 36° Celsius.

Die Anfärbung der Zellkerne und des Lungengewebes erfolgte hierbei mit einer Gegenfärbung, bestehend aus Hämalaun und Bluing Reagenz, welche für etwa 2 Minuten hinzugegeben werden.

Zwischen jedem Färbeschritt muss hierbei eine Reinigung mit einem Waschpuffer (Reaction Buffer Concentrate in 10-facher Verdünnung der Firma Roche) erfolgen.

Bei diesem Verfahren wird anstatt eines Deckglases ein Ölfilm verwendet, welcher eine Verdunstung verhindern soll. Dieser wird nach dem Färbeprozess in einem Heißwasserbad entfernt.

Nach einer Behandlung mit Aquadest (de-ionisiertes Wasser) sowie einer Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol, erfolgt die Eindeckung durch einen Eindeckautomaten der Firma Sakura (Staufen, Deutschland). Dieser verwendet ebenfalls kein Deckglas, sondern eine spezielle Folie (Tissue-Tek 4770 Coverslipping Film).

Eine Ausnahme bei der Färbung stellen hier die Antikörper Fox-P3 und ALK dar. Diese wurden nicht mit einem Roche Gerät, sondern mit dem Bond-Max Automaten der Firma Leica Biosystems (Nussloch, Deutschland) gefärbt. Die Arbeitsschritte der beiden genannten Verfahren ähneln sich, wobei jedoch ein anderes Detektionssystem verwendet wird. Bei dem Bond Max Automat wurde das „Refine-kit“ verwendet. Zum direkten Nachweis der Zielproteine wird auch hier ein Polymersystem verwendet sowie eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, zur Darstellung der Zellkerne, durchgeführt. Zusätzlich erfolgt hierbei ein direkter Nachweis der Ziel-RNA durch Diaminobenzidin (fixed DAB Refine).

### **2.2.2) Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie wird zur Detektierung bestimmter Proteine auf Zielgeweben und Strukturen angewandt. Hierfür können Antikörper generiert werden, welche die Zielproteine selektiv erkennen und anschließend markieren können.

Für die Anfärbung der durch den Antikörper markierten Zielstruktur wird ein Detektionssystem angewandt, welches bei der Bindung an den Primärantikörper aktiviert wird und die Zielstruktur somit, z.B. farblich, markiert.

Hierbei können direkte und indirekte Systeme unterschieden werden. Bei der direkten Methode ist das Detektionssystem bereits im Primärantikörper enthalten, während bei der indirekten Methode ein zusätzlicher Antikörper mit einem Detektionssystem in einem zweiten Schritt hinzugegeben wird, welcher an den Primärantikörper bindet und die Zielstruktur somit markiert.

Eine spezielle Methode stellt das Polymersystem dar. Hierbei wird, wie bei der direkten Methode, ein Primärantikörper verwendet, welcher mit einem Polymer gekoppelt ist. Das Polymer verfügt hierbei über eine hohe Anzahl von verschiedenen Enzymen, welche beim Binden des Antikörpers zu einer Verstärkung der Farbreaktion führen. Die Farbreaktion wird durch eine kompakte molekulare Struktur zusätzlich verstärkt, da mehr Antikörper an die Zielstrukturen binden können und somit eine höhere Sensitivität ermöglichen.

Bei Bedarf kann durch ein Mischen der Dextranpolymere eine zusätzliche Steigerung der Sensitivität erreicht werden.

### **2.3) Immunhistochemische Analyse der TIL, Checkpoint Proteine und P53:**

Es erfolgte eine immunhistochemische Analyse dieser Fälle hinsichtlich der Subpopulationen immunkompetenter Zellen in der direkten Tumorumgebung, der Checkpoint Proteine PD-1 und PD-L1 sowie der mutierten Form des P53 Proteins.

Zum Nachweis der T-Lymphozyten wurden die Marker CD3, CD8, Fox-P3 und PD-1 angefärbt.

CD3 ist ein Bestandteil des T-Zell-Rezeptor-CD3 Komplexes, welcher eine Aktivierung der T-Zellen ermöglicht. Durch seine Expression auf zytotoxischen und T-Helferzellen gilt er als Pan-T-Zellmarker.

Einen spezifischeren Marker für die zytotoxischen T-Zellen stellt der Marker CD8 dar. Er bindet den „major histocompatibility complex I“, welcher die Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Zellen ermöglicht. Der Marker CD8 ist typisch für die zytotoxischen T-Zellen sowie deren direkte Vorläufer.

Das Forkhead-Box-Protein P3 (Fox-P3) bezeichnet einen Transkriptionsfaktor, welcher die Immunantwort durch die Steuerung der Expression regulatorischer Proteine beeinflusst. Dieser ist spezifisch für die regulatorischen T-Zellen, welche eine Untergruppe der T-Zellen darstellen und die Immuntoleranz fördern.

Ein weiterer Marker für die T-Zellen und zugleich eines der Checkpoint Proteine ist das Protein PD-1. Dieses ist Teil der B7-CD28- Superfamilie<sup>90</sup> und ist der Rezeptor für die Liganden PD-L1 und PD-L2, mit denen er inhibitorisch auf das Immunsystem wirkt.

Dieser Mechanismus hat einen physiologischen Stellenwert zur Prävention von Autoimmunerkrankungen, wobei jedoch auch eine adäquate Immunantwort auf maligne Zellen abgeschwächt oder sogar verhindert werden kann.

Für die Detektion der Lymphozyten der B-Zellreihe wurden die Antikörper CD19 und CD20 verwendet.

Als Pan-B-Zellmarker wurde das Protein CD19 verwendet, da dieses als Ko-Molekül des B-Zell-Rezeptors auf B-Zellen, Plasmazellen und deren Vorläufern zu finden ist.

Das Oberflächenantigen CD20 hingegen ist spezifischer, da es für die späteren Stadien der B-Zellen spezifisch ist, jedoch nicht auf Plasmazellen und Pro-B-Zellen vorkommt.

Somit konnte durch die Differenz zwischen den beiden B-Zellmarkern auch, zumindest orientierend, eine Beteiligung der Plasmazellen an der B-Zellreaktion ermittelt werden.

Gezählt wurden jeweils intensiv braune Anfärbungen einer lymphatischen Zelle innerhalb des Tumorgewebes.

Zur Detektion der Makrophagen wurde das Antigen CD68 angefärbt. Hierbei handelt es sich um ein Glykoprotein, welches vermutlich Schutz vor sauren Hydrolasen gewährt.

Gezählt wurden intensiv braun angefärbte Zellen des mononukleären Phagozytensystems, welche sich innerhalb des Tumorgewebes befanden.

Ein weiterer Parameter war das P53 Protein, welches ein wichtiges Tumorsuppressorgen darstellt und vielfältige Aufgaben übernimmt. Bei einem DNA-Schaden wird es aktiviert und unterbricht zunächst den Zellzyklus. Je nach Ausmaß der DNA-Schäden können anschließend DNA-Reparaturenzyme aktiviert, oder der Apoptosemechanismus eingeleitet werden.

Tumore wurden als P53 positiv bezeichnet, wenn intensiv braune Anfärbungen der Zellkerne bei mehr als 20% der Tumorzellen nachweisbar war.

Das zweite Checkpoint Protein PD-L1, welches einen Liganden für den Rezeptor PD-1 darstellt und gemeinsam den „programmed-cell-death-pathway“ bilden, kann auf den

Tumorzellen exprimiert werden und somit durch Bindung an den PD-1 Rezeptor immunkompetenter Zellen eine physiologische Immunantwort abschwächen.

Für die Detektion von PD-L1 wurden 2 Antikörper verwendet, wobei sich der Klon Sp263 als sensitiver, im Vergleich zum Sp142-Klon, erwies und für die Ergebnisermittlung verwendet wurde. Der Sp142 Klon hingegen fand in der statistischen Analyse keinerlei Berücksichtigung.

Als positiv gewertet wurden intensiv braune, membranständige Anfärbungen von Tumorzellen und immunkompetenten Zellen.

Die Unterscheidung von PD-L1 positiven Immunzellen und Tumorzellen ist hierbei nicht immer abschließend möglich. Zur Unterscheidung der Zelltypen bei der Auswertung wird im klinischen Alltag sowie bei den bisherigen Studienanalysen auf die individuelle Erfahrung des Pathologen zur Unterscheidung der beiden Zelltypen anhand der Grundfärbungen mit Hämatoxylin und Eosin sowie deren Anordnung zueinander, vertraut. Bei vereinzelt Zellen ist aufgrund der histologischen Merkmale jedoch keine eindeutige Aussage für eine Zuordnung möglich. Aufgrund der semiquantitativen Bestimmung der PD-L1 Positivität in lediglich 3 große Kategorien (Negativ, 1-49% und >50%) ist der Einfluss dieses Umstandes auf die statistische Analyse jedoch unwahrscheinlich. Die Plausibilität der ausgewerteten Ergebnisse wurden in unserem Kollektiv durch die Supervision von Herrn Prof. h.c. Dr. Tiemann sichergestellt.

Antikörper	CD3	CD8	CD19	CD20	CD68
Clone	2VG6	SP57	CE-CD19	L26	PG-M1
Firma	Roche	Roche	Dako	Roche	Dako
Verdünnung	RTU	RTU	1:50	RTU	1:100
Vorbehandlung	CC1 (Puffer), 32 Minuten, 90 Grad	CC1 (Puffer), 32 Minuten, 90 Grad	CC1(Puffer), 56 Minuten, 90 Grad	CC1(Puffer), 32 Minuten, 90 Grad	CC1(Puffer), 32 Minuten, 90 Grad
Antikörper Inkubationszeit	16 Minuten	16 Minuten	32 Minuten	16 Minuten	16 Minuten
Kontrolle	Tonsille	Tonsille	Tonsille	Tonsille	Tonsille

Tabelle 1: Klon, Hersteller, Verdünnung, Vorbehandlung, Inkubationszeit und Kontrolle der verwendeten Antikörper.



Antikörper	PD-1	ALK	P53	Fox P3	PD-L1 Sp263
<b>Clone</b>	NAT-105	D5F3	DO7	SP97	Sp263
<b>Firma</b>	Roche	Biolaps	Roche	Zytomed	Roche
<b>Verdünnung</b>	RTU	1:1000	RTU	1:100	RTU
<b>Vorbehandlung</b>	CC1(Puffer), 64 Minuten, 90 Grad	30 Min ER1 (PH6)	CC1(Puffer), 32 Minuten, 90 Grad	30 Min ER1 (PH 6)	CC1(Puffer), 64 Minuten, 90 Grad
<b>Antikörper inkubationszeit</b>	32 Minuten	15 Minuten	16 Minuten	15 Minuten	16 Minuten
<b>Kontrolle</b>	Tonsille	Appendix	Mamma- Karzinom	Tonsille	Tonsille

*Tabelle 2: Klon, Hersteller, Verdünnung, Vorbehandlung, Inkubationszeit und Kontrolle der verwendeten Antikörper.*

### **2.3.1) Immunhistochemische Analyse:**

Die lichtmikroskopische Auswertung der 156 Fälle erfolgte mit einem Mikroskop der Firma Nikon eclipse, Modell 80i. Für die Ermittlung vergleichbarer Daten wurden 3 High-Power-Fields in repräsentativen Tumorarealen ausgewertet.

Das sogenannte High Power Field (HPF) ist eine feste Größe in der pathologischen Diagnostik und ist definiert als Sichtfeld unter 400-facher Vergrößerung, die sich aus einer 40x Objektiv- und 10x Okular- Vergrößerung ergibt. Das HPF kann bei Benutzung unterschiedlicher Mikroskope leicht variieren. Sämtliche Daten der vorliegenden Arbeit wurden daher anhand desselben Mikroskops erhoben, um eine technische Variabilität auszuschließen.

Bei den Antikörpern CD3, CD8, Fox-P3, CD19, CD20 und PD-1 wurden die Ergebnisse in absoluten Zahlen ermittelt.

Die Makrophagen und B-Follikel hingegen wurden semiquantitativ in 4 Kategorien (negativ, gering, mäßig und stark) unterteilt.

Bei den mit den Antikörpern PD-L1 (Sp142 und Sp263) gefärbten Schnitten wurden der Anteil der PD-L1 exprimierenden Zellen in Prozent angegeben. Hierbei wurden Tumorzellen und immunkompetente Zellen berücksichtigt.

Die mit dem P53-Antikörper gefärbten Schnitte wurden je nach Anteil der angefärbten Tumorzellen in positiv (>20% der Tumorzellen) oder negativ (<20% der Tumorzellen) unterschieden.

Die Auszählung erfolgte durch den Doktoranden Peter Zink in Supervision mit Herrn Prof. H.c. Dr. Markus Tiemann (Facharzt für Hämatopathologie).

Neben der immunhistochemischen Analyse erfolgte eine Analyse der Tumor-DNA hinsichtlich verschiedener Treibermutationen. Hierzu wurde ein Lungenpanel des hämatopathologischen Instituts Hamburg angewandt (siehe Kapitel 2.3.5, Seite 37). Die DNA Sequenzierung erfolgte durch ein Verfahren des Next Generation Sequencing mit dem Automaten „Illumina MiSeq“ (Illumina, San Diego, USA).

### **2.3.2) Next Generation Sequencing:**

Die DNA-Sequenzierung bezeichnet die Bestimmung der Nukleotidabfolge eines DNA-Stranges und ist die Grundlage der Genomik.

Sie findet Anwendung in der Analyse genetischer Erkrankungen und spielt auch in molekularbiologischen oder laborchemischen Prozessen eine tragende Rolle.

Lange Zeit waren die Sanger-Methode oder modifizierte Versionen der Goldstandard der genetischen Analyse. Diese Verfahren waren jedoch zu aufwändig für umfassende Analysen großer Genabschnitte, sodass neue Methoden entwickelt wurden, die zunächst zur zweiten Generation und schließlich zum „Next Generation Sequencing“ führten.

„Next Generation Sequencing“ ist ein Sammelbegriff für verschiedene neuartige Sequenzierungsmethoden, welche parallel verwendet werden können und somit eine simultane Analyse vieler Millionen Basenpaare ermöglichen. Diese neuen Techniken ermöglichen somit die Sequenzierung eines kompletten menschlichen Genoms innerhalb eines Tages<sup>91</sup>.

Angesichts der großen Anstrengungen über einen Zeitraum von 13 Jahren (1990 bis 2003), welche im Rahmen des „Human Genome Projects“ vorgenommen wurden, kommt dies einer Revolution in der Genomik gleich<sup>92</sup>.

Die entsprechenden Verfahren werden bereits im klinischen Alltag angewendet, indem beim Vorliegen von bestimmten Erkrankungen standardisierte Panels bekannter Mutationen ausgewertet werden. Diese können in einigen Fällen bereits mit neuartigen Medikamenten der molekular stratifizierten Therapie behandelt werden.

Wie bei allen Verfahren der Genanalyse können per NGS nur Veränderungen in den entsprechenden Genabschnitten untersucht werden. Da bei einer Translokation der Genabschnitt selbst nicht verändert ist, und nur durch die Veränderung seiner Lokalisation zur Tumorentstehung beiträgt, sind Fusionsgene wie das EML-4-ALK Gen mit diesem Verfahren nicht nachweisbar. Diese müssen zusätzlich durch den Nachweis einer ALK-Amplifikation in der Immunhistochemie oder per FISH ermittelt werden.

### **2.3.3) Funktionsweise der Sequenzierung:**

Nach der Präparation und Extrahierung der Tumor-DNA müssen weitere Präparationsschritte angeschlossen werden. Hierzu gehört die Vervielfältigung und Fragmentierung der DNA. Beim sogenannten A-Tailing werden mehrere Adenosin-Basen am 3'-Ende des DNA Stranges angefügt. Hinzu kommt die sogenannte Ligation von Adapter bzw. Primer an den beiden Enden des DNA-Stranges. Diese sind später für die Bindung an komplementäre Stränge des „Cell Flow“ und anderer Oligonukleotide nötig. Da mehrere Genomabschnitte parallel untersucht werden können, ist eine Markierung der DNA Fragmente durch weitere Primer (sogenannte Barcodes) erforderlich.

Nach der Durchführung sämtlicher Modifizierungen wird die Gesamtheit der DNA-Fragmente als „Library“ bezeichnet.

Die Library wird im nächsten Schritt auf eine „Flow Cell“ gegeben. Dies sind Plattformen welche komplementäre Oligonukleotide, passend zu den Adaptern der Library, tragen. Somit werden die DNA Fragmente auf der „Flow Cell“-Plattform fixiert.

Der Adapter auf der anderen Seite der DNA hingegen hat die Gelegenheit sich mit weiteren Oligonukleotiden zu verbinden.

Nach der Zugabe von Nukleotiden und Polymerasen erfolgt die Replikation der DNA zu einer Doppelbrücke (sogenannte „Bridge Amplification“), welche durch die Erhitzung des Thermozyklers wieder gespalten wird. Durch mehrere Zyklen werden hierbei etwa 1000 Kopien hergestellt, welche sogenannte Cluster ergeben.

Diese Cluster sind die Voraussetzung für die folgende Sequenzierung. Diese erfolgt durch das Hinzufügen von dNTPs. Diese haben zwei Funktionen. Zum einen tragen sie Fluoreszenzfarbstoffe und markieren die entsprechenden Basen für das Auswertungsprogramm. Zum anderen verhindern sie das Anheften weiterer Basen an den DNA-Strang durch die Polymerase. Somit kann eine Detektion der entsprechenden Base

durch den Farbstoff erfolgen. Durch eine enzymatische Spaltung wird der Farbstoff entsprechend freigesetzt und die Amplifikation kann fortgesetzt werden. Durch die Wiederholung des Vorgangs kann schließlich das gesamte Genom entschlüsselt werden. Die Auswertung der Daten erfolgt anschließend durch eine spezielle Software, welche die Ergebnisse mit einem Referenzgen vergleicht.

#### **2.3.4) Arbeitsablauf nach Standard des Hämatopathologischen Instituts Hamburg**

Als Ausgangsmaterial wird beim Next-Generation-Sequencing das Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Tumorgewebe verwendet.

Für die Markierung des Tumorgewebes im Schnitt werden zunächst HE-Schnitte des Tumorgewebes angefertigt, welche von einem Pathologen überprüft und in den tumorreichen Arealen markiert werden. Der Sequenzierungsprozess selbst gliedert sich hierbei in 4 Hauptschritte. Begonnen wird mit der Mikrodissektion durch den Mikrorotatoren „Leica LMD 6500“ (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland). Hier wird mit einem Laser das entsprechend markierte Tumorareal vom restlichen Schnitt getrennt.

Es folgt die DNA-Extraktion als zweiter Schritt mithilfe unterschiedlicher DNA-Extraktionskits, wie dem „Maxwell Purifications kit“.

Nach erfolgter DNA Extraktion kann die Amplifikation durch die Zugabe von Nuclease, freiem H<sub>2</sub>O, der gewünschten Primer sowie einer bestimmten „Mastermix“ Lösung begonnen werden.

Zu etwa 8 Mikroliter Mastermix in 3 Fraktionen werden jeweils die DNA-Proben hinzugegeben, welche auf etwa 5ng/Mikroliter verdünnt werden.

Die DNA-Proben werden anschließend in einen Thermozykler gegeben, welcher nach einem festgelegten Zyklus die Temperaturen für die entsprechenden Reaktionsschritte einstellt.

Hierbei kommt das sogenannte „MiSeq Amplification I“ Programm zum Einsatz.

Nach diesem Programm werden die Proben zunächst für 2 Minuten auf 99° Celsius erhöht. Es folgen anschließend 26 Zyklen, von hohen Temperaturen (99° Celsius), für etwa 15 Sekunden und moderaten Temperaturen, von etwa 60° Celsius, für etwa 4 Minuten.

Nach dem Durchlauf des letzten Zyklus werden die Proben auf etwa 10° heruntergekühlt. Anschließend können aus den amplifizierten DNA Proben eine „digital Library“ erstellt werden. Diese kann anschließend auf der darauffolgenden MiSequenz laufen und somit sequenziert werden.

Die somit gewonnenen Sequenzierungen können anschließend mit einer speziellen Software ausgewertet werden. In diesem Falle wurde die „SeqNext“-Software (JSI Medical Systems GmbH, Ettenheim) verwendet.

### **2.3.5) Das Lungenpanel des Hämatopathologischen Instituts Hamburg:**

Zu dem Lungenpanel zählen 17 Mutationen, welche im Nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinom als therapierelevante Mutationen bekannt sind. Insbesondere die Treibermutationen sind vor allem beim Adenokarzinom zu finden und haben für die Auswahl des Therapieschemas eine hohe Relevanz.

Von den 156 herausgesuchten Fällen konnten bei 133 qualitativ ausreichende DNA extrahiert und per NGS sequenziert werden.

#### **ALK:**

Die anaplastic lymphoma kinase (ALK) ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die bei einer Vielzahl von Tumoren auftritt. Auch beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) ist sie mit 6-7% der Fälle relativ häufig nachweisbar. Die Aktivierung dieses Onkogens erfolgt meist über eine Fusion mit anderen Genen, wie dem EML-4 Gen, durch eine Gen-Amplifikation oder aktivierende Mutationen des Gens selbst. Betroffen sind oft Patienten in jungem Alter ohne Raucheranamnese. Patienten bei denen eine entsprechende Genmutation nachgewiesen wird, kann eine entsprechende Therapie mit TKIs, vorzugsweise Alectinib, angeboten werden. Mit dem „Next generation sequencing“ können lediglich die Basenabfolgen des untersuchten Gens dargestellt werden. Eine Translokation mit der Fusion eines anderen Gens ist somit mit der genannten Technik nicht detektierbar. Für die Mutationen im ALK-Gen wurden Abschnitte im Chromosom 2, Exon 22-25 untersucht. Der Nachweis von ALK Translokationen hingegen wurde immunhistochemisch mit der Detektion einer ALK-Amplifikation nachgewiesen.

#### **AKT-1:**

Die Protein Kinase B Alpha ist eine Serin/Threonin-Protein-Kinase und ist in verschiedenen Tumoren, wie z.B. der Haut, den weiblichen Geschlechtsorganen oder der Lunge nachweisbar. Eine onkogene Mutation im AKT-1 Gen führt zu einer Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges<sup>93</sup>. Die Untersuchung des AKT-1 Gens erfolgte in dem Genabschnitt des 4 Exons von Chromosom 14.

### BRAF:

BRAF ist eine Serin/Threonin Kinase, welche nach einer onkogenen Mutation zu einer Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges führt. Der Nachweis einer BRAF Mutation ist generell mit einer schlechten Prognose korreliert und kommt vorwiegend bei Tumoren der Haut oder der Schilddrüse vor. Mit nur 3-4% der Fälle ist sie bei Lungentumoren eher selten. Die häufigste der BRAF Mutationen stellt die V600E Mutation dar. In ihrem Fall ist eine Kombinationstherapie mit dem BRAF-Inhibitoren Dabrafenib und Trametinib zugelassen<sup>44 45</sup>  
46.

Untersucht wurden die Genabschnitte der Exone 11 und 15 von Chromosom 7.

### CTNNB1:

Das cadherin-associated protein beta 1 kodiert das Beta-Catenin, welches zum Wnt Signalweg zählt. Durch eine CTNNB1 Aktivierung kommt es zu einer dauerhaften Akkumulation des Beta-Catenin Proteins, was zu einer ständigen Aktivierung der Gene MYC und CCND1 führt. Ein Auftreten in Lungentumoren ist selten. Vorwiegend sind diese Mutationen bei Lebertumoren oder gynäkologischen Neoplasien zu finden<sup>94 95</sup>. Untersucht wurde der Genabschnitt des Exon 3 von Chromosom 3.

### DDR2:

DDR2 steht für „discoidin domain receptor 2“ und ist eine Thyrosin-Kinase, welche vor allem beim Plattenepithelkarzinom der Lunge nachweisbar ist. Durch die Bindung an Kollagen fördert DDR2 die Zellmigration, Überleben und Proliferation<sup>96</sup>.

Mit einem Auftreten in 3-4% der Plattenepithelkarzinome gehört sie ebenfalls zu den eher seltenen Treibermutationen. In Einzelfällen wurde ein Ansprechen auf Dasatinib vermutet<sup>97</sup>.

In unserem Genpanel wurde zur Detektion das gesamte Chromosom 1 sequenziert.

### EGFR:

Der „Epidermal growth factor receptor“ ist eine relativ häufig mutierte Thyrosin Rezeptor Kinase und kommt bei etwa 10-15% der Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge vor. Bei diesen Patienten handelt es sich überwiegend um junge Frauen ohne Raucheranamnese. Im klinischen Alltag kommen bereits mehrere TKIs zur Behandlung jener Treibermutationen zum Einsatz. Bei der Ausbildung bestimmter Resistenzmutationen wie der 858R oder T790 Mutation ist eine Therapie mit TKIs der dritten Generation möglich<sup>26 98</sup>.

Zur Detektion einer Mutation wurden die Exone 18-21 des Chromosoms 7 detektiert.

### FGFR2:

FGFR2 steht für „Fibroblast Growth Factor Receptor“ und gehört zur Familie der Tyrosin Kinasen. Eine Aktivierung von FGFR2 kann durch Mutationen, Amplifikationen und Genfusionen erfolgen. Sie sind beim Plattenepithelkarzinom der Lunge beschrieben worden, doch sind sie deutlich häufiger bei gynäkologischen Neoplasien oder Magentumoren<sup>99</sup>. Zum Nachweis einer entsprechenden Mutation wurde das gesamte Chromosom 10 sequenziert.

### HER2/ERBB2:

Der „Human epidermal growth factor receptor 2“ wird meist durch eine Amplifikation des gesamten Gens aktiviert. Andere Mechanismen sind die Überexpression oder die Mutation. Typisch ist diese Mutation für Tumore der Brust. Generell kann sie jedoch bei allen Adenokarzinomen, darunter auch in der Lunge (ca. 2-4% der Fälle), auftreten<sup>100</sup>. Oft sind erworbene Mutationen im HER2-Gen verantwortlich für eine EGFR-TKI Resistenz<sup>101</sup>. Während zielgerichtete Therapieansätze bei Magen- und Mammakarzinomen bereits zugelassen sind<sup>102 103</sup>, konnte bei Lungentumoren kein ähnlich großer Effekt wie beim Brustkrebs reproduziert werden, sodass es nicht zur Zulassung von Trastuzumab oder Pertuzumab kam<sup>104</sup>. Untersucht wurde das Exon 20 von Chromosom 17.

### HRAS:

HRAS gehört zu der Familie der RAS-Proteine, welche die häufigste Gruppe von mutierten Proteinen in Tumoren des Menschen darstellen. Mit einer Häufigkeit von etwa 3%, auf alle Tumorentitäten gesehen, macht HRAS hierbei jedoch einen eher kleinen Anteil aller RAS-Mutationen aus. Die gängigsten Tumore von HRAS stellen hierbei Tumore des Urogenitaltraktes, der Haut und der Speicheldrüsen dar<sup>105</sup>. In unserem Panel erfolgte die Detektion in den Exonen 2-4 von Chromosom 11.

### NRAS:

Wie HRAS und KRAS gehört auch NRAS zur Gruppe der small GTPase Superfamilie. Auch hier sind die Mutationen meist auf den Codons 12,13 und 61 lokalisiert. Das häufigste Auftreten von NRAS zeigt sich bei Neoplasien der Haut und des hämatopoetischen Systems<sup>105</sup>. Die Sequenzanalyse erfolgte in unserem Panel in den Exonen 2-4 von Chromosom 1.

### KRAS:

KRAS stellt mit etwa 25%-35% der Fälle die häufigste Treibermutation des Lungenkarzinoms dar. Sie gehört zu den GTPase abhängigen Kinasen und tritt in einem breiten Spektrum von Tumoren auf. Die Aktivierung erfolgt hierbei durch eine Amplifikation oder durch eine Akkumulation von Mutationen in den Codons 12,13 und 61, welche zu einer Daueraktivierung des Proteins führen.

Eine KRAS Mutation ist oft mit einer schlechten Prognose verbunden, da es sich bei diesen Tumoren oft um sehr aggressive Formen handelt, welche nicht auf eine Therapie mit TKIs ansprechen<sup>106</sup>. Ansätze für die gezielte Therapie sind derzeit Bestandteil klinischer Studien<sup>107</sup>  
108 109 110 .

Die Sequenzierung erfolgte in den Genabschnitten der Exone 2-4 des Chromosom 12.

### MAP2K1:

Die „Mitogen activated protein kinase 1“ codiert die Kinase MEK1, welche einen essentiellen Bestandteil des MAP Kinase Signalweges darstellt. Diese Mutationen wurden in einigen Fällen bei Melanomen, Ovarialtumoren, kolorektalen Tumoren und NSCLCs nachgewiesen. Klinische Bedeutung haben diese Mutationen vor allem für Melanompatienten, da diese eine Resistenz gegenüber BRAF-Inhibitoren aufweisen<sup>111</sup>. Die Genanalyse erfolgte im 2. Exon von Chromosom 15.

### MET:

Das MET-Gen enkodiert den „hepatocyte growth factor receptor“, welcher vor allem durch Mutationen und Amplifikationen aktiviert wird. Außerdem sind einige Fälle einer Genfusion beschrieben. Eine gängige Hypothese stellt die „Progenitorzell-Hypothese“ dar. Hierbei wird davon ausgegangen, dass es Stammzellen im bronchioalveolaren Raum gibt, welche HGF und MET exprimieren. Unter dem Einfluss von Entzündungen oder mechanischen Schaden kann es schließlich zu einer Überexpression dieser Wachstumsfaktoren kommen<sup>112 113</sup>. Die Aktivierung der Treibermutation MET kann eine Resistenz gegenüber einer TKI-Therapie verursachen<sup>50</sup>, führt jedoch auch zu einer Sensibilisierung gegenüber einer Therapie mit MET-Inhibitoren wie Crizotinib.

Die Sequenzanalyse erfolgte im 2. Exon von Chromosom 7.



### PI3KCA:

Die Phosphatidyl 3-kinase (PI3K) ist eine Familie von Lipid Kinasen, welche in eine Vielzahl von Zellprozessen involviert ist. Hierzu zählen auch die Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Motilität und Überleben.

Das PI3KCA-Gen enkodiert die katalytische p110a Untereinheit der phosphatidyl Inositol 3 Kinase (PI3K). Durch eine Aktivierung von PI3K wird die Translokation von AKT in der Zellmembran sowie der mTOR Signalweg aktiviert, was eine Tumorentstehung begünstigt. Bei Lungenkarzinomen kommen sie nur in etwa 1-3% der Fälle vor. Derzeit gibt es noch keine zielgerichtete Therapie. Inhibitoren des Proteins werden jedoch derzeit in einer Reihe von Studien erprobt<sup>114</sup>.

Für die Sequenzanalyse wurde das komplette Chromosom 3 untersucht.

### PTEN:

PTEN steht für „phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten“ und bezeichnet eine Phosphatase, welche phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat dephosphoryliert und somit eine Rolle in verschiedenen Signalkaskaden der Zellproliferation, -Überleben und -Wachstum einnimmt. Durch die Dephosphorylierung von Kinasedomänen wirkt PTEN als Tumorsuppressor, sodass seine Inaktivierung zu einem Anstieg der Aktivität des PI3K-AKT-Pathways führt<sup>115</sup>.

Ein Nachweis von PTEN-Mutationen ist bei Lungenkarzinomen mit etwa 2% jedoch eher selten.

Für den Nachweis einer Mutation im PTEN-Gen wurde das komplette Chromosom 10 sequenziert.

### PTPN11:

PTPN11 bezeichnet eine Protein Tyrosin Phosphatase, deren Suppression zu einer Sensibilisierung gegenüber MEK-Inhibitoren führen kann<sup>116</sup>. Mit einer Häufigkeit von etwa 3% gehört sie zu den eher seltenen Treibermutationen.

Zum Nachweis von PTPN11 wurde das 3. Exon von Chromosom 12 untersucht.

### TP53:

TP53 kodiert das zentrale Tumorsuppressorprotein p53, welches durch die Blockade des Zellzyklus, der Aktivierung von Reparaturenzymen oder der Einleitung der Zellapoptose vor der malignen Entartung einer Zelle schützt. Aufgrund seiner zentralen Rolle in der

Tumorsuppression ist es das am häufigsten mutierte Gen in Tumoren<sup>117</sup>. Die höchsten Anteile an TP53 mutierten Tumoren zeigt sich beim SCLC der Lunge<sup>118</sup>, bei Kolontumoren<sup>119</sup> und Ovarialtumoren<sup>120</sup>. Generell können sich aber entsprechende Mutationen in allen Tumorentitäten zeigen.

Zum Nachweis einer Mutation im TP53 Gen wurde das komplette Chromosom 17 sequenziert.

#### **2.4) statistische Verfahren der Korrelationsanalyse:**

Die statistische Analyse der Treibermutationen, der B-Follikel, der Tumorstadien und der Checkpointproteine erfolgte durch die Unterteilung der jeweiligen Marker in verschiedene Untergruppen, welche anschließend in einer Vierfeldertafel dargestellt wurden. Diese wiederum stellte die Grundlage für die Korrelationsanalyse per Fisher's exact Test.

Je nach klinischem Zusammenhang der Fragestellung wurden hierbei die beiden Gruppen eines Parameters unterschiedlich unterteilt. So wurden bei der Korrelationsanalyse der Tumorstadien mit Treibermutationen und Checkpointproteinen die Frühstadien (pT1 und pT2 bzw. Stadium I und II nach UICC) mit den fortgeschrittenen Tumorstadien (pT3 und pT4 bzw. Stadium III und IV nach UICC) verglichen. Aufgrund der klinischen Relevanz wurde bei den Immunzellsubpopulationen und B-Follikeln ein Vergleich zwischen den Stadien pT1-3 bzw. I-III nach UICC mit den fortgeschrittenen Stadien pT4 und IV nach UICC durchgeführt. Hierbei wurde der Mann Whitney-U Test verwendet.

In Bezug auf die Häufigkeit von Treibermutationen wurden ebenfalls Vierfeldertafeln anhand von Gruppeneinteilungen erstellt. Die Korrelationsanalyse wurde anschließend durch den Fisher's exact Test durchgeführt. Hierbei war jedoch lediglich bei den Treibermutationen KRAS und EGFR, sowie die Mutation TP53 in ausreichender Anzahl vertreten, sodass 3 Gruppen von Mutationen zu statistischen relevanten Gruppen zusammengeführt wurden. Dies war eine Gruppe aus therapierbaren Treibermutationen (definiert durch ein zugelassenes Medikament), biologische Treibermutationen (jegliche Treibermutation mit klinischer Relevanz) und die Gruppe aller nachgewiesener Mutationen des Panels. Die Mutationen in TP53 wurden separat ausgewertet.

Das Checkpointprotein PD-L1 wurden lediglich bei der Expression auf Tumorzellen berücksichtigt und wurden in einer Gruppe der „High Expressoren“ mit >50% PD-L1 exprimierender Tumorzellen und eine Gruppe der No-/Low-Expressoren mit keiner oder

geringer Expression von <50% der Tumorzellen. Nach Ermittlung der entsprechenden Quadranten einer Vierfeldertafel wurde der Fisher's exact Test durchgeführt.

Bei der Analyse der TILs wurde nach der oben genannten Auszählung der 3 High-Power-Fields der Median jedes einzelnen Falles ermittelt. Aus den Medianen der 156 einzelnen Fälle, wurde der Median der Gesamtpopulation für den entsprechenden Immunzellmarker ermittelt. Der Median der Gesamtpopulation wurde als Cut-off für die Bildung von 2 Gruppen bestimmt. Die erste oberhalb des Medians sowie einer weiteren unterhalb des Medians der Gesamtpopulation. Diese beiden Gruppen wurden anschließend miteinander verglichen. Dies erfolgte per Vierfeldertafel und Fisher's exact Test bei den Checkpointproteinen, Treibermutationen und TP53. Bei den Tumorstadien hingegen erfolgte der Vergleich per Mann-Whitney-U-Test.

Die bei den B-Follikeln erhobenen Daten wurden gemäß der oben genannten, semiquantitativen Einteilung (Negativ, gering, mäßig und stark) zugeordnet. Diese wurde anschließend erneut in 2 Kategorien unterteilt: Bei den Treibermutationen, TP53 und PD-L1 wurden die beiden Kategorien „Negativ/geringe Follikelreaktion“ (0-3 Follikel) und „mäßig/starke Follikelreaktion“ (>4 Follikel) gewählt. Bei der Korrelationsanalyse mit den Tumorstadien wurden die Kategorien verändert, sodass die Kategorien in „negativ/schwach/mäßige Follikelreaktion“ (0-8 Follikel) und „starke Follikelreaktion“ (>8 Follikel) eingeteilt wurden.

Bei der Analyse der Verlaufsdaten wurden bei der Analyse der 5 Jahres-Überlebensrate je nach Vitalstatus die beiden Kategorien „Lebend/ >60 Monate“ und „verstorben“ unterschieden. Nach Einteilung in einer Vierfeldertafel erfolgte auch hier der Fisher's exact Test. Bei einem signifikanten Ergebnis wurde die Korrelationsanalyse durch den Log-Rank-Tests ergänzt.

## **2.5) Ethikvotum:**

Ein Ethikvotum mit dem Titel „Retrospektives Forschungsvorhaben mit dem Ziel, Erkenntnisse über die Zusammensetzung des Tumormikromilieus von Lungentumoren zu gewinnen“ wurde unter der Bearbeitungsnummer „WF-017/19“ bei der Ärztekammer Hamburg eingereicht.

Aufgrund der vollständigen Anonymisierung sämtlicher patientenbezogener Daten wurde unser Projekt als nicht beratungspflichtiges Forschungsprojekt eingestuft.

## 2.6) Verlaufsdaten des Hamburger Krebsregisters:

Auf Anfrage wurden vom Hamburger Krebsregister die Verlaufsdaten der beteiligten Patienten ermittelt. Von den 155 angefragten Personen konnten bei 100 Personen verwertbare Aussagen zum aktuellen Vitalstatus getroffen werden. Von diesen 100 Personen waren 48 registriert und am Leben, während 52 Patienten verstorben waren. 32 Fälle waren zum Zeitpunkt der Erkrankung nicht in Hamburg wohnhaft und entsprechend in einem anderen Register dokumentiert. 15 weitere Fälle waren dem Register nicht bekannt und 8 Personen wechselten nach der Registrierung den Wohnort, sodass kein weiterer Verlauf dokumentiert wurde.

Jene 100 Fälle mit Vitalstatus wurden zur Korrelationsanalyse mit den immunhistochemischen Parametern und Treibermutationen herangezogen.

