

Diplomarbeit

**MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG VON
PATIENT/INNEN MIT OPERABLEM
ADENOKARZINOM DER LUNGE**

eingereicht von

Aaron Nadig

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinik für Innere Medizin

unter Anleitung von Betreuer/innen

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. et scient. med. Marija Balic

Dr. med. univ. et scient. med. Iva Brcic

Datum: 15.12.2018

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Köln, am 15.12.2018

Aaron Nadig eh

ZUSAMMENFASSUNG

Die Identifizierung von zielgerichteten Mutationen beim Adenokarzinom der Lunge ist Teil der Routinediagnostik und Voraussetzung für eine adäquate Entscheidung über die systemische Therapie. Am Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz wird die molekulare Charakterisierung bei allen Patienten mit der Diagnose Adenokarzinom der Lunge durchgeführt. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Quantität und Art der identifizierten Mutationen (EGFR, ALK, KRAS, BRAF und ROS1) bei primär resezierten Adenokarzinomen der Lunge, die an der Abteilung für Thoraxchirurgie LKH Graz operiert wurden, zu analysieren. Darüber hinaus wurde der Zusammenhang zwischen Mutationsstatus und klinischen Parametern untersucht.

In diese Studie wurden Patienten einbezogen, die mit einem Adenokarzinom der Lunge in einem operativen Stadium diagnostiziert und in einem Zeitraum zwischen Juni 2013 und Mai 2016 operiert wurden. Klinische Daten der Patienten wurden aus dem Medocs-System extrahiert. Die molekularen Analysen wurden mittels PCR und NGS durchgeführt. Die statistischen Analysen wurden mit SPSS angefertigt.

Im oben genannten Zeitraum wurde eine Kohorte von 77 Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge, für die genügend klinische Daten ermittelt werden konnten, reseziert. Unter diesen getesteten Tumoren zeigten sich 11,3% positiv für eine EGFR-Mutation. Die Mutation trat vermehrt bei Frauen und Nichtrauchern/Nichtraucherinnen auf (18,9% bzw. 31,25%). Eine ALK-Mutation wurde in 8,1% beobachtet und trat häufiger bei jüngeren Patienten/Patientinnen auf. Mutationen im KRAS-Gen wurden bei 28,6% der Adenokarzinome festgestellt. Dies betreffend waren 39,3% der Raucher/Raucherinnen betroffen. BRAF-Mutationen fanden sich auch vor allem bei Rauchern/Raucherinnen und ehemaligen Rauchern/Raucherinnen (insgesamt 9,5% der untersuchten Tumore). In keiner Tumorgewebsprobe unserer Kohorte konnte eine ROS1-Mutation nachgewiesen werden.

Insgesamt entsprach die Häufigkeit der nachgewiesenen Mutationen und die Prävalenz spezifischer genetischer Mutationen bei Adenokarzinomen der Lunge den bereits veröffentlichten Daten.

ABSTRACT

Identification of targetable mutations in lung adenocarcinoma is a part of the routine diagnostic procedures and a prerequisite for the adequate decision about systemic therapy. At the Institute of Pathology Medical University of Graz molecular characterization is performed in all patients diagnosed with lung adenocarcinoma. The aim of the present study was to analyze the number and kind of identified mutations (EGFR, ALK, KRAS, BRAF and ROS1), in primary resected lung adenocarcinoma who underwent surgery at Department of thoracic surgery LKH Graz. Furthermore, correlation of the mutation status and clinical parameters was investigated.

Patients diagnosed with lung adenocarcinoma in an operable stage in whom the surgery was performed in a period between June 2013 and May 2016, were included in this study. Clinical data were extracted from Medocs-System. Molecular analyses were performed by PCR and NGS. Statistical analyses were performed with SPSS.

In the above-mentioned period, a cohort of 77 lung adenocarcinoma patients were resected for whom adequate clinical data were identified. Among these, 11.3% were positive for an EGFR mutation. The mutation occurred more common in women and non-smokers (18.9% and 31.25%, respectively). An ALK mutation was observed in 8.1% of the cohort and occurred more frequently in younger patients. Changes in the KRAS gene were detected in 28.6% of adenocarcinomas, with 39.3% of smokers affected. BRAF mutations were also found mainly in smokers and former smokers (a total of 9.5% of the tumours examined). No ROS1 alteration could be detected in any tumor tissue sample in our patient cohort.

Overall, the frequency of detected mutations and the prevalence of specific genetic mutations in lung adenocarcinoma were in accordance with published data.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	2
Abstract	3
Glossar und Abkürzungen	6
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	9
1 Einleitung	10
1.1 <i>Das Lungenkarzinom</i>	11
1.1.2 Morphologie und Klassifizierung.....	13
1.1.2.1 Klinik.....	20
1.1.3 Risikofaktoren.....	20
1.1.3.1 Tabakrauch-assoziierte Risikofaktoren.....	20
1.1.3.2 Nicht Tabakrauch-assoziierte Risikofaktoren.....	21
1.2 <i>Das operable Adenokarzinom der Lunge</i>	23
1.2.1 Möglichkeiten der therapeutischen Intervention.....	23
1.2.1.1 Wann ist ein Karzinom der Lunge operabel?.....	23
1.3 <i>Genetische Variationen in Tumorzellen</i>	25
1.3.1 EGFR.....	25
1.3.2 ALK.....	26
1.3.3 ROS1.....	27
1.3.4 KRAS.....	28
1.3.5 BRAF.....	28
1.3.6 Genetische Variationen in Plattenepithelkarzinomen der Lunge.....	29
2 Material und Methoden	30
2.1 <i>Studiendesign</i>	30
2.2 <i>Datenerhebung</i>	30
2.3 <i>Mutationsanalyse</i>	31
2.3.1 ALK-Analyse.....	32

2.3.2	ROS1-Analyse.....	33
2.3.3	EGFR-Analyse (Pyrosequenzierung).....	34
2.3.4	EGFR-Analyse (NGS) (inklusive BRAF, KRAS).....	35
3	Ergebnisse.....	37
3.1	<i>Allgemeine Informationen.....</i>	37
3.2	<i>Therapeutische Intervention.....</i>	42
3.3	<i>Tumoreigenschaften.....</i>	44
3.3.2	Tumorstadien.....	44
3.3.3	Tumorlokalisation.....	45
3.4	<i>Krankheitsverlauf.....</i>	45
3.4.1	Metastasen.....	46
3.5	<i>Molekulare Charakterisierung.....</i>	47
3.5.1	EGFR-Status.....	48
3.5.2	ALK-Status.....	51
3.5.3	KRAS-Status.....	53
3.5.4	BRAF-Status.....	56
3.5.5	ROS1-Status.....	58
4	Diskussion.....	59
5	Fazit.....	63
	Literaturverzeichnis.....	64

GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN

EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene
BRAF	B-Isoform der Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
ROS1	C-Ros Oncogene 1
WHO	Weltgesundheitsorganisation
EU	Europäische Union
NET	neuroendokrine Tumore der Lunge
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom
NOS	ohne weitere Spezifikation
AIS	Adenocarcinoma in situ
MIA	minimal invasives Adenokarzinom
TNM	Tumor Nodus Metastasen
ETS	Environmental Tobacco Smoke
EPA	US Environmental Protection Agency
Er α	Estrogen Receptor Alpha
CT	Computertomographie
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie- Computertomographie
VATS	video-assisted thorascopic surgery
VCS	Vena-cava-superior-Syndrom
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
CML	chronisch myeloische Leukämie

ALL	akuter lymphatische Leukämie
RAS-Gen	Rat Sarcoma Gen
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor-1
DDR2	Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 2
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
LKH	Landeskrankenhaus
NGS	Next Generation Sequencing

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Adenokarzinom der Lunge mit prädominant papillärem Wachstumsmuster.....	13
Abbildung 2: Plattenepithelkarzinom mit Keratinisierung im Zentrum der Darstellung.....	14
Abbildung 3: Großzelliges Karzinom ohne morphologische oder immunohistochemische Zeichen von Differenzierung.....	15
Abbildung 4: Großzelliges Karzinom mit typischem neuroendokrinem Wachstumsmuster und zentraler Nekrose in Tumorzellaggregaten.....	15
Abbildung 5: Kleinzelliges Karzinom bei typischer histologischer Präsentation mit „Crushing“-Artefakt und Nekrose.....	16
Abbildung 6: Die Proteinstruktur der EML4-ALK Fusionkinase. (Aus: Mano H. The EML4-ALK oncogene: targeting an essential growth driver in human cancer. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2015;91(5):193-201.).....	27
Abbildung 7: Adenokarzinom der Lunge mit immunohistochemisch positiven Merkmalen einer ALK-Mutation.....	32
Abbildung 8: Kleines Fragment eines Adenokarzinoms der Lunge mit ROS1-positiven Merkmalen in der immunohistochemischen Untersuchung.....	34
Abbildung 9: PyroMark Q24 Work-Station zur Aufreinigung von DNA Einzelsträngen.....	35
Abbildung 10: Der in dieser Studie verwendete NGS-Sequencer - IonTorrent Proton™ Sequencer..	36
Abbildung 11: Boxplot der Altersverteilung der Patienten/Patientinnen unserer Studie nach Geschlecht.....	38
Abbildung 12: Relevante Begleitdiagnosen unserer Patienten/Patientinnen neben der Diagnose Adenokarzinom der Lunge.....	39
Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der Raucherstatus unserer Kohorte nach Rauchern/Raucherinnen, ehemaligen Rauchern/Raucherinnen, Niemalsrauchern/Niemalsraucherinnen und Patienten mit unbekanntem Raucherstatus (n=77)	41
Abbildung 14: Boxplot der Packyears von Rauchern/Raucherinnen bzw. ehemaligen Rauchern/Raucherinnen unserer Studie (n=37).....	42
Abbildung 15: Häufigkeit der zusätzlichen Chemotherapie (neoadjuvant, adjuvant und palliativ) neben der operativen Therapie unserer Adenokarzinome.....	43
Abbildung 16: Darstellung der Häufigkeit der verschiedenen Tumorstadien von Adenokarzinomen der Lunge unserer Kohorte (Stadium I bis Stadium IV) (n=77).....	45
Abbildung 17: Häufigkeitsdarstellung von positivem bzw. negativem KRAS-Status unter Rauchern/Raucherinnen bzw. ehemaligen Rauchern/Raucherinnen unserer Kohorte (n=28).....	54
Abbildung 18: Häufigkeitsdarstellung von positivem bzw. negativem KRAS-Status unter Niemalsrauchern/Niemalsraucherinnen unserer Kohorte (n=14).....	54

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Entwicklung der Mortalität von Lungenkrebs in Österreich von 1975 bis 2007 (nach (6))...	12
Tabelle 2: TNM Tumorklassifizierung von Lungentumoren (nach (8)).....	17
Tabelle 3: Tumorklassifizierung von Lungentumoren (nach (8)).....	19
Tabelle 4: Mittleres Alter (plus Median, Maximum und Minimum) unserer Patientengruppe nach Geschlecht (n=77).....	37
Tabelle 5: Relevante Begleitdiagnosen unserer Patienten/Patientinnen neben der Diagnose Adenokarzinom der Lunge.....	39
Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der Raucherstatus unserer Kohorte nach Rauchern/Raucherinnen, ehemaligen Rauchern/Raucherinnen und Niemalsrauchern/Niemalsraucherinnen (n=77).....	40
Tabelle 7: Verwendete Therapeutika bei möglicher durchgeführter Chemotherapie im Therapieverlauf unserer Patienten/Patientinnen.....	43
Tabelle 8: Häufigkeit der verschiedenen Tumorstadien von Adenokarzinomen der Lunge unserer Kohorte (Stadium I bis Stadium IV) (n=77).....	44
Tabelle 9: Lokalisation der Tumore unserer Patienten/Patientinnen in der Lunge.....	45
Tabelle 10: Häufigkeit von lokalen- bzw. Lymphknotenmetastasen im Rahmen der Tumorerkrankung unserer Patienten/Patientinnen.....	46
Tabelle 11: Häufigkeit und Lokalisation von Fernmetastasen im Rahmen der Tumorerkrankung unserer Patienten/Patientinnen.....	46
Tabelle 12: Häufigkeit von positivem bzw. negativem Mutationsstatus der zu untersuchenden Gene innerhalb unserer Kohorte (n=77).....	48
Tabelle 13: Lokalisation der Mutationen unserer EGFR-positiven Adenokarzinome in den unterschiedlichen Exonen des EGFR-Gens (n=8).....	49
Tabelle 14: Zusammenhang zwischen EGFR-Status und pathologischen Parametern unserer Patienten/Patientinnen (n=71).....	50
Tabelle 15: Zusammenhang zwischen ALK-Status und pathologischen Parametern unserer Patienten/Patientinnen (n=74).....	52
Tabelle 16: Zusammenhang zwischen KRAS-Status und pathologischen Parametern unserer Patienten/Patientinnen (n=42).....	55
Tabelle 17: Zusammenhang zwischen BRAF-Status und pathologischen Parametern unserer Patienten/Patientinnen (n=42).....	57

1 EINLEITUNG

Das Thema „Rauchen“ spielt in unserer Gesellschaft nach wie vor eine große Rolle. Durch langwierige Tradition und einer Vielzahl von Rollenbildern, die teilweise den Griff zur Zigarette verherrlichen, ist ein komplettes Verbannen der Droge noch lange nicht in Sicht. Im intereuropäischen Vergleich lässt sich eine Anpassung der Raucherschutzgesetze beobachten. In den meisten Ländern darf mittlerweile in Schulen, öffentlichen Einrichtungen und am Arbeitsplatz nicht mehr geraucht werden, während Regelungen für den Gaststättenbereich eher unterschiedlich gehandhabt werden.

In Österreich steht das für ab Mitte 2018 vorgesehene Rauchverbot in der Gastronomie durch den kürzlich erfolgten Regierungswechsel auf der Kippe. Es wird sich zeigen, ob durch eine erneute Gesetzesnovellierung das Land weiterhin dem Ruf des „Raucherparadieses“ treu bleiben wird.

Nicht umsonst entbrennen seit vielen Jahren weltweit Diskussionen um den Tabakkonsum. Rauchen macht psychisch und physisch süchtig, und der regelmäßige Gebrauch wird mit dem Entstehen von Lungenkarzinomen in Verbindung gebracht. Auch die Medizinische Universität Graz war diesbezüglich aktiv, und hat die „Don't smoke“ Kampagne unter Anleitung vom jetzigen Rektor Prof. Samonigg gestaltet und war führend beteiligt.

Doch nicht nur das „Rauchen“ ist ein Indikator für die Entstehung von Lungenkarzinomen. Auch andere Faktoren können dazu beitragen, dass sich ein Tumor in der Lunge eines Menschen bildet. Grund dafür sind Mutationen, die das Gewebe entarten lassen. Einige dieser bekannten Mutationen sollen nun in dieser Arbeit im Umfang einer retrospektiven Studie aufgearbeitet und mit bestehender Literatur zu diesem Thema verglichen werden. Im Vordergrund stehen hier Mutationen in den zugehörigen Genabschnitten des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), der Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK), des Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene (KRAS), der B-Isoform der Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (BRAF), sowie des C-Ros Oncogene 1 (ROS1). Besonders soll im Folgenden der Zusammenhang zwischen einem Auftreten dieser Mutationen mit bekannten Parametern, wie z. B. dem Raucherstatus oder dem Geschlecht analysiert werden, um im besten Fall Risikofaktoren aufgrund spezieller Charakteristika für die einzelnen Mutationen definieren zu können.

1.1 Das Lungenkarzinom

1.1.1 EPIDEMIOLOGIE

Lungenkrebs hat sich seit den 1930er Jahren von einer seltenen Krankheit zu einem weltweiten Problem entwickelt (1). Im Jahre 2012 starben rund 1,6 Millionen Menschen (hiervon zirka 1,1 Millionen Männer (69%) und 500.000 Frauen (31%)) weltweit an den Folgen des Lungenkarzinoms (2).

Obwohl die Zahl der Lungenkrebspatienten/Lungenkrebspatientinnen in den westlichen Ländern in den letzten Jahrzehnten rückläufig war, stieg der Anteil in Entwicklungsländern in den letzten zwei Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts von rund 30% auf 50% an. Dies ist vor allem auf einen erhöhten Tabakkonsum in den betroffenen Ländern zurückzuführen (3). Ebenfalls lässt sich in großen Städten und Industrieregionen ein erhöhtes Auftreten von Lungenkrebs beobachten, welches sich jedoch nicht primär an der vermehrten Luftverschmutzung, sondern viel mehr am erhöhten Tabakkonsum in diesen Regionen, sowie der vermehrten beruflichen Exposition mit kanzerogenen Stoffen festmachen lässt (4).

