

Aus dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg

Direktor: Prof. Dr. R. M. Bohle

**Prognostische Bedeutung der Mutationslast von EGFR und KRAS in  
Adenokarzinomen der Lunge**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin*

der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von: Michelle Natalie Haffner

geb. am: 12.02.1994 in Koblenz

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Zusammenfassung .....	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Definition und Grundlagen .....	4
2.2	Ätiologie des Lungenkrebses .....	5
2.2.1	Allgemeines .....	5
2.2.2	Genetische Faktoren.....	6
2.2.2.1	EGFR-Gen .....	6
2.2.2.1.1	Grundlagen.....	6
2.2.2.1.2	Mutationen im EGFR-Gen.....	7
2.2.2.1.2.1	„Häufige EGFR-Mutationen“ .....	8
2.2.2.1.2.2	Synonyme Veränderungen im EGFR-Gen.....	10
2.2.2.2	KRAS-Gen.....	11
2.2.2.2.1	Grundlagen.....	11
2.2.2.2.2	Mutationen im KRAS-Gen .....	12
2.3	Diagnostik.....	13
2.3.1	Mutationslast als Biomarker .....	14
2.4	Zielsetzung.....	15
3	Material und Methodik .....	16
3.1	Material.....	16
3.1.1	Kollektivstruktur und Datenerhebung .....	16
3.1.2	Verwendete Software.....	18
3.2	Methoden .....	19
3.2.1	Auswertung der Mutationsanalysen .....	19
3.2.2	Bestimmung der Mutationslast .....	20
3.2.3	Einteilung in Unterkollektive.....	21
3.2.4	Vergleichende Analyse der Mutationslast.....	22
3.2.5	Klinisch-histopathologische Standardparameter .....	23

3.2.6	Überlebensanalysen.....	23
3.2.7	Statistische Auswertung.....	24
4	Ergebnisse.....	25
4.1	Häufigkeitsverteilung der klinisch-histopathologischen Standardparameter.....	25
4.2	Ergebnisse der Mutationsanalysen.....	29
4.2.1	Mutationsanalyse des EGFR-Gens.....	29
4.2.1.1	Allgemein.....	29
4.2.1.2	Synonyme Mutation/Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) Q787Q.....	31
4.2.2	Mutationsanalyse des KRAS-Gens.....	32
4.3	Einteilung in Unterkollektive.....	32
4.3.1	Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“ 32	
4.3.2	Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“	33
4.3.3	Unterkollektiv „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“ ...	33
4.3.4	Gruppenbildung anhand der Mutationslast.....	34
4.4	Bedeutung der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutationslast für die klinisch-histopathologischen Standardparameter.....	37
4.4.1	Klinisch-histopathologische Standardparameter im Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“.....	38
4.4.1.1	Ansatz 1: Untersuchung der Gruppe mit Wildtyp im EGFR-Gen und der Gruppe mit ‚häufiger EGFR-Mutation“.....	38
4.4.1.2	Ansatz 2: Untersuchung der am Median orientierten Gruppenbildung.....	43
4.4.1.3	Ansatz 3: Untersuchung der an Terzilen orientierten Gruppenbildung.....	45
4.4.1.4	Ansatz 4: Untersuchung der an der MT/WT-Ratio 1 orientierten Gruppenbildung... ..	48
4.4.2	Klinisch-histopathologische Standardparameter im Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“.....	51
4.4.2.1	Ansatz 1: Untersuchung der Gruppe mit Wildtyp im KRAS-Gen und der Gruppe mit Mutation im KRAS-Gen.....	51
4.4.2.2	Ansatz 2: Untersuchung der am Median orientierten Gruppenbildung.....	53
4.4.2.3	Ansatz 3: Untersuchung der an Terzilen orientierten Gruppenbildung.....	55

4.4.2.4	Ansatz 4: Untersuchung der an der MT/WT-Ratio von 1 orientierten Gruppenbildung	57
4.4.3	Klinisch-histopathologische Standardparameter im Unterkollektiv „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“ .....	60
4.5	Prognostische Bedeutung der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutationslast ...	62
4.5.1	Prognostische Bedeutung der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutationslast im EGFR-Gen (19-del/21-L858R).....	62
4.5.2	Prognostische Bedeutung der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutationslast im KRAS-Gen (Exon 2, Codon12/13).....	66
4.5.3	Prognostische Bedeutung der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Q787Q-Last (Exon 20 im EGFR-Gen) .....	69
5	Diskussion .....	78
5.1	Häufigkeitsverteilung der klinisch-histopathologischen Standardparameter.....	78
5.2	Mutationsanalysen .....	79
5.3	Bestimmung der semiquantitativen Mutationslast und Gruppenbildung .....	80
5.4	Bedeutung der Mutationen und ihrer semiquantitativen Last für die klinisch-histopathologischen Parameter und die Prognose.....	82
5.4.1	„Häufige EGFR-Mutationen“ (19-del/21-L858R) .....	82
5.4.2	Mutationen in Exon 2 des KRAS-Gens .....	84
5.4.3	Der Q787Q Einzelnukleotid-Polymorphismus (Exon 20 im EGFR-Gen).....	85
5.5	Fazit: Mutationslast und Allelfrequenz.....	88
6	Literaturverzeichnis .....	89
7	Publikation.....	96
8	Dank .....	97
9	Anhang .....	98
9.1	TNM-Klassifikation und IASLC / UICC8 Stadieneinteilung.....	98
9.2	Ergebnisse der Mutationsanalyse.....	101
9.2.1	Mutationen im Gesamtkollektiv.....	101
9.2.2	Mutationen im EGFR-Gen.....	102
9.2.2.1	„Häufige EGFR-Mutationen“ .....	102

9.2.2.2	„Seltene Mutationen“ .....	104
9.2.2.3	Multiple Mutationen .....	105
9.2.3	Mutationen im KRAS-Gen .....	106
9.3	Genderhinweis .....	107
10	Lebenslauf.....	108

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chromatogramm eines Falls mit Wildtypsequenz in Exon 18 (Codon 702-704) .....	19
Abbildung 2: Ermittlung der Mutationslast bei einem Fall mit der KRAS-Mutation Gly12Cys.....	20
Abbildung 3: Ermittlung der Mutationslast bei einem Fall mit der Deletionsmutation delE746-A750 (EGFR-Gen, Exon 19).....	21
Abbildung 4: Alter zum Diagnosezeitpunkt.....	25
Abbildung 5: Raucherstatus in den Gruppen ohne und mit „häufiger EGFR-Mutation“.....	38
Abbildung 6: Verteilung des Parameters p <sub>ys</sub> in den Gruppen mit Wildtyp im EGFR-Gen (MD=40 p <sub>ys</sub> ) und der Gruppe mit „häufiger EGFR-Mutation“ (MD=15 p <sub>ys</sub> ).....	38
Abbildung 7: Geschlechterverteilung in den Gruppen mit und ohne „häufige EGFR-Mutation“.....	39
Abbildung 8: Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der Raucherhistorie.....	39
Abbildung 9: Geschlechterverteilung in anhand der Raucherhistorie gebildeten Subgruppen .....	40
Abbildung 10: (Ex)raucherverteilung in anhand vom Geschlecht gebildeten Subgruppen.....	40
Abbildung 11: Zusammenhang zwischen Mutationen im EGFR-Gen und Mutationen im KRAS-Gen41	
Abbildung 12: (Ex)raucherverteilung in den anhand des Medians gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“) .....	43
Abbildung 13: Geschlechterverteilung in den anhand des Medians gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“) .....	43
Abbildung 14: (Ex)raucherverteilung in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“) .....	45
Abbildung 15: Geschlechterverteilung in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“) .....	46
Abbildung 16: (Ex)raucherverteilung in den anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“).....	48
Abbildung 17: Geschlechterverteilung in den anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“).....	49
Abbildung 18: Geschlechterverteilung in den Gruppen ohne Mutation im KRAS-Gen und mit Mutation im KRAS-Gen.....	51
Abbildung 19: Regionäre Lymphknotenmetastasierung in den Gruppen ohne KRAS-Mutation und mit KRAS-Mutation.....	51
Abbildung 20: Fernmetastasierung in den Gruppen ohne KRAS-Mutation und mit KRAS-Mutation. 52	
Abbildung 21: Regionäre Lymphknotenmetastasierung in den anhand des Medians gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“) .....	53
Abbildung 22: Regionäre Lymphknotenmetastasierung in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“).....	55

Abbildung 23: Regionäre Lymphknotenmetastasierung in anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“) .....	57
Abbildung 24: Fernmetastasierung in anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“).....	58
Abbildung 25: Fernmetastasierung in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“).....	60
Abbildung 26: Gegenüberstellung des Überlebens bei Patienten mit unterschiedlich hoher EGFR-Mutationslast.....	63
Abbildung 27: Gegenüberstellung des DSS bei Patienten mit unterschiedlich hoher EGFR-Mutationslast in der Subgruppe „Stadium IIIB-IV“ .....	65
Abbildung 28: Gegenüberstellung des OS bei Patienten mit unterschiedlich hoher KRAS-Mutationslast.....	67
Abbildung 29: Gegenüberstellung des Überlebens in den Gruppen ohne und mit Q787Q SNP .....	69
Abbildung 30: OS in den Gruppen mit unterschiedlich hoher Q787Q-Last .....	70
Abbildung 31: Auswirkung des Q787Q SNP auf das Überleben in der Subgruppe „Alter $\geq$ 65 Jahre“ .	71
Abbildung 32: Auswirkung des Q787Q SNP auf das OS in der Subgruppe „(Ex)raucher“ .....	72
Abbildung 33: Gegenüberstellung des OS in Gruppen mit unterschiedlich hoher Q787Q-Last in der Subgruppe „(Ex)raucher“ .....	74
Abbildung 34: Gegenüberstellung des Überlebens von über 65-jährigen Patienten mit positiver Raucheranamnese mit und ohne den Q787Q SNP .....	75
Abbildung 35: Gegenüberstellung des Überlebens von unter 65-jährigen Patienten mit positiver Raucheranamnese mit und ohne den Q787Q SNP .....	76

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verwendete Software.....	18
Tabelle 2: Klinische Standardparameter des Gesamtkollektivs .....	27
Tabelle 3: Histopathologische Standardparameter des Gesamtkollektivs .....	28
Tabelle 4: Mutationen im EGFR-Gen.....	29
Tabelle 5: Mutationsanalyse des EGFR-Gens .....	30
Tabelle 6: Mutationen im EGFR-Gen mit Komutation im KRAS-Gen.....	31
Tabelle 7: Vorkommen des Q787Q SNP im Zusammenhang mit EGFR-Mutationen.....	31
Tabelle 8: Vorkommen des Q787Q SNP im Zusammenhang mit KRAS-Mutationen .....	31
Tabelle 9: Gruppenbildung im Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“ .....	34
Tabelle 10: Gruppenbildung im Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“ .....	35
Tabelle 11: Gruppenbildung im Unterkollektiv „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“ .....	36
Tabelle 12: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den Gruppen ohne und mit „häufiger EGFR-Mutation“ .....	42
Tabelle 13: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den anhand des Medians gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“)..	44
Tabelle 14: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“)..	47
Tabelle 15: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“)..	50
Tabelle 16: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den Gruppen ohne und mit Mutation im KRAS-Gen.....	52
Tabelle 17: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den anhand des Medians gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“) .....	54
Tabelle 18: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“) .....	56
Tabelle 19: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den Gruppen, die anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildet wurden (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“)..	59

Tabelle 20: Zusammenstellung der p-Werte der Analyse der klinisch-histopathologischen Standardparameter in den verschiedenen Ansätzen (Unterkollektiv „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“) .....	61
Tabelle 21: Univariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten ohne und mit 19-del/21-L858R nach klinisch-histopathologischen Variablen.....	64
Tabelle 22: Univariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten ohne und mit Mutation im KRAS-Gen nach klinisch-histopathologischen Variablen .....	68
Tabelle 23: Sterbetafel für Patienten ohne und mit Q787Q SNP in der Subgruppe „(Ex)raucher“ .....	72
Tabelle 24: Gegenüberstellung des OS in der Gruppe ohne Q787Q SNP und den Gruppen mit hoher Q787Q-Last in der Subgruppe „(Ex)raucher“ .....	73
Tabelle 25: Univariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten ohne und mit Q787Q SNP nach klinisch-histopathologischen Variablen .....	77
Tabelle 26: TNM-Klassifikation der Lungenkarzinome, T-Stadium .....	98
Tabelle 27: TNM-Klassifikation der Lungenkarzinome, N- und M-Stadium.....	99
Tabelle 28: Klassifikation der Tumorstadien des Lungenkarzinoms nach UICC (8. Auflage).....	100
Tabelle 29: Mutationen im EGFR-Gen.....	101
Tabelle 30: Mutationen im KRAS-Gen .....	101
Tabelle 31: Fälle mit Deletionen in Exon 19 .....	102
Tabelle 32: Fälle mit der Punktmutation L858R.....	103
Tabelle 33: Fälle mit „seltenen Mutationen“ .....	104
Tabelle 34: Fälle mit multiplen Mutationen.....	105
Tabelle 35: Fälle mit Mutation im KRAS-Gen.....	106

## Abkürzungsverzeichnis

19-del	Deletionsmutation in Exon 19
21-L858R	Punktmutation L858R in Exon 21
ADC	Adenokarzinom
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
Bp	Basenpaare
BRAF	„proto-oncogene B-Raf“ oder „v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1“
d	days (Tage)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSS	Disease Specific Survival (krankheitsspezifisches Überleben)
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
erbB1	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
et al.	et alii
G	Grading (Differenzierungsgrad)
GDP	Guanindiphosphat
GFRB2	Growth Factor Receptor-Bound Protein 2
GTP	Guanintriphosphat
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HRAS-Gen	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
Kb	Kilobasenpaare
KRAS-Gen	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
m	months (Monate)
Mb	Megabasenpaare
MD	Median
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen
MT/WT-Ratio	Mutationslast
NGS	Next-Generation-Sequencing (Hochdurchsatz-Sequenzierung)
NRAS-Gen	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
OP	Operation
OS	Overall Survival (Gesamtüberleben)
pADC	pulmonales Adenokarzinom
PEC	Plattenepithelkarzinom
pPEC	pulmonales Plattenepithelkarzinom
Pys	pack years (Packungsjahre)
RAF	Rapidly Accelerating Fibrosarcoma
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS1	C-Ros Oncogene 1

SCLC	Small Cell Lung Cancer (kleinzelliges Lungenkarzinom)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SOS	Son of Sevenless
TGF-alpha	Transforming Growth Factor alpha
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitoren
UICC	Union internationale contre le cancer
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
vs.	versus
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

<b>Aminosäure</b>	<b>Dreibuchstabencode</b>	<b>Einbuchstabencode</b>
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Tryptophan	Trp	W
Valin	Val	V

# 1 Zusammenfassung

---

Lungenkrebs gehört mit ca. 57500 Neuerkrankungen im Jahr zu den häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland. Da die Tumorerkrankung in über 50 % der Fälle erst diagnostiziert wird, wenn bereits eine Fernmetastasierung vorliegt, ist eine komplette Tumorentfernung oft nicht mehr möglich. Bei diesen Patienten kommt der medikamentösen Therapie eine besondere Bedeutung zu. Noch vor wenigen Jahren stellte die Chemotherapie die einzig mögliche medikamentöse Therapieform dar. Mittlerweile ist bekannt, dass sich die Tumore im Hinblick auf ihre genetischen Eigenschaften unterscheiden und mehrere Angriffspunkte für neue zielgerichtete Medikamente bieten.

Beim pulmonalen Adenokarzinom, das geschlechtsabhängig ca. 36-46 % der malignen pulmonalen Neoplasien ausmacht, liegen je nach Ethnizität der Betroffenen und Studie in ca. 10-50 % der Fälle Mutationen im EGFR-Gen und in ca. 15-30 % der Fälle Mutationen im KRAS-Gen als onkogene Treiber vor. Während sich für Patienten mit Treibermutation im EGFR-Gen bereits prognoseverbessernde zielgerichtete Medikamente etabliert haben, befinden sich zielgerichtete Medikamente für Patienten mit KRAS-Mutation derzeit noch in Entwicklung.

Zum Auffinden von Mutationen werden die 1977 vorgestellte Sanger-Sequenzierung und die 2005 eingeführte Hochdurchsatz-Sequenzierung (Next-Generation-Sequenzierung) verwendet. Die Hochdurchsatz-Sequenzierung ermöglicht erstmalig auch eine quantitative Bestimmung von Mutationen im Tumor. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass diese quantitative Bestimmung von Mutationen für die Prognose und Prädiktion von Bedeutung sein kann.

Mit der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Technik soll anhand von in pulmonalen Adenokarzinomen vorliegenden EGFR- und KRAS-Mutationen herausgefunden werden, ob auch die semiquantitative Bestimmung von Mutationen – die durch die Sanger-Sequenzierung retrospektiv ermöglicht wird – von diagnostischer und klinischer Relevanz ist.

In dem Kollektiv von 376 Patienten mit EGFR-Mutationsanalyse wurden bei 35 Patienten (9 %) aktivierende Mutationen im EGFR-Gen nachgewiesen. Die semiquantitative Mutationslast konnte bei 34 dieser Patienten ermittelt werden. Eine hohe EGFR-Mutationslast ging bei Patienten in den UICC-Stadien IIIB-IV mit einem längeren krankheitsspezifischen Überleben einher.

Am häufigsten waren nicht-synonyme Mutationen im KRAS Exon 2 auffindbar. In dem Kollektiv von 104 Patienten mit KRAS-Mutationsanalyse konnten bei 31 Patienten (30 %) KRAS-Mutationen nachgewiesen werden. Die semiquantitative Mutationslast konnte bei 23 dieser Patienten ermittelt werden. Eine hohe KRAS-Mutationslast traf signifikant häufig mit dem Status „N0“ zusammen.

Die Arbeit weist darauf hin, dass es durch die semiquantitative Analyse möglich ist, Mutationsträger mit pulmonalem Adenokarzinom noch differenzierter zu betrachten: Demnach ähneln die klinisch-histopathologischen Standardparameter und die Prognose von Patienten mit niedriger Mutationslast mehr denen von Patienten ohne Mutation als denen von Patienten mit hoher Mutationslast.

Dieses Ergebnis könnte durch Mutationslastanalysen multipler prognoserelevanter Gene bestätigt werden, sodass auch eine prädiktive Wertung möglich ist.

## Summary

---

### **Prognostic relevance of EGFR and KRAS mutation burden in adenocarcinomas of the lung**

With approximately 57500 new cases a year lung cancer is one of the leading malignant neoplasms in Germany. Extrapulmonary metastases are present in over 50 % of cases at initial diagnosis. Therefore complete surgical excision is often not feasible and drug therapy is of great importance. Just a few years ago chemotherapy was the only possible form of drug therapy. It has recently been proven that tumors differ in genetic characteristics and thus offer multiple points of attack for new, targeted drugs.

Pulmonary adenocarcinoma accounts, depending on gender, for about 36-46 % of all cases of pulmonary neoplasia. Depending on ethnicity and study, it harbors EGFR mutations in approximately 10-50 % of cases and KRAS mutations in approximately 15-30 % of cases. Nowadays prognostic-improving targeted drugs have already been established for patients with driver mutations in the EGFR gene, whereas targeted drugs for patients with KRAS mutations are still in development.

In order to detect mutations, the Sanger sequencing method, which was developed in 1977, as well as the next-generation sequencing method, which was introduced in 2005, are used. For the first time, next-generation sequencing also allows a quantitative determination of mutations in the tumor. Recent studies indicate that this quantitative determination of mutations could be important for prognosis and prediction.

The technique used in the present work aims to find out, on the basis of EGFR and KRAS mutations in pulmonary adenocarcinomas, whether the semiquantitative determination of mutations - which is also made possible retrospectively by Sanger sequencing - is of diagnostic and clinical relevance.

In a collection of 376 patients with EGFR mutation analysis, activating mutations were detected in 35 patients (9 %). The semi-quantitative mutation burden could be determined in 34 of these patients. High EGFR mutation burden was associated with longer tumor-specific survival in patients in UICC stages IIIB-IV.

Exon 2 was analyzed for KRAS non-synonymous mutations. In the tumor group mutations were detected in 31 of 104 patients (30 %). The semi-quantitative mutation burden could be determined in 23 of these patients. High KRAS mutation burden significantly frequently coincided with "N0" status.

This work indicates that the semiquantitative analysis of mutation status allows prediction of clinical outcome. This study shows that the prognosis of patients with low mutation burden is more similar to that of patients without mutations than to that of patients with high mutation burden.

This conclusion could be confirmed by mutation load analyses of multiple prognosis-relevant genes in terms of their predictive value.

## 2 Einleitung

---

### 2.1 Definition und Grundlagen

Bei Lungenkarzinomen handelt es sich um epitheliale Malignome des Lungenparenchyms, die primär in der Lunge entstanden sind (Moch et al., 2019, p. 137; Savic Prince und Bubendorf, 2019, p. 512).

Sie können gemäß der WHO-Klassifikation von 2021 durch histopathologische Begutachtung in folgende Hauptgruppen unterteilt werden (Tsao et al., 2021, pp. 19-28):

- Adenokarzinome (ADC),
- Plattenepithelkarzinome (PEC),
- Neuroendokrine Neoplasien und
- Großzellige Karzinome.

Mit über 50 % hatte das pulmonale Adenokarzinom (pADC) in den USA in den Jahren 2012-2016 den größten Anteil unter den Lungenkarzinomen. Danach folgten mit einem Anteil von 22 % die Plattenepithelkarzinome. An dritter Stelle standen mit 13 % die kleinzelligen Karzinome, die gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation (2021) zu den neuroendokrinen Neoplasien gezählt werden. Großzellige Karzinome kamen mit einem Anteil von 1 % eher selten vor (Tsao et al., 2021, p. 20).

Die Subtypisierung von Lungenkarzinomen ist klinisch sehr wichtig, da je nach Diagnose die Prognose stark variiert und unterschiedliche Therapien im Vordergrund stehen (Collins et al., 2007; Molina et al., 2008; Wagner und Buettner, 2020; Savic Prince und Bubendorf, 2019, p. 514).

In den Jahren 2015-2016 lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate von Frauen mit Lungenkrebs bei ca. 21 % und von Männern bei ca. 15 % (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019). Das mediane Überleben der Patienten betrug nach dem Diagnosezeitpunkt noch ca. 10-12 Monate (Savic Prince und Bubendorf, 2019, p. 512). Damit gehört Lungenkrebs zu einem der prognostisch ungünstigeren Tumore (Bohle und Fink, 2018, p. 355).

Neoplasien der Lunge standen in Deutschland im Jahr 2015 nach kardiovaskulären Ursachen an der Spitze der häufigsten Todesursachen (Statistisches Bundesamt [Destatis], 2017).

Die eher schlechte Prognose rührt unter anderem daher, dass die Diagnose in über der Hälfte der Fälle erst dann erfolgt, wenn bereits eine Metastasierung vorliegt. Über 50 % aller nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome (NSCLC) und 69-72 % der kleinzelligen Lungenkarzinome (SCLC) werden erst in bereits metastasiertem Stadium diagnostiziert (Kraywinkel und Schönfeld, 2018; Kraywinkel und Barnes, 2017).

Obgleich Lungenkarzinome bei Menschen mit Raucherhistorie häufiger als bei Nierauchern und bei Männern häufiger als bei Frauen vorkommen, wird das pulmonale Adenokarzinom relativ häufig bei Nierauchern und Frauen gefunden. So lag der Anteil von Nierauchern bei Patienten mit pulmonalem Adenokarzinom (pADC) in einer Studie von Siegel et al. (2021) bei immerhin ca. 16 %, während er bei Patienten mit pulmonalem Plattenepithelkarzinom (pPEC) nur bei ca. 7 % lag. Bei Frauen, die in Deutschland 2013 und 2014 an einer pulmonalen Neoplasie erkrankten, lag der Anteil von pADCs mit 46 % weit über dem von pPECs mit 15 % (Kraywinkel und Schönfeld, 2018).

Seit dem 01.01.2017 ist für das NSCLC die Stadieneinteilung nach IASLC/UICC8 gültig (siehe Punkt 9.1, Tabellen 26-28).

## 2.2 Ätiologie des Lungenkrebses

### 2.2.1 Allgemeines

Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung von malignen Lungentumoren zählt die Exposition gegenüber Zigaretten, Asbestfeinstaub, Kokereigas, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, radioaktiver Strahlung, Arsen, Quarz- und Nickelstäuben (Molina et al., 2008; Savic Prince und Bubendorf, 2019, pp. 512-513). Liegen mehrere Risikofaktoren vor, potenziert sich das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, um ein Vielfaches (Bhopal et al., 2019).

Auf das Rauchen sind 90 % der Lungentumore beim Mann und 60-80 % der Lungentumore bei der Frau zurückzuführen (Molina et al., 2008). Durch den Zigarettenkonsum wird die Entstehung von tumorbegünstigenden Mutationen verursacht (Jamal-Hanjani et al., 2017; Savic Prince und Bubendorf, 2019, p. 518). Die Tumorinzidenz steigt mit der Anzahl der Jahre, in denen geraucht wurde, und mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag. Sie sinkt nach einem Rauchstopp stetig. Allerdings erreicht sie nie wieder das Niveau eines Nierauchers (Savic Prince und Bubendorf, 2019, p. 513).

Trotz der wesentlichen Rolle des Rauchens für die Entwicklung von malignen Lungentumoren nimmt das Rauchen beim pulmonalen Adenokarzinom im Verhältnis zu anderen Subtypen des Lungenkarzinoms eine eher untergeordnete Bedeutung ein (Patel et al., 2004).

Neben einer Schadstoffexposition können auch chronische Lungenerkrankungen (z.B. idiopathische pulmonale Fibrose) zur Entstehung von Lungenkarzinomen beitragen (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019, Savic Prince und Bubendorf, 2019, p. 513).

Außerdem können genetische und/oder epigenetische Veränderungen, die durch Onkogenaktivierung oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bedingt sind, die Entstehung von Lungenkarzinomen begünstigen (Shigematsu et al, 2005; Fong et al., 1999; Gazdar, 1994, Sekido et al., 1998).

## 2.2.2 Genetische Faktoren

Vor allem molekulare Veränderungen im KRAS-Gen und EGFR-Gen spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung eines NSCLC. Ihr Vorhandensein im Tumor kann maßgeblich für die einsetzbaren Therapiemöglichkeiten sein.

Während bei Patienten mit pulmonalem Adenokarzinom und Raucherhistorie häufiger Mutationen im KRAS-Gen auftreten, sind bei pulmonalen Adenokarzinomen von Nichtrauchern häufiger Mutationen im EGFR-Gen, BRAF-Gen sowie Rearrangierungen im ALK- oder ROS1-Gen anzutreffen (Savic Prince und Bubendorf, 2019; p. 518).

Auch Polymorphismen können Einfluss auf die Entwicklung von Lungenkarzinomen haben. Insbesondere in Verbindung mit einer Raucherhistorie können sie die Wahrscheinlichkeit, an einem Lungenkarzinom zu erkranken, steigern (Ag et al., 2014).

### 2.2.2.1 EGFR-Gen

#### 2.2.2.1.1 Grundlagen

Das 200-kb große Gen besteht aus 28 Exons und 27 Introns und liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 (7p12) (Dutta und Maity, 2007).

Die Exons codieren für den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR, auch erbB1), der in verschiedenen normalen Zellen des epidermalen, mesenchymalen und neurogenen Gewebes exprimiert wird. Mit HER2/neu(erbB2), HER3(erbB3) und HER4(erbB4) gehört der EGFR zur erbB-Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase-Proteine. Diese Rezeptoren haben gemeinsam, dass sie aus drei Domänen bestehen: der extrazellulären ligandenbindenden Domäne, der transmembranen lipophilen Domäne und der intrazellulären Tyrosinkinase- und Regulationsdomäne (Bethune et al., 2010).

Der EGFR bildet Dimere, wenn Liganden an ihn binden (Dutta und Maity, 2007).

Ein Ligand, der besonders affin an diesen Rezeptor bindet, ist der Epidermale Growth Factor (EGF) (Bethune et al., 2010). Bei diesem handelt es sich um ein 170-kDA Tyrosinkinase-Protein (Inamura et

al., 2010). Besonders affin sind auch Amphiregulin und der Transforming Growth Factor alpha (TGF-alpha) (Dutta und Maity, 2007).

Daneben existieren auch Liganden wie heparin-bindendes EGF, Epiregulin, Heregulin, Neuregulin und Betacellulin.

Exon 1 bis 16 des EGFR-Gens codieren die extrazelluläre Domäne des EGFR. Die transmembrane Domäne wird von Exon 17 codiert. Die Exons 18 bis 28 codieren die intrazellulären Domänen. Zu den intrazellulären Domänen gehören die Tyrosinkinase-Domäne mit ATP-Bindungsstelle, die von Exon 18 bis 24 codiert wird, und die C-terminale Domäne, die von den Exons 25 bis 28 codiert wird (Dutta und Maity, 2007).