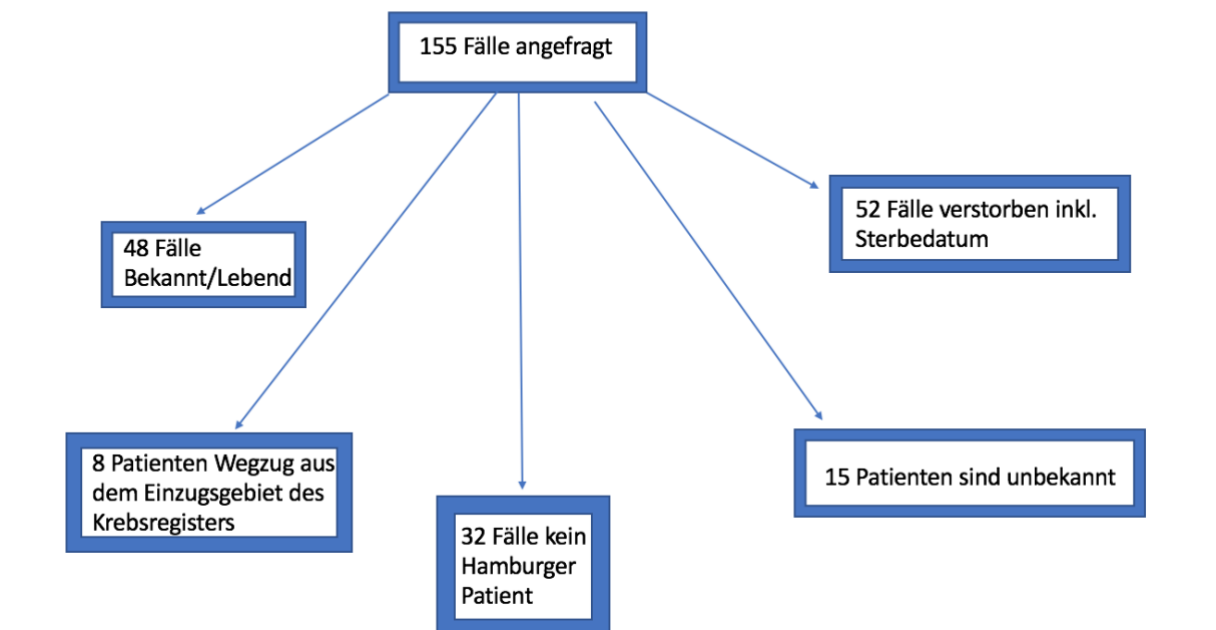


Abbildung 5: Verlaufsdaten der Studienpopulation nach dem Hamburger Krebsregister (Stand 6/2019)  
(Quelle: Powerpoint 2018, eigene Darstellung)

### **3) Ergebnisse:**

In dieser Studie untersuchten wir Adenokarzinome der Lunge und ihre direkte Tumorumgebung. Hierfür wurde mit den neuen Verfahren des „next generation sequencing“ eine Analyse der Tumor-DNA hinsichtlich der gängigsten Treibermutationen untersucht. Hierfür wurde ein Lungenpanel des hämatopathologischen Institutes Hamburg (HPH) verwandt.

Für die immunhistochemische Auswertung wurden insgesamt 156 Fälle aus dem internen Befundungssystem des HPH ermittelt. Von diesen Fällen wurde bei weiteren 133 Fällen eine umfassende NGS Mutationsanalyse durchgeführt.

Des Weiteren wurden per Immunhistochemie Checkpoint Proteine des PD-1/PD-L1 Pathways auf der Oberfläche von Tumorzellen und immunkompetenten Zellen dargestellt.

Eine weitere Komponente stellte die quantitative und qualitative Analyse von immunkompetenten Zellen in der direkten Tumorumgebung dar.

Hierfür wurden die immunhistochemischen Marker CD3, CD8, CD19, CD20, Fox-P3 und CD 68 angefärbt.

Den pathologischen Befundberichten wurde zudem das pathologische T-Stadium und die klinischen Tumorstadien nach UICC entnommen. In einem Fall zeigte sich kein Eintrag zu den Tumorstadien, sodass dieser Fall bei der statistischen Analyse der Tumorstadien keine Berücksichtigung fand.

Wir führten verschiedene Korrelationsanalysen zum Nachweis von Zusammenhängen zwischen den verschiedenen getesteten Biomarkern durch.

#### **3.1) Tumorstadien**

##### **3.1.1 pathologische T-Stadien:**

In der untersuchten Studienpopulation zeigten sich mit 54,46% (83/152) mehr als die Hälfte der Fälle in den pathologischen Stadien pT1a bzw. b. Weitere 24,34% (37/152) entfielen auf die Stadien pT2a und b.

Die fortgeschrittenen pathologischen Stadien pT3 und pT4 waren mit 12,25% (19/152) bzw. 8,55% (13/152) deutlich seltener vertreten.

Von den insgesamt 156 untersuchten Fällen konnte in einem Fall das Stadium nicht eindeutig ermittelt werden und wurde daher nicht in die statistische Auswertung einbezogen. Drei Fälle mit Probenmaterial aus einer Fernmetastase wurden in den statistischen Korrelationen des pathologischen T-Stadiums ebenfalls nicht berücksichtigt,

sodass bei der Korrelation der pathologischen Tumorstadien letztendlich 152 Fälle berücksichtigt wurden.

Für eine übersichtliche statistische Auswertung wurden die jeweiligen pathologischen Unterstadien zu den Hauptgruppen pT1-4 zusammengefasst (siehe Tab.3).

T-Stadium	pT1	pT2	pT3	pT4	Gesamt
Absolute Anzahl	83	37	19	13	152
Relativer Anteil	54,46%	24,34%	12,5%	8,55%	100%

*Tabelle 3: Anteil und Anzahl der pathologischen T-Stadien von 152 Adenokarzinomen der Lunge in der vorliegenden Studienpopulation.*

### **3.1.2 klinische Tumorstadien nach UICC:**

Von den insgesamt 156 Fällen konnte lediglich bei einem Fall kein genaues klinisches Tumorstadium identifiziert werden. Bei 3 weiteren Fällen handelte es sich um Fernmetastasen, welche der Gruppe des klinischen Tumorstadium IV hinzugefügt wurden. Nach den klinischen Kriterien der UICC waren in unserer Studienpopulation 63,87% (99/155) der Patienten im Stadium IA bzw. IB. Mit 7,74% (12/155) befanden sich deutlich weniger Patienten in den frühen Stadien IIA und IIB.

Die fortgeschrittenen Tumorstadien waren mit 16,77% (26/155) bei den Stadien IIIA und B sowie 11,6% (18/155) für das Stadium IV deutlich seltener vertreten (siehe Tab.4).

UICC-Stadium	I	II	III	IV	Gesamt
Absolute Anzahl	99	12	26	18	155
Relativer Anteil	63,87%	7,74%	16,77%	11,6%	100%

*Tabelle 4: Anteil und Anzahl der klinischen Tumorstadien nach UICC von 155 Adenokarzinomen der Lunge in der vorliegenden Studienpopulation.*

## **3.2) Immunhistochemie:**

### **3.2.1) Immunzellsubpopulationen:**

Für die Bestimmung der Anzahl der Tumor infiltrierenden Lymphozyten erfolgte die Auszählung von 3 High-Power-Field (definiert als Sichtfeld der 400-fachen Vergrößerung) in repräsentativen Arealen des Tumorgewebes. Aus den ermittelten Werten wurde anschließend der Median sowie das Konfidenzintervall bestimmt. Für die Korrelationsanalyse wurde anschließend der Median der ermittelten Medianwerte in der Gesamtpopulation ermittelt.

#### **3.2.1.1) T-Zellen:**

Bei den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (folgend als TILs bezeichnet) zeigte sich ein heterogenes Verteilungsmuster, wobei für den Pan-T-Zellmarker CD3 Mediane von minimal 7 Zellen pro HPF und Maximalwerte von 473 Zellen pro HPF gezählt wurden (siehe Tab.5, Seite 48).

Der Median der gesamten Population lag bei 87 Zellen pro HPF. Mit etwa 1/3 aller Fälle, zeigten sich die häufigsten absoluten Werte in einem Bereich zwischen 50 und 100 Zellen pro HPF.

Die T-Zellen zeigten ein relativ homogenes Verteilungsmuster im gesamten Tumorstroma. Bei einem Mittelwert von 108 CD3+ TILs, lag das 95% Konfidenzintervall für die CD3 Zellen bei 31-185 Zellen pro High-Power-Field.

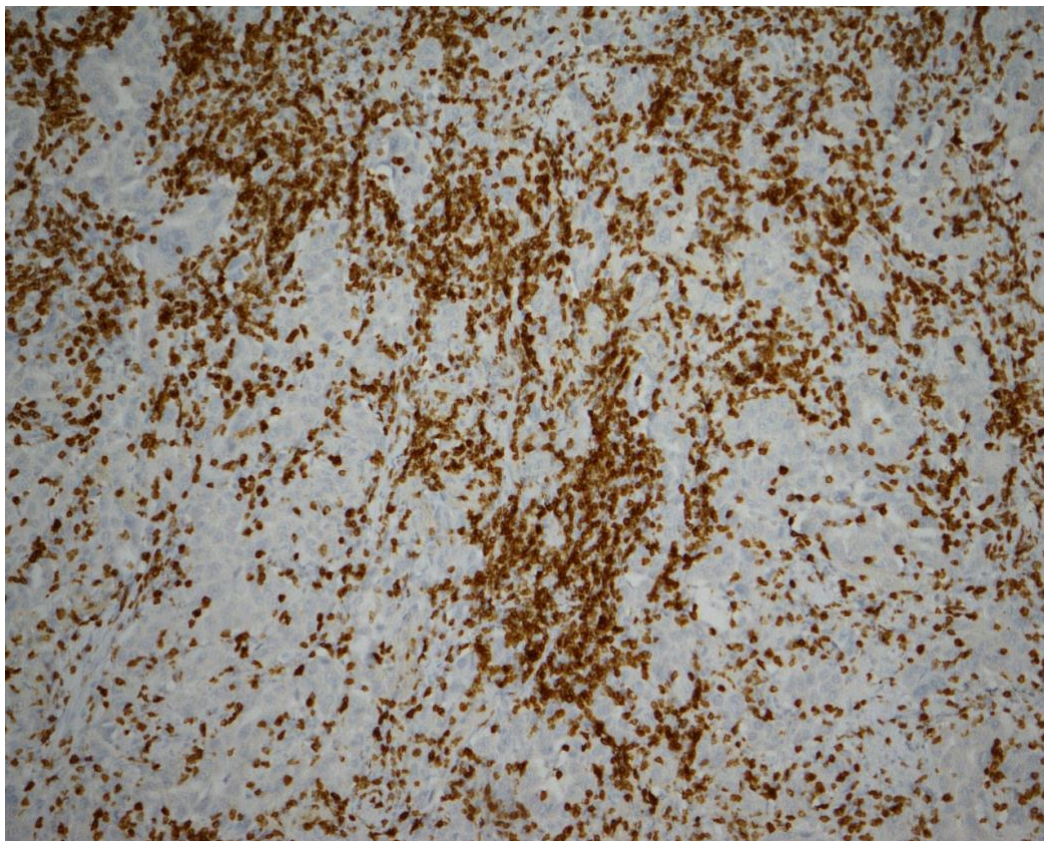
Bei dem für zytotoxische T-Zellen spezifischen Marker CD8 wurden geringere Zellzahlen pro HPF gezählt. Hier lag der Median der Studienpopulationen bei nur 65 Lymphozyten, während das Minimum bei 3 Zellen und das Maximum bei 314 gezählten Zellen lag. (siehe Tab.5, Seite 48)

Bei einem Mittelwert von 77 Zellen pro HPF und einer Standardabweichung von +/- 56 Zellen ergab sich ein 95%-Konfidenzintervall von 21-133 Zellen pro High-Power-Field. Der Mittelwert betrug für die zytotoxischen T-Zellen 77 TILs pro HPF.

Die Fox-P3 positiven, regulatorischen T-Zellen zeigten mit einem Median von 5, sowie einem Mittelwert von 8 TILs, vergleichsweise geringe Infiltrationszahlen. Der Minimalwert lag bei 0 Zellen sowie der Maximalwert bei 55 Zellen pro HPF. Das 95% Konfidenzintervall erstreckte sich zwischen 0 und 17 Zellen pro High-Power-Field (siehe Tab.5, Seite 48)

Färbung	CD3	CD8	Fox-P3
Minimum	7	3	0
Maximum	473	314	55
Median	87	65	5
Mittelwert	108	77	8
Standardabweichung	77	56	9
95%- Konfidenzintervall	31 - 185	21 - 133	0 - 17
Anzahl Fälle	156	156	156

*Tabelle 5: Minimum, Maximum, Median der Mediane der verschiedenen T-Zellmarker pro High Power Field (400-fache Vergrößerung), sowie. 95% Konfidenzintervalle bei 156 Fällen des Adenokarzinoms der Lunge.*



*Abbildung 6: Adenokarzinom der Lunge mit hoher Anzahl CD3 positiver Tumor infiltrierender Lymphozyten, 100-fache Vergrößerung, CD3-Antikörper, Polymer basierte Immunhistochemie und DAB-Detektion.*



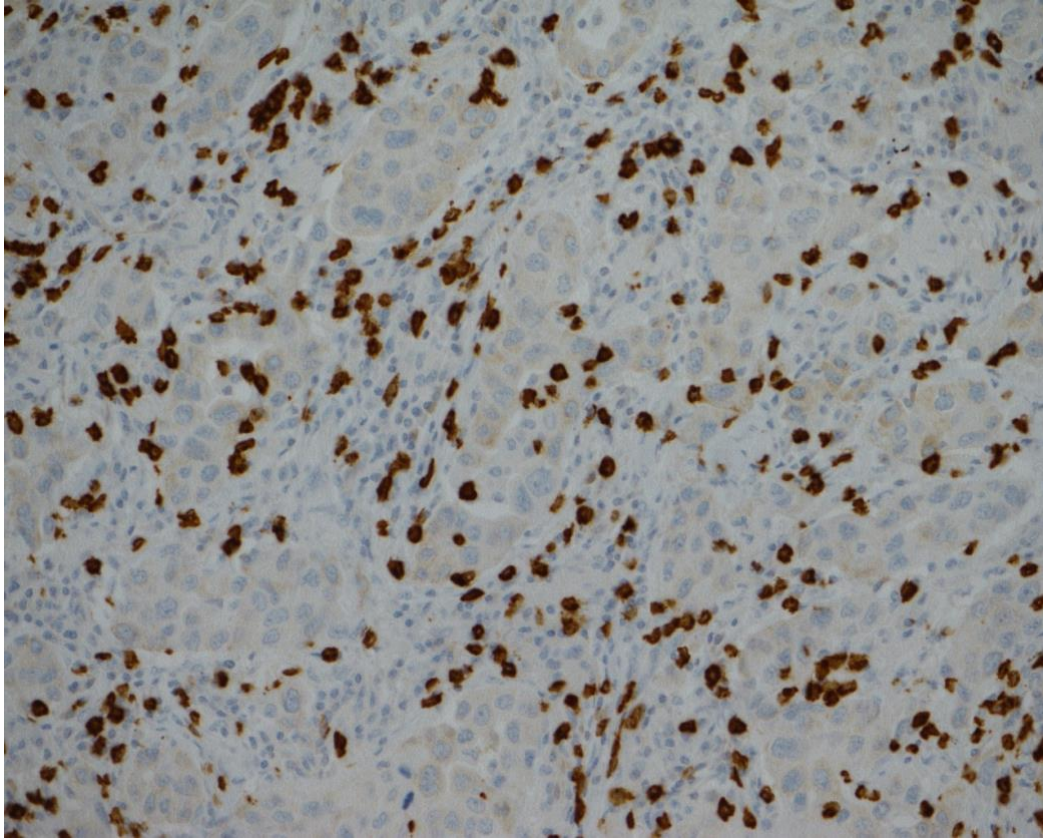


Abbildung 7: Adenokarzinom der Lunge mit CD8 positiven Tumor infiltrierenden, zytotoxischen T- Lymphozyten zwischen den Tumorzellen, 200-fache Vergrößerung, CD8 Antikörper, Polymer basierte Immunhistochemie, DAB-Detektion.

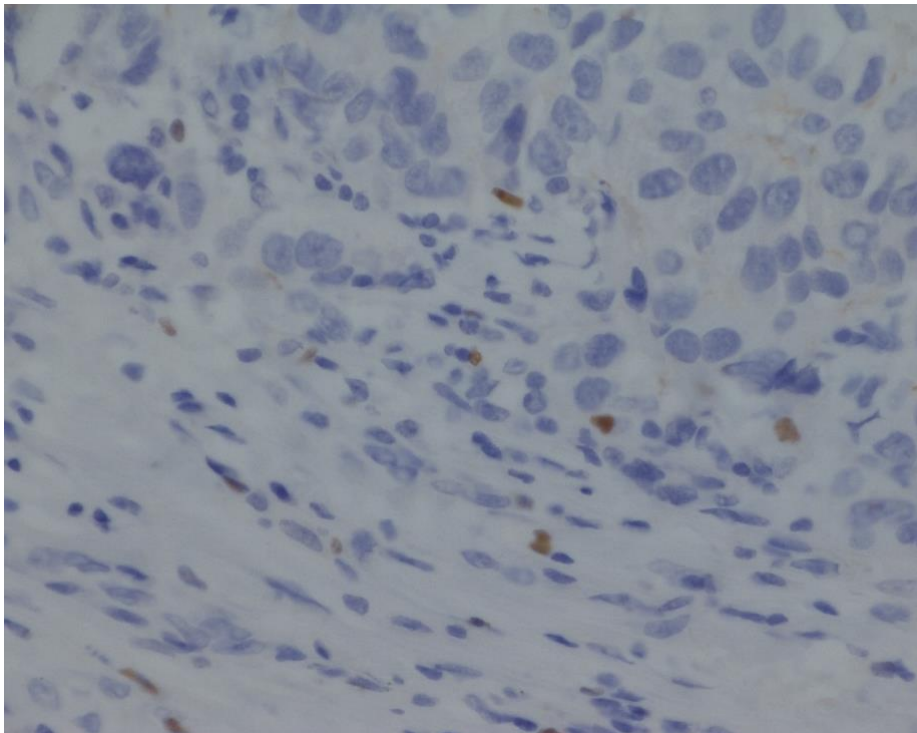


Abbildung 8: Adenokarzinom der Lunge mit geringer Anzahl an Fox-P3 positiven T-Suppressorzellen, 400-fache Vergrößerung, Fox-P3 Antikörper, Polymer basierte Immunhistochemie mit DAB-Detektion.

### 3.2.1.2) B-Zellen:

Bei den B-Zellen wurde eine geringere Anzahl von Zellen pro HPF ausgezählt. Der Marker CD19, welcher B-Zellen und Plasmazellen anfärbt, zeigte einen Maximalwert von 185 Zellen sowie einen Minimalwert von 0 Zellen pro HPF. (siehe Tab.6)

Bei einem Mittelwert von 32 CD19+ B-TILs pro HPF, lag das 95%-Konfidenzintervall zwischen 0 und 66 Zellen pro HPF.

Der für B-Zellen spezifische Marker CD20 zeigte noch einmal geringere Zellzahlen im Vergleich zu CD19. Hier wurde ein Median von 11 Zellen bei einem Minimalwert von 0 Zellen und einem Maximalwert von 89 Zellen pro HPF gezählt. Das 95% Konfidenzintervall lag hier bei 0-37 Zellen pro HPF. Der Mittelwert betrug 18 CD20+ B-TILs pro HPF (siehe Tab. 6)

Die Auszählung der B-Zellen bezog sich ausschließlich auf solche, die das Tumorstroma infiltrierten. Das Verteilungsmuster zeigte Ähnlichkeiten zu dem Muster der T-Zellen und kann als relativ homogen beschrieben werden, wobei sich in manchen Fällen deutliche Ansammlungen um Tumorzellnester zeigten. (siehe Abb.9, Seite 51)

Färbung	CD19	CD20
Minimum	0	0
Maximum	185	89
Median	19	11
Mittelwert	32	18
Standardabweichung	34	19
95%-Konfidenzintervall	0 - 66	0 - 37
Anzahl Fälle	155	156

*Tabelle 6: Minimum, Maximum, Mittelwert und Mediane von B-Zellsubpopulationen pro High Power Field (400-fache Vergrößerung), sowie 95%-Konfidenzintervall in 155 Adenokarzinomen der Lunge.*

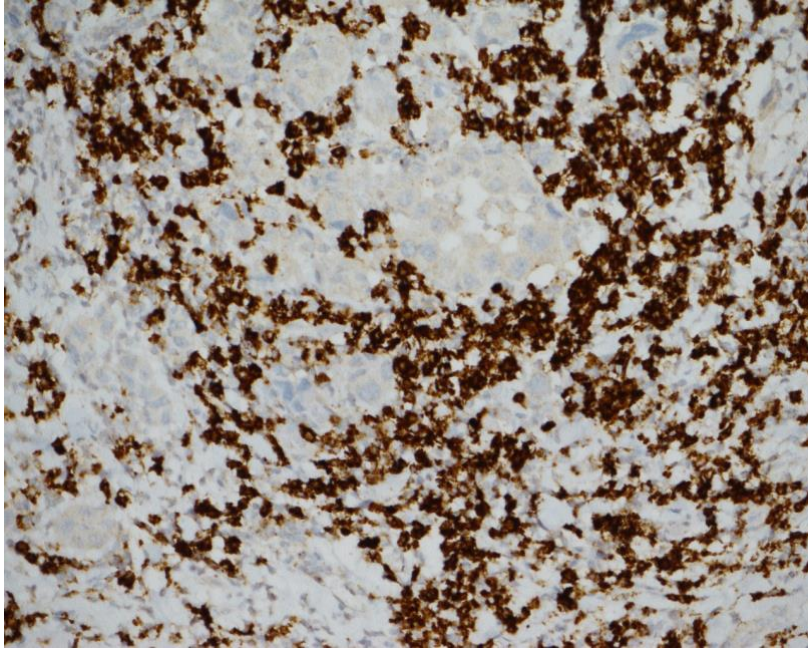


Abbildung 9: Tumorzellnester eines Adenokarzinoms der Lunge umgeben von CD19 positiven B-Zellen und Plasmazellen, CD19 Antikörper, 200-fache Vergrößerung, Polymerbasierte Immunhistochemie mit DAB-Detektion.

### **3.2.2) B-Follikelreaktion:**

Neben den zuvor beschriebenen B-TILs im Tumorstroma zeigten sich follikuläre Ansammlungen von B-Zellen im Tumorrandbereich. Hierbei erfolgte eine Auszählung der absoluten Anzahl von B-Follikeln im Tumorrandbereich mit anschließender semiquantitativer Kategorisierung in 4 Untergruppen.

Je nach Anzahl der B-Follikel im Randbereich erfolgte die Einteilung in die Gruppen negativ (0 Follikel), schwach (1-3 Follikel), mäßig (4-8 Follikel) oder stark (>8 Follikel).

In beiden Färbungen konnten mit jeweils ca. 42% (65/156 bei CD19 sowie 66/156 bei CD20) am häufigsten mäßige B-Follikelreaktionen im Tumorrandbereich nachgewiesen werden. Mit 30,76% (48/156) in der CD19 Färbung und 32,69% (51/156) in der CD20 Färbung, waren starke B-Follikelreaktionen im Randbereich ebenfalls eher häufig.

Deutlich seltener waren die geringen Follikelreaktionen mit 19,87% der Fälle (31/156) bei CD19 und 18,58% (28/156) bei CD20.

Lediglich bei 7,69% (12/156) der Fälle in der CD19 Färbung sowie 6,4% (10/156) in der CD20 Färbung konnten keine B-Follikel im Tumorrandbereich nachgewiesen werden.

Im Mittelwert zeigten sich bei der CD20 Färbung leicht stärkere Follikelreaktionen als beim Marker CD19. (siehe Tab.7, Seite 52)

B-Follikelreaktionen	CD19 absolute Anzahl	CD19 relativer Anteil	CD20 absolute Anzahl	CD20 relativer Anteil
Negative Follikelreaktionen (0 Follikel)	12	7,69%	10	6,4%
Geringe Follikelreaktion (1-3 Follikel)	31	19,87%	29	18,58%
Mäßige Follikelreaktion (4-8 Follikel)	65	41,66%	66	42,3%
Starke Follikelreaktion (>8 Follikel)	48	30,76%	51	32,69%
Gesamtanzahl	156	100%	156	100%

*Tabelle 7: Kategorien und deren prozentuale Anteile der B-Follikelreaktionen in den Färbungen CD19 und CD20 bei 156 Adenokarzinomen der Lunge*



*Abbildung 10: Adenokarzinom der Lunge mit CD20 positiven B-Follikeln im Tumorrandbereich, CD20 Antikörper, 20-fache Vergrößerung, Polymer basierte Immunhistochemie mit DAB basierte Detektion.*



Abbildung 11: Randbereich eines Adenokarzinoms der Lunge mit starker Bildung CD19 positiver B-Follikel, CD19 Antikörper, 20-fache Vergrößerung, Polymerbasierte Immunhistochemie mit DAB-Detektion.

### **3.2.3) Immunzellsubpopulationen nach Tumorstadium:**

Zur weiteren Analyse der entsprechenden Immunzellsubpopulationen in den Tumorstadien erfolgte die Berechnung der 95%-Konfidenzintervalle und Standardabweichungen der verschiedenen Immunzellmarker in den Tumorstadien. Hierbei konnte bei einem Fall aufgrund einer mangelhaften Färbung die Anzahl der CD19+ BTILs nicht bestimmt werden. Zudem wurden auch hier bei den Tumorstadien ein Fall ohne Angabe des Tumorstadiums nicht berücksichtigt, sodass 155 Fälle für das klinische Tumorstadium nach UICC inkludiert wurden. Bei den pathologischen Tumorstadien wurden zudem 3 weitere Fälle von Fernmetastasen nicht berücksichtigt. Des Weiteren wurden zur weiteren Analyse der Mittelwert, Median sowie der Minimal- und Maximalwert in den jeweiligen Tumorstadien ermittelt. Bei den Stadien pT3, pT4 sowie den klinischen Stadien II und IV nach UICC konnten jeweils weniger als 20 Fälle zugeordnet werden, sodass die Aussagekraft hinsichtlich des Konfidenzintervalls deutlich eingeschränkter ist wie z.B. bei den Stadien I oder pT1.

### **3.2.3.1) Pathologische T-Stadien und Immunzellsubpopulationen:**

Bei der weiteren Analyse der Immunzellinfiltrate wurden ebenfalls die 95%

Konfidenzintervalle, der Mittelwert, der Median und Minimalwert sowie Maximalwert der Immunzellen pro HPF in den entsprechenden Tumorstadien ermittelt.

Bei den pathologischen Tumorstadien waren unterschiedliche Verläufe der Immunzellmarker bei Tumorprogression des T-Stadiums erkennbar.

Für den Marker CD3 war der Minimalwert relativ konstant (zwischen 16 Zellen im Stadium pT4 und 23 Zellen im Stadium pT2), wobei der geringste Wert mit 7 Zellen pro HPF im Stadium pT1 beobachtet wurde. Beim Maximalwert hingegen waren in den Stadien pT1-3 jeweils hohe Anzahlen von >400 Zellen pro HPF ausgezählt worden, während im Stadium pT4 der höchste Wert 226 Zellen betrug. Hinsichtlich des Medians zeigt sich ein zunächst rückläufiger Wert von 103 Zellen im Stadium pT1 bis 76 Zellen im Stadium pT3, welcher jedoch im Stadium pT4 erneut auf 90 Zellen pro HPF ansteigt. Der Mittelwert hingegen zeigte leicht erhöhte Werte im Stadium pT1 (113 Zellen pro HPF) gegenüber konstanten Zellzahlen pro HPF in den Stadien pT2-pT4 (pT2: 105; pT3: 103; pT4: 104). Auch beim 95%-Konfidenzintervall war beim oberen Cut-Off Wert kein wesentlicher Unterschied bei den CD3+ TILs nachweisbar (siehe Tab. 8, Seite 56; Tab.9-11, Seite 57).

Für die CD8+ TILs wurde ebenfalls kein relevanter Unterschied für den Minimalwert ermittelt (pT1: 14; pT2: 10; pT3: 12; pT4: 14). Der Maximalwert hingegen zeigte ähnliche Werte in den Stadien pT1 und pT3 (pT1: 264 TILs vs. pT3: 244 TILs), während im Stadium pT2 mit 314 Zellen einen deutlich höheren Wert festgestellt wurde (pT2: 314 TILs), welcher sich im Stadium pT4 wieder verringerte (pT4: 176 TILs). Für den Median konnte eine sinkende Tendenz festgestellt werden, welche sich vor allem in einer Verringerung zwischen den Stadien pT3 und pT4 zeigte (pT3: 63 TILs vs. pT4: 52 TILs), welcher jedoch statistisch nicht signifikant war (siehe Kap.3.5.1, Seite 73). Der tendenzielle Rückgang der CD8+ TILs im Stadium pT4 konnte ebenfalls beim Mittelwert (pT1: 81 TILs; pT2: 76 TILs; pT3: 81 TILs; pT4: 65 TILs) und beim Konfidenzintervall (oberer Cut off-Wert von 117 TILs bei pT4 gegenüber 135 TILs bei pT1/2 sowie 143 TILs bei pT3) beobachtet werden.

Bei den B-Zellmarkern CD19 und CD20 konnte ein deutlich divergierender Verlauf gezeigt werden.

Bei dem Pan-B-Zellmarker CD19 war der Minimalwert bei allen pathologischen Stadien mit 0 bzw. 1 Zelle nahezu identisch. Bei den Maximalwerten hingegen wurde der höchste Wert mit 185 B-TILs pro HPF im Stadium pT4 ausgezählt. Bei den Stadien pT1 und pT3 hingegen

war der Wert ähnlich hoch bei 125 bzw. 126 B-TILs pro HPF. Im Stadium pT2 war der Maximalwert mit 97 B-TILs am geringsten. Der Median hingegen deutet einen Tiefpunkt der Anzahl CD19 B-TILs im Stadium pT3 an (Median von 8 B-TILs für pT3 gegenüber 21 B-TILs bei pT1/2 sowie 20 B-TILs bei pT4). Dieser Tiefpunkt ist ebenfalls beim Mittelwert angedeutet (Mittelwert von 26 bei pT3 gegenüber 32 B-TILs bei pT1 und 30 B-TILs bei pT2). Zusätzlich ist der Mittelwert im Stadium pT4 mit 42 Zellen pro HPF deutlich höher als in den früheren pathologischen Stadien.

Der B-Zellmarker CD20 zeigte ein anderes Infiltrationsmuster in Abhängigkeit der pathologischen Tumorstadien als der zuvor beschriebene Pan-B-Zellmarker CD19. Hier waren die Minimalwerte ebenfalls mit jeweils 0 B-TILs pro HPF in allen pathologischen Stadien identisch. Bei den Maximalwerten wurden hingegen die geringsten Werte im Stadium pT4 gemessen, wobei sich zuvor bereits eine leicht rückläufige Tendenz mit erneutem Anstieg im Stadium pT3 zeigte (pT4: 56 B-TILs pro HPF gegenüber pT1: 89 B-TILs; pT2: 63 B-TILs; pT3: 70 B-TILs). Dieser Rückgang war ebenfalls anhand des Mittelwertes sichtbar (pT4: 14 B-TILs gegenüber pT1: 20 B-TILs, pT2: 17 B-TILs, pT3: 17 B-TILs). Am Median hingegen konnte, wie beim Marker CD19, ein Tiefpunkt im Stadium pT3 nachgewiesen werden, während für die Stadien pT1/pT2 und pT4 kein relevanter Unterschied bestand (pT1: 12 B-TILs; pT2: 11 B-TILs; pT3: 4 B-TILs; pT4: 11 B-TILs). Das 95%-Konfidenzintervall zeigte die höchsten Cut-off-Werte im Stadium pT1 (0-41 B-TILs) sowie im Stadium pT3 (0-37 B-TILs), während die Werte im Stadium pT4 (0-30 B-TILs) und pT2 (2-32 B-TILs) leicht niedriger ausfielen.

Bei dem Immunzellmarker Fox-P3 wurde in allen pathologischen Stadien ein Minimalwert von 0 TILs pro HPF ausgezählt. Der Maximalwert hingegen war mit 55 Zellen am höchsten im Stadium pT1 mit anschließend konstanten Werten zwischen 25 TILs (pT4) und 30 TILs (pT3). Der Mittelwert war bei insgesamt geringen Werten rückläufig in den Stadien pT3 und pT4 (pT1: 9 TILs; pT2: 8 TILs gegenüber jeweils 6 TILs in den Stadien pT3 und pT4). Ähnliches konnte für den Verlauf des Medians beobachtet werden (pT1: 6 TILs; pT2: 7 TILs gegenüber 3 TILs für pT3 und 2 TILs bei pT4).

Der obere Cut-off-Wert des Konfidenzintervalls zeigte sich konstant in den Stadien pT2-4 (pT2: 0-15 TILs; pT3: 0-14 TILs; pT4: 13 TILs).

Für die PD1+ TILs wurden für den Minimalwert fast identische Werte zwischen 2 TILs für pT1 und 4 TILs für pT2 ausgezählt. Der Maximalwert war ebenfalls in den Stadien pT1/2 und pT4 ähnlich hoch (pT1: 95 TILs; pT2: 98 TILs; pT4: 101 TILs), wobei im Stadium pT3 die höchste Anzahl mit 175 PD-1+ Zellen pro HPF beobachtet werden konnte.

Ähnliches konnte für den Mittelwert beobachtet werden, wobei die Stadien pT1/2 und pT4 Werte zwischen 29 und 32 TILs pro HPF vorwiesen und im Stadium pT3 der höchste Mittelwert mit 40 TILs pro HPF ermittelt wurde. Ähnliches konnte für den oberen Cut-off-Wert des 95% Konfidenzintervalls beobachtet werden (pT1: 12-54 TILs; pT2: 11-53 TILs; pT3: 0-84 TILs; pT4: 0-59 TILs).

Beim Median hingegen ist die Anzahl der PD-1+ TILs pro HPF mit dem Fortschreiten der pathologischen Tumorstadien deutlich rückläufig (pT1: 32 TILs; pT2: 30 TILs; pT3: 24 TILs; pT4:16 TILs). (siehe Tab. 8, Tab. 9-11, Seite 57).

Färbungen	CD3	CD8	CD19	CD20	Fox-P3	PD-1
Minimum	7	14	0	0	0	2
Maximum	473	264	125	89	55	95
Median	103	68	21	12	6	32
Mittelwert	113	81	32	20	9	33
Standardabweichung	75	55	32	21	10	21
95% Konfidenzintervall	38-188	26-135	0-64	0-41	0-19	12-54
Anzahl Fälle	83	83	82	83	83	83

*Tabelle. 8: Minimum, Maximum, Mittelwert und Median der Mediane pro High Power Field (400-fache Vergrößerung), sowie 95%-Konfidenzintervall der verschiedenen Immunzellsubpopulationen in 83 Adenokarzinomen der Lunge des pathologischen Stadium pT1.*



Färbungen	CD3	CD8	CD19	CD20	Fox-P3	PD-1
Minimum	23	10	1	0	0	4
Maximum	407	314	97	63	27	98
Median	86	57	21	11	7	30
Mittelwert	105	76	30	17	8	32
Standardabweichung	79	59	25	15	7	21
95% Konfidenzintervall	26-184	17-135	5-55	2-32	1-15	11-53
Anzahl Fälle	37	37	37	37	37	37

*Tabelle 9: Minimum, Maximum, Mittelwert und Median sowie 95%-Konfidenzintervall der verschiedenen Immunzellsubpopulationen pro High Power Field (400-fache Vergrößerung) in 37 Adenokarzinomen der Lunge des pathologischen Stadium pT2.*

Färbungen	CD3	CD8	CD19	CD20	Fox-P3	PD-1
Minimum	19	12	0	0	0	3
Maximum	407	244	126	70	30	175
Median	76	63	8	4	3	24
Mittelwert	103	81	26	17	6	40
Standardabweichung	90	62	38	20	8	44
95% Konfidenzintervall	12-192	19-143	12-64	0-37	2-14	0-84
Anzahl Fälle	19	19	19	19	19	19

*Tabelle 10: Minimum, Maximum, Mittelwert und Median der Mediane sowie 95%-Konfidenzintervall von B-Zellsubpopulationen pro High Power Field (400-fache Vergrößerung) in 19 Adenokarzinomen der Lunge des pathologischen Stadium pT3.*

Färbungen	CD3	CD8	CD19	CD20	Fox-P3	PD-1
Minimum	16	14	0	0	0	3
Maximum	226	176	185	56	25	101
Median	90	52	20	11	2	16
Mittelwert	104	65	42	14	6	29
Standardabweichung	77	52	56	16	7	30
95% Konfidenzintervall	27-181	13-117	0-98	0-30	0-13	0-59
Anzahl Fälle	13	13	13	13	13	13

*Tabelle 11: Minimum, Maximum, Mittelwert und Median sowie 95%-Konfidenzintervall von verschiedenen Immunzellsubpopulationen pro High Power Field (400-fache Vergrößerung), sowie 95%-Konfidenzintervall in 13 Adenokarzinomen der Lunge des pathologischen Stadium pT4.*

### **3.2.3.2) Klinische Tumorstadien nach UICC und Immunzellsubpopulationen:**

Für die klinischen Tumorstadien nach UICC wurden ebenfalls das Minimum, Maximum, der Mittelwert, der Median sowie das 95%-Konfidenzintervall ermittelt.

Die CD3+ TILs waren bezüglich des Minimalwertes in den Stadien II-IV ähnlich verteilt (II: 19 TILs; III: 13 TILs; IV: 16 TILs), während im Stadium I mit nur 2 CD3+ TILs pro Fall die geringste Anzahl zu finden war. Bezüglich der Maximalwerte zeigt das Stadium I den höchsten Wert mit 473 CD3+ TILs pro HPF sowie eine identische Anzahl von 407 CD3+ Zellen pro HPF in den Stadien II und III. Im Stadium IV hingegen kommt es zu einer deutlichen Erniedrigung des Maximalwertes auf lediglich 222 CD3+ Zellen pro HPF.

Der Median steigt zunächst in den Stadien I-III kontinuierlich an (I: 90 TILs; II: 99 TILs; III: 108 TILs) mit rückläufigen Zahlen von 63 Zellen pro HPF in Stadium IV.

Beim Mittelwert zeigt sich ebenfalls ein Anstieg der CD3+ TILs zwischen den Stadien I (108 TILs) und II (127 TILs), wobei die Anzahl der TILs in den Stadien III (118 TILs) und IV (82 TILs) wieder rückläufig ist. Der gleiche Verlauf kann auch bei den oberen Cut-off-Werten des 95%-Konfidenzintervalls beobachtet werden (I: 34-182 TILs; II: 23-230 TILs; III: 38-206 TILs; IV: 18-146 TILs). (Siehe Tab. 12-14, Seite 61; Tab. 15, Seite 62)

Die CD8+ zytotoxischen T-Zellen zeigten bei den klinischen Tumorstadien I-III für den Minimalwert in einem HPF konstante Infiltrationszahlen (I: 14 TILs; II: 14 TILs; III: 11 TILs), welche sich im Stadium IV (3 TILs) schließlich deutlich verringerte.

Der Maximalwert hingegen sank mit Fortschreiten der Tumorstadien zunehmend ab (I: 314 TILs; II: 244 TILs; III: 192 TILs; IV: 176 TILs). Der Median zeigte ein ähnliches Verhalten mit relativ konstanten Werten für die Stadien I-III (I: 90 TILs; II: 87 TILs; III: 82 TILs) gegenüber einem deutlichen Rückgang des Medians im Stadium IV (44 TILs). Auch beim Mittelwert konnte der beschriebene Rückgang im Stadium IV gegenüber den Stadien I-III beobachtet werden (I: 108 TILs; II: 94 TILs; III: 89 TILs gegenüber Stadium IV: 51 TILs). Die oberen Cut-off-Werte des 95%-Konfidenzintervalls kamen zu einem ähnlichen Ergebnis wie der Median und Mittelwert. Hier kam es zu einem initialen Anstieg der Werte vom Stadium I auf das Stadium II (I: 23-133 TILs gegenüber 34-154 TILs im Stadium II), welche im Stadium III relativ konstant blieben (III: 28-150 TILs) und im Stadium IV schließlich rückläufig waren (9-93 TILs).

Beim Pan-B-Zellmarker CD19 war der Minimalwert bei allen klinischen Stadien 0 TILs pro HPF. Beim Maximalwert hingegen waren die Stadien I und II nahezu identisch (I: 125 TILs; II: 126 TILs). Beim Stadium III hingegen war der Maximalwert mit 95 TILs pro HPF deutlich erniedrigt um im Stadium IV erneut auf 185 TILs pro HPF wieder anzusteigen.