Mit 354.000 Todesfällen (laut Weltgesundheitsorganisation (WHO)) - davon 72% Männer, 28% Frauen -, die auf ein Lungenkarzinom zurückzuführen waren, belegte Europa im Jahr 2012 den 2. Rang im weltweiten Vergleich. Eine überproportionale Häufung ließ sich in den EU-Staaten nachweisen (2). Obwohl die Mortalität in der EU im Verlauf der letzten Jahre von 265.000 in 2011 zu voraussichtlich 274.000 in 2016 stieg, war diese Entwicklung nur für die weibliche Bevölkerung stimmig. Die Inzidenz stieg von 13,61 im Jahre 2011 zu 14,35 Toten pro 100.000 Menschen im Jahre 2016. Bei Männern hingegen sank die Inzidenz von Todesfällen von 38,07 auf 34,01 pro 100.000. Dieser Umstand ist auf unterschiedliche Trendentwicklungen des Tabakkonsums in den beiden Geschlechtergruppen zurückzuführen (5).

Auch der internationale Kurs in der Entwicklung der Mortalität spiegelt sich in Österreich wieder. Allgemein nahm die Mortalität, in Bezug auf maligne Neoplasien der Lunge, seit den späten 1970er Jahren bis 2007 um 13% ab. Bemerkenswert ist insbesondere die Abnahme von 36% bei den Männern und die Zunahme von 72% bei den Frauen (siehe Tabelle 1) (6).

In Österreich und in Deutschland ist der Lungenkrebs, nach Brustkrebs und dem kolorektalen Karzinom, die dritthäufigste Tumorerkrankung der Frau. Bei den Männern steht er an zweiter Stelle nach dem Prostatakarzinom (4). In Österreich

wurden 2015 4860 neuerkrankte Lungenkrebspatienten/Lungenkrebspatientinnen gemeldet. Darauf entfielen 2956 Männer und 1904 Frauen. Rund 3889 Menschen starben in Österreich an den Folgen des Lungenkrebses (Stand 2015), wobei sich wieder der bekannte Trend der geschlechterspezifischen Verteilung mit 62% männlichen und 38% weiblichen Verstorbenen zeigt (7). Betrachtet man die krebsbedingten Todesursachen im letzten Jahrzehnt, so steht bei den Männern der Lungenkrebs mit 23% an erster Stelle und bei den Frauen mit 10% an zweiter Stelle (6).

Bis 2020 ist in Deutschland ein steigender Trend der Inzidenz von Lungenkrebs vorhergesagt. Als Ursache hierfür werden vor allem die steigende Inzidenz bei Frauen, sowie die demographische Entwicklung genannt (8). Ein Maximum der Mortalität lässt sich bei Frauen wie Männern im Alter zwischen 80 und 84 Jahren beobachten (4).

Die 5-Jahres-Überlebensrate stieg in Österreich von 14,5% (in der Zeit zwischen 1997 und 2001) auf 18,6% (2007-2011) (7)

Years	Standardized mortality x 10 ⁶			Δ% (rel. 1975-1979)		
	Males	Females	Total	Males	Females	Total
1975-1979	575,7	77,8	270,8	0	0	0
1980-1984	553,8	89,3	268,6	-3,8	14,8	-0,8
1985-1989	518,7	96,3	262,6	-9,9	23,8	-3
1990-1994	494,7	106,8	263,3	-14,1	37,3	-2,8
1995-1999	450	118,9	256,4	-21,8	52,8	-5,3
2000-2004	405,3	128,9	246,5	-29,6	65,7	-9
2005-2007	366,3	133,7	235,1	-36,4	71,9	-13,2

Tabelle 1: Entwicklung der Mortalität von Lungenkrebs in Österreich von 1975 bis 2007 (nach (6))

1.1.2 MORPHOLOGIE UND KLASSIFIZIERUNG

Allgemein bezeichnet ein Lungenkarzinom einen malignen Tumor, der vom Epithel der Lunge ausgeht. Ausgangsgewebe können Bronchien, Bronchiolen und Alveolen sein (9).

Vor Zeiten der individuellen, präzisen Therapie von epithelialen Tumoren der Lunge, reichte eine Aufteilung in NSCLC und SCLC. Heutzutage ist eine exakte histologische Differenzierung notwendig, um eine weitere Charakterisierung vornehmen zu können und infolge dessen eine optimale Therapie zu ermöglichen. Hierzu werden Lungenkarzinome in Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome, neuroendokrine Tumore, großzellige Karzinome, adenosquamöse Karzinome und weitere seltene Typen unterschieden (8).

Seit 2015 werden rezidierte Adenokarzinome gemäß ihrer prädominanten histologischen Differenzierung in lepidisch, azinär, papillär, mikropapillär und solid-prädominant unterteilt. Muzinöse Adenokarzinome (charakterisiert durch eine Muzinproduktion) bilden, wie auch kolloide, fetale und enterale Adenokarzinome, eine separate Gruppe (8).

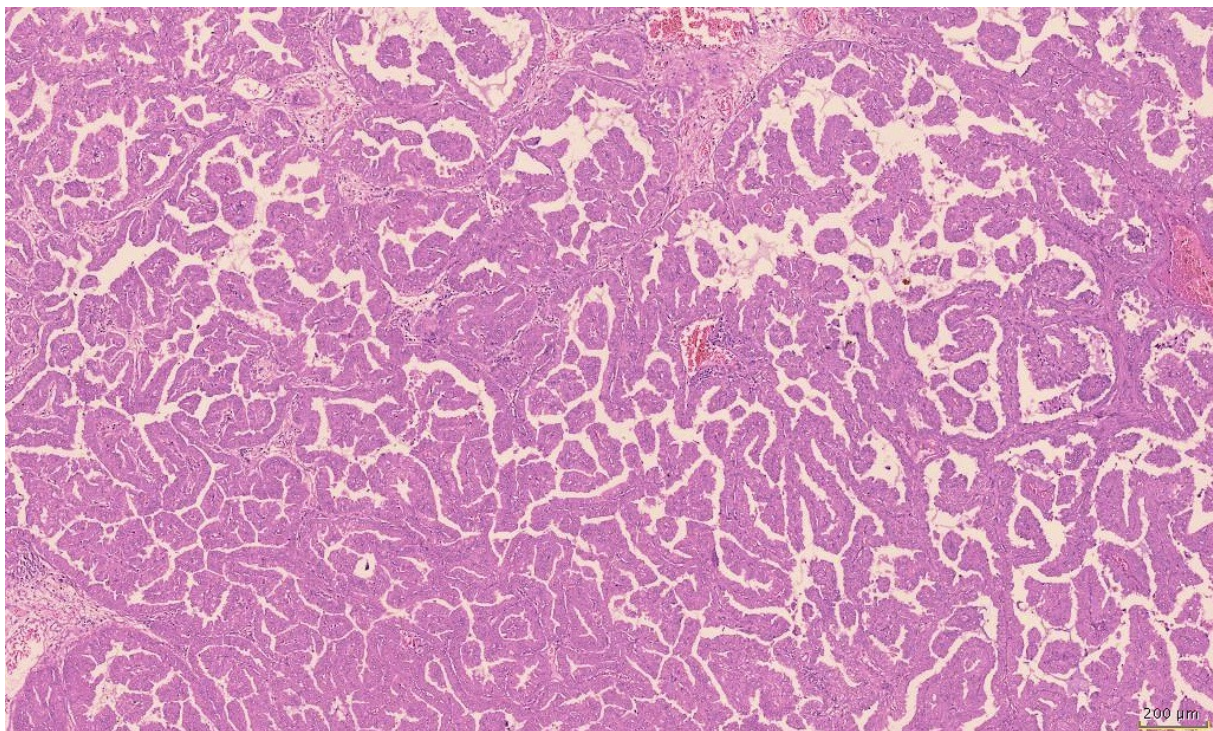


Abbildung 1: Adenokarzinom der Lunge mit prädominant papillärem Wachstumsmuster.

Das Plattenepithelkarzinom wird in verhornend und nicht-verhornend, sowie basaloides Plattenepithelkarzinom unterteilt (8).

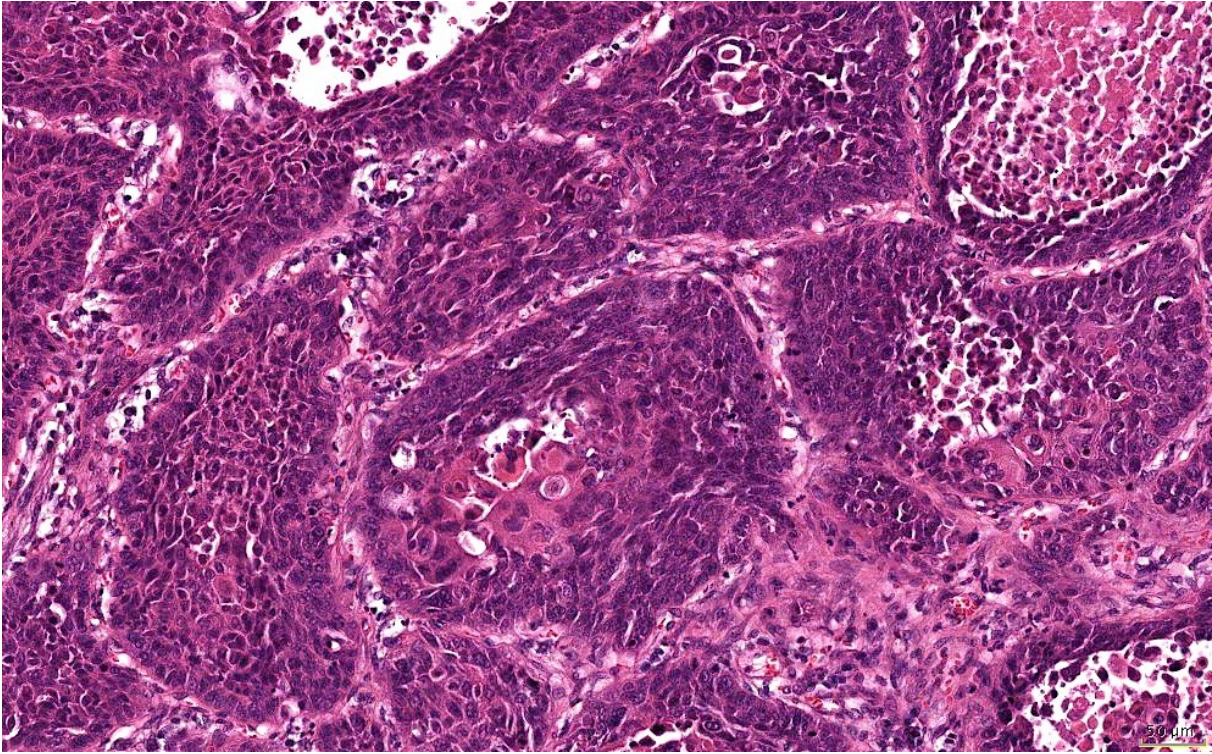


Abbildung 2: Plattenepithelkarzinom mit Keratinisierung im Zentrum der Darstellung.

Die Gruppe der neuroendokrinen Tumoren besteht aus typischen und atypischen Karzinoiden, großzelligen neuroendokrinen Karzinomen, und kleinzelligen Karzinomen (8).

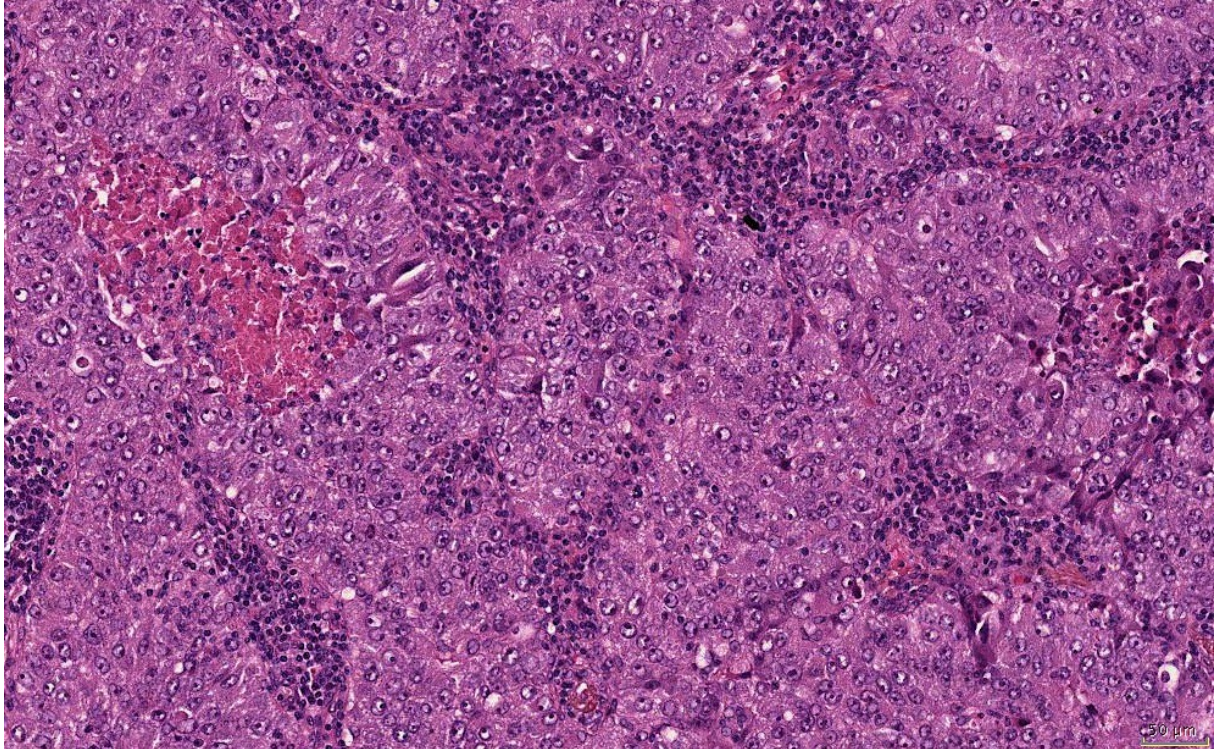


Abbildung 3: Großzelliges Karzinom ohne morphologische oder immunohistochemische Zeichen von Differenzierung.

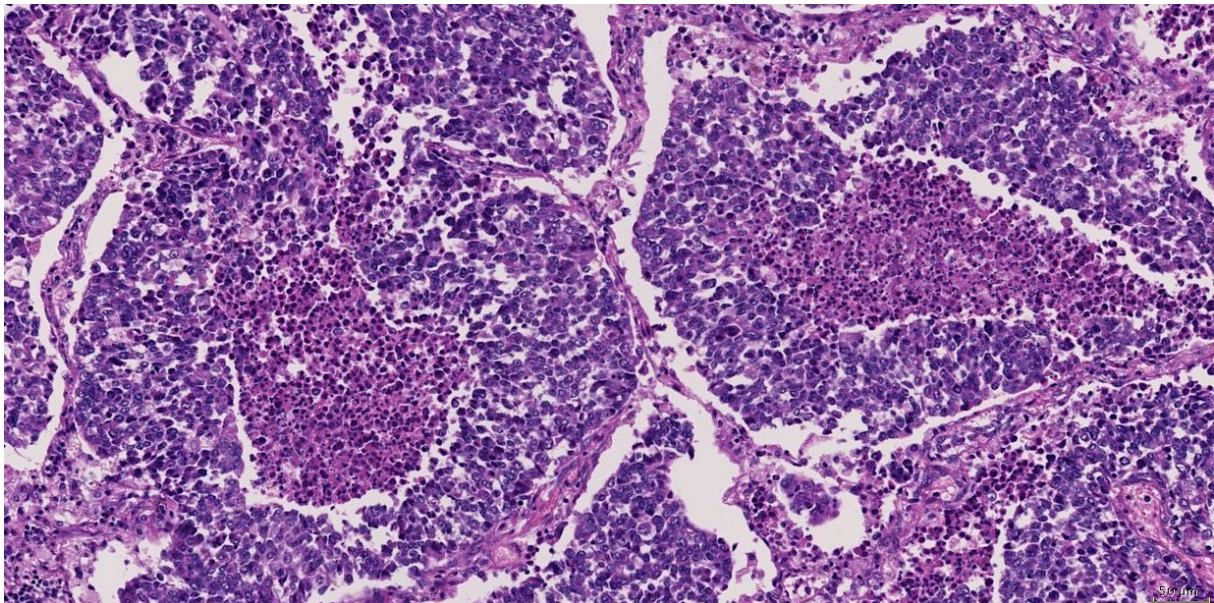


Abbildung 4: Großzelliges Karzinom mit typischem neuroendokrinen Wachstumsmuster und zentraler Nekrose in Tumorzellaggregaten.