Der EGFR ist wichtig für die Differenzierung, die Entwicklung, die Proliferation und den Erhalt der Zelle (Gazdar, 2009).

Wenn eine strukturelle Variante oder eine aktivierende Mutation (auch Treibermutation genannt) in Exon 18 bis 21 zu einer Überexprimierung bzw. Erhöhung der Tyrosinkinaseaktivität ohne Ligandenbindung führt, kommt es zur malignen Entartung und Tumorprogression (Shigematsu und Gazdar, 2006; Kumar et al., 2008; Salomon et al., 1995).

Um die durch Überaktivierung des EGFR entstehende unkontrollierte Zellproliferation zu verhindern, wurden chemische Inhibitoren der EGFR-Kinaseaktivität (Tyrosinkinase-Inhibitoren/TKI) entwickelt (Shigematsu und Gazdar, 2006).

#### 2.2.2.1.2 Mutationen im EGFR-Gen

Bei aktivierenden Mutationen im EGFR-Gen handelt es sich um starke onkogene Treiber, die vor allem im pulmonalen Adenokarzinom (pADC) zu finden sind (Jamal-Hanjani et al., 2017; Jänne und Johnson, 2006).

Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Mutationen im EGFR-Gen mit Ethnizität, Rauchverhalten und Geschlecht der Patienten beobachtet.

Während in der kaukasischen Bevölkerung bei 10-15 % der pADC-Patienten eine EGFR-Mutation vorliegt (Leichsenring et al., 2017; Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao et al., 2005), treten sie bei pADC-Patienten ostasiatischer Herkunft mit 30-50 % der Fälle sehr viel häufiger auf (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao et al., 2005).

Aktivierende EGFR-Mutationen kommen häufiger bei Nierauchern als bei Patienten mit positiver Raucheranamnese vor (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao et al., 2005). Das gehäufte Vorkommen bei Nierauchern ist unabhängig von der Höhe der durch die Next-Generation-Sequenzierung (NGS)

ermittelten EGFR-Allelfrequenz (Friedlaender et al., 2021). In der vorliegenden Arbeit wird unter anderem der Zusammenhang zwischen der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten EGFR-Mutationslast und dem Raucherstatus untersucht.

Zudem sind EGFR-Mutationen laut aktueller Datenlage häufiger bei Frauen als bei Männern zu finden (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao et al., 2005; Pfarr et al., 2016; Zhang et al., 2006). Es besteht kein Zusammenhang zwischen der durch NGS ermittelten EGFR-Allelfrequenz und dem Geschlecht (Friedlaender et al., 2021). Die Beziehung zwischen der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten EGFR-Mutationslast und dem Geschlecht wird in der vorliegenden Studie betrachtet.

Bei Treibermutationen des EGFR-Gens handelt es sich meist um heterozygote (Pao und Chmielecki, 2010), klonale und im Tumorprozess früh auftretende (Jamal-Hanjani et al., 2017) Mutationen, die die Karzinogenese vorantreiben (Bohle und Fink, 2018, p. 355).

Obwohl EGFR-Mutationen meist somatischer Natur sind (Lynch et al., 2004), existieren auch Anhaltspunkte dafür, dass eine Keimbahnübertragung von EGFR-Mutationen innerhalb von Familien, in denen eine hohe Inzidenz von Lungenkrebs vorliegt, möglich ist (Ikeda et al., 2008; Gazdar, 2009).

Einige Studien deuten darauf hin, dass Tumore mit EGFR-Mutation weniger aggressiv sind als Tumore mit Wildtyp im EGFR-Gen (Tumore ohne Mutation im EGFR-Gen) und Patienten mit EGFR-Mutation eine signifikant bessere Prognose haben als Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen (Isaka et al, 2018; Matsumara et al., 2016). Dagegen ist die prognostische Bedeutung der EGFR-Allelfrequenz noch unklar: Während eine hohe EGFR-Allelfrequenz in der Studie von Friedlaender et al. (2021) mit einer besseren Prognose einherging, hatte die Höhe der EGFR-Allelfrequenz nach der Studie von Li et al. (2019) keinen Einfluss auf die Prognose. Eine hohe EGFR-Mutationslast (semiquantitativ) ging in der Studie von Oakley und Chiosea (2011) mit einer schlechteren Prognose einher.

EGFR-Mutationen kommen nicht nur im pulmonalen Adenokarzinom vor. Sie sind bei ca. 33 % der Patienten mit Glioblastom (Xu et al., 2017), bei 15 % der Patienten mit sporadischem Mammakarzinom, bei 46 % der Patienten mit erblich bedingtem Mammakarzinom (Weber et al., 2005), bei 8 % der Patienten mit Prostatakarzinom (de Muga et al., 2010) und in der Kohorte von Nagahara et al. (2005) bei 12 % der Patienten mit kolorektalem Karzinom zu finden.

In der einschlägigen Literatur wird bei Mutationen des EGFR-Gens oft zwischen „häufigen EGFR-Mutationen“ und „seltenen Mutationen“ unterschieden.

#### 2.2.2.1.2.1 „Häufige EGFR-Mutationen“

Als „häufige EGFR-Mutationen“ gelten Deletionen in Exon 19 (19-del) und die Punktmutation L858R in Exon 21 (21-L858R). Beide sind hoch spezifisch für Adenokarzinome der Lunge (Inamura et al., 2010) und führen zu einer konstitutiven Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinaseaktivität (Dutta und

Maity, 2007). Zusammen machen sie in etwa 90 % der Mutationen aus, die bei Lungenkarzinomen gefunden werden (Inamura et al., 2010).

Der Anteil von Deletionen in Exon 19 liegt bei ca. 44 % aller EGFR-Mutationen, die zu einer Rezeptoraktivierung führen (Dutta und Maity, 2007; Gazdar, 2009). Meist handelt es sich um Deletionen im Bereich der Codons 746 bis 750 (Dahse und Kosmehl, 2008).

Bei der L858R-Mutation in Exon 21 handelt es sich mit ca. 41 % um die häufigste aktivierende Punktmutation im EGFR-Gen (Gazdar, 2009).

In der Studie von Pallis et al. (2007) wird auch die Mutation G719A in Exon 18 zu den „häufigen EGFR-Mutationen“ gezählt. Diese betragen zusammen mit G719S und G719C in etwa 4 % aller aktivierenden Mutationen im EGFR-Gen (Gazdar, 2009).

Da Mutationen im EGFR-Gen nicht nur eine Ursache für das Entstehen von Lungenkarzinomen darstellen, sondern auch Einfluss auf Prognose und Therapierbarkeit der Erkrankung nehmen, ist das Aufdecken der Mutationen durch die molekularpathologische Diagnostik besonders relevant.

Patienten mit pADC und „häufiger EGFR-Mutation“ sprechen zum Beispiel im Gegensatz zu Patienten mit pADC und Wildtyp (WT) in der Regel auf eine Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), wie z.B. Gefitinib und Erlotinib, an (Gazdar, 1994; Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao und Miller, 2005). Bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung und aktivierender EGFR-Mutation liegt die Ansprechrate in etwa bei 60-70 % (Abdulla et al., 2018).

Eine Herausforderung, die es in der zielgerichteten Tumortherapie mit TKI zu bewältigen gilt, ist das Überwinden von Resistenzmutationen, die viele Tumore nach den ersten Jahren erfolgreicher Therapie mit TKI entwickeln oder die (in seltenen Fällen) schon zum Diagnosezeitpunkt vorhanden sind (Xu et al., 2017). Zu den häufigsten Resistenzmutationen zählt die Punktmutation T790M in Exon 20 des EGFR-Gens, die ca. 60 % aller erworbenen Resistenzmutationen gegen TKI der ersten Generation ausmacht und häufiger bei Patienten mit der Punktmutation L858R als bei Patienten mit Deletion in Exon 19 vorkommt (Xu et al., 2017).

Um Resistenzmutationen zu begegnen, wurde die dritte Generation von TKI (z.B. Osimertinib) entwickelt. Ursprünglich stellte die Therapie mit diesen lediglich eine Option bei Patienten mit zusätzlich aufgetretener Resistenzmutation dar (Nakashima et al., 2019). Heute gilt aufgrund der Ergebnisse der FLAURA-Studie Osimertinib als Standardtherapie bei aktivierenden EGFR-Mutationen in Exon 19 und 21 (Wagner und Buettner, 2020).

Während mehrere Studien zu dem Ergebnis kommen, dass Patienten mit pulmonalem Adenokarzinom sowie „häufiger EGFR-Mutation“ gut auf TKI ansprechen, werden seltenere Mutationen des EGFR-Gens tendenziell mit schlechterem Ansprechen auf TKI assoziiert. Allerdings fehlen aufgrund der niedrigen Frequenz seltener Mutationen klinische Studien (Harrison et al., 2020).

Der prädiktive Wert der EGFR-Allelfrequenz ist noch nicht endgültig geklärt: Während eine hohe EGFR-Allelfrequenz in der Studie von Friedlaender et al. (2021) einen positiven prädiktiven Wert besitzt, zeigt die EGFR-Allelfrequenz in der Studie Li et al. (2019) keinen Einfluss auf die Wirksamkeit der angewendeten TKIs. Ungewiss ist auch die prädiktive Bedeutung der (semiquantitativen) EGFR-Mutationslast.

#### 2.2.2.1.2.2 Synonyme Veränderungen im EGFR-Gen

Neben Punktmutationen und Deletionen gibt es auch einen Mechanismus namens Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP), der zu einer Veränderung auf Molekularebene führt. Von SNP (syn. „stumme Mutation“ oder „synonyme Mutation“) spricht man, wenn trotz einer im Codon veränderten Base die daraus resultierende veränderte Basenfolge für die gleiche Aminosäure codiert.

Obwohl die resultierende Aminosäure bei Einzelnukleotid-Polymorphismen unverändert bleibt, kann aus der molekularen Veränderung die Codonverwendung verändert und somit die Proteinproduktion verlangsamt werden. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Proteine fehlgefaltet werden und die Tertiärstruktur des resultierenden Proteins verändert wird.

Beim Q787Q SNP, der je nach Ethnizität in 24-84 % der NSCLC beobachtet wird, handelt es sich um einen Austausch der Base Guanin gegen Adenin im Codon 787 von Exon 20 des EGFR-Gens. Die Aminosäure Glutamin bleibt hierdurch unverändert. Dennoch führt dieser Einzelnukleotid-Polymorphismus zu einer niedrigeren EGFR-Protein-Expression (Nakazaki et al., 2010) und zu einer vermehrten Bildung seiner Isoform D (Tan et al., 2017; zitiert nach Wu et al., 2022).

Der SNP ist in kaukasischen Kohorten häufiger zu finden als in japanischen Kohorten (82-84 % vs. 24 %; Leichsenring et al., 2017; Zhang et al., 2006; Sasaki et al., 2008). Er tritt unabhängig von anderen Mutationen auf (Zhang et al., 2006) und kommt häufiger bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom (PEC) der Lunge als bei Patienten mit pADC vor (Koh et al., 2016; Sasaki et al., 2008).

Eine prokanzerogene Wirkung ist möglich. Der Polymorphismus kam in einer Studie von Zhang et al. (2006) häufiger bei Patienten mit NSCLC vor als in der Kontrollgruppe ohne NSCLC.

Die prognostische Bedeutung des Q787Q SNP ist gegenwärtig noch nicht eindeutig geklärt. Während sich das Vorhandensein des Q787Q SNP in den Studien von Koh et al. (2016) und Leichsenring et al. (2017) bei Patienten mit pADC nicht auf die Prognose auswirkte, zeigte sein Vorliegen in einer neueren

Studie von Wu et al. (2022) einen positiven prognostischen Einfluss. Bei Patienten mit pulmonalem Plattenepithelkarzinom (pPEC) in den UICC-Stadien I und II beeinträchtigte er dagegen das Überleben (Koh et al., 2016). In dieser Subgruppe lag der Überlebenszeitmedian von Patienten mit Q787Q SNP unter dem von Patienten ohne Q787Q SNP (ca. 10 m vs. ca. 70 m;  $p=0,03$ ). Der Grund für die abweichenden Ergebnisse ist noch nicht hinreichend bekannt.

Während das Vorhandensein des Q787Q SNP für die traditionelle Chemotherapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom laut aktuellen Erkenntnissen irrelevant ist, stellt er einen negativen Prädiktor für eine Anti-EGFR-Antikörper-Therapie dar (Bonin et al., 2016). Dagegen sprechen Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren und dem SNP besser auf eine Therapie mit TKI an als Patienten mit Wildtyp (Nakazaki et al., 2010; zitiert nach Wu et al., 2022). Tan et al. (2017) sehen den Grund für den positiven prädiktiven Effekt des SNP darin, dass seine Isoform D im Fall des SNP vermehrt exprimiert wird und diese besser auf eine TKI-Therapie anspricht als der Wildtyp (zitiert nach Wu et al., 2022).

Ob der Polymorphismus heterozygot oder homozygot vorliegt, macht für den Patienten und die Entwicklung seiner Erkrankung nach der Studie von Leichsenring et al. (2017) keinen Unterschied. Die Bedeutung der semiquantitativen Q787Q-Last wird in der vorliegenden Arbeit untersucht.

## 2.2.2.2 KRAS-Gen

### 2.2.2.2.1 Grundlagen

Das KRAS-Gen (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) gehört zusammen mit dem HRAS-Gen (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) und dem NRAS-Gen (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) zur Familie der Ras-Gene (Muñoz-Maldonado et al., 2019).

Es befindet sich auf Chromosom 12 und codiert für ein aus 188 bis 189 Aminosäuren bestehendes, zellmembranständiges, Guanosintriphosphat-bindendes Protein. Bei diesem handelt es sich um einen untergeordneten Mediator im EGFR-induzierten Signalweg (Huang et al., 2021).

Bei Bindung an Guanindiphosphat (GDP) befindet sich das Protein in inaktiver Form. Es wechselt bei Bindung an Guanintriphosphat (GTP) in seine aktive Form (Nollmann und Ruess, 2020).

Es handelt sich sowohl bei der intrinsischen GTP-Hydrolyse (die GTP zu GDP spaltet) als auch bei dem intrinsischen Nukleotidaustausch (von GDP zu GTP) um langsame Prozesse. Daher kommen bei der Konformationsveränderung des Proteins Nukleotid-Austauschfaktoren und GTPase-aktivierenden Proteinen eine besondere Bedeutung zu.

Um den Austausch von GDP zu GTP zu katalysieren und das KRAS-Protein so in seine aktive Form zu überführen, werden Wachstumssignale (z.B. EGF) durch das Adapterprotein GFRB2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2) auf das Guaninnukleotidaustauschmolekül SOS (Son of Sevenless) übertragen (Ostermayer, 2015).

Befindet sich das KRAS-Protein in seiner aktiven Form, werden Signalwege in Gang gesetzt, die zur Zellzyklusprogression, zum Zellwachstum, zur Zellkernproliferation und zur Zellkerndifferenzierung führen (Nollmann und Ruess, 2020). Im Detail kommt es unter anderem zu einer Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase RAF. RAF phosphoryliert und aktiviert MEK. MEK wiederum reguliert das Protein ERK (Huang et al., 2021).

Eine Deaktivierung des KRAS-Proteins erfolgt durch intrinsische Hydrolyse. Die intrinsische GTPase-Aktivität des KRAS-Proteins kann durch verschiedene Proteine beschleunigt werden (Ostermayer, 2015).

Das onkogene Potenzial von Punktmutationen im KRAS-Gen ergibt sich durch die Fähigkeit, die intrinsische GTPase-Aktivität zu blockieren und somit zu einem von Wachstumssignalen unabhängigen Zellwachstum zu führen (Viallet und Sausville, 1996; zitiert nach Ostermayer, 2015).

#### 2.2.2.2 Mutationen im KRAS-Gen

Beim pADC gehören zu den Treibermutationen insbesondere molekulare Veränderungen im KRAS-Gen. Eine der am häufigsten vorkommenden KRAS-Mutationen ist die G12C-Mutation (Arbour et al., 2018), bei der es zu einem Cysteinaustausch kommt. Da die meisten Patienten mit KRAS-Mutation nicht auf eine Therapie mit TKI ansprechen und medikamentös bis heute nicht behandelt werden können (Metro et al., 2012; Pao et al., 2005), kommt der Entwicklung neuer, zielgerichteter Medikamente besondere Bedeutung zu. Inzwischen befindet sich ein Medikament in klinischer Prüfung, das irreversibel an die Aminosäure Cystein bindet und somit bei einem Cysteinaustausch zu einer Inhibition führen soll (Wagner und Buettner, 2020).

Während studienabhängig bei 15-30 % der pADC-Patienten KRAS-Mutationen zu finden sind, kommen sie bei Patienten mit pPEC sehr viel seltener vor (1-7 % gemäß Acker et al., 2021). Allerdings treten KRAS-Mutationen nicht nur in Lungenkarzinomen auf. Tatsächlich kommen sie mit einer Prävalenz von 90-95 % am häufigsten in Pankreaskarzinomen vor (Wenning et al., 2021). Auch in kolorektalen Karzinomen liegen sie häufig vor (44 % aller kolorektalen Karzinome [The AACR Project GENIE Consortium, 2017]).

Man findet KRAS-Mutationen in den USA und Australien häufiger als in Japan und in Taiwan (Pao und Miller, 2005) und häufiger bei Rauchern als bei Nichtrauchern (Kempf et al., 2016).

Meist handelt es sich um eine Mutation von Codon 12 oder 13 in Exon 2 (Shigematsu et al., 2005).

Das Vorhandensein einer KRAS-Mutation führt in den meisten Untersuchungen (Marabese et al, 2015; Mascaux et al., 2005; Rodenhuis und Slebos, 1990) zu einer signifikanten Verschlechterung des Überlebens. Einzelne Studien (Chiosea et al., 2011; Villaruz et al., 2013) deuten darauf hin, dass sich eine hohe semiquantitative KRAS-Mutationslast schlechter auf die Prognose auswirkt als eine niedrige KRAS-Mutationslast.

Für das kolorektale Karzinom existieren erste Hinweise (CRYSTAL-Studie), dass eine hohe KRAS-Allelfrequenz – im Gegensatz zu einer niedrigen KRAS-Allelfrequenz – einen negativen Prädiktor für eine Anti-EGFR-Therapie darstellt (Stintzing und Heinemann, 2019).

## 2.3 Diagnostik

Liegt die Arbeitsdiagnose „Pulmonales Adenokarzinom“ vor, gilt es – vor allem bei Patienten in höhergradigen, inoperablen Stadien – molekulare Veränderungen im Tumorgewebe zu entdecken (Abdulla et al., 2018).

Molekularpathologische Methoden ermöglichen die Untersuchung von DNA und RNA und damit das Erkennen von Treibermutationen, Deletionen, Insertionen, Rearrangierungen und Translokationen (Moch et al., 2019, p. 13).

Vor allem das Detektieren von aktivierenden Mutationen des EGFR-Gens und des KRAS-Gens spielt eine wichtige Rolle zur Abwägung des Nutzens einer zielgerichteten Therapie.

DNA-Sequenzanalyse-Verfahren ermöglichen die Bestimmung der Nukleinsäuresequenz eines DNA-Stranges (Moch et al., 2019, p. 16).

Zu den DNA-Sequenzanalyse-Verfahren zählt die 1977 vorgestellte Basenterminationsmethode nach Sanger, deren Entwicklung Frederick Sanger 1980 den Nobelpreis für Chemie eingebracht hat. Sequenzen von bis zu 1000 Basenpaaren (bp) Länge (je nach Sequenziergerät) können mit ihr analysiert werden (Grabner, 2019).

Als weitere DNA-Sequenzanalyseverfahren sind die 2005 erstmals eingeführten NGS-basierten Testsysteme zu nennen (Mardis, 2017). Sie ermöglichen die gleichzeitige Sequenzierung von Millionen von DNA-Fragmenten und das Anfertigen von qualitativ hochwertigen Sequenzdaten (Prudnikow und

Wünschiers, 2020). Zudem wurde die Sensitivität von Mutationsnachweisen deutlich gesteigert (Vidal et al., 2019; zitiert nach Stintzing und Heinemann, 2019). So kann es vorkommen, dass in Tumorgewebe nur mit dem NGS – und nicht mit der Sanger-Sequenzierung – ein Mutationsnachweis erbracht werden kann (Stintzing und Heinemann, 2019).

### 2.3.1 Mutationslast als Biomarker

Das Vorhandensein von Mutationen im Tumor kann maßgeblich für den Verlauf einer Krebserkrankung und die für den Patienten zur Verfügung stehenden Therapieoptionen sein.

Gegenstand aktueller Forschungen ist, ob Patienten im Hinblick auf Mutationen im Tumor nicht nur anhand von qualitativen, sondern auch von quantitativen Parametern subtypisiert werden können und sich so die Möglichkeit von noch weiter individualisierten Therapien oder synergistischen Kombinationstherapien ergibt.

In diesem Zusammenhang gilt es auch herauszufinden, ab welcher Höhe der Mutationslast sich aus dem Vorhandensein von Mutationen eine prognostische oder prädiktive Bedeutung für den Patienten ergibt.

Sprich: Verhalten sich Tumore von Patienten mit niedriger Mutationslast biologisch eher wie Tumore mit Wildtyp oder eher wie Tumore mit hoher Mutationslast?

Wenn sich ein Tumor mit niedriger Mutationslast biologisch ähnlich verhält wie ein Tumor mit hoher Mutationslast, wäre es naheliegend für einen Tumor mit niedriger Mutationslast das gleiche Therapiekonzept zu verwenden wie für einen Tumor mit hoher Mutationslast.

Falls aber ein Tumor mit niedriger Mutationslast ähnlich wie ein Tumor ohne Mutation reagieren sollte, wäre für einen Tumor mit niedriger Mutationslast das Therapiekonzept eines Tumors ohne Mutation vorzuziehen.

Erste Hinweise gibt es z.B. für das kolorektale Karzinom: Patienten mit niedriger (durch NGS ermittelter) RAS-Allelfrequenz profitierten – im Gegensatz zu Patienten mit hoher RAS-Allelfrequenz – von dem gleichen Therapieschema wie Patienten mit Wildtyp (Stintzing und Heinemann, 2019; Van Cutsem et al., 2008; Vidal et al., 2019).

In den letzten Jahren wurden auch einige Forschungsergebnisse zu der mittels NGS ermittelbaren „tumor mutation burden“ (TMB) veröffentlicht. In der einschlägigen Literatur ist die TMB als Anzahl der Mutationen über eine Region von mehreren hundert Genen definiert. Je nach Studie variiert hierbei die Größe der Genregion und ebenso, ob nicht-synonyme Mutationen berücksichtigt werden oder nicht (McGrail et al., 2021; Offin et al., 2019). Die genannten Arbeiten weisen darauf hin, dass der Menge

der Mutationen im Tumor – zumindest bei Patienten mit Lungenkarzinom – eine prädiktive Bedeutung zukommt.

Vor diesem Hintergrund wäre ein zeitsparendes Verfahren zur Bestimmung der Mutationslast, das dem der Variantendetektion (Punktmutationsdetektion) ähnelt und innerhalb von wenigen Tagen Aussagen treffen kann, sinnvoll. Hier setzt die vorliegende Arbeit an. Es existieren bereits Anhaltspunkte dafür, dass sich die semiquantitative, mittels Sanger-Sequenzierung ermittelbare Mutationslast auf die Prognose von pADC-Patienten auswirkt (Chiosea et al., 2011; Oakley und Chiosea, 2011; Villaruz et al., 2013).

## 2.4 Zielsetzung

Mit der nachstehenden Methodik wird in der vorliegenden Arbeit anhand eines Kollektivs mit pADC-Patienten der Frage nachgegangen, ob die semiquantitativ ermittelte Mutationslast (Sanger-Sequenzierung) von klinischer Relevanz ist. Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, werden in diesem Projekt folgende Punkte untersucht:

1. Durch welche klinisch-histopathologischen Standardparameter (Alter zum Diagnosezeitpunkt, Geschlecht, Raucherstatus, pack years [pys], Überlebensstatus zum 10.02.2020, Todesursache, Grading [Differenzierungsgrad, G], TNM-Stadium, UICC-Stadiengruppe, Gewebeursprung, Operationsstatus) ist das oben genannte Kollektiv gekennzeichnet?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen den durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutationen („häufige EGFR-Mutationen“, KRAS-Mutationen, Q787Q SNP) oder deren Mutationslast und den klinisch-histopathologischen Standardparametern der Patienten?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen den Mutationen oder deren Mutationslast und der Prognose der Patienten?

Sollte sich in dieser Studie herausstellen, dass sich Mutationsträger mit pADC mithilfe der Sanger-Sequenzierung in weitere Subgruppen unterteilen lassen, wäre es bedeutsam herauszufinden, ob man anhand der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutationslast auch prädiktive Aussagen treffen kann. In diesem Fall könnte die Verwendung von NGS beim Detektieren von Mutationen im Rahmen von Krebserkrankungen und zum Modifizieren des Therapiekonzepts in Frage gestellt werden. Die Implementierung von NGS in die breite Routinediagnostik sowie die Herausforderungen, die diese mit sich zieht, könnten somit eventuell umgangen werden.

## 3 Material und Methodik

---

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Kollektivstruktur und Datenerhebung

Für die Studie wurden 825 am UKS (Universitätsklinikum des Saarlandes) durchgeführte EGFR-Gen-Analysen aus den Jahren 2010 bis 2016, 256 am UKS durchgeführte Mutationsanalysen aus dem Jahr 2017 und 100 im Rahmen des CHIC-Projekts gesammelte Mutationsanalysen genauer betrachtet. Bei den von pADC stammenden EGFR-Gen-Analysen aus den Jahren 2010-2016 wurde außerdem berücksichtigt, ob eine zusätzliche Analyse des KRAS-Gens vorliegt.

In die Studienpopulation aufgenommen wurden 381 pADC-Patienten mit Mutationsanalyse des EGFR-Gens und/oder des KRAS-Gens aus den Jahren 2010 bis 2016, ein pADC-Patient mit im Jahr 2007 festgestellter EGFR-Mutation sowie acht KRAS- und sechs EGFR-Mutationsträger mit im Jahr 2017 diagnostiziertem pADC. Somit erreichte das Gesamtkollektiv eine Anzahl von 396 Patienten.

Die Tumor-DNA stammte aus Gewebe, das durch eine Resektion oder Biopsie zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken gewonnen wurde.

Die Mutationsanalysen wurden im Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des UKS durchgeführt.

Vor der ersten Datenerhebung wurde zum Eintragen der zu ermittelnden Daten eine Tabelle mit Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond) erstellt.

Erfasst wurden folgende Informationen:

- Geschlecht
- Raucherstatus ([Ex]raucher, Nieraucher), pack years (pys)
- Diagnosezeitpunkt
- Alter zum Diagnosezeitpunkt
- Therapie des Tumors: Operation (ja/nein)
- Überlebensdaten: Todesdatum, Todesursache bzw. falls kein Tod bekannt ist, Datum der letzten klinischen Vorstellung
- Tumorhistologie
- Tumorgröße und -ausbreitung
- Lymphknoten- und Fernmetastasen

- Stadium nach UICC
- Differenzierungsgrad des Tumors
- Gewebeursprung (Primarius, Metastase)
- Mutationsstatus im EGFR-Gen und KRAS-Gen

Die Daten wurden vor der Auswertung pseudonymisiert.

Die aufgelisteten Informationen wurden bei Patienten, deren Biopsie oder Operation am UKS durchgeführt wurde, der pathologisch-histologischen Beurteilung entnommen oder in Zusammenarbeit mit dem Tumorzentrum des UKS zusammengetragen.

Sofern das pathologisch gesicherte Stadium (pTNM-Stadium) nicht dokumentiert war, wurde das klinische TNM-Stadium (cTNM-Stadium) genutzt.

Die TNM-Klassifikation der Tumore erfolgte bei Diagnosestellung nach den vorgegebenen Richtlinien und wurde im Jahr 2017 gemäß der 8. Auflage der TNM-Klassifikation maligner Tumore aktualisiert.

Das Grading der Tumore wurde nach Petersen (2011) wie folgt vorgenommen:

- prädominant lepidisch => G1
- prädominant papillär und azinär => G2
- prädominant mikropapillär und prädominant solide => G3

Neben Daten von Patienten, deren Diagnose und Therapie am UKS stattfanden, wurden auch Daten von Patienten erhoben, von denen lediglich die Diagnose oder die Mutationsanalyse am UKS vorgenommen wurde, während die Behandlung anschließend auswärts erfolgte.

Bei Patienten, deren Erstdiagnose auswärts gestellt wurde oder die auswärts vorbehandelt wurden, wurde als Zeitpunkt der Diagnosestellung das Datum der Mutationsanalyse gewählt.