Diese Unterschiede konnten weder im Median, noch im Mittelwert beobachtet werden.

Der Median betrug 15 Zellen pro HPF in den Stadien II und IV sowie 20 TILs in den Stadien I und III. Beim Mittelwert waren die Infiltrationszahlen aller Stadien nahezu identisch, wobei im Stadium IV ein leichter Anstieg ausgezählt wurde (I: 32 TILs; II: 31 TILs; III: 30 TILs; IV: 35 TILs).

Die Konfidenzintervalle zeigten ebenfalls ein ähnliches Muster mit Höchstwert im Stadium IV (0-85 TILs) gegenüber den Stadien I-III (I: 2-62 TILs; II: 0-71 TILs; III: 0-60 TILs).

Der spezifischere B-Zellmarker CD20 zeigte ebenfalls Minimalwerte von 0 in den Stadien I, III und IV bzw. 1 TIL im Stadium II. Der Maximalwert war am höchsten im Stadium I (89 TILs) und im Stadium III (70 TILs). Im Stadium IV wurde ein Höchstwert von 56 TILs gemessen sowie der niedrigste Wert im Stadium II mit 47 TILs.

Beim Median konnten beim Marker CD20 in den Stadien I-III mit der Tumorprogression leicht ansteigende Werte ausgezählt werden (I: 11 TILs; II: 12 TILs; III: 14 TILs). Im Stadium IV zeigte sich der Median mit 5 TILs pro HPF schließlich deutlich verringert.

Ein ähnlicher Verlauf war auch beim Mittelwert ausgewertet worden. Hier kam es zu einer Halbierung der CD20+ TILs im Stadium IV gegenüber dem Stadium III (III: 22 TILs; Stadium IV: 11 TILs). Die Stadien I und II wiesen etwas niedrigere Mittelwerte wie Stadium III vor (I: 19 TILs; II: 17 TILs).

Die oberen Cut-off-Werte der 95%-Konfidenzintervalle hatten den gleichen Verlauf wie der Mittelwert, sodass im Stadium IV deutlich weniger CD20+ TILs ausgezählt wurden (I: 1-39 TILs; II: 1-33; III: 1-43 TILs; IV: 0-26 TILs).

Für die Fox-P3+ regulatorischen T-Zellen wurde in allen Stadien ein Minimalwert von 0 Zellen ausgezählt. Bei den Maximalwerten hingegen konnten große Unterschiede zwischen den Stadien festgestellt werden. So fanden sich die höchsten Anzahlen von regulatorischen T-Zellen in den Stadien I (55 TILs) und III (53 TILs). Im Stadium II (30 TILs) und Stadium IV (25 TILs) waren deutlich weniger TILs nachweisbar.

Beim Median wurden mit 3 TILs pro HPF die niedrigsten Werte in den Stadien II und III ermittelt. Die Stadien I (7 TILs) und IV (6 TILs) zeigten deutlich höhere Medianwerte.

Der Mittelwert hingegen war für die Stadien I-III mit 8 TILs pro HPF konstant. Für das Stadium IV war mit 6 TILs pro HPF ein leichter Rückgang zu verzeichnen.

Beim 95% Konfidenzintervall zeigt sich ein initialer Anstieg der oberen Cut-off-Werte in den Stadien I-III (I: 0-16 TILs; II: 0-18 TILs; III: 5-21 TILs), welcher im Stadium IV wieder rückläufig ist (IV: 0-12 TILs).

Die PD-1+ TILs waren beim Minimalwert mit Anzahlen von 2 Zellen pro HPF in Stadium I, 4 Zellen in Stadium II sowie jeweils 3 Zellen pro HPF in den Stadien III und IV nahezu identisch.

Beim Maximalwert hingegen konnte mit 85 Zellen pro HPF die geringste Anzahl im Stadium I nachgewiesen werden. In den Stadien III (98 TILs) und IV (101 TILs) konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Der Maximalwert der gesamten Population pro HPF konnte mit 185 TILs im Stadium II nachgewiesen werden.

Beim Median der PD-1+ TILs unserer Studienpopulation konnte ein initialer Anstieg der in den Stadien I-III beobachtet werden (I:31 TILs; II: 37 TILs; III: 39 TILs), wobei sich der Medianwert im Stadium IV mit 20 TILs pro HPF wieder deutlich rückläufig zeigte.

Der Mittelwert der PD-1+ TILs hatte mit 51 TILs pro HPF seinen Höchstwert im Stadium II, welcher zum Stadium III mit 38 Zellen pro HPF wieder rückläufig war. Die Stadien I (31 TILs) und IV (30 TILs) zeigten vergleichbare Anzahlen PD-1+ TILs.

Der beschriebene Verlauf des Mittelwertes wurde auch beim 95%-Konfidenzintervall beobachtet. Hier war der obere Cut-off-Wert ebenfalls im Stadium II am größten (1-101 TILs) mit anschließendem Rückgang im Stadium III (9-67 TILs). Der geringste obere Cut-off-Wert wurde für das Stadium I ermittelt (12-50 TILs), wobei im Stadium IV ein höherer Cut-off-Wert gemessen wurde (2-58 TILs). Hierbei war jedoch der untere Cut-off-Wert im Stadium I deutlich höher wie im Stadium IV. (siehe Tab. 12-14, Seite 61; Tab. 15, Seite 62)

Färbungen	CD3	CD8	CD19	CD20	Fox-P3	PD-1
Minimum	2	14	0	0	0	2
Maximum	473	314	125	89	55	85
Median	90	67	20	11	7	31
Mittelwert	108	78	32	19	8	31
Standardabweichung	74	55	30	20	8	19
95% Konfidenzintervall	34-182	23-133	2-62	1-39	0-16	12-50
Anzahl Fälle	99	99	99	99	99	99

*Tabelle 12: Minimum, Maximum, Mittelwert und Median sowie 95%-Konfidenzintervall von verschiedenen Immunzellsubpopulationen pro High Power Field (400-fache Vergrößerung) in 99 Adenokarzinomen der Lunge des klinischen Tumorstadium I nach UICC.*

Färbungen	CD3	CD8	CD19	CD20	Fox-P3	PD-1
Minimum	19	14	0	1	0	4
Maximum	407	244	126	47	30	175
Median	99	87	15	12	3	37
Mittelwert	127	94	31	17	8	51
Standardabweichung	103	60	40	16	10	50
95% Konfidenzintervall	24-230	34-154	0-71	1-33	0-18	1-101
Anzahl Fälle	12	12	12	12	12	12

*Tabelle 13: Minimum, Maximum, Mittelwert und Median sowie 95%-Konfidenzintervall von verschiedenen Immunzellsubpopulationen pro High Power Field (400-fache Vergrößerung) in 12 Adenokarzinomen der Lunge des klinischen Tumorstadium II nach UICC.*

Färbungen	CD3	CD8	CD19	CD20	Fox-P3	PD-1
Minimum	13	11	0	0	0	3
Maximum	407	192	95	70	53	98
Median	108	82	20	14	3	39
Mittelwert	118	89	30	22	8	38
Standardabweichung	88	61	30	21	13	29
95% Konfidenzintervall	38-206	28-150	0-60	1-43	5-21	9-67
Anzahl Fälle	26	26	26	26	26	26

*Tabelle 14: Minimum, Maximum, Mittelwert und Median sowie 95%-Konfidenzintervall von verschiedenen Immunzellsubpopulationen pro High Power Field (400-fache Vergrößerung) in 26 Adenokarzinomen der Lunge des klinischen Tumorstadium III nach UICC.*

Färbungen	CD3	CD8	CD19	CD20	Fox-P3	PD-1
Minimum	16	3	0	0	0	3
Maximum	222	176	185	56	25	101
Median	63	44	15	5	6	20
Mittelwert	82	51	35	11	6	30
Standardabweichung	64	42	50	15	6	28
95% Konfidenzintervall	18-146	9-93	0-85	0-26	0-12	2-58
Anzahl Fälle	18	18	18	18	18	18

*Tabelle 15: Minimum, Maximum, Mittelwert und Median sowie 95%-Konfidenzintervall von verschiedenen Immunzellsubpopulationen pro High Power Field (400-fache Vergrößerung) in 18 Adenokarzinomen der Lunge klinischen Tumorstadiums IV nach UICC.*

### **3.2.4) Checkpoint Proteine:**

Wir färbten die Proteine PD-1 und PD-L1 des „programmed death pathways“ auf Tumorzellen und immunkompetenten Zellen. Für die Bestimmung der Anzahl der PD-1+ TILs erfolgte die Auszählung von 3 High-Power Field (definiert als Sichtfeld der 400-fachen Vergrößerung) in repräsentativen Arealen des Tumorgewebes. Aus den ermittelten Werten wurde anschließend der Median sowie das Konfidenzintervall bestimmt. Für die Korrelationsanalyse wurde anschließend der Median der einzelnen Medianwerte ermittelt.

PD-L1 hingegen wurde als prozentualer Anteil PD-L1 positiver Immun- oder Tumorzellen von der Gesamtzahl der immunkompetenten Zellen und Tumorzellen angegeben.

Als Tumorzellen wurden entsprechende Zellverbände mit deutlicher randständiger Anfärbung und Malignitätskriterien definiert.

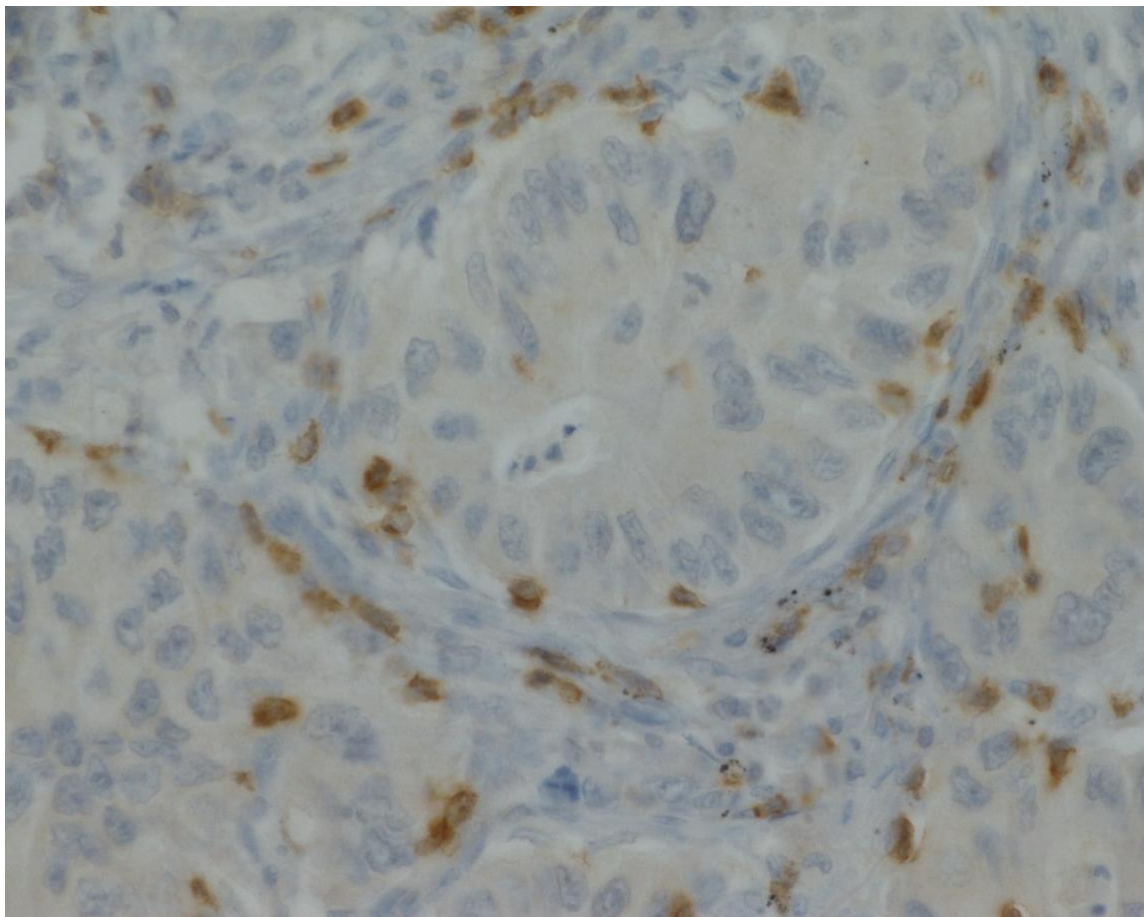
Anschließend erfolgte die Einteilung in 3 Subgruppen. Diese beinhalteten die Gruppen der PD-L1 negative Tumore, Tumore mit geringer PD-L1 Expression zwischen 1-49% sowie Tumore mit hohen PD-L1 Expressionsraten >50%.

#### **3.2.4.1) PD-1:**

Auch bei den PD-1 positiven immunkompetenten Zellen zeigte sich ein heterogenes Verteilungsmuster. Der Minimalwert lag bei lediglich 2 Zellen pro High-Power-Field (HPF), während der Maximalwert 175 Zellen betrug. Der Mittelwert lag bei 33 PD-1+ Zellen pro HPF, sowie der Median bei 30 Zellen pro HPF. Das 95%-Konfidenzintervall lag zwischen 7 und 59 Zellen pro HPF. (siehe Tab.16; Seite 63).

Färbung	PD-1
Minimum	2
Maximum	175
Median	30
Mittelwert	33
Standardabweichung	26
95%-Konfidenzintervall	7 - 59
Anzahl Fälle	156

*Tabelle 16: Minimum, Maximum, Mittelwert und Median sowie 95%-Konfidenzintervall der PD-1+ TILs pro High Power Field (400-fache Vergrößerung) bei 156 Fällen des Adenokarzinoms der Lunge.*



*Abbildung 12: Tumorzellnester eines Adenokarzinoms der Lunge umgeben von PD-1 positiven immunkompetenten Zellen, 400-fache Vergrößerung, Antikörperklon NAT-105, Polymerbasierte Immunhistochemie mit DAB-Detektion.*

### 3.2.4.2) PD-L1 nach SP263 Klon:

Aufgrund der klinischen Relevanz unterschieden wir bei den Tumoren hinsichtlich PD-L1 zwischen „high-expressor“ Tumoren (>50% PD-L1+ Tumorzellen) und „low-expressor“ Tumoren (1-49% PD-L1+ Tumorzellen).

In unserer Studienpopulation zeigte sich in 53,2% (83/156) der Fälle eine membranständige Expression von PD-L1. Bei 13,46% (21/156) aller Fälle zeigte sich hierbei eine starke PD-L1 Positivität in mehr als 50% der Tumorzellen. Mit 39,73% (62/156) der Fälle wies der Großteil der PD-L1 positiven Tumore eine PD-L1 Positivität zwischen 1 und 49% der Tumorzellen auf.

46,8% (73/156) der Fälle zeigten keinerlei Expression von PD-L1 und waren somit PD-L1 negativ (siehe Tab.17).

Kategorie	„High Expressor“	„Low-Expressor“	„No Expressor“	Gesamt
PD-L1 Positivität in % der Tumorzellen	>50%	1-49%	0%	
Anteil in Prozent	13,46%	39,73%	46,8%	100%
Absolute Anzahl	21	62	73	156

Tabelle 17: Kategorien und Anteile unterschiedlicher PD-L1 Expressionen in 156 Adenokarzinomen der Lunge

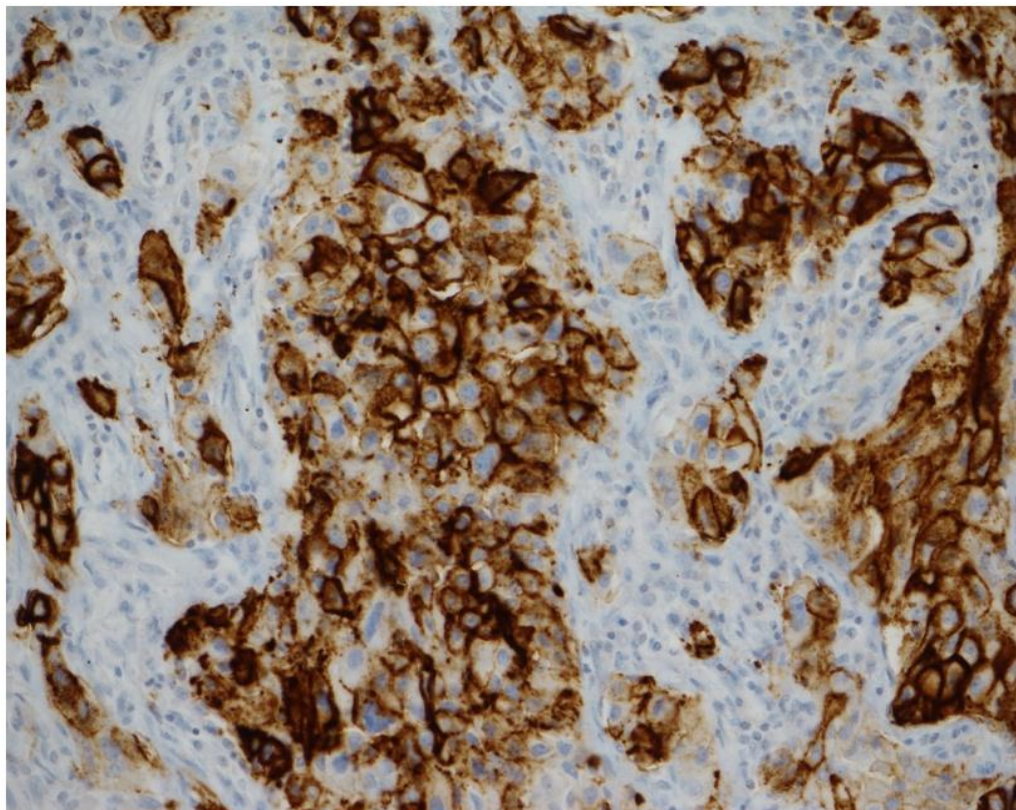


Abbildung 13: Adenokarzinom der Lunge mit starker, membranständiger PD-L1 Expression der Tumorzellen, 200-fache Vergrößerung, PD-L1 Antikörper (Antikörperklon Sp263), Polymerbasierte Immunhistochemie und DAB-Detektion.



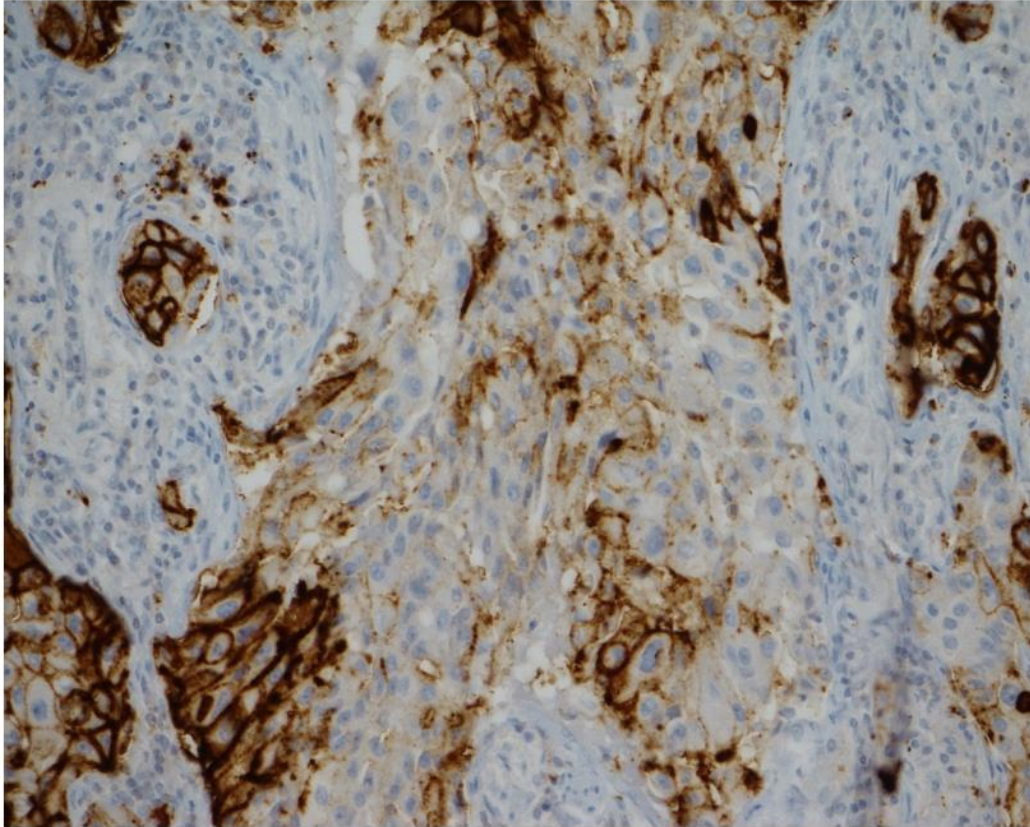


Abbildung 14: Adenokarzinom der Lunge mit geringer, nur lokalisiert nachweisbarer Expression von PD-L1 auf Tumorzellen, 200-fache Vergrößerung, PD-L1 Antikörper (Antikörperklon Sp263), Polymerbasierte Immunhistochemie mit DAB-Detektion.

### **3.3) Next Generation Sequencing:**

#### **3.3.1) Treibermutationen:**

Von den insgesamt 156 Fällen konnte bei 23 Fällen aufgrund mangelnder DNA-Qualität keine Sequenzierung durchgeführt werden.

Von den verbliebenen 133 molekulargenetisch aufgearbeiteten Fällen zeigte sich in 121 Fällen mindestens eine Mutation, die mit Hilfe des Amplikon-basierten-NGS-Panels des HPH nachgewiesen wurde.

Die mit Abstand häufigste Mutation lag im TP53-Gen bei 53,38% der Fälle (71/133) gefolgt von KRAS bei 37,59% der Fälle (50/133).

Alle anderen Mutationen kamen deutlich seltener vor:

Zu den selteneren Aberrationen gehörten EGFR mit 10,53% der Fälle (14/133), PI3KCA mit ca. 9% der Fälle (12/133) sowie die Mutationen MET und DDR2 mit jeweils 6,77% der Fälle (je 9/133). Weiterhin fanden wir therapeutisch relevante Mutationen in den Genabschnitten von PTEN und BRAF mit je 3,76% der Fälle (5/133), FGFR2 und CTNNB1 mit jeweils 2,26% der Fälle (3/133).

In jeweils einem Fall waren Mutationen in den Genen NRAS, HRAS und ALK nachweisbar. Eine vereinzelte Mutation im ALK-Gen wurde nicht zu den Treibermutationen gezählt, da es sich lediglich um eine Punktmutation ohne weitere Auswirkung handelte. Da eine Translokation nicht per NGS nachgewiesen werden kann, erfolgte eine immunhistochemische Nachuntersuchung von ALK. Aufgrund des sehr seltenen Auftretens von mehreren Treibermutationen im selben Tumor, wurde diese zusätzliche Untersuchung nur bei den 58 Fällen ohne Nachweis einer Treibermutation durchgeführt. In 8,62% der Fälle (5/58) konnte per Immunhistochemie eine Expression von ALK nachgewiesen werden, was indirekt für das Vorliegen einer EML-4-ALK-Translokation oder einer ALK-Amplifikation spricht. In einigen Genen wie AKT1, MAP2K1 und PTPN11 war in dieser Studienpopulation keine Mutation nachweisbar.

Von den insgesamt beschriebenen Mutationen handelte es sich in 20 Fällen um therapierbare Treibermutationen (14x EGFR und 1x BRAF V600E Mutationen sowie 5x immunhistochemischer Nachweis einer ALK Translokation bzw. Amplifikation).

Im Folgenden wurden die gefundenen Mutationen gruppiert. Hierbei wurde eine erste Gruppe mit therapierbaren Treibermutationen (definiert durch zugelassenes Medikament) mit den Genen EGFR, BRAF V600E und ALK Expression gebildet.

Eine zweite Gruppe mit biologischen Treibermutationen bestehend aus EGFR, ALK Expression, BRAF V600E, KRAS, NRAS, HRAS) sowie einer dritten Gruppe welche alle Mutationen umfasst. Es erfolgte eine statistische Korrelation jener Gruppen mit den immunhistochemischen Parametern.

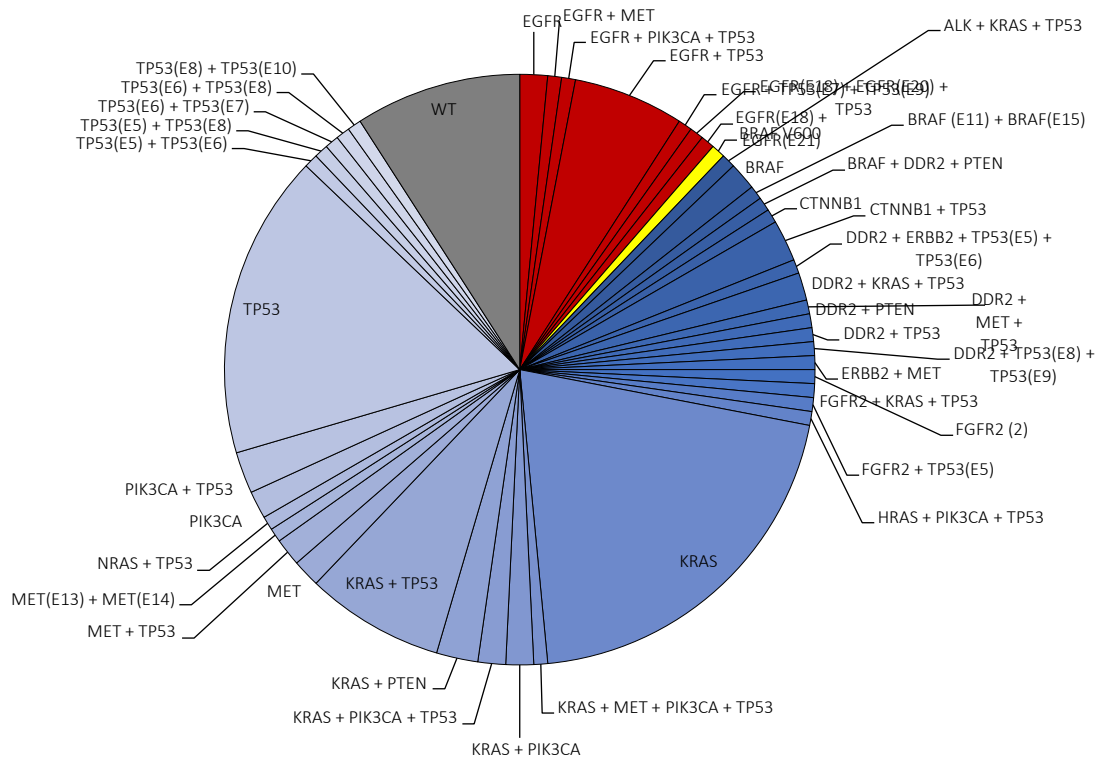


Abbildung 15: Zusammensetzung der Treibermutationen in der NGS-Analyse in 133 Adenokarzinomen der Lunge nach dem Lungenpanel des Hämatopathologischen Institut Hamburg (HpH).

### 3.3.2: Mutationskonstellationen:

#### EGFR:

Bei den therapierelevanten Mutationen konnte eine Vielzahl von Ko-Mutationen erfasst werden, sodass die entsprechenden Mutationen eher selten ausschließlich alleine auftraten, sondern meistens mindestens eine weitere Mutation des genannten Panels nachweisbar war. Von den insgesamt 16 detektierten EGFR Mutationen, waren in 12/14 Fällen bzw. 85,71% weitere Mutationen des Panels nachweisbar. Die häufigsten Mutationen stellten die Mutationen im TP53 Gen (insgesamt 11/14 Fälle bzw. 78,57%) dar. Davon waren in 3/14 Fälle bzw. 21,43% weitere Mutationen, wie zweifache Mutationen im EGFR- bzw. TP53 Gen, oder eine zusätzliche Mutation im PIK3CA-Gen vorhanden. In 2/14 Fällen bzw. 14,28% zeigte sich eine doppelte EGFR Mutation der Exone 18 und 21 bzw. Exon 18 und 20 (siehe Tab. 18).

Mutationskonstellation	Absolute Häufigkeit	Prozentualer Anteil (alle NGS Fälle)
EGFR	2	1,52%
EGFR+PIK3CA+TP53	1	0,76%
EGFR+TP53	8	6,06%
EGFR+ TP53(E7) + TP53(E9)	1	0,76%
EGFR(E18) + EGFR (E20) + TP53	1	0,76%
EGFR (E18) + EGFR (E21)	1	0,76%
EGFR Gesamt	14	10,52%

Tabelle 18: Mutationskonstellationen bei EGFR Mutationen in 133 Adenokarzinomen der Lunge.

#### KRAS:

Bei den Mutationen von KRAS zeigten sich häufiger Fälle mit isolierten KRAS Mutationen ohne Ko-Mutationen (27/49 Fälle bzw. 55,1%) als bei den anderen therapierelevanten Mutationen des Lungen Panels. Die häufigste Ko-Mutation stellt mit 17 Fällen das TP53 Gen dar (17/49 Fälle bzw. 34,69%). Hiervon waren 10 der 49 Fälle (bzw. 20,4%) ausschließlich mit dem TP53 Gen, sowie 7 weitere (7/49 bzw. 14,28%) mit zusätzlichen Ko-Mutationen vergesellschaftet. Zu diesen Konstellationen gehörten KRAS mit FGFR2 und TP53 (1/49 bzw. 2,04%), KRAS mit DDR2 und TP53 (1/49 bzw. 2,04%), KRAS mit PIK3CA und TP53

(2/49 bzw. 4,08%), KRAS mit MET, PIK3CA und TP53 (1/49 bzw. 2,04%) oder KRAS mit ALK und TP53 (1/49, bzw. 2,04%). In einem weiteren Fall konnte eine zusätzliche Mutation im PTEN-Gen detektiert werden (1/49, bzw. 2,04%) (siehe Tab. 19).

Mutationskonstellation	Absolute Häufigkeit	Prozentualer Anteil (alle NGS-Fälle)
KRAS	27	20,45%
KRAS+MET+PIK3CA+TP53	1	0,76%
KRAS+PIK3CA	2	1,52%
KRAS+PIK3CA+TP53	2	1,52%
KRAS+PTEN	3	2,27%
KRAS+TP53	10	7,58%
KRAS+FGFR2+TP53	1	0,76%
KRAS+ALK+TP53	1	0,76%
KRAS+DDR2+TP53	2	1,52%
KRAS Gesamt	49	36,84%

*Tabelle 19: Mutationskonstellationen bei KRAS Mutationen in 133 Adenokarzinomen der Lunge*

#### ALK:

Da ALK-Translokationen und Amplifikationen nicht zwingend per Amplikon basierter NGS-Sequenzierung nachweisbar sind, wurde eine zusätzliche immunhistochemische Untersuchung hinsichtlich einer ALK-Expression durchgeführt. In den 5 ALK positiven Fällen (5/58, bzw. 8,6%) zeigten sich bei 2 Fällen weitere Mutationen in der NGS Sequenzierung. Zu diesen Konstellationen gehörten ALK mit DDR2 und PTEN (1/5 bzw. 20%) sowie ALK und TP53 (1/5 bzw. 20%) (siehe Tab.20).

Mutationskonstellation	Absolute Häufigkeit	Prozentualer Anteil (aller immunhistochemisch untersuchten Fälle)
ALK	3	5,17%
ALK+DDR2+PTEN	1	1,72%
ALK+TP53	1	1,72%
ALK Gesamt	5	8,6%

*Tabelle 20: Mutationskonstellationen bei immunhistochemisch detektierter ALK Expression in 58 Adenokarzinomen der Lunge.*

**BRAF:**

Es konnten insgesamt 5 BRAF-Mutationen in unserer Studienpopulation detektiert werden. Bei einem dieser Fälle handelte es sich um die therapeutisch relevante BRAF V600E Mutation (1/5 bzw. 20%). 2 weitere Mutationen von BRAF waren nicht therapierelevant und zeigten keine weiteren Ko-Mutationen (2/5 bzw. 40%). In einem Fall wurden 2 Mutationen im BRAF Gen festgestellt, welche jedoch beide nicht zu den potentiell therapierelevanten Mutationen zählen (1/5 bzw. 20%). In nur einem Fall konnten mit DDR2 und PTEN weitere Ko-Mutationen detektiert werden (1/5 bzw. 20%) (siehe Tab.21).

Mutationskonstellation	Absolute Häufigkeit	Prozentualer Anteil (alle NGS-Mutationen)
BRAF V600E	1	0,76%
BRAF	2	1,52%
BRAF (E11) + BRAF(E15)	1	0,76%
BRAF+DDR2+PTEN	1	0,76%
BRAF Gesamt	5	3,76%

*Tabelle 21: Mutationskonstellationen bei BRAF Mutationen in 133 Adenokarzinomen der Lunge.*

### 3.4) Überleben und prognostische Parameter:

Für 155 Fälle unserer Studienpopulation wurden beim Krebsregister Hamburg die entsprechenden Daten zum Vitalstatus erfragt. In 100 Fällen konnten eindeutige Aussagen zum Vitalstatus getroffen werden. Von den 100 genannten Fällen waren 48 Patienten am Leben, während 52 Patienten verstorben waren und einem exakten Todeszeitpunkt zugewiesen werden konnten. Von den restlichen 55 Fällen waren 32 nicht aus Hamburg, 8 Personen waren aufgrund von Umzügen nicht mehr im Einzugsgebiet des Registers angesiedelt und 15 weitere waren unbekannt (siehe Abb.16).

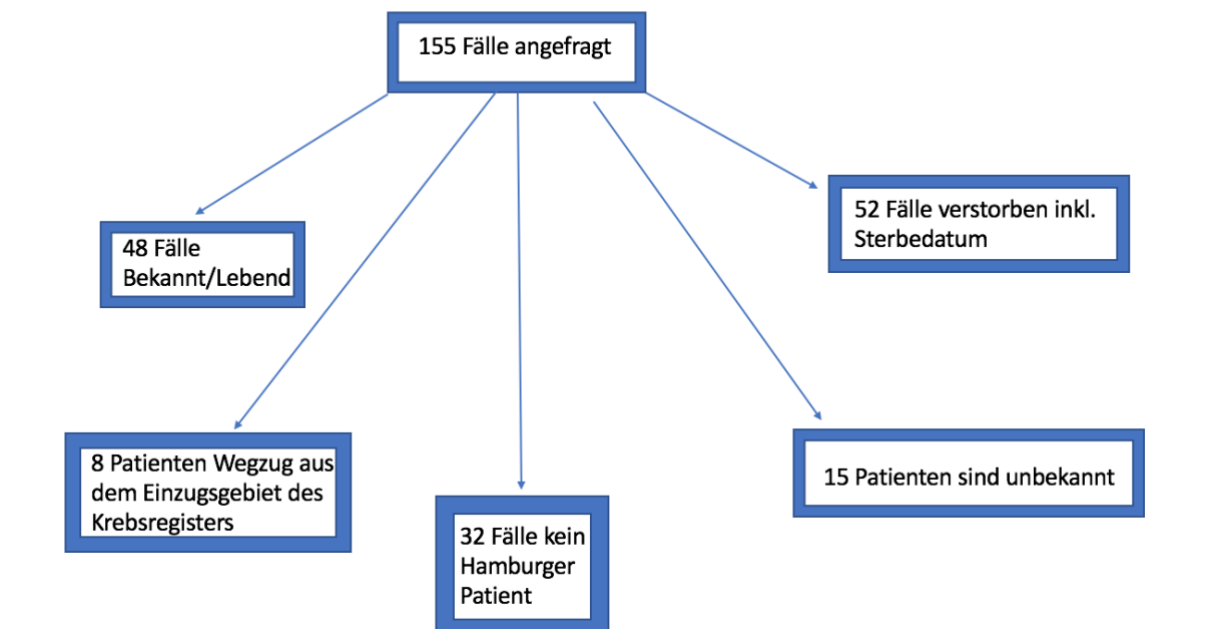


Abbildung 16: Verteilung der Ergebnisse des Hamburger Krebsregisters (Quelle: Powerpoint 2018, eigene Darstellung)

Für die Korrelationsanalyse wurden nur die Fälle mit einem eindeutigen Vitalstatus herangezogen (n=100). Bei den Fällen, welche bereits verstorben waren, wurde anhand des Sterbezeitpunktes und dem Datum der Erstdiagnose das Gesamtüberleben in Monaten ermittelt. Die Korrelationsanalyse erfolgte schließlich anhand des 5 Jahresüberlebens. Zum Zeitpunkt der Auswertung (Juli 2019) haben 12 Patienten den Zeitraum von 60 Monaten nach Diagnosestellung noch nicht vollständig erfüllt. Diese Fälle kamen ausschließlich in den pathologischen Stadien pT1 (8 Fälle) und pT2 (4 Fälle) bzw. den klinischen Stadien I (11 Fälle) oder II (1 Fall) vor. Um eine ausreichend große Stichprobe gewährleisten zu können wurden diese Fälle ebenfalls mit einbezogen und zunächst der Gruppe von lebenden Patienten und Patienten mit einem Gesamtüberleben von mehr als

60 Monaten hinzugefügt. Unter den Fällen mit bekanntem Vitalstatus befand sich ein Fall ohne genaue Kenntnis des Tumorstadiums, sodass nur 99 Fälle in die folgende Statistik einbezogen werden konnten.

Wir unterteilten die Patienten mit eindeutigen Vitalstatus nach dem pathologischen und klinischen Tumorstadium und verglichen den relativen Anteil an verstorbenen Patienten sowie den Median des Gesamtüberlebens in Monaten. Erwartungsgemäß zeigte sich die beste Prognose bei den Fällen in den klinischen Frühstadien, welche einen Anteil von 33,85% (22/65) an verstorbenen Patienten aufwiesen. Der Median des Gesamtüberlebens lag bei dieser Subgruppe bei 57 Monaten. Die Fälle im pathologischen Stadium II wiesen nach 60 Monaten bereits einen leicht höheren Anteil von 42% (3/7) an verstorbenen Patienten auf, welche mit einem Median von 52 Monaten eine ähnliche Lebenserwartung wie Patienten des Stadiums I aufwiesen. In den fortgeschrittenen klinischen Stadien zeigte sich schließlich eine deutlich eingeschränkte Lebenserwartung mit deutlich höheren Anteilen an verstorbenen Patienten. So sind im Stadium III bereits 75% (12/16) der angefragten Patienten innerhalb der ersten 60 Monate nach Diagnosestellung verstorben. Auch der Median des Gesamtüberlebens zeigt sich mit 22 Monaten deutlich eingeschränkt. Im klinischen Stadium IV kommt es zu einer weiteren Verschlechterung der Prognose. Hier sind bereits 100% (12/12) der Patienten verstorben und weisen einen Median von 5 Monaten für das Gesamtüberleben auf (siehe Tab.22).

UICC Stadium	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV	Gesamt
Anzahl Fälle	65	7	16	11	99
Verstorben innerhalb von 60 Monaten	22	3	12	11	48
5 Jahresüberlebensrate/ lebend	66,15%	58%	25%	0%	51,52%
Median des Gesamtüberlebens in Monaten	57	52	22	5	57

*Tabelle 22: Gesamtüberleben und Anteil Verstorbene in Abhängigkeit des klinischen Tumorstadiums bei 99 Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge.*



### 3.5) Korrelationsanalyse:

#### 3.5.1) Tumorstadien und Subpopulationen immunkompetenter Zellen:

Wir untersuchten die pathologischen und klinischen Tumorstadien nach UICC in Bezug auf die Häufigkeit der verschiedenen Subpopulationen immunkompetenter Zellen in der direkten Tumorumgebung. Hierfür wurde der Median der ermittelten Mediane der Subgruppen der unterschiedlichen Immunzellsubpopulationen in den unterschiedlichen Tumorstadien ermittelt. Die Korrelationsanalyse erfolgte anschließend per Mann-Whitney-U Test.