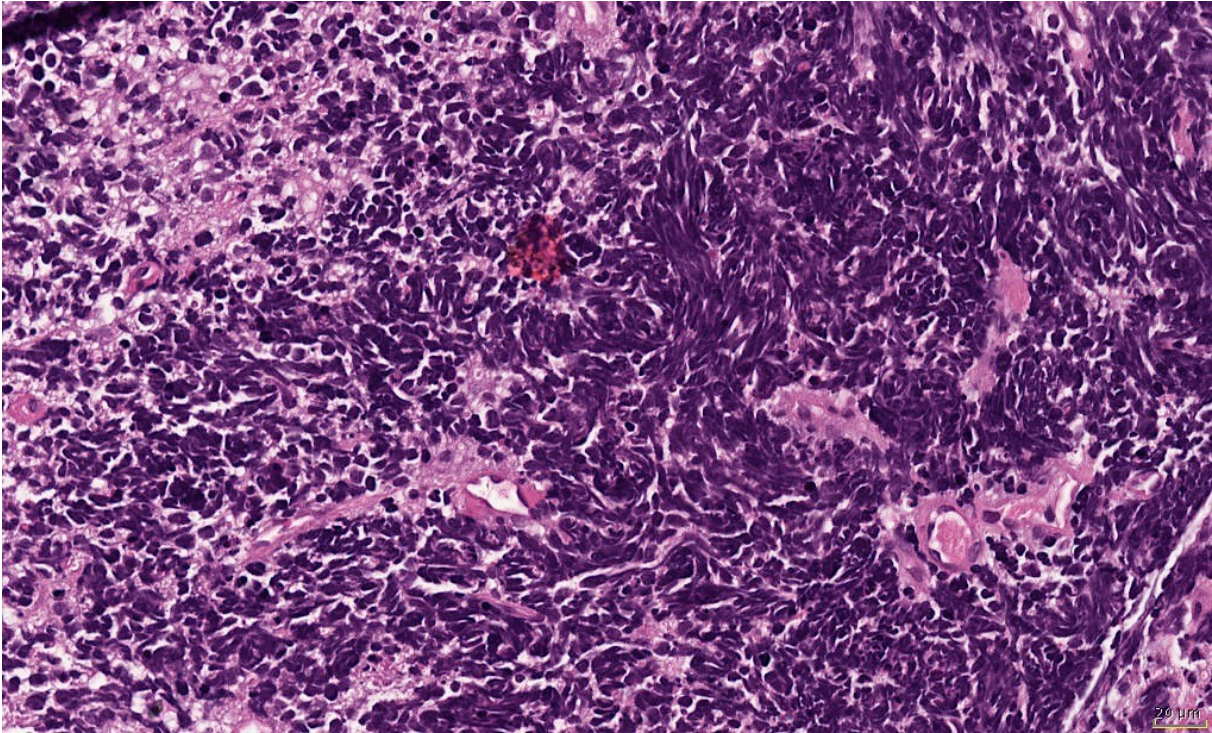


Abbildung 5: Kleinzelliges Karzinom bei typischer histologischer Präsentation mit „Crushing“-Artefakt und Nekrose.

<u>T: Tumor</u>	
Tis	in-situ Karzinom
T1	Tumor mit einem größten Durchmesser ≤ 3 cm, der von Lungengewebe oder viszeraler Pleura umgeben ist. Der Hauptbronchus ist nicht betroffen.
T1a (mi)	minimal-invasives Karzinom: lepidisches Wachstumsmuster mit einem größten Durchmesser ≤ 3 cm und einem soliden Anteil ≤ 5 mm
T1a	Tumor mit einem größten Durchmesser ≤ 1 cm
T1b	Tumour mit einem größten Durchmesser > 1 cm aber ≤ 2 cm
T1c	Tumour mit einem größten Durchmesser > 2 cm aber ≤ 3 cm
T2	Tumour mit einem größten Durchmesser > 3 cm aber ≤ 5 cm oder <ul style="list-style-type: none"> • Infiltration des Hauptbronchus unabhängig vom Abstand von der Carina jedoch ohne direkte Invasion der Carina oder • Infiltration der viszeralen Pleura oder • tumorbedingte partielle Atelektase oder obstruktive Pneumonie, die bis in den Hilus reichen und Teile der Lunge oder die gesamte Lunge umfassen
T2a	Tumour mit einem größten Durchmesser > 3 cm aber ≤ 4 cm
T2b	Tumour mit einem größten Durchmesser > 4 cm aber ≤ 5 cm
T3	größter Durchmesser > 5 cm, aber < 7 cm oder <ul style="list-style-type: none"> • Infiltration von Thoraxwand (inklusive parietale Pleura und Superior Sulcus), N. phrenicus, oder parietales Perikard oder • zusätzlicher Tumorknoten im selben Lungenlappen wie der Primärtumor
T4	größter Durchmesser > 7 cm oder <ul style="list-style-type: none"> • mit direkter Infiltration von Diaphragma, Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Trachea, N. laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper oder Carina oder • zusätzlicher Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen
<u>N: Lymphknoten</u>	
N0	Keine Metastase(n) der Lymphknoten
N1	Metastase(n) in ipsilateralen, peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und/oder intrapulmonalen Lymphknoten oder direkte Invasion dieser Lymphknoten
N2	Metastase(n) in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastase(n) in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsi- oder kontralateral tief zervikalen, supraklavikulären Lymphknoten
<u>M: Fernmetastasen</u>	
M0	keine Fernmetastase(n) vorhanden
M1	Fernmetastase(n) vorhanden
M1a	<ul style="list-style-type: none"> • Separate(r) Tumorknoten in einem kontralateralen Lungenlappen oder • Pleura mit knotigem Befall oder • maligner Pleuraerguss oder • maligner Perikarderguss
M1b	Eine solitäre Fernmetastase in einem solitären extrathorakalen Organ
M1c	mehr als eine Fernmetastase in einem oder mehreren Organen

Tabelle 2: TNM Tumorklassifizierung von Lungentumoren (nach (8)).

Laut Empfehlungen der WHO sollen Tumorproben von NSCLC, die nach morphologischen Kriterien nicht eindeutig einer Diagnose zugeordnet werden können, zusätzlich mithilfe von immunhistochemischen bzw. histochemischen Verfahren untersucht werden. Immer mit Augenmerk darauf, genügend Material für mögliche zusätzliche molekulare Analyseverfahren zur Verfügung zu haben. Falls keine eindeutige Diagnose gestellt werden kann, sollte der Tumor als NSCLC-NOS (ohne weitere Spezifikation) klassifiziert werden und zur molekularen Analyse überstellt werden. Resektionspräparate, die nach morphologischen und/oder immunhistochemischen Charakteristika keiner Tumorklassifizierung zugeordnet werden können, erhalten die Diagnose großzelliges Karzinom (10).

Das Wachstumsmuster kann bereits eine Einschätzung der Überlebenschancen des Patienten/der Patientin prognostizieren. So stehen invasiv wachsende Adenokarzinome mit überwiegend lepidischem Wachstum mit einer guten Prognose, azinär/papillär wachsende Adenokarzinome mit einer intermediären und solide sowie mikropapillär wachsende Adenokarzinome mit einer schlechten Prognose in Zusammenhang (11).

Weitere Möglichkeiten der Unterscheidung bieten in der letzten Dekade molekulare Charakterisierungen von Tumorzellen, die spezifischere Therapieoptionen ermöglichen. Vorreiter war hier die Entdeckung von EGFR-Mutationen in einigen Adenokarzinomen, die sensitiv auf Tyrosinkinaseinhibitoren sind (11). Hier sind, vor allem im Rahmen dieser Arbeit, neben EGFR-Mutationen, ALK- und ROS1-Rearrangements zu nennen, die vermehrt in Adenokarzinomen der Lunge vorkommen (12). Gleichzeitiges Auftreten verschiedener Mutationen innerhalb eines Tumors ist ebenfalls möglich, aber sehr selten (13).

Neu eingeführte Kategorien in der WHO-Klassifikation 2015 sind das Adenocarcinoma in situ (AIS) bzw. das minimalinvasive Adenokarzinom (MIA). Hiermit werden kleine (< 3 cm) Adenokarzinome definiert. Das AIS zeigt ausschließlich lepidisches Wachstum und keine vaskuläre-, Pleura- oder Stroma-Invasion. Das MIA wächst überwiegend lepidisch, kann jedoch zusätzlich weitere histologische Subtypen aufweisen und bis zu fünf Millimeter in myofibroblastisches Stroma invasiv wachsen. Beide sind meist nicht-mukös und haben, nach einer R0-Resektion, also einer Entfernung des Tumors im Gesunden, eine 5-Jahres-Überlebensrate von fast 100% (11,12).

Das Stadium der Tumore wird nach der TNM-Klassifikation bestimmt (siehe Tabelle 2). Hierbei wird der Primärtumor selbst (T), der Lymphknotenstatus (N), sowie eine mögliche Metastasierung (M) bewertet. Durch diese Klassifizierung werden Patientenmanagement, Prognose und der internationale Vergleich erheblich

vereinfacht. Der TNM-Status eines NSCLC lässt auf ein Stadium zwischen I und IV schließen. Diese weitere Stadieneinteilung dient zur Prognoseeinschätzung und ist Hilfsmittel bei der Therapieplanung (14). (siehe Tabelle 3)

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA1	T1a(mi)	N0	M0
	T1a	N0	M0
Stadium IA2	T1b	N0	M0
Stadium IA3	T1c	N0	M0
Stadium IB	T2a	N0	M0
Stadium IIA	T2b	N0	M0
Stadium IIB	T1a, T1b, T1c	N1	M0
	T2a, T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T1a, T1b, T1c	N2	M0
	T2a, T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
Stadium IIIB	T1a, T1b, T1c	N3	M0
	T2a, T2b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0
Stadium IIIC	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
Stadium IVA	jedes T	jedes N	M1a
	jedes T	jedes N	M1b
Stadium IVB	jedes T	jedes N	M1c

Tabelle 3: Tumorklassifizierung von Lungentumoren (nach (8)).

1.1.2.1 Klinik

Das Lungenkarzinom wird in der Mehrzahl der Fälle erst im fortgeschrittenen Stadium symptomatisch, was auch eine frühe Diagnosestellung erschwert (10). Klassische Initialsymptome sind nach absteigender Häufigkeit Husten, Gewichtsverlust, Luftnot, Brustschmerzen, Hämoptysen, Knochenschmerzen, Fingerendteilveränderungen, Fieber und Schwächegefühl (4).

Ein Drittel der Patienten/Patientinnen präsentieren sich durch Auswirkungen entsprechender Metastasen erstsymptomatisch. Diese zeigen dann für die betroffene Region typische Symptome. So präsentieren sich Hirnmetastasen zum Beispiel häufig mit Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, epileptischen Anfällen oder sonstigen neurologischen Ausfällen.

Grundsätzlich können Metastasen des Lungenkarzinoms in allen Organsystemen auftreten. Fernmetastasen sind, aufgrund des TNM-Staging, in zwei Kategorien zu diskriminieren. Hier werden Metastasen in einem kontralateralen Lungenlappen, eine Pleurakarzinose oder ein maligner Pleura- oder Pericarderguss als M1a bezeichnet und Fernmetastasen in extrathorakalen Organen als M1b.

Insgesamt präsentieren 80% der Adenokarzinome in der Lunge extrathorakale Metastasen (11).

Im Rahmen dieser Studie wird ein besonderes Augenmerk auf Metastasen im Gehirn, den Knochen, der Leber, den Nebennieren und den Nieren gelegt.

1.1.3 RISIKOFAKTOREN

1.1.3.1 Tabakrauch-assoziierte Risikofaktoren

Im Jahre 1938 zeigte R. Pearl den lebensverkürzenden Effekt von Tabakkonsum auf (15). 1941 fassten Ochsner und DeBakey die Verbindung zwischen Zigarettenrauch und Lungenkrebs in einem Review zusammen und schrieben unter anderem, "it is

our definite conviction that the increase in the incidence of pulmonary carcinoma is due largely to the increase in smoking.” (16).

Noch in den späten 1950er und frühen 1960er Jahren wurde angenommen, dass Adenokarzinome der Lunge nicht oder kaum mit Tabakrauchen in Zusammenhang stünden (17). Da sich innerhalb der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts die Anzahl der Lungenkrebspatienten/Lungenkrebspatientinnen mit einem Adenokarzinom vervielfachte, während die Zahl der Plattenepithelkarzinome abnahm, musste diese Hypothese neu überprüft werden. Dieser plötzliche Wandel scheint vor allem der Veränderung des Designs, besonders den Einsatz von Filtern betreffend, und des Nikotin- bzw. Teergehalts der Zigaretten sowie dem Rauchverhalten der Konsumenten zugrunde zu liegen (3,17).

Tabakrauch enthält mindestens 50 verschiedene Karzinogene, die dazu führen, dass eine/r von neun Rauchern/Raucherinnen im Laufe seines Lebens an Lungenkrebs erkrankt. Dabei ist das Risiko eines Langzeitrauchers/einer Langzeitraucherin gegenüber dessen eines Nichtraucher/einer Nichtraucherin an einem Tumor der Lunge zu erkranken um den Faktor 10 bis 20 erhöht (15). Für alle histologischen Subtypen des Lungenkarzinoms gilt eine Risikosteigerung durch Zigarettenrauch (9). Das Rauchen hat bei Männern und Frauen einen ähnlich karzinogenen Effekt (8).

Neben der Anzahl und der Stärke der Zigaretten sind auch Faktoren wie Inhalationstiefe und -dauer sowie Vorhandensein bzw. Beschaffenheit eines Filters für das Risiko von Bedeutung (15).

Auch andere Formen des Rauchens, wie Zigarren- oder Pfeifenrauch, können das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, erhöhen (15).

1.1.3.2 Nicht Tabakrauch-assoziierte Risikofaktoren

25% der Lungenkrebsfälle (15% bei Männern, 53% bei Frauen) stehen nicht mit Rauchen in Verbindung (3). In Südasien beträgt der Anteil der Nichtraucherinnen unter den Betroffenen sogar 80% (15).

Besonders ist hier das Adenokarzinom zu erwähnen, welches, wie bereits erwähnt, auch bei Rauchern/Raucherinnen immer häufiger vorkommt. Trotzdem ist es vor

allem bei jungen Nichtraucher/Nichtraucherinnen noch immer die Art des Lungenkarzinoms (15).

Passivrauchen, auch Environmental Tobacco Smoke (ETS) genannt, nimmt hier einen besonderen Stellenwert ein. In den USA sterben laut US Environmental Protection Agency (EPA) jedes Jahr rund 3.000 Menschen an passivem Inhalieren von Tabakrauch. Trotzdem können die meisten Lungenkrebsfälle bei Nichtrauchern/Nichtraucherinnen nicht aufgrund von ETS erklärt werden (3).

Als einen weiteren Risikofaktor zeigte sich Radon, das als Gas beim Zerfall von Uran auftritt. Bei Inhalation setzt sich dieses im Epithel des Respirationstrakts fest und kann die Desoxyribonukleinsäure (DNA) in Form von α -Strahlung direkt schädigen. Diesem Gas sind vor allem die Arbeiter in entsprechenden Minen ausgesetzt (3).

Auch das Kochen mit Kohleöfen in geschlossenen Räumen sowie der Dampf von sehr stark erhitztem Öl kann, besonders bei schlechter Lüftung, ein zusätzliches Risiko für Lungenkrebs bedeuten. Dieses Phänomen lässt sich besonders in China, aber auch Taiwan und Singapur, beobachten (3).

Die Tatsache, dass die Inzidenz für Lungenkrebs bei Nichtraucherinnen höher ist, lässt einen Zusammenhang mit geschlechterspezifischen Hormonen vermuten (15). Im Verdacht steht hierbei das Östrogen, da der Rezeptor Estrogen Receptor Alpha ($ER\alpha$) in gesundem Lungengewebe, sowie auch in Lungentumorgewebe, exprimiert wird (18). Der eindeutige Beleg zu dieser Hypothese ist jedoch noch nicht erbracht (3).

Der Analyse einiger Studien zufolge besteht bei familiärem Vorkommen ein 1,5-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten von Lungenkrebs. Auch eine direkte Verwandtschaft mit dunkelhäutigen Personen scheint das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, zu verdoppeln. Die genaue Rolle der einzelnen Gene bleibt aber bisher weitgehend ungeklärt (3). Der genetische Einfluss ist bei Nichtrauchern/Nichtraucherinnen, ehemaligen Rauchern/Raucherinnen und Rauchern/Raucherinnen zu beobachten (15).