Fehlende Daten wurden in Zusammenarbeit mit dem Tumorzentrum des UKS und dem saarländischen und rheinland-pfälzischen Krebsregister erhoben.

Bei 379 der 396 Patienten waren Informationen zum weiteren Krankheitsverlauf bekannt. Als Stichtag für die Überlebensdaten wurde der 10.02.2020 bestimmt. Dadurch ergab sich ein Follow-Up von 7 bis 5249 d.

Bei 294 verstorbenen Patienten wurde das Gesamtüberleben (Overall survival, OS) erhoben. Bei 143 Patienten konnte auch das krankheitsspezifische Überleben (Disease specific survival, DSS) ermittelt werden.

Das OS und das DSS sind in Tagen vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Zeitpunkt des Todes definiert. Im Gegensatz zum DSS ist das OS unabhängig von der Todesursache (Zwiener et al., 2011).

Zur Ermittlung des DSS muss der Tod des Patienten als Folge der Tumorerkrankung (ICD-Codes C340, C341, C342, C343, C348, C349) eingetreten sein (Oberhofer, 2020).

### 3.1.2 Verwendete Software

**Tabelle 1: Verwendete Software**

Name	Firma, Ort	Verwendung
Chromas lite	Technelysium, South Brisbane	DNA-Analyse
Microsoft Excel Version 2016	Microsoft Corporation, Redmond	Dokumentation/Auswertung
Microsoft Word Version 2016	Microsoft Corporation, Redmond	Dokumentation/Auswertung
SPSS Version 24	SPSS/IBM, Armonk	Dokumentation/Auswertung
Zotero	George Mason University, Washington DC	Dokumentation/Auswertung
Microsoft Powerpoint Version 2016	Microsoft Corporation, Redmond	Dokumentation/Auswertung
Snipping Tool	Microsoft Corporation, Redmond	Auswertung
Gießener Tumordokumentationssystem	WILEY-VCH-Verlag, Weinheim	Datenerhebung
C21. Produktivsystem	SAP SE, Walldorf	Datenerhebung

## 3.2 Methoden

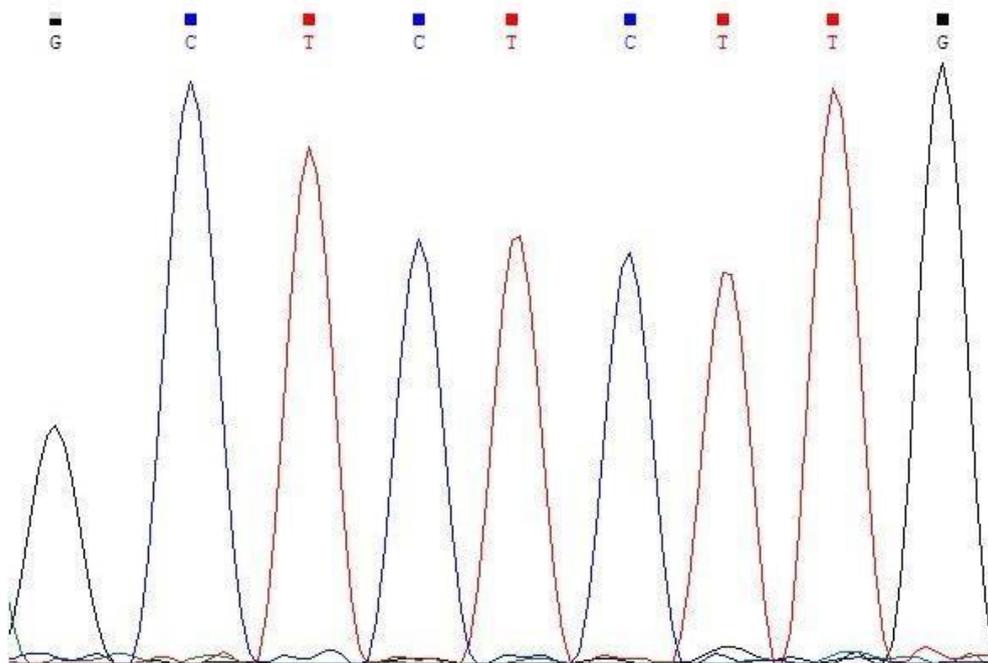
### 3.2.1 Auswertung der Mutationsanalysen

Die Mutationsanalysen lagen nach PCR und Sanger-Sequenzierung in Form von Chromatogrammen vor.

In den für das Projekt zur Verfügung stehenden Mutationsanalysen des EGFR-Gens wurden die Exons 18-21 untersucht; in den zur Verfügung stehenden Mutationsanalysen des KRAS-Gens wurde Exon 2 untersucht. Sobald aus der Mutationsanalyse hervorging, dass eine Mutation vorlag, wurde das Chromatogramm eingesehen. Die Sequenz im Chromatogramm wurde mit der Wildtypsequenz abgeglichen. Abweichungen der Basenreihenfolge wurden erfasst und die dazugehörige Mutationslast ermittelt.

Exemplarisch dargestellt ist in Abbildung 1 ein Chromatogramm, das einen Teil der Wildtypsequenz von Exon 18 des EGFR-Gens (Codon 702-704) zeigt.

#### **EGFR-Gen Exon 18 (Codon 702-704)**



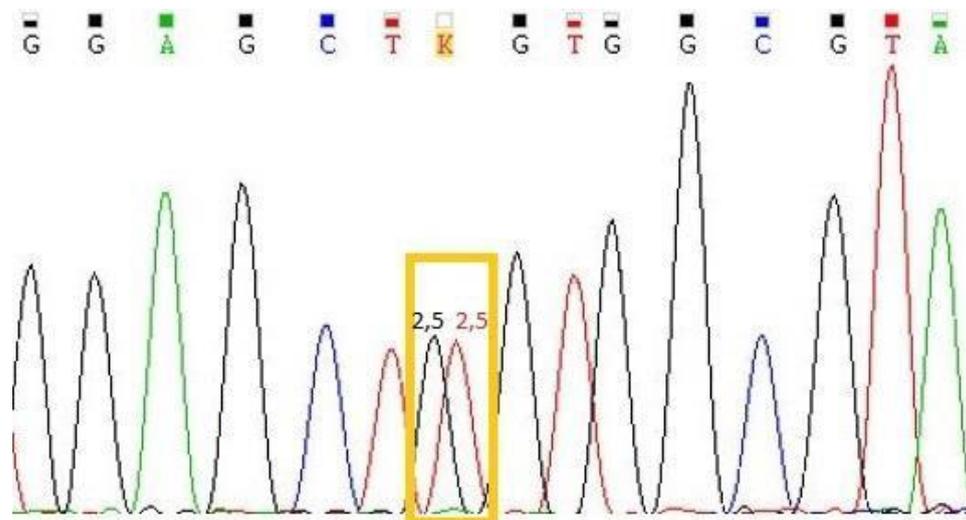
**Abbildung 1: Chromatogramm eines Falls mit Wildtypsequenz in Exon 18 (Codon 702-704)**  
Die Buchstabenfolge über den Amplituden entspricht der vom Chromatogramm erkannten Basensequenz.

### 3.2.2 Bestimmung der Mutationslast

In den Chromatogrammen wurden zur Bestimmung der Mutationslast die Amplituden von mutierter DNA und Wildtyp-DNA gegenübergestellt.

Die Gegenüberstellung von mutierter DNA und Wildtyp-DNA erfolgte bei Einzelnukleotid-Polymorphismen und Punktmutationen mittels Division der Amplitude des mutierten Allels durch die Amplitude des Wildtypallels.

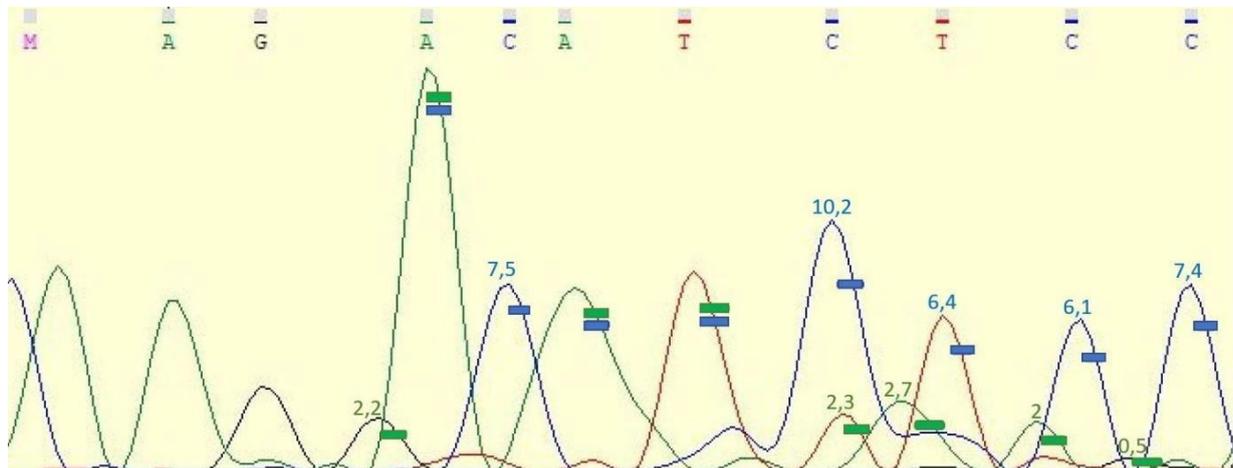
Abbildung 2 zeigt anhand der Mutation Gly12Cys in Exon 2 des KRAS-Gens die Ermittlung der Mutationslast bei Punktmutationen und Einzelnukleotid-Polymorphismen. Es ergibt sich die MT/WT-Ratio 1 bei Division von 2,5 cm (Amplitude des mutierten Allels) durch 2,5 cm (Amplitude des Wildtypallels).



**Abbildung 2: Ermittlung der Mutationslast bei einem Fall mit der KRAS-Mutation Gly12Cys**  
Zu sehen sind die Codons 10 (GGA) – 14 (GTA) von Exon 2 des KRAS-Gens. In diesem Fall liegt in Codon 12 ein Austausch der Base Guanin (schwarze Farbe) durch Thymin (rote Farbe) vor. Daraus resultiert die Punktmutation Gly12Cys. Sowohl die Amplitude des Wildtypallels (Guanin) als auch die Amplitude des mutierten Allels (Thymin) misst 2,5 cm. Die Mutationslast nimmt in diesem Fall einen Wert von 1 an ( $2,5/2,5=1$ ).

Eine besondere Herausforderung stellte die Ermittlung der Mutationslast bei Deletionsmutationen dar. Nach dem Beispiel von Oakley und Chiosea (2011) wurde dabei folgendermaßen verfahren: Zunächst wurden die Amplituden der ersten fünf von der Wildtypsequenz abweichenden mutierten Allele addiert. Anschließend wurden die Amplituden der ersten fünf alleinig zur Wildtypsequenz gehörenden Allele addiert. Danach wurde die berechnete Summe der Amplituden der mutierten Allele durch die berechnete Summe der Amplituden der Wildtypallele dividiert.

In Abbildung 3 wird anhand der Mutation delE746-A750 die Ermittlung der Mutationslast bei Deletionsmutationen vorgeführt. Nach Addieren der Amplituden der mutierten Allele (blau markiert;  $7,5 \text{ cm} + 10,2 \text{ cm} + 6,4 \text{ cm} + 6,1 \text{ cm} + 7,4 \text{ cm} = 37,6 \text{ cm}$ ) und Division durch die Summe der Wildtypamplituden (grün markiert;  $2,2 \text{ cm} + 2,3 \text{ cm} + 2,7 \text{ cm} + 2 \text{ cm} + 0,5 \text{ cm} = 9,7$ ) erhält man die MT/WT-Ratio 3,88.



**Abbildung 3: Ermittlung der Mutationslast bei einem Fall mit der Deletionsmutation delE746-A750 (EGFR-Gen, Exon 19)**

Die Grafik beginnt mit dem Codon 745 (AAG) von Exon 19 (EGFR-Gen) und endet mit den ersten beiden Basen (CC) von Codon 753 (CCG). Grün markiert sind die Basenamplituden, die der Wildtypsequenz zugeordnet werden können (GAATTAAG). Blau markiert sind die Basenamplituden, die in der Wildtypsequenz auf das Codon 750 (GCA) folgen (ACATCTCC). Mit beiden Farben markiert sind Basenamplituden, die sowohl zur Wildtypsequenz als auch zu der auf das Codon 750 (GCA) folgenden Basensequenz passen.

Existierten zu einem Fall mehrere auswertbare Chromatogramme, wurde die MT/WT-Ratio der vorhandenen Chromatogramme ermittelt und deren Durchschnittswert als Mutationslast festgelegt.

### 3.2.3 Einteilung in Unterkollektive

Der prognostische Einfluss der Mutationslast und ihr Zusammenhang mit den klinisch-histopathologischen Standardparametern wurden anhand von drei unterschiedlichen Unterkollektiven untersucht:

- „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“ (siehe 4.3.1)
- „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“ (siehe 4.3.2)
- „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“ (siehe 4.3.3)

In der gesamten Arbeit wurden Patienten mit Deletionen in Exon 19 und der L858R-Mutation (Exon 21) als „Patienten mit häufigen EGFR-Mutationen (im EGFR-Gen)“ zusammengefasst.

Die Mutationen von Codon 12 und Codon 13 im Exon 2 des KRAS-Gens wurden zusammengefasst.

### 3.2.4 Vergleichende Analyse der Mutationslast

Um zu analysieren, ob die Mutationslast einen prognostischen Einfluss hat oder in Zusammenhang mit den klinisch-histopathologischen Standardparametern steht, wurden innerhalb der oben genannten Unterkollektive zunächst mehrere Gruppenbildungen vorgenommen:

Bei der ersten Einteilung wurden Patienten ohne Mutation Patienten mit Mutation gegenübergestellt. Die Höhe der Mutationslast wurde nicht berücksichtigt.

Bei der zweiten und der dritten Gruppenbildung wurde untersucht, wie sich das Kollektiv verhält, wenn die Fälle anhand des Medians der MT/WT-Ratio oder anhand der Terzile der MT/WT-Ratio eingeordnet werden.

Die dichotome Aufteilung der Gruppe mit Mutation anhand des Medians wurde folgendermaßen vorgenommen:

- Fälle mit einer MT/WT-Ratio kleiner als der Median wurden zur Gruppe „Niedrige Mutationslast“ zusammengefasst.
- Fälle mit einer MT/WT-Ratio größer gleich dem Median wurden zur Gruppe „Hohe Mutationslast“ zusammengefasst.

Die Aufteilung der Gruppe mit Mutation in Terzile abhängig von der Mutationslast wurde folgendermaßen vorgenommen:

- Fälle mit einer MT/WT-Ratio, die sich innerhalb des ersten Terzils befand, wurden zur Gruppe „Niedrige Mutationslast“ zusammengefasst.
- Fälle mit einer MT/WT-Ratio, die sich innerhalb des zweiten Terzils befand, wurden zur Gruppe „Mittlere Mutationslast“ zusammengefasst.
- Fälle mit einer MT/WT-Ratio, die sich im dritten Terzil befand, wurden zur Gruppe „Hohe Mutationslast“ zusammengefasst.

In einer weiteren Einteilung wurden die Gruppen in Abhängigkeit des Verhältnisses der Amplituden im Chromatogramm gebildet. Bei der Gruppe mit hoher Mutationslast war die Amplitude des mutierten Allels höher als die Amplitude des Wildtypallels ( $MT/WT \geq 1$ ) et vice versa.

Bei der letzten Gruppenbildung wurden die Fälle des Kollektivs abhängig davon, ob die Mutation heterozygot oder homozygot vorlag, in Gruppen eingeteilt.

Fälle mit homozygoter Mutation wurden in den Gruppenbildungen anhand des Medians, der Terzile und des Verhältnisses der Amplituden im Chromatogramm ( $MT/WT\text{-Ratio} < 1$  oder  $\geq 1$ ) den Gruppen mit der höchsten Mutationslast zugeschlagen.

Patienten ohne Mutation (mit Wildtyp) wurden in allen Gruppenbildungen als eigene Gruppe betrachtet.

### 3.2.5 Klinisch-histopathologische Standardparameter

Die klinisch-histopathologischen Standardparameter (Alter zum Diagnosezeitpunkt, Geschlecht, Raucherstatus, pys, Überlebensstatus zum 10.02.2020, Todesursache, Grading, TNM-Stadium, UICC-Stadiengruppe, Gewebeansprung, Operationsstatus) wurden zur vergleichenden Analyse hinsichtlich der Mutationslast herangezogen.

Raucher und Exraucher wurden zusammengenommen und Nierauchern gegenübergestellt.

Patienten mit Grading 1 und 2 wurden zusammengefasst und Patienten mit Grading 3 gegenübergestellt.

Die Tumorstadien wurden dichotom aufgeteilt: T1-T2 und T3-T4.

Beim Lymphknotenstatus und dem Vorliegen von Fernmetastasen wurde jeweils zwischen Vorhandensein und Nichtvorhandensein unterschieden.

Auch die UICC-Stadiengruppen wurden dichotom aufgeteilt: So wurden Stadium I bis IIIA und IIIB bis IV zusammengefasst.

### 3.2.6 Überlebensanalysen

Wie in Unterpunkt 3.1.1 beschrieben, wurden zur vergleichenden Analyse hinsichtlich der Mutationslast auch das OS und das DSS herangezogen.

Konnte der Todeszeitpunkt nicht festgestellt werden ( $N=102$ ), wurde bei den Patienten das Datum des letzten Kontaktes für die Überlebenszeitanalyse herangezogen. Die betroffenen Casus und die Fälle, bei denen der Tod zum Zeitpunkt des Stichtages (10.02.2020) nicht eingetreten war, wurden bei Analyse des OS mit der Kaplan-Meier-Methode als zensierte Daten gewertet. Bei Analyse des DSS wurden diese Casus nicht in Analyse einbezogen.

Bei der Darstellung des OS entspricht die Zahl vor der Klammer der Anzahl von unzensierten Fällen und die Zahl in der Klammer der Gesamtzahl der Fälle.

Mittels Kaplan-Meier-Methode (Log-Rank-Test) wurden die Überlebenszeiten analysiert.

Die graphischen Darstellungen der Überlebenszeit erfolgten mit Kaplan-Meier-Kurven.

### 3.2.7 Statistische Auswertung

Die Bereitstellung des Programms zur statistischen Auswertung sowie die Überprüfung der statistischen Ergebnisse erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik (IMBEI) des UKS.

Die Datentabelle wurde mit Hilfe des Softwareprogramms Microsoft Office Excel Version 2016 erstellt.

Die Verteilung der Standardparameter wurde bei qualitativen Variablen mit relativen und absoluten Häufigkeiten dargestellt. Außerdem wurden mehrere Säulendiagramme erstellt.

Bei quantitativen Variablen wurde die Verteilung der Standardparameter mit Mittelwert oder Median dargestellt.

Beim Vergleich der Gruppen hinsichtlich qualitativer Merkmale wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Ergab sich beim Chi-Quadrat-Test, dass bei mehr als 20 % der Zellen die erwartete Häufigkeit kleiner als fünf war, wurden die Ergebnisse des exakten Tests nach Fischer verwendet.

Wurden zwei Gruppen hinsichtlich quantitativer Merkmale verglichen, kam der Wilcoxon (Mann-Whitney)-U-Test zur Anwendung. Der Kruskal-Wallis-Test wurde beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen im Hinblick auf quantitative Merkmale verwendet.

Das zweiseitige Signifikanzniveau wurde sowohl für die Analyse des Zusammenhangs zwischen der Mutationslast und den klinisch-histopathologischen Parametern als auch für die Überlebenszeitanalyse bei 5 % ( $p \leq 0,05$ ) festgelegt. Lag der p-Wert zwischen 0,05 und 0,11, wurde hinsichtlich der Ergebnisse ein „Trend“ interpretiert.

Die Analyse wurde mit dem Softwareprogramm SPSS, Version 24 (IBM, Armonk[USA]), durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

---

### 4.1 Häufigkeitsverteilung der klinisch-histopathologischen Standardparameter

Als klinisch-histopathologische Standardparameter wurden das Alter zum Diagnosezeitpunkt, das Geschlecht, der Raucherstatus, die pack years (pys), der Differenzierungsgrad des Tumors (das Grading, G), das TNM-Stadium, die Stadiengruppe nach UICC8 (Stadium), die Therapie (Operation: ja/nein), sowie der Überlebensstatus zum 10.02.2020 und bei den 294 bekanntermaßen Verstorbenen die Todesursache herangezogen. Zusätzlich wurde festgestellt, ob das Gewebe, das zur Mutationsanalyse genutzt wurde, von dem pulmonalen Primarius oder einer Metastase stammt.

In den Tabellen 2 und 3 sind die klinisch-histopathologischen Standardparameter des gesamten Patientenkollektivs aufgeführt.

Das Gesamtkollektiv setzte sich aus 396 pADC-Patienten zusammen, die zum Diagnosezeitpunkt im Alter von 35 bis 89 Jahren (Mittelwert=64,86) waren. Der Median (MD) lag bei 65 Jahren (siehe Abbildung 4).

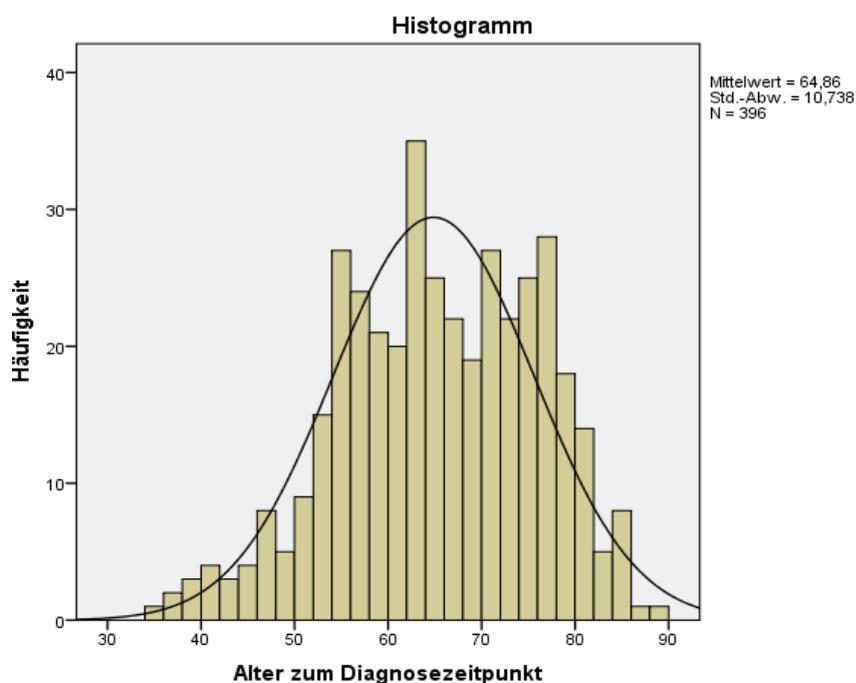


Abbildung 4: Alter zum Diagnosezeitpunkt

Das Gesamtkollektiv (N=396) bestand aus 236 Männern und 160 Frauen.

Bei 263 Patienten des Gesamtkollektivs (N=396) war der Raucherstatus verfügbar. Von den 263 Patienten waren 237 Patienten Raucher oder Exraucher (90 %). Der Median der pys lag bei 40 Jahren. 26 von den 263 Patienten gaben an, noch nie geraucht zu haben.

Bei 325 (82 %) der 396 Patienten konnte die Information erhoben werden, ob die Patienten im Rahmen ihrer Erkrankung operiert wurden oder nicht. 85 (26 %) der 325 Patienten wurden operiert.

Die Herkunft des für die Mutationsanalyse verwendeten Gewebes konnte bei 394 der 396 Fälle genauer differenziert werden: Es entstammte bei 315 der 394 Patienten (80 %) vom pulmonalen Primarius und bei 79 der 394 Patienten (20 %) vom Gewebe einer Metastase des pulmonalen Primarius.

Der T-Status konnte bei 314 Patienten (N=396) bestimmt werden. 45 % der Tumore befanden sich zum Zeitpunkt der Diagnose im Stadium T4, 19 % im Stadium T3, 22 % im Stadium T2 und 14 % im Stadium T1. Nur knapp ein Viertel (24 %) der Patienten mit verfügbaren Informationen zum Lymphknotenstatus (N=315) hatten zum Zeitpunkt der Diagnose keine Lymphknotenmetastasen. Bei über der Hälfte der Patienten (63 %), von denen Informationen zum Vorhandensein von Fernmetastasen vorlagen (N=337), hatte das Karzinom zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Fernmetastasen verursacht.

Zum Diagnosezeitpunkt befanden sich 72 der 330 Patienten (22 %) mit bekanntem Stadium in Stadium I-III A. 258 der 330 Patienten (78 %) mit bekanntem Stadium befanden sich in Stadium III B bis IV.

Die Untergruppen G1 und G2 waren mit insgesamt 43 % der Fälle, von denen das Grading ausfindig gemacht werden konnte (N=318), vertreten. G3 lag in 57 % der Fälle mit bekanntem Grading (N=318) vor.

Von 17 der 396 Patienten konnten keine Informationen zum Verlauf der Erkrankung und zum aktuellen Überlebensstatus eingeholt werden. 294 der 379 Patienten (78 %) mit Informationen zum weiteren Krankheitsverlauf verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Tabelle 2: Klinische Standardparameter des Gesamtkollektivs

Klinische Standardparameter	Anzahl	Information verfügbar
<b>Geschlecht</b>		
männlich	236 (60 %)	396/396
weiblich	160 (40 %)	
<b>Raucherstatus</b>		
Raucher/Exraucher	237 (90 %)	263/396
Nieraucher	26 (10 %)	
Pys (MD)	40	152/237
<b>Überlebensstatus am zuletzt bekannten Zeitpunkt</b>		
Tod eingetreten	294 (78 %)	379/396
Tod nicht eingetreten	85 (22 %)	
<b>Todesursache</b>		
direkt oder indirekt kanzerogen	143 (49 %)	294/294
nicht kanzerogen	9 (3 %)	
fraglich oder nicht ermittelbar	142 (48 %)	
<b>Informationen zur Therapie</b>		
Operation (OP)	85/325 (26 %)	325/396
<b>Überleben</b>		
Gesamtüberleben/OS (MD)	504 d	396/396 <sup>1</sup>
Krankheitsspezifisches Überleben/DSS (MD)	413 d	143/143

<sup>1</sup> 102 der 396 Fälle gingen als zensierte Daten in die Überlebenszeitanalyse mit ein.

Tabelle 3: Histopathologische Standardparameter des Gesamtkollektivs

Histopathologische Standardparameter	Anzahl		Information verfügbar
<b>T</b>			
T1	45 (14 %)	114 (36 %)	314/396
T2	69 (22 %)		
T3	58 (19 %)	200 (64 %)	
T4	142 (45 %)		
<b>N</b>			
N 0	75 (24 %)		315/396
N 1-3	240 (76 %)		
<b>M</b>			
M0	126 (37 %)		337/396
M1	211 (63 %)		
<b>Stadium</b>			
I bis IIIA	72 (22 %)		330/396
IIIB bis IV	258 (78 %)		
<b>Grading</b>			
G1	9 (3 %)	137 (43 %)	318/396
G2	128 (40 %)		
G3	181 (57 %)	181 (57 %)	
<b>Gewebeursprung</b>			
pulmonaler Primarius	315 (80 %)		394/396
Metastase	79 (20 %)		

## 4.2 Ergebnisse der Mutationsanalysen

Es wurden Mutationsanalysen des EGFR-Gens (N=393) und des KRAS-Gens (N=104) von Patienten mit pulmonalem Adenokarzinom betrachtet.

In dem Patientenkollektiv fand man 58 nicht-synonyme und 316 synonyme Mutationen des EGFR-Gens sowie 32 nicht-synonyme Mutationen des KRAS-Gens (siehe Punkt 9.2.1).

### 4.2.1 Mutationsanalyse des EGFR-Gens

Bei 393 der Patienten der Gesamtstichprobe (N=396) lag eine auswertbare Analyse der Exons 18, 19 und 21 des EGFR-Gens vor. 387 der 393 EGFR-Analysen enthielten zusätzlich auswertbare Informationen zu Exon 20 des EGFR-Gens. Bei 6 der 393 Fälle mit EGFR-Mutationsanalyse war die Analyse des Exon 20 nicht vorhanden oder nicht auswertbar.

Folgende Mutationen des EGFR-Gens konnten beobachtet werden:

**Tabelle 4: Mutationen im EGFR-Gen**

Exon 18	Exon 19	Exon 20	Exon 21
A722A, Q701*, G719A, L707S, G724S	verschiedene Deletionsmutationen, L747P	Q787Q, T790A, T790M, S768I, P794L, F795L	L858R, K860E, R836R, P848L

#### 4.2.1.1 Allgemein

Dieser Abschnitt befasst sich mit den in Tabelle 4 genannten EGFR-Mutationen mit Ausnahme des Q787Q SNP. Auf den Q787Q SNP wird gesondert in Punkt 4.2.1.2 eingegangen.