Hier konnte ebenfalls einer der 156 Fälle aufgrund fehlender Kenntnis des Tumorstadiums nicht berücksichtigt werden, sodass insgesamt 155 Fälle verglichen werden konnten.

Färbungen	Median CD3	Median CD8	Median CD19	Median CD20	Median Fox-P3	Median PD-1	Anzahl Fälle
T-Stadium pT1a und pT1b	103	68	21	12	6	32	83
T-Stadium pT2a und pT2b	86	57	21	11	7	30	37
T-Stadium pT3	76	63	8	4	3	24	19
T-Stadium pT4	90	52	20	11	2	16	13

*Tabelle 23: Mediane der Immunzellsubpopulationen in Abhängigkeit des pathologischen T-Stadiums bei 152 Adenokarzinomen der Lunge.*

Färbungen	Median CD3	Median CD8	Median CD19	Median CD20	Median Fox-P3	Median PD-1	Anzahl Fälle
Stadium I	90	67	20	12	7	31	99
Stadium II	99	87	15	12	3	37	12
Stadium III	108	82	20	14	3	39	26
Stadium IV	63	44	15	5	6	20	18

*Tabelle 24: Mediane der Immunzellsubpopulationen in Abhängigkeit der klinischen Tumorstadien nach UICC bei 155 Adenokarzinomen der Lunge.*

Hinsichtlich der CD3 positiven TILs zeigte sich eine relativ konstante Anzahl an Immunzellen in den verschiedenen Tumorstadien. Während die Anzahl in den Stadien pT1a und b mit einem Median von 103 Zellen am höchsten ausfiel, unterschieden sich die T-Stadien zwischen pT2a/b und pT3 nur geringfügig (Median jeweils zwischen 86 und 76). Im T-Stadium pT4 hingegen zeigte sich die Anzahl der CD3+ TILs mit einem Median von 90 wieder leicht ansteigend. (siehe Tab.23).

In den klinischen Tumorstadien nach UICC wurde in den früheren Stadien ein stetiger Anstieg der CD3+ TILs, mit einem Median von 90 TILs pro HPF in Stadium I zu einer Median-Population von 108 Zellen pro HPF im Stadium III, beobachtet. Im Stadium IV hingegen kam es zu einem starken Rückgang der Anzahl CD3+ TILs (Median=63 Zellen). Dieser Rückgang war mit  $p=0,06288$  statistisch nicht signifikant, was jedoch auf die geringe Anzahl von Fällen im Stadium IV (18/155 bzw. 11,6%) zurückgeführt werden könnte (siehe Tab.24, Seite 73).

Die CD8 positiven T-Zellen hingegen zeigen ebenfalls einen konstanten Infiltrationsgrad in den T-Stadien pT1-pT3. Hier zeigte sich mit einem Median von 68 Zellen pro HPF die stärkste Infiltration in den T-Stadien pT1a/b, welche in den Stadien pT2a/b auf 57 Zellen sank um im T-Stadium pT3 erneut auf einen Median von 63 Zellen anzusteigen. Im T-Stadium pT4 kam es schließlich zu einer Abnahme der CD8+ TILs auf nur 52 Zellen. Diese Abnahme war jedoch nach dem Mann-Whitney-U Test mit  $p=0,25014$  nicht signifikant. Auch hier könnte jedoch die geringe Anzahl an Fällen (nur 13 Fälle) im Stadium pT4 verantwortlich sein (siehe Tab.23, Seite 73).

In den klinischen Tumorstadien war ein geringer Anstieg der CD8+ TILs von 67 Zellen im Stadium I auf 87 bzw. 82 CD8+ TILs in den Stadien II und III nachweisbar.

Im Stadium IV hingegen kam es zu einem deutlichen Rückgang der Anzahl CD8+ TILs auf einen Median von 44 Zellen. Dieser Rückgang war nach dem Mann-Whitney U Test mit  $p=0,014$  statistisch signifikant (siehe Abb.17).

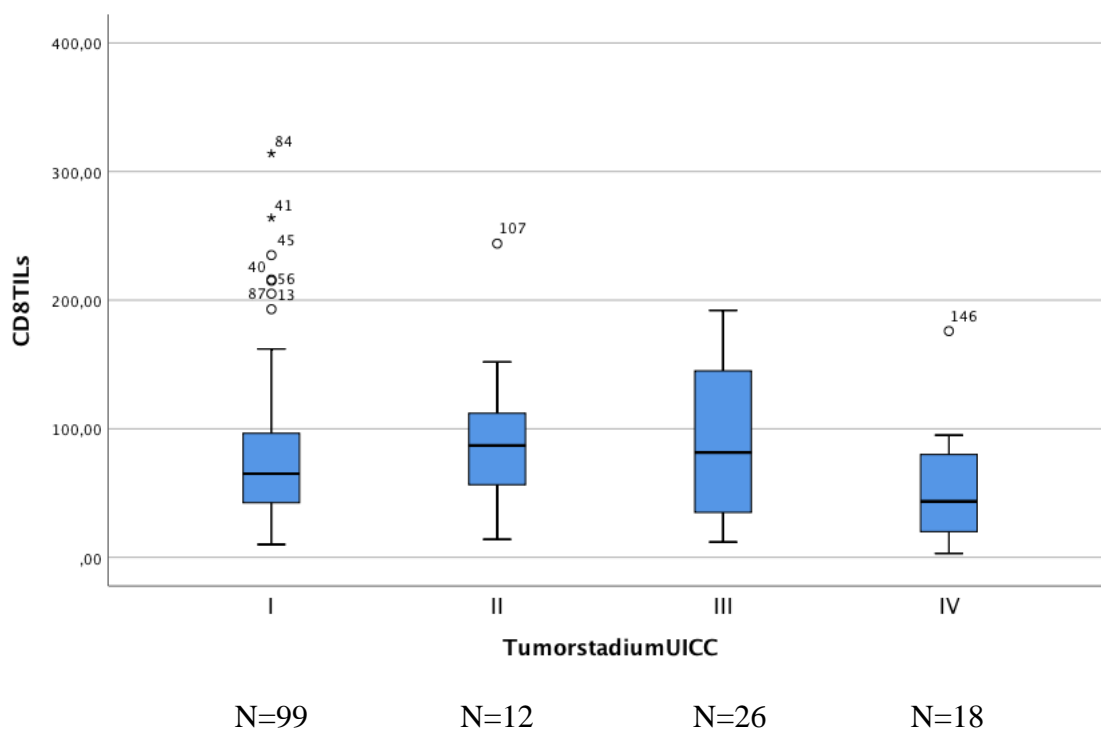


Abbildung 17: Mediane der CD8+ zytotoxischen T-Zellen in Abhängigkeit des klinischen Tumorstadiums nach UICC in 155 Adenokarzinomen der Lunge.

Die CD19 positiven B-TILs zeigten, abgesehen vom T-Stadium pT3, mit einem Median von 8 B-TILs nahezu identische Infiltrationszahlen im pathologischen T-Stadium pT1, pT2 und pT4 (Median von 21 B-TILs in den Stadien pT1a/b und pT2, sowie 20 B-TILs für die Stadien pT4) (siehe Tab.23, Seite 73).

Auch beim klinischen Stadium zeigte sich zwar eine gewisse Schwankung der Anzahl von CD19+ B-TILs mit 15 B-TILs in den Stadien II und IV, sowie 20 BTILs in den Stadien I und III. Diese waren jedoch statistisch nicht signifikant (siehe Tab.24, Seite 73).

Eine deutlichere Abnahme zeigte sich bei dem Marker CD20. Hier zeigten die pathologischen Frühstadien pT1a/b und pT2a/b mit einem Median von 12 bzw. 11 B-TILs vergleichbare Infiltrationszahlen, während die Anzahl des fortgeschrittenen T-Stadiums pT3 mit 4 B-TILs deutlich geringer war. Im T-Stadium pT4 hingegen konnte mit einem Median von 11 B-TILs ein erneuter Anstieg auf die Werte der frühen T-Stadien beobachtet werden.

In den klinischen Tumorstadien zeigte sich, hinsichtlich der Anzahl CD20 positiver B-TILs, jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen den Stadien I-III und dem Stadium IV.

So konnten für die Stadien I-III relativ konstante Anzahlen von CD20+ BTILs beobachtet werden (zwischen 12 und 14 B-TILs), während es im Stadium IV zu einem starken Rückgang auf nur 5 B-TILs kam. Dieser Rückgang war mit  $p=0,02382$  statistisch signifikant (siehe Abb.18).

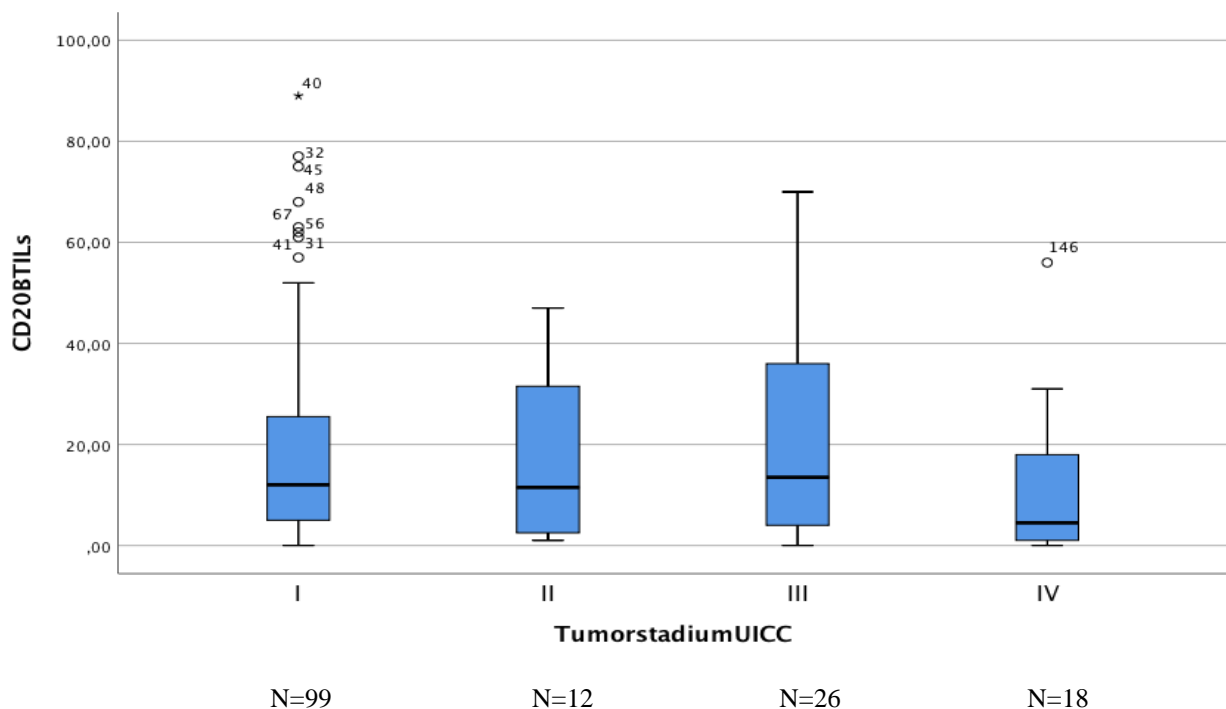


Abbildung 18: Mediane der Anzahl CD20+ BTILs in Abhängigkeit der klinischen Tumorstadien nach UICC in 155 Adenokarzinomen der Lunge

Bei den Fox-P3 positiven TILs zeigte sich ein deutlicher relativer Unterschied zwischen den Medianen der Frühstadien (n=6 in den Stadien pT1a/b und n=7 in den Stadien pT2a/b) und der fortgeschrittenen pathologischen Tumorstadien (n=3 in T-Stadium pT3 und n=2 in T-Stadium pT4). Dieser Unterschied zeigte jedoch aufgrund der ungleichmäßigen Häufigkeit der unterschiedlichen Stadien und der geringen absoluten Unterschiede keine statistische Relevanz.

Im klinischen Tumorstadium wurde im frühen Stadium I eine relativ hohe Anzahl von 7 Fox-P3+ TILs ausgezählt, welche in den folgenden Stadien II und III auf einen Median von 3 Zellen pro HPF zurückging. Im Stadium IV hingegen konnte wieder ein Anstieg der Fox-P3 positiven TILs auf einen Median von 6 Zellen pro HPF beobachtet werden (siehe Tab.24, Seite 73).

### **3.5.2) Korrelationen von PD-1:**

Wir untersuchten den Rezeptor des „programmed death pathways“ PD-1 immunhistochemisch (siehe Kapitel 3.2.4.1, Seite 62) und überprüften ihn hinsichtlich Abhängigkeiten zu den Tumorstadien, der Follikelreaktion und den anderen Subpopulationen der immunkompetenten Zellen.

#### **3.5.2.1) PD-1 und Tumorstadien:**

Die Korrelationsanalyse erfolgte durch den Vergleich der Mediane der PD1+ TILs in direkter Tumorumgebung in den Subgruppen der unterschiedlichen Tumorstadien. Hierfür wurde der Mann-Whitney-U Test angewendet.

Hinsichtlich der Expression von PD-1 zeigte sich ein Rückgang der Anzahl von PD-1+ TILs mit fortschreitendem T-Stadium. Passend zu der Abnahme der CD8 positiven T-Lymphozyten wurde der Rückgang besonders deutlich zwischen den T-Stadien pT3 und pT4. Hier fiel die Anzahl von einem Median von 24 Zellen in Stadium pT3 auf einen Median von 16 Zellen im Stadium pT4. Anhand des Mann-Whitney-U Testes stellte sich der Unterschied zwischen dem Stadium pT4 und den Stadien pT1-pT3 mit  $p=0,1868$  nicht als signifikant heraus (siehe Abb. 19, Seite 77).

In den klinischen UICC Stadien konnte ebenfalls kein signifikanter Rückgang der PD-1 positiven T-Zellen im Stadium IV gegenüber den Stadien I-III beobachtet werden. Der p-Wert betrug hier 0,25014.

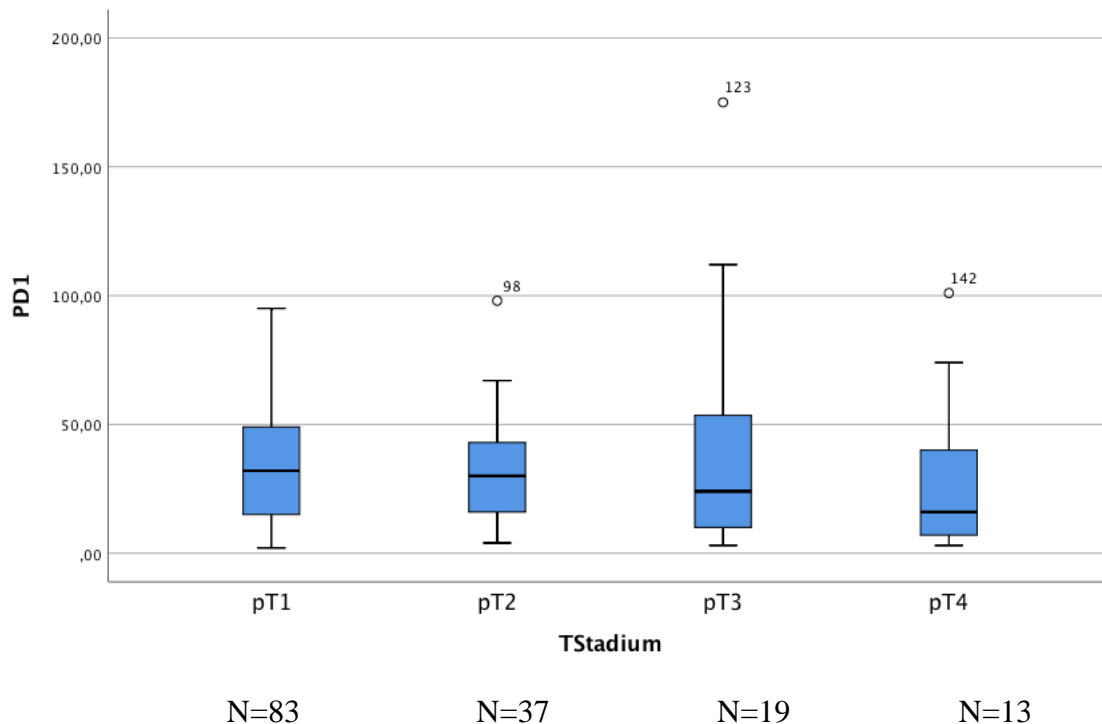


Abbildung 19: Anzahl PD-1 positiver immunkompetenter Zellen in Abhängigkeit des pathologischen T-Stadiums von 152 Adenokarzinomen der Lunge.

### **3.5.2.2) Tumorstadien und B-Follikel:**

Wir verglichen die klinischen Tumorstadien nach UICC sowie die pathologischen T-Stadien mit den Follikelreaktionen in den Färbungen CD19 und CD20. Hierfür wurde die Häufigkeit der Untergruppen von Follikelreaktionen in den verschiedenen Tumorstadien korreliert.

Hierbei wurde der Fisher's exact Test verwendet. Ein Fall konnte bei unklarem Tumorstadium nicht einbezogen werden, sodass insgesamt 155 Fälle berücksichtigt wurden.

Verglichen wurden die Tumorstadien I-III nach UICC mit dem Stadium IV. Die Follikelreaktionen wurden in lediglich 2 Kategorien zusammengefasst. Eine Gruppe bildeten die negativen bzw. schwachen Follikelreaktionen (0-3 Follikel) sowie die mäßigen bzw. starken Follikelreaktionen (ab 4 Follikel) eine weitere Gruppe.

In der Färbung CD20 konnte mit  $p=0,0453$  ein signifikant selteneres Auftreten von mäßigen bzw. starken Follikelreaktionen in dem UICC Stadium IV nachgewiesen werden (siehe Abb.20, Seite 78).

In der CD19 Färbung zeigte sich ebenfalls eine Tendenz, welche mit  $p=0,0934$  jedoch nicht signifikant war.

Bei den pathologischen T-Stadien hingegen konnte bei beiden Färbungen kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Eine gewisse Tendenz zeigte sich lediglich, sofern das pathologische Tumorstadium pT4 mit den Stadien pT1-pT3 hinsichtlich der Anzahl der

starken CD19+ B-Follikelreaktionen mit mehr als 9 Follikeln verglichen wurde. Hier betrug der p-Wert 0,0634.

UICC Stadium und CD20+ B-Follikel	Negative/schwache B-Follikelreaktion	Mäßige/starke B-Follikelreaktion	Gesamt
Stadium I-III	30	107	137
Stadium IV	8	10	18
p=0,0453	38	117	155

Abbildung 20: Vierfeldertafel zur Korrelation von CD20+ B-Follikelreaktionen und dem klinischen Tumorstadium nach UICC in 155 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

### 3.5.2.3) PD-1 und B-Follikel:

Wir untersuchten die Abhängigkeit von der PD-1 Expression sowie der Anzahl von B-Follikeln im Randbereich. Hierfür erfolgten Korrelationen zwischen dem Median der PD-1+ TILs in der direkten Tumorumgebung sowie den 4 Subgruppen der B-Follikelreaktionen in den beiden Färbungen CD19 und CD20. Die Korrelation erfolgte anhand des Mann-Whitney-U Tests.

Für den Marker CD19 zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl PD-1 positiver Zellen zwischen den negativen/schwachen Follikelreaktionen und den mäßigen Follikelreaktionen. Dieser Unterschied war mit  $p=0,0005$  statistisch hochsignifikant. Zwischen der mäßigen Follikelreaktion und der starken Follikelreaktion konnte wiederum ein signifikanter Anstieg ( $p=0,0041$ ) an PD-1 positiven Zellen gezeigt werden (siehe Abb. 21).

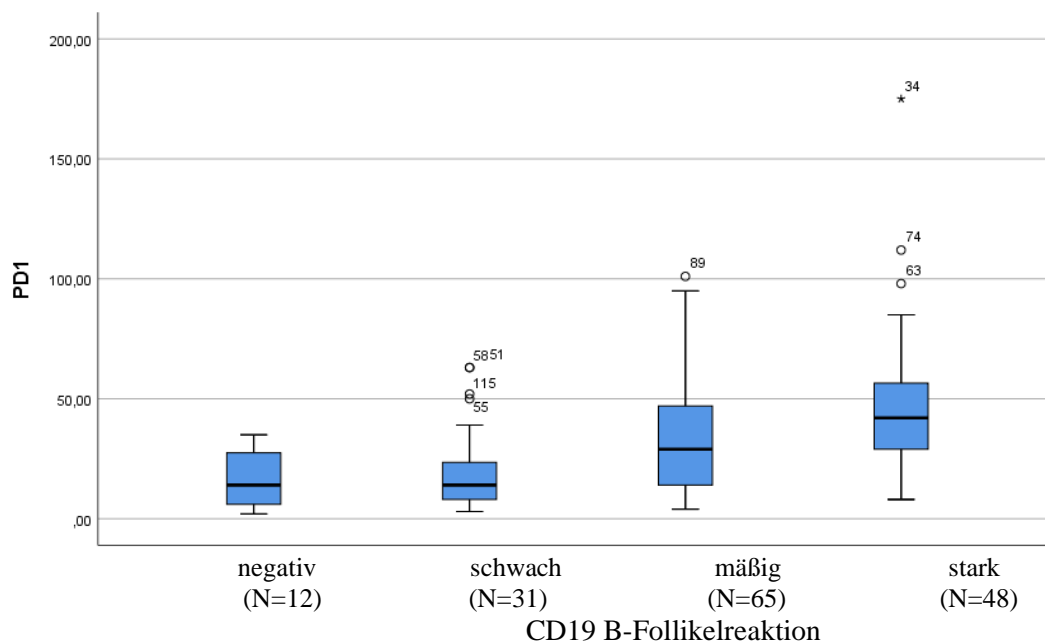


Abbildung 21: Intensität der B-Follikelreaktion im Tumorrandbereich in der CD19 Färbung in Abhängigkeit der Anzahl PD-1+ Zellen von 156 Adenokarzinomen der Lunge.

Wir wählten das gleiche Vorgehen bei der CD20 Färbung. Hierbei zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede in Bezug auf die Anzahl PD-1 positiver Zellen zwischen negativer/geringer Follikelreaktion und mäßiger B-Follikelreaktion ( $p=0,08$ ). Zwischen der mäßigen und der starken Follikelreaktion zeigte sich sogar ein deutlicherer Signifikanzunterschied ( $p=0,0025$ ) als bei der CD19 Färbung (siehe Abb. 22).

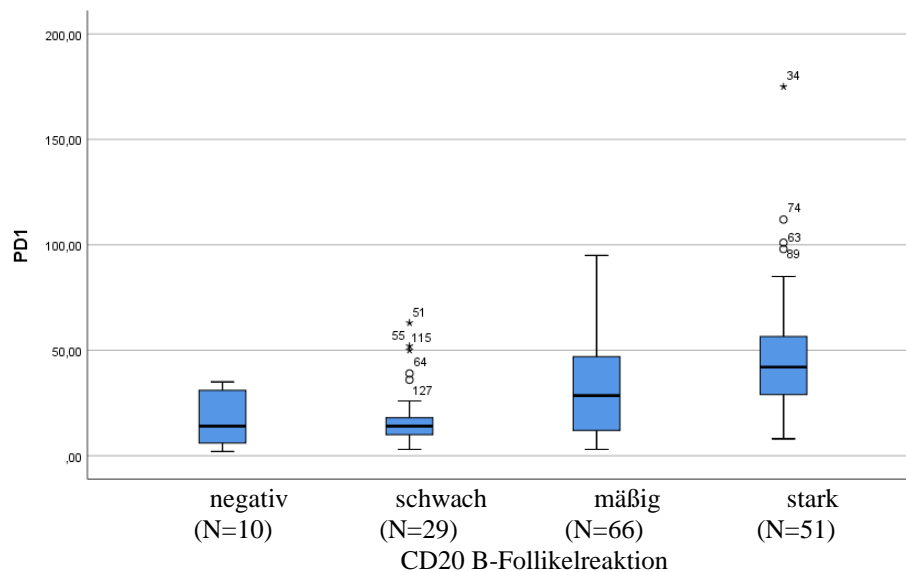


Abbildung 22: B-Follikelreaktion in der CD20 Färbung in Abhängigkeit der Anzahl PD-1+ Zellen im Tumorrandbereich von 156 Adenokarzinomen der Lunge.

### 3.5.3) Übersicht Korrelationsanalyse Treibermutationen/Checkpointproteine und Immunzellsubpopulationen:

Für jedes Tumorresektat wurden folgende Parameter und Biomarker ermittelt.

1) Die Expression der Proteine PD-1/PD-L1 des „programmed death pathways“ auf Tumorzellen (hier nur PD-L1) und immunkompetenten Zellen, 2) die pathologischen und klinischen Tumorstadien, 3) eine Mutationsanalyse der häufigsten therapie relevanten Mutationen in Adenokarzinomen der Lunge sowie 4) eine immunhistochemische Analyse der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Subpopulationen von immunkompetenten Zellen in der direkten Tumorumgebung. Ziel war die Ermittlung von potentiellen Zusammenhängen zwischen Tumorstadium, PD-L1 Expression, TIL-Infiltration und somatischen Treibermutationen in der Tumor-DNA. Hierfür wurden die entsprechenden Parameter untereinander korreliert.

Um die Korrelationen zu erleichtern wurden zur Erstellung auswertbarer Gruppen die immunhistochemischen Parameter wie folgt eingeteilt:

Von jedem Expressionsparameter wurde der Median aus den ausgezählten Ergebnissen der 3 ausgezählten High-Power-Fields ermittelt. Von den insgesamt 156 Medianen der einzelnen Fälle wurde schließlich der Median der Gesamtpopulation ermittelt. Von diesem Median ausgehend, wurde eine Gruppe mit Infiltrationszahlen unterhalb des Median, und eine Gruppe mit Infiltrationszahlen oberhalb des Medians gebildet. Die anderen Biomarker wurden jeweils in 2 Gruppen unterteilt mit anschließender Aufteilung der Subgruppen anhand des Medians und des weiteren Kriteriums (Tumorstadium, Checkpointprotein, Treibermutation oder TP53) in einer Vierfeldertafel. Anschließend erfolgte die Signifikanztestung mit dem Fisher's exact test.

Zur weiteren Vereinfachung wurden die Treibermutationen in die bereits genannten Untergruppen der therapierbaren Treibermutationen (Mutationen mit aktuell zugelassenem Medikament wie EGFR, ALK, BRAF V600E) und der biologischen Treibermutationen (EGFR, ALK Expression, BRAF V600E, KRAS, NRAS, HRAS) eingeteilt.

Die PD-L1 Expression wurde in zwei Untergruppen mit einer Expression von >50% sowie <50% eingeteilt. Wie bei den vorigen genannten Korrelationsanalysen unterschieden sich je nach Biomarker teilweise die Gesamtanzahl der inkludierten Fälle. Bei Analysen des Tumorstadiums wurden weiterhin 155 Fälle inkludiert. Bei den Korrelationen der Checkpointproteine und TILs hingegen wurden alle 156 Fälle berücksichtigt, während bei den Korrelationsanalysen von TP53, Treibermutationen und allen Mutationen nur 133 Fälle berücksichtigt werden konnten.

### 3.5.3.1) CD3:

Verglichene Parameter	CD3 und PD-L1	CD3 und TP53	CD3 und therapierbare TM	CD3 und biologische TM	CD3 und alle Mutationen
p-Value	0,0007	0,8628	0,809	0,3162	0,3649

*Tabelle 25: Korrelationen von CD3 und PD-L1, sowie den Subgruppen von Treibermutationen von 156 (PD-L1) bzw. 133 (TP53 und Treibermutationen) Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.*

Je nach Höhe des Medians der CD3 positiven TILs wurden Gruppen mit Fällen oberhalb bzw. unterhalb des Medians für CD3 positive TILs in der direkten Tumorumgebung der Gesamtpopulation gebildet und mit der membranständigen Expression von PD-L1 der Tumorzellen korreliert. Hierfür wurden die Tumore in die klinisch relevante Gruppe der „high-expressor“ Tumore (Anteil der PD-L1 exprimierenden Tumorzellen >50%) und die



Gruppe der „no-expressor“ Tumore bzw. „low-expressor“ Tumore (keine PD-L1 Expression bzw. PD-L1 Positivität bei 1-49% der Tumorzellen) eingeteilt. Hierbei zeigte sich bei der Gruppe der „high-expressor“ Tumore ein, mit  $p=0,0007$  statistisch hochsignifikant, häufigeres Auftreten von Fällen mit CD3 Infiltrationen unterhalb des Medians der Gesamtpopulation (siehe Abb.23). Vergleicht man die Gruppen der Tumore mit keiner Expression mit denen der Low-Expressor Tumoren, hinsichtlich der Anzahl CD3 positiver Zellen, zeigt sich ebenfalls eine Tendenz. Diese ist mit  $p=0,0851$  jedoch nicht signifikant.

Wir verglichen ebenfalls die Anzahl der CD3 positiven TILs mit verschiedenen Gruppen von Mutationen in der Tumor-DNA, welche wir mittels NGS ermittelten.

Hierbei zeigte sich jedoch keinerlei statistischer Zusammenhang. Weder bei allen Mutationen ( $p=0,3649$ ), der Subgruppe von therapierbaren Treibermutationen ( $p=0,809$ ) oder der Subgruppe von biologischen Treibermutationen ( $p=0,3162$ ). Überraschend konnte ebenfalls kein Zusammenhang mit der TP53 Mutation, welche aufgrund der Instabilität der DNA-Reparaturmechanismen auf eine höhere „Tumor mutational burden“ (TMB) und Immunogenität des Tumors hindeutet, nachgewiesen werden. (siehe Tab.25, Seite 80)

	PD-L1 positiv	PD-L1 negativ	Total
>Median CD3	3	75	78
<Median CD3	18	60	78
p-Value=0,0007	21	135	156

Abbildung 23: Vierfeldertafel zu Korrelation zwischen PD-L1 High-Expressor Tumoren und der Anzahl CD3 positiver TILs in 156 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

### 3.5.3.2) CD8:

Verglichene Parameter	CD8 und PD-L1	CD8 und TP53	CD8 und therapierbare TM	CD8 und biologische TM	CD8 und alle Mutationen
p-Value	0,2429	0,0817	0,4678	0,3864	1

Tabelle 26: Korrelation von CD8 und PD-L1 sowie den Subgruppen der Treibermutationen in 156 (PD-L1) bzw. 133 (TP53 und Treibermutationen) Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

Wir ermittelten die Anzahl der CD8 positiven, zytotoxischen T-Zellen und verglichen diese mit der klinisch relevanten membranständigen Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen (>50% PD-L1 positiver Tumorzellen). Hierbei konnte der statistische Zusammenhang, wie wir ihn bei den CD3 positiven TILs feststellen konnten, nicht reproduziert werden.

Auch hier beobachteten wir keinen statistischen Zusammenhang mit den Treibermutationen.

Dies galt für alle Mutationen ( $p=1$ ) sowie für die beiden Subgruppen von biologischen Treibermutationen ( $p=0,3864$ ) und den therapierbaren Treibermutationen ( $p=0,4678$ ). (siehe Tab.26, Seite 81)

### 3.5.3.3) CD19:

Verglichene Parameter	CD19 und PD-L1	CD19 und TP53	CD19 und therapierbare TM	CD19 und biologische TM	CD19 und alle Mutationen
p-Value	1	0,488	0,4188	0,0151	0,7604

Tabelle 27: p-Werte der Korrelationen von CD19 mit Treibermutationssubgruppen, TP53 und PD-L1 in 156 (PD-L1) bzw. 133 (TP53 und Treibermutationen) Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

Wir ermittelten die Anzahl der CD19 positiven B-TILs im nekrosefreien Tumorstroma und korrelierten die ausgezählten Ergebnisse mit den oben genannten Parametern. Hierbei wurden Korrelationsanalysen für mögliche Zusammenhänge mit Mutationen im TP53 Gen, den verschiedenen Subgruppen von Treibermutationen sowie der klinisch relevanten Expression von PD-L1 durchgeführt.

Es konnte kein Zusammenhang hinsichtlich der Expression von PD-L1 und der Anzahl CD19 positiver B-TILs im Tumorstroma festgestellt werden ( $p=1$ ). Auch bei den Fällen mit mutiertem TP53 Gen zeigte sich keine signifikante Veränderung in der Infiltration der B-Zellen ( $p=0,488$ ). (siehe Tab.27)

Bei den Mutationen zeigte sich ebenfalls kein Zusammenhang, wenn nur die therapierbaren Mutationen ( $p=0,6312$ ) oder alle Mutationen ( $p=0,7604$ ) berücksichtigt wurden.

Wurden jedoch ausschließlich die Subgruppe der biologischen Treibermutationen berücksichtigt, wurden mit  $p=0,0151$  signifikant häufiger Fälle mit niedrigen B-TIL Zahlen, bei Vorliegen einer biologischen Treibermutation, beobachtet (siehe Abb.24).

	biologische TM (+)	biologische TM (-)	Total
>Median CD19	28	37	65
< Median CD19	44	24	68
Total	72	61	133

Abbildung 24: Vierfeldertafel zur Korrelation von biologischen Treibermutationen und CD19+ B-TILs in 133 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test

### 3.5.3.4) CD20:

Verglichene Parameter	CD20 und PD-L1	CD20 und TP53	CD20 und therapierbare TM	CD20 und biologische TM	CD20 und alle Mutationen
p-Value	0,4885	0,8628	1	0,166	0,3582

Tabelle 28: p-Werte der Korrelationen von CD20 mit Treibermutationssubgruppen, TP53 und PD-L1 in 156 (PD-L1) bzw. 133 (TP53 und Treibermutationen) Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

Wir ermittelten die Anzahl der CD20 positiven B-TILs in der direkten Tumorumgebung (nekrosefreies Tumorstroma) und verglichen diese mit allen Treibermutationen sowie deren Subgruppen, dem TP53 Gen und der klinisch relevanten Expression von PD-L1 durch den Tumor.

Hierbei konnte hinsichtlich PD-L1 mit  $p=0,4885$  kein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden. Auch bei dem TP53 Gen zeigte sich mit  $p=0,8628$  keinerlei statistischer Zusammenhang. Bei allen Treibermutationen ( $p=0,3582$ ) und deren Subgruppen der therapierbaren Treibermutationen ( $p=1$ ) und den biologischen Treibermutationen ( $p=0,166$ ) waren ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse zu beobachten. (siehe Tab.28)

Der Zusammenhang mit den biologischen Treibermutationen, welcher bei den höheren Infiltrationszahlen von CD19 signifikant ist, lässt sich auch hier in Form einer schwachen Tendenz ( $p=0,166$ ) reproduzieren (siehe Tab. 28).

### 3.5.3.5) Fox-P3:

Verglichene Parameter	Fox-P3 und PD-L1	Fox-P3 und TP53	Fox-P3 und therapierbare TM	Fox-P3 und biologische TM	Fox-P3 und alle Mutationen
p-Value	0,6398	0,14789	0,3325	0,8629	0,3528

Tabelle 29: p-Werte der Korrelationen von Fox-P3 mit Treibermutationssubgruppen, TP53 und PD-L1 in 156 (PD-L1) bzw. 133 (TP53 und Treibermutationen) Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

Wir zählten die regulatorischen T-Zellen in der direkten Tumorumgebung und korrelierten diese mit der klinisch relevanten Expression von PD-L1 (>50% der Tumorzellen) sowie mit allen Mutationen des NGS-Panels, den Subgruppierungen der biologischen Treibermutationen, den therapierbaren Treibermutationen und dem TP53 Gen.

Hierbei konnte bei keinem der Tests ein statistisch signifikanter Zusammenhang gezeigt werden. Dies galt für die Gruppe mit allen Mutationen ( $p=0,3528$ ), sowie für die Subgruppen der biologischen Treibermutationen ( $p=0,8629$ ) und den therapierbaren Treibermutationen ( $p=0,3325$ ).

Einzig bei der Korrelation mit der Mutation des TP53 Gens konnte mit  $p=0,1478$  eine leichte Tendenz nachgewiesen werden, welche jedoch ebenfalls nicht signifikant war (siehe Tab.29, Seite 83).

### 3.5.3.6) PD-1:

Verglichene Parameter	PD-1 und PD-L1	PD-1 und TP53	PD-1 und therapierbare TM	PD-1 und biologische TM	PD-1 und alle Mutationen
p-Value	0,4816	1	0,809	0,2979	0,5311

Tabelle 30: p-Werte der Korrelationen von PD-1+ TILs mit Treibermutationssubgruppen, TP53 und PD-L1 in 156 (PD-L1) bzw. 133 (TP53 und Treibermutationen) Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

Wir zählten die PD-1 positiven TILs in der direkten Tumorumgebung (nekrosefreies Tumorstroma) und korrelierten diese mit der klinisch relevanten Expression von PD-L1 auf mindestens 50% der Tumorzellen und dem Auftreten von Mutationen im TP53 Gen.

Hinzu kamen Korrelationen mit allen Mutationen des NGS-Panels und den Subgruppen der biologischen bzw. therapierbaren Treibermutationen.

Hierbei konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Parametern hergestellt werden. Dies galt bei dem TP53 Gen ( $p=1$ ), den Subgruppen der Treibermutationen ( $p=0,809$  für therapierbare und  $p=0,2979$  für biologische Treibermutationen) und bei der Berücksichtigung aller Mutationen ( $p=0,5311$ ). Auch bei einer klinisch relevanten Expression von PD-L1 bei mehr als 50% der Tumorzellen ( $p=0,4816$ ), zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Infiltration von PD-1 positiven Zellen (siehe Tab. 30).

### 3.5.3.7) CD19 Follikel:

Verglichene Parameter	CD19 Follikel und PD-L1	CD19 Follikel und TP53	CD19 Follikel und therapierbare TM	CD19 Follikel und biologische TM	CD19 Follikel und alle Mutationen
p-Value	1	0,1295	0,4178	0,0334	0,7265

Tabelle 31: p-Werte der Korrelationen von CD19 Follikeln mit Treibermutationssubgruppen, TP53 und PD-L1 in 156 (PD-L1) bzw. 133 (TP53 und Treibermutationen) Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

Wir ermittelten die Anzahl der CD19+ Follikel im Tumorrandbereich und ordneten diese in die Kategorien negativ bis stark ausgeprägt. Anschließend verglichen wir die Fälle mit negativen bzw. geringen Follikelreaktionen (1-3 Follikel) mit den Fällen, welche eine mäßige (3-8 Follikel) oder starke Follikelreaktion (>8 Follikel) aufwiesen.

Wir korrelierten die Follikel mit allen Mutationen, mit den Untergruppen der therapierbaren und biologischen Treibermutationen sowie mit dem TP53-Gen. Hinzu kam eine Korrelation

mit Fällen, welche eine klinisch relevante Expression von >50% PD-L1 positiver Tumorzellen aufwies.

Hierbei konnte bei allen Mutationen ( $p=0,7265$ ), den therapierbaren Treibermutationen ( $p=0,4178$ ) und bei PD-L1 ( $p=1$ ), kein statistischer Zusammenhang festgestellt werden.

Bei dem mutierten TP53 Gen zeigte sich eine gewisse Tendenz, welche jedoch mit  $p=0,1295$  nicht signifikant war (siehe Tab.31, Seite 84).