Auch das Alter ist ein mitwirkender Faktor beim Lungenkrebs. 65% der Patienten/Patientinnen sind über 65, obwohl in dieser Altersgruppe der Anteil an Rauchern/Raucherinnen mit 9,3% am niedrigsten ist (15).

In einigen Regionen scheint außerdem das Human Papilloma Virus eine Rolle beim Auftreten eines Lungentumors zu spielen. Ähnliches wurde im Jaasiekte Sheep Retrovirus vermutet, jedoch bislang nicht belegt (3).

Des Weiteren wurde bereits in den 1940er Jahren in Deutschland entdeckt, dass Asbest ein Lungenkarzinogen darstellt (15). So scheint das Risiko zur Entwicklung eines Lungenkarzinoms vor allem bei asbestexponierten Arbeitern mit bevorstehender Asbestose erhöht zu sein (9).

Einige Studien zeigen außerdem, dass Dieselmotoremissionen das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, erhöhen. Gegenstand dieser Studien waren Bergarbeiter, Lastkraftwagen- und Busfahrer, Eisenbahner und Bediener schwerer Baumaschinen (8).

Auch bestehende Lungenkrankheiten, wie chronische Bronchitis, Emphysem oder Tuberkulose, können das Risiko einer malignen Tumorerkrankung der Lunge steigern (9).

1.2 Das operable Adenokarzinom der Lunge

1.2.1 MÖGLICHKEITEN DER THERAPEUTISCHEN INTERVENTION

Die Operation ist die Therapie der Wahl bei einer lokal begrenzten Tumorerkrankung der Lunge. Multimodale Therapiekonzepte sind stadienabhängig. Eine adjuvante Chemotherapie ist bei NSCLC oft erforderlich um das Risiko der Lokal- und Fernrezidive zu reduzieren. Sie bietet sich vor allem in den Stadien II bis IIIa an. Die Strahlentherapie kann in ausgewählten Fällen eine Alternative darstellen, falls ein Patient/eine Patientin funktionell nicht operabel ist. In höheren Stadien kommt entweder eine neoadjuvante Chemotherapie oder, in ausgewählten Fällen, eine neoadjuvante oder definitive Radiochemotherapie zum Einsatz (10,19).

1.2.1.1 Wann ist ein Karzinom der Lunge operabel?

Bei einem operablen Adenokarzinom steigt die Überlebensdauer durch eine chirurgische Intervention signifikant an. Jedoch kommen nur ca. 25% der Lungenkrebspatienten/Lungenkrebspatientinnen für diesen Therapieansatz infrage (20). Bei klinischem Verdacht auf ein Lungenkarzinom ist in der Regel eine Bildgebung durch eine Computertomographie (CT) oder eine Positronen-Emissions-Tomographie-Computertomographie (PET-CT) zur Abklärung indiziert. Die Befunde

der Bildgebung müssen, falls sie einen Einfluss auf weiteres Vorgehen haben, bioptisch gesichert werden (9).

Grundsätzlich ist eine Operation des Tumors bei NSCLC im Stadium I bzw. Stadium II indiziert. Bei Tumoren im Stadium III ist im Vorhinein zu eruieren, ob zusätzlich eine neoadjuvante Chemotherapie indiziert ist. Voraussetzung ist, dass der Patient/die Patientin einen solchen Eingriff von der körperlichen Verfassung her toleriert. NSCLC im Stadium IV oder IIIB werden für gewöhnlich nicht operativ behandelt. (11).

Bei Adenokarzinomen der Lunge scheint die Lobektomie das operative Mittel der Wahl zu sein. Die Segmentektomie erzielt ähnlich gute Ergebnisse. Die Wedge-Resektion scheint weniger effektiv. Welches operative Verfahren (offene Thorakotomie oder video-assisted thorascopic surgery (VATS)) zum Einsatz kommt, ist aus onkologischer Sicht nicht entscheidend. Es obliegt der Entscheidung des Operateurs/der Operateurin welches Verfahren dieser/diese einsetzt, wobei VATS postoperativ mit einer besseren Lebensqualität für den Patienten/die Patientin einhergeht und somit vor allem bei Tumoren im Stadium I das Mittel der Wahl sein sollte (10).

Bei einer chirurgischen Intervention wird der betroffene Lappen bzw. Flügel, sowie das dazugehörige Lymphabflussgebiet im Mediastinum reseziert. Zusätzlich ist eine ipsilaterale und zum Teil auch kontralaterale Lymphadenektomie indiziert. Eine erweiterte Resektion ist bei T3-Situation an der Brustwand, dem Zwerchfell oder dem Perikard notwendig (19).

Primär wird zur Evaluation des klinischen Stadiums, sowie zur Festlegung der therapeutischen Vorgehensweise ein interdisziplinäres Tumorboard angestrebt. Mittels PET-CT und CT kann der Lymphknotenstatus eruiert werden, wobei bei unklaren Befunden oft zusätzlich eine endobronchiale Ultraschalluntersuchung mit histologischer Evaluierung der Lymphknoten durchgeführt wird. Bei befallenen Lymphknoten wird festgelegt, ob der Patient primär operiert oder neoadjuvant behandelt wird (8).

Einige Tumormanifestationen schließen ein kuratives, operatives Verfahren aus. Hier ist das Vena-cava-superior-Syndrom (VCS-Syndrom), eine Stimmband- oder Phrenicusparese, ein maligner Pleura- oder Pericarderguss und eine Beteiligung der Arteria pulmonalis zu nennen. Desweiteren darf der Patient/die Patientin weder extrathorakale Metastasen, noch Metastasen in der kontralateralen Lunge, den supraclaviculären Lymphknoten oder den kontralateralen Lymphknoten aufweisen (9).

1.3 Genetische Variationen in Tumorzellen

Unter physiologischen Bedingungen werden die Zellproliferation und das Zellüberleben von vielen verschiedenen extrazellulären Signalen gesteuert, die meist an der Oberfläche der jeweiligen Zelle andocken. Hierdurch werden unterschiedliche Signalwege innerhalb der Zelle aktiviert. Zum Problem wird diese Kaskade, wenn Mutationen in den Signalproteinen solcher Zellen auftreten und somit Tumorzellen entstehen. Besonders betroffen sind hierbei Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), zu denen auch EGFR und ALK gehören, sowie KRAS (21).

Großangelegte Studien mit Augenmerk auf der genomischen Sequenzierung von Tumorzellen, haben die molekulare Heterogenität und Vielfalt von malignen Neoplasien aufgezeigt (22).

Die Aktivierung von Proteinkinasen durch somatische Mutationen oder chromosomale Alterationen spielt eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese (23). Es besteht eine Abhängigkeit der Tumorzellen gegenüber diesen konkreten Mutationen (21). Dieser Umstand bietet einige therapeutisch relevante Ansatzpunkte und ist für die Möglichkeit einer personalisierten Therapie von Patienten/Patientinnen mit Tumorleiden von Bedeutung (21,22).

Die Mehrheit der Niemalsraucher/Niemalsraucherinnen unter den Patienten/Patientinnen mit Adenokarzinomen der Lunge weisen eine Mutation im EGFR oder Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2), oder eine Translokation mit Beteiligung von ALK oder ROS1 auf (24).

1.3.1 EGFR

Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) ist ein transmembranöses Glykoprotein mit einer extrazellulären Liganden-bindenden Domäne, sowie einer intrazellulären Domäne mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. Diese aktivierte Tyrosinkinase trägt zum normalen Zellwachstum und -differenzierung bei. Es wird angenommen, dass Mutationen des für EGFR verantwortlichen Gens zu neoplastischer Veränderung von Zellen führen können (25).

Eine Aktivierung des EGFR-Rezeptor-Pathways durch Mutation ist der Hauptmechanismus für eine, nicht von Tabakrauch hervorgerufene, karzinogene Entartung der Lunge (26).

Diese Mutationen im EGFR-Gen treten, im Rahmen eines NSCLC, vor allem bei Nichtrauchern/Nichtraucherinnen, Frauen und Menschen asiatischer Herkunft auf (27). Sie sind vermehrt bei Adenokarzinomen, und hier besonders bei nicht-muzinösen mit lepidischem oder überwiegend papillärem Wachstumsmuster, zu beobachten (11,28). Eine Überexprimierung ist neben den Lungenkarzinomen auch in vielen anderen Tumorarten wie Lunge, Brust, Prostata, Blase, Kolon, Kopf bzw. Nacken und Ovar zu finden (29,30).

Grundsätzlich zeigen 10 bis 35% der NSCLC eine EGFR-Mutation. Hauptsächlich sind Adenokarzinome betroffen (11).

Über bereits erwähnte Tyrosinkinase-Domänen kommt es zur Ausschüttung von nachgeschalteten Effektoren und zur Aktivierung von proliferativen und zell-erhaltenden Transmittern (29).

Bei Vorliegen einer EGFR-Mutation in Adenokarzinomen spielt die Therapie mit EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie Gefitinib, eine große Rolle (22,29).

1.3.2 ALK

Chromosomale Translokation ist ein bekannter Mechanismus, der für das Entstehen von rund 20% aller Tumore verantwortlich zu sein scheint. Fusions-Gene spielen seit langer Zeit eine Rolle bei der Tumorentstehung von lymphatischem und hämatologischem Gewebe, sowie bei der des Bindegewebes (26). Das BCR-ABL1-Fusion-Gen, zum Beispiel, wurde in einigen Fällen von chronisch myeloischer Leukämie (CML) und akuter lymphatischer Leukämie (ALL) nachgewiesen (31). Bis auf das Prostata-Karzinom gab es lange Zeit keine Hinweise auf Einflüsse dieser Fusions-Gene auf solide Tumore (26).

Das Fusions-Gen zwischen ALK und echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) ALK-EML4 entsteht durch eine chromosomale Inversion [inv(2)(p21;p23)], die zu einer Verschmelzung des EML-4- und des ALK-Gens führt, welche beide auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2, jedoch in unterschiedlicher Richtung liegen (26,32) (siehe Abbildung 1).

Dies führt zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase-Funktion von ALK und hiermit zu einer onkogenen Aktivität (32).

Ein vermehrtes Auftreten des ALK-Fusions-Gens in Lungentumoren wurde vermehrt bei Patienten/Patientinnen in frühem Alter bei Erstdiagnose und Wenig- bzw. Niemals-Rauchern/Raucherinnen festgestellt (32). Diese Mutation zeigt sich in 3-7% der NSCLC. Hier vor allem in Adenokarzinomen (11).

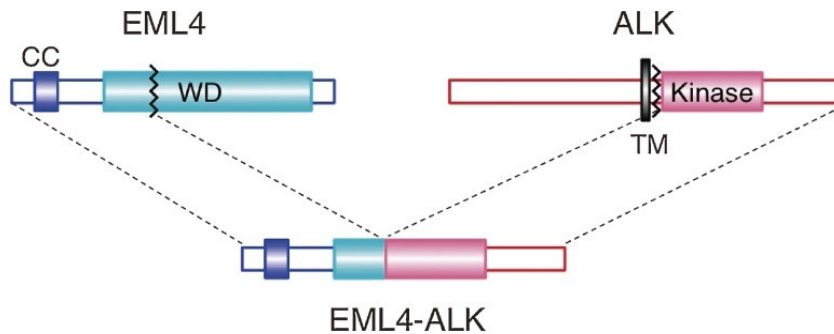


Abbildung 6: Die Proteinstruktur der EML4-ALK Fusionkinase. (Aus: Mano H. The EML4-ALK oncogene: targeting an essential growth driver in human cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2015;91(5):193-201.)

Die Organisation der Gene beider Fusionspartner ist schemenhaft dargestellt (32).

1.3.3 ROS1

ROS1 ist ein Onkogen, welches phylogenetisch entfernt mit ALK verwandt ist (33,34). Es kommt normalerweise in der Lunge und anderen Organen vor, auch wenn die physiologische Bedeutung bisher noch weitgehend unklar ist (34).

ROS1 kann durch unterschiedliche chromosomale Veränderungen in verschiedenen Tumorarten aktiviert werden (33,34). Zu diesen Tumorarten zählen, neben dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, das cholangiozelluläre Karzinom, das Magenkarzinom, das Ovarialkarzinom, sowie das Glioblastoma multiforme.

Mutationen können zur Fusion zwischen einem Teil des ROS1, der die Domäne der Tyrosin-Kinase enthält, und 1 aus 12 verschiedenen Partner-Proteinen führen. Die so erschaffenen ROS1-Fusions-Kinasen haben die Möglichkeit, zelluläre Transformationen herbeizuführen (33).

Rund 1% der NSCLC-Patienten/-Patientinnen hat eine Mutation im ROS1-Gen. Außerdem ist diese Mutation vermehrt bei Nichtrauchern/Nichtraucherinnen, bzw. leichten Rauchern/Raucherinnen, sowie Patienten/Patientinnen mit Adenokarzinomen zu finden (33).

Eine ROS1-Mutation kommt selten gemeinsam mit einer ALK-Mutation in einem Tumor vor (33).

Es wurde ein Ansprechen von ALK-Inhibitoren bei Patienten/Patientinnen mit ROS1-Mutation beobachtet (34).

1.3.4 KRAS

KRAS, wie HRAS und NRAS, gehört zur Familie der Rat Sarcoma Gene (RAS-Gene), die alle im Zusammenhang mit einer Vielzahl unterschiedlicher Krebsarten stehen. In rund 30% aller malignen menschlichen Tumoren wird eine RAS-Mutation gefunden, wobei KRAS am häufigsten betroffen ist. Ihre Mutation führt zu einer ständigen Aktivierung von RAS, und damit zur Aktivierung einer Vielzahl von Signalkaskaden, die verschiedene zelluläre Events, inklusive Proliferation, Überleben und Differenzierung, beeinflussen. Die physiologische RAS/RAF/MEK/ERK-Kaskade, welche nachfolgend der EGFR-Kaskade steht, kontrolliert die Zellproliferation, in dem sie verschiedene Regulatoren in unterschiedlichen Ebenen des Zellzyklus manipulieren kann. Sie ist in Krebszellen regelmäßig hyperaktiviert (35).

KRAS-Mutationen haben eine Prävalenz von über 20% und sind somit die am häufigsten vorkommende Mutationen in Adenokarzinomen der Lunge (36). Das invasive Adenokarzinom weist für gewöhnlich keine EGFR, dafür vermehrt KRAS-Mutationen auf (11). In Plattenepithelkarzinomen sind sie hingegen selten, in SCLC für gewöhnlich nie zu finden. Vermehrt treten sie bei Rauchern/Raucherinnen bzw. ehemaligen Rauchern/Raucherinnen auf, die an Lungenkrebs erkrankt sind (35,36).

Der Beweis einer KRAS-Mutation ist oftmals ein Anhaltspunkt für eine schlechte Prognose (36). Außerdem wurde ein Nichtansprechen von NSCLC-Patienten/Patientinnen mit KRAS-Mutation auf Tyrosinkinase-Inhibitoren festgestellt (37).

1.3.5 BRAF

BRAF ist eine Serin/Threonin-Kinase, die in der RAS-RAF-MEK-ERK Kaskade nach RAS liegt (38). Bei einer BRAF-Mutation wird diese Kaskade dauerhaft aktiviert, was zu einer verminderten Apoptose und einer gesteigerten Zellproliferation führt (21).

BRAF-Mutationen wurden in verschiedenen Tumorarten dokumentiert. Hier sind neben dem Lungentumor vor allem maligne Melanome, aber auch Schilddrüsen-, kolorektale-, sowie Ovarialtumore, zu nennen (39).

Eine Mutation im BRAF-Gen zeigt sich in ein bis drei Prozent der NSCLC. Hier vor allem in Adenokarzinomen (11).

1.3.6 GENETISCHE VARIATIONEN IN PLATTENEPITHELKARZINOMEN DER LUNGE

Obwohl bislang vor allem die Adenokarzinome Teil des genetischen Screenings der Forschung waren, sind mittlerweile auch in Plattenepithelkarzinomen der Lunge einige Treibermutationen identifiziert worden. So zeigen sich in 50% dieser Tumore Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR1)-Amplifikationen, Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 2 (DDR2)-Mutationen und/oder Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha (PIK3CA)-Mutationen bzw. Verlust von Phosphatase and Tensin homolog (PTEN) (11).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign

Ziel der Studie war es, die molekular-pathologische Charakterisierung vom definierten Kollektiv der Patienten mit operierten Adenokarzinomen der Lunge mit bestehender Literatur zu vergleichen und den Zusammenhang zu bekannten klinisch-pathologischen Parametern, wie zum Beispiel TNM-Status, Alter bei OP oder sonstige Therapiemaßnahmen, zu analysieren. Interessant waren EGFR, ALK, BRAF, K-RAS und ROS1 Mutationen, die zum Teil mithilfe von Next Generation Sequencing (NGS), zum Teil mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und teilweise mit beiden Methoden in den entsprechenden Tumorzellen nachgewiesen wurden. Auch die Art der Diagnostik soll in den weiteren Ausführungen Teil der Analyse werden.