Im Gesamtkollektiv lagen bei 52 Patienten Mutationen im EGFR-Gen vor.

Nach Ausschluss der 7 Fälle mit EGFR-Mutation aus den Jahren 2017 und 2007, die zur Gruppenvergrößerung in das Gesamtkollektiv (N=393) einbezogen wurden, lag der Anteil von EGFR-Mutationsträgern bei 12 %.

8 der 52 Patienten (15 %) mit Mutation im EGFR-Gen wiesen mehrere Mutationen im EGFR-Gen auf (siehe Punkt 9.2.2.3).

Bei 41 der 393 Patienten mit Analyse des EGFR-Gens (10 %) lagen Deletionsmutationen in Exon 19 oder die Punktmutation L858R in Exon 21 vor (siehe Punkt 9.2.2.1 und Tabelle 5). Diese Mutationen werden in der vorliegenden Arbeit als „häufige EGFR-Mutationen“ bezeichnet.

Bei 18 der 393 Patienten mit Analyse des EGFR-Gens (5 %) lagen Mutationen vor, die nicht zu einer Deletion in Exon 19 führen und nicht der Punktmutation L858R in Exon 21 oder dem Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q in Exon 20 entsprechen („seltene Mutationen“, siehe Punkt 9.2.2.2 und Tabelle 5).

Bei 6 der 41 Patienten mit „häufiger EGFR-Mutation“ lag eine zusätzliche, „seltene“ nicht-synonyme Mutation im EGFR-Gen vor; bei einem der 41 Patienten mit „häufiger EGFR-Mutation“ lag zusätzlich die non-synonyme Mutation R836R vor. Bei einem der 18 Patienten mit „seltene Mutationen“ lagen zwei „seltene Mutationen“ vor.

Die 341 der 393 Patienten mit Analyse des EGFR-Gens (87 %), bei denen weder eine nicht-synonyme Mutation im EGFR-Gen noch die synonyme Mutation A722A vorlag, werden in der Arbeit als „Fälle mit Wildtyp (WT) im EGFR-Gen“ bezeichnet.

**Tabelle 5: Mutationsanalyse des EGFR-Gens**

Mutationsanalyse des EGFR-Gens	Anzahl (n)
<b>Fälle mit „häufigen EGFR-Mutationen“<sup>1</sup> im EGFR-Gen:</b>	<b>41/393 (ca. 10 %)</b>
- davon Fälle mit Deletionen in Exon 19	29
- davon Fälle mit der Mutation L858R in Exon 21	12
<b>Fälle mit „seltene Mutationen“<sup>2</sup> im EGFR-Gen</b>	<b>18/393 (ca. 5 %)</b>
- davon Fälle mit synonymen Mutationen	2
- davon Fälle mit nicht-synonymen Mutationen	16
<b>Fälle mit Wildtyp (WT) im EGFR-Gen</b>	<b>341/393 (ca. 87 %)</b>

<sup>1</sup> Deletionsmutationen in Exon 19 oder L858R-Mutation in Exon 21.

<sup>2</sup> Mutationen im EGFR-Gen, die nicht zu einer Deletion in Exon 19 führen und nicht der L858R-Mutation in Exon 21 entsprechen.

Eine zusätzliche Analyse des KRAS-Gens existierte bei 101 der 393 Patienten mit EGFR-Analyse.

Komutationen im KRAS-Gen kamen bei 2 der 23 Patienten (9 %) mit Mutation im EGFR-Gen und zusätzlich vorhandener KRAS-Analyse vor:

**Tabelle 6: Mutationen im EGFR-Gen mit Komutation im KRAS-Gen**

Fälle	KRAS-Mutation	EGFR-Mutation
Fall 1	G12C (Exon 2)	G724S (Exon 18)
Fall 2	G12C (Exon 2)	delE746-S752insV (Exon 19)

#### 4.2.1.2 Synonyme Mutation/Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) Q787Q

Bei allen 387 Fällen mit Analyse von Exon 20 konnten Informationen über das Vorliegen des Q787Q und dessen Last gewonnen werden. Der Q787Q SNP lag bei 314 der 387 (81 %) Patienten mit Analyse von Exon 20 vor. Nach Ausschluss der 7 Fälle aus den Jahren 2017 und 2007, die zur Gruppenvergrößerung herangezogen wurden, lag der Anteil von Patienten mit dem Q787Q SNP noch bei 80 %.

Der Q787Q SNP trat unabhängig davon auf, ob andere Mutationen im EGFR-Gen vorlagen (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7: Vorkommen des Q787Q SNP im Zusammenhang mit EGFR-Mutationen**

EGFR-Gen	Q787Q	
	WT (Genotyp GG)	Mutation (Genotyp GA oder AA)
WT	65	275
Nicht-synonyme Mutation	8	39
- davon „häufige EGFR-Mutationen“	8	23
- davon „seltene Mutationen“	0	9
- davon multiple Mutationen im EGFR-Gen	0	7

Eine zusätzliche Analyse des KRAS-Gens war bei 97 der 387 Patienten mit Exon 20-EGFR-Gen-Analyse vorhanden. Auch hier zeigte sich das Auftreten des SNP unabhängig vom Vorliegen einer KRAS-Mutation (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8: Vorkommen des Q787Q SNP im Zusammenhang mit KRAS-Mutationen**

KRAS-Gen	Q787Q	
	WT	Mutation
WT	22	47
Mutation	7	21

## 4.2.2 Mutationsanalyse des KRAS-Gens

Bei 104 Patienten der Gesamtstichprobe (N=396) war eine Analyse des KRAS-Gens verfügbar. Es konnte bei 31 (30 %) der 104 Patienten mit KRAS-Analyse eine Mutation der Codons 12 oder 13 des KRAS-Gens festgestellt werden (siehe Punkt 9.2.3). Nach Ausschluss der 8 Patienten aus dem Jahr 2017, die zur Gruppenvergrößerung herangezogen wurden, lag der Anteil von KRAS-Mutationsträgern bei 24 %.

Die Höhe der Mutationslast konnte bei 23 von 31 Patienten mit KRAS-Mutation festgestellt werden (siehe Punkt 9.2.3).

## 4.3 Einteilung in Unterkollektive

Das Gesamtkollektiv (N=396) wurde für die weiteren Untersuchungen in drei Unterkollektive eingeteilt:

- „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“
- „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“
- „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“

### 4.3.1 Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“

Das Unterkollektiv (N=376) bestand aus 35 Patienten mit „häufiger EGFR-Mutation“ und 341 Patienten mit Wildtyp (WT) im EGFR-Gen.

Bei 34 der 35 Patienten konnte die EGFR-Mutationslast bestimmt werden.

Die Fälle mit „häufiger EGFR-Mutation“, bei denen noch weitere nicht-synonyme Mutationen im EGFR-Gen vorlagen (6 von 41 Fällen), wurden aus dem Unterkollektiv und dessen Analysen ausgeschlossen.

Der Gruppe „WT im EGFR-Gen“ wurden 341 Fälle zugeteilt, bei denen weder eine nicht-synonyme EGFR-Mutation und noch die synonyme Mutation A722A (EGFR-Gen: Exon 18) vorhanden war.

Die Bildung dieses Unterkollektivs erfolgte unabhängig davon, ob Mutationen im KRAS-Gen oder die synonymen Mutationen Q787Q oder R836R im EGFR-Gen vorlagen.

#### 4.3.2 Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“

Das Unterkollektiv (N=104) bestand aus 31 Patienten mit Mutation im KRAS-Gen und 73 Patienten mit Wildtyp im KRAS-Gen.

Bei 23 Patienten der 31 Patienten mit Mutation im KRAS-Gen konnte die KRAS-Mutationslast bestimmt und Gruppen anhand von dieser gebildet werden.

Bei den auf das KRAS-Gen bezogenen Gruppenbildungen wurden Patienten ohne zusätzliche Analyse des EGFR-Gens (N=3) und Patienten, bei denen eine nicht-synonyme Mutation im EGFR-Gen vorlag (N=2), in die Analyse miteingeschlossen.

Synonyme Einzelnukleotid-Polymorphismen wurden bei der Bildung des Unterkollektivs nicht berücksichtigt.

#### 4.3.3 Unterkollektiv „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“

Das Unterkollektiv (N=340) bestand aus 275 Patienten mit dem Q787Q SNP und aus 65 Patienten ohne den Q787Q SNP.

Patienten mit nicht-synonymen Mutationen im EGFR-Gen (N=46) sowie der synonymen Mutation A722A (Exon 18, N=1) wurden aus dem Unterkollektiv ausgeschlossen.

Bei allen 275 Patienten des Unterkollektivs mit Q787Q SNP konnte die Q787Q-Last bestimmt und Gruppenbildungen anhand dieser vorgenommen werden.

Mutationen im KRAS-Gen blieben bei der Bildung des Unterkollektivs unberücksichtigt.

#### 4.3.4 Gruppenbildung anhand der Mutationslast

Die Gruppenbildungen für diese Arbeit erfolgten wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben.

Die Ansätze, die Gruppen und die Gruppengrößen des Unterkollektivs „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“ sind in Tabelle 9 aufgelistet.

**Tabelle 9: Gruppenbildung im Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“**

Ansatz	Gruppe	Anzahl	
<b>1. Trennung Wildtyp und Mutation</b>	Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen	34 <sup>1</sup>	
	Patienten mit „häufiger EGFR-Mutation“	35	
<b>2. Dichotome Aufteilung der Gruppe mit EGFR-Mutation anhand des Medians der EGFR-Mutationslast (MT/WT-Ratio=0,67)</b>	Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen	34 <sup>1</sup>	
	Patienten mit niedriger EGFR-Mutationslast (MT/WT-Ratio=0,01-0,66)	16 <sup>2</sup>	34 <sup>1</sup>
	Patienten mit hoher EGFR-Mutationslast (MT/WT-Ratio $\geq$ 0,67)	18 <sup>2</sup>	
<b>3. Aufteilung der Gruppe mit EGFR-Mutation in Terzile abhängig von der EGFR-Mutationslast</b>	Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen	34 <sup>1</sup>	
	Patienten mit niedriger EGFR-Mutationslast (1.Terzil: MT/WT-Ratio=0,01-0,53)	11 <sup>2</sup>	34 <sup>1</sup>
	Patienten mit mittlerer EGFR-Mutationslast (2.Terzil: MT/WT-Ratio=0,54-1,04)	12 <sup>2</sup>	
	Patienten mit hoher EGFR-Mutationslast (3.Terzil: MT/WT-Ratio $\geq$ 1,05)	11 <sup>2</sup>	
<b>4. Dichotome Aufteilung der Gruppe mit EGFR-Mutation anhand des EGFR-MT/WT-Ratio-Schwellenwertes von 1</b>	Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen	34 <sup>1</sup>	
	Patienten mit niedriger EGFR-Mutationslast (MT/WT-Ratio=0,01-0,99)	22 <sup>2</sup>	34 <sup>1</sup>
	Patienten mit hoher EGFR-Mutationslast (MT/WT-Ratio $\geq$ 1)	12 <sup>2</sup>	

<sup>1</sup> Bei einem der 35 Patienten mit „häufiger EGFR-Mutation“ konnte die EGFR-Mutationslast nicht ermittelt werden.

<sup>2</sup> Patienten mit homozygoter EGFR-Mutation wurden der Gruppe mit hoher EGFR-Mutationslast zugeschlagen.

Ein am Genotyp (heterozygot/homozygot) orientierter Ansatz existiert weder im Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“ noch im Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“, da „häufige EGFR-Mutationen“ nur bei zwei Patienten homozygot vorlagen und kein Fall mit homozygoter KRAS-Mutation gefunden wurde.

Im Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“ ergaben sich in den unterschiedlichen Ansätzen folgende Gruppen und Gruppengrößen:

**Tabelle 10: Gruppenbildung im Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“**

Ansatz	Gruppe	Anzahl	
<b>1. Trennung Wildtyp und Mutation</b>	Patienten mit Wildtyp im KRAS-Gen	73	
	Patienten mit KRAS-Mutation	31	
<b>2. Dichotome Aufteilung der Gruppe mit KRAS-Mutation anhand des Medians der KRAS-Mutationslast (MT/WT-Ratio=0,69)</b>	Patienten mit Wildtyp im KRAS-Gen	73	
	Patienten mit niedriger KRAS-Mutationslast (MT/WT-Ratio=0,01-0,68)	11	23 <sup>1</sup>
	Patienten mit hoher KRAS-Mutationslast (MT/WT-Ratio $\geq$ 0,69)	12	
<b>3. Aufteilung der Gruppe mit KRAS-Mutation in Terzile abhängig von der KRAS-Mutationslast</b>	Patienten mit Wildtyp im KRAS-Gen	73	
	Patienten mit niedriger KRAS-Mutationslast (1.Terzil: MT/WT-Ratio=0,01-0,47)	7	23 <sup>1</sup>
	Patienten mit mittlerer KRAS-Mutationslast (2.Terzil: MT/WT-Ratio=0,48-0,99)	7	
	Patienten mit hoher KRAS-Mutationslast (3.Terzil: MT/WT-Ratio $\geq$ 1)	9	
<b>4. Dichotome Aufteilung der Gruppe mit KRAS-Mutation anhand des KRAS-MT/WT-Ratio-Schwellenwertes von 1</b>	Patienten mit Wildtyp im KRAS-Gen	73	
	Patienten mit niedriger KRAS-Mutationslast (MT/WT-Ratio=0,01-0,99)	14	23 <sup>1</sup>
	Patienten mit hoher KRAS-Mutationslast (MT/WT-Ratio $\geq$ 1)	9	

<sup>1</sup> Bei acht der 31 Patienten mit KRAS-Mutation konnte die KRAS-Mutationslast nicht ermittelt werden.

Die Gruppen der Ansätze des Unterkollektivs „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“ sind mitsamt ihrer Gruppengröße in Tabelle 11 aufgeführt:

**Tabelle 11: Gruppenbildung im Unterkollektiv „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“**

Ansatz	Gruppe	Anzahl	
<b>1. Trennung Wildtyp und Q787Q SNP</b>	Patienten mit Wildtyp Q787Q	65	
	Patienten mit Q787Q SNP	275	
<b>2. Dichotome Aufteilung der Gruppe mit Q787Q SNP anhand des Medians der Q787Q-Last (MT/WT-Ratio=1,03)</b>	Patienten mit Wildtyp Q787Q	65	
	Patienten mit niedriger Q787Q-Last (MT/WT-Ratio=0,01-1,02)	85 <sup>1</sup>	275
	Patienten mit hoher Q787Q-Last (MT/WT-Ratio $\geq$ 1,03)	190 <sup>1</sup>	
<b>3. Aufteilung der Gruppe mit Q787Q SNP in Terzile abhängig von der Q787Q-Last</b>	Patienten mit Wildtyp Q787Q	65	
	Patienten mit niedriger Q787Q-Last (1.Terzil: MT/WT-Ratio=0,01-0,82)	56 <sup>1</sup>	275
	Patienten mit mittlerer Q787Q-Last (2.Terzil: MT/WT-Ratio=0,83-1,35)	58 <sup>1</sup>	
	Patienten mit hoher Q787Q-Last (3.Terzil: MT/WT-Ratio $\geq$ 1,36)	161 <sup>1</sup>	
<b>4. Aufteilung der Gruppe mit Q787Q SNP in eine Gruppe mit heterozygot vorliegendem und eine Gruppe mit homozygot vorliegendem Q787Q SNP</b>	Patienten mit Wildtyp Q787Q	65	
	Patienten mit heterozygotem Q787Q SNP	170 <sup>1</sup>	275
	Patienten mit homozygotem Q787Q SNP	105 <sup>1</sup>	
<b>5. Dichotome Aufteilung der Gruppe mit Q787Q SNP anhand des Q787Q-MT/WT-Ratio-Schwellenwertes von 1</b>	Patienten mit Wildtyp Q787Q	65	
	Patienten mit niedriger Q787Q-Last (MT/WT-Ratio=0,01-0,99)	80 <sup>1</sup>	275
	Patienten mit hoher Q787Q-Last (MT/WT-Ratio $\geq$ 1)	195 <sup>1</sup>	

<sup>1</sup> Patienten mit homozygotem Q787Q SNP wurden der Gruppe mit hoher Q787Q-Last zugeschlagen.

---

## 4.4 Bedeutung der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutationslast für die klinisch-histopathologischen Standardparameter

In diesem Kapitel wird der Zusammenhang zwischen der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutationslast und den klinisch-histopathologischen Standardparametern untersucht.

Er wird im Unterkapitel 4.4.1 im Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder mit Wildtyp im EGFR-Gen“, im Unterkapitel 4.4.2 im Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder mit Wildtyp im KRAS-Gen“ und im Unterkapitel 4.4.3 im Unterkollektiv „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“ betrachtet.

Zunächst wird in den oben genannten Unterkapiteln in einem ersten Ansatz analysiert, ob ein Zusammenhang zwischen dem reinen Vorliegen einer genetischen Veränderung („häufige EGFR-Mutationen“, Mutationen im KRAS-Gen, Q787Q SNP) und den klinisch-histopathologischen Standardparametern besteht.

In den darauffolgenden Ansätzen wird der Zusammenhang zwischen den anhand der Mutationslast gebildeten Gruppen (siehe Punkt 4.3.4) und den klinisch-histopathologischen Standardparametern behandelt.

#### 4.4.1 Klinisch-histopathologische Standardparameter im Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“

##### 4.4.1.1 Ansatz 1: Untersuchung der Gruppe mit Wildtyp im EGFR-Gen und der Gruppe mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘

In Ansatz 1 wurden Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen („Wildtyp“) und Patienten mit „häufiger EGFR-Mutation“ („19-del/21-L858R“) miteinander verglichen.

Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen waren mit einem Anteil von 94 % signifikant ( $p=0,00$ ) häufiger (Ex)raucher als Patienten mit „häufiger EGFR-Mutation“ (50 %; siehe Abbildung 5).

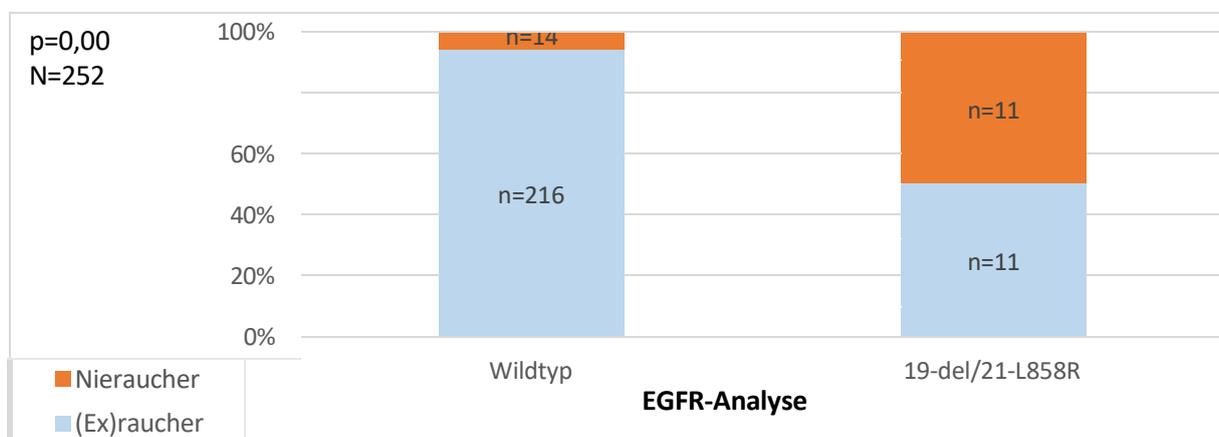


Abbildung 5: Raucherstatus in den Gruppen ohne und mit „häufiger EGFR-Mutation“

Anhand Abbildung 6 wird deutlich, dass bei Patienten mit „häufiger EGFR-Mutation“ und Raucherhistorie tendenziell eine geringere Anzahl der pys vorlag (MD=15 pys) als bei Patienten mit Wildtyp und Raucherhistorie (MD=40 pys). Diese Beobachtung erwies sich nach Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests allerdings als nicht signifikant ( $p=0,07$ ).

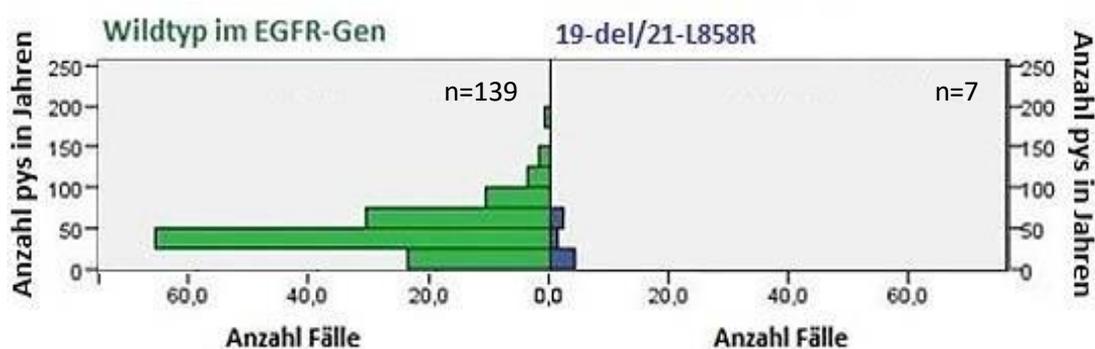
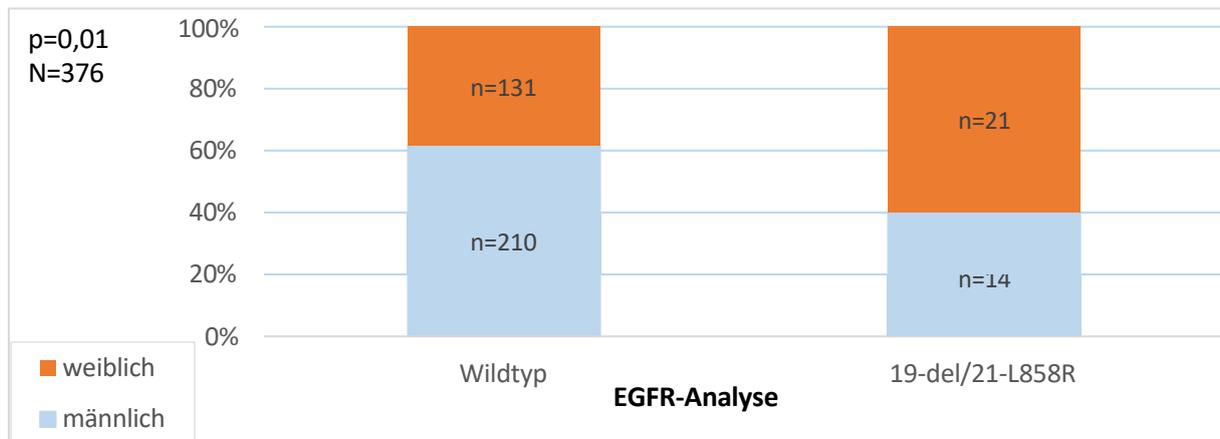


Abbildung 6: Verteilung des Parameters pys in den Gruppen mit Wildtyp im EGFR-Gen (MD=40 pys) und der Gruppe mit „häufiger EGFR-Mutation“ (MD=15 pys)

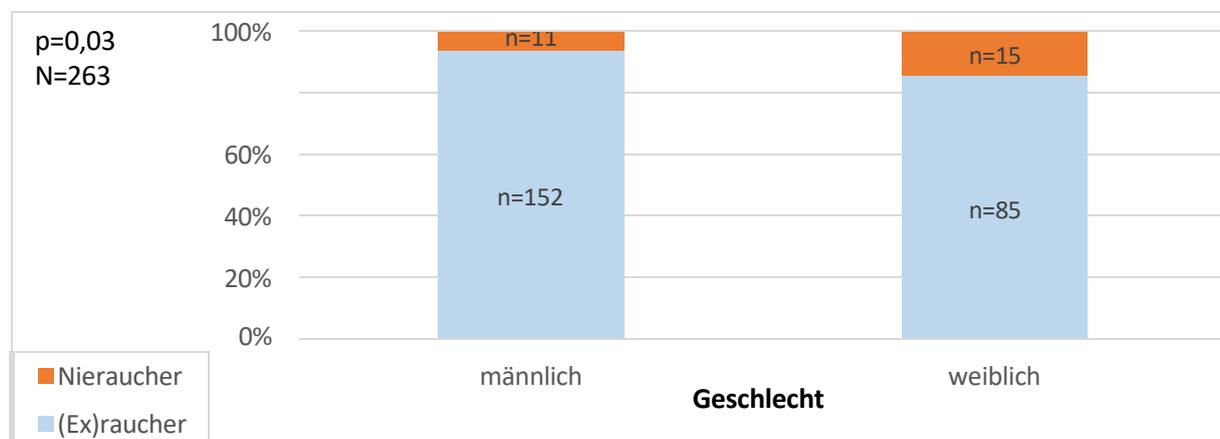
N=146

Der Männeranteil war in der Gruppe „Wildtyp“ mit 62 % signifikant ( $p=0,01$ ) höher als in der Gruppe „19-del/21-L858R“ (40 %; siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Geschlechterverteilung in den Gruppen mit und ohne „häufige EGFR-Mutation“**

Da in dem Kollektiv bei Männern der (Ex)raucheranteil mit 93 % signifikant ( $p=0,03$ ) höher war als bei Frauen (85 %; siehe Abbildung 8) und „häufige EGFR-Mutationen“ (wie in Abbildung 5 dargestellt) prozentual häufiger bei Nierauchern als bei (Ex)rauchern vorkamen, ist es denkbar, dass das Vorkommen von „häufigen EGFR-Mutationen“ stärker mit dem Status „Nieraucher“ als mit dem weiblichen Geschlecht assoziiert ist. Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob „häufige EGFR-Mutationen“ unabhängig vom Raucherstatus öfter bei Frauen als bei Männern vorlagen.

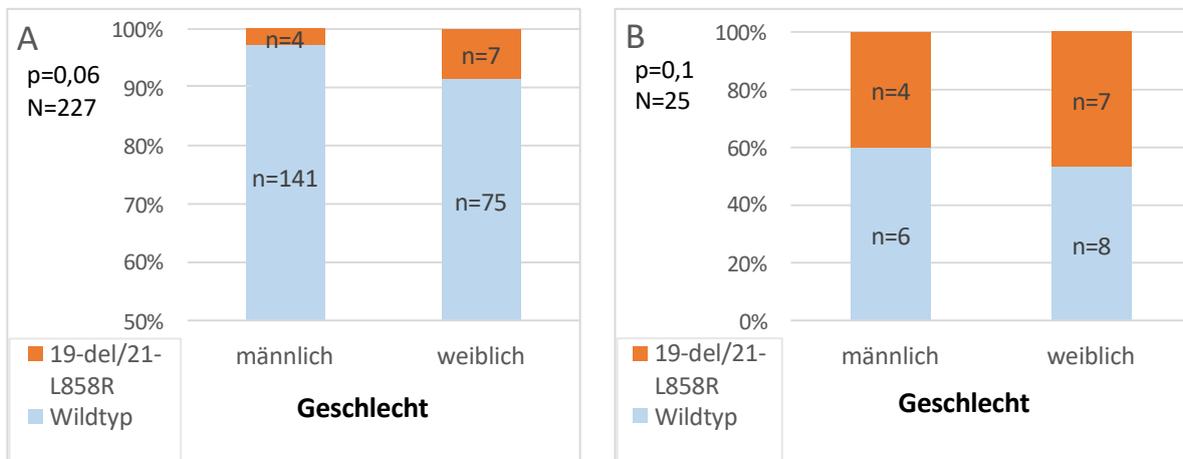


**Abbildung 8: Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der Raucherhistorie**

Zunächst wurde überprüft, ob bei Frauen öfter als bei Männern „häufige EGFR-Mutationen“ vorlagen in den Subgruppen „(Ex)raucher“ oder „Nieraucher“:

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Geschlecht und dem Vorkommen von „häufigen EGFR-Mutationen“ unter Berücksichtigung der Raucherhistorie lagen bei Frauen in der Subgruppe „(Ex)raucher“ lediglich tendenziell ( $p=0,06$ ) öfter „häufige EGFR-Mutationen“ vor als bei Männern (9 % vs. 3 %; siehe Abbildung 9 A).

Bei Nierauchern lagen „häufige EGFR-Mutationen“ nicht signifikant öfter bei Frauen als bei Männern vor (47 % vs. 40 %;  $p=0,1$ ; siehe Abbildung 9 B).