Bei Vorliegen einer biologischen Treibermutation hingegen konnte mit  $p=0,0344$  ein signifikant selteneres Auftreten von starken CD19+ Follikelreaktionen im Randbereich des Tumors nachgewiesen werden (siehe Abb.25).

	biologische TM (+)	biologische TM (-)	Total
Negative/ schwache CD19 Follikelreaktion	25	11	36
Mäßige/starke CD19 Follikelreaktion	47	50	97
p-Value=0,0344	72	61	133

Abbildung 25: Vierfeldertafel zur Korrelation von biologischen Treibermutationen und CD19+ B-Follikel in 133 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

### 3.5.3.8) CD20 Follikel:

Verglichene Parameter	CD20 Follikel und PD-L1	CD 20 Follikel und TP53	CD20 Follikel und therapierbare TM	CD20 Follikel und biologische TM	CD20 Follikel und alle Mutationen
p-Value	1	0,3198	0,4034	0,0293	0,7285

Tabelle 32: p-Werte der Korrelationen von CD20 Follikeln mit Treibermutationsgruppen, TP53 und PD-L1 in 156 (PD-L1) bzw. 133 (TP53 und Treibermutationen) Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact test.

Wir ermittelten die Anzahl CD20 positiver Follikel im Randbereich des Tumors und ordneten sie quantitativ den Kategorien negativ bis stark zu.

Diese Ergebnisse korrelierten wir mit allen Mutationen unseres NGS Panels, mit dem TP53 Gen sowie den Subgruppen der biologischen und therapierbaren Treibermutationen.

Hinzu kam die Untersuchung des Zusammenhangs von Fällen mit einer klinisch relevanten Expression von mehr als 50% PD-L1 positiver Tumorzellen.

Hierbei zeigte sich mit  $p=1$  keinerlei Zusammenhang zwischen der Anzahl der Follikel im Tumorrandbereich und der klinisch relevanten Expression von PD-L1.

Auch bei der TP53 Mutation ( $p=0,3198$ ) sowie allen Mutationen ( $p=0,7285$ ), konnte mit den CD20+ Follikeln, kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

Bei den Subgruppen standen die therapierbaren Treibermutationen ebenfalls mit  $p=0,4034$  in keinem signifikanten Zusammenhang mit den CD20+ B-Follikeln (siehe Tab.24, Seite 67). Bei dem Vorliegen einer biologischen Treibermutation hingegen, zeigte sich mit  $p=0,0293$  ein signifikant häufigeres Auftreten von negativen/schwachen CD20+ B-Follikelanzahlen (siehe Abb.26).

	biologische TM (+)	biologische TM (-)	Total
Negative/schwache CD20 Follikelreaktion	24	10	34
Mäßige/starke CD20 Follikelreaktion	48	51	99
$p=0,0293$	72	61	133

Abbildung 26: Vierfeldertafel zur Korrelation der biologischen Treibermutationen und CD20+ B-Follikel in 133 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

### 3.5.3.9) Pathologische T-Stadien:

Verglichene Parameter	T-Stadium und PD-L1	T-Stadium und TP53	T-Stadium und therapierbare TM	T-Stadium und biologische TM	T-Stadium und alle Mutationen
p-Value	0,3903	0,0273	1	0,2791	0,2109

Tabelle 33: p-Werte der Korrelationen der pathologischen Tumorstadien mit Treibermutationssubgruppen, TP53 und PD-L1 in 133 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

Wir entnahmen das pathologische Tumorstadium den pathologischen Fallberichten und korrelierten dieses mit verschiedenen Subgruppen des NGS Mutationspanels, dem TP53 Gen sowie hinsichtlich der klinisch relevanten Expression von PD-L1 bei mehr als 50% der Tumorzellen. Hierbei wurden die pathologischen Frühstadien I und II mit den fortgeschrittenen T-Stadien pT3 und pT4 verglichen.

Hierbei zeigte sich keine signifikante Korrelation von Tumorstadium und den Treibermutationen. Dies zeigte sich bei den therapierbaren Treibermutationen mit  $p=1$  sehr deutlich, während sich bei den biologischen Treibermutationen eine gewisse Tendenz zeigte, welche mit  $p=0,2791$  jedoch nicht signifikant war. Bei der Korrelation mit allen Mutationen ( $p=0,2109$ ) war ebenfalls kein statistischer Unterschied zwischen den pathologischen Tumorstadien beobachtet worden. Auch bei der Expression von PD-L1 zeigte sich kein gehäuftes Auftreten von klinisch relevanten Expressionen (>50% der Tumorzellen) in den fortgeschrittenen pathologischen Stadien gegenüber den frühen pathologischen Stadien (siehe Tab.33, Seite 86).

Der einzige signifikante Zusammenhang war ein mit  $p=0,0273$  signifikant häufigeres Auftreten von Mutationen im TP53 Gen in den fortgeschrittenen pathologischen Stadien pT3 und pT4 (siehe Abb.27).

	TP53 positiv	TP53 negativ	Total
T-Stadium pT1 und pT2	49	54	103
T-Stadium pT3 und pT4	19	7	26
p-Value= 0,0273	68	61	129

Abbildung 27: Vierfeldertafel zur Korrelation von TP53 Mutationen und frühem bzw. spätem pathologischen T-Stadium in 129 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

### **3.5.3.10) Klinisches Tumorstadium nach UICC:**

Nach der Ermittlung der klinischen Tumorstadien nach UICC aus den pathologischen Fallberichten erfolgte die statistische Korrelation mit den Subgruppen der Treibermutationen, dem TP53 Gen sowie der Expression von PD-L1.

Es konnte hierbei weder für PD-L1 ( $p=0,6076$ ) noch für das TP53 Gen ( $p=0,4383$ ) ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

Bei den Subgruppen der Treibermutationen wurde ebenfalls kein statistischer Zusammenhang beobachtet. Dies galt für die Subgruppen der biologischen Treibermutationen ( $p=0,2461$ ), der therapierbaren Treibermutationen ( $p=1$ ) sowie bei der Berücksichtigung aller Mutationen ( $p=0,501$ ) (siehe Tab.34).

Verglichene Parameter	UICC-Stadium und PD-L1	UICC-Stadium und TP53	UICC-Stadium und therapierbare TM	UICC-Stadium und biologische Treibermutationen	UICC Stadium und alle Mutationen
p-Wert	0,6076	0,4383	1	0,2461	0,501

Tabelle 34: p-Werte der Korrelationen der klinischen Tumorstadien nach UICC mit den Treibermutationen, TP53 und PD-L1 in 155 (PD-L1) bzw. 133 (TP53 und Treibermutationen) Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

### **3.5.3.11) PD-L1 und weitere Parameter:**

Verglichene Parameter	PD-L1 und TP53	PD-L1 und therapierbare TM	PD-L1 und biologische TM	PD-L1 und alle Mutationen	PD-L1 und KRAS
p-Value	0,0809	0,0758	0,8065	0,3635	0,0717

Tabelle 35: p-Werte der Korrelationen von PD-L1 mit Treibermutationsgruppen, TP53 und KRAS in 133 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

Wir ermittelten per Immunhistochemie den prozentualen Anteil an PD-L1 positiven Tumorzellen. Bei der Korrelationsanalyse wurden die Fälle als PD-L1 positiv bewertet, wenn der klinisch relevante Anteil von mehr als 50% PD-L1 exprimierender Zellen erreicht wurde. Jene Fälle mit einer geringen Expression von 1 bis 49% oder keiner Expression wurden als PD-L1 negativ bezeichnet.

Wir korrelierten anschließend die klinisch relevante PD-L1 Expression (definiert als >50% der Tumorzellen und Möglichkeit zur Therapie mit Pembrolizumab in der Erstlinientherapie) mit unseren Ergebnissen aus der NGS-Sequenzierung.

PD-L1 zeigte keinerlei Zusammenhang bei der Korrelation mit allen Mutationen ( $p=0,3635$ ) sowie mit den biologischen Treibermutationen ( $p=0,8065$ ).

Bei den Korrelationen mit Mutationen im TP53-Gen und dem Auftreten von therapeutischen Treibermutationen zeigten sich deutliche Tendenzen. Diese lagen jedoch mit  $p=0,0758$  bei den therapierbaren Treibermutationen und  $p=0,0809$  bei dem positiven TP53 Mutationsstatus oberhalb der Signifikanzschwelle. Auch bei der häufigsten Treibermutation KRAS zeigte sich mit  $p=0,0717$  eine Tendenz, welche jedoch nicht signifikant war. (siehe Tab.35, Seite 87)

Interessant ist hierbei der Aspekt, dass die Tendenzen der verschiedenen Treibermutationen einen inversen Verlauf zeigen. So war bei den Fällen mit therapierbaren Treibermutationen in keinem Fall eine klinisch relevante Expression von PD-L1 nachweisbar (siehe Abb. 28).

	Therapeutische TM (+)	Therapeutische TM (-)	Gesamt
>50% PD-L1+ Tumorzellen	0	19	19
<50% PD-L1+ Tumorzellen	20	94	114
p-Value=0,0758	20	113	133

Abbildung 28: Vierfeldertafel zur Korrelation klinisch relevante PD-L1 Expression >50% und Auftreten therapeutischer Treibermutationen in 133 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

### **3.5.3.12) TP53 und Immunzellsubpopulationen:**

Verglichene Parameter	TP53 und CD3	TP53 und CD8	TP53 und CD19	TP53 und CD20	TP 53 und Fox-P3
p-Value	0,7294	0,0817	0,488	0,8628	0,147899

Tabelle 36: p-Werte der Korrelationen von TP53 mit den Immunzellsubpopulationen in 133 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.



Wir untersuchten die Tumor-DNA, bei den Fällen mit geeignetem Tumormaterial, anhand einer NGS Sequenzierung von 18 ausgewählten Genen. Eines davon war das TP53 Gen. Diesem Gen kam als Genabschnitt für das wichtigste Tumorsuppressorgen eine entscheidende Bedeutung zu, da es bei positivem Mutationsstatus zu einer zusätzlichen Instabilität der Tumor-DNA und vermutlich auch einer verstärkten Anhäufung weiterer Mutationen kommt. Dies kann möglicherweise zu einer erhöhten Immunogenität des Tumors beitragen. Entsprechend korrelierten wir den Mutationsstatus des TP53 Gens mit den Infiltrationszahlen der unterschiedlichen Immunzellsubpopulationen. Hierbei zeigte jedoch keine der Subpopulationen signifikant höhere Infiltrationszahlen bei einem positiven Mutationsstatus. Für den Pan-T-Zellmarker CD3 zeigte sich mit  $p=0,7294$  keinerlei signifikanter Zusammenhang, während bei dem Marker CD8 für zytotoxische T-Zellen mit  $p=0,0817$  eine gewisse Tendenz festgestellt werden konnte. Der Marker Fox-P3 für die regulatorischen T-Zellen war mit  $p=0,147899$  ebenfalls weit oberhalb der Signifikanzschwelle. Bei den B-Zellmarkern hingegen war mit p-Werten von  $p=0,488$  für CD19 und  $p=0,8628$  für CD20 kein Zusammenhang zwischen der Infiltrationszahl der B-TILs und einem positiven Mutationsstatus von TP53 nachweisbar (siehe Tab.36, Seite 88).

### **3.5.3.13) 5 Jahres Überleben und Immunzellsubpopulationen:**

Verglichene Parameter	5-JÜR und CD3	5-JÜR und CD8	5-JÜR und CD19 B-Follikel	5-JÜR und CD20 B-Follikel	5-JÜR und CD19 B-TILs	5-JÜR und CD20 B-TILs	5-JÜR und PD-L1
p-Value	0,0491	0,6948	0,0377	0,0977	0,5487	0,0294	0,5547

*Tabelle 37: p-Werte der Korrelationen der 5-JÜR bzw. Vitalstatus mit den Immunzellmarkern und PD-L1 in 100 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.*

Wir korrelierten unsere Ergebnisse hinsichtlich der verschiedenen Immunzellsubpopulationen mit dem, vom Hamburger Krebsregister übermittelten, Vitalstatus der Patienten. Die Fälle waren aufgrund der unterschiedlichen Diagnosezeitpunkte, welche zwischen 2013 und 2015 lagen, nur bedingt hinsichtlich des heutigen Vitalstatus miteinander vergleichbar. Es erfolgte die Einteilung der Patienten in eine Gruppe mit den noch lebenden Patienten sowie den Patienten welche länger als 60 Monate nach der Diagnosestellung noch gelebt haben. Dieser Gruppe wurden ebenfalls 11 Fälle zugeteilt, welche im Juli 2019 noch gelebt haben, jedoch den Zeitraum von 60 Monaten nach Diagnosestellung noch nicht erfüllten.

Dem gegenüber stand die Gruppe der verstorbenen Patienten, die weniger als 60 Monate nach der Diagnosestellung gelebt haben.

Bei dem Pan-T-Zellmarker CD3 zeigte sich ein signifikant häufigeres Auftreten von CD3 Anzahlen unterhalb des Medians in der Gruppe der Verstorbenen, welche die Dauer von 60 Monaten nicht erreicht hatten. Es zeigte sich ebenfalls ein mit  $p=0,0377$  signifikant häufigeres Auftreten von mäßigen bzw. starken Follikelreaktionen in der CD19 Färbung in der Gruppe mit einem positiven Vitalstatus oder Überleben von mindestens 60 Monaten (siehe Abb. 29, Seite 90 und Abb. 30, Seite 91).

Dieses Ergebnis konnte jedoch in der CD20 Färbung für die B-Follikel nicht reproduziert werden. Hier war mit  $p=0,0977$  eine deutliche Tendenz erkennbar, welche jedoch nicht signifikant ist (siehe Abb.31, Seite 91).

Bei den B-TILs hingegen ergibt sich bei der CD20 Färbung eine mit  $p=0,0294$  signifikante Korrelation mit dem 5 Jahresüberleben, während sich in der CD19 Färbung hinsichtlich der infiltrierenden Immunzellen im Tumorstroma mit  $p=0,5487$  keine signifikante Korrelation ergibt.

Für die CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen konnte mit  $p=0,6948$  kein signifikanter Einfluss auf die Prognose der Patienten festgestellt werden.

Auch hinsichtlich der klinisch relevanten Expression von PD-L1 (>50% der Tumorzellen) konnte mit  $p=0,5547$  kein signifikanter Einfluss auf die Prognose der Patienten gezeigt werden (siehe Tab.37, Seite 89).

	Lebend/ länger als 60 Monate nach Diagnose verstorben	früher als 60 Monate nach Diagnose verstorben	Total
CD19 Follikel negativ/schwach	8	17	25
CD19 Follikel mäßig/stark	43	32	75
p-Value= 0,0377	51	49	100

Abbildung 29: Vierfeldertafel zur Korrelation von CD19+ B-Follikelreaktionen und 5 Jahresüberlebensrate bei 100 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

	Lebend/ länger als 60 Monate nach Diagnose verstorben	früher als 60 Monate nach Diagnose verstorben	Total
CD3 > Median	30	19	49
CD3 < Median	21	30	51
p-Value=0,0491	51	49	100

Abbildung 30: Vierfeldertafel zur Korrelation der 5-Jahresüberlebensrate und Anzahl CD3+ TILs in 100 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

	Lebend/ länger als 60 Monate nach Diagnose verstorben	früher als 60 Monate nach Diagnose verstorben	Total
CD20 > Median	29	17	46
CD20 < Median	22	32	54
p-Value=0,0294	51	49	100

Abbildung 31: Vierfeldertafel zur Korrelation der 5-Jahresüberlebensrate und Anzahl CD20+ B-TILs in 100 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

### **3.5.3.14) 5 Jahres Überleben und Treibermutationen:**

Verglichene Parameter	5 JÜR und therapierbare Treibermutationen	5 JÜR und biologische Treibermutationen	5 JÜR und alle Mutationen
p-Value	0,7569	1	1

Tabelle 38: p-Werte der Korrelation der 5 JÜR und der verschiedenen Gruppen von therapie relevanten Mutationen in 100 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Fisher's exact Test.

Bei der Korrelationsanalyse des 5 Jahresüberlebens mit den therapie relevanten Mutationen unterteilten wir, wie oben beschrieben, die getesteten Mutationen in 3 Subgruppen.

Keine der Subgruppen hatte einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten.

Bei den therapierbaren Treibermutationen war mit  $p=0,7569$  und bei den biologischen Treibermutationen mit  $p=1$  kein Zusammenhang zu erkennen. Nimmt man alle therapie relevanten Mutationen zusammen sind diese, mit einem p-Wert von 1, in unserer Studienpopulation ebenfalls statistisch irrelevant für das Gesamtüberleben der Patienten.

### **3.6) Gesamtüberleben:**

Die Parameter CD3, CD20 und die B-Follikelreaktion in der CD19 Färbung hatten sich in der Korrelationsanalyse mit dem 5 Jahresüberleben, per Fisher's exact test, als signifikante Einflussfaktoren erwiesen.

Zur weiteren Korrelationsanalyse erfolgte hier eine zusätzliche Analyse per Log-Rank Test. Hinsichtlich der statistischen Untersuchungen des Gesamtüberlebens konnten für die Gesamtpopulation alle 100 Fälle mit eindeutiger Kenntnis über Vitalstatus und Todeszeitpunkt berücksichtigt werden.

Für die Untersuchungen von Teilpopulationen der einzelnen Tumorstadien divergierte ebenfalls teilweise die Anzahl der inkludierten Patienten.

So konnten für das pathologische Tumorstadium nur 97 Patienten berücksichtigt werden (hiervon pT1 N=51, pT2 N=26, pT3 N=10, pT4=10), da bei einem Patienten kein pathologisches oder klinisches Tumorstadium bekannt war sowie 2 weitere Fälle Metastasen ohne Angaben zum Stadium des Primarius waren.

Beim klinischen Tumorstadium wurden die beiden Metastase-Proben zum klinischen Stadium IV hinzugezählt, sodass insgesamt 99 Fälle berücksichtigt wurden. Hiervon waren 65 Fälle im klinischen Stadium I, 7 weitere Fälle im klinischen Stadium II, 16 im Stadium III und 11 Fälle im klinischen Stadium IV.

#### **3.6.1) CD3 und Gesamtüberleben:**

CD3 TILs und Gesamtüberleben	Gesamtpopulation	T-Stadium pT1	T-Stadium pT2	T-Stadium pT3	T-Stadium pT4
p-Value	0,02	0,199	0,165	0,002	0,859

*Tabelle 39: p-Werte der Korrelationsanalyse von CD3 und dem Gesamtüberleben in Monaten bei den unterschiedlichen T-Stadien in 97 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Log-Rank-Test.*

CD3 TILs und Gesamtüberleben	Gesamtpopulation	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
p-Value	0,02	0,129	0,190	0,281	0,282

*Tabelle 40: p-Werte der Korrelationsanalyse von CD3 und dem Gesamtüberleben in Monaten in den unterschiedlichen Tumorstadien nach UICC bei 99 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Log-Rank-Test.*

Zur weiteren Differenzierung der prognostischen Relevanz führten wir eine Analyse der CD3 Infiltration mit dem Gesamtüberleben in Monaten durch. Hierfür wurde der Median in den verschiedenen Subpopulationen bestimmt und die Gruppe mit CD3 positiven TILs oberhalb des Medians mit der Gruppe unterhalb des Medians verglichen.

Bei der Gesamtpopulation konnte mit p=0,02 ein signifikant längeres Überleben für die Gruppe mit Anzahlen von CD3 positiven TILs oberhalb des Medians in der direkten

Tumorumgebung festgestellt werden (siehe Abb.32, Seite 93). Bei dem pathologischen Tumorstadium konnte ein ähnliches Ergebnis in den Subgruppen der fortgeschrittenen pathologischen T-Stadium pT3 ( $p=0,002$ ) gezeigt werden. Im T-Stadium pT4 hingegen zeigte sich mit  $p=0,859$  keinerlei Zusammenhang hinsichtlich der Verteilung der CD3+ TILs, wobei hier lediglich 10 Fälle zum Vergleich zur Verfügung standen.

In den T-Stadien pT1 und pT2 hingegen war eine Anzahl von CD3 positiven TILs ebenfalls nicht signifikant mit einem längeren Überleben verbunden (pT1:  $p=0,199$ ; pT2:  $p=0,165$ ).

Betrachtet man hingegen jedoch die beiden Subgruppen in den fortgeschrittenen T-Stadien pT3 und pT4 ist ein Langzeitüberleben nur mit einer höheren Infiltration von CD3+ TILs möglich, während die Fälle mit weniger CD3+ Effektorzellen, bis auf einen Fall, nach 20 Monaten verstorben waren (siehe Tab. 39, Seite 92).

Beim klinischen Tumorstadium zeigten sich ebenfalls Tendenzen, welche mit  $p=0,129$  im Stadium I am deutlichsten ausgeprägt waren. Mit dem Fortschreiten der Tumorstadien wird diese Tendenz im Stadium II mit  $p=0,190$  geringer und bleibt mit  $p=0,281$  im Stadium III und  $p=0,282$  im Stadium IV konstant. Es zeigte sich in den Subgruppen hierbei jedoch keine statistische Signifikanz (siehe Tab. 40, Seite 92).

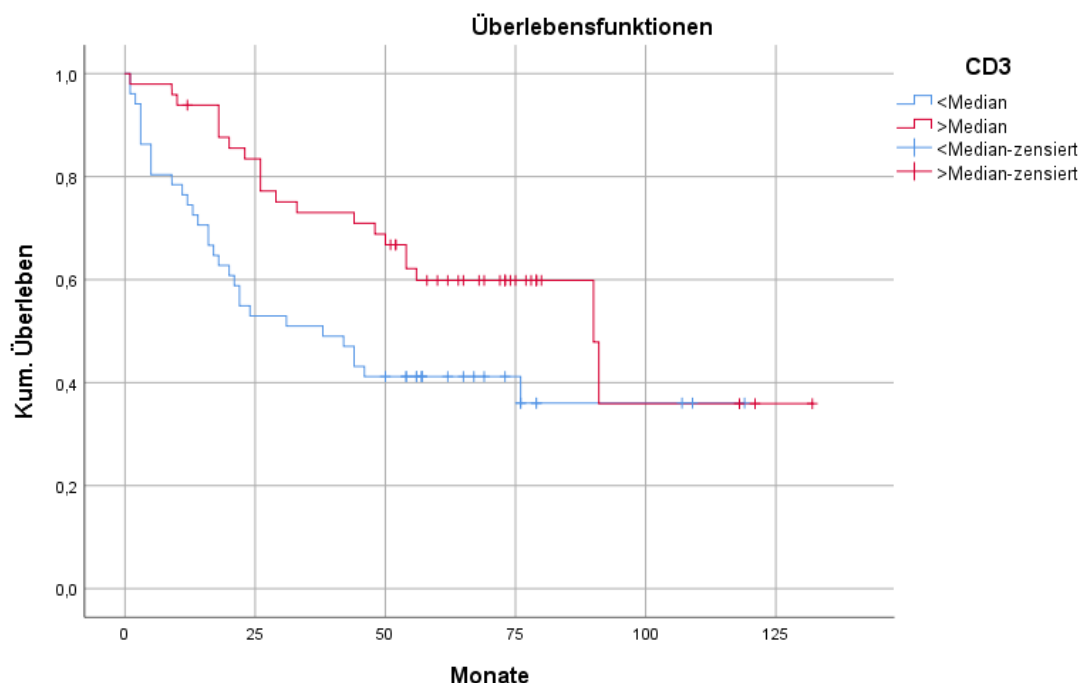


Abbildung 32: Kaplan Meier Kurve hinsichtlich des Einflusses von Infiltrationszahlen CD3+ TILs oberhalb des Median (Rot) und unterhalb des Median (Blau) auf das Gesamtüberleben in der Gesamtstudienpopulation bei 100 Adenokarzinomen der Lunge.

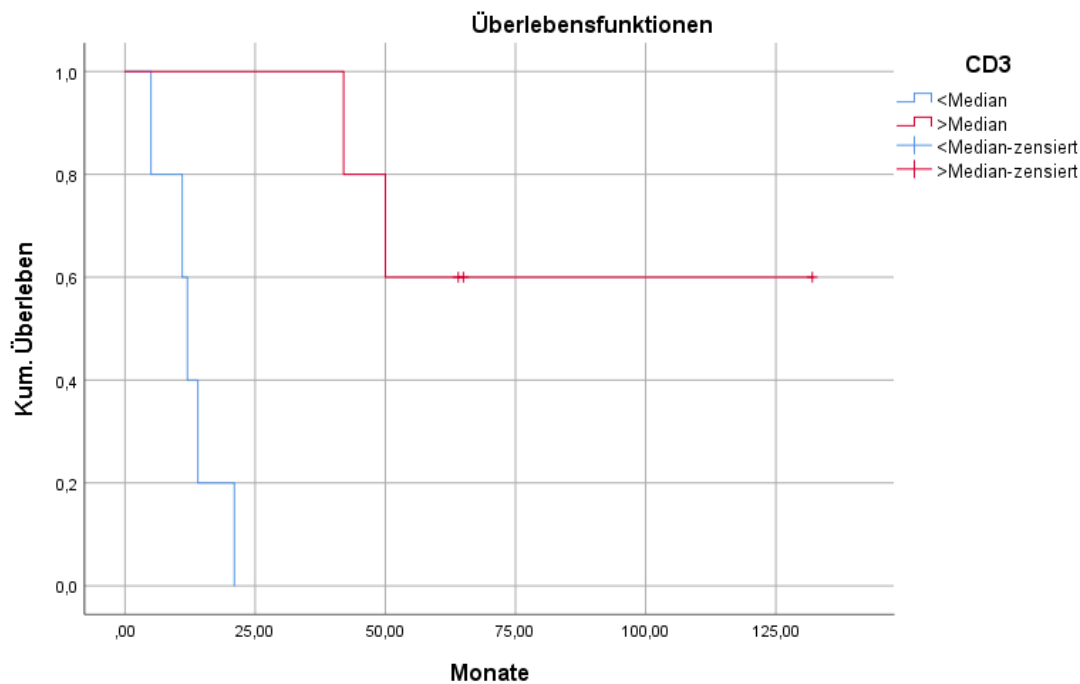


Abbildung 33: Kaplan Meier Kurve hinsichtlich des prognostischen Einflusses der Infiltrationszahlen von CD3+ TILs oberhalb des Median (Rot) und unterhalb des Median (Blau) bei 10 Adenokarzinomen der Lunge des Tumorstadiums pT3.

### 3.6.2) CD19+ B-Follikel und Gesamtüberleben:

CD19+ B-Follikel und Gesamtüberleben	Gesamtpopulation	pT1	pT2	pT3	pT4
p-Value	0,001	0,649	0,164	0,001	0,016

Tabelle 41: p-Werte hinsichtlich der Korrelation des Gesamtüberlebens in Monaten und der Anzahl CD19+ B-Follikel im Tumorrandbereich in den Subgruppen der pathologischen Tumorstadien bei 97 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Log-Rank- Test.

CD19+ B-Follikel und Gesamtüberleben	Gesamtpopulation	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
p-Value	0,001	0,458	0,190	0,000	0,129

Tabelle 42: p-Werte hinsichtlich der Korrelation des Gesamtüberlebens in Monaten und der Anzahl CD19+ B-Follikel im Tumorrandbereich in den Subgruppen der klinischen Tumorstadien nach UICC bei 99 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Log-Rank-Test.

Da sich die CD19 positiven B-Follikel als prognostisch signifikanter Einfluss auf die 5 Jahres-Überlebensrate gezeigt hatten (siehe Abb. 29, Seite 90), erfolgte eine weitere Analyse mittels des Log-Rank Tests hinsichtlich des Gesamtüberlebens.

Hier konnte ein deutlicher Einfluss auf die Prognose des Patienten in der Gesamtpopulation beobachtet werden (p=0,001) (siehe Abb. 34, Seite 95). Bei näherer Analyse der

unterschiedlichen Tumorstadien zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei CD3. Während in den pathologischen Frühstadien pT1 ( $p=0,649$ ) und pT2 ( $p=0,164$ ) kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben nachweisbar ist, kann mit  $p=0,001$  bzw.  $p=0,016$  in den fortgeschrittenen Stadien pT3 und pT4 eine signifikante Korrelation von hohen Follikelanzahlen und längerem Gesamtüberleben beobachtet werden (siehe Tab.41, Seite 94 und Abb.35+36, Seite 96).

In den klinischen Tumorstadien nach UICC zeigt sich in dem Stadium I mit  $p=0,458$  kein statistischer Zusammenhang. Mit dem Fortschreiten der Tumorstadien zeigt sich dann eine Zunahme der Tendenz, welche im Stadium III schließlich mit  $p=0,000$  signifikant ist (siehe Abb.36, Seite 78). Im klinischen Stadium IV hingegen kann mit  $p=0,129$  lediglich eine Tendenz beobachtet werden, welche jedoch statistisch nicht signifikant ist (siehe Tab.42, Seite 94).

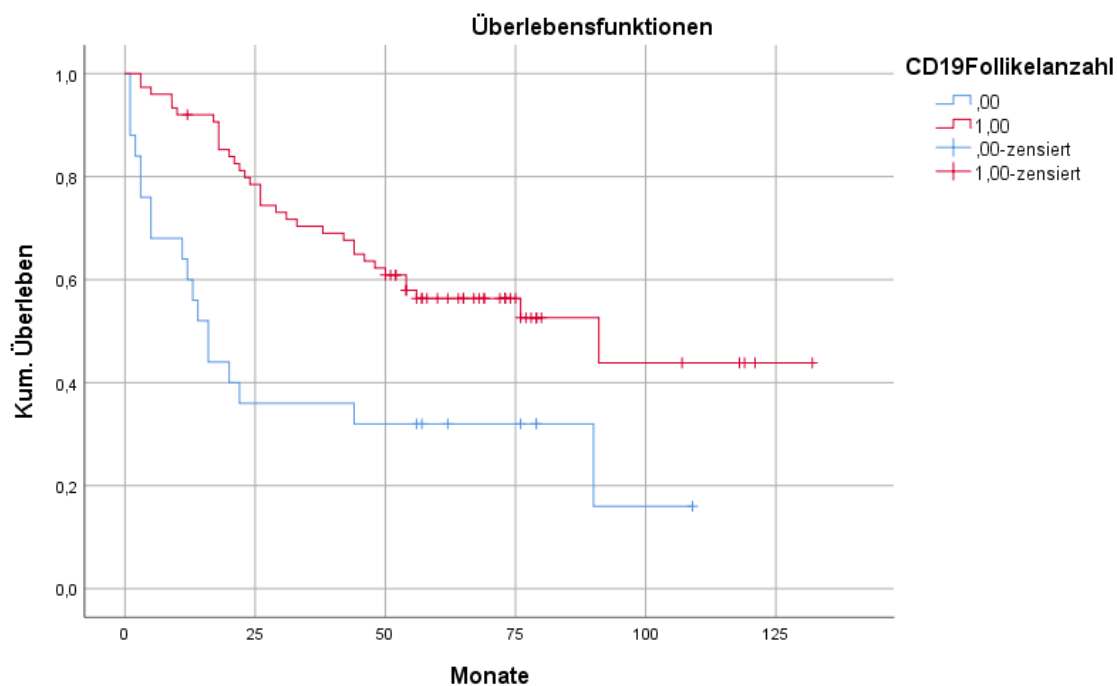


Abbildung 34: Kaplan Meier Kurve hinsichtlich des Gesamtüberlebens in der Gesamtpopulation bei 100 Adenokarzinomen der Lunge bei mäßigen bzw. starken CD19+ B-Follikelreaktionen (Rot) und keinen bzw. schwachen CD19+ B-Follikelreaktionen (Blau)

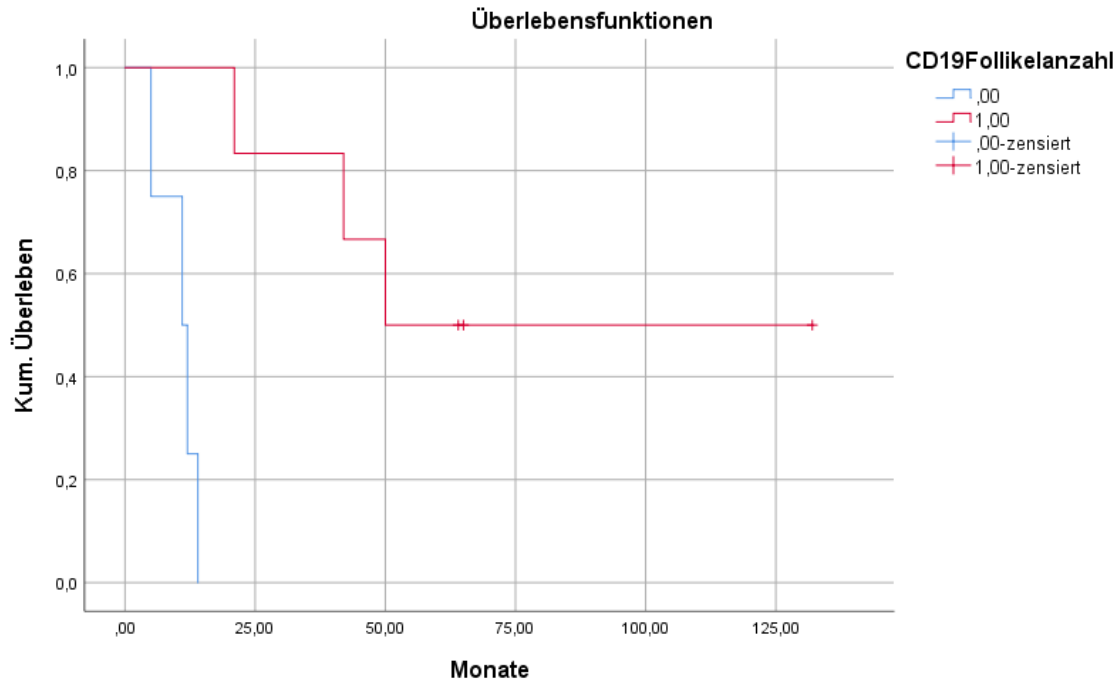


Abbildung 35: Kaplan Meier Kurve des Gesamtüberlebens bei 10 Adenokarzinomen der Lunge des pathologischen Tumorstadiums pT3 hinsichtlich einer mäßigen bzw. starken CD19+ B-Follikelreaktion (Rot/1,00) und einer schwachen bzw. negativen CD19+ B-Follikelreaktion (Blau/0,0).

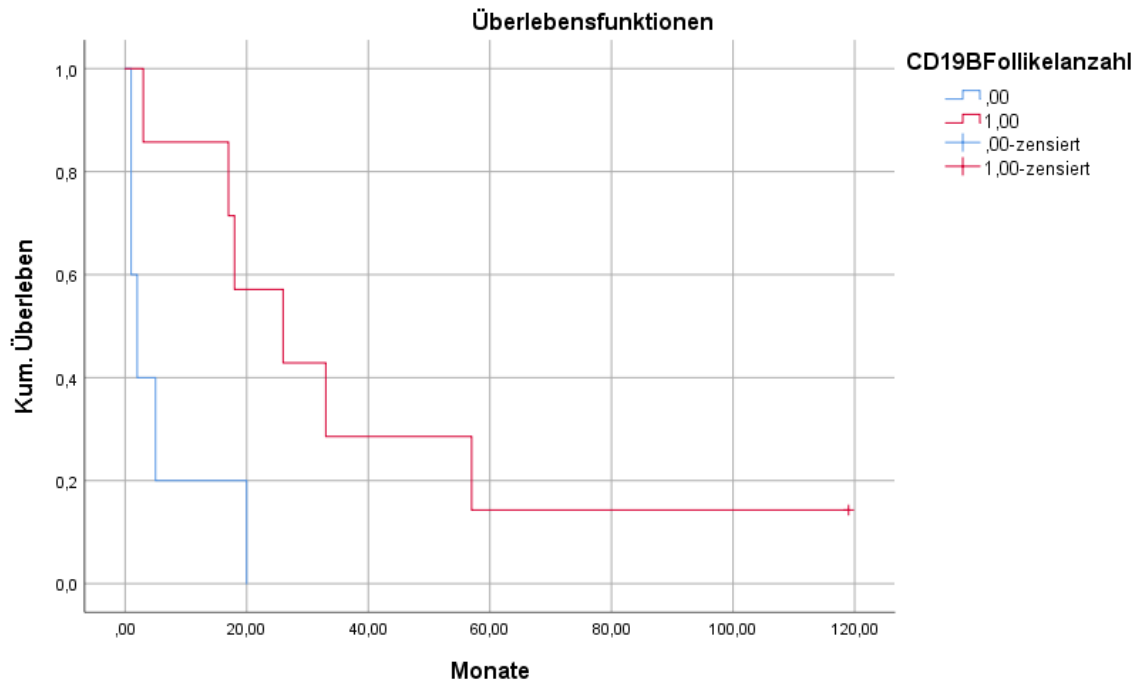


Abbildung 36: Kaplan Meier Kurve des Gesamtüberlebens bei 10 Adenokarzinomen der Lunge im pathologischen Tumorstadium pT4 hinsichtlich einer mäßigen bzw. starken CD19+ B-Follikelreaktion (Rot) und einer schwachen bzw. negativen CD19+ B-Follikelreaktion (Blau).



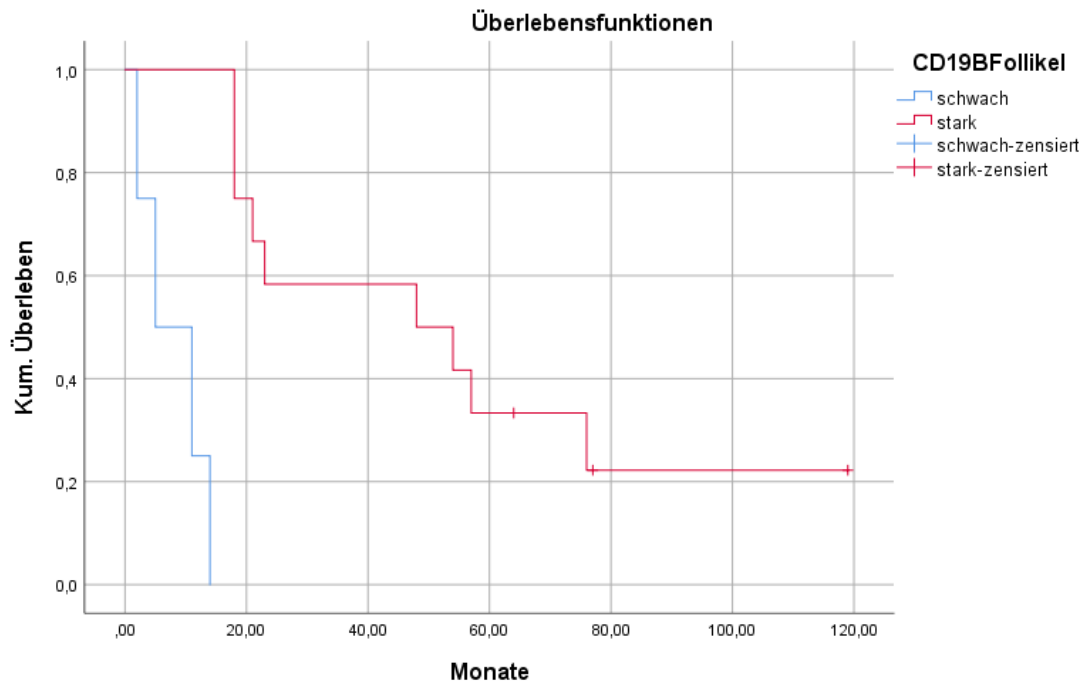


Abbildung 37: Kaplan Meier Kurve des Gesamtüberlebens bei 16 Adenokarzinomen der Lunge im klinischen Stadium III nach UICC hinsichtlich einer mäßigen bzw. starken (Rot) und einer negativen bzw. schwachen (Blau) CD19+ B-Follikelreaktion.

### 3.6.3) CD20 und Gesamtüberleben:

CD20+ B-TILs und Gesamtüberleben	Gesamtpopulation	T-Stadium pT1	T-Stadium pT2	T-Stadium pT3	T-Stadium pT4
p-Value	0,013	0,632	0,059	0,113	0,840

Tabelle 43: p-Werte hinsichtlich der Korrelation des Gesamtüberlebens in Monaten mit der Anzahl CD20+ B-TILs in direkter Tumorumgebung hinsichtlich der pathologischen T-Stadien bei 97 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Log-Rank-Test.