Das Patientengut der Studie ergab sich aus Patienten/Patientinnen mit operablen Adenokarzinomen der Lunge, die an der Universitätsklinik für Chirurgie des Landeskrankenhauses Graz diagnostiziert und operiert wurden, in dem Zeitraum zwischen Juni 2013 und Mai 2016 in die Studie eingeschlossen wurden und einer translationellen Studie zugestimmt haben. Andere Einschlusskriterien, wie Alter oder Geschlecht, gab es nicht.

2.2 Datenerhebung

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden alle gängigen klinisch-pathologischen Daten der ausgewählten Patienten/Patientinnen eines operierten Adenokarzinoms der Lunge in eine Exceltabelle erhoben und dokumentiert. Hierzu erfolgte die Durchsicht aller relevanten Arztbriefe, Operationsberichte, pathologischen Untersuchungen und anderen zur Verfügung stehenden Dokumente aus dem Medocs-System des LKH Graz.

Zusätzlich zu den definierten klinisch-pathologischen Parametern wurden die zugehörigen Daten der molekularen Charakterisierung dokumentiert. Die Diagnostik

dieser Mutationen erfolgte durch das Diagnostik- und Forschungsinstitut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz.

Diese Patientenkohorte war die Grundlage für die retrospektive Studie, die 95 Patienten/Patientinnen mit Lungentumoren enthielt. Da unter diesen 95 Tumoren auch ein Adenocarcinoma in situ, drei großzellige Karzinome, ein Karzinoid, ein kleinzelliges Karzinom, elf Plattenepithelkarzinome und ein Adenokarzinom mit mangelhafter Datenlage waren, wird diese Arbeit primär die 77 übrigen Adenokarzinome behandeln.

Das Patienten/Patientinnen-Kollektiv besteht aus 36 Patienten und 41 Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Operation zwischen 42 und 81 Jahre alt waren.

Die Ergebnisse der Datenerhebung wurden mithilfe von SPSS, unter Anwendung des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson, bei einem Signifikanzniveau von 5%, ausgewertet. Die Präsentation der Ergebnisse erfolgte unter Zuhilfenahme von SPSS, sowie Microsoft Excel.

2.3 Mutationsanalyse

Die Diagnose möglicher Mutationen, wie EGFR, ALK, ROS1, BRAF oder K-RAS, erfolgte durch das Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz. Hier wurde wie folgt vorgegangen:

Die intraoperativ oder bioptisch gesicherten Proben wurden routinemäßig 6 bis 72 Stunden in 10%iger Formalinlösung eingebettet und somit fixiert. Weitergehende Diagnostik wurde nach den Standards der WHO durchgeführt.

Die molekulare Mutationsanalyse wurde nun bei allen Adenokarzinomen, NSCLC, bei denen Anteile von Adenokarzinomen nicht ausgeschlossen werden konnten, und NSCLC-NOS, also bei allen, die nicht eindeutig einer anderen Differenzierung zugehörig waren, durchgeführt.

Die Proben wurden parallel mithilfe von Immunohistochemie auf ALK- bzw. ROS1-Translokationen (Bestätigung mit FISH, siehe unten) und mithilfe von NGS auf EGFR-, KRAS-, BRAF- und andere Mutationen getestet. Einige Tumore, die innerhalb des ersten Zeitabschnitts der Studie operiert bzw. analysiert wurden, sind mit Hilfe von PCR auf eine EGFR-Mutation getestet worden.

2.3.1 ALK-Analyse

Die immunohistochemische Analyse der Tumore nach Translokationen von ALK erfolgte auf 4µm dicken Paraffinschnitten mit einem Benchmark XT Instrument (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) unter Verwendung des Ventana ALK Antikörper-Klons D5F3 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und des OptiView Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

Laut Herstellerangaben sollten sich die Ergebnisse entweder als eindeutig positiv oder negativ präsentieren. Ein positives Ergebnis definierte sich in diesem Fall, selbst in heterogenen Strukturen, durch eine deutliche granuläre Färbung im Zytoplasma der Tumorzellen. Bei einem negativen Ergebnis fehlte diese granuläre Färbung.

Positive Ergebnisse mussten durch Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) bestätigt werden. Hierzu wurde die ZytoLight SPEC EML4 Dual Color Break Apart Probe (ZytoVision, Bremerhaven, Deutschland) verwendet. Im Falle eines negativen Ergebnisses, also keinem Vorliegen einer ALK-Translokation, erschienen zwei orange-grüne fusionierte Signale pro Nukleus. Ein positives Ergebnis, also eine ALK-Translokation, zeigte sich durch eine Trennung der grünen bzw. orangenen Signale oder durch ein einzelnes rotes Signal innerhalb eines Nukleus.

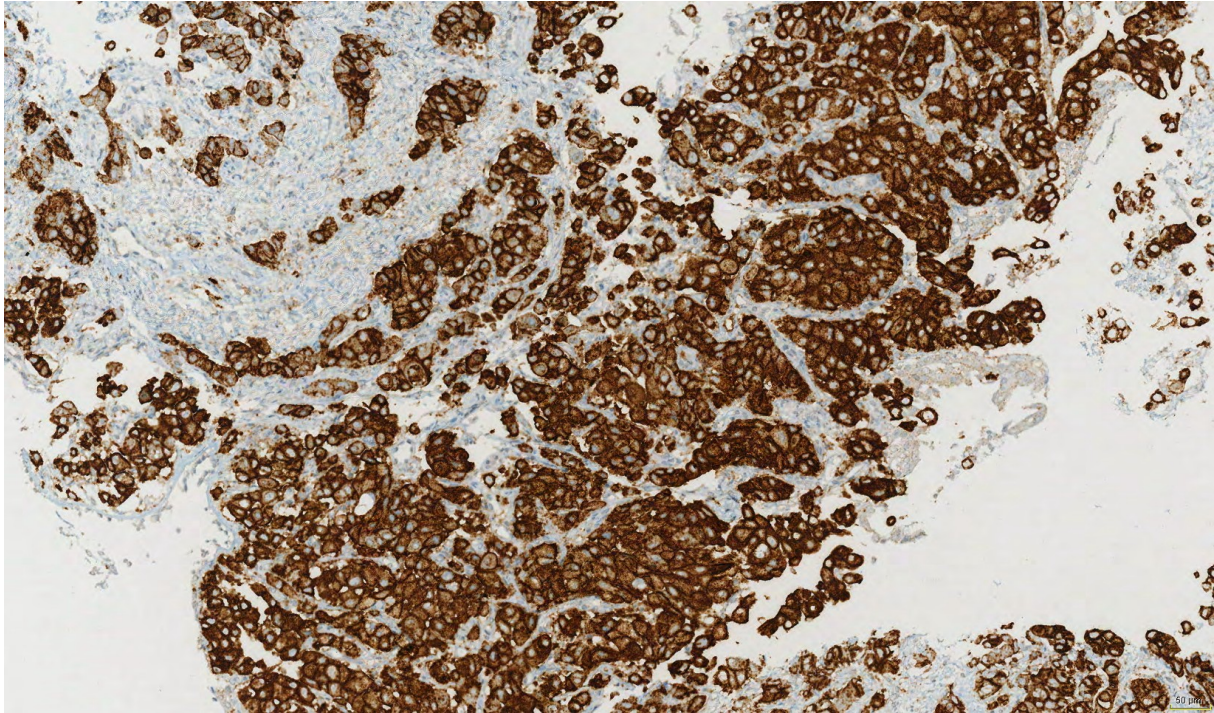


Abbildung 7: Adenokarzinom der Lunge mit immunohistochemisch positiven Merkmalen einer ALK-Mutation.

2.3.2 ROS1-Analyse

Die Analyse der Tumorproben auf eine ROS1-Translokation erfolgte, wie bei ALK, immunhistochemisch auf 4µm dicken Paraffinschnitten mit einem Benchmark XT Instrument (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) mithilfe des Cell Signaling Technology Antikörper-Klon D4D6 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) und ebenfalls des OptiView Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

Das Ergebnis war auch hier entweder positiv oder negativ. Ein Ergebnis zählte als positiv, wenn eine granuläre Färbung des Zytoplasmas der Tumorzellen, eine homogene Färbung der gesamten Zelle oder nur ein Zytoplasma mit granulärer und membranöser Betonung zu betrachten war. Ein negatives Ergebnis zeichnete sich durch das Fehlen all dieser Färbungen aus.

Auch bei der ROS1-Analyse wurde jedes positive Ergebnis mithilfe von Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) zusätzlich geprüft, um das Vorliegen einer Translokation zu bestätigen. Hierzu wurde die ZytoLight SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe (ZytoVision, Bremerhaven, Deutschland) verwendet. Das Verfahren war hier ähnlich des Vorgehens bei der ALK-Analyse. Im Falle eines negativen Ergebnisses, also keinem Vorliegen einer ROS1-Translokation, erschienen zwei orange-grüne

fusionierte Signale pro Nukleus. Ein positives Ergebnis, also eine vorliegende ROS1-Translokation, zeigte sich durch eine Trennung der grünen bzw. orangenen Signale oder durch ein einzelnes rotes Signal und ein einzelnes grünes Signal innerhalb eines Nukleus.

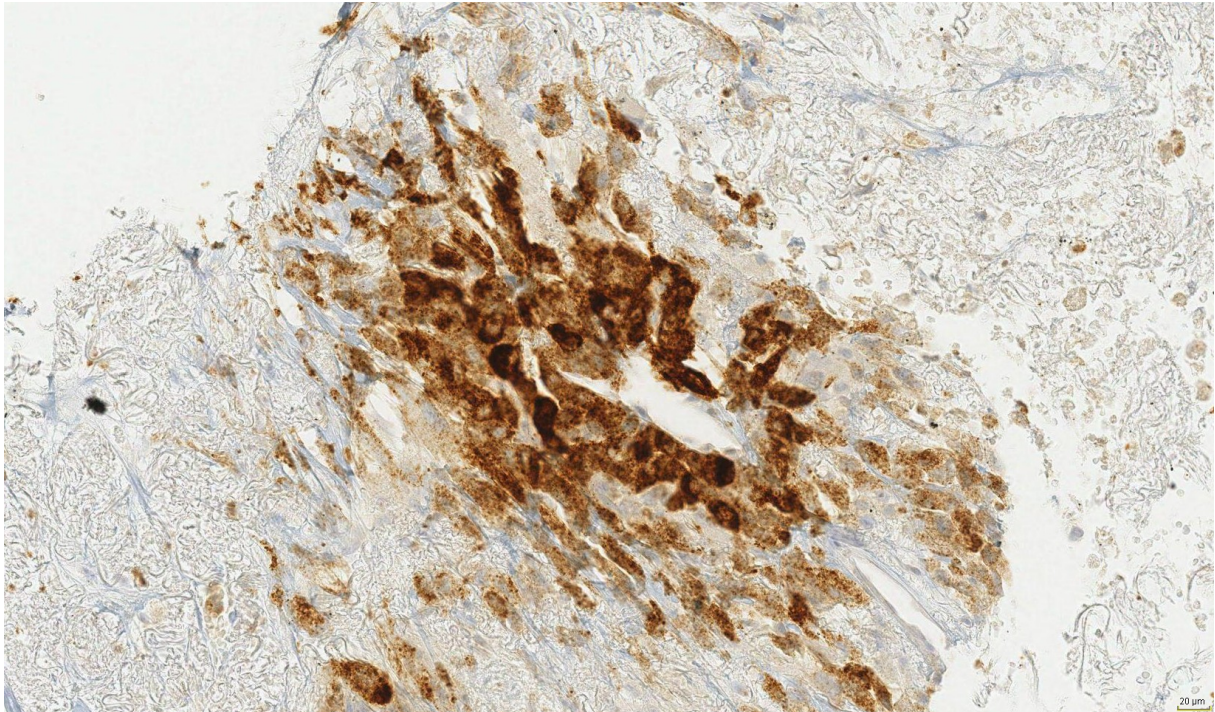


Abbildung 8: Kleines Fragment eines Adenokarzinoms der Lunge mit ROS1-positiven Merkmalen in der immunohistochemischen Untersuchung.

2.3.3 EGFR-Analyse (Pyrosequenzierung)

Zum Nachweis einer EGFR-Mutation wurden, ausgehend von einer PCR, bei der die Primer die zu analysierende Sequenz begrenzen, DNA-Einzelstränge mittels Sepharosebeads über Biotin-Streptavidin-Bindungen aufgereiht. Die Beads mit den anhaftenden Doppelsträngen wurden mit einem Filtertool, das unter Vakuum die Beads fixierte, durch Denaturierungs- und Waschlösungen geschleust. Dabei wurden die Doppelstränge getrennt und die Gegenstränge entfernt. Anschließend kamen die Einzelstränge mit einem Sequenzierungsprimer auf eine Sequenzierungsplatte.

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte mit Hilfe des PyroMark Q24 (QIAGEN, Hilden, Deutschland). Die DNA-Einzelstränge dienten als Matrix, an der die Sequenzierungsprimer andocken und die DNA-Polymerasen einen neuen Gegenstrang durch Einbau von Nucleotiden bilden konnten.

2.3.4 EGFR-Analyse (NGS) (inklusive BRAF, KRAS)

Die für die NGS-Analyse benötigte DNA wurde aus Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeproben extrahiert. Voraussetzung für eine adäquate Analyse war das Vorhandensein von genügend Tumorzellen in der Probe. Entweder musste der Anteil an Tumorzellen mindestens 10% oder die Zahl der Tumorzellen in der Probe über 200 betragen.

Die DNA wurde mithilfe eines Maxwell FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) gewonnen und die NGS-Datenbank der Proben mit dem Ion Ampliseq Colon and Lung Research Panel v2 primer pool erstellt. Dieses Panel deckt 22 Gene, die im Zusammenhang mit Lungen- und Dickdarmkrebs in Verbindung stehen, ab. Die untersuchten Gene sind KRAS, EGFR, BRAF, PIK3CA, AKT1, ERBB2, PTEN, NRAS, STK11, MAP2K1, ALK, DDR2, CTNNB1, MET, TP53, SMAD4, FBXW7, FGFR3, NOTCH1, ERBB4, FGFR1 und FGFR2.

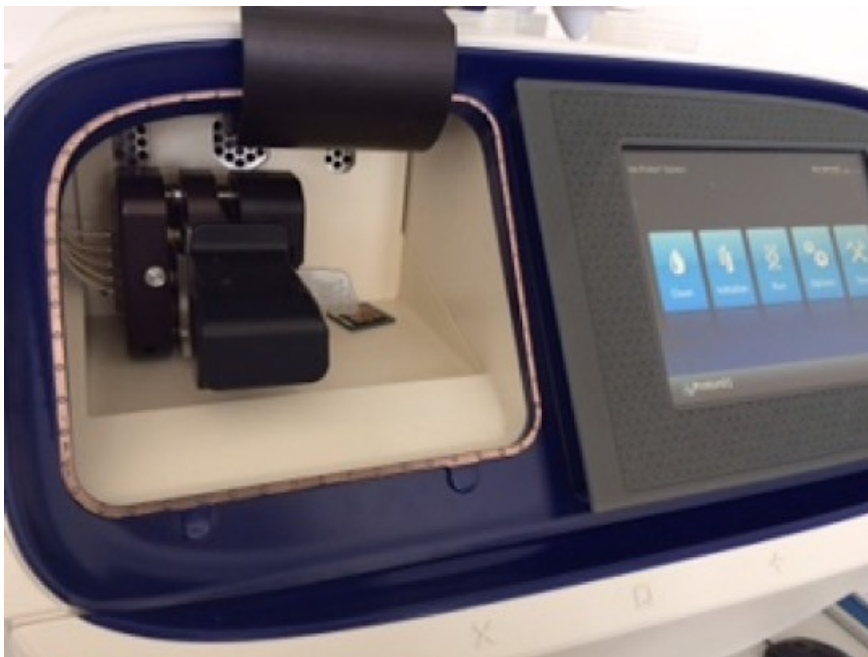


Abbildung 10: Der in dieser Studie verwendete NGS-Sequencer - IonTorrent Proton™ Sequencer.