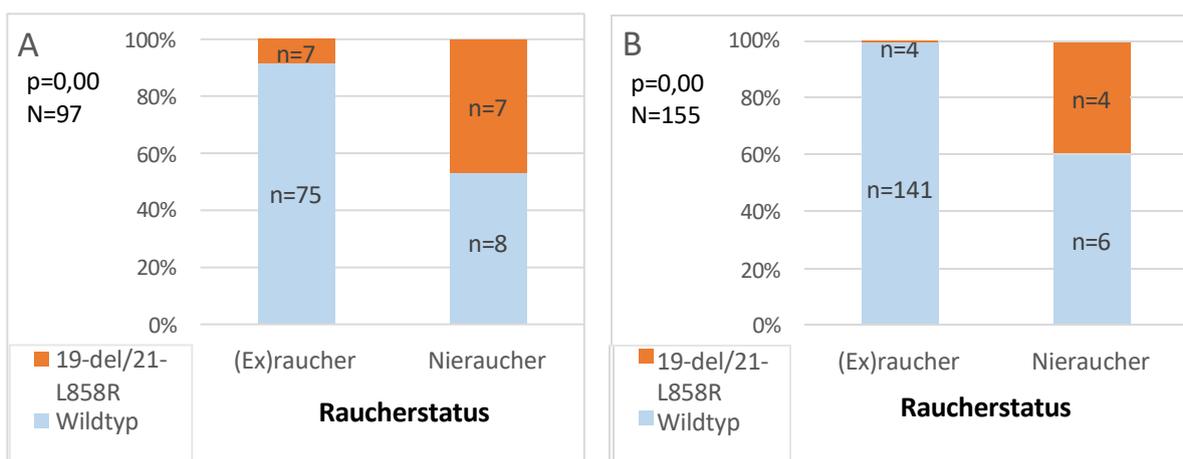


**Abbildung 9: Geschlechterverteilung in anhand der Raucherhistorie gebildeten Subgruppen**  
 A, in der Subgruppe „(Ex)raucher“.  
 B, in der Subgruppe „Nieraucher“.

Außerdem wurde untersucht, ob „häufige EGFR-Mutationen“ geschlechtsunabhängig häufiger bei Nierauchern als bei (Ex)rauchern vorkamen.

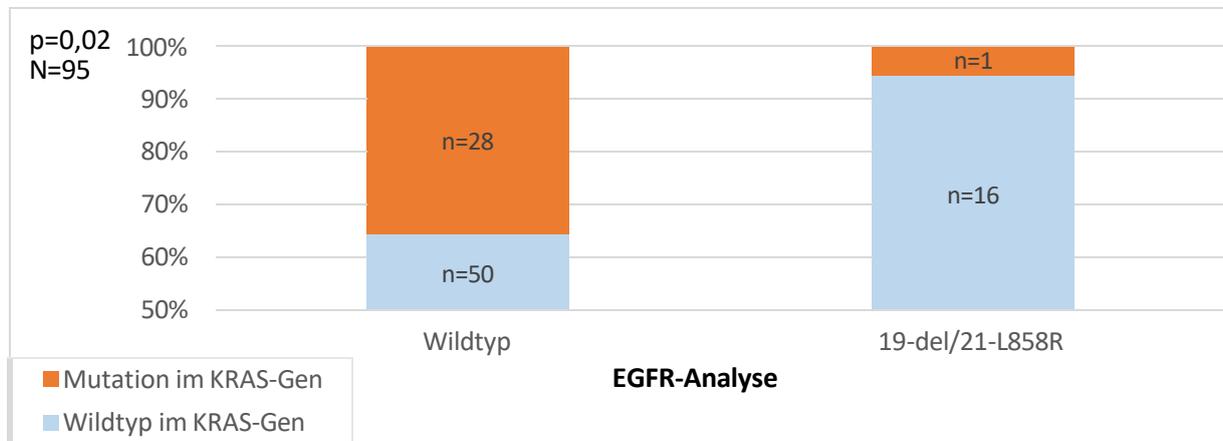
Hierzu wurde überprüft, ob „häufige EGFR-Mutationen“ in den Subgruppen „Männer“ oder „Frauen“ öfter bei Nierauchern als bei (Ex)rauchern vorlagen:

„Häufige EGFR-Mutationen“ waren sowohl in der Subgruppe „Frauen“ als auch in der Subgruppe „Männer“ signifikant (jeweils  $p=0,00$ ) öfter bei Nierauchern (47 % und 40 %) als bei (Ex)rauchern (9 % und 3 %) zu finden (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: (Ex)raucherverteilung in anhand vom Geschlecht gebildeten Subgruppen**  
 A, in der Subgruppe „Frauen“.  
 B, in der Subgruppe „Männer“.

Mit 36 % war der Anteil von Patienten mit Mutation im KRAS-Gen in der Gruppe ohne „häufige EGFR-Mutation“ („Wildtyp“) signifikant ( $p=0,02$ ) höher als in der Gruppe „19-del/21-L858R“ (6 %; siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11: Zusammenhang zwischen Mutationen im EGFR-Gen und Mutationen im KRAS-Gen**

Hinsichtlich der folgenden Merkmale ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen:

**Tabelle 12: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den Gruppen ohne und mit „häufiger EGFR-Mutation“**

<b>Merkmal</b>	<b>EGFR-Gen-Analyse (376 Fälle)</b>		<b>Chi-Quadrat-Test</b>
	<b>Wildtyp (n=341)</b>	<b>19-del/21-L858R (n=35)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Alter zum Diagnosezeitpunkt (Median)</b>	65	64	0,98 <sup>1</sup>
<b>T</b>			0,58
T1 und T2	96	9	
T3 und T4	171	21	
<b>N</b>			0,27
N0	67	5	
N1 bis N3	201	26	
<b>M</b>			0,57
M0	110	11	
M1	176	22	
<b>Grading</b>			0,81
G1 und G2	117	12	
G3	161	15	
<b>Stadium nach UICC8</b>			0,82
I bis IIIA	63	6	
IIIB und IV	218	25	
<b>Gewebeursprung</b>			0,97
pulmonaler Primarius	272	28	
Metastase	67	7	

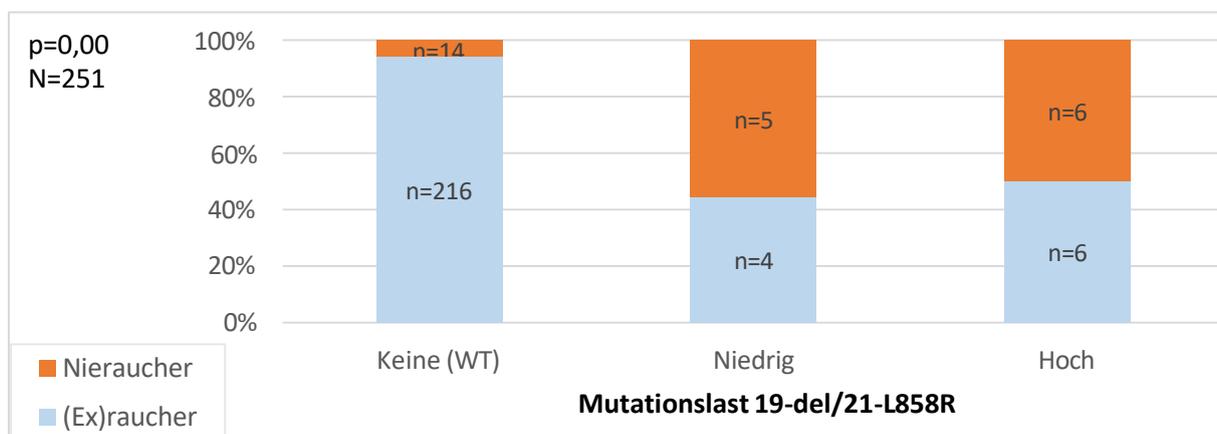
<sup>1</sup> Mann-Whitney-U-Test.

#### 4.4.1.2 Ansatz 2: Untersuchung der am Median orientierten Gruppenbildung

In Ansatz 2 wurden Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen, Patienten mit einer EGFR-MT/WT-Ratio unter dem Median („Niedrige Mutationslast im EGFR-Gen“, EGFR-MT/WT-Ratio=0,01-0,66) und Patienten mit einer EGFR-MT/WT-Ratio gleich oder größer dem Median („Hohe Mutationslast im EGFR-Gen“, EGFR-MT/WT-Ratio $\geq$ 0,67) miteinander verglichen.

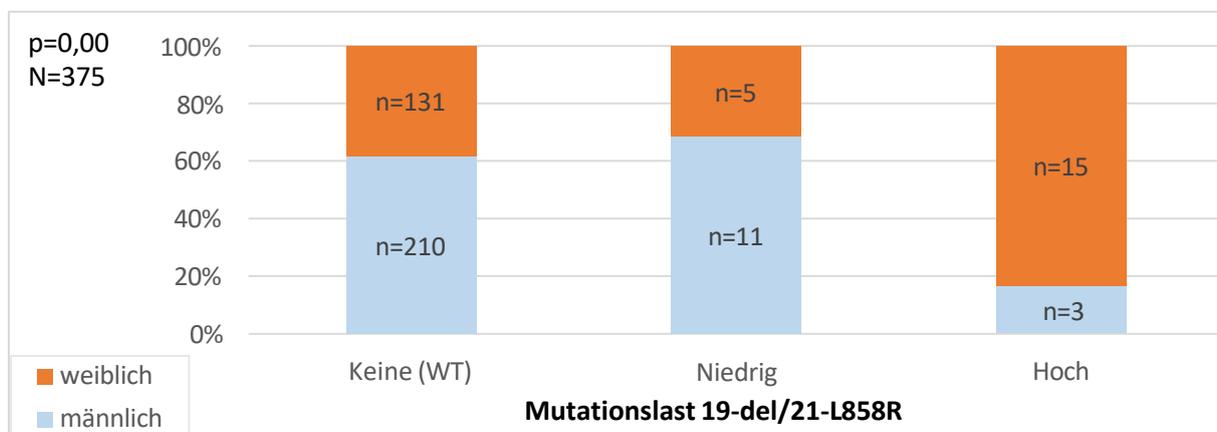
Abbildung 12 zeigt, dass Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen mit einem Anteil von 94 % häufiger (Ex)raucher waren als Patienten mit niedriger Mutationslast im EGFR-Gen (44 %) und Patienten mit hoher Mutationslast im EGFR-Gen (50 %; p=0,00).

Zwischen Patienten mit niedriger und Patienten mit hoher Mutationslast im EGFR-Gen ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Verteilung von (Ex)rauchern und Nierauchern.



**Abbildung 12: (Ex)raucherverteilung in den anhand des Medians gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“)**

Der Männeranteil war in den Gruppen „Wildtyp im EGFR-Gen“ (62 %) und „Niedrige Mutationslast im EGFR-Gen“ (69 %) signifikant (p=0,00) höher als in der Gruppe „Hohe Mutationslast im EGFR-Gen“ (17 %; siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13: Geschlechterverteilung in den anhand des Medians gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“)**

Untersuchungen zur Geschlechterverteilung in den Subgruppen „Nieraucher“ und „(Ex)raucher“ und zum Zusammenhang zwischen dem Parameter „pys“ und der EGFR-Mutationslast wurden aufgrund der geringen Fallzahlen nicht durchgeführt.

Hinsichtlich der in der nachfolgenden Tabelle aufgelisteten Parameter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den am Median orientierten Gruppen:

**Tabelle 13: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den anhand des Medians gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“)**

Merkmal	Mutationslast 19-del/21-L858R (375 Fälle)			Chi-Quadrat-Test
	Keine (WT) (n=341)	Niedrig <sup>1</sup> (n=16)	Hoch <sup>2</sup> (n=18)	p-Wert
<b>Alter zum Diagnosezeitpunkt (Median)</b>	65	72	60	0,43 <sup>3</sup>
<b>T</b>				0,64
T1 und T2	96	4	4	
T3 und T4	171	9	12	
<b>N</b>				0,52 <sup>4</sup>
N0	67	3	2	
N1 bis N3	201	11	14	
<b>M</b>				0,9
M0	110	5	6	
M1	176	10	11	
<b>Grading</b>				0,81
G1 und G2	117	4	8	
G3	161	6	8	
<b>Stadium nach UICC8</b>				0,94 <sup>4</sup>
I bis IIIA	63	3	3	
IIIB und IV	218	11	13	
<b>Gewebeursprung</b>				0,84 <sup>4</sup>
pulmonaler Primarius	272	12	15	
Metastase	67	4	3	

<sup>1</sup> EGFR-MT/WT-Ratio=0,01-0,66.

<sup>2</sup> EGFR-MT/WT-Ratio≥0,67.

<sup>3</sup> Kruskal-Wallis-Test.

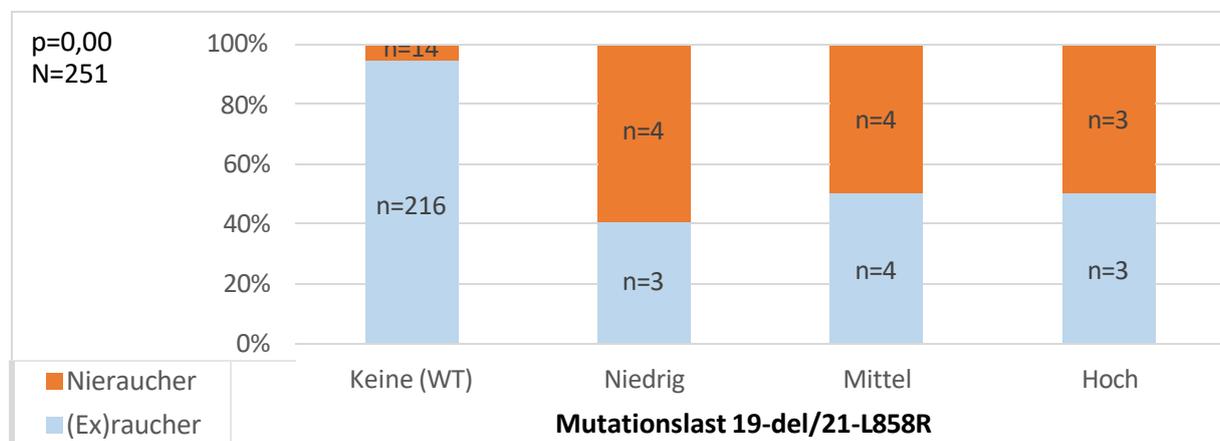
<sup>4</sup> Exakter Test nach Fisher.

#### 4.4.1.3 Ansatz 3: Untersuchung der an Terzilen orientierten Gruppenbildung

In Ansatz 3 wurden die Gruppe mit Wildtyp im EGFR-Gen, die Gruppe mit niedriger EGFR-Mutationslast (EGFR-MT/WT-Ratio=0,01-0,53), die Gruppe mit mittlerer EGFR-Mutationslast (EGFR-MT/WT-Ratio=0,54-1,04) und die Gruppe mit hoher EGFR-Mutationslast (EGFR-MT/WT-Ratio $\geq$ 1,05) miteinander verglichen.

Der (Ex)raucheranteil war in der Gruppe mit Wildtyp im EGFR-Gen mit 94 % signifikant ( $p=0,00$ ) höher als in den Gruppen „Niedrige Mutationslast im EGFR-Gen“ (43 %), „Mittlere Mutationslast im EGFR-Gen“ (50 %) und „Hohe Mutationslast im EGFR-Gen“ (50 %; siehe Abbildung 14).

Beim Vergleich der einzelnen Gruppen mit Mutation im EGFR-Gen untereinander erhielt man kein signifikantes Ergebnis hinsichtlich der (Ex)raucherverteilung.



**Abbildung 14: (Ex)raucherverteilung in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“)**

Der Männeranteil war in den Gruppen „Wildtyp im EGFR-Gen“ (62 %) und „Niedrige Mutationslast im EGFR-Gen“ (73 %) höher als in den Gruppen „Mittlere Mutationslast im EGFR-Gen“ (33 %) und „Hohe Mutationslast im EGFR-Gen“ (18 %; siehe Abbildung 15).

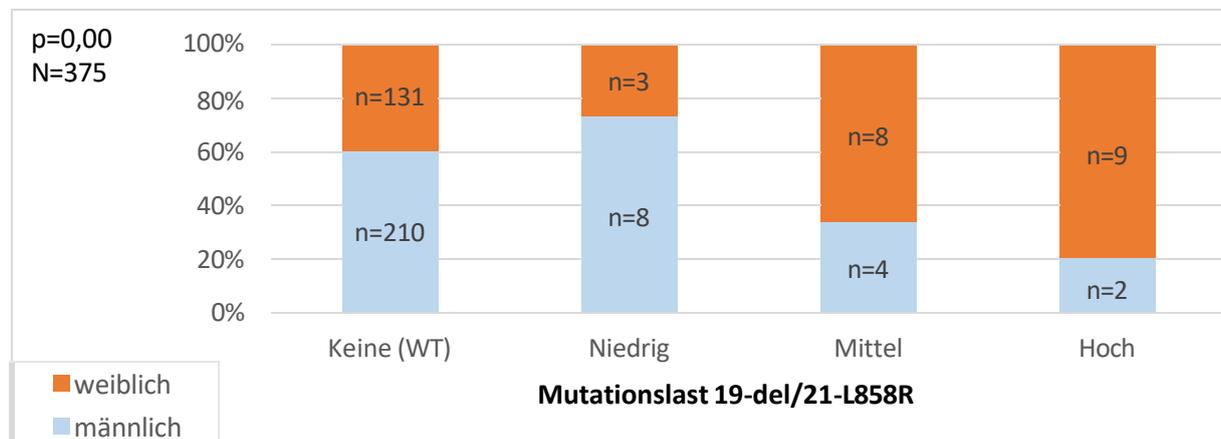
Zwischen Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen (62 %) und Patienten mit niedriger EGFR-Mutationslast (73 %) gab es hinsichtlich des Männeranteils keinen signifikanten Unterschied.

Jedoch war der Männeranteil in der Wildtypgruppe mit 62 % tendenziell ( $p=0,07$ ) höher als der Männeranteil in der Gruppe mit mittlerer EGFR-Mutationslast (33 %) und signifikant ( $p=0,01$ ) höher als der Männeranteil in der Gruppe mit hoher EGFR-Mutationslast (18 %, jeweils mit dem exakten Test nach Fisher analysiert).

Auch der Männeranteil in der Gruppe mit niedriger EGFR-Mutationslast war mit 73 % signifikant ( $p=0,01$ ) höher als der Männeranteil (18 %) in der Gruppe mit hoher EGFR-Mutationslast.

Dagegen war der Männeranteil in der Gruppe „Niedrige Mutationslast im EGFR-Gen“ (73 %) nicht signifikant ( $p=0,06$ ) höher als der Männeranteil (33 %) in der Gruppe „Mittlere Mutationslast im EGFR-Gen“.

Zwischen Patienten mit mittlerer EGFR-Mutationslast (Männeranteil 33 %) und hoher EGFR-Mutationslast (Männeranteil 18 %) ergab sich kein signifikanter Unterschied.



**Abbildung 15: Geschlechterverteilung in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“)**

Untersuchungen zur Geschlechterverteilung in den Subgruppen „Nieraucher“ und „(Ex)raucher“ und zum Zusammenhang zwischen dem Parameter „pys“ und der EGFR-Mutationslast wurden auch in diesem Ansatz aufgrund der geringen Fallzahlen nicht durchgeführt.

Hinsichtlich der folgenden klinisch-histopathologischen Standardparameter ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse im terzilorientierten Ansatz:

**Tabelle 14: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“)**

<b>Merkmal</b>	<b>Mutationslast 19-del/21-L858R (375 Fälle)</b>				<b>Chi-Quadrat-Test</b>
	<b>Keine (WT) (n=341)</b>	<b>Niedrig<sup>1</sup> (n=11)</b>	<b>Mittel<sup>2</sup> (n=12)</b>	<b>Hoch<sup>3</sup> (n=11)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Alter zum Diagnosezeitpunkt (Median)</b>	65	73	64,5	64	0,87 <sup>4</sup>
<b>T</b>					
T1 und T2	96	2	3	3	0,79 <sup>5</sup>
T3 und T4	171	7	8	6	
<b>N</b>					
N0	67	2	1	2	0,69 <sup>5</sup>
N1 bis N3	201	8	10	7	
<b>M</b>					
M0	110	3	5	3	0,80 <sup>5</sup>
M1	176	8	6	7	
<b>Grading</b>					
G1 und G2	117	3	4	5	0,96 <sup>5</sup>
G3	161	3	6	5	
<b>Stadium nach UICC8</b>					
I bis IIIA	63	1	3	2	0,82 <sup>5</sup>
IIIB und IV	218	9	8	7	
<b>Gewebeart</b>					
pulmonaler Primarius	272	9	10	8	0,95 <sup>5</sup>
Metastase	67	2	2	3	

<sup>1</sup> EGFR-MT/WT-Ratio=0,01-0,53.

<sup>2</sup> EGFR-MT/WT-Ratio=0,54-1,04.

<sup>3</sup> EGFR-MT/WT-Ratio $\geq$ 1,05.

<sup>4</sup> Kruskal-Wallis-Test.

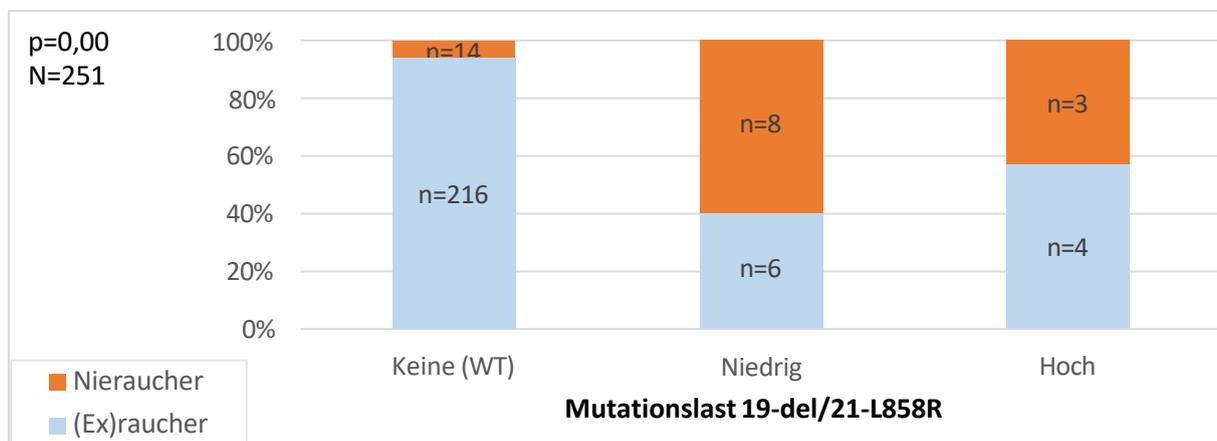
<sup>5</sup> Exakter Test nach Fisher.

#### 4.4.1.4 Ansatz 4: Untersuchung der an der MT/WT-Ratio 1 orientierten Gruppenbildung

In dieser Gruppeneinteilung (Ansatz 4) wurden die Gruppe mit Wildtyp im EGFR-Gen, die Gruppe mit niedriger EGFR-Mutationslast (EGFR-MT/WT-Ratio=0,01-0,99) und die Gruppe mit hoher EGFR-Mutationslast (EGFR-MT/WT-Ratio $\geq$ 1) miteinander verglichen.

In der Gruppe „Wildtyp im EGFR-Gen“ war der Anteil von (Ex)rauchern mit 94 % signifikant ( $p=0,00$ ) höher als in den Gruppen „Niedrige Mutationslast im EGFR-Gen“ (43 %) und „Hohe Mutationslast im EGFR-Gen“ (57 %; siehe Abbildung 16).

Zwischen den Gruppen „Niedrige Mutationslast im EGFR-Gen“ (43 %) und „Hohe Mutationslast im EGFR-Gen“ (57 %) ergaben sich bezüglich des (Ex)raucheranteils keine signifikanten Unterschiede.



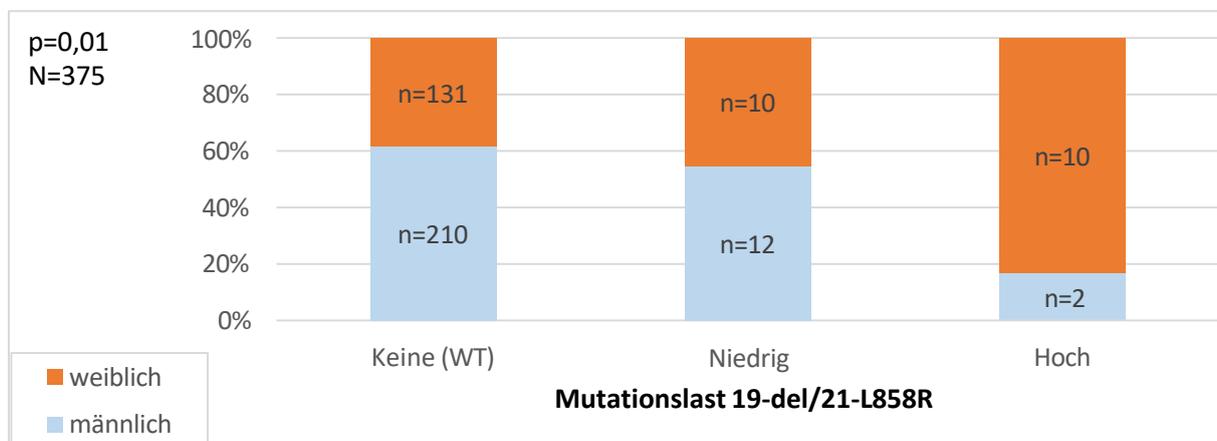
**Abbildung 16: (Ex)raucherverteilung in den anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“)**

Die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der Männeranteil in den Gruppen „Wildtyp im EGFR-Gen“ (62 %) und „Niedrige Mutationslast im EGFR-Gen“ (55 %) höher war als in der Gruppe „Hohe Mutationslast im EGFR-Gen“ (17 %;  $p=0,01$ ).

Einen signifikanten Unterschied der Männeranteile in den Gruppen „Wildtyp im EGFR-Gen“ und „Niedrige Mutationslast im EGFR-Gen“ gab es nicht ( $p=0,51$ ).

Tendenziell war der Männeranteil in der Gruppe „Niedrige Mutationslast im EGFR-Gen“ (55 %) höher als in der Gruppe „Hohe Mutationslast im EGFR-Gen“ (17 %). Der p-Wert ( $p=0,07$ ), der sich mit dem exakten Test nach Fisher ergab, erreichte jedoch nicht das von uns festgelegte Signifikanzniveau.

Der Männeranteil in der Gruppe „Wildtyp im EGFR-Gen“ (62 %) unterschied sich signifikant ( $p=0,00$  mit dem exakten Test nach Fisher) vom Männeranteil in der Gruppe „Hohe Mutationslast im EGFR-Gen“ (17 %).



**Abbildung 17: Geschlechterverteilung in den anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“)**

Auch in diesem Ansatz wurden aufgrund der geringen Fallzahlen keine Untersuchungen zur Geschlechterverteilung in den Subgruppen „Nieraucher“ und „(Ex)raucher“ und zum Zusammenhang zwischen dem Parameter „pys“ und der EGFR-Mutationslast durchgeführt.

Bei den folgenden klinisch-histopathologischen Standardparametern ergaben sich zwischen den Gruppen von Ansatz 4 keine signifikanten Unterschiede:

**Tabelle 15: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit ‚häufiger EGFR-Mutation‘ oder Wildtyp im EGFR-Gen“)**

<b>Merkmal</b>	<b>Mutationslast 19-del/21-L858R (375 Fälle)</b>			<b>Chi-Quadrat-Test</b>
	<b>Keine (WT) (n=341)</b>	<b>Niedrig<sup>1</sup> (n=22)</b>	<b>Hoch<sup>2</sup> (n=12)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Alter zum Diagnosezeitpunkt (Median)</b>	65	70	62	0,47 <sup>3</sup>
<b>T</b>				0,66
T1 und T2	96	5	3	
T3 und T4	171	14	7	
<b>N</b>				0,69 <sup>4</sup>
N0	67	3	2	
N1 bis N3	201	17	8	
<b>M</b>				0,76
M0	110	8	3	
M1	176	13	8	
<b>Grading</b>				0,92
G1 und G2	117	7	5	
G3	161	8	6	
<b>Stadium nach UICC8</b>				1,0 <sup>4</sup>
I bis IIIA	63	4	2	
IIIB und IV	218	16	8	
<b>Gewebeursprung</b>				0,88 <sup>4</sup>
pulmonaler Primarius	272	18	9	
Metastase	67	4	3	

<sup>1</sup> EGFR-MT/WT-Ratio=0,01-0,99.

<sup>2</sup> EGFR-MT/WT-Ratio $\geq$ 1.

<sup>3</sup> Kruskal-Wallis-Test.