CD20+ B-TILs und Gesamtüberleben	Gesamtpopulation	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
p-Value	0,013	0,077	0,702	0,174	0,412

Tabelle 44: p-Werte hinsichtlich der Korrelation des Gesamtüberlebens in Monaten mit der Anzahl CD20+ B-TILs in der direkten Tumorumgebung hinsichtlich der klinischen Tumorstadien nach UICC bei 99 Adenokarzinomen der Lunge anhand des Log-Rank-Test.

Aufgrund der prognostischen Signifikanz der CD20+ B-TILs (siehe Tab.37, Seite 89) erfolgte eine weitere Korrelationsanalyse der Anzahl CD20+ B-TILs hinsichtlich des Gesamtüberlebens mit dem Log-Rank-Test. Dieser wurde bei den verschiedenen Subpopulationen sowie der Gesamtpopulation durchgeführt. Hier zeigte sich bei der Gesamtpopulation mit  $p=0,013$  ein signifikanter Einfluss von Anzahlen der B-TILs oberhalb des Medians verglichen mit der Gruppe unterhalb des Medians

(siehe Abb.38, Seite 98). Bei den Subgruppen hingegen zeigte sich ein prognostischer Unterschied nur in der Subgruppe des T-Stadiums pT4. Bei den anderen Substadien hingegen war kein signifikanter Unterschied auf das Gesamtüberleben nachweisbar, wobei sich hier deutliche Unterschiede zwischen dem T-Stadium pT1 ( $p=0,632$ ) und den weiter fortgeschrittenen T-Stadien pT2 und pT3 ergaben. Hier war mit  $p=0,059$  im T-Stadium pT2 und  $p=0,113$  im T-Stadium pT3 eine deutliche Tendenz erkennbar, welche jedoch statistisch nicht signifikant war (siehe Tab. 43, Seite 97).

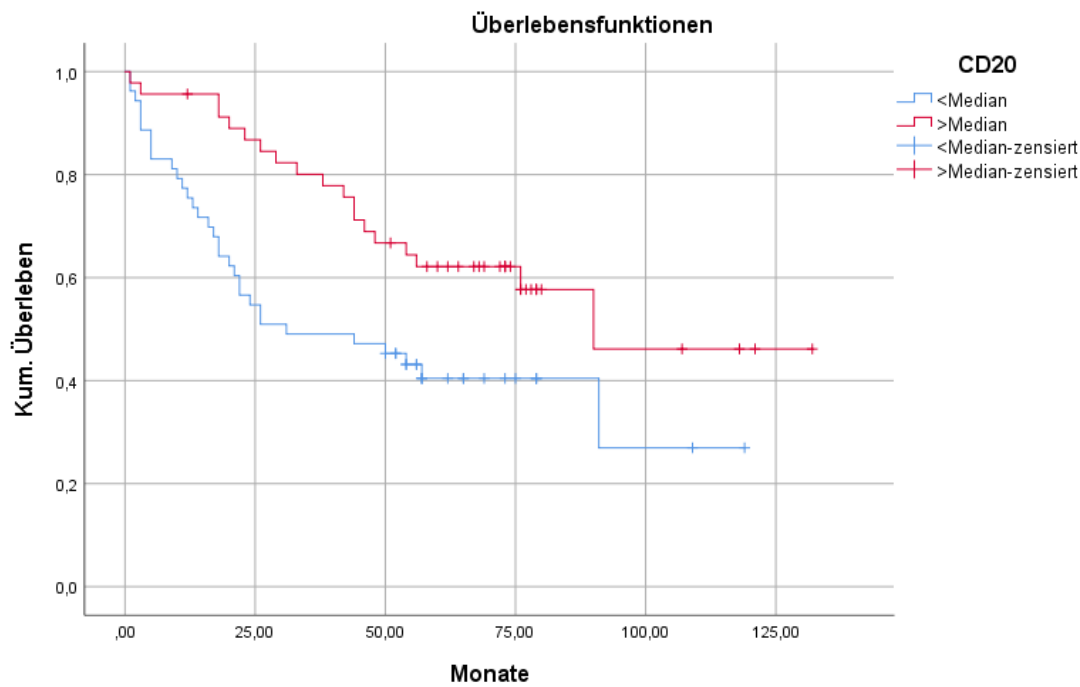


Abbildung 38: Kaplan Meier Kurve des Gesamtüberlebens der Gesamtpopulation bei 100 Adenokarzinomen der Lunge hinsichtlich der Anzahl von CD20+ B-TILs in der direkten Tumorumgebung oberhalb des Medians (Rot) bzw. unterhalb des Medians (Blau).

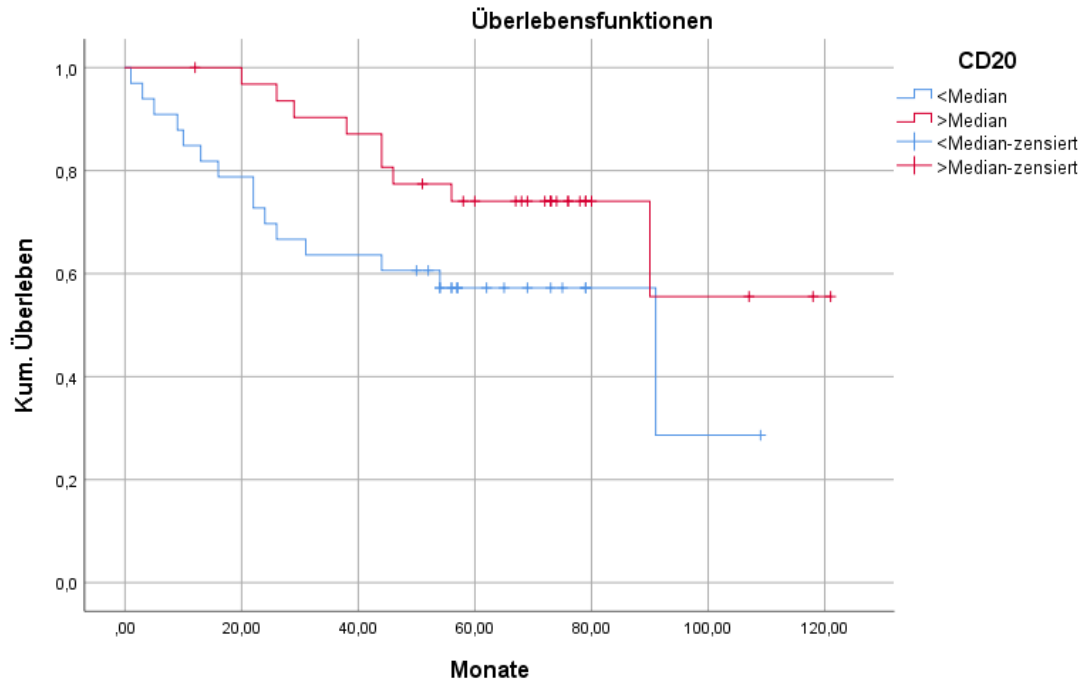


Abbildung 39: Kaplan Meier Kurve von 65 Adenokarzinomen der Lunge im klinischen Tumorstadium I nach UICC hinsichtlich der Anzahl CD20+ B-TILs in der direkten Tumorumgebung oberhalb des Medians (Rot) bzw. unterhalb des Medians (Blau).

## 4) Diskussion:

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Zusammenhänge von Mutationen des Adenokarzinoms der Lunge, der Expression von Molekülen des „programmed death pathways“ und deren Auswirkung auf die Immunreaktion untersucht.

Hierfür erfolgte eine immunhistochemische Analyse der Immunzellsubpopulationen in der direkten Tumorumgebung sowie der beiden Checkpoint Proteine PD-1 und PD-L1.

Zusätzlich wurde die Tumor-DNA mittels Amplikon-basiertem NGS auf 17 therapierelevante Gene hin untersucht.

Hierfür wurde Tumormaterial von 156 Adenokarzinomen der Lunge aus dem Archiv der HPH zusammengestellt, um histologische Schnitte für die immunhistochemische Analyse anzufertigen. Hierbei wurde bei jedem Fall ein Tumorblock des jeweiligen Resektates mit dem meisten Tumormaterial herausgesucht. Bei 133 der 156 Patientenproben war die DANN-Qualität für die NGS-Analyse ausreichend.

Bei der statistischen Analyse wurden vorwiegend jene Mutationen berücksichtigt, welche mit einer molekular stratifizierten Therapie behandelt werden können. Zu diesen Mutationen zählen z.B. EGFR, ALK, BRAF (V600E) sowie das MET (Exon 14 Skipping).

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Marker CD3, CD8, CD19, CD20 und Fox-P3 für die Subpopulationen der immunkompetenten Zellen sowie PD-1 und PD-L1 für die Darstellung der Immun-Checkpoint-Proteine, welche ein mögliches „Target“ der Immuntherapie des NSCLCs darstellen, untersucht.

Punktmutationen und kleinere Insertionen sowie Deletionen wurden mittels Amplikon-basiertem NGS-Panel untersucht und deckte die Gene ALK, BRAF, AKT-1, CTNNB1, DDR2, FGFR2, EGFR, HER2/ERBB2, HRAS, NRAS, KRAS, MAP2K1, MET, PIK3CA, PTEN, PTPN11 und TP53 ab. Nachträglich erfolgte eine immunhistochemische Untersuchung hinsichtlich einer ALK-Expression als indirekter Nachweis einer ALK-Translokation. Da sich die Treibermutationen gewöhnlich gegenseitig ausschließen, wurde diese ALK-Analyse nur bei Fällen mit fehlendem Nachweis einer Treibermutation in der NGS-Analyse durchgeführt.

Es erfolgte eine statistische Auswertung der Daten anhand des Fisher's exact test. Hierbei wurde eine Analyse zwischen den Immun-Checkpoint-Proteinen und den Immunzellsubpopulationen sowie der B-Follikelreaktion im Randbereich vorgenommen. Hinzu kam eine Korrelationsanalyse der Treibermutationen mit den immunkompetenten Zellen, der Expression der Checkpoint Proteine und den Verlaufsdaten von 100 bekannten Fällen des Hamburger Krebsregisters.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Prävalenz von verschiedenen Treibermutationen in Adenokarzinomen der Lunge. Hierbei wurde das Auftreten von Treibermutationen auf Zusammenhänge mit den Tumorstadien nach UICC, den pathologischen T-Stadien, der Expression von Immun-Checkpoint-Proteinen sowie der Zusammensetzung der immunkompetenten Zellen in der direkten Tumorumgebung untersucht.

Dies ist vor allem im Hinblick auf neue Therapieansätze der molekular stratifizierten Therapie und der Checkpoint Inhibitoren klinisch relevant, da die Wirkweise weiterhin weitgehend unbekannt ist und nicht ausreichend verstanden wird.

Hinsichtlich einer sinnvollen Patientenselektion zum effizienten Einsatz der therapeutischen Ressourcen sind weitere Biomarker und klinische Studien nötig, um hier eine adäquate Therapieauswahl treffen zu können.

#### **4.1) PD-L1 Expression**

Es zeigte sich in unserer Studienpopulation von 156 Fällen ein Anteil von etwa 13,46% an „high-expressor“ Tumoren mit einem Anteil von mehr als 50% PD-L1 exprimierender Tumorzellen (siehe Tab.17, Seite 64). Im Vergleich hierzu konnte in den KEYNOTE Studien 001 und 024 ein Anteil von 23-30%, gezeigt werden<sup>52 66</sup>.

Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Analyse an Biopsaten, wie sie in der klinischen Diagnostik verwendet werden, durchgeführt wurde. Anhand des bei unseren Resektaten beobachteten, heterogenen Verteilungsmusters, könnten dort in vielen Fällen ausschließlich Bereiche mit überdurchschnittlicher Expression entnommen worden sein. Dies könnte den höheren Anteil an „high-expressor“-Tumoren in den Keynotestudien erklären<sup>52 66</sup>.

Eine weitere mögliche Erklärung für die beobachteten Diskrepanzen könnte hier das Rekrutierungsmuster der beiden Studien darstellen. Während für die Zulassungsstudien

Patienten aus einem weltweiten Kollektiv rekrutiert wurden, bezieht sich unser Forschungsvorhaben ausschließlich auf Patientendaten zweier Hamburger Kliniken. Ein direkter Vergleich verschiedenster Studien wird zusätzlich durch die jeweils unterschiedlichen Anteile an untersuchten Tumorstadien erschwert. Während der überwiegende Teil der Fälle in unserer Studie den Stadien I-IIIa zugeordnet werden konnte, waren in den Checkmate Studien 17 und 57 von Brahmer et al (2015) sowie Borghaei et al. (2015) ausschließlich Patienten in den klinischen Stadien IIIB und IV berücksichtigt worden<sup>53</sup><sup>121</sup>. Bei den Keynotestudien handelte es sich ausschließlich um Tumore im klinischen Stadium IV.

In unserem Patientenkollektiv konnte kein signifikanter Einfluss des klinischen oder pathologischen Tumorstadiums hinsichtlich des Auftretens von therapeutisch relevanten PD-L1 Expressionsraten >50% PD-L1 positiver Tumorzellen gezeigt werden (siehe Tab.25, Seite 80 und Tab.26, Seite 81).

Die Färbetechnik als Ursache der Diskrepanz zwischen unserer Arbeit und der Checkmatestudie halten wir hingegen für unwahrscheinlich, da mit dem PD-L1 Antikörperklon SP263 in unserer Studie ein etwas sensitiverer Antikörperklon, wie in der Checkmatestudie, verwendet wurde (Validierung erfolgte auf 3 verschiedenen Färbepattformen der HPH). Auch das polymerbasierte Detektionssystem verfügt über eine vergleichbare Sensitivität.

Neben der relativ kleinen Gruppe von Tumoren mit einem Anteil von mehr als 50% von PD-L1 exprimierender Tumorzellen zeigte sich ein großer Anteil an Tumoren, in denen keine PD-L1 Expression auf den Zellen nachweisbar war (46,8%) sowie PD-L1 positive Tumore mit einem Anteil von 1-49% der Tumorzellen (39,73%), welche nicht für eine Immuntherapie in der Erstlinie zugelassen waren<sup>122</sup>.

#### **4.2) PD-L1 als immunhistochemischer und prognostischer Marker:**

Bei der Korrelationsanalyse von der PD-L1 Expression und den Subpopulationen von Immunzellen der direkten Tumorumgebung konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der T-Zellen invers mit dem Grad der PD-L1 Expression der Tumorzellen korreliert. Die absolute Zahl CD3 positiver T-Zellen in der direkten Tumorumgebung war signifikant reduziert in Fällen, welche mehr als 50% der Tumorzellen PD-L1 exprimierten ( $p=0,0007$ ) (siehe Abb. 23, Seite 81).

Bei allen anderen Subpopulationen wie den B-Zellreihen (CD20:  $p=0,4885$ ; CD19:  $p=1$ ), den B-Follikeln (CD20:  $p=1$  ; CD19:  $p=1$ ) sowie den zytotoxischen T-Zellen (CD8:  $p=0,2429$ )

bzw. T-Suppressorzellen (Fox-P3:  $p=0,6398$ ) konnte kein signifikanter Einfluss der PD-L1 Expression beobachtet werden (siehe Tab.26; Seite 81; Tab.27, Seite 82; Tab. 28, Seite 83; Tab. 29, Seite 83).

PD-L1 selbst hat in unserem Studienkollektiv keine Häufung in einer der Tumorstadien gezeigt (T-Stadium:  $p=0,5743$ ; klinisches Stadium nach UICC:  $p=0,6076$ ), sowie keinen prognostisch signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten gehabt (siehe Tab.33, Seite 86; Tab. 34, Seite 87, Tab. 37, Seite 89).

Ein Zusammenhang von PD-L1 mit dem Tumorstadium oder ein vermehrtes Auftreten im Verlauf der Tumorprogression, ohne Einfluss einer Radiochemotherapie, ist in der uns bekannten Literatur bisher nicht beschrieben worden.

Unser Ergebnis hinsichtlich des prognostischen Einflusses von PD-L1 auf den weiteren Krankheitsverlauf, relativiert die bisherigen Erkenntnisse aus der PACIFIC-Studie, welche das Vorhandensein von PD-L1 als einen prognostisch ungünstigen Marker einstuft. Hier konnte ein Überlebensvorteil für Patienten, deren Tumor eine Expression von weniger als 25% der Tumorzellen aufwies gegenüber den Patienten mit mehr als 25% PD-L1 exprimierender Tumorzellen, gezeigt werden. Hierbei handelte es sich jedoch ausschließlich um bereits radiochemotherapierte Patienten im klinischen Stadium III. Der Überlebensnachteil konnte durch die zusätzliche Gabe von Durvalumab (PD-L1 Antikörper) ausgeglichen werden<sup>55</sup>.

Die Ergebnisse unserer Studie lassen jedoch keinen Rückschluss auf den prognostischen Wert einer Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren zu, da sich unser Patientenkollektiv, abgesehen von 18 Fällen im Stadium IV bzw. 2 Fällen im Stadium IIIB, überwiegend in einem operablen Stadium befand und somit, bei leitliniengerechter Therapie, nicht mit einem entsprechenden Checkpoint-Inhibitor behandelt wurde.

Bisher wird im klinischen Alltag standardmäßig ausschließlich PD-L1 als immunhistochemischer Marker für die Therapieselektion mit Checkpoint-Inhibitoren berücksichtigt. Hierfür ist eine Expression bei mehr als 50% der Tumorzellen für eine Erstlinientherapie mit Pembrolizumab notwendig<sup>122</sup>.

In mehreren Zulassungsstudien zeigte sich jedoch ebenfalls, dass Patienten bereits bei einem Anteil von nur 1% PD-L1 positiver Tumorzellen von einer Immuntherapie profitieren sowie in einigen Fällen auch bei PD-L1 negativen Tumoren ein Therapieeffekt beobachtet werden konnte<sup>123</sup>. Ursache hierfür könnte die heterogene Verteilung PD-L1 positiver Tumorzellen im Tumorgewebe sein, sodass in der Biopsie nur PD-L1 negative Anteile entnommen worden sein könnten. Hinzu kommt die unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen PD-L1

Antikörperklone. Somit könnte es sich bei den PD-L1 negativen Tumoren eventuell um Fälle handeln, welche mit dem sensitiveren Antikörperklon SP263 eine geringe Positivität für PD-L1 aufweisen würden<sup>52 53</sup>. Bei dieser Vermutung wäre jedoch ebenfalls eine Analyse der „tumor mutational burden“ (TMB) zu berücksichtigen, welche nachweislich ebenfalls aufgrund der erhöhten Immunogenität des Tumors einen Einfluss auf das Ansprechen der Immuntherapie hat<sup>62 63 124</sup>.

Hinsichtlich der oben genannten Zusammenhänge zwischen der Anzahl der CD3 positiven immunkompetenten Zellen und der PD-L1 Expression wäre jedoch auch denkbar, dass es sich bei dem in den Zulassungsstudien festgestellten Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression und dem Ansprechen auf die Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren nur um eine Korrelation, jedoch nicht um eine zugrundeliegende Kausalität handelt.

Zudem werden andere Immunzellpopulationen, welche in unserer Studienpopulation einen signifikanten Einfluss auf das Überleben haben, durch PD-L1 nicht beeinflusst und bleiben somit bei der Therapieselektion unberücksichtigt.

Entsprechend wäre eine Evaluierung von CD3 als alternativen oder zusätzlichen prädiktiven Marker für die Patientenselektion einer Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren zu überprüfen.

Die Ursache für die inverse Korrelation von PD-L1 und CD3 ist nicht vollständig geklärt.

Die inhibitorische Wirkung des „programmed death pathways“ wurde bereits beschrieben und führt zu einer geringeren T-Zell-rezeptorvermittelten Proliferation und Zytokinexpression.

Bei einer Langzeitexposition der T-Zellen mit dem Antigen und zugleich inhibitorischen Einfluss von Checkpointproteinen kann es schließlich zu dem Phänomen der „exhausted T-cells“ kommen. Die T-Zellen verlieren hierbei weitgehend ihre Funktion und können Viren oder Krebszellen nicht mehr adäquat bekämpfen<sup>125</sup>. Durch eine Pilotstudie von Forde et al.

konnten erste Erkenntnisse, hinsichtlich der Auswirkung von PD-1 Inhibitoren auf die Effektorzellen in der direkten Tumorumgebung, gemacht werden. Hier zeigte sich eine starke Abweichung zwischen der Remission von Tumoren in der Bildgebung gegenüber der Remission von Tumorzellen, wie sie per Immunhistochemie detektiert werden konnte. Eine partielle radiologische Remission war nur bei 10% der Fälle (2/20) nachweisbar, während immunhistochemisch eine mittlere Remissionsrate von 65% (davon 3 Komplettremissionen) nachgewiesen wurde. Das zusätzliche Volumen, welches eine radiologische Remission kaschiert hat, wurde mit einer höheren Anzahl von immunkompetenten Zellen in dem Tumorstroma erklärt<sup>126</sup>. Dies kann auf eine mögliche Unterdrückung der Chemotaxis der T-Zellen durch einen aktivierten „programmed death pathway“ bei erhöhter Expression von PD-L1 auf der Tumoroberfläche hinweisen und somit ein pathophysiologischer Ansatz für die



inverse Korrelation zwischen PD-L1 und CD3 sein. Hinzu kommt eine mögliche Einschränkung der T-Zelldifferenzierung.

So konnten bei Forde et al in den Präparaten vor und nach der Behandlung mit Nivolumab in der direkten Tumorumgebung sowie im peripheren Blut ein Unterschied zwischen den T-Zellrezeptoren und Subklonen festgestellt werden. Dies könnte auf einen zusätzlichen Primingeffekt durch Checkpointinhibitoren deuten, welcher einen zusätzlichen systemischen Effekt und Schutz vor Mikrometastasen sowie Rezidiven bilden könnte.

Diese Beobachtungen auf unser Patientenkollektiv zu übertragen gestaltet sich jedoch schwierig, da bei Forde et al. die Untersuchungen nur anhand des T-Zellmarkers CD8 durchgeführt wurden, während der Pan-T-Zellmarker CD3 nicht getestet wurde.

In einer Studie von Varn et al. konnte ebenfalls für die B-Zellreihe eine deutliche Veränderung der Zellklone und der Genexpressionssignatur nach einer entsprechenden Therapie mit Checkpointinhibitoren festgestellt werden. Die B-Zellen zeigten hier öfter die Expressionsmuster von Gedächtnis-B-Zellen und könnten somit ebenfalls einen verbesserten Schutz vor möglichen Tumorrezidiven bieten. Bei der Studienkohorte handelte es sich jedoch um eine Gruppe von Urothelkarzinom- und Melanompatienten, sodass ein ähnlicher Mechanismus beim NSCLC noch überprüft werden muss <sup>127</sup>.

#### **4.3) Tumorstadien und Einfluss auf die direkte Tumorumgebung:**

Wir ermittelten das pathologische und klinische Tumorstadium und korrelierten vorwiegend die fortgeschrittenen Stadien im klinischen Stadium IV nach UICC mit den früheren klinischen Tumorstadien I-III. Hierbei konnten wir Parameter der direkten Tumorumgebung bei den Fällen, welche per Leitlinie bereits für eine Therapie mit Tyrosinkinase- oder Checkpointinhibitoren zugelassen sind, mit Fällen in früheren Tumorstadien vergleichen. Dabei konnte ein signifikanter Rückgang von Immunzellsubpopulationen in der direkten Tumorumgebung beim Fortschreiten der Tumorerkrankung beobachtet werden.

Zu den signifikant verringert auftretenden Subpopulationen zählten die CD8 positiven, zytotoxischen T-Zellen ( $p=0,014$ ), die CD20+ BTILs ( $p=0,02382$ ) und die CD20+B-Follikel ( $p=0,0453$ ) (siehe Abb. 17; Seite 74; Abb. 18; Seite 75; Abb. 20, Seite 78).

Bei dem Pan-T-Zellmarker CD3 ( $p=0,06288$ ) sowie den CD19+ B-Follikeln ( $p=0,0934$ ) handelte es sich ebenfalls um deutliche Tendenzen, welche bei einer größeren Anzahl von Fällen im klinischen Stadium IV (nur 18 Fälle im Stadium IV gegenüber 137 in den Stadien I-III) signifikant gewesen sein könnten (siehe Tab.24, Seite 73).

Mit diesen Erkenntnissen wird deutlich, dass die Immunzellpopulationen wie CD3+ TILs, CD20+ BTILs und die CD19+ B-Follikel, welche in unserer Studienpopulation einen

signifikanten Einfluss auf das Überleben gezeigt haben, eine vermutlich deutlich eingeschränkte antitumorale Wirkung in den fortgeschrittenen Tumorstadien aufweisen. Ähnliches gilt für die zytotoxischen T-Zellen oder die CD20+ B-Follikel, welche in unserer Studienpopulation zwar keinen signifikanten Einfluss auf die 5 JÜR haben, jedoch in der Literatur bereits mehrfach als signifikante Einflussfaktoren auf das Überleben beschrieben wurden<sup>72 73 128-130</sup>.

Überraschend zeigte sich bei dem PD-1+ TILs mit  $p=0,25014$  kein signifikanter Rückgang im klinischen Stadium IV. Somit scheinen trotz Rückgang der Gesamtzahl der Immunzellen ausreichend Zielmoleküle für eine Therapie mit Checkpointinhibitoren vorhanden zu sein. In der uns bekannten Literatur fanden wir keine Studie, welche sich mit der Veränderung der Immunantwort der direkten Tumorumgebung im Verlauf der Tumorprogression, beschäftigt.

#### **4.4) Gesamtüberleben und 5 Jahres Überlebensrate:**

Wir unterteilten die Patienten hinsichtlich der ermittelten pathologischen T-Stadien und klinischen Tumorstadien nach UICC. Erwartungsgemäß gab es große Unterschiede hinsichtlich des Gesamtüberlebens zwischen frühen und fortgeschrittenen klinischen Stadien. Während im Stadium I eine 5 Jahres-Überlebensrate von 66,15% (43/65) bestand, fällt diese beständig mit dem Fortschreiten des Tumorstadiums. Im Stadium II sind in unserer Population noch 58% (4/7) der Patienten am Leben, während es im Stadium III noch 25% (4/16) und 0% (0/11) im Stadium IV sind. Die entsprechenden Angaben in der Literatur hinsichtlich des Stadiums IA (75-80%) und IB (55-60%) sind noch gut mit unserer gemeinsamen Population des Stadium I (IA und IB) vergleichbar. In den klinischen Stadien IIA und IIB zeigen sich in der Literatur leicht niedrigere Anteile an Patienten mit einem 5 Jahresüberleben (zwischen 35 und 55%), was jedoch aufgrund der geringen Fallzahlen im Stadium II (nur 7 Patienten) zu vernachlässigen ist. Hinsichtlich des dritten klinischen Stadiums ist die 5 JÜR für das Stadium IIIA, welches aufgrund seiner Operabilität relativ häufig in unserer Population vorkam, mit einer 5 JÜR von 15-40% gut mit unseren Überlebensraten im Stadium III (25%) vergleichbar. Kommen hingegen ausgeprägte Lymphknotenbeteiligungen wie im inoperablen Stadium IIIB hinzu, so schwindet der Anteil an Patienten, welche nach 5 Jahren noch am Leben sind auf 5-10%. In unserer Gruppe des Stadium III war jedoch nur 1 Fall im Stadium IIIB, sodass ein Wert im unteren Bereich der Referenzliteratur plausibel erscheint. Im klinischen Stadium IV zeigen sich in Verlaufskontrollen stets nur vereinzelt Langzeitüberlebende. In unserer Studienpopulation gab es bei insgesamt 11 Fällen im Stadium IV keinen Patienten mit einem Überleben von länger als 60 Monaten. Bei multiplen Metastasen ist lediglich eine mediane Überlebenszeit

von 8-12 Monaten zu erwarten, während in unserer Studienpopulation für diese Gruppe eine mediane Überlebenszeit von nur 5 Monaten erreicht wurde. Bei den Langzeitüberlebenden im Stadium IV handelt es sich meist um Fälle mit seltenen Treibermutation, wie einer Mutation im ROS-1- oder BRAF V600E-Gen<sup>30 44</sup>. Hinzu kommt, dass wir keine genauen Angaben über adjuvante und neoadjuvante Therapiekonzepte, sowie dem allgemeinen Gesundheitszustand und Komorbiditäten der Patienten zur Verfügung haben.

#### **4.5) Subpopulationen Tumor infiltrierender Lymphozyten als prognostische Marker:**

Wir korrelierten die 5 Jahres-Überlebensrate der Patienten mit den verschiedenen Untergruppen von Mutationen sowie mit der Anzahl der Immunzellsubpopulationen in der direkten Tumorumgebung.

Es konnte hierbei für den Pan-T-Zellmarker CD3 ( $p=0,0491$ ) und dem B-Zellmarker CD20 ( $p=0,0294$ ) ein signifikant geringerer Anteil von verstorbenen Patienten bei einem Wert oberhalb des Medians der CD3+ und CD20 +BTILs beobachtet werden (siehe Tab.37, Seite 89).

Bei CD8 hingegen konnte mit  $p=0,6948$  überraschend kein signifikanter Überlebensvorteil nachgewiesen werden (siehe Tab.37, Seite 89).

In der genaueren Untersuchung per Log-Rang Test konnte ein noch deutlicherer Effekt auf das Gesamtüberleben der Patienten beobachtet werden. Diese waren bei beiden Immunzellmarkern für die Gesamtpopulation ( $p=0,02$  für CD3 und  $p=0,013$  für CD20) nachweisbar (siehe Abb. 32, Seite 93 und Abb.38, Seite 98). In den einzelnen Tumorstadien waren diese Einflüsse jedoch nur vereinzelt signifikant nachweisbar, was jedoch aufgrund der geringen Fallzahl in den fortgeschrittenen Tumorstadien nicht verwunderlich ist. In den fortgeschrittenen Tumorstadien erreichte nur ein einziger Fall mit CD3 oder B-Follikelwerten unterhalb des Medians ein Überleben von mehr als 20 Monaten. In den frühen pathologischen und klinischen Tumorstadien hingegen zeigte sich hinsichtlich der Prognose kein signifikanter Unterschied zwischen den Fällen oberhalb des Medians von CD3 oder CD20 und den Fällen unterhalb des Medians. So konnte bei Berücksichtigung der CD20+ B-TILs in keiner Subgruppe ein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

Die positiven Auswirkungen von hohen CD3 TILs auf die Prognose sind bereits in mehreren Studien beschrieben worden<sup>74 75 76 131</sup>.

In einer deutschen Studienkohorte von Kayser et al. mit 232 NSCLCs in den operablen Stadien I-IIIa wurde ebenfalls ein prognostischer Einfluss von CD3+ TILs nachgewiesen. Hierbei handelte es sich jedoch nur bei 75 Fällen (32,3%) um Adenokarzinome. Zudem

wurde für die Detektierung der CD3+ TILs ein anderer Antikörper verwendet. Hier wurde in der Analyse der direkten Tumorumgebung zusätzlich ein Unterschied in der Lokalisation von CD3+ TILs und der Prognose festgestellt. Es hatten lediglich immunkompetente Zellen, welche sich im Tumorstroma befanden einen Einfluss auf das Überleben, während intraepitheliale Immunzellen scheinbar ohne Wirkung blieben<sup>76</sup>.

Eine weitere Studie von Khalid et al<sup>131</sup> untersuchte ebenfalls die Auswirkung von CD3 positiven Zellen auf die Prognose. Hierfür wurden 335 NSCLCs untersucht, von denen 113 Fälle zu den Adenokarzinomen gezählt wurden. Alle NSCLCs befanden sich in den pathologischen Tumorstadien I-III. Auch hier konnte ein positiver prognostischer Effekt bei erhöhten CD3+ TILs in der direkten Tumorumgebung nachgewiesen werden. Trotz der Vergleichbarkeit der Tumorstadien und der ethnischen Gruppe ist ein direkter Vergleich durch Unterschiede in Statistik und Detektion erschwert. So wurde hier ein anderer Antikörper (PS1 Clone) zur Detektion von CD3 verwendet, sowie der prognostische Wert am krankheitsspezifischen Überleben gemessen, welches bei uns nicht exakt bestimmt werden konnte. In einer Studie von Schalper et. al wurden 2 Kohorten mit NSCLC-Patienten aus den USA und Griechenland hinsichtlich der prognostischen Relevanz der Immunmarker CD3, CD8 und CD20 untersucht. In der Studie wurden insgesamt 552 NSCLCs (darunter 247 Adenokarzinome) durch quantitative Fluoreszierung analysiert. CD3 stellte sich in beiden Kohorten als prognostisch signifikanter Parameter heraus, welcher ebenfalls mit dem Log-Rank-Test analysiert wurde. Mögliche Unterschiede ergeben sich gegebenenfalls durch die Detektierung, die ebenfalls über einen anderen Antikörper (E273 Novus Biologicals) sowie über ein automatisiertes Verfahren (AQUA), durchgeführt wurde<sup>72</sup>.

Eine weitere Studie aus den USA bestätigt ebenfalls den positiven Einfluss von hohen Anzahlen CD3+ TILs auf das Überleben und auf die rezidivfreie Zeit. In dieser Studie wurden ebenfalls die Fox-P3 positiven regulatorischen T-Zellen untersucht, welche als alleiniger Faktor einen signifikant negativen Einfluss auf das Überleben haben. Bei Patientengruppen mit erhöhter Anzahl beider Subgruppen wurde eine krankheitsentsprechend normale Lebenserwartung beobachtet, sodass der Quotient der Anzahl CD3+ TILs und der Anzahl regulatorischer T-Zellen möglicherweise eine höhere prognostische Aussagekraft besitzt<sup>74</sup>.

Die Anzahl der CD8+ zytotoxischen T-Zellen in der direkten Tumorumgebung hatte mit  $p=0,6948$  in unserer Studienpopulation keine Auswirkung auf die 5 Jahres-Überlebensrate der Patienten, während sich in der Literatur deutliche Hinweise finden, welche auf eine prognostische Relevanz der CD8 positiven T-Zellen hindeuten. In der Studie von Schalper et

al. konnte ein signifikanter Einfluss von hohen Anzahlen CD8 positiver TILs auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Eine weitere Studie mit Kohorten aus Norwegen und Dänemark mit insgesamt 797 NSCLC in den klinischen Stadien I-IIIa bestätigte ebenfalls die prognostische Relevanz der Infiltration von CD8 positiven TILs. Wird in dieser Gruppe jedoch nur die Subgruppe der Adenokarzinome berücksichtigt, ist lediglich das krankheitsspezifische Überleben signifikant beeinflusst. Die Studie ist aufgrund struktureller Unterschiede im Studiendesign und Zielsetzung schwer mit unseren Ergebnissen vergleichbar. In der oben genannten skandinavischen Studie wurde versucht einen Immunoscore für die Ermittlung von genaueren Prognosen zu erproben. Hierfür wurden die CD8 positiven Zellen je nach prozentuaalem Anteil an allen kernhaltigen Zellen in 3 Gruppen eingeteilt. Diese wurden anschließend per Kaplan Meier Analyse miteinander verglichen. Dieses relative Kriterium ist somit sehr eingeschränkt mit unserer Einteilung nach absoluter Anzahl von Immunzellen in 2 Gruppen vergleichbar<sup>72 73</sup>. Ein möglicher Erklärungsansatz wurde in einer Studie von Dieu-Nosjean et al<sup>129</sup> gezeigt. In dieser Studie wurden Immunkonglomerate untersucht, welche vorwiegend aus aktivierten dendritischen Zellen (hier DC-Lamps bezeichnet) und CD4+ T-Helferzellen bestanden. Die CD8 positiven T-Zellen hingegen waren diffus im Tumorstroma lokalisiert. In dieser Studie konnte ein prognostischer Effekt der DC-Lamps nachgewiesen werden. Waren diese Zellen verringert konnte eine geringere Anzahl von CD8+ TILs beobachtet werden. Hinzu kam, dass ebenfalls der CD4/CD8 Quotient bei Verringerung der DC-Lamps stark eingeschränkt war, sodass abgesehen von der Anzahl der CD8 positiven TILs, eine starke Einschränkung der antitumoralen Effizienz der verbliebenen Zellen zu erwarten ist.

In der uns bekannten Literatur fanden wir zwar einige Arbeiten in denen TILs der B-Zellreihe untersucht wurden, doch wurden diese nicht mit dem Tumorstadium korreliert.

Einige Studien berücksichtigten anhand klinischer Daten die Prognose der Patienten hinsichtlich der Anzahl von B-Zellen bzw. Plasmazellen im Tumorstroma.

So wurde in der Studie von Lohr et al. ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Anzahl CD138 positiver Zellen sowie der Expression von Immunglobulin G kappa C und dem Gesamtüberleben der Patienten berichtet<sup>130</sup>. Problematisch ist bei dieser Studie eine fehlende Spezifität für den Plasmazellmarker CD138 sowie eine fehlende Signifikanz für eine bessere Prognose beim B-Zellmarker CD20. Des Weiteren zeigte sich bei den CD19+ BTILs in unserer Studie keine statistische Signifikanz (siehe Tab. 27, Seite 82). Neue Studien hingegen konnten vereinzelt sogar einen negativen Effekt bei hohen Infiltrationszahlen von

Plasmazellen nachweisen, während niedrige Anzahlen von CD20 positiven B-Zellen ebenfalls mit einer verringerten Lebenserwartung assoziiert waren<sup>81</sup>.

Als pathophysiologische Ursache für den prognostisch günstigen Effekt von CD20+ BTILs wird die Bildung von Antikörpern mit einem entsprechend größeren antitumoralen Effekt durch die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität vermutet. Hierdurch wird die Mobilisierung weiterer Immunzell-Subpopulationen wie NK-Zellen zur Tumorabwehr möglich. Des Weiteren ist die zusätzliche Aktivierung der T-Zellen durch die B-Zell vermittelte Antigenpräsentation über MHC II denkbar. Somit wäre es möglich, dass durch die erhöhte Anwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen eine Verstärkung der T-Zellantwort durch die Aktivierung von T-Helferzellen und zusätzlicher Zytokinexpression zu einer erhöhten antitumoralen Immunantwort führt<sup>80</sup>.

Eine Studie von Schalper et al. konnte einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem längeren Überleben des Patienten und dem Nachweis von CD20 positiven B-TILs im Tumorstroma zeigen. Dies galt jedoch nur für die Kohorte der Adenokarzinome während bei anderen histologischen Subtypen jener Zusammenhang nicht nachweisbar war<sup>72</sup>.

Eine japanische Studie von Fujimoto et al., welche an Lungentumoren aller histologischen Subtypen (79,3% Adenokarzinome) durchgeführt wurde, untersuchte die Infiltration von Plasmazellen anhand der Detektion von IgG4. Entsprechende Analysen wurden an Resektaten durchgeführt. Somit befanden sich die untersuchten Fälle in einem operablen Tumorstadium, von denen sich der überwiegende Anteil wiederum in den klinischen Stadien I und II (etwa 85% der Fälle) befand. Somit sind Verfahren und die Patientenselektion grundsätzlich mit unserem Kollektiv vergleichbar. Die Fälle mit einer erhöhten Zahl von IgG4 positiven Plasmazellen im Tumorstroma zeigten im Stadium I ein signifikant geringeres Auftreten von Todesfällen und Rezidiven im Vergleich zu der Gruppe mit moderater Infiltration. Diese Ergebnisse konnten jedoch nur im Stadium I beobachtet werden, sofern alle histologischen Subtypen berücksichtigt wurden<sup>132</sup>.