3 ERGEBNISSE

3.1 Allgemeine Informationen

Die Studie umfasst eine Anzahl von 77 Patienten/Patientinnen, die alle aufgrund eines Adenokarzinoms in der Lunge in einem Zeitraum von 35 Monaten operiert wurden. Der erste Patient/die erste Patientin ist hierbei am 25. Juni 2013 und der/die Letzte am 13. Mai 2016 operiert worden.

Von diesen 77 Patienten/Patientinnen waren 36 männlich und 41 weiblich. Dies entspricht einem Anteil von 46,8% bzw. 53,2%. Das Alter der Patienten/Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation reichte von 42 bis 81 Jahren. Das mittlere Alter betrug 64,4 Jahre (m:62,5; w:66,0) (siehe Tabelle 4, Abbildung 11).

Geschlecht	mittleres Alter	Anzahl (%)	Median	Minimum	Maximum
m	62,472	36 (46,8)	63,500	42,0	81,0
w	65,976	41 (53,2)	67,000	47,0	80,0
Insgesamt	64,338	77 (100)	65,000	42,0	81,0

Tabelle 4: Mittleres Alter (plus Median, Maximum und Minimum) unserer Patientengruppe nach Geschlecht (n=77).

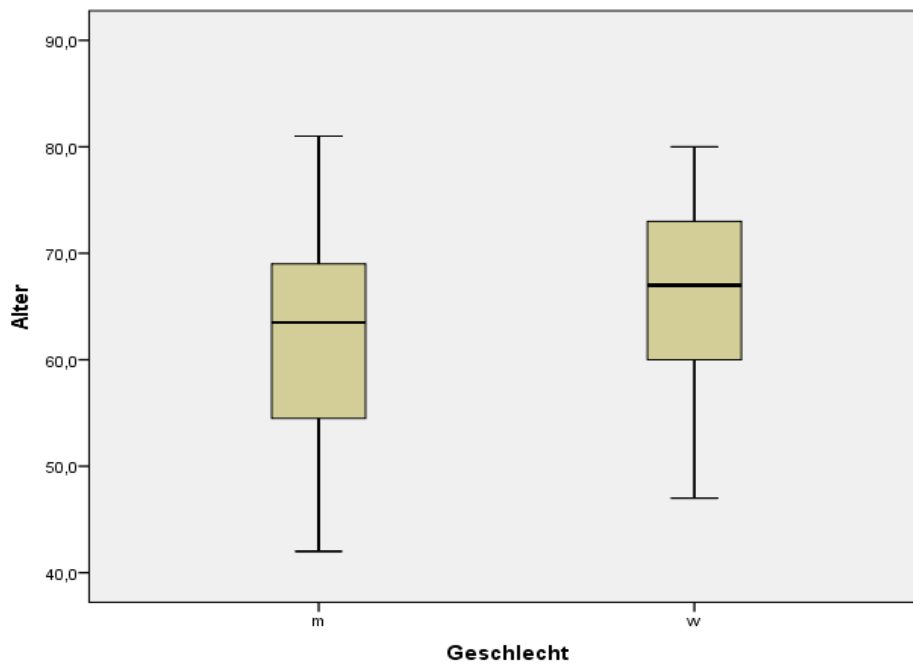


Abbildung 11: Boxplot der Altersverteilung der Patienten/Patientinnen unserer Studie nach Geschlecht.

Zum Zeitpunkt der Recherche sind bereits 14 der 77 Patienten/Patientinnen verstorben. Dies entspricht 18,2%. Bei einem/einer der 14 Verstorbenen war die Todesursache nicht durch den Tumor bedingt.

Im Folgenden sind nun einige Begleitdiagnosen/Komorbiditäten nach Häufigkeit gelistet, die im Patienten-/Patientinnen-Kollektiv neben der Diagnose des Adenokarzinoms der Lunge miterfasst wurden. Diese sind Ergebnisse der Recherche, die mithilfe von Arztbriefen aus dem Medocs des LKHs Graz durchgeführt wurde:

Begleitdiagnosen	
arterielle Hypertonie	49 (63,6%)
COPD	17 (22,1%)
Adipositas	15 (19,5%)
Hypothyreose	11 (14,3%)
Alkoholabusus	9 (11,7%)
Diabetes Mellitus	6 (7,8%)
Hyperurikämie	5 (6,5%)
Leberparenchymschäden	3 (3,9%)

Tabelle 5: Relevante Begleitdiagnosen unserer Patienten/Patientinnen neben der Diagnose Adenokarzinom der Lunge.

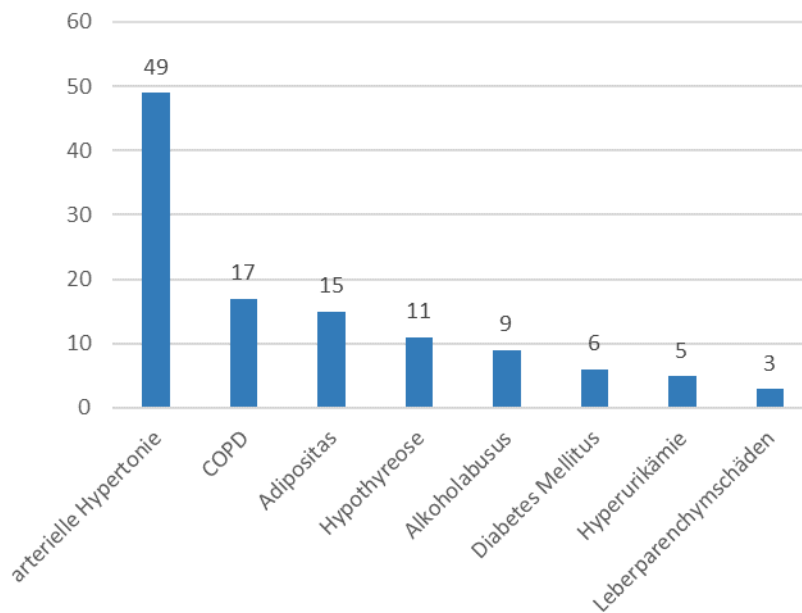


Abbildung 12: Relevante Begleitdiagnosen unserer Patienten/Patientinnen neben der Diagnose Adenokarzinom der Lunge.

Ein weiterer, vor allem in diesem Zusammenhang, wichtiger Parameter ist der Raucherstatus zum Zeitpunkt der Diagnose. Hier ist zwischen Niemalsrauchern/Niemalsraucherinnen, ehemaligen Rauchern/Raucherinnen und Rauchern/Raucherinnen zu unterscheiden. Des Weiteren war der Raucherstatus bei 10 Patienten/Patientinnen aus den verfügbaren Quellen nicht ersichtlich.

Raucherstatus	
Raucher/Raucherinnen	24 (31,2%)
ehemaliger Raucher/Raucherinnen	26 (33,8%)
Niemalsraucher/Niemalsraucherinnen	17 (22,1%)
keine Informationen	10 (13,0%)

Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der Raucherstatus unserer Kohorte nach Rauchern/Raucherinnen, ehemaligen Rauchern/Raucherinnen und Niemalsrauchern/Niemalsraucherinnen (n=77).

Diese Statistik schließt auf einen Anteil von mindestens 65% Rauchern/Raucherinnen bzw. ehemaligen Rauchern/Raucherinnen. Bei außer Acht lassen der Patienten/Patientinnen ohne genügend Informationen beträgt der Anteil 74,6% (Abbildung 13).

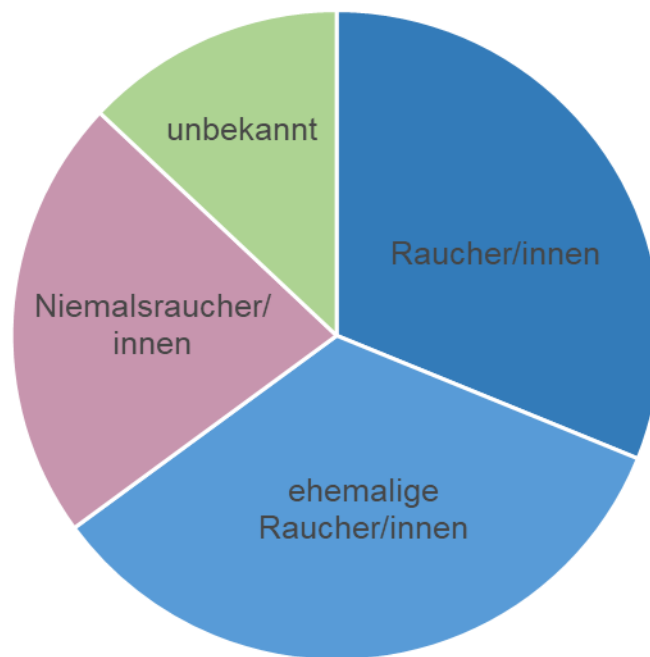


Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der Raucherstatus unserer Kohorte nach Rauchern/Raucherinnen, ehemaligen Rauchern/Raucherinnen, Niemalsrauchern/Niemalsraucherinnen und Patienten mit unbekanntem Raucherstatus (n=77).

Von 37 der insgesamt 50 Rauchern/Raucherinnen bzw. ehemaligen Raucher/Raucherinnen liegen Informationen über die Anzahl der Packyears vor. Hier liegt der Mittelwert bei 40,4 Packyears.

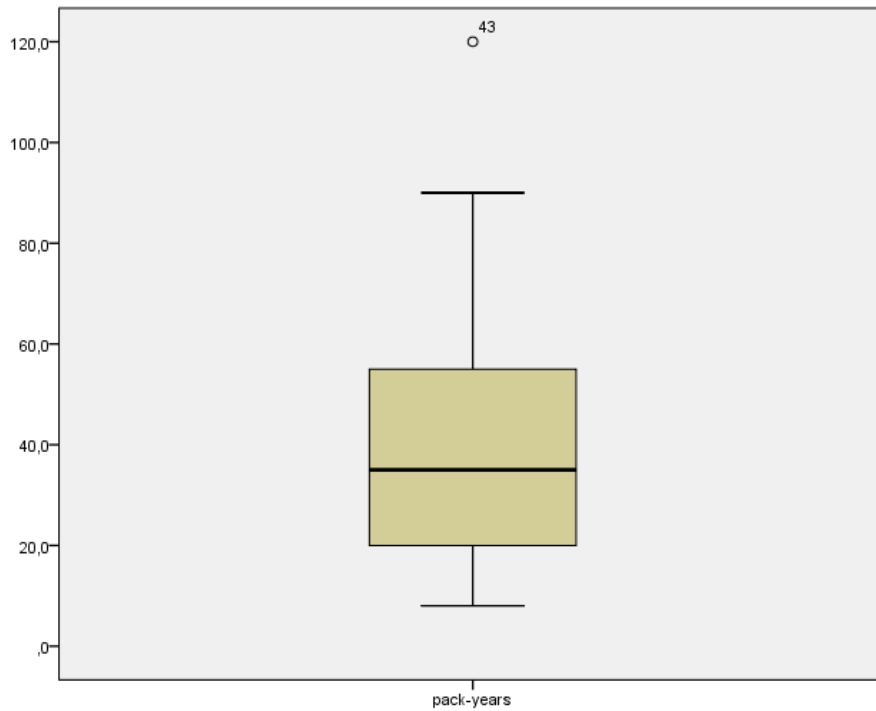


Abbildung 14: Boxplot der Packyears von Rauchern/Raucherinnen bzw. ehemaligen Rauchern/Raucherinnen unserer Studie (n=37).

3.2 Therapeutische Intervention

Alle 77 Patienten/Patientinnen der Studie hatten ein Adenokarzinom der Lunge und wurden aufgrund dessen operiert. Zusätzlich wurden 35 der Patienten/Patientinnen neoadjuvant (9), adjuvant (21) und/oder palliativ (5) mit einer Chemotherapie behandelt (Abbildung 15).

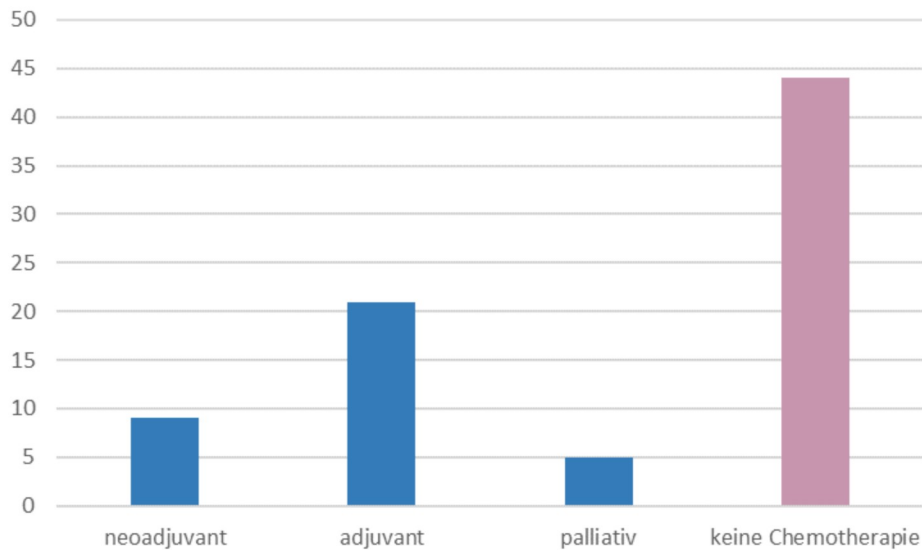


Abbildung 15: Häufigkeit der zusätzlichen Chemotherapie (neoadjuvant, adjuvant und palliativ) neben der operativen Therapie unserer Adenokarzinome.

Folgende Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen wurden bei Therapie mit Chemotherapeutikern verwendet:

Wirkstoffe (Chemotherapie)	
Cisplatin/Navelbine	14
Cisplatin/Alimta	10
Carboplatin/Alimta	6
Carboplatin/Navelbine	4
Cisplatin/Taxotere	4

Tabelle 7: Verwendete Therapeutika bei möglicher durchgeführter Chemotherapie im Therapieverlauf unserer Patienten/Patientinnen.

3.3 Tumoreigenschaften

3.3.2 TUMORSTADIEN

Auch die Stadieneinteilung dient u. a. dem Abschätzen der weiteren Prognose des Patienten/der Patientin (s. 1.1.2). Es fällt auf, dass sich 28,6% der Tumore, zum Zeitpunkt der Operation, im Stadium III A befinden. Da die Stadien III B und IV keine operablen Stadien darstellen, ist ihr Anteil in unserer Kohorte mit 5,2%, sowie 6,5% relativ gering. Sie wurden aus palliativen Gründen operiert (s. Tabelle 8, Abbildung 17).

Tumorstadien	
I A1	8 (10,4%)
I A2	10 (13,0%)
I B	12 (15,6%)
II A	4 (5,2%)
II B	12 (15,6%)
III A	22 (28,6%)
III B	4 (5,2%)
IV	5 (6,5%)

Tabelle 8: Häufigkeit der verschiedenen Tumorstadien von Adenokarzinomen der Lunge unserer Kohorte (Stadium I bis Stadium IV) (n=77).

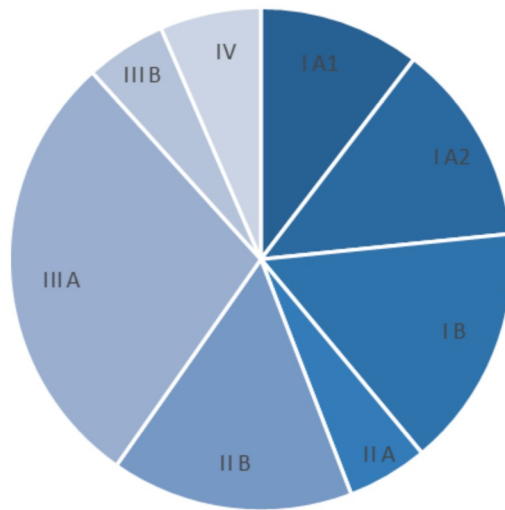


Abbildung 16: Darstellung der Häufigkeit der verschiedenen Tumorstadien von Adenokarzinomen der Lunge unserer Kohorte (Stadium I bis Stadium IV) (n=77).

3.3.3 TUMORLOKALISATION

Eine eindeutige Tendenz der Tumorlokalisierung zu einer Seite hin ist nicht zu erkennen. Trotzdem zeigt sich bei rechts lokalisierten Tumoren ein vermehrtes Auftreten im oberen Sektor der Lunge (24 oben / 9 unten / 6 mittig) (Tabelle 9).