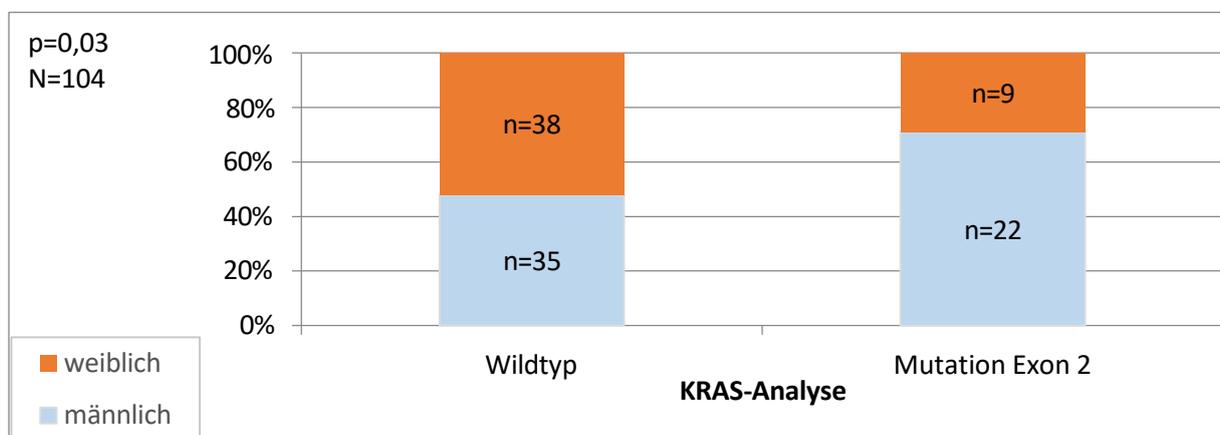
<sup>4</sup> Exakter Test nach Fisher.

#### 4.4.2 Klinisch-histopathologische Standardparameter im Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“

##### 4.4.2.1 Ansatz 1: Untersuchung der Gruppe mit Wildtyp im KRAS-Gen und der Gruppe mit Mutation im KRAS-Gen

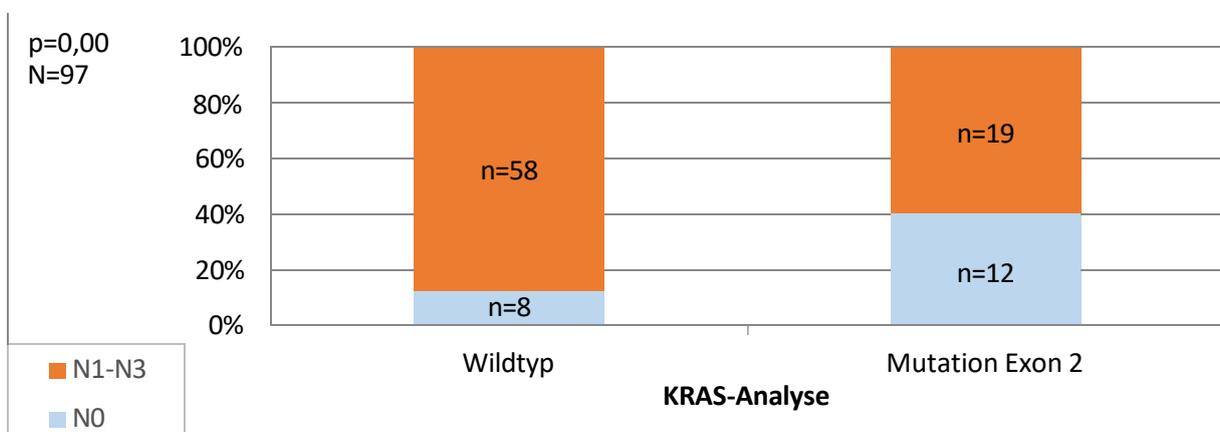
In Ansatz 1 wurden Patienten mit Wildtyp im KRAS-Gen („Wildtyp“) und Patienten mit Mutation im KRAS-Gen („Mutation Exon 2“) miteinander verglichen.

Der Frauenanteil in der Gruppe ohne Mutation im KRAS-Gen war mit einem Anteil von 52 % signifikant ( $p=0,03$ ) höher als in der Gruppe mit Mutation im KRAS-Gen (29 %; siehe Abbildung 18).



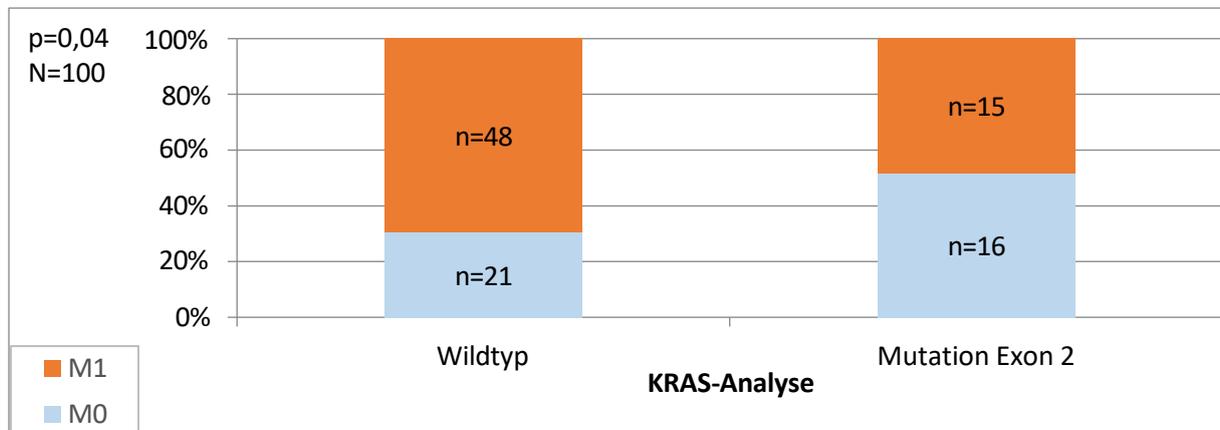
**Abbildung 18: Geschlechterverteilung in den Gruppen ohne Mutation im KRAS-Gen und mit Mutation im KRAS-Gen**

Der Anteil von Patienten mit regionären Lymphknotenmetastasen zum Diagnosezeitpunkt war in der Gruppe ohne Mutation im KRAS-Gen mit 88 % signifikant ( $p=0,00$ ) höher als in der Gruppe mit Mutation im KRAS-Gen (61 %; siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19: Regionäre Lymphknotenmetastasierung in den Gruppen ohne KRAS-Mutation und mit KRAS-Mutation**

Darüber hinaus war der Anteil von Patienten mit Fernmetastasen zum Diagnosezeitpunkt in der Gruppe ohne Mutation im KRAS-Gen mit 70 % signifikant ( $p=0,04$ ) höher als in der Gruppe mit Mutation im KRAS-Gen (48 %; siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20: Fernmetastasierung in den Gruppen ohne KRAS-Mutation und mit KRAS-Mutation**

Im Hinblick auf die folgenden Standardparameter ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse:

**Tabelle 16: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den Gruppen ohne und mit Mutation im KRAS-Gen**

Merkmal	KRAS-Gen-Analyse (104 Fälle)		Chi-Quadrat-Test
	Wildtyp (n=73)	Mutation Exon 2 (n=31)	p-Wert
<b>Alter zum Diagnosezeitpunkt (Median)</b>	61	61	0,74 <sup>1</sup>
<b>Raucherhistorie</b>			1,0 <sup>2</sup>
(Ex)raucher	50	25	
Nieraucher	7	4	
<b>Pys (Median)</b>	35	45	0,2 <sup>1</sup>
<b>T</b>			0,75
T1 und T2	23	11	
T3 und T4	46	19	
<b>Grading</b>			0,8
G1 und G2	19	9	
G3	36	15	
<b>Stadium nach UICC8</b>			0,88
I bis IIIA	12	5	
IIIB und IV	57	26	
<b>Gewebeart</b>			0,94
pulmonaler Primarius	57	24	
Metastase	16	7	

<sup>1</sup> Mann-Whitney-U-Test.

<sup>2</sup> Exakter Test nach Fisher.

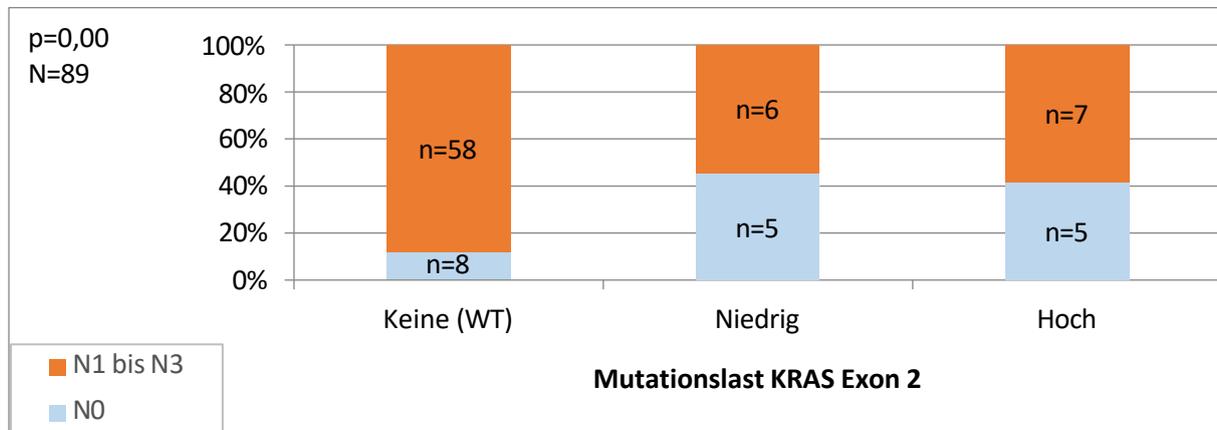
#### 4.4.2.2 Ansatz 2: Untersuchung der am Median orientierten Gruppenbildung

In Ansatz 2 wurden Patienten ohne Mutation im KRAS-Gen, Patienten mit KRAS-MT/WT-Ratio unter dem Median („Niedrige Mutationslast im KRAS-Gen“, KRAS-MT/WT-Ratio=0,01-0,68) und Patienten mit KRAS-MT/WT-Ratio gleich oder größer dem Median („Hohe Mutationslast im KRAS-Gen“, KRAS-MT-WT-Ratio $\geq$ 0,69) verglichen.

Abbildung 21 zeigt, dass der Anteil von Patienten mit regionären Lymphknotenmetastasen zum Diagnosezeitpunkt in der Gruppe „Wildtyp im KRAS-Gen“ mit 88 % höher war als der in den Gruppen „Niedrige Mutationslast im KRAS-Gen“ (55 %) und „Hohe Mutationslast im KRAS-Gen“ (58 %; p=0,00).

Signifikant unterschied sich der Anteil von Patienten mit Lymphknotenmetastasen zwischen den Gruppen „Wildtyp im KRAS-Gen“ (88 %) und „Niedrige Mutationslast im KRAS-Gen“ (55 %) sowie zwischen den Gruppen „Wildtyp im KRAS-Gen“ (88 %) und „Hohe Mutationslast im KRAS-Gen“ (58 %; jeweils p=0,02 mit dem exakten Test nach Fisher).

Zwischen den Gruppen „Niedrige Mutationslast im KRAS-Gen“ (55 %) und „Hohe Mutationslast im KRAS-Gen“ (58 %) unterschied sich der Anteil von Patienten mit Lymphknotenmetastasen zum Diagnosezeitpunkt dagegen nicht signifikant voneinander.



**Abbildung 21: Regionäre Lymphknotenmetastasierung in den anhand des Medians gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“)**

Hinsichtlich der folgenden klinisch-histopathologischen Standardparameter ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse beim Vergleich der Gruppen:

**Tabelle 17: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den anhand des Medians gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“)**

<b>Merkmal</b>	<b>Mutationslast KRAS-Gen (96 Fälle)</b>			<b>Chi-Quadrat-Test</b>
	<b>Wildtyp (n=73)</b>	<b>Niedrige Mutationslast<sup>1</sup> (n=11)</b>	<b>Hohe Mutationslast<sup>2</sup> (n=12)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Alter zum Diagnosezeitpunkt (Median)</b>	61	63	62,5	0,51 <sup>3</sup>
<b>Geschlecht</b>				
männlich	35	6	9	0,21
weiblich	38	5	3	
<b>Raucherhistorie</b>				
(Ex)raucher	50	11	10	0,83 <sup>4</sup>
Nieraucher	7	0	1	
<b>Pys (Median)</b>	35	40	46,5	0,35 <sup>3</sup>
<b>T</b>				
T1 und T2	23	3	4	0,85 <sup>4</sup>
T3 und T4	46	8	7	
<b>M</b>				
M0	21	6	6	0,18 <sup>4</sup>
M1	48	5	6	
<b>Grading</b>				
G1 und G2	12	2	2	0,9 <sup>4</sup>
G3	26	4	7	
<b>Stadium nach UICC8</b>				
I bis IIIA	12	2	1	0,80 <sup>4</sup>
IIIB und IV	57	9	11	
<b>Gewebeart</b>				
pulmonaler Primarius	41	9	8	0,9 <sup>4</sup>
Metastase	9	2	3	

<sup>1</sup> KRAS-MT/WT=0,01-0,68.

<sup>2</sup> KRAS-MT/WT $\geq$ 0,69.

<sup>3</sup> Kruskal-Wallis-Test.

<sup>4</sup> Exakter Test nach Fisher.

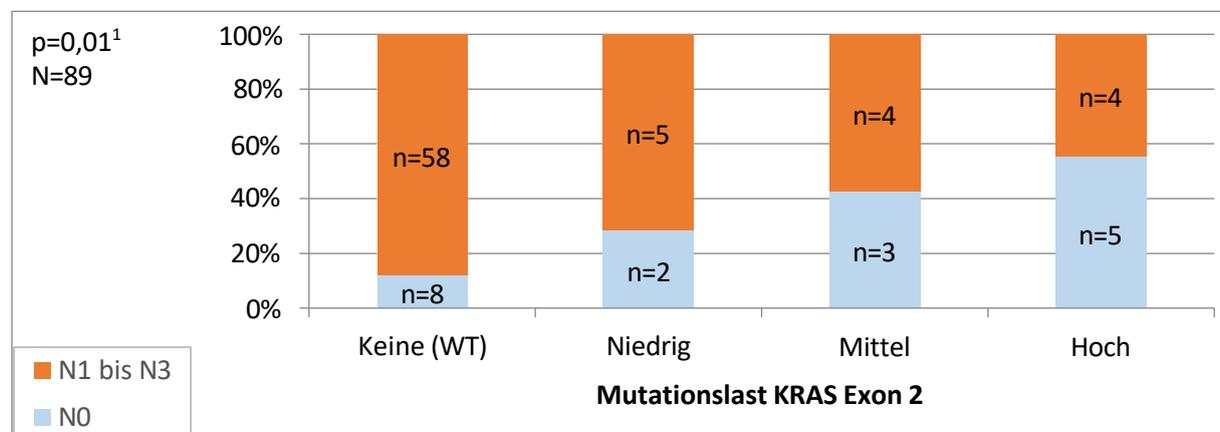
#### 4.4.2.3 Ansatz 3: Untersuchung der an Terzilen orientierten Gruppenbildung

Bei den an den Gruppen „Wildtyp im KRAS-Gen“, „Niedrige Mutationslast im KRAS-Gen“ (KRAS-MT/WT-Ratio=0,01-0,47), „Mittlere Mutationslast im KRAS-Gen“ (KRAS-MT/WT-Ratio=0,48-0,99) und „Hohe Mutationslast im KRAS-Gen“ (KRAS-MT/WT-Ratio $\geq$ 1) durchgeführten Analysen waren (wie in Abbildung 22 dargestellt) Patienten ohne Mutation im KRAS-Gen zum Diagnosezeitpunkt signifikant häufiger von Lymphknotenmetastasen betroffen als Patienten mit hoher Mutationslast im KRAS-Gen (88 % vs. 44 %; p=0,01).

Patienten ohne Mutation im KRAS-Gen waren zum Diagnosezeitpunkt tendenziell häufiger von Lymphknotenmetastasen betroffen als Patienten mit mittlerer Mutationslast im KRAS-Gen (88 % vs. 57 %; p=0,07).

Zwischen Patienten mit Wildtyp im KRAS-Gen und niedriger Mutationslast im KRAS-Gen ergab sich kein signifikanter Unterschied (88 % vs. 71 %).

Zudem ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit niedriger und mittlerer Mutationslast im KRAS-Gen (71 % vs. 57 %), zwischen Patienten mit niedriger Mutationslast und hoher Mutationslast im KRAS-Gen (71 % vs. 44 %) sowie zwischen Patienten mit mittlerer Mutationslast und hoher Mutationslast im KRAS-Gen (57 % vs. 44 %).



**Abbildung 22: Regionäre Lymphknotenmetastasierung in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“)**

<sup>1</sup> Exakter Test nach Fisher.

Im Hinblick auf die folgenden Parameter existierten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen im terzilorientierten Ansatz:

**Tabelle 18: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“)**

<b>Merkmal</b>	<b>Mutationslast KRAS-Gen (96 Fälle)</b>				<b>Chi-Quadrat-Test</b>
	<b>Keine (WT) (n=73)</b>	<b>Niedrig<sup>1</sup> (n=7)</b>	<b>Mittel<sup>2</sup> (n=7)</b>	<b>Hoch<sup>3</sup> (n=9)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Alter zum Diagnosezeitpunkt (Median)</b>	61	61	65	63	0,61 <sup>5</sup>
<b>Geschlecht</b>					0,55 <sup>4</sup>
männlich	35	4	5	6	
weiblich	38	3	2	3	
<b>Raucherhistorie</b>					0,71 <sup>4</sup>
(Ex)raucher	50	7	7	7	
Nieraucher	7	0	0	1	
<b>Pys (Median)</b>	35	45	52,5	40	0,36 <sup>5</sup>
<b>T</b>					0,52 <sup>4</sup>
T1 und T2	23	2	1	4	
T3 und T4	46	5	6	4	
<b>M</b>					0,1 <sup>4</sup>
M0	21	4	2	6	
M1	48	3	5	3	
<b>Grading</b>					0,9 <sup>4</sup>
G1 und G2	19	1	1	2	
G3	36	2	5	5	
<b>Stadium nach UICC8</b>					0,54 <sup>4</sup>
I bis IIIA	12	2	0	1	
IIIB und IV	57	5	7	8	
<b>Gewebeart</b>					0,77 <sup>4</sup>
pulmonaler Primarius	57	6	6	6	
Metastase	16	1	1	3	

<sup>1</sup> KRAS-MT/WT-Ratio=0,01-0,47.

<sup>2</sup> KRAS-MT/WT-Ratio=0,48-0,99.

<sup>3</sup> KRAS-MT/WT-Ratio $\geq$ 1.

<sup>4</sup> Exakter Test nach Fisher.

<sup>5</sup> Kruskal-Wallis-Test.

#### 4.4.2.4 Ansatz 4: Untersuchung der an der MT/WT-Ratio von 1 orientierten Gruppenbildung

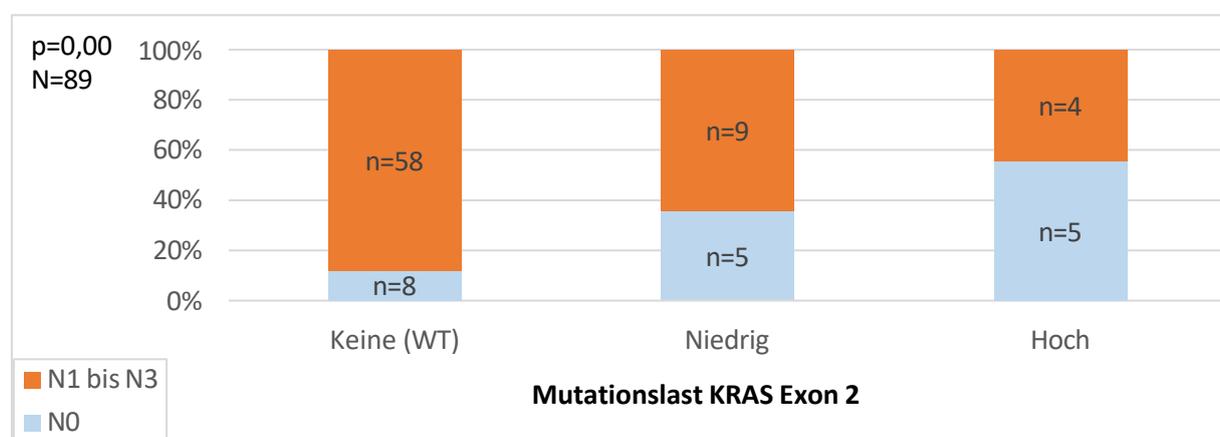
In diesem Ansatz wurden Patienten ohne KRAS-Mutation, Patienten mit niedriger KRAS-Mutationslast (KRAS-MT/WT=0,01-0,99) und Patienten mit hoher KRAS-Mutationslast (KRAS-MT/WT $\geq$ 1) miteinander verglichen.

Die dargestellten Ergebnisse in Abbildung 23 zeigen, dass Patienten ohne Mutation im KRAS-Gen zum Diagnosezeitpunkt mit einem Anteil von 88 % häufiger von Lymphknotenmetastasen betroffen waren als Patienten der Gruppen „Niedrige Mutationslast im KRAS-Gen“ (64 %) und „Hohe Mutationslast im KRAS-Gen“ (44 %; p=0,00 mit dem exakten Test nach Fisher).

Beim Vergleich der Gruppen untereinander ergab sich hinsichtlich der Verteilung von Patienten mit Lymphknotenmetastasierung zum Diagnosezeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe „Wildtyp im KRAS-Gen“ (88 %) und der Gruppe „Niedrige Mutationslast im KRAS-Gen“ (64 %; p=0,05 mit dem exakten Test nach Fisher).

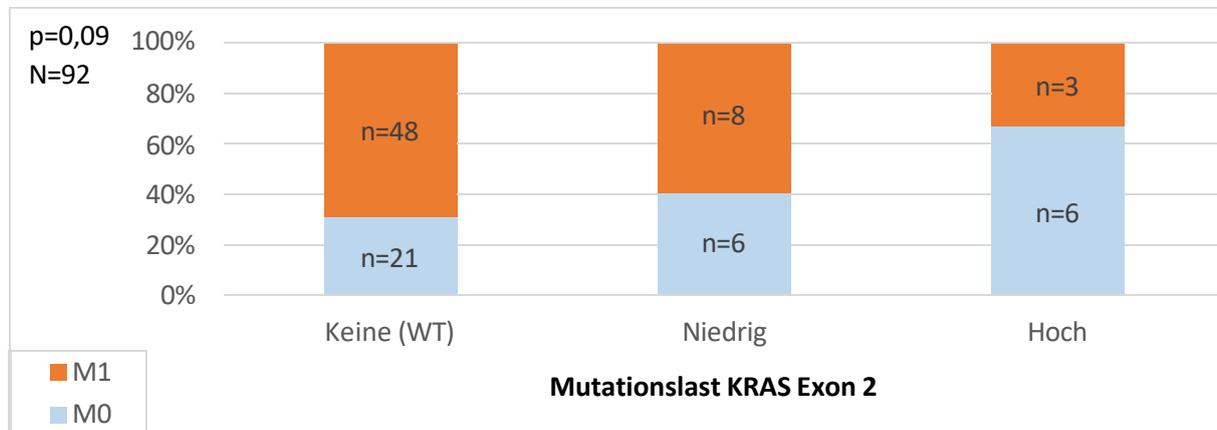
Zwischen den Gruppen „Wildtyp im KRAS-Gen“ (88 %) und „Hohe Mutationslast im KRAS-Gen“ (44 %) war der Unterschied ebenfalls signifikant (p=0,01 mit dem exakten Test nach Fisher).

Zwischen den Gruppen „Niedrige Mutationslast im KRAS-Gen“ (64 %) und „Hohe Mutationslast im KRAS-Gen“ (44 %) ergab sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied.



**Abbildung 23: Regionäre Lymphknotenmetastasierung in anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“)**

Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, waren Patienten ohne Mutation im KRAS-Gen zum Diagnosezeitpunkt tendenziell häufiger von Fernmetastasen betroffen (70 %) als Patienten der Gruppen „Niedrige Mutationslast im KRAS-Gen“ (57 %) und „Hohe Mutationslast im KRAS-Gen“ (33 %;  $p=0,09$  mit dem exakten Test nach Fisher).



**Abbildung 24: Fernmetastasierung in anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“)**

Hinsichtlich des Alters bei Diagnose, des Geschlechts, der Raucherhistorie, der Pys, des T-Stadiums, des Differenzierungsgrades, des Stadiums nach UICC8 und des Gewebsursprungs ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen:

**Tabelle 19: Klinisch-histopathologische Standardparameter in den Gruppen, die anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildet wurden (Unterkollektiv „Patienten mit Mutation im KRAS-Gen oder Wildtyp im KRAS-Gen“)**

<u>Merkmal</u>	<u>Mutationslast KRAS-Gen (96 Fälle)</u>			<u>Chi-Quadrat-Test</u>
	<b>Wildtyp (n=73)</b>	<b>Niedrige Mutationslast<sup>1</sup> (n=14)</b>	<b>Hohe Mutationslast<sup>2</sup> (n=9)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Alter zum Diagnosezeitpunkt (Median)</b>	61	62,5	63	0,55 <sup>4</sup>
<b>Geschlecht</b>				0,41 <sup>3</sup>
männlich	35	9	6	
weiblich	38	5	3	
<b>Raucherhistorie</b>				0,46 <sup>3</sup>
(Ex)raucher	50	14	7	
Nieraucher	7	0	1	
<b>Pys (Median)</b>	35	45	40	0,45 <sup>4</sup>
<b>T</b>				0,44 <sup>3</sup>
T1 und T2	23	3	4	
T3 und T4	46	11	4	
<b>Grading</b>				0,83 <sup>3</sup>
G1 und G2	19	2	2	
G3	36	7	5	
<b>Stadium nach UICC8</b>				1,0 <sup>3</sup>
I bis IIIA	12	2	1	
IIIB und IV	57	12	8	
<b>Gewebeart</b>				0,58 <sup>3</sup>
pulmonaler Primarius	57	12	6	
Metastase	16	2	3	

<sup>1</sup> KRAS-MT/WT-Ratio=0,01-0,99.

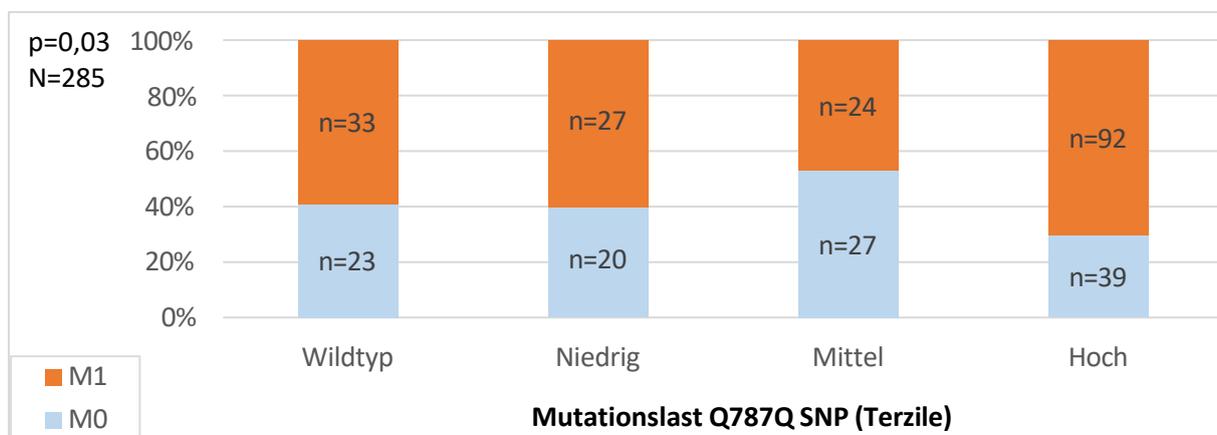
<sup>2</sup> KRAS-MT/WT-Ratio≥1.

<sup>3</sup> Exakter Test nach Fisher.

<sup>4</sup> Kruskal-Wallis-Test.

#### 4.4.3 Klinisch-histopathologische Standardparameter im Unterkollektiv „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“

In der Gruppe ohne Q787Q SNP, den Gruppen mit niedriger Q787Q-Last, der Gruppe mit mittlerer Q787Q-Last und der Gruppe mit heterozygot vorliegendem Q787Q SNP waren Patienten mit einem Anteil von 47-59 % zum Diagnosezeitpunkt seltener als statistisch erwartet von Fernmetastasen betroffen. Patienten mit hoher Q787Q-Last und homozygot vorliegendem Q787Q SNP waren dagegen mit einem Anteil von 66-70 % häufiger von Fernmetastasen betroffen. Diese Beobachtungen erreichten allerdings nur im terzilorientierten Ansatz (Ansatz 3) das Signifikanzniveau (siehe Abbildung 25).