Legt man den Fokus lediglich auf Adenokarzinome im Stadium I, konnte kein signifikanter Unterschied beim Gesamtüberleben oder krankheitsfreiem Überleben, zwischen Fällen mit hoher oder moderater Infiltration von IgG4 positiven Plasmazellen, beobachtet werden.

Hinzu kommt, dass IgG4 mit einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen wie Vaskulitiden assoziiert sein kann, weshalb hier keine eindeutige Aussage zur Beteiligung der B-Zellreihe an dem verbesserten Outcome einiger Studienkohorten getroffen werden kann.

Trotz des mehrfachen Nachweises einer signifikanten prognostischen Relevanz von TILs der B-Zellreihe im Tumorstroma sind die Studien aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Immunzellmarker bei Studienpopulationen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen vom histologischen Subtyp und Tumorstadium nur sehr eingeschränkt vergleichbar. Auch in unserem Patientenkollektiv zeigt sich zwar eine Signifikanz für infiltrierende CD20 positive B-TILs, welche jedoch aufgrund der fehlenden Korrelation im breiteren Pan-B-Zellmarker CD19 vorsichtig interpretiert werden sollte.

Neue Studien haben zudem gezeigt, dass der Marker CD20 keine homogene Gruppe von proinflammatorischen B-Zellen abbildet. Der Marker CD20 inkludiert ebenfalls die Gruppe der regulatorischen B-Zellen, welche ohne die Anfärbung von IL-10 nicht von anderen B-Zellen unterschieden werden kann. Der genaue Stellenwert dieser Subgruppe ist noch nicht abschließend verstanden, wobei in der aktuellen Literatur deutliche Hinweise auf eine ausgeprägte Interaktion mit anderen immunsuppressiven Zellgruppen wie den regulatorischen T-Zellen (Treg) oder den „Myeloid derived suppressor cells“ zu finden sind.<sup>84 85 133</sup>

#### **4.6) B-Follikel im Tumorrandbereich:**

Wir zählten die B-Follikel im Tumorrandbereich in den Färbungen CD19 und CD20 aus und korrelierten diese mit dem Tumorstadium, den anderen Immunzellsubpopulationen sowie den Treibermutationen, PD-L1 und dem 5 Jahresüberleben.

Hierbei zeigte sich für die gesamte B-Zellreihe, im Gegensatz zur T-Zellreihe, kein signifikanter Einfluss durch die Expression von PD-L1 (siehe Tab. 27, Seite 82; Tab 28, Seite 83; Tab. 31, Seite 84; Tab. 32, Seite 85).

Signifikante Zusammenhänge ergaben sich hingegen bei der Anzahl von PD-1 positiven Zellen sowie der Intensität der B-Follikelreaktion.

Hierbei konnte in beiden B-Zellfärbungen signifikante Unterschiede bei der Anzahl PD-1 positiver Zellen in Fällen mit negativer Follikelreaktion oder geringer Follikelanzahl und jenen Fällen mit mäßiger Follikelreaktion ( $p=0,0005$  bei CD19 und  $p=0,008$  bei CD20) sowie zwischen den Fällen mit mäßiger und starker Follikelanzahl ( $p=0,0041$  bei CD19 und  $p=0,0025$  bei CD20), festgestellt werden (siehe Abb. 21, Seite 78; Abb. 22, Seite 79).

Diese Ergebnisse bestätigen die bereits beschriebene Annahme, dass PD-1+ T-Zellen essentiell für die Entstehung von B-Zellfollikeln und die thymusgesteuerte B-Zellantwort sind<sup>134 135</sup>.

Aufgrund des deutlichen Zusammenhanges zwischen der PD-1 Expression und der Anzahl von B-Follikeln in der direkten Tumorumgebung, sowie der bereits beschriebenen Relevanz von PD-1 positiven Zellen für die Follikelentstehung<sup>134 135</sup>, stellt sich die Frage, ob sich eine Therapie mit PD-1 Inhibitoren auf die Entstehung von B-Follikeln im Tumorrandbereich auswirkt und somit einen negativen Einfluss auf die B-Zellantwort geben könnte. Eine verlässliche Untersuchung erscheint hier jedoch schwer durchführbar. Für eine adäquate Beurteilung müssten Proben des Tumors zu einem Zeitpunkt vor Behandlungsbeginn mit PD-1 Inhibitoren entnommen werden, um diese mit Probematerial aus Folgebiospien oder Resektaten vergleichen zu können.

Diese Maßnahmen sind gegenüber den Patienten jedoch unter gesundheitlichen Aspekten schwer vertretbar, sodass erst bei der Anwendung von PD-1 Inhibitoren in neoadjuvanten Therapieschemata entsprechende Studien mit großem Patientenumfang möglich sind.

Die prognostische Relevanz von B-Follikeln hat in der uns bekannten Literatur bisher eine untergeordnete Rolle gespielt, bekam jedoch in den letzten Jahren zunehmende Aufmerksamkeit

So wurde bereits in einigen Studien ein Zusammenhang zwischen einem längeren Überleben der Patienten und dem Auftreten von sogenannten TLS („tertiary lymphoid structures“) beschrieben<sup>77 78 128 129</sup>.

Germain et al. unterteilt in seinem Forschungsprojekt die Fälle in Abhängigkeit ihrer B-Follikel-Dichte sowie der Dichte der dendritischen Zellen im gesamten Tumorbereich. Die Datenauswertung des 60-monatigen Follow-ups ergab einen deutlichen Unterschied zwischen den Patientengruppen. So waren von der Gruppe mit hoher Beteiligung der dendritischen Zellen und Follikel 100% der Patienten im Frühstadium und 55% der Patienten im fortgeschrittenen Stadium, welches mit neoadjuvanter Chemotherapie behandelt wurde, noch am Leben. Bei der Vergleichsgruppe hingegen überlebten nur noch 38% der Patienten im Frühstadium und 10% der Patienten im fortgeschrittenen Stadium die folgenden 5 Jahre. Diese Ergebnisse weisen auf ein mögliches therapeutisches Potential dieser Subpopulationen hin.

Die Ergebnisse von Germain et al. lassen sich eingeschränkt auch in unserem Patientenkollektiv erkennen. So zeigt sich auch bei uns ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl von CD19+ B-Follikeln und dem Überleben (siehe Abb. 34, Seite 95). Kritisch an dem Vergleich sind jedoch Unterschiede in der Erhebung der Befunde. Die Beurteilung der Follikel wurde in dem Forschungsprojekt von Germain et al. anhand der



Tumorfläche in Quadratmillimeter gemessen, während wir die absolute Follikelanzahl im Tumorrandbereich berücksichtigten. Des Weiteren waren in dem Forschungsprojekt von Germain et al. ausschließlich die Tumorstadien I-III vertreten, welche alle histologischen Subtypen des NSCLCs einschließen. Unsere Studienpopulation hingegen bestand ausschließlich aus Adenokarzinomen, welche ebenfalls Fälle im fortgeschrittenen Stadium IV, mit signifikant seltenerem Auftreten von B-Follikeln, aufwies.

Hinzu kommt, dass neben den B-Follikeln auch den dendritischen Zellen, welche als zentraler Bestandteil der Follikel, bei der Statistik ein besonderer Stellenwert eingeräumt wurde, bei uns keinerlei Berücksichtigung fanden.

Neue Untersuchungen von Germain et al aus dem Jahr 2021 bestätigen den prognostisch günstigen Einfluss von CD20+ TLS auf das Gesamtüberleben des Patienten. Außerdem konnten durch eine Erweiterung der Untersuchungen per Durchflußzytometrie Assoziationen zwischen der Anzahl, Zusammensetzung und mutmaßlichen antitumoralen Potenz der T-Zellpopulationen in der Tumorumgebung beobachtet werden. In den Fällen mit höherer CD20+ B-Follikeldichte (die Auszählung in dieser Studie erfolgte jedoch nach B-Follikelfläche in Quadratmillimeter im Vergleich zur Gesamttumorfläche) konnte eine geringere Anzahl von CD4+ T-Zellen nachgewiesen werden, welche die Gensignatur von „exhausted“- T-Zellen exprimierten. Des Weiteren konnte eine inverse Korrelation der B-Follikelbeteiligung mit der Anzahl regulatorischer T-Zellen beobachtet werden, was auf eine mögliche Wechselwirkung zwischen den Keimzentren und der Effizienz der intratumoralen T-Zellreaktion hindeuten könnte<sup>77</sup>.

In einer Studie von Dieu-Nosjean et al.<sup>129</sup> wurde ebenfalls die Auswirkung von tertiären Follikelstrukturen in der direkten Tumorumgebung auf verschiedene Parameter des Langzeitüberlebens untersucht. Bei 74 NSCLCs in frühen klinischen Tumorstadien (davon 46 Adenokarzinome) wurde eine Vielzahl von Immunmarkern analysiert und auf ihre prognostische Relevanz untersucht. Die follikulären Strukturen wurden zunächst immunhistochemisch auf ihre zellulären Bestandteile untersucht. Hierbei wurde beobachtet, dass aktivierte dendritische Zellen (im Folgenden DC-Lamp bezeichnet) zusammen mit umgebenden CD4+-T-Zellen den Kern dieser Strukturen bildeten. Dieser Kern wurde umgeben von CD20+ B-Zellen. Diese follikulären Strukturen zeigten ein sehr heterogenes Auftreten in Anzahl und Verteilung bei den unterschiedlichen Tumoren. Da DC-Lamp eine starke Korrelation mit den anderen Zellbestandteilen der Follikelstrukturen (Folgend und in der Studie als Ti-BALT bezeichnet) zeigte, wurde dieser Marker für die Korrelationsanalyse der Ti-BALTs mit den Überlebensparametern ausgewählt. Durch ein „score-counting“

wurden die Ti-BALTs semiquantitativ ausgezählt und in eine Low-DC-Lamp- und eine High-DC-Lamp-Gruppe eingeteilt. In einem 48-monatigen Follow-up wurde das Gesamtüberleben, das krankheitsspezifische Überleben und das krankheitsfreie Überleben untersucht. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den High- und Low-DC-Lamp Gruppen. Aufgrund der unterschiedlichen Definition und Quantifizierung der B-Follikel in der Studie von Dieu-Nosjean ist ein Vergleich mit unserer Studie nur orientierend möglich. Auch die geringe Anzahl an Studienteilnehmern mit nur 46 Adenokarzinomen beschränkt die Aussagefähigkeit dieser Ergebnisse. Dennoch könnten die beobachteten immunologischen Zusammenhänge in der Studie zur Interpretation und Verständnis der Ergebnisse unserer Studienpopulation beitragen.

#### **4.7) Prävalenz und klinische Relevanz der Treibermutationen:**

Bei den 133 Fällen mit ausreichender Qualität des Tumormaterials für eine DNA-Sequenzierung konnten bei 122 Fällen mindestens eine Mutation nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich mit 53,38% der Fälle (71/133) am häufigsten um das TP53 Gen. Bei den Treibermutationen zeigte sich am häufigsten eine Mutation im KRAS Gen, welche bei 37,59% der Fälle (50/133) auftrat. Die anderen beiden Mutationen der RAS-Familie (H-Ras und N-Ras) sowie eine Mutation im ALK-Gen waren nur in jeweils einem Fall nachweisbar. Die Mutation im ALK-Gen erwies sich jedoch als eine Punktmutation und wurde daher nicht zu den therapierbaren Treibermutationen gezählt.

Von den therapierbaren Treibermutationen zeigten sich 14 Fälle bei EGFR (10,43%) und 1 Fall von BRAF V600E (insgesamt 4 BRAF Mutationen). Die NGS Sequenzierung untersucht nur die Genabschnitte selbst wohingegen die Translokation oder Fusion von Genabschnitten nicht nachgewiesen werden können. Wir führten daher bei den 58 Fällen, welche keine Treibermutation im NGS Panel aufwiesen, eine zusätzliche immunhistochemische Untersuchung für den indirekten Nachweis einer ALK Translokation durch. In 5 Fällen konnten hierbei eine ALK-Amplifikation nachgewiesen werden.

Weitere Mutationen zeigten sich im MET- und DDR2 Gen (jeweils 12/133 Fälle bzw. 9,02%) sowie bei den Genen FGFR2 und CTNNB1 (jeweils 3/133 Fälle bzw. 2,26%).

In den Genen AKT1, MAP2K1 und PTPN11 konnte keine Mutation nachgewiesen werden. In unserem Studienkollektiv konnte kein Zusammenhang zwischen dem T-Stadium oder dem klinischen Tumorstadium hergestellt werden. Dies galt für die Gruppen der therapeutischen (T-Stadium:  $p=1$ ; klinisches Stadium:  $p=1$ ) bzw. biologischen Treibermutationen (T-Stadium: 0,1397; klinisches Stadium:  $p=0,2461$ ) sowie für alle Mutationen (T-Stadium:  $p=0,4546$ ; klinisches Stadium:  $p=0,501$ ) (siehe Tab. 33, Seite 86; Tab. 34, Seite 87).

Dies spricht für die Treibermutation als ein frühes Ereignis, welches entscheidend zur Tumorentstehung oder sehr früh zur Tumorprogression beiträgt, und somit auch in den frühen Stadien als potentielles therapeutisches Target vorhanden ist.

Da sich die Treibermutationen in den meisten Fällen gegenseitig ausschließen, erfolgte eine ALK-Untersuchung per Immunhistochemie nur bei den Fällen, welche keine Treibermutation in dem zuvor untersuchten NGS-Panel aufwiesen.

Es wurden einige Fälle beschrieben, bei denen mehrere Treibermutationen nachgewiesen werden konnten<sup>136</sup>. Dies ist vor allem klinisch relevant, da in einem solchen Fall durch die Aktivierung eines anderen Signalweges eine Therapieresistenz verursacht werden kann<sup>137</sup>. Aufgrund der Seltenheit dieser Fälle zeigte sich jedoch keine große Bedeutung für unsere begrenzte Studienpopulation.

Die Häufigkeit von 10,43% bei den EGFR-Mutationen in unserem Studienkollektiv deckt sich mit dem aktuellen Stand der Literatur. In der größten Studie mit einer deutschen Studienpopulation von Schuette et al, betrug der Anteil EGFR-positiver Studienteilnehmer 10,3% bei allen histologischen Subtypen sowie 13% bei der Subgruppe der Adenokarzinome<sup>138</sup>. In der Studie von Schuette et al. wurden jedoch lediglich Patienten im klinischen Stadium IIIB und IV berücksichtigt, während sich der überwiegende Anteil unserer Studienpopulation in einem früheren klinischen Stadium befindet. Bei dieser Studie erfolgte die Detektion der EGFR Mutationen dezentral, wobei nur die Exone 19 und 21 von EGFR getestet werden mussten. Die Exone 18 und 20 hingegen waren nicht verpflichtend, sodass einige EGFR positive Fälle eventuell nicht detektiert werden konnten.

In einer Studie von Barlesi et al, welche die Daten einer landesweiten Erhebung des „French National Cancer Institutes“ von 17664 NSCLC Patienten enthält, zeigte sich bei den Adenokarzinomen ein Anteil von 12% EGFR positiver Fälle.

Einige kleinere Studien aus dem deutschsprachigen Raum haben zum Teil deutlich größere Anteile von EGFR positiven Patienten gezeigt<sup>139 140 141</sup>. So zeigte sich bei Schildgen et al. ein Anteil von 11,3% EGFR-Positivität bei den Männern und 29% bei den Frauen. In dieser Studie ist jedoch das Probenmaterial nicht ausschließlich aus dem Primarius, sondern auch aus der Pleura und aus Metastasen gewonnen worden<sup>139</sup>.

Bei der deutschen Studienpopulation von Faehling et al. zeigten sich mit 17% EGFR positiver Fälle ebenfalls höhere Werte. Hier wurden entgegen unserer Studienpopulation ausschließlich Patienten in inoperablen Stadien berücksichtigt<sup>141</sup>.

In dem amerikanischen Studienprojekt des „Lung Cancer Mutation Consortium“ wurden Daten in 16 Kliniken der USA ermittelt, welche von Kris et al. in einer Studie mit 1017 Patienten ausgewertet wurden. Hier wurden in der amerikanischen Studienpopulation ebenfalls ein Anteil von 17% EGFR positiver Fälle ermittelt <sup>142</sup>.

Im asiatischen Raum hingegen zeigt sich ein anderes genetisches Profil mit deutlich mehr EGFR positiven Fällen von bis zu 50% der Studienteilnehmer<sup>143</sup>.

Die Ursachen der großen Unterschiede bei der Anzahl von Treibermutationen in den unterschiedlichen ethnischen Gruppen wie Kaukasiern und Asiaten ist weiterhin nicht gänzlich geklärt und bedarf weiterer epidemiologischer Studien.

Die Unterschiede zwischen den Geschlechtern und Ethnien lassen sich teilweise durch den deutlich häufigeren positiven Rauchstatus bei Männern und in westlichen Ländern erklären. So zeigen Frauen und Nichtraucher ein deutlich häufigeres Auftreten von EGFR-Mutationen, wobei die Wahrscheinlichkeit des Ereignisses in direktem Zusammenhang mit Dauer und Menge des Tabakkonsums zu stehen scheint<sup>144</sup>.

In den Daten der bisher nicht publizierten Studienplattform CRISP mit mehreren tausend NSCLC Patienten aus Deutschland hatte sich ebenfalls gezeigt, dass bei Berücksichtigung der genannten Faktoren ein vergleichbar häufiges Auftreten von EGFR Mutationen bei nichtrauchenden Frauen beider Ethnien beobachtet werden kann (Projektleitung Griesinger Frank, persönliche Mitteilung).

Die häufigste Treibermutation in unserem Patientenkollektiv stellte die KRAS Mutation mit einem Vorkommen bei 37,59% (50/133) der Fälle dar. Dieser Anteil zeigte sich ebenfalls in anderen Studien mit vergleichbaren Studienpopulationen. So zeigte sich in der oben bereits genannten Studie von Schildgen et al. eine Prävalenz von 35% KRAS positiver Patienten in der männlichen Studienpopulation sowie 41% bei den weiblichen Patienten<sup>139</sup>.

In der oben genannten Studie des „French National Cancer Institutes“ von Barlesi et al., wurde ein Anteil von 32% KRAS positiver Tumore bei den Adenokarzinomen festgestellt<sup>145</sup>, was von einer aktuellen Studie von Friedlaender et. al ebenfalls bestätigt wird <sup>146</sup>.

Internationale Studien hingegen fanden sehr unterschiedliche Werte hinsichtlich der Häufigkeit von KRAS-Mutationen. In der amerikanischen Studienpopulation der „Lung Cancer Mutational Consortium“ mit 25% KRAS positiver Fälle wurde ein etwas selteneres Auftreten detektiert <sup>142</sup>, während insbesondere in den asiatischen Ländern ein deutlich selteneres Auftreten beobachtet wird<sup>147</sup>. Dies bestätigt, dass das Auftreten von KRAS Mutationen neben dem Rauchstatus auch von der ethnischen Herkunft beeinflusst wird<sup>148</sup>.

Die KRAS-Mutation hat eine besondere klinische Relevanz, da sie sich als ein stark negativer

Prädiktor für das mediane Überleben der Patienten<sup>149 150</sup> herausgestellt hat und oftmals für das schlechte Ansprechen auf eine Therapie mit TKIs verantwortlich ist<sup>138 150 151 152</sup>.

Die Prognose des Patienten ist dabei von der Lokalisation einer Mutation in verschiedenen Codons des KRAS-Gens abhängig. So zeigte sich ein signifikant geringeres progressionsfreies Überleben von Patienten mit den Mutationen V und C im Codon 12 im Vergleich zu Mutationen im Codon 13 oder 61<sup>153</sup>. Zusätzlich konnte für die gleichen Mutationen in Zulassungsstudien eine Tendenz zu einem besseren Ansprechen auf Therapieversuche mit Docetaxel und Selumetinib festgestellt werden, welche jedoch nicht signifikant war<sup>154</sup>.

Bei den ALK Mutationen konnte in der NGS-Analyse unserer Studienpopulation lediglich eine Punktmutation in einem ALK-Gen nachgewiesen werden. Diese hatte jedoch keinen Krankheitswert und somit auch keine therapeutische Relevanz.

Zusätzlich zu der Analyse mittels NGS-Panel der HPH wurde eine immunhistochemische Analyse der Expression von ALK durchgeführt.

Da sich Treibermutationen gegenseitig ausschließen<sup>48</sup> wurde die ALK-Expression nur bei den Fällen geprüft, welche keine Treibermutationen im NGS-Panel aufwiesen.

Hierbei konnte in 3,76% der Fälle (5/133) eine solche Expression als indirekter Nachweis einer EML-4-ALK Translokation nachgewiesen werden.

Es finden sich in der Literatur Studien, welche mit 2-7% vergleichbare Häufigkeiten angeben<sup>14 141 155</sup>. In der deutschen Studienpopulation von Faehling et al. zeigten sich hierbei 7% ALK positiver Fälle, wobei hier bereits eine Vorselektion durch eine vorangegangene Testung von EGFR stattgefunden hat und nur EGFR negative Fälle in der folgenden Untersuchung des ALK-Genes berücksichtigt wurden<sup>137</sup>. In den aktuelleren Studien von Schildgen et al und Tufman et al. hingegen, wird von einem deutlich höheren Anteil von bis zu 14% bzw. 16,4% ALK positiver Patienten ausgegangen<sup>139 140</sup>.

Ein möglicher Grund für die starke Diskrepanz zwischen den Studien stellt die unterschiedliche Art der Mutationstestung dar. Während in unserer Studie Immunhistochemie und NGS-Verfahren verwendet wurden, erfolgte die Detektion in der Studie von Eunice et al. vorwiegend durch Immunhistochemie und FISH-Analysen.

Die Studiengruppe von Schildgen et. al stützte sich ausschließlich auf NGS-Methoden, welche in unserer Studienpopulation keinen therapierelevanten Nachweis einer ALK-Mutation erbracht haben.

Eine weitere potentielle Fehlerquelle stellt das Probenmaterial bei Schildgen et al. dar. Hier wurden, neben Resektaten, auch ein beträchtlicher Anteil der Proben von der Pleura oder von Metastasen des Primarius untersucht.

Auch die Zusammensetzung der Patienten in den unterschiedlichen Studienpopulationen könnte zum Teil für die unterschiedlichen Messungen verantwortlich sein, da junge Patienten generell deutlich häufiger Treibermutationen aufweisen, darunter auch viele ALK Mutationen<sup>156</sup>.

Die von uns durchgeführte NGS-Analyse konnte bei 3% (4/133) der Fälle Mutationen im Bereich des BRAF-Gens feststellen. Bei nur einer dieser Mutationen (0,7% der Fälle) handelte es sich dabei um die therapeutisch relevante Treibermutation vom BRAF V600E Typ.

Ähnliche Mutationsraten konnten in anderen großen Studien reproduziert werden.

So zeigte sich in der genannten Studie von Schildgen et al. eine BRAF Mutation in 1,35% der Fälle, sowie bei 0,67% der Fälle eine Mutation des Typ V600E<sup>139</sup>.

Ähnlich hohe Werte zeigten sich mit 2 bzw. 3% der Fälle ebenfalls in den amerikanischen Studienpopulationen von Kris et al. und Paul et al., wobei hier der Anteil der Mutationen vom Typ V600E 50% oder mehr, innerhalb der BRAF-Mutationen, betrug<sup>142 157</sup>. Einzelne neue Studien beschreiben in ihren Studienkollektiven höhere Werte zwischen 5-8%<sup>158</sup>.

Der Anteil der V600E Mutationen von der Gesamtzahl ist wegen seiner Therapierbarkeit mit der Kombination aus Dabrafenib und Trametinib von großer klinischer Relevanz<sup>45 46 158</sup>.

Aufgrund der geringen absoluten Zahlen von BRAF-Mutationen ist der geringe relative Anteil an BRAF Mutationen in unserer Studienpopulation statistisch nicht relevant.

In unserer Studienpopulation konnte bei keiner der 3 Gruppen von Treibermutationen ein signifikanter Einfluss auf die Prognose des Patienten nachgewiesen werden (siehe Tab.38, Seite 91). Ähnlich wie bei der fehlenden prognostischen Relevanz der PD-L1 Expression ist hier ein Selektionsbias, aufgrund der nahezu ausschließlichen Untersuchung von Patienten im operablen Stadium (103 Fälle in operablen Stadien vs. 18 Fälle in den Stadien IV bzw. IIIB) und der alleinigen Zulassung von TKIs für Tumore in den inoperablen, fortgeschrittenen klinischen Tumorstadien, am wahrscheinlichsten.

#### **4.8) Korrelationsanalyse der Treibermutationen:**

Wir bildeten aus den Daten unseres NGS-Panels 3 große Untergruppen von Mutationen und korrelierten diese jeweils mit den Subpopulationen der Immunkompetenten Zellen, dem klinisch relevanten PD-L1 Status sowie dem TP53 Gen.

Die erste Gruppe wurde durch die Mutationen der Gene EGFR, ALK, BRAF V600E und MET (Exon 14 Skipping) gebildet, die bereits heute durch ein zugelassenes Medikament therapiert werden können.

Die zweite Auswahl stellte die Gruppe der biologischen Treibermutationen dar. Diese Gruppe beinhaltet die Gene EGFR, MET (Exon 14 Skipping), BRAF V600E, ALK, KRAS, NRAS, HRAS). Die dritte Gruppe wurde schließlich aus allen Mutationen des NGS-Panels und der Mutation des TP53 Gens gebildet.

In der ersten Gruppe der therapierbaren Treibermutationen konnten wir keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Immunzellsubpopulationen oder dem PD-L1 Status sowie dem TP53 Gen finden.

Hierbei zeigte sich jedoch bei PD-L1-Negativität mit  $p=0,0758$  eine Tendenz, welche statistisch nicht signifikant ist. Kein einziger Fall in unserer Studie, mit einer klinisch relevanten PD-L1 Expression bei mehr als 50% von Tumorzellen, zeigte sich gleichzeitig positiv für eine therapierbare Treibermutation. Bei einer größeren Studienpopulation wäre aufgrund dieser deutlichen Konstellation möglicherweise ein signifikantes Ergebnis zu erwarten gewesen (Abb.28, Seite 88).

Dies könnte die Annahme untermauern, dass diese beiden Prinzipien der Tumorgenese getrennt voneinander zur Tumorentstehung beitragen. So entstehen die entsprechenden Tumore vermutlich entweder durch eine Mutation in einem entsprechenden Treiber-Gen zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorgenese mit entsprechend aggraviertem Verlauf und Tumorwachstum, während die Expression von PD-L1 mit einem Immundefizit einhergeht, welches die Bekämpfung des Tumors durch das Immunsystem unterbindet und somit ein langfristiges Wachstum ermöglicht.

In der zweiten, erweiterten Gruppe der biologischen Treibermutationen hatten wir alle RAS-Mutationen miteinbezogen. Hier konnte ebenfalls kein Zusammenhang mit einer Mutation des TP53 Gens oder dem PD-L1 Status gefunden werden. Bei dieser Gruppe zeigten sich signifikant geringere Werte in den B-Zellfärbungen. Dies zeigte sich in der Färbung CD19 bei den B-TILs im Tumorstroma ( $p=0,0151$ ) sowie bei den B-Follikeln im Tumorrandbereich in der Färbung von CD19 ( $p=0,0334$ ) und CD20 ( $p=0,0293$ ).

Der statistisch signifikante Zusammenhang zwischen den Mutationen der Gruppe biologischer Treibermutationen und der B-Zellantwort ist bisher in der uns bekannten Literatur nicht beschrieben worden. Dies lässt sich vermutlich durch die geringere Immunogenität von Tumoren mit Treibermutationen erklären, welche vorwiegend bei Nichtrauchern anzutreffen sind (siehe Abb.24, Seite 82; Abb. 25, Seite 85; Abb. 26, Seite 86).

Bei der dritten Gruppe wiederum waren keinerlei signifikante Unterschiede mit den oben genannten Parametern nachweisbar.

#### **4.9) Stellenwert der Immuntherapie in früheren Tumorstadien:**

Die oben genannten Daten bestärken die Vermutung, dass eine Behandlung mit Checkpoint Inhibitoren in frühen Tumorstadien sinnvoll sein könnte, da auch in den frühen, operablen Stadien bereits ein vergleichbar häufiges Auftreten von klinisch relevanten PD-L1 Expressionsraten von über 50% vorzukommen scheint.

Neben der bereits erfolgreichen Anwendung von PD-L1 Inhibitoren bei radiochemotherapierten NSCLCs im Stadium III<sup>55</sup>, hat die bereits genannte Pilotstudie von Forde et al. einen ersten Ausblick auf einen möglichen therapeutischen Effekt von Checkpoint-Inhibitoren in einer neoadjuvanten Situation gezeigt<sup>126</sup>.

Hierbei präsentierte sich Nivolumab als eine schonende und effektive Alternative zu einer zusätzlichen, perioperativen Chemotherapie. Während bei bisherigen Chemotherapieregimen ein relativ geringer Nutzen von 5,4% erhöhter Überlebensrate mit starken Nebenwirkungen erkauft wird (60% der Patienten zeigen mindestens Grad 3 Nebenwirkungen), zeigt Nivolumab ein akzeptableres Nebenwirkungsprofil sowie eine höhere Ansprechrate von 45% (9 von 20 Fällen) gegenüber 22% bei der Chemotherapie. In 15% der Fälle (3/20) zeigten sich sogar immunhistochemische Komplettremissionen des Tumors. Aufgrund des nachgewiesenen Primings von T-Zell-Rezeptoren ist zudem ein langfristiger Schutz vor Rezidiven, gegenüber einer erhöhten Anfälligkeit durch die Immunsuppression einer Chemotherapie, denkbar. Diese Hypothese müsste jedoch in einem langfristigen Follow-up mit größeren Studienpopulationen überprüft werden.

Ähnliches gilt auch für eine mögliche Behandlung mit TKIs, da alle Untergruppen der Treibermutationen nicht signifikant häufiger in den späteren Tumorstadien auftraten. Bei anderen Tumoren, wie dem Melanom, wurden bereits ähnliche Verteilungen von Mutationen und PD-L1 Expressionsraten hinsichtlich des Tumorstadiums beobachtet. Einige klinische Studien von Eggermont et al. sowie Long et al. überprüften bereits, ob eine



Ausweitung des Therapiespektrums der neuen Therapieformen auf das klinische Stadium III sinnvoll sein könnte<sup>55 89 160</sup>.

Auch unsere Daten zeigen, dass weitere klinische Untersuchung zur Anwendung von TKIs und Checkpoint-Inhibitoren als Bestandteil neoadjuvanter oder adjuvanter Therapieschemata in früheren Tumorstadien sinnvoll sein könnten.

#### **4.10) „Limitationen der Studie“**

Neben den, in der Diskussion bereits genannten, Einschränkungen zur Vergleichbarkeit unserer Daten mit der bekannten Literatur müssen zusätzlich weitere potentielle Fehlerquellen berücksichtigt werden.

Ein großer Vorteil hinsichtlich der Qualität der Auswertung stellte die Untersuchung am Resektat dar. Hierdurch konnten einige potentiell nicht-repräsentative Effekte, welche in kleineren Biopsien naturgemäß eher auftreten, von vornherein reduziert werden. Des Weiteren waren ebenfalls 3 Metastasen von bereits zuvor bekannten Adenokarzinomen in die Gruppe des Stadium IV nach UICC einbezogen worden. Es handelt sich hierbei zwar ebenfalls um ein weit fortgeschrittenes Tumorgeschehen, doch können Metastasen möglicherweise ein unterschiedliches Immunprofil oder eigene Treibermutationen, im Zuge der klonalen Evolution, erworben haben. Zudem könnte, im Falle der Metastasen, der eigentliche Primarius oder die assoziierten Therapieregime bereits einen Einfluss auf die direkte Tumorumgebung bewirkt haben.

Alle Informationen zu den Patienten in unserer Studie stammten ausschließlich aus den pathologischen Akten sowie dem Vitalstatus des Hamburger Krebsregisters. Somit konnten weitere Informationen zu Ko-Morbiditäten, Therapieregimen, Therapieanspruch des Patienten oder gesicherter Todesursache ebenfalls nicht einbezogen werden. Generell ist beim Verlauf des Krankheitsbildes im fortgeschrittenen Tumorstadium eine kausale Todesursache wahrscheinlich. Dennoch könnte die oftmals unterschiedliche Bereitschaft des Patienten zur Fortführung der Therapie sowie die signifikante Verkürzung der Lebenszeit durch Ko-Morbiditäten bei entsprechend geringer Fallzahl im fortgeschrittenen Stadium einen wichtigen Einfluss auf unsere statistische Analyse haben.

Eine weitere mögliche Einschränkung hinsichtlich der pathologischen Daten war die Bestimmung der klinischen Tumorstadien, das hauptsächlich anhand des eingesandten Materials stattgefunden hatte. Somit ist unklar, ob in der klinischen Praxis eine lymphogene oder hämatogene Aussaat bestand, welche aufgrund anatomischer Unzugänglichkeit,

Therapielimitierung des Patienten oder stark reduzierten Allgemeinzustand des Patienten nicht weiter abgeklärt werden konnte und somit nicht beim pathologischen Befund berücksichtigt wurde.

Aufgrund der teils großen Menge des intraoperativ entfernten Materials mit zum Teil sehr heterogener Verteilung der Tumorzellen in der Probe erfolgte die Selektion des Gewebeblocks mit den jeweils größten Tumoranteilen. Dies war aufgrund der hohen Anzahl von Blöcken nötig, da diese nicht immer ausreichend Tumormaterial für eine immunhistochemische Analyse sowie einer zusätzlichen DNA-Analyse per NGS enthielten. Somit erfolgte bei der hohen Anzahl von immunhistochemischen Parametern die Selektion des tumorreichsten Blockes. Im Tumorstroma der ausgewählten Blöcke konnte immunhistochemisch ein teilweise heterogenes Verteilungsmuster beobachtet werden, woraus wiederum, nach bestem Ermessen, repräsentative Areale zur Auszählung der High Power Fields herausgesucht wurden. Dies kann dennoch immer mit einer möglichen Subjektivität behaftet sein.

Neben der Zählung der Immunzellen im Tumorstroma war ebenfalls die Zählung der B-Follikel im vorliegenden Schnitt herausfordernd. Es erfolgte aufgrund der manuellen Auszählung am Mikroskop keine relative Berechnung der Follikelanzahl in Bezug auf eine Fläche, sondern eine absolute Zählung je Tumor unabhängig der lokalen Ausdehnung. Bei der Auswertung des Checkpointproteins PD-L1 erfolgte in unserer Studie die semiquantitative Bestimmung der PD-L1 positiven Tumorzellen und Immunzellen. Hierfür wurde neben der Grundfärbung (HE) lediglich PD-L1 angefärbt. Die Unterscheidung von PD-L1 positiven Zellen in Immunzellen und Tumorzellen erfolgte in unserer Studie anhand der gängigen histologischen Merkmale wie Dendritenfortsätzen oder typischer Zeichen der Malignität wie Kernpolymorphie und der Anordnung in Tumorzellnestern. Hierbei ist jedoch für einzelne Zellen ohne Doppelfärbung keine eindeutige Zuordnung möglich, sodass keine statistische Auswertung der PD-L1-Positivität für Immunzellen in unserer Studie vollzogen wurde. Auch für die Tumorzellen folgte eine, entsprechend der klinischen Relevanz und der immunhistochemischen Aussagekraft angepasste, Einteilung in drei Kategorien (negativ, 1-49% bzw. Low-Expressoren, sowie >50% High Expressoren), sodass ein Einfluss durch die mögliche Fehlinterpretation einzelner Zellen minimiert werden konnte.

## 5) Zusammenfassung:

In dieser Arbeit sollte die Prävalenz von Treibermutationen sowie deren Einfluss auf die Entwicklung der Immunzellsubpopulationen in der direkten Tumorumgebung, hinsichtlich der Tumorstadien und der Expression von PD-1/ PD-L1, untersucht werden.

Dafür wurden 156 Lungenresektate immunhistochemisch angefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Bei 133 dieser Fälle wurde per NGS eine Sequenzanalyse von Genabschnitten der gängigsten Treibermutationen durchgeführt. Bei 100 dieser Fälle war ein eindeutiger Vitalstatus und Sterbedatum im Hamburger Krebsregister dokumentiert. Immunhistochemisch wurden die Parameter CD68, CD3, CD8, CD19, CD20, Fox-P3 sowie PD-1 und PD-L1 für die Proteine des „programmed cell death pathways“ angefärbt.

Die Analyse von klinisch relevanten Treibermutationen auf der Tumor-DNA erfolgte nach einem Panel des HpH per Amplikon-basiertem NGS. Die Daten wurden mit denen, aus den Krankenakten entnommenen, pathologischen und klinischen Tumorstadien, sowie den vorhandenen Überlebensdaten des Hamburger Krebsregisters verglichen. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen klinisch relevanten PD-L1 Expressionsraten und geringen CD3 positiven TILs nachgewiesen werden ( $p=0,0007$ ). Weitere signifikante Korrelationen konnten bei der Intensität der Follikelreaktionen bei erhöhter Anzahl von PD-1 positiven Zellen (CD19:  $p=0,0005$  bzw.  $p=0,0041$ ; CD20:  $p=0,008$  bzw.  $p=0,0025$ ). Das pathologische und klinische Tumorstadium erwies sich ebenfalls als signifikanter Einfluss auf die Anzahl der B-Follikel. So konnte im klinischen Stadium IV ein selteneres Auftreten von CD20+ B-Follikeln ( $p=0,0453$ ), sowie im T-Stadium pT4 ein signifikant selteneres Auftreten von CD19+ B-Follikeln nachgewiesen werden ( $p=0,0232$ ). Die Immunzellsubpopulationen CD20 ( $p=0,02382$ ) und CD8 ( $p=0,014$ ) zeigten im Stadium IV einen signifikanten Rückgang der Zellzahl gegenüber den Stadien I-III. Hinsichtlich der prognostischen Parameter waren hohe Zahlen von CD3+ TILs ( $p=0,02$ ), CD20+ B-TILs ( $p=0,0294$ ) und CD19+ Follikel ( $p=0,001$ ) mit einem signifikant höheren Gesamtüberleben assoziiert. Weitere Korrelationen zeigten sich zwischen einer signifikant geringeren Anzahl von B-TILs (CD19:  $p=0,0151$ ) bei biologischen Treibermutationen, sowie ein signifikant häufigeres Auftreten von Mutationen im TP53 Gen bei Tumoren im fortgeschrittenen T-Stadium ( $p=0,0273$ ). Unsere Ergebnisse zeigen eine starke Beteiligung der B-Zellreihe an der Tumorabwehr. Es stellt sich die Frage, ob ein früherer Therapiezeitpunkt von Checkpoint Inhibitoren angemessen sein könnte. Des Weiteren wurden die bereits bekannte Prävalenz von Treibermutationen in unserer Studie bestätigt, während der Einfluss von Treibermutationen auf die B-Zellantwort bisher nicht beschrieben wurde.

## **6) Summary:**

The intention of this study was to investigate the potential relationship of immunecell subpopulations within the tumor microenvironment and the tumor PD-L1 status as well as tumor genotype and the potential impact on prognosis.