Tumor-lokalisierung	oben	unten	Mitte	nicht genauer definiert	gesamt
links	17 (22,1%)	19 (24,7%)		0	36 (46,8%)
rechts	24 (31,1%)	9 (11,7%)	6 (7,8%)	2 (2,6%)	41 (53,2%)

Tabelle 9: Lokalisation der Tumore unserer Patienten/Patientinnen in der Lunge.

3.4 Krankheitsverlauf

Wie bereits erwähnt, sind zum Zeitpunkt der Recherche bereits 14 Patienten/Patientinnen dieser Studie verstorben. Todesursache war in den meisten Fällen tumorbedingt.

3.4.1 METASTASEN

Einige Patienten/Patientinnen wiesen im Laufe ihrer Krankheit lokale, Lymphknoten- oder Fernmetastasen auf. Die typischen Zielorgane und -regionen wurden bereits in der Einleitung dieser Arbeit erörtert.

Bei fast der Hälfte der Patienten/Patientinnen (48,1%) wurden Lymphknotenmetastasen festgestellt. Lokale Metastasen konnten bei vier Patienten/Patientinnen (5,2%) in der Lunge und einem Patienten/einer Patientin (1,3%) in der Pleura festgestellt werden (Tabelle 10).

lokale-, Lymphknotenmetastasen		
Lymphknoten	37	48,10%
Lunge	4	5,20%
Pleura	1	1,30%

Tabelle 10: Häufigkeit von lokalen- bzw. Lymphknotenmetastasen im Rahmen der Tumorerkrankung unserer Patienten/Patientinnen.

Des Weiteren entwickelten sich aus 16 Tumoren (20,8%), teilweise multiple, Fernmetastasen. Vor allem das Gehirn (11,7%) und das Skelett (10,40%) waren häufig betroffen (Tabelle 11).

Fernmetastasen		
Gehirn	9	11,70%
Knochen	8	10,40%
Leber	4	5,20%
Nebenniere	2	2,60%
Niere	1	1,30%
insgesamt	16	20,80%

Tabelle 11: Häufigkeit und Lokalisation von Fernmetastasen im Rahmen der Tumorerkrankung unserer Patienten/Patientinnen.

3.5 Molekulare Charakterisierung

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Mutationsanalyse präsentiert. Diese sind der Hauptbestand dieser Arbeit und sollen im späteren Verlauf mit anderen Studien verglichen werden, damit die Ergebnisse korrekt bewertet und eingeordnet werden können.

Nicht alle in dieser Studie behandelten Patienten/Patientinnen konnten auf jede Mutation (EGFR, ALK, ROS1, BRAF, KRAS) getestet werden, da unterschiedliche Methoden angewandt wurden. Anfangs erfolgte die Untersuchung mit Hilfe von PCR, wobei nur auf EGFR-Mutationen getestet wurde. Später konnten unter Verwendung von NGS alle hier präsentierten Mutationen untersucht werden. Außerdem zählt das Screening nach ALK-Mutationen bereits länger zu den Routine-Untersuchungen, als das nach ROS1-Mutationen. Dies erklärt eine niedrigere Zahl an getesteten Tumoren auf eine ROS1-Mutation.

So wurde eine Mutation im KRAS- und BRAF-Gen nur bei 42 von 77 Patienten/Patientinnen durchgeführt. Auf eine Mutation im EGFR-Status wurden 71 von 77 Patienten/Patientinnen, und im ALK-Status 74 von 77 Patienten/Patientinnen getestet. Auf Mutationen im ROS1-Gen wurden 21 Tumore untersucht, wobei alle negativ getestet wurden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Genanalysen vor allem im Zusammenhang mit bekannten pathologischen Parametern dargestellt. Diese tabellarischen Darstellungen entstanden in Anlehnung an die Arbeit von Marchetti et. al. (40), welche, neben anderen vergleichbaren Arbeiten, außerdem als Grundlage für weitere Ausführungen im Diskussionsteil dienen soll.

Die Ergebnisse der Häufigkeiten der einzelnen Mutationen werden im Folgenden (Tabelle 12) dargestellt:

Mutationsstatus	Mutation	Wildtyp	keine Angabe
EGFR	8	63	6
ALK-EML4	6	68	3
KRAS	12	30	35
BRAF	4	38	35
ROS1	0	21	56

Tabelle 12: Häufigkeit von positivem bzw. negativem Mutationsstatus der zu untersuchenden Gene innerhalb unserer Kohorte (n=77).

3.5.1 EGFR-STATUS

71 der 77 Tumore wurden auf eine EGFR-Mutation getestet. Die acht Patienten/Patientinnen (11,3%) mit einer Mutation des EGFR-Gens wiesen ein Durchschnittsalter von 71,5 Jahren auf und lagen damit über dem Durchschnitt der Gesamtkohorte (64,3) ($p=0,019$). Des Weiteren fällt auf, dass sieben der acht positiv getesteten Patienten/Patientinnen weiblich sind ($p=0,033$). Von den 37 getesteten Frauen wiesen 18,9% eine Mutation auf, bei den 34 getesteten Männern im Gegensatz 2,9%. Außerdem lässt sich bei fünf von 16, und somit 31,25%, Niemalsrauchern/Niemalsraucherinnen eine EGFR-Mutation beobachten ($p=0,003$). Die Kombination einer weiblichen Niemalsraucherin ist in 50% der Fälle (vier) mit einem positivem EGFR-Mutationsstatus behaftet. Des Weiteren fehlen bei zwei Patientinnen mit dieser Mutation die Informationen zum Raucherstatus.

Weitere Informationen bezüglich des EGFR-Status in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern, die keine Signifikanz nach festgelegtem Signifikanzniveau aufweisen, sind in Tabelle 14 ersichtlich.

Vier der EGFR-Mutationen wurden im Exon 19, zwei im Exon 21 und jeweils einer im Exon 18 bzw. 20 nachgewiesen (Tabelle 13).

Lokalisation	Anzahl
Exon 18	1
Exon 19	4
Exon 20	1
Exon 21	2

Tabelle 13: Lokalisation der Mutationen unserer EGFR-positiven Adenokarzinome in den unterschiedlichen Exonen des EGFR-Gens (n=8).

EGFR-Status	Mutation	Wildtyp
Alter		
Mittelwert	71,5	63,6
Standardabweichung	5,5	9,1
Geschlecht		
männlich	1	33
weiblich	7	30
Raucherstatus		
Raucher/in	0	21
ehemalige Raucher/in	1	24
Niemalsraucher/in	5	11
fehlende Information	2	7
T-Stadium		
1	3	24
2	5	27
3	0	11
4	0	1
N-Stadium		
0	3	31
1	1	13
2	4	19
Tumorstadium		
I	3	26
II	1	24
III	4	20
IV	0	3

Tabelle 14: Zusammenhang zwischen EGFR-Status und pathologischen Parametern unserer Patienten/Patientinnen (n=71).

3.5.2 ALK-STATUS

74 Patienten/Patientinnen der Kohorte wurden im Rahmen ihrer Krebserkrankung auf eine ALK-Translokation getestet. Sechs Tumore (8,1%) wiesen diese Mutation auf, hiervon vier Frauen und zwei Männer. Dies entspricht 10% bzw. 5,9% der getesteten Patienten/Patientinnen. Im Kollektiv der Untersuchten waren die ALK-positiven Patienten/Patientinnen im Durchschnitt 57,2 und die Wildtyp-Patienten/-Patientinnen 65,1 Jahre alt ($p < 0,05$).

Weitere Informationen bezüglich des ALK-Status in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern, die keine Signifikanz nach festgelegtem Signifikanzniveau aufweisen, sind in Tabelle 15 ersichtlich.

ALK-EML4-Status	Mutation	Wildtyp
Alter		
Mittelwert	57,2	65,1
Standardabweichung	11,6	9,1
Geschlecht		
männlich	2	32
weiblich	4	36
Raucherstatus		
Raucher/in	1	22
ehemalige Raucher/in	2	23
Niemalsraucher/in	2	15
fehlende Information	1	8
T-Stadium		
1	1	27
2	4	28
3	1	10
4	0	2
N-Stadium		
0	3	33
1	0	14
2	3	21
Tumorstadium		
I	3	27
II	0	16
III	3	21
IV	0	4

Tabelle 15: Zusammenhang zwischen ALK-Status und pathologischen Parametern unserer Patienten/Patientinnen (n=74).

3.5.3 KRAS-STATUS

Der KRAS-Status wurde bei 42 Patienten/Patientinnen erhoben, wobei 12 Patienten/Patientinnen (28,6%) positiv auf eine Mutation in KRAS-Gen getestet wurden. Diese 12 positiven Ergebnisse betreffen neun weibliche und drei männliche Patienten/Patientinnen.

Unter den Rauchern/Raucherinnen, bzw. ehemaligen Rauchern/Raucherinnen, weisen 11 von 28 Patienten/Patientinnen eine KRAS-Mutation auf. Gegenüberstellend lässt sich die Mutation bei den Niemalsrauchern/Niemalsraucherinnen in einem von 14 untersuchten Fällen beobachten (siehe Abbildung 18, Abbildung 19).

Leider weisen keine unserer Ergebnisse eine Signifikanz nach vorgegebenem Signifikanzniveau auf.

Weitere Informationen bezüglich des KRAS-Status in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern sind in Tabelle 16 ersichtlich.

(ehemalige) Raucher/innen

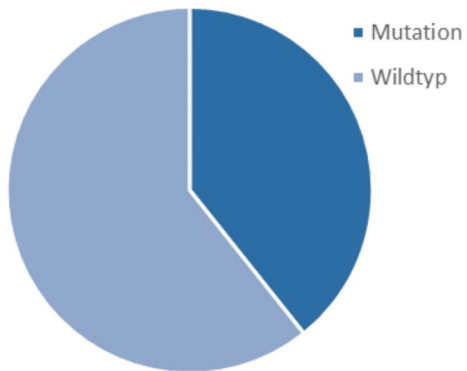


Abbildung 17: Häufigkeitsdarstellung von positivem bzw. negativem KRAS-Status unter Rauchern/Raucherinnen bzw. ehemaligen Rauchern/Raucherinnen unserer Kohorte (n=28).

Niemalsraucher/innen

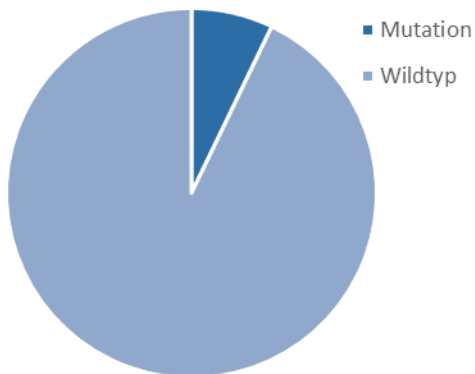


Abbildung 18: Häufigkeitsdarstellung von positivem bzw. negativem KRAS-Status unter Niemalsrauchern/Niemalsraucherinnen unserer Kohorte (n=14).

KRAS-Status	Mutation	Wildtyp
Alter		
Mittelwert	62,8	67,1
Standardabweichung	7	9,1
Geschlecht		
männlich	3	14
weiblich	9	16
Raucherstatus		
Raucher/in	4	8
ehemalige Raucher/in	7	9
Niemalsraucher/in	1	13
fehlende Information	0	0
T-Stadium		
1	4	13
2	4	14
3	4	3
4	0	0
N-Stadium		
0	5	17
1	6	4
2	1	9
Tumorstadium		
I	4	15
II	5	4
III	2	10
IV	1	1

Tabelle 16: Zusammenhang zwischen KRAS-Status und pathologischen Parametern unserer Patienten/Patientinnen (n=42).

3.5.4 BRAF-STATUS

42 Patienten/Patientinnen der Kohorte wurden auf eine Mutation im BRAF-Gen getestet. Vier Tumore (9,5%) wiesen bei dieser Untersuchung ein positives Ergebnis auf. Hiervon drei Frauen und ein Mann. Alle vier positiv getesteten Patienten/Patientinnen waren entweder Raucher/Raucherinnen (drei) oder ehemalige Raucher/Raucherinnen (einer/eine).

Leider weisen keine unserer Ergebnisse eine Signifikanz nach vorgegebenem Signifikanzniveau auf.

Weitere Informationen bezüglich des BRAF-Status in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern sind in Tabelle 17 ersichtlich.

BRAF-Status	Mutation	Wildtyp
Alter		
Mittelwert	64	66,1
Standardabweichung	6,2	8,9
Geschlecht		
männlich	1	16
weiblich	3	22
Raucherstatus		
Raucher/in	3	9
ehemalige Raucher/in	1	15
Niemalsraucher/in	0	14
fehlende Information	0	0
T-Stadium		
1	2	15
2	1	17
3	1	6
4	0	0
N-Stadium		
0	2	20
1	1	9
2	1	9
Tumorstadium		
I	2	17
II	0	9
III	2	10
IV	0	2

Tabelle 17: Zusammenhang zwischen BRAF-Status und pathologischen Parametern unserer Patienten/Patientinnen (n=42).

3.5.5 ROS1-STATUS

Wie bereits in Tabelle 12 beschrieben, wurden 21 Patienten/Patientinnen auf eine Fusion des ROS1-Gens getestet. Im Rahmen dieser Untersuchung waren alle Tumore negativ in Bezug auf eine ROS1-Fusion.

4 DISKUSSION

Die Bedeutung personalisierter Therapie und die damit verbundene molekulare Untersuchung (besonders in Bezug auf EGFR, ROS1 und ALK) ist vor allem bei fortgeschrittenen NSCLCs unumstritten (8). Einige Mutationen zeigen einen Zusammenhang mit dem Risikofaktor Nummer 1, dem Rauchen, andere scheinen durch keine der klassischen Ätiologien bedingt zu sein.

Die Ergebnisse der EGFR-Analyse stimmen mit bestehender Literatur weitgehend überein. Marchetti et al. testeten 860 NSCLCs auf eine Mutation im EGFR-Gen. Hierbei wiesen 39 von 375 Adenokarzinomen (10,4%) eine Mutation in Exon 18, Exon 19 oder Exon 21 auf (40). In einer umfassenden Studie von Dogan et al. aus dem Jahr 2012 wurden 19,6% der 3026 Adenokarzinome positiv auf eine Deletion im Exon 19 oder eine L858R Punktmutation im Exon 21 getestet (41). Unsere Kohorte zeigt im Vergleich dazu in 11,3% der Fälle eine EGFR-Mutation, wobei die Tumorzellen auf Mutationen im Exon 18, Exon 19, Exon 20 und Exon 21 untersucht wurden.

Mit 31,25% präsentiert sich das Vorkommen von EGFR-mutierten Adenokarzinom bei den Niemalsrauchern/Niemalsraucherinnen in unserer Studie gegenüber der Gesamtkohorte deutlich erhöht. Auch Marchetti und Dogan berichten von einem erhöhten Vorkommen in der Gruppe der Niemalsraucher/Niemalsraucherinnen. Bei Marchetti waren 25%, bei Dogan 42,5% von einem EGFR-mutierten Adenokarzinom betroffen (40,41). Somit scheint das Vorkommen dieser Mutation nicht mit dem Tabakkonsum zu korrelieren.

Auch bei Marchetti und Dogan waren besonders Frauen betroffen. So zeigten bei Marchetti 30% aller Patienten/Patientinnen eine Mutation auf. Bei den Männern waren es nur 6% (40). Dogan konnte bei 22,3% der weiblichen und bei 15% der männlichen Patienten/Patientinnen eine EGFR-Mutation nachweisen (41). Im Vergleich zeigt sich in unserer Studie ein Anteil von 17,1% bei Frauen und 2,8% bei Männern mit dieser Mutation. Dieses Ergebnis ist signifikant und bestätigt den bisherigen Stand der Forschung.

Hochmair et al. untersuchten 2014 das Vorkommen von EGFR-Mutationen in NSCLCs österreichischer Patienten/Patientinnen. In dieser Studie waren 12,8% aller Patienten/Patientinnen betroffen, wobei 30% aller Frauen und 8,2% aller Männer einen positiven Mutationsbefund aufwiesen (42).

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten/Patientinnen und einer EGFR-Mutation konnte in keiner der zum Vergleich zugezogenen Studien hergestellt werden. In der, dieser Arbeit zugrundeliegenden, Kohorte ist dieser jedoch mit 71,5 Jahren in Patienten/Patientinnen mit EGFR-mutierten Tumoren und 63,6 Jahren ohne entsprechende Mutation signifikant gegeben ($p < 0,05$). Somit ist anzunehmen, dass EGFR-Mutationen vermehrt in Adenokarzinomen der Lunge von älteren, weiblichen und/oder niemals rauchenden Patienten/Patientinnen auftreten.