**Abbildung 25: Fernmetastasierung in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen (Unterkollektiv „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“)**

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des Q787Q SNP und dem Vorliegen von „häufigen Mutationen im EGFR-Gen“ ( $p=0,42$ ) oder Mutationen im KRAS-Gen ( $p=0,50$ ) festgestellt werden.

In dem Kollektiv lag auch kein Zusammenhang zwischen der Q787Q-Last im Tumor und Mutationen im EGFR-Gen oder KRAS-Gen oder deren Last im Tumor vor.

Hinsichtlich der weiteren, hier untersuchten klinisch-histopathologischen Standardparameter konnten weder beim Vergleich von Patienten ohne Q787Q SNP (Genotyp GG) und Patienten mit Q787Q SNP (Genotyp GA und AA) noch bei Integration der Q787Q-Last in die Analyse signifikante Beobachtungen gemacht werden (siehe Tabelle 20).

**Tabelle 20: Zusammenstellung der p-Werte der Analyse der klinisch-histopathologischen Standardparameter in den verschiedenen Ansätzen (Unterkollektiv „Patienten mit oder ohne Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q“)**

Merkmal	p-Wert				
	Ansatz 1 <sup>1</sup>	Ansatz 2 <sup>2</sup>	Ansatz 3 <sup>3</sup>	Ansatz 4 <sup>4</sup>	Ansatz 5 <sup>5</sup>
<b>Alter</b>	0,6 <sup>6</sup>	0,76 <sup>7</sup>	0,81 <sup>7</sup>	0,62 <sup>7</sup>	0,69 <sup>7</sup>
<b>Geschlecht</b>	0,58	0,25	0,48	0,86	0,37
männlich					
weiblich					
<b>Raucherstatus</b>	1,0 <sup>8</sup>	0,87 <sup>8</sup>	0,94 <sup>8</sup>	0,76 <sup>8</sup>	0,66 <sup>8</sup>
Nieraucher					
(Ex)raucher					
<b>Pys (Median)</b>	0,95 <sup>6</sup>	0,79 <sup>7</sup>	0,39 <sup>7</sup>	0,95 <sup>7</sup>	0,99 <sup>7</sup>
<b>Grading</b>	0,95	0,49	0,66	1,0	0,33
G1 und G2					
G3					
<b>T</b>	0,8	0,42	0,19	0,19	0,5
T1 und T2					
T3 und T4					
<b>N</b>	0,75	0,95	0,27	0,48	0,95
N0					
N1 bis N3					
<b>M</b>	0,63	0,17	<b>0,03</b>	0,33	0,22
M0					
M1					
<b>Stadium</b>	0,56	0,28	0,55	0,63	0,46
I-III A					
III B-IV					

Fett gedruckt sind signifikante p-Werte.

<sup>1</sup> Gruppe ohne Q787Q SNP (Genotyp GG) vs. Gruppe mit Q787Q SNP (Genotyp GA und AA).

<sup>2</sup> Gruppe ohne Q787Q SNP (Genotyp GG) vs. Gruppe mit Q787Q-Last >0 und < Median (1,03) vs. Gruppe mit Q787Q-Last  $\geq$  Median (1,03).

<sup>3</sup> Gruppe ohne Q787Q SNP (Genotyp GG) vs. Gruppe mit Q787Q-Last im ersten Terzil (0,01-0,82) vs. Gruppe mit Q787Q-Last im zweiten Terzil (0,83-1,35) vs. Gruppe mit Q787Q-Last im dritten Terzil ( $\geq$ 1,36).

<sup>4</sup> Gruppe ohne Q787Q SNP (Genotyp GG) vs. Gruppe mit Vorliegen des Q787Q SNP in heterozygoter Form (GA) vs. Gruppe mit Vorliegen des Q787Q SNP in homozygoter Form (AA).

<sup>5</sup> Gruppe ohne Q787Q SNP (Genotyp GG) vs. Gruppe mit Q787Q-Last=0,01-0,99 vs. Gruppe mit Q787Q-Last  $\geq$ 1.

<sup>6</sup> Mann-Whitney-U-Test.

<sup>7</sup> Kruskal-Wallis-Test.

<sup>8</sup> Exakter Test nach Fisher.

## 4.5 Prognostische Bedeutung der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutationslast

### 4.5.1 Prognostische Bedeutung der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutationslast im EGFR-Gen (19-del/21-L858R)

Patienten mit „häufigen EGFR-Mutationen“ überlebten deutlich länger (MD DSS=529 d, MD OS=1008 d) als Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen (MD DSS=356 d, MD OS=471 d). Der p-Wert für die Analyse des DSS lag bei 0,08 (siehe Abbildung 26 A), für das OS bei 0,16.

Bei der Überlebenszeitanalyse der anhand der EGFR-Mutationslast gebildeten Gruppen war der Überlebenszeitmedian bei allen Vergleichen in den Gruppen mit hoher EGFR-Mutationslast am höchsten (siehe Abbildung 26).

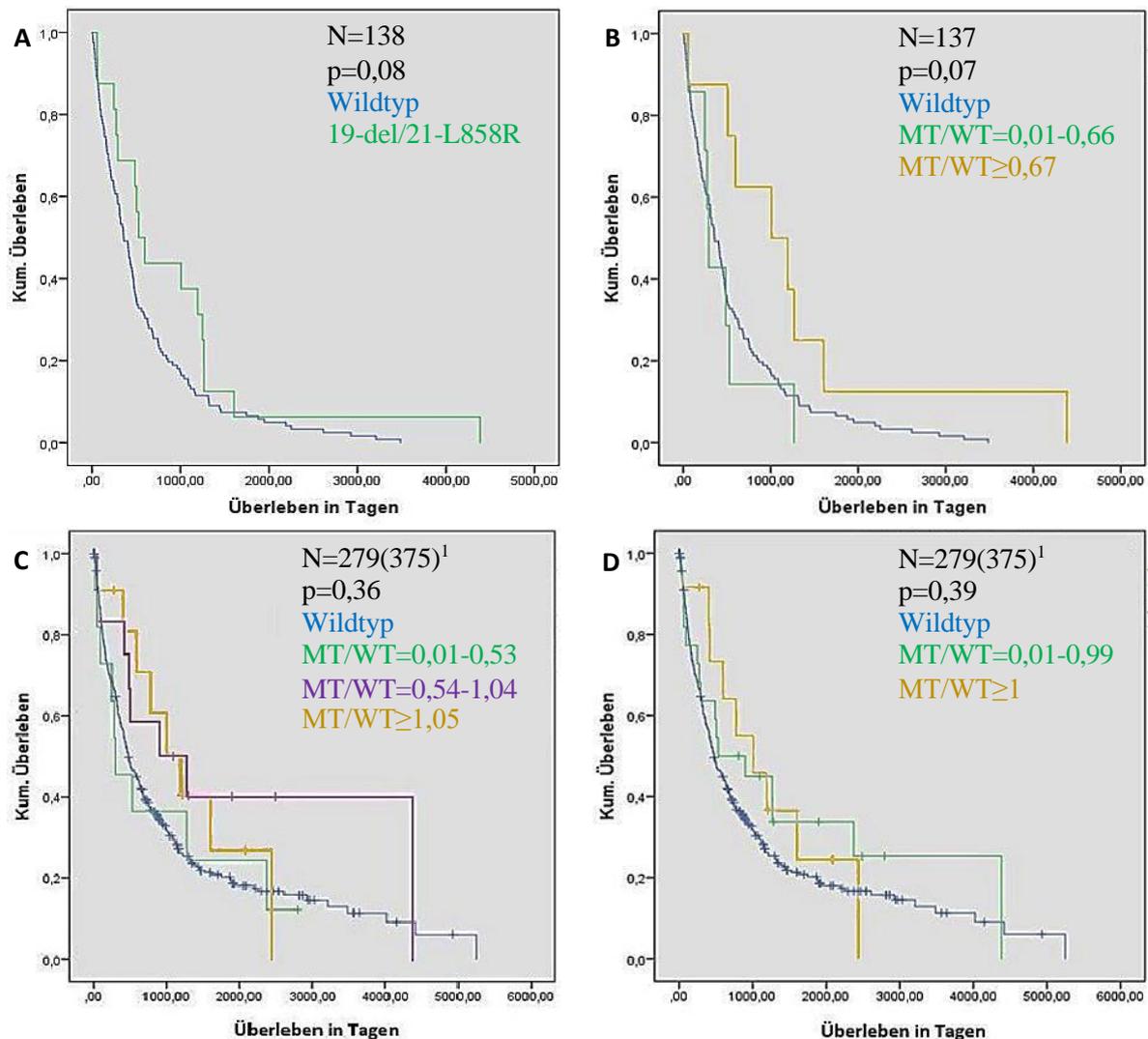
Das OS konnte in allen Gruppenbildungen analysiert werden. Das DSS wurde aufgrund der Gruppengrößen nur in der am Median orientierten Gruppenbildung untersucht.

Das OS in den Gruppen mit niedriger EGFR-Mutationslast (MD=291 d–529 d) bzw. das DSS in der Gruppe mit niedriger EGFR-Mutationslast (MD=291 d) unterschied sich nicht signifikant von dem OS in der Gruppe mit Wildtyp im EGFR-Gen (MD=471 d) bzw. dem DSS in der Gruppe mit Wildtyp im EGFR-Gen (MD=356 d).

Das OS in den Gruppen mit niedriger EGFR-Mutationslast (MD=291 d–529 d) unterschied sich auch nicht signifikant von dem der Gruppen mit hoher EGFR-Mutationslast (MD=1008 d–1193 d). Das DSS in der Gruppe mit niedriger EGFR-Mutationslast (MD=291 d) war tendenziell kleiner als das der Gruppe mit hoher EGFR-Mutationslast (MD=1008 d;  $p=0,06$ ).

Beim Vergleich der Gruppe mit Wildtyp im EGFR-Gen und den Gruppen mit hoher EGFR-Mutationslast zeigte sich nur bei Analyse des DSS ein signifikanter Unterschied (MD DSS=356 d vs. MD DSS=1008 d;  $p=0,03$ ). Nicht signifikant ( $p=0,13$ ) unterschieden sich die OS von Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen (MD=471 d) und Patienten mit hoher EGFR-Mutationslast (MD=1193 d).

Beim Vergleich der Gruppen, die anhand von Terzilen gebildet wurden (Ansatz 3), verhielt sich das OS der Gruppe mit mittlerer EGFR-Mutationslast (MD=900 d) eher wie das der Gruppe mit hoher EGFR-Mutationslast (MD=1193 d), während das OS der Gruppe mit niedriger EGFR-Mutationslast (MD=291 d) eher dem der Gruppe mit Wildtyp im EGFR-Gen (MD=471 d) ähnelte (siehe Abbildung 26 C). Dieses Ergebnis erwies sich mit dem Log-Rank-Test allerdings als nicht signifikant.



**Abbildung 26: Gegenüberstellung des Überlebens bei Patienten mit unterschiedlich hoher EGFR-Mutationslast**

A, DSS in den Gruppen „Wildtyp im EGFR-Gen“ (n=122, MD=356 d) und „19-del/21-L858R“ (n=16, MD=529 d).

B, DSS in den anhand des Medians gebildeten Gruppen. Gruppe „Wildtyp im EGFR-Gen“ (n=122, MD=356 d) vs. Gruppe „EGFR-MT/WT-Ratio=0,01-0,66“ (n=7, MD=291 d) vs. Gruppe „EGFR-MT/WT-Ratio≥0,67“ (n=8, MD=1008 d).

C, OS in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen. Gruppe „Wildtyp im EGFR-Gen“ (n=254[341]<sup>1</sup>, MD=471 d) vs. Gruppe „EGFR-MT/WT-Ratio=0,01-0,53“ (n=9[11]<sup>1</sup>, MD=291 d) vs. Gruppe „EGFR-MT/WT-Ratio=0,54-1,04“ (n=8[12]<sup>1</sup>, MD=900 d) vs. Gruppe „EGFR-MT/WT-Ratio≥1,05“ (n=8[11]<sup>1</sup>, MD=1193 d).

D, OS in den anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildeten Gruppen. Gruppe „Wildtyp im EGFR-Gen“ (n=254[341]<sup>1</sup>, MD=471 d) vs. Gruppe „EGFR-MT/WT-Ratio=0,01-0,99“ (n=16[22]<sup>1</sup>, MD=529 d) vs. Gruppe „EGFR-MT/WT-Ratio≥1“ (n=9[12]<sup>1</sup>, MD=1008 d).

<sup>1</sup>Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl von unzensurierten Fällen; die Zahl in der Klammer entspricht der Gesamtzahl.

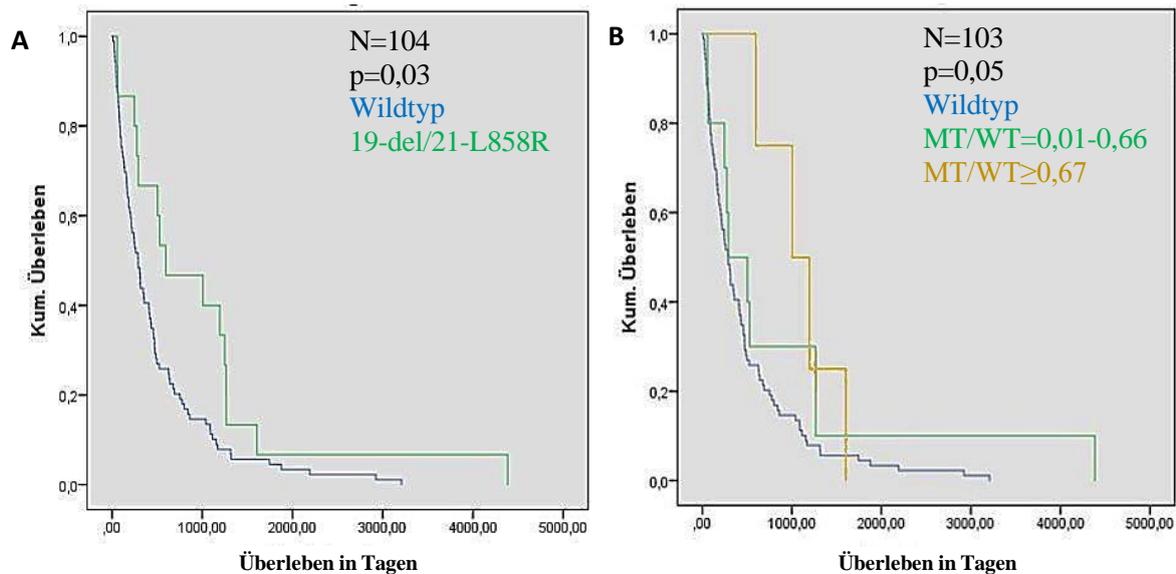
In den anhand der klinisch-histopathologischen Parameter gebildeten Subgruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Gegenüberstellung des OS von Patienten mit „häufiger EGFR-Mutation“ und Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen, obwohl der Median des OS von Patienten mit „häufiger EGFR-Mutation“ in jeder Subgruppe - außer in „Stadium: I-IIIa“ - höher war als bei Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen (siehe Tabelle 21).

**Tabelle 21: Univariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten ohne und mit 19-del/21-L858R nach klinisch-histopathologischen Variablen**

Subgruppe	Wildtyp EGFR-Gen (N=341)		19-del/21-L858R (N=35)		p-Wert
	Unzensierte Fälle (Gesamtzahl)	OS (d)	Unzensierte Fälle (Gesamtzahl)	OS (d)	
<b>Alter</b>					
<65 Jahre	121(175)	584	15(19)	1008	0,62
≥65 Jahre	133(166)	442	11(16)	900	0,1
<b>Geschlecht</b>					
männlich	154(210)	429	12(14)	529	0,92
weiblich	100(131)	515	14(21)	1193	0,1
<b>Raucherstatus</b>					
Nieraucher	11(14)	860	7(11)	2373	0,15
(Ex)raucher	174(216)	481	7(11)	1247	0,46
<b>Grading</b>					
G1 und G2	77(117)	961	8(12)	1265	0,34
G3	129(161)	347	11(15)	529	0,35
<b>T</b>					
<i>T1 und T2</i>	65(96)	1018	5(9)	1247	-
T2 und T4	144(171)	354	17(21)	529	0,26
<b>N</b>					
<i>N0</i>	54(67)	756	2(5)	-	-
N1 bis 3	158(201)	467	20(26)	597	0,32
<b>M</b>					
<i>M0</i>	84(110)	777	5(11)	4384	-
M1	141(176)	347	19(22)	529	0,55
<b>Stadium</b>					
<i>I-IIIa</i>	45(63)	911	3(6)	773	-
IIIB und IV	176(218)	356	21(25)	597	0,28

Kursiv gedruckt sind die klinisch-histopathologischen Ausprägungen und deren Werte, bei denen aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Testung durchgeführt wurde.

Das DSS von Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen war signifikant kürzer als das von Patienten mit „häufiger EGFR-Mutation“ in der Subgruppe „Stadium IIIB-IV“ (siehe Abbildung 27 A). Abbildung 27 B zeigt, dass im medianorientierten Ansatz Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen ein signifikant kürzeres DSS aufwiesen als Patienten mit hoher EGFR-Mutationslast ( $p=0,01$ ); sowohl zwischen Patienten mit hoher EGFR-Mutationslast und Patienten mit niedriger EGFR-Mutationslast als auch zwischen Patienten ohne Mutation und Patienten mit niedriger EGFR-Mutationslast bestand kein signifikanter Überlebensunterschied ( $p=0,1$  bzw.  $p=0,9$ ).



**Abbildung 27: Gegenüberstellung des DSS bei Patienten mit unterschiedlich hoher EGFR-Mutationslast in der Subgruppe „Stadium IIIB-IV“**

A, DSS in den Gruppen mit Wildtyp im EGFR-Gen ( $n=89$ , DSS MD=289 d) und mit „häufigen EGFR-Mutationen“ ( $n=15$ , DSS MD=597 d).

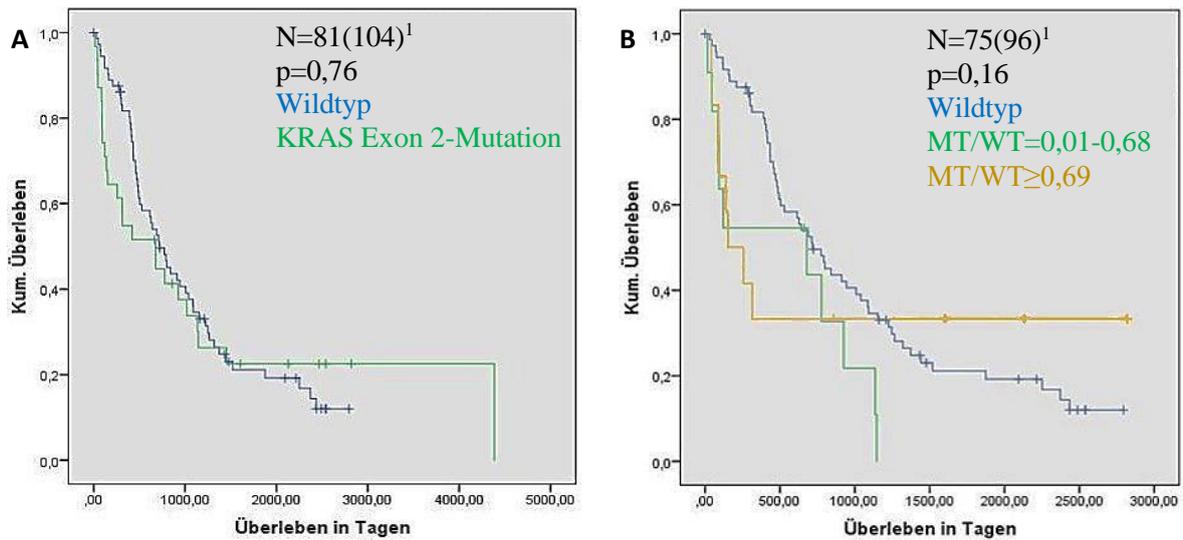
B, DSS in den anhand des Medians gebildeten Gruppen. Gruppe mit Wildtyp im EGFR-Gen ( $n=89$ , DSS MD=289 d) vs. Gruppe mit niedriger EGFR-Mutationslast ( $n=6$ , DSS MD=274 d) vs. Gruppe mit hoher EGFR-Mutationslast ( $n=8$ , DSS MD=1008 d).

#### 4.5.2 Prognostische Bedeutung der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutationslast im KRAS-Gen (Exon 2, Codon12/13)

Aufgrund der Fallzahlen wurde das OS lediglich in Ansatz 1 (Vergleich der Patienten mit Wildtyp im KRAS-Gen und Patienten mit Mutation im KRAS-Gen) und in Ansatz 2 (Vergleich der am Median orientiert gebildeten Gruppen und der Gruppe ohne Mutation im KRAS-Gen) analysiert. Das DSS wurde wegen der Fallzahlen nur in Ansatz 1 (Vergleich der Gruppe mit Wildtyp im KRAS-Gen und mit Mutation im KRAS-Gen) untersucht.

Obwohl die Überlebenszeitmediane in der Gruppe ohne Mutation im KRAS-Gen (OS MD=719 d, DSS MD=799 d) höher waren als in der Gruppe mit Mutation im KRAS-Gen (OS MD=676 d, DSS MD=312 d), stellten sich diese Beobachtungen als nicht signifikant heraus ( $p=0,76$  bzw.  $p=0,5$ ; siehe Abbildung 28 A).

Bei der Überlebenszeitanalyse der Gruppen mit unterschiedlich hoher KRAS-Mutationslast war das OS von Patienten mit Mutation im KRAS-Gen nicht nur kürzer als das von Patienten ohne Mutation im KRAS-Gen. Der Median des OS der Gruppe mit niedriger KRAS-Mutationslast (MD=679 d) lag zudem näher am Median der Gruppe ohne Mutation im KRAS-Gen (MD=719 d) als am Median der Gruppe mit hoher KRAS-Mutationslast (MD=152 d). Diese Beobachtung entzog sich allerdings ebenfalls der Signifikanz ( $p=0,16$ , siehe Abbildung 28 B).



**Abbildung 28: Gegenüberstellung des OS bei Patienten mit unterschiedlich hoher KRAS-Mutationslast**

A, OS in den Gruppen „Wildtyp im KRAS-Gen“ (n=57[73]<sup>1</sup>, MD=719 d) und „KRAS Exon 2-Mutation“ (n=24[31]<sup>1</sup>, MD=676 d).

B, OS in den anhand des Medians gebildeten Gruppen. Gruppe „Wildtyp im KRAS-Gen“ (n=57[73]<sup>1</sup>, MD=719 d) vs. Gruppe „KRAS-MT/WT-Ratio=0,01-0,68“ (n=10[11]<sup>1</sup>, MD=679 d) vs. Gruppe „KRAS-MT/WT-Ratio≥0,69“ (n=8[12]<sup>1</sup>, MD=152 d).

<sup>1</sup>Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl von unzensurierten Fällen; die Zahl in der Klammer entspricht der Gesamtzahl.

Bei der Überlebenszeitanalyse von anhand der klinisch-histopathologischen Parameter gebildeten Subgruppen ergaben sich keine statistisch signifikanten Differenzen des OS zwischen Patienten mit und ohne KRAS-Mutation (siehe Tabelle 22).

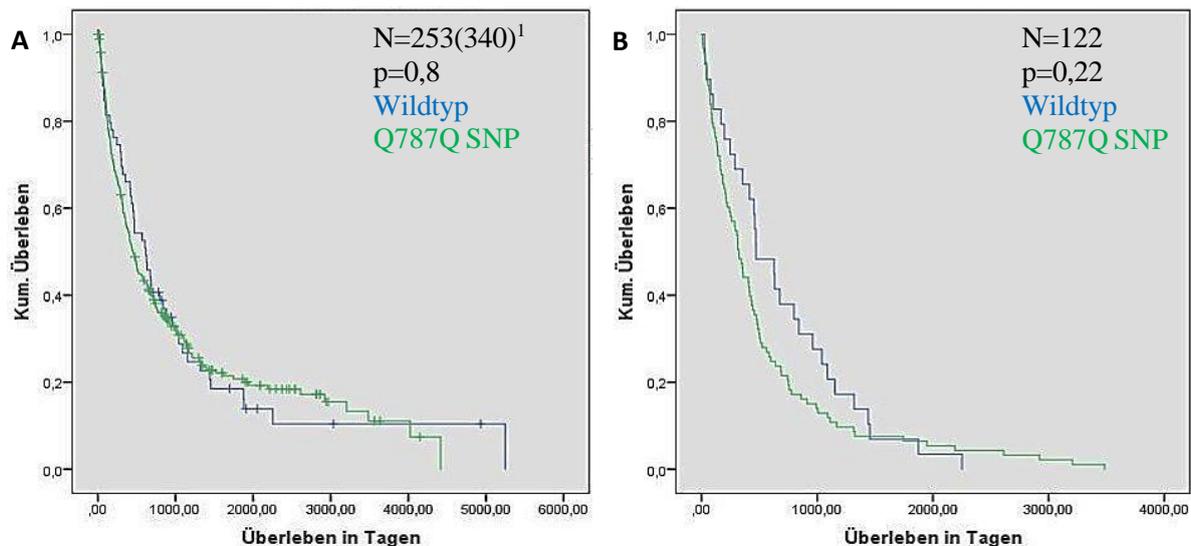
**Tabelle 22: Univariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten ohne und mit Mutation im KRAS-Gen nach klinisch-histopathologischen Variablen**

Subgruppe	Wildtyp KRAS-Gen N=73		KRAS Exon 2 N=31		p-Wert
	Unzensierte Fälle (Gesamtzahl)	OS (d)	Unzensierte Fälle (Gesamtzahl)	OS (d)	
<b>Alter</b>					
<65 Jahre	33(45)	627	18(23)	676	0,94
≥65 Jahre	24(28)	944	6(8)	314	0,4
<b>Geschlecht</b>					
männlich	26(35)	627	17(22)	676	0,98
weiblich	31(38)	841	7(9)	152	0,54
<b>Raucherstatus</b>					
<i>Nierraucher</i>	6(7)	1008	3(4)	1018	-
(Ex)raucher	39(50)	615	19(25)	421	0,58
<b>Grading</b>					
G1 und G2	14(19)	1154	6(9)	1455	0,37
G3	31(36)	529	12(15)	257	0,27
<b>T</b>					
<i>T1 und T2</i>	18(23)	944	5(11)	1146	-
T3 und T4	37(46)	615	18(19)	152	0,09
<b>N</b>					
N0	6(8)	688	9(12)	1018	0,6
N1 bis 3	46(58)	773	15(19)	312	0,47
<b>M</b>					
M0	18(21)	688	13(16)	777	0,59
M1	37(48)	713	11(15)	314	0,52
<b>Stadium</b>					
<i>I-III A</i>	10(12)	688	4(5)	1136	-
IIIB und IV	45(57)	713	20(26)	312	0,52

Kursiv gedruckt sind die klinisch-histopathologischen Ausprägungen und deren Werte, bei denen aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Testung durchgeführt wurde.

### 4.5.3 Prognostische Bedeutung der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Q787Q-Last (Exon 20 im EGFR-Gen)

Beim Vergleich des Überlebens bei Patienten ohne und mit Einzelnukleotid-Polymorphismus Q787Q ergaben sich weder bei der Analyse des OS noch bei der Analyse des DSS signifikante Unterschiede (siehe Abbildung 29).



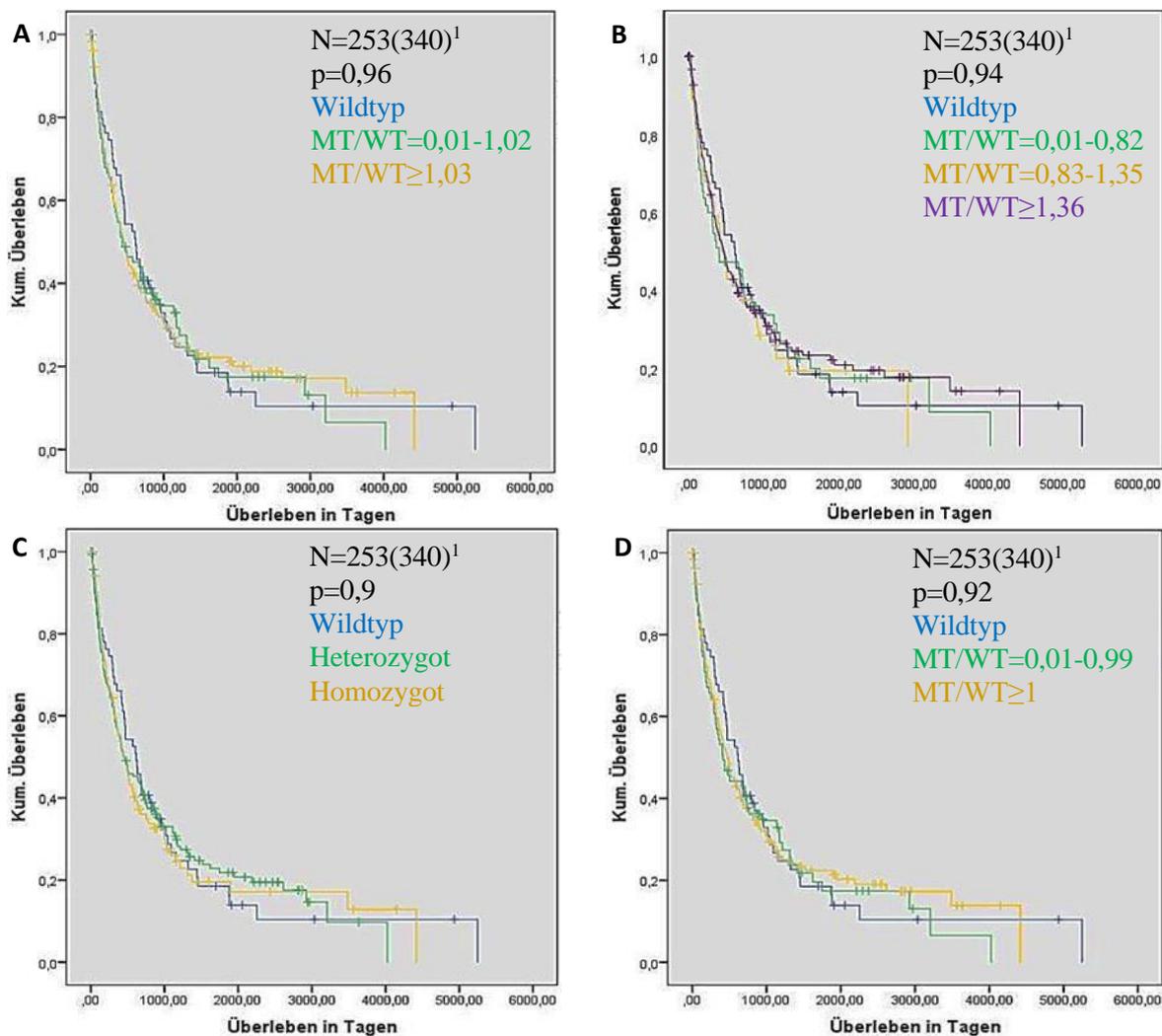
**Abbildung 29: Gegenüberstellung des Überlebens in den Gruppen ohne und mit Q787Q SNP**

A, OS in den Gruppen ohne Q787Q SNP (n=50[65]<sup>1</sup>, MD=615 d) und mit Q787Q SNP (n=203[275]<sup>1</sup>, MD=449 d).

B, DSS in den Gruppen ohne Q787Q SNP (n=29, MD=471 d) und mit Q787Q SNP (n=93, MD=323 d).

<sup>1</sup> Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl von unzensurierten Fällen; die Zahl in der Klammer entspricht der Gesamtzahl.

Auch zwischen den Gruppen mit unterschiedlich hoher Q787Q-Last ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf das OS (siehe Abbildung 30) und das DSS.



**Abbildung 30: OS in den Gruppen mit unterschiedlich hoher Q787Q-Last**

A, OS in den anhand des Medians gebildeten Gruppen. Gruppe ohne Q787Q SNP (n=50[65]<sup>1</sup>, MD=615 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last=0,01-1,02“ (n=66[85]<sup>1</sup>, MD=433 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last≥1,03“ (n=137[190]<sup>1</sup>, MD=456 d).

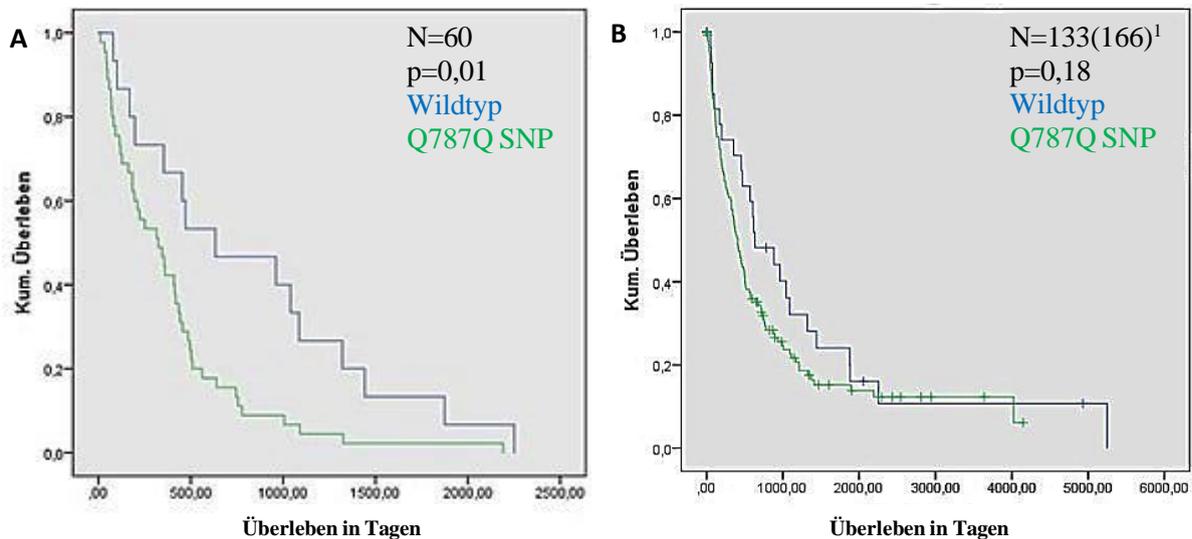
B, OS in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen. Gruppe ohne Q787Q SNP (n=50[65]<sup>1</sup>, MD=615 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last=0,01-0,82“ (n=45[56]<sup>1</sup>, MD=405 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last=0,83-1,35“ (n=43[58]<sup>1</sup>, MD=435 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last≥1,36“ (n=115[161]<sup>1</sup>, MD=467 d).

C, OS in den anhand des Genotyps gebildeten Gruppen. Gruppe ohne Q787Q SNP (n=50[65]<sup>1</sup>, MD=615 d) vs. Gruppe „Heterozygoter Q787Q SNP“ (n=124[170]<sup>1</sup>, MD=449 d) vs. Gruppe „Homozygoter Q787Q SNP“ (n=79[105]<sup>1</sup>, MD=456 d).

D, OS in den anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildeten Gruppen. Gruppe ohne Q787Q SNP (n=50[65]<sup>1</sup>, MD=615 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last=0,01-0,99“ (n=63[80]<sup>1</sup>, MD=413 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last≥1“ (n=140[195]<sup>1</sup>, MD=475 d).

<sup>1</sup> Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl von unzensurierten Fällen; die Zahl in der Klammer entspricht der Gesamtzahl.

In der Subgruppe „Alter $\geq$ 65 Jahre“ war das DSS von Patienten ohne Q787Q SNP allerdings signifikant länger als das von Patienten mit Q787Q SNP (siehe Abbildung 31 A). Zwischen den Gruppen mit unterschiedlich hoher Q787Q-Last bestand kein signifikanter Überlebenszeitunterschied. Bei der Analyse des Parameters OS zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Q787Q SNP (siehe Abbildung 31 B).



**Abbildung 31: Auswirkung des Q787Q SNP auf das Überleben in der Subgruppe „Alter $\geq$ 65 Jahre“**

A, DSS in den Gruppen ohne Q787Q SNP (n=15, MD=633 d) und mit Q787Q SNP (n=45, MD=324 d).

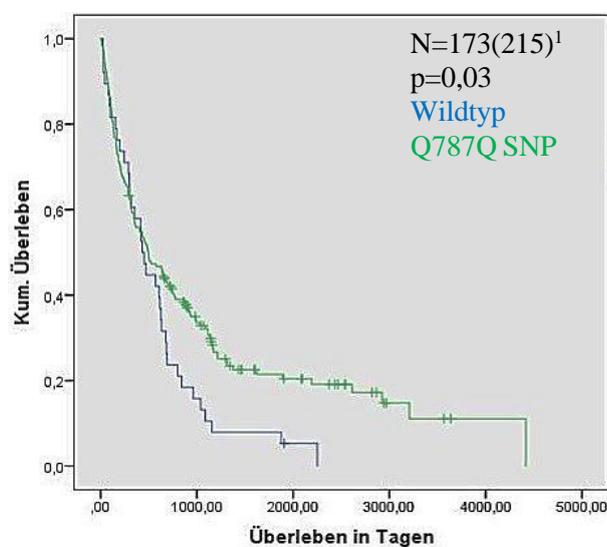
B, OS in den Gruppen ohne Q787Q SNP (n=24[30]<sup>1</sup>, MD=633 d) und mit Q787Q SNP (n=109[136]<sup>1</sup>, MD=409 d)

<sup>1</sup> Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl von unzensierten Fällen; die Zahl in der Klammer entspricht der Gesamtzahl.

Beim Vergleich des OS von Patienten mit und ohne Q787Q SNP in der Subgruppe „(Ex)raucher“ zeigte sich trotz der nahe beieinander liegenden Überlebenszeitmediane (MD=496 d vs. MD=433 d) ein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 32).

Das OS von Patienten mit Q787Q SNP (MD=496 d) war in dieser Subgruppe signifikant ( $p=0,03$ ) länger als das von Patienten ohne Q787Q SNP (MD=433 d). Bei der Analyse des DSS in dieser Subgruppe zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse.

Während sich das OS im ersten Jahr nach Diagnosestellung kaum voneinander unterschied, wich es, wie aus den folgenden mittels Sterbetafel in SPSS ermittelten Werten ersichtlich ist, in den darauffolgenden Jahren immer weiter auseinander (siehe Tabelle 23).



**Abbildung 32: Auswirkung des Q787Q SNP auf das OS in der Subgruppe „(Ex)raucher“**  
Gegenüberstellung des OS bei Patienten ohne Q787Q SNP ( $n=37[38]^1$ , MD=433 d) und der Gruppe mit Q787Q SNP ( $n=136[177]^1$ , MD=496 d) in der Subgruppe „(Ex)raucher“.

<sup>1</sup> Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl von unzensierten Fällen; die Zahl in der Klammer entspricht der Gesamtzahl.

**Tabelle 23: Sterbetafel für Patienten ohne und mit Q787Q SNP in der Subgruppe „(Ex)raucher“**

Zeit in Tagen	Wildtyp			Q787Q SNP		
	Überlebensrate in %	Tod	zensiert	Überlebensrate in %	Tod	zensiert
365 d	58 %	16/38	-	57 %	76/177	1
730 d	24 %	13/22	-	42 %	25/100	3
1095 d	13 %	4/9	-	33 %	15/72	12
1460 d	8 %	2/5	-	23 %	13/45	6
1825 d	8 %	0/3	-	22 %	1/26	5

Beim Einbeziehen der Höhe der Q787Q-Last in die Überlebenszeitanalyse der Subgruppe „(Ex)raucher“ war das OS von Patienten mit hoher Q787Q-Last (MD=631-642 d) bzw. mit homozygotem Q787Q SNP (MD=523 d) signifikant länger als das in der Gruppe ohne Q787Q SNP (MD=433 d; siehe Tabelle 24 und Abbildung 33).

**Tabelle 24: Gegenüberstellung des OS in der Gruppe ohne Q787Q SNP und den Gruppen mit hoher Q787Q-Last in der Subgruppe „(Ex)raucher“**

	Wildtyp	Hohe Q787Q-Last			
		Ansatz 2 <sup>1</sup>	Ansatz 3 <sup>2</sup>	Ansatz 4 <sup>3</sup>	Ansatz 5 <sup>4</sup>
OS MD in Tagen	433	631	642	523	631
p-Wert	-	0,01	0,01	0,03	0,02

<sup>1</sup> Am Median (Q787Q-Last=1,03) orientierte Gruppeneinteilung.

<sup>2</sup> An Terzilen (1.Terzil: Q787Q-Last=0,01-0,82, 2.Terzil: Q787Q-Last=0,83-1,35, 3.Terzil: Q787Q-Last $\geq$ 1,36) orientierte Gruppeneinteilung.

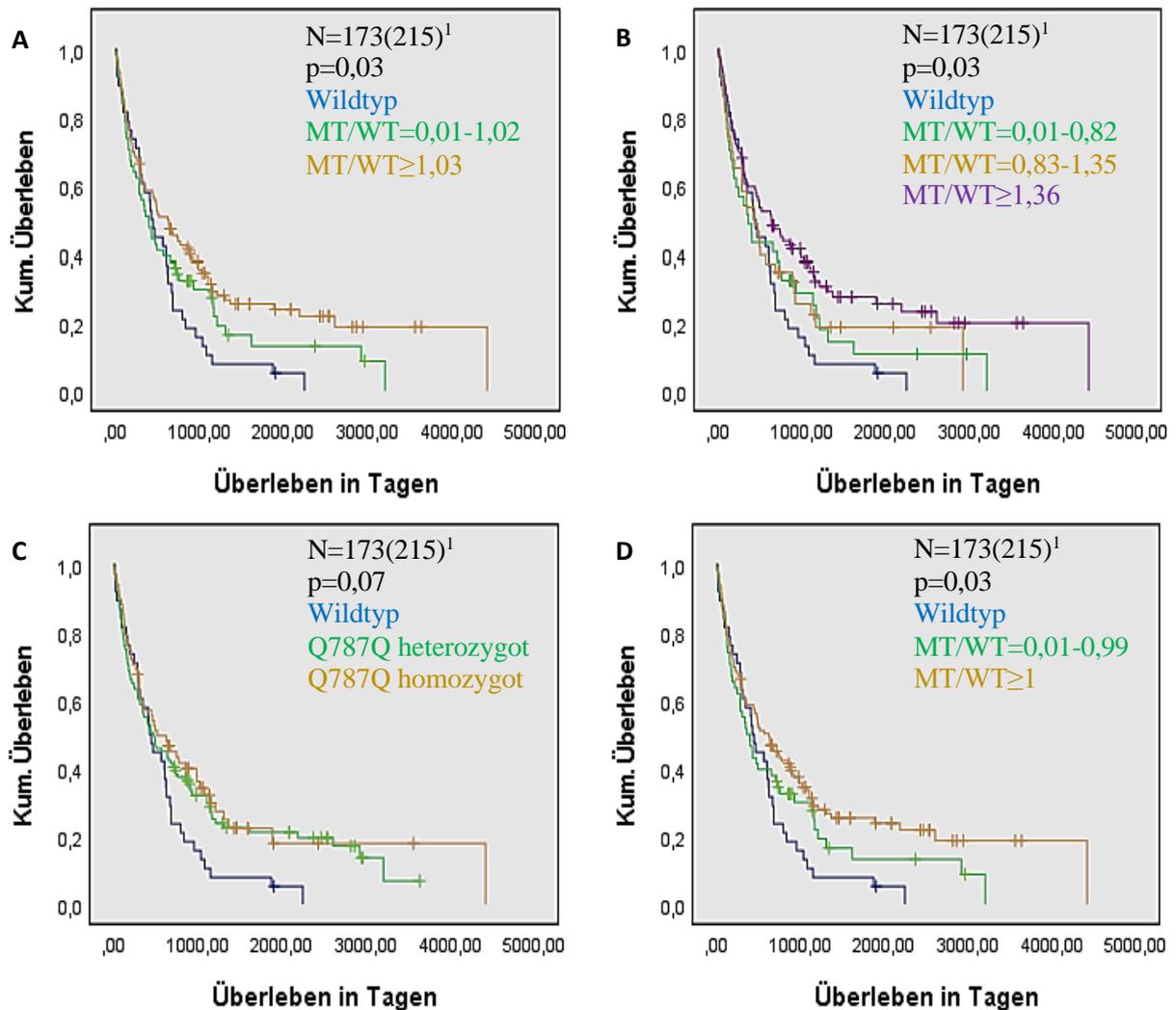
<sup>3</sup> Gruppeneinteilung nach Genotyp (heterozygot/homozygot).

<sup>4</sup> Gruppeneinteilung an der Q787Q-Last 1 orientiert.

Zwischen der Gruppe ohne Q787Q SNP (MD=433 d) und den Gruppen mit niedriger Q787Q-Last (MD=367-405 d) zeigten sich in keinem Ansatz signifikante Unterschiede.

Auch zwischen den Gruppen mit niedriger Q787Q-Last (MD=367-405 d) und den Gruppen mit hoher Q787Q-Last (MD=631-642 d) ergaben sich keine bis lediglich tendenzielle Unterschiede (p=0,09-0,14). Das OS der Gruppe mit heterozygotem Q787Q SNP (MD=481 d) war länger als das der Gruppe ohne den Q787Q SNP (MD=433 d, p=0,05).

Zwischen den Gruppen mit heterozygotem Q787Q SNP (MD=481 d) und der Gruppe mit homozygotem Q787Q SNP (MD=523 d) bestand kein signifikanter Unterschied.



**Abbildung 33: Gegenüberstellung des OS in Gruppen mit unterschiedlich hoher Q787Q-Last in der Subgruppe „(Ex)raucher“**

A, OS in den anhand des Medians gebildeten Gruppen. Gruppe ohne Q787Q SNP ( $n=37[38]^1$ , MD=433 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last=0,01-1,02“ ( $n=50[61]^1$ , MD=405 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last $\geq 1,03$ “ ( $n=86[116]^1$ , MD=631 d).

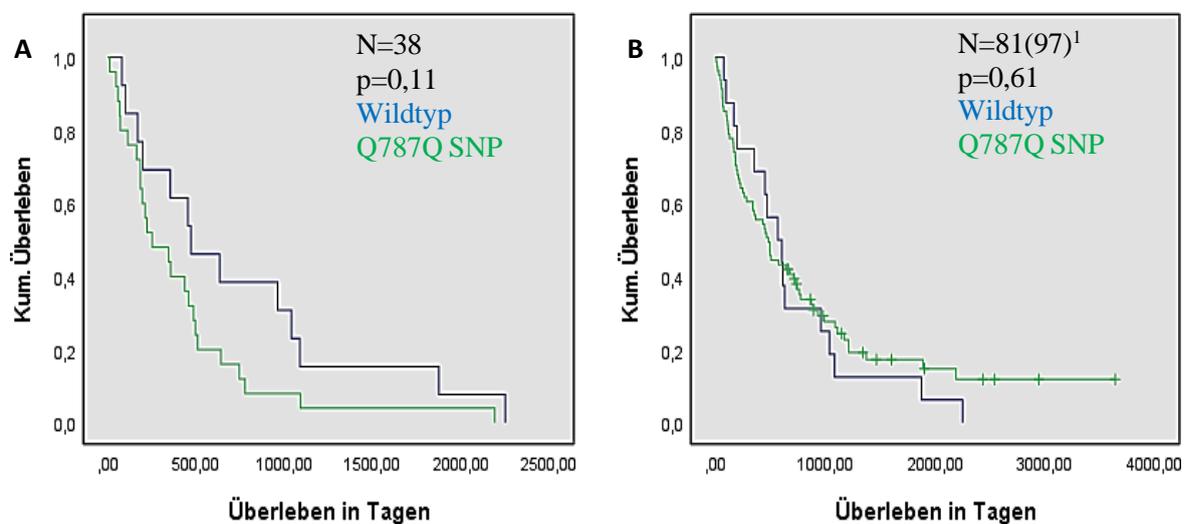
B, OS in den anhand der Terzile gebildeten Gruppen. Gruppe ohne Q787Q SNP ( $n=37[38]^1$ , MD=433 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last=0,01-0,82“ ( $n=32[37]^1$ , MD=367 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last=0,83-1,35“ ( $n=34[43]^1$ , MD=435 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last $\geq 1,36$ “ ( $n=70[97]^1$ , MD=642 d).

C, OS in den anhand des Genotyps gebildeten Gruppen. Gruppe ohne Q787Q SNP ( $n=37[38]^1$ , MD=433 d) vs. Gruppe „Heterozygoter Q787Q SNP“ ( $n=86[109]^1$ , MD=481 d) vs. Gruppe „Homozygoter Q787Q SNP“ ( $n=50[68]^1$ , MD=523 d).

D, OS in den anhand der MT/WT-Ratio 1 gebildeten Gruppen. Gruppe ohne Q787Q SNP ( $n=37[38]^1$ , MD=433 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last=0,01-0,99“ ( $n=48[58]^1$ , MD=367 d) vs. Gruppe „Q787Q-Last $\geq 1$ “ ( $n=88[119]^1$ , MD=631 d).

<sup>1</sup>Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl von unzensurierten Fällen; die Zahl in der Klammer entspricht der Gesamtzahl.

Da der Q787Q SNP bei Patienten, die zum Diagnosezeitpunkt älter als 65 Jahre alt waren, einen negativen Prognosefaktor darstellte und sich bei (Ex)rauchern positiv auf die Prognose auswirkte, wurden Überlebenszeitanalysen unter Berücksichtigung der Merkmale „Raucherstatus“ und „Alter zum Diagnosezeitpunkt“ durchgeführt: Bei (Ex)rauchern, die zum Diagnosezeitpunkt älter als 65 Jahre alt waren, lag der Median des DSS bei Patienten mit Q787Q SNP mit 251 d zwar unter dem des Medians von Patienten ohne den Q787Q SNP (471 d); signifikant war dieses Ergebnis allerdings nicht ( $p=0,11$ , siehe Abbildung 34 A). Auch bei der Analyse des OS ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,61$ ) zwischen Patienten mit dem Q787Q SNP (MD=485 d) und Patienten ohne den Q787Q SNP (MD=570 d, siehe Abbildung 34 B).



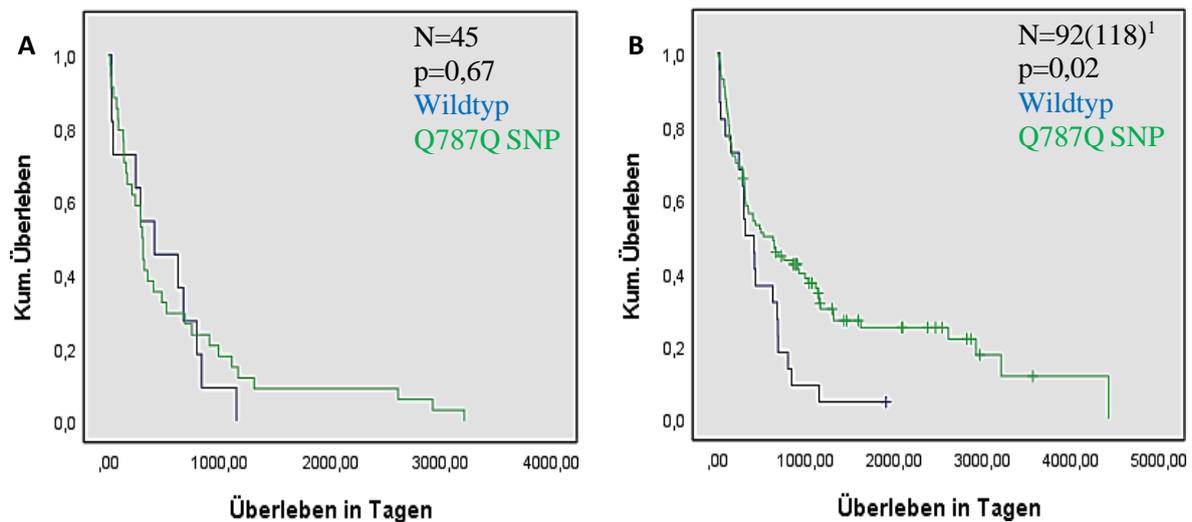
**Abbildung 34: Gegenüberstellung des Überlebens von über 65-jährigen Patienten mit positiver Raucheranamnese mit und ohne den Q787Q SNP**

A, DSS bei Patienten ohne Q787Q SNP (n=13, MD=471 d) und Patienten mit Q787Q SNP (n=25, MD=251 d).

B, OS bei Patienten ohne Q787Q SNP (n=16[16]<sup>1</sup>, MD= 570 d) und Patienten mit Q787Q SNP (n=65[81]<sup>1</sup>, MD=485 d).

<sup>1</sup> Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl von unzensurierten Fällen; die Zahl in der Klammer entspricht der Gesamtzahl.

Abbildung 35 A zeigt, dass es auch bei (Ex)rauchern, die zum Diagnosezeitpunkt jünger als 65 Jahre alt waren, keinen signifikanten Unterschied zwischen dem DSS von Patienten mit Q787Q SNP (MD=306 d) und ohne Q787Q SNP (MD=415 d) gab ( $p=0,67$ ). Demgegenüber war in dieser Subgruppe das OS von Patienten mit Q787Q SNP (MD=523 d) signifikant ( $p=0,02$ ) länger als das von Patienten ohne den Q787Q SNP (MD=318 d, Abbildung 35 B).



**Abbildung 35: Gegenüberstellung des Überlebens von unter 65-jährigen Patienten mit positiver Raucheranamnese mit und ohne den Q787Q SNP**

A, DSS bei Patienten ohne Q787Q SNP (n=11, MD=415 d) und Patienten mit Q787Q SNP (n=34, MD=306 d).

B, OS bei Patienten ohne Q787Q SNP (n=21[22]¹, MD=318 d) und Patienten mit Q787Q SNP (n=71[96]¹, MD=523 d).

¹ Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl von unzensurierten Fällen; die Zahl in der Klammer entspricht der Gesamtzahl.

Eine altersadaptierte Überlebenszeitanalyse von Nierauchern mit und ohne Q787Q SNP wurde aufgrund der geringen Anzahl von Nierauchern nicht durchgeführt.

Tabelle 25 enthält die Gegenüberstellung des OS von Patienten ohne Q787Q SNP und Patienten mit Q787Q SNP in den anhand der klinisch-histopathologischen Parameter gebildeten Subgruppen sowie die mit dem Log-Rank-Test ermittelten p-Werte.

**Tabelle 25: Univariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten ohne und mit Q787Q SNP nach klinisch-histopathologischen Variablen**

Subgruppe	Wildtyp (N=65)		Q787Q SNP (N=275)		p-Wert
	Unzensierte Fälle (Gesamtzahl)	OS (d)	Unzensierte Fälle (Gesamtzahl)	OS (d)	
<b>Alter</b>					
<65 Jahre	26(35)	461	94(139)	631	0,25
≥65 Jahre	24(30)	633	109(136)	409	0,18
<b>Geschlecht</b>					
männlich	28(38)	615	125(171)	409	0,61
weiblich	22(27)	607	78(104)	485	0,57
<b>Raucherstatus</b>					
<i>Nierraucher</i>	3(3)	884	8(11)	860	-
(Ex)raucher	37(38)	433	136(177)	496	<b>0,03</b>
<b>Grading</b>					
G1 und G2	15(23)	1018	62(94)	874	0,8
G3	25(31)	453	103(129)	324	0,73
<b>T</b>					
T1 und T2	15(18)	1018	50(78)	993	0,9
T3 und T4	30(34)	415	113(136)	347	0,48
<b>N</b>					
N0	11(14)	1018	42(52)	744	0,53
N1 bis 3	36(39)	470	122(162)	456	0,69
<b>M</b>					
M0	19(23)	799	64(86)	777	1,0
M1	29(33)	433	112(143)	314	0,9
<b>Stadium</b>					
I-III A	10(14)	1455	35(49)	874	0,27
II B und IV	37(41)	461	138(176)	344	0,36

Kursiv gedruckt sind die klinisch-histopathologischen Ausprägungen und deren Werte, bei denen aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Testung durchgeführt wurde. Fett gedruckt sind signifikante p-Werte.

## 5 Diskussion

---

### 5.1 Häufigkeitsverteilung der klinisch-histopathologischen Standardparameter

Das Gesamtkollektiv bestand aus 396 Patienten mit pulmonalem Adenokarzinom, von deren Tumorgewebe im Jahr 2007 und in den Jahren 2010 bis 2017 Mutationsanalysen mittels Sanger-Sequenzierung angefertigt wurden.

Das mediane Alter der Patienten betrug zum Diagnosezeitpunkt 65 Jahre und ähnelt somit dem der vergleichbaren Literatur (Leichsenring et al., 2017; Chiosea et al., 2011; Oakley und Chiosea, 2011). Dort lag das Durchschnittsalter oder der Altersmedian bei 65-66 Jahren. Geschlechtsabhängig ergaben sich im vorliegenden Kollektiv leichte Unterschiede des medianen Alters. So betrug das mediane Alter bei Männern 66 und bei Frauen 63 Jahre. Schon in den Jahren 1995-2007 ergab sich dieses mediane Alter bei männlichen Lungenkarzinompatienten am UKS (Dissertation von Sarah Kristina Eich, 2