We performed immunohistochemical analysis In 156 tumor resections. In addition 133 samples were evaluable for NGS-DNA sequencing for mutations in 17 clinically relevant genes. In 100 cases we got exact data about vitalstatus and date of death. Immunohistochemistry was done using antibodies against CD68, CD3, CD8, CD19, CD20 and Fox-P3 for immune cell subtyping and PD-1/PD-L1 for analysis of checkpoint proteins. NGS sequencing of the tumor-DNA was performed, using an amplicon based NGS panel to detect clinically relevant mutations, including drivermutations. These were correlated with the tumorstages (T-stage and UICC) from the diagnostic database, checkpoint proteins, cell count in the tumor microenvironment and overall survival in a 60 month follow up. In cases with clinically relevant PD-L1 Expression over 50% of Tumorcells a significantly lower cell count in tumor microenvironment (CD3  $p=0,0007$ ) was shown. An elevated B-follicle reaction correlated with a higher count of PD-1 positive T-cells (CD19:  $p=0,0005$  and  $p=0,0041$ ; CD20:  $p=0,008$  and  $p=0,0025$ ). Furthermore, B-follicle reaction was reduced in T-stage pT4 ( $p=0,0232$ ) as well as UICC Stage IV ( $p=0,0453$ ) and in tumors carrying somatic drivermutations (CD19:  $p=0,0293$ ; CD20:  $p=0,0334$ ). A significant decrease in CD8+ ( $p=0,014$ ) and CD20+ ( $p=0,013$ ) immune cells could be found in the UICC Stage IV compared to the earlier stages. The overall survival showed significant correlation with the count of CD3+ TILs ( $p=0,02$ ), CD20+ B-TILs ( $p=0,0294$ ) and CD19 follicles ( $p=0,001$ ). Another significant correlation could be shown with a lower count of B-TIL and CD19 Follicles in presence of a biological drivermutation (CD 19  $p=0,0151$ ) as well as higher numbers of Mutations in the TP53 Gene in cases with advanced tumorstage ( $p=0,0273$ ).

These results show a strong participation of B-cells in the immune response of drivermutation wild-type Tumors.

It should be discussed, whether the use of checkpoint inhibitors even in earlier tumor stages may be useful and should be addressed in subsequent clinical studies.

In addition, we confirmed the known prevalence of driver mutations from earlier publications, while the correlation between the driver mutations and the B-cells has not been described yet.

## V) Literaturverzeichnis:

1. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, et al. Bericht zum krebsgeschehen in deutschland 2016. . 2016. <http://www.dx.doi.org/10.25646/318910.17886/rkipubl-2016-014>. doi: 10.17886/rkipubl-2016-014.
2. Cheng TD, Cramb SM, Baade PD, et al. The international epidemiology of lung cancer: Latest trends, disparities, and tumor characteristics. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2016;11(10):1653-1671. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27364315>. doi: 10.1016/j.jtho.2016.05.021.
3. Doll R, Hill AB. Study of the aetiology of carcinoma of the lung. *British Medical Journal*. 1952;2(4797):1271-1286. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.2.4797.1271>. doi: 10.1136/bmj.2.4797.1271.
4. Österreichische Gesellschaft für Hämatologie & Medizinische Onkologie, Schweizerische Gesellschaft für Medizinische Onkologie, Griesinger F, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie. Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC). <http://www.dx.doi.org/10.4126/FRL01-006400881>. Updated 2012.
5. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalton transactions : an international journal of inorganic chemistry*. 2018;47(19):6645-6653. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29632935>. doi: 10.1039/c8dt00838h.
6. Seidel D, Zander T, Heukamp LC, et al. A genomics-based classification of human lung tumors. *Science Translational Medicine*. 2013;5(209):209ra153. <https://www.narcis.nl/publication/RecordID/oai:pure.rug.nl:publications%2Fbe3de556-5dd2-4364-ab4c-57ae644c66e6>. doi: 10.1126/scitranslmed.3006802.

7. Greulich H. The genomics of lung adenocarcinoma: Opportunities for targeted therapies. *Genes & cancer*. 2010;1(12):1200-1210. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779443>. doi: 10.1177/1947601911407324.
8. Thomas A, Lee J, Abdullaev Z, et al. Characterization of fibroblast growth factor receptor 1 in small-cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2014;9(4):567-571. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24736083>. doi: 10.1097/JTO.0000000000000089.
9. Peifer M, Fernandez-Cuesta L, Sos ML, et al. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nature Genetics*. 2012;44(10):+. <https://www.narcis.nl/publication/RecordID/oai:pure.rug.nl:publications%2Fd0c79596-91b4-48b4-8c23-ef33ea59e3b>.
10. Weiss J, Sos ML, Seidel D, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Science Translational Medicine*. 2010;2(62):62ra93. <https://www.narcis.nl/publication/RecordID/oai:pure.rug.nl:publications%2F252d68c6-aa54-4245-9f1c-6bfc5e6e5d7a>. doi: 10.1126/scitranslmed.3001451.
11. Weeden CE, Solomon B, Asselin-Labat M. FGFR1 inhibition in lung squamous cell carcinoma: Questions and controversies. *Cell Death Discovery*. 2015;1(1):15049. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27551478>. doi: 10.1038/cddiscovery.2015.49.
12. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: Lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(4):1167-1176. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228640>. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2109.

13. Kristin Bergethon, Alice T. Shaw, Sai-Hong Ignatius Ou, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(8):863-870. <http://jco.ascopubs.org/content/30/8/863.abstract>. doi: 10.1200/JCO.2011.35.6345.
14. Kwak EL, Bang Y, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in Non-Small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2010;363(18):1693-1703. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20979469>. doi: 10.1056/NEJMoa1006448.
- 15.. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the philadelphia chromosome. *The New England Journal of Medicine*. 2001;344(14):1038-1042. <http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/344/14/1038>. doi: 10.1056/NEJM200104053441402.
16. Tetsuya M, Satoshi M, Yasushi Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): An open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncology, The*. 2010;11(2):121-128. <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S147020450970364X>. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70364-X.
17. Solomon BJ, Mok T, Kim D, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2014;371(23):2167-2177. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25470694>. doi: 10.1056/NEJMoa1408440.
18. Mok TS, Wu Y, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *The New England Journal of Medicine*. 2009;361(10):947-957. <http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/361/10/947>. doi: 10.1056/NEJMoa0810699.

19. Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for european patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncology, The*. 2012;13(3):239-246. <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S147020451170393X>. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70393-X.
20. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for Non–Small-cell lung cancer with mutated EGFR. *The New England Journal of Medicine*. 2010;362(25):2380-2388. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20573926>. doi: 10.1056/NEJMoa0909530.
21. Solomon BJ, Mok T, Kim D, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2014;371(23):2167-2177. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25470694>. doi: 10.1056/NEJMoa1408440.
22. Zhou C, Wu Y, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): A multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. . 2011. <http://ir.bjmu.edu.cn/handle/400002259/67838>. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70184-X.
23. Masahiro F, Yi-Long W, Sumitra T, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced Non–Small-cell lung cancer in asia (IPASS). *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(21):2866-2874. <http://jco.ascopubs.org/content/29/21/2866.abstract>. doi: 10.1200/JCO.2010.33.4235.
24. Kato T, Yoshioka H, Okamoto I, et al. Afatinib versus cisplatin plus pemetrexed in japanese patients with advanced non-small cell lung cancer harboring activating EGFR



mutations: Subgroup analysis of LUX-Lung 3. *Cancer Science*. 2015;106(9):1202-1211.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cas.12723>. doi: 10.1111/cas.12723.

25. Wu Y, Xu C, Hu C, et al. Afatinib versus gemcitabine/cisplatin for first-line treatment of chinese patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR mutations: Subgroup analysis of the LUX-lung 6 trial. *OncoTargets and Therapy*. 2018;11:8575-8587. doi: 10.2147/OTT.S160358.

26. Mok TS, Wu Y, Ahn M, et al. Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive lung cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2017;376(7):629-640.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27959700>. doi: 10.1056/NEJMoa1612674.

27. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, et al. Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC. *The New England journal of medicine*.

2020;382(1):41-50. <https://nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1913662>. doi:

10.1056/NEJMoa1913662.

28. Soria J, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced Non–Small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(2):113-

125. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1713137>. doi: 10.1056/NEJMoa1713137.

29. Nishio M, Kim D, Wu Y, et al. Crizotinib versus chemotherapy in asian patients with ALK-positive advanced non-small cell lung cancer. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association*. 2018;50(3):691-700.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28701030>. doi: 10.4143/crt.2017.280.

30. Arnaoutakis K. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;372(7):683.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25671265>.

31. Shaw AT, Ou SI, Bang Y, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged Non–Small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2014;371(21):1963-1971.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25264305>. doi: 10.1056/NEJMoa1406766.
32. Ou SI, Kwak EL, Siwak-Tapp C, et al. Activity of crizotinib (PF02341066), a dual mesenchymal-epithelial transition (MET) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor, in a non-small cell lung cancer patient with de novo MET amplification. *Journal of Thoracic Oncology*. 2011;6(5):942-946.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&NEWS=n&CSC=Y&PAGE=fulltext&D=ovft&AN=01243894-201105000-00015>. doi: 10.1097/JTO.0b013e31821528d3.
33. Shaw AT, Riely GJ, Bang Y-, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): Updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. *Annals of oncology*. 2019;30(7):1121-1126. <https://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdz131>.  
doi: 10.1093/annonc/mdz131.
34. Friboulet L, Li N, Katayama R, et al. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer discovery*. 2014;4(6):662-673.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24675041>. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0846.
35. Shen L, Ji H, Shaw AT, et al. Ceritinib in ALK-rearranged Non–Small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2014;370(26):2537-2539.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24963575>. doi: 10.1056/NEJMc1404894.
36. Shaw AT, Gandhi L, Gadgeel S, et al. Phase 2 prospective analysis of alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant non-small-cell lung cancer. *The Lancet. Oncology*. 2015;17(2):234-242.

[https://www.openaire.eu/search/publication?articleId=od\\_267::12f4f6fc7e2780f53722a027f37ca79e](https://www.openaire.eu/search/publication?articleId=od_267::12f4f6fc7e2780f53722a027f37ca79e). doi: 10.1016/S1470-2045(15)00488-X.

37. Gadgeel, S., M, Ghandi., Leena, R., et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK -rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): Results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study.

*Lancet Oncology, The*. 2014;15(10):1119-1128. <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S1470204514703626>. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70362-6.

38. Lin JJ, Schoenfeld AJ, Zhu VW, et al. Efficacy of platinum/pemetrexed combination chemotherapy in ALK-positive NSCLC refractory to second-generation ALK inhibitors. *Journal of thoracic oncology*. 2020;15(2):258-

265. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2019.10.014>. doi: 10.1016/j.jtho.2019.10.014.

39. Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, et al. First-line lorlatinib or crizotinib in advanced ALK-positive lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2020;383(21):2018-2029. <https://nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2027187>. doi: 10.1056/NEJMoa2027187.

40. Vivek S., David SH, Funda M-B, et al. Clinical activity of ceritinib in ROS1-rearranged non-small cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(11):E1420. <https://www.jstor.org/stable/26468705>. doi: 10.1073/pnas.1522052113.

41. Roskoski R. ROS1 protein-tyrosine kinase inhibitors in the treatment of ROS1 fusion protein-driven non-small cell lung cancers. *Pharmacological Research*. 2017;121:202-212.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661817304747>. doi: 10.1016/j.phrs.2017.04.022.

42. Drilon A, Siena S, Dziadziuszko R, et al. Entrectinib in *ROS1* fusion-positive non-small-cell lung cancer: integrated analysis of three phase 1–2 trials *The Lancet Oncology*. 2020;21(2):261. doi: 10.1016/S1470-2045.
43. Yun MR, Kim DH, Kim SH, et al. Repotrectinib exhibits potent antitumor activity in treatment-naïve and solvent-Front–Mutant ROS1-rearranged Non–Small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2020;26(13):3287. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-19-2777.
44. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, et al. Vemurafenib in multiple nonmelanoma cancers with BRAF V600 mutations. *The New England Journal of Medicine*. 2015;373(8):726-736. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26287849>. doi: 10.1056/NEJMoa1502309.
45. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF .sup.V600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: An open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncology*. 2017;18(10):1307. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30679-4.
46. Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer:: An open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncology*. 2016;17(7):984-993. <https://www.narcis.nl/publication/RecordID/oai:pure.rug.nl:publications%2Fdf8b5aae-c82b-4553-b35c-b89d7048712f>. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30146-2.
47. Tomasini P, Walia P, Labbe C, et al. Targeting the KRAS pathway in Non-Small cell lung cancer. *The Oncologist*. 2016;21(12):1450-1460. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1634/theoncologist.2015-0084>. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0084.

48. Gainor JF, Varghese AM, Ou SI, et al. ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: An analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(15):4273-4281. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23729361>. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0318.
49. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, et al. Tracking the evolution of Non-Small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2017;376(22):2109-2121. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28445112>. doi: 10.1056/NEJMoa1616288.
50. Dunn EF, Harari PM, Wheeler DL. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2010;7(9):493-507. <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.97>. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.97.
51. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Science translational medicine*. 2011;3(75):75ra26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21430269>. doi: 10.1126/scitranslmed.3002003.
52. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2016;375(19):1823-1833. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27718847>. doi: 10.1056/NEJMoa1606774.
53. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced non-squamous non-small cell lung cancer. . 2015. [https://www.openaire.eu/search/publication?articleId=od\\_\\_\\_\\_\\_267::a93aab209df49556bb352c161a7fa532](https://www.openaire.eu/search/publication?articleId=od_____267::a93aab209df49556bb352c161a7fa532). doi: 10.1056/NEJMoa1507643.

54. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, et al. Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC. *The New England Journal of Medicine*. 2018;378(24):2288-2301. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29863955>. doi: 10.1056/NEJMoa1716948.
55. Kim Y, Antonia SJ. Durvalumab after chemoradiotherapy in stage III Non–Small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2019;380(10):989-990. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1900407>. doi: 10.1056/NEJMc1900407.
56. Eggermont A, Blank CU, Mandala M, et al. Adjuvant pembrolizumab in resected stage III melanoma. *The New England Journal of Medicine*. 2018;379(6):593. <https://search.proquest.com/docview/2087560339>. doi: 10.1056/NEJMc1807505.
57. Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, et al.; KEYNOTE-042 Investigators. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2019 May 4;393(10183):1819-1830. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32409-7. Epub 2019 Apr 4. PMID: 30955977. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32559-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32559-5)
58. Gainor JF, Shaw AT, Sequist LV, et al. EGFR mutations and ALK rearrangements are associated with low response rates to PD-1 pathway blockade in non-small cell lung cancer: A retrospective analysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(18):4585-4593. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27225694>. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-3101.
59. J.K. Sabari, G.C. Leonardi, C.A. Shu, et al. PDL1 Expression, Tumor Mutational Burden, and Response to Immunotherapy in Patients with MET exon 14 Altered Lung Cancers. *Annals of Oncology*. 2017. doi: 10.5755/j01.eie.24.6.22279

60. Ng TL, Liu Y, Dimou A, et al. Predictive value of oncogenic driver subtype, programmed death-1 ligand (PD-L1) score, and smoking status on the efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors in patients with oncogene-driven non-small cell lung cancer. *Cancer*. 2018.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30548240>. doi: 10.1002/cncr.31871.
61. Turgeon G, Weickhardt A, Azad AA, et al. Radiotherapy and immunotherapy: A synergistic effect in cancer care. *Medical Journal of Australia*. 2019;210(1):47-53.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.5694/mja2.12046>. doi: 10.5694/mja2.12046.
62. Bhalla N, Brooker R, Brada M. Combining immunotherapy and radiotherapy in lung cancer. *Journal of thoracic disease*. 2018;10(Suppl 13):S1460.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29951296>. doi: 10.21037/jtd.2018.05.107.
63. Cristescu R, Mogg R, Ayers M, et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade–based immunotherapy. *Science*. 2018;362(6411):197.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30309915>. doi: 10.1126/science.aar3593.
64. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: Utility for the oncology clinic. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2018.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30395155>. doi: 10.1093/annonc/mdy495.
65. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer. *Current Medicine Research and Practice*. 2016;6(2):96-97. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S235208171630023X>.  
doi: 10.1016/j.cmrp.2016.03.004.

66. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of Non–Small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2015;372(21):2018-2028. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25891174>. doi: 10.1056/NEJMoa1501824.
67. Herbst RS, Baas P, Kim D-W, et al.. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet, The*. 2015;387(10027):1540-1550. <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0140673615012817>. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01281-7.
68. Zink P., Falk M., Schatz S. et al. Dynamics of tumor infiltrating lymphocytes throughout different stages of lung adenocarcinomas, *Oncol Res Treat* 2018;41(suppl 4):1-358. doi: 10.1159/000492737
69. Horne ZD, Jack R, Gray ZT, et al. Increased levels of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with improved recurrence-free survival in stage 1A non-small-cell lung cancer. *The Journal of surgical research*. 2011;171(1):1-5. <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0022480411003040>. doi: 10.1016/j.jss.2011.03.068.
70. Gachechiladze M, Škarda J, Skanderová D, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and their association with PD-L1 expression and DNA repair protein RAD51 in patients with resected non-small cell lung carcinoma. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2020;147:30-38. <https://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.06.025>. doi: 10.1016/j.lungcan.2020.06.025.
71. Boscolo A, Fortarezza F, Lunardi F, et al. Combined immunoscore for prognostic stratification of early stage non-small-cell lung cancer. *Frontiers in oncology*.



2020;10:564915. <https://search.proquest.com/docview/2452093226>. doi:  
10.3389/fonc.2020.564915.

72. Schalper K, Brown J, Carvajal-Hausdorf D, et al. Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015;107(3):1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25650315>. doi: 10.1093/jnci/dju435.

73. Donnem T, Al-Shibli K, Andersen S, et al. Combination of low vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)/VEGF receptor 2 expression and high lymphocyte infiltration is a strong and independent favorable prognostic factor in patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2010;116(18):4318-4325. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20549821>. doi: 10.1002/cncr.25333.

74. Kadota K, Nitadori J, Adusumilli PS. Prognostic value of the immune microenvironment in lung adenocarcinoma. *OncoImmunology*. 2013;2(5):e24036. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/onci.24036>. doi:  
10.4161/onci.24036.

75. Schulze AB, Evers G, Görlich D, et al. Tumor infiltrating T cells influence prognosis in stage I–III non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic disease*. 2020;12(5):1824-1842. <https://search.proquest.com/docview/2422014013>. doi: 10.21037/jtd-19-3414a.

76. Kayser G, Schulte-Uentrop L, Siene W., et al. Stromal CD4/CD25 positive T-cells are a strong and independent prognostic factor in non-small cell lung cancer patients, especially with adenocarcinomas. *Lung Cancer*. 2012;76(3):445-451.  
<https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0169500212000141>. doi:  
10.1016/j.lungcan.2012.01.004.

77. Germain C, Devi-Marulkar P, Knockaert S, et al. Tertiary lymphoid structure-B cells narrow regulatory T cells impact in lung cancer patients. *Front Immunol.* 2021;12. doi: 10.3389/fimmu.2021.626776.
78. Tang J, Ramis-Cabrer D, Curull V, et al. B cells and tertiary lymphoid structures influence survival in lung cancer patients with resectable tumors. *Cancers.* 2020;12(9):2644. <https://search.proquest.com/docview/2444386271>. doi: 10.3390/cancers12092644.
79. Patel AJ, Richter A, Drayson MT, et al. The role of B lymphocytes in the immunobiology of non-small-cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(3):325-342. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00262-019-02461-2>. doi: 10.1007/s00262-019-02461-2.
80. Bruno TC, Ebner PJ, Moore BL, et al. Antigen-presenting intratumoral B cells affect CD4(+) TIL phenotypes in non-small cell lung cancer patients. *Cancer immunology research.* 2017;5(10):898-907. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28848053>. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0075.
81. Lee HE, Luo L, Kroneman T, et al. P2.04-06 increased plasma cell % and decreased B-cells in tumor immune infiltrates are associated with worse prognosis in lung adenocarcinomas. *Journal of thoracic oncology.* 2018;13(10):S732. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.1230>. doi: 10.1016/j.jtho.2018.08.1230.
82. Kinoshita F, Takada K, Yamada Y, et al. Combined evaluation of tumor-infiltrating CD8 + and FoxP3 + Lymphocytes provides accurate prognosis in stage IA lung

- adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2019;27(6):2102-2109. <https://link.springer.com/article/10.1245/s10434-019-08029-9>. doi: 10.1245/s10434-019-08029-9.
83. Hao J, Wang H, Song L, et al. Original article infiltration of CD8 + FOXP3 + T cells, CD8 + T cells, and FOXP3 + T cells in non-small cell lung cancer microenvironment. *Int J Clin Exp Pathol*. 2020;13(5):880.
84. Mauri C. Novel frontiers in regulatory B cells. *Immunological reviews*. 2021;299(1):5-9. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/imr.12964>. doi: 10.1111/imr.12964
85. Catalán D, Mansilla MA, Ferrier A, et al. Immunosuppressive mechanisms of regulatory B cells. *Front Immunol*. 2021;12. doi: 10.3389/fimmu.2021.611795.
86. Sarvaria A, Madrigal JA, Saudemont A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cellular & molecular immunology*. 2017;14(8):662-674. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28626234>. doi: 10.1038/cmi.2017.35.
87. Stankovic B, Bjørhovde HAK, Skarshaug R, et al. Immune cell composition in human non-small cell lung cancer. *Front Immunol*. 2019;9. doi: 10.3389/fimmu.2018.03101.
88. Creelan BC, Wang C, Teer JK, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte treatment for anti-PD-1-resistant metastatic lung cancer: A phase 1 trial. *Nature medicine*. 2021;27(8):1410-1418. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34385708>. doi: 10.1038/s41591-021-01462-y.

89. Long GV, Hauschild A, Santinami M, et al. Adjuvant dabrafenib plus trametinib in stage III BRAF-mutated melanoma. *The New England Journal of Medicine*. 2017;377(19):1813-1823. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28891408>. doi: 10.1056/NEJMoa1708539.
90. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nature reviews. Immunology*. 2002;2(2):116-126. <http://dx.doi.org/10.1038/nri727>. doi: 10.1038/nri727.
91. Koboldt D, Steinberg K, Larson D, et al. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*. 2013;155(1):27-38. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867413011410>. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.006.
92. Moraes F, Góes A. A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2016;44(3):215-223. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bmb.20952>. doi: 10.1002/bmb.20952.
93. Cantley LC, Engelman JA, Luo J. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7(8):606-619. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1879>. doi: 10.1038/nrg1879.
94. Na K, Kim EK, Jang W, et al. Mutations in ovarian microcystic stromal tumors: Identification of a novel deletion mutation and the use of pyrosequencing to identify reported point mutation. *Anticancer research*. 2017;37(6):3249. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28551672>.
95. Rebouissou S, Franconi A, Calderaro J, et al. Genotype-phenotype correlation of CTNNB1 mutations reveals different  $\beta$ -catenin activity associated with liver tumor

progression. *Hepatology*. 2016;64(6):2047-2061.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.28638>. doi: 10.1002/hep.28638.

96. Osawa M, Ichikawa O, Shimada I, et al. Structural basis of the collagen-binding mode of discoidin domain receptor 2. *The EMBO Journal*. 2007;26(18):4168-4176.

<http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601833>. doi: 10.1038/sj.emboj.7601833.

97. von Mässenhausen A, Sanders C, Brägelmann J, et al. Targeting DDR2 in head and neck squamous cell carcinoma with dasatinib. *International Journal of Cancer*.

2016;139(10):2359-2369. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.30279>. doi: 10.1002/ijc.30279.

98. Kim D, Lee DH, Han J, et al. Safety, tolerability, and anti-tumor activity of olmutinib in non-small cell lung cancer with T790M mutation: A single arm, open label, phase 1/2 trial. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2019;135:66-

72. <https://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.07.007>. doi: 10.1016/j.lungcan.2019.07.007.

99. Helsten T, Elkin S, Arthur E, et al. The FGFR landscape in cancer: Analysis of 4,853 tumors by next-generation sequencing. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(1):259-267.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26373574>. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3212.

100. Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*. 2014;79:34-74.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661813001771>. doi: 10.1016/j.phrs.2013.11.002.

101. Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME, et al. HER2 amplification: A potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-

site EGFR T790M mutation. *Cancer Discovery*. 2012;2(10):922-933.

<https://www.openaire.eu/search/publication?articleId=od267::67572b0e9b6548644a3b92abc30bcd34>. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0108.

102. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *The New England Journal of Medicine*.

2005;353(16):1673-1684. <http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/353/16/1673>. doi: 10.1056/NEJMoa052122.

103. Bartley AN, Washington MK, Colasacco C, et al. HER2 testing and clinical decision making in gastroesophageal adenocarcinoma: Guideline from the college of american pathologists, american society for clinical pathology, and the american society of clinical oncology. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017;35(4):446-464. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28129524>. doi:

10.1200/JCO.2016.69.4836.

104. Cappuzzo F, Bemis L, Varella-Garcia M. HER2 mutation and response to trastuzumab therapy in non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*.

2006;354(24):2619-2621. <http://content.nejm.org/cgi/content/extract/354/24/2619>. doi: 10.1056/NEJMc060020.

105. Prior IA, Lewis, Mattos C. A comprehensive survey of ras mutations in cancer. *Cancer Research*. 2012;72(10):2457-2467. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22589270>. doi:

10.1158/0008-5472.CAN-11-2612.

106. Kosaka T, Yatabe Y, Endo H, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with Non-Small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(19):5764-5769.

<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/12/19/5764.abstract>. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0714.

107. Westover KD, Janne PA, Gray NS. Progress on covalent inhibition of KRASG12C. *Cancer Discovery*. 2016;6(3):233-234. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0092.

108. Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, et al. KRASG12C inhibition with sotorasib in advanced solid tumors. *The New England journal of medicine*. 2020;383(13):1207-1217. <https://nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1917239>. doi: 10.1056/NEJMoa1917239.

109. Jiao D, Yang S. Overcoming resistance to drugs targeting KRAS mutation. *Innovation (New York, NY)*. 2020;1(2):100035. doi: 10.1016/j.xinn.2020.100035.

110. Misale S, Fatherree JP, Cortez E, et al. KRAS G12C NSCLC models are sensitive to direct targeting of KRAS in combination with PI3K inhibition. *Clin Cancer Res*. 2018;25(2):796. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-18-0368.

111. Leung GP, Feng T, Sigoillot F, et al. Hyperactivation of MAPK Signaling is Deleterious to RAS/RAF Mutant Melanoma. *Mol Cancer Res*. 2018;10 doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0327

112. Lawrence RE, Salgia R. MET molecular mechanisms and therapies in lung cancer. *Cell Adhesion & Migration*. 2010;4(1):146-152.

<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.4.1.10973>. doi: 10.4161/cam.4.1.10973.

113. Ma PC, Tretiakova MS, MacKinnon AC, et al. Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2008;47(12):1025-1037.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/gcc.20604>. doi: 10.1002/gcc.20604.

114. Workman P, Clarke PA, Raynaud FI, et al. Drugging the PI3 kinome: From chemical tools to drugs in the clinic. *Cancer research*. 2010;70(6):2146-2157.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179189>. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4355.
115. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(22):13375-13378. <http://www.jbc.org/content/273/22/13375.abstract>.  
doi: 10.1074/jbc.273.22.13375.
116. Fedele C, Ran H, Diskin B, et al. SHP2 inhibition prevents adaptive resistance to MEK inhibitors in multiple cancer models. *Cancer discovery*. 2018;8(10):1237-1249.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30045908>. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0444.
117. T Soussi, Wiman KG. TP53: An oncogene in disguise. *Cell Death and Differentiation*. 2015;22(8):1239-1249. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26024390>. doi:  
10.1038/cdd.2015.53.
118. Peifer M, Fernandez-Cuesta L, Sos ML, et al. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nature Genetics*. 2012;44(10):+.  
<https://www.narcis.nl/publication/RecordID/oai:pure.rug.nl:publications%2Fd0c79596-91b4-48b4-8c23-ef33eaa59e3b>.
119. Hammel P, Leroy-Viard K, Chaumette M, et al. Correlations between p53-protein accumulation, serum antibodies and gene mutation in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*. 1999;81(5):712-718. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990531\)81:53.0.CO;2-0](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1097-0215(19990531)81:53.0.CO;2-0). doi: AID-IJC7>3.0.CO;2-0.
120. Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Temple J, et al. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *The Journal of Pathology*.



2010;221(1):49-56. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/path.2696>. doi:  
10.1002/path.2696.

121. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell Non–Small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2015;373(2):123-135. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26028407>. doi:  
10.1056/NEJMoa1504627.

122. Heinzl S. Was ist neu in diagnostik und therapie? *Pneumo News*. 2010;4(3):46-48. doi:  
10.1007/BF03364258.

123. Dempke WCM, Fenchel K, Dale SP. Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) as a biomarker for non-small cell lung cancer (NSCLC) treatment-are we barking up the wrong tree? *Translational lung cancer research*. 2018;7(Suppl 3):S275.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30393621>.

124. Rizvi NA, Hellmann, Snyder A, et al. Cancer immunology. mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science (New York, N.Y.)*. 2015;348(6230):124. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25765070>.

125. Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: An update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56(5):739-745. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195077>. doi:  
10.1007/s00262-006-0272-1.

126. Forde PM, Chaft JE, Smith KN, et al. Neoadjuvant PD-1 blockade in resectable lung cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2018;378(21):1976-1986. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1716078>. doi: 10.1056/NEJMoa1716078.

127. Varn FS, Wang Y, Cheng C. A B cell-derived gene expression signature associates with an immunologically active tumor microenvironment and response to immune checkpoint blockade therapy. *OncoImmunology*. 2018;8(1). doi: 10.1080/2162402x.2018.1513440.

128. Germain C, Gnjjatic S, Tamzalit F, et al. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;189(7):832-844.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24484236>. doi: 10.1164/rccm.201309-1611OC.

129. Dieu-Nosjean M-C, Antoine M, Danel D, et al. Long-term survival for patients with Non-Small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(27):4410-4417. <http://jco.ascopubs.org/content/26/27/4410.abstract>. doi: 10.1200/JCO.2007.15.0284.

130. Lohr M, Edlund K, Botling J, et al. The prognostic relevance of tumour-infiltrating plasma cells and immunoglobulin kappa C indicates an important role of the humoral immune response in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*. 2013;333(2):222.  
<http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-181908>.

131. Al-Shibli K, Al-Saad S, Andersen S, et al. The prognostic value of intraepithelial and stromal CD3-, CD117- and CD138-positive cells in non-small cell lung carcinoma. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2010;118(5):371.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20477813>. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02609.x.

132. Fujimoto M, Yoshizawa A, Sumiyoshi S, et al. Stromal plasma cells expressing immunoglobulin G4 subclass in non-small cell lung cancer. *Human pathology*. 2013;44(8):1569-1576.

<https://www.openaire.eu/search/publication?articleId=jairo::276257583d923f0ca046117e8abe77b3>.

133. Mion F, Tonon S, Valeri V, et al. Message in a bottle from the tumor microenvironment: Tumor-educated DCs instruct B cells to participate in immunosuppression. *Cellular & molecular immunology*. 2017;14(9):730-

732. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28757609>. doi: 10.1038/cmi.2017.63.

134. Sage PT, Francisco LM, Carman CV, et al. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nature Immunology*. 2013;14(2):152-161.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242415>. doi: 10.1038/ni.2496.

135. Shlomchik MJ, Szumilas CG, Good-Jacobson KL, et al. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nature Immunology*. 2010;11(6):535-542. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1877>. doi: 10.1038/ni.1877.

136. Li S, Li L, Zhu Y, et al. Coexistence of EGFR with KRAS, or BRAF, or PIK3CA somatic mutations in lung cancer: A comprehensive mutation profiling from 5125 chinese cohorts. *The British Journal of Cancer*. 2014;110(11):2812-2820.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24743704>. doi: 10.1038/bjc.2014.210.

137. Chong CR, Pasi AJ. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nature Medicine*. 2013;19(11):1389-1400.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24202392>. doi: 10.1038/nm.3388.

138. Schuette W, Schirmacher P, Eberhardt WEE, et al. EGFR mutation status and first-line treatment in patients with stage III/IV non-small cell lung cancer in germany: An observational study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of*

*Preventive Oncology*. 2015;24(8):1254-1261.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26070531>. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-1149.

139. Schildgen V, Lüsebrink J, Schildgen O, et al.. Epidemiology of driver mutations in lung cancer in a german tertiary hospital in patients with testing indication. *Personalized Medicine*. 2016;13(4):315-323. <http://dx.doi.org/10.2217/pme.16.2>. doi: 10.2217/pme.16.2.

140. Tufman A, Kahnert K, Duell T, et al. Frequency and clinical relevance of EGFR mutations and EML4-ALK translocations in octogenarians with non-small cell lung cancer. *OncoTargets and therapy*. 2017;10:5179-5186.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29123416>. doi: 10.2147/OTT.S140472.

141. Faehling M, Schwenk B, Kramberg S, et al. Oncogenic driver mutations, treatment, and EGFR-TKI resistance in a caucasian population with non-small cell lung cancer: Survival in clinical practice. *Oncotarget*. 2017;8(44):77897-77914.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29100434>. doi: 10.18632/oncotarget.20857.

142. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA*. 2014;311(19):1998-2006.

<http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.3741>. doi: 10.1001/jama.2014.3741.

143. Yang Y, Meng Y, Zhang H, et al. Detection of EGFR and BRAF mutations by competitive allele-specific TaqMan polymerase chain reaction in lung adenocarcinoma.

*Oncology letters*. 2018;15(3):3295-3304. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29467863>. doi: 10.3892/ol.2017.7652.

144. Tseng C, Chiang C, Tseng J, et al. EGFR mutation, smoking, and gender in advanced lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(58):98384-

98393. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29228697>. doi: 10.18632/oncotarget.21842.

145. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: Results of a 1-year nationwide programme of the french cooperative thoracic intergroup (IFCT). *Lancet, The*. 2016;387(10026):1415-1426. <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0140673616000040>. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00004-0.
146. Friedlaender A, Drilon A, Weiss GJ, et al. KRAS as a druggable target in NSCLC: Rising like a phoenix after decades of development failures. *Cancer treatment reviews*. 2020;85:101978. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.101978>. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.101978.
147. Zheng D, Wang R, Zhang Y, et al. The prevalence and prognostic significance of KRAS mutation subtypes in lung adenocarcinomas from chinese populations. *Oncotargets and therapy*. 2016;9:833-843. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26955281>. doi: 10.2147/OTT.S96834.
148. Dogan S, Shen R, Ang DC, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3026 lung adenocarcinomas: Higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. . 2012. [https://www.openaire.eu/search/publication?articleId=od\\_\\_\\_\\_\\_267::f3f107309bba787f7f78ac47f7d6531d](https://www.openaire.eu/search/publication?articleId=od_____267::f3f107309bba787f7f78ac47f7d6531d). doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3265.
149. Marabese M, Ganzinelli M, Garassino MC, et al. KRAS mutations affect prognosis of non-small-cell lung cancer patients treated with first-line platinum containing chemotherapy. *Oncotarget*. 2015;6(32):34014-34022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26416458>.
150. Fan G, Zhang K, Ding J, et al. Prognostic value of EGFR and KRAS in circulating tumor DNA in patients with advanced non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-

analysis. *Oncotarget*. 2017;8(20):33922-33932.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28430611>. doi: 10.18632/oncotarget.15412.

151. Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS medicine*. 2005;2(1):e17.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15696205>. doi: 10.1371/journal.pmed.0020017.

152. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with Non-Small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(25):5900-5909.

<http://jco.ascopubs.org/content/23/25/5900.abstract>. doi: 10.1200/JCO.2005.02.857.

153. Ihle NT, Byers LA, Kim ES, et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: Implications for signaling and clinical outcome. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(3):228-239. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247021>. doi: 10.1093/jnci/djr523.

154. Jänne PA, Smith I, Mcwalter G, et al. Impact of KRAS codon subtypes from a randomised phase II trial of selumetinib plus docetaxel in KRAS mutant advanced non-small-cell lung cancer. *The British Journal of Cancer*. 2015;113(2):199-203.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26125448>. doi: 10.1038/bjc.2015.215.

155. Shackelford RE, Ansari JM, Wei EX, et al. Anaplastic lymphoma kinase rearrangements in non-small-cell lung cancer: Novel applications in diagnostics and treatment.

*Pharmacogenomics*. 2017;18(12):1179-1192. <http://dx.doi.org/10.2217/pgs-2017-0098>. doi: 10.2217/pgs-2017-0098.

156. Tanaka K, Hida T, Oya Y, et al. Unique prevalence of oncogenic genetic alterations in young patients with lung adenocarcinoma. *Cancer*. 2017;123(10):1731-1740.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cncr.30539>. doi: 10.1002/cncr.30539.

157. Paul K. Paik, ME. Arcila, MF, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *Journal of Clinical Oncology*.

2011;29(15):2046. <http://jco.ascopubs.org/content/29/15/2046.abstract>. doi:

10.1200/JCO.2010.33.1280.

158. Planchard D, Kim TM, Mazieres J, et al. Dabrafenib in BRAF V600E–Mutant advanced non-small cell lung cancer: An open-label, single arm, multicenter, phase 2 trial. . 2016.

[https://www.openaire.eu/search/publication?articleId=od\\_\\_\\_\\_\\_267::3858accf0d10519e6da55cbffdd85fc6](https://www.openaire.eu/search/publication?articleId=od_____267::3858accf0d10519e6da55cbffdd85fc6). doi: 10.1016/S1470-2045(16)00077-2.

159. Zink P, Falk M, Schatz S, et al. Analysis of the tumor microenvironment and tumor genotype through different stages of lung adenocarcinoma, *Annals of Oncology* (2019)

[https://oncologypro.esmo.org/meeting-resources/esmo-2019-congress/Analysis-of-the-tumor-microenvironment-and-tumor-genotype-through-different-stages-of-lung-adenocarcinoma30\(suppl\\_5\):v602-v660](https://oncologypro.esmo.org/meeting-resources/esmo-2019-congress/Analysis-of-the-tumor-microenvironment-and-tumor-genotype-through-different-stages-of-lung-adenocarcinoma30(suppl_5):v602-v660). 10.1093/annonc/mdz260

160. Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, et al. Adjuvant pembrolizumab versus placebo in resected stage III melanoma. *The New England Journal of Medicine*.

2018;378(19):1789-1801. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoal802357>. doi:

10.1056/NEJMoal802357.

## **VI) Eidstattliche Erklärung:**

Hiermit versichere ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und sämtliche, für Sinn und Inhalt der Arbeit, relevante Quellen und Hilfsmittel angegeben zu haben.

Diese Arbeit war in der vorliegenden Fassung nie Bestandteil einer anderen Studien- oder Prüfungsleistung gewesen.

-----

Unterschrift Doktorand

## **VII) Danksagung:**

Ich möchte abschließend allen Personen danken, welche mich bei der Anfertigung der Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Griesinger für die Bereitstellung des Themas, seinen fachlichen Rat sowie Beratung hinsichtlich ethischer Fragen und Studiendesign.

Ebenfalls besonderer Dank gilt Herrn Prof. h.c. Dr. Markus Tiemann für die Bereitstellung der Studienmaterialien, seines Institutes, seinem hohen Zeitinvestment, seiner motivierenden Art sowie seinem fachlichen Rat.

Ich danke insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Markus Falk und Frau Stefanie Schatz für ihre Hilfe bei der Auswertung der NGS-Daten, ihrer ständigen Erreichbarkeit und großen Einsatz hinsichtlich Kongressplanung, statistischer Beratung und Studiendesign.

Großer Dank gebührt den Mitarbeitern des hämatopathologischen Institutes Hamburg für ihre ständige Hilfsbereitschaft, hohe Motivation und stets freundlichen Umgang.

Hierbei waren insbesondere zu nennen:



Den Sekretärinnen Frau Petra Preus, Nadine Haas und Frau Korthas für ihre organisatorische, sowie mit ihrer offenen und hilfsbereiten Art, auch soziale Unterstützung für alle Doktoranden.

Zudem gilt großer Dank den Mitarbeitern des Archivs des HPH für ihre logistische und beratende Unterstützung sowie den medizinisch-technischen Assistenten für die Anfertigung aller Schnitte und Mutationsanalysen. Hinzu kam ihre beratende Funktion hinsichtlich der Materialien und Methoden.