Unser Ergebnis zur Häufigkeit des Auftretens von EGFR-Mutationen in der gesamten Kohorte (11,3%) konnte durch bestehende Literatur bestätigt werden.

Das Vorkommen von ALK-Translokationen in Adenokarzinomen bzw. NSCLCs wiesen bereits einige Studien auf (43-45). Rodig untersuchte 358 Tumorpatienten/Tumorpatientinnen, von denen 20, also 5,6%, eine Mutation aufwiesen. Mit 8% war die Prävalenz unter den Männern fast doppelt so hoch, wie bei den Frauen (4,1%) (43). Die andere Kohorte zeigte unter 441 Adenokarzinomen einen Anteil von 6,6% positiv getesteten Patienten/Patientinnen (44). Li et al. berichten in einer großangelegten Studie zu diesem Thema einen Anteil von 200 Translokationen unter 7344 NSCLC (2,7%), wobei die positiv getesteten Tumore zu 94% Adenokarzinome waren (45). Eine österreichische Kohorte wies einen Anteil von 15,3% auf und liegt hiermit deutlich höher als die restlichen Studien (42). Vergleichend hierzu erzielt unsere Studie einen Anteil von 8,1% in 74 untersuchten Tumoren, wobei, gegensätzlich zum Trend in Rodigs Studie, 5,9% der Männer und 10% der Frauen betroffen waren. Bei $p = 0,52$ ist dieses Ergebnis, nach festgelegtem Signifikanzniveau, jedoch nicht als signifikant anzusehen.

Eine Korrelation einer ALK-Translokation mit dem Alter der Patienten/Patientinnen ist in unserer Studie jedoch signifikant gegeben. Das mittlere Alter positiv getesteter Patienten/Patientinnen beträgt 57,2 Jahren, wobei bei Wildtyp-Patienten/-Patientinnen das Mittel bei 65,1 Jahren liegt. Dies bestätigen die Ergebnisse von Rodig et al., deren positive Patienten/Patientinnen im Median 51 Jahre alt sind (Wildtyp: 66 Jahre), mit $p = 0,16$ jedoch keine Signifikanz aufzeigten (43). Auch die zwei anderen erwähnten Kohorten zeigten mit 57 bzw. 54,5 Jahren im Median eine eher junge Gruppe von Patienten/Patientinnen mit ALK-Translokation (44,45).

In der Kohorte von Rodig et al. zeigten 16,5% der Niemalsraucher/Niemalsraucherinnen ein positives Ergebnis. Von den Rauchern/Raucherinnen waren nur 2,5% betroffen (43). Unsere Studie zeigte in 11,8% der Niemalsrauchern/Niemalsraucherinnen eine ALK-Translokation. In Rauchern/Raucherinnen bzw. ehemaligen Rauchern/Raucherinnen konnte diese nur in 6,3% der Fälle, also mit einer ähnlichen Tendenz wie in genannter Studie, nachgewiesen werden. Auch hier kann infolgedessen, wie schon bei EGFR, kein direkter Zusammenhang mit dem Tabakkonsum bestätigt werden.

Zwei Studien konnten einen Zusammenhang zwischen fortgeschrittenen Adenokarzinomen und dem Vorhandensein eines ALK-EML4-Fusiongens herstellen (43,44). In der einen zeigten sich 16 von 20 positiv getesteten Tumoren bereits im Stadium IV. Dies entspricht 17,2% aller Tumoren in diesem Stadium (43). McLeer-Florin et al. berichten von 18 positiven Patienten/Patientinnen in Stadium IV, sowie fünf in Stadium IIIB. Dies entspricht 79,3% aller Tumoren mit einer ALK-EML4-Translokation (44). Die sechs in unserer Studie positiv getesteten Patienten/Patientinnen hingegen wiesen in drei Fällen ein Stadium IIIA und in drei weiteren Fällen ein Stadium I auf. Somit lässt sich das Ergebnis der erwähnten Studien nicht bestätigen. Hierbei ist zu erwähnen, dass nur fünf Patienten/Patientinnen in Stadium IV Teil der Kohorte sind, von denen vier auf eine ALK-Translokation untersucht wurden und das Ergebnis statistisch nicht signifikant ist ($p=0,59$).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass eine ALK-Translokation vermehrt bei jungen Patienten/Patientinnen und Nichtrauchern/Nichtraucherinnen aufzutreten scheint. Ein gehäuftes Auftreten dieses Fusion-Gens in fortgeschrittenen Tumorstadien konnte unsere Studie weder bestätigen noch entkräften, da die Mehrzahl der Patienten/Patientinnen unserer Studie im potenziell kurativen, früheren Stadium war.

Eine KRAS-Mutation ließ sich in über einem Drittel (39,3%) der Raucher/Raucherinnen bzw. ehemaligen Raucher/Raucherinnen unserer Kohorte nachweisen. Dieses Ergebnis bestätigt den bisherigen Stand der Forschung, welches unter anderem in einer Studie von 2012 und einer Meta-Analyse von 22 Studien 2010 nachgewiesen werden konnte (41,46). Dogan et al. berichten in ihrer Studie von 34% positiv getesteten Rauchern/Raucherinnen bzw. ehemaligen Rauchern/Raucherinnen unter den Adenokarzinom-Patienten/-Patientinnen (41). Maos Analyse umfasste allgemein NSCLC. Diese kam zu einem Ergebnis von 25% positiv auf KRAS-Mutationen getesteter Patienten/Patientinnen in der Gruppe der ehemaligen und akuten Raucher/Raucherinnen. Vergleichend zeigten 26,5% aller

Adenokarzinome in Dogans und 26% in Maos Studie eine Mutation im KRAS-Gen (41,46). Dieses Ergebniss kann unsere Analyse mit 28,6% absolut bestätigen.

Die Geschlechterverteilung zeigt sich bei den KRAS-mutierten Tumoren in beiden Vergleichsstudien relativ ausgewogen.

Unsere Statistiken der BRAF-Analyse konnten leider keine signifikanten Ergebnisse liefern.

In einer Metaanalyse aus 16 Studien, die insgesamt 11.711 NSCLC-Patienten/-Patientinnen untersuchten, einen Anteil von 2,78% BRAF-mutierten Tumoren unter den Adenokarzinomen (47).

Eine Studie von 2011 beinhaltet 3% Adenokarzinome mit BRAF-Mutation, die alle in Rauchern/Raucherinnen bzw. ehemaligen Rauchern/Raucherinnen nachgewiesen wurden (48). A. Marchetti et al. konnten in ihrer Kohorte aus dem gleichen Jahr einen Anteil von 4,9% BRAF-mutierten Adenokarzinomen präsentieren, die jedoch auf Raucher/Raucherinnen und Nichtraucher/Nichtraucherinnen relativ ähnlich verteilt waren (4,8% zu 5%). Alle positiv getesteten Nichtraucher/Nichtraucherinnen wiesen hierbei eine T1799A-Mutation im Exon 15 auf, die eine Aminosäuresubstitution von V600E zufolge hat (39).

Im Vergleich zu diesen drei Studien wies unsere Kohorte bei 42 untersuchten Patienten/Patientinnen vier (9,5%) BRAF-mutierte Tumore auf, deren Proben ausnahmslos Rauchern/Raucherinnen oder ehemaligen Rauchern/Raucherinnen entstammen.

Da kein Patient/keine Patientin unserer Kohorte eine ROS1-Translokation aufwies, ist es an dieser Stelle nicht möglich, aufgrund unserer Ergebnisse, die Rolle dieser Mutation in Adenokarzinomen der Lunge zu benennen. Jedoch zeigten in einer Studie mit 1478 NSCLC-Patienten/-Patientinnen neun (0,6%) eine ROS1-Translokation. Von den 695, in dieser Studie involvierten, Adenokarzinomen waren acht im ROS1-Gen verändert (1,2%). Des Weiteren schienen in diesem Kollektiv Frauen eher betroffen gewesen zu sein (49).

5 FAZIT

Wie erwartet, scheinen die verschiedenen Mutationen von unterschiedlichen Faktoren begünstigt zu werden. Trotzdem wichen unsere Ergebnisse teilweise von den erwarteten, von bisheriger Forschung beschrieben, Ergebnissen ab. Unsere Kohorte zeigte mit 8,1% einen vergleichsweise hohen Anteil an ALK-positiven Tumoren. Auch Patienten mit positivem BRAF-Status nehmen in dieser Studie mit 9,5% eine bedeutendere Rolle ein, als in ähnlichen Kohorten. ROS1-Mutationen waren mit rund einem Prozent erwartet, konnten in den untersuchten Tumoren jedoch nicht nachgewiesen werden. Diese Abweichungen können vermutlich durch die geringe Anzahl an Patienten in der Kohorte erklärt werden.

Andere zentrale Ergebnisse, wie das Auftreten von EGFR-Mutationen, auch in Korrelation mit Geschlecht und Raucherstatus, decken sich mit bereits veröffentlichten Studien zu diesem Thema. Unsere Ergebnisse bezüglich des Zusammenhangs zwischen positivem EGFR-Status und Alter der Patienten beschreibt keine der, in dieser Arbeit erwähnten, Vergleichsstudien.

Es bleibt zu erwähnen, dass die Möglichkeiten des Screenings bzw. die spezifischen Therapien, die diese genetische Diskriminierung und Behandlung der Adenokarzinome der Lunge ermöglichen, auch Teil künftiger Forschung sein sollten, um den Patienten/Patientinnen einen optimalen Outcome ermöglichen zu können. Besonders mit neuen Verfahren, wie NGS, ist es heutzutage einfacher denn je Tumore und ihre Tumorzellen genetisch zu charakterisieren, wodurch ihre Entstehungsgrundlage verstanden und ihre optimalen Angriffspunkte aufgedeckt werden können.

LITERATURVERZEICHNIS

(1) Ridge CA, McErlean AM, Ginsberg MS. Epidemiology of lung cancer. *Semin Intervent Radiol* 2013 Jun;30(2):93-98.

(2) Didkowska J, Wojciechowska U, Manczuk M, Lobaszewski J. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. *Ann Transl Med* 2016 Apr;4(8):150.

(3) Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer* 2007 Oct;7(10):778-790.

(4) G. Goeckenjan ea. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms
Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. 2010.

(5) Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Rosso T, Boffetta P, Levi F, et al. European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias. *Ann Oncol* 2016 Apr;27(4):725-731.

(6) Borsoi L, Kunze U, Kunze M, Groman E, Kundi M. Trends in mortality and mean age at death from lung cancer in Austria (1975-2007). *Cancer Epidemiol* 2011 Apr;35(2):120-125.

(7) Österreichisches Krebsregister. STATISTIK AUSTRIA. 2016.

(8) Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. 2017.

(9) Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. Lungentumoren. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, editors. *Harrisons Innere Medizin*. 18th ed.; 2012. p. 789-806.

(10) Postmus P,E., Kerr K,M., Oudkerk,M., Senan,S., Waller D,A., Vansteenkiste,J., et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up . *Annals of Oncology* 2017;28(suppl_4):iv1-iv21.

- (11) Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Lungenkarzinom. In: Suttrop N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, editors. *Harrisons Innere Medizin*. 19th ed.; 2015. p. 615-634.
- (12) Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 2015 Sep;10(9):1243-1260.
- (13) Petersen I. The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Dtsch Arztebl Int* 2011 Aug;108(31-32):525-531.
- (14) Tsim S, O'Dowd CA, Milroy R, Davidson S. Staging of non-small cell lung cancer (NSCLC): a review. *Respir Med* 2010 Dec;104(12):1767-1774.
- (15) Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med* 2011 Dec;32(4):605-644.
- (16) Ochsner A, Debaeky M. Primary pulmonary malignancy: treatment by total pneumonectomy; analysis of 79 collected cases and presentation of 7 personal cases. *Ochsner J* 1999 Jul;1(3):109-125.
- (17) Thun MJ, Lally CA, Flannery JT, Calle EE, Flanders WD, Heath CW, Jr. Cigarette smoking and changes in the histopathology of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997 Nov 5;89(21):1580-1586.
- (18) Mollerup S, Jorgensen K, Berge G, Haugen A. Expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung tissue and cell lines. *Lung Cancer* 2002 Aug;37(2):153-159.
- (19) Reck M, Wolf M, Heigener DF. Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom. In: Zeller WJ, zur Hausen H, editors. *Onkologie Grundlagen - Diagnostik - Therapie - Entwicklungen*; 2016.
- (20) Mirsadraee S, Oswal D, Alizadeh Y, Caulo A, van Beek E, Jr. The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World J Radiol* 2012 Apr 28;4(4):128-134.
- (21) Fröhling S. Aktuelle Entwicklungen in der molekularzielgerichteten Therapie solider Tumoren. In: Zeller WJ, zur Hausen H, editors. *Onkologie Grundlagen - Diagnostik - Therapie - Entwicklung: ecomed Medizin*; 2016.
- (22) Hagemann IS, Devarakonda S, Lockwood CM, Spencer DH, Guebert K, Bredemeyer AJ, et al. Clinical next-generation sequencing in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer* 2015 Feb 15;121(4):631-639.
- (23) Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004 Jun 4;304(5676):1497-1500.

- (24) Pao W, Hutchinson KE. Chipping away at the lung cancer genome. *Nat Med* 2012 Mar 6;18(3):349-351.
- (25) Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 2005 Feb 1;23(4):857-865.
- (26) Wong DW, Leung EL, So KK, Tam IY, Sihoe AD, Cheng LC, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* 2009 Apr 15;115(8):1723-1733.
- (27) Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007 Aug 2;448(7153):561-566.
- (28) Aisner DL, Marshall CB. Molecular pathology of non-small cell lung cancer: a practical guide. *Am J Clin Pathol* 2012 Sep;138(3):332-346.
- (29) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004 May 20;350(21):2129-2139.
- (30) Tam IY, Chung LP, Suen WS, Wang E, Wong MC, Ho KK, et al. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 2006 Mar 1;12(5):1647-1653.
- (31) Mano H. Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer Sci* 2008 Dec;99(12):2349-2355.
- (32) Mano H. The EML4-ALK oncogene: targeting an essential growth driver in human cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2015;91(5):193-201.
- (33) Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014 Nov 20;371(21):1963-1971.
- (34) Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Shimada Y, et al. ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. *Am J Surg Pathol* 2013 Apr;37(4):554-562.
- (35) Westcott PM, To MD. The genetics and biology of KRAS in lung cancer. *Chin J Cancer* 2013 Feb;32(2):63-70.
- (36) Roberts PJ, Stinchcombe TE. KRAS mutation: should we test for it, and does it matter? *J Clin Oncol* 2013 Mar 10;31(8):1112-1121.

- (37) Guan JL, Zhong WZ, An SJ, Yang JJ, Su J, Chen ZH, et al. KRAS mutation in patients with lung cancer: a predictor for poor prognosis but not for EGFR-TKIs or chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 2013 Apr;20(4):1381-1388.
- (38) Cardarella S, Ogino A, Nishino M, Butaney M, Shen J, Lydon C, et al. Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2013 Aug 15;19(16):4532-4540.
- (39) Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, Grazia Sciarrotta M, Guetti L, Chella A, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011 Sep 10;29(26):3574-3579.
- (40) Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 2005 Feb 1;23(4):857-865.
- (41) Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res* 2012 Nov 15;18(22):6169-6177.
- (42) Hochmair MJ, Holzer S, Setinek U. O1. EGFR, EML4-ALK and ROS 1 testing in Austrian patients with NSCLC: a multicentre study. 2014.
- (43) Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res* 2009 Aug 15;15(16):5216-5223.
- (44) McLeer-Florin A, Moro-Sibilot D, Melis A, Salameire D, Lefebvre C, Ceccaldi F, et al. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J Thorac Oncol* 2012 Feb;7(2):348-354.
- (45) Li T, Maus MK, Desai SJ, Beckett LA, Stephens C, Huang E, et al. Large-scale screening and molecular characterization of EML4-ALK fusion variants in archival non-small-cell lung cancer tumor specimens using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Thorac Oncol* 2014 Jan;9(1):18-25.
- (46) Mao C, Qiu LX, Liao RY, Du FB, Ding H, Yang WC, et al. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer* 2010 Sep;69(3):272-278.
- (47) Cui G, Liu D, Li W, Fu X, Liang Y, Li Y, et al. A meta-analysis of the association between BRAF mutation and nonsmall cell lung cancer. *Medicine (Baltimore)* 2017 Apr;96(14):e6552.

(48) Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011 May 20;29(15):2046-2051.

(49) Warth A, Muley T, Dienemann H, Goeppert B, Stenzinger A, Schnabel PA, et al. ROS1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer: clinicopathological analysis of 1478 cases. *Histopathology* 2014 Aug;65(2):187-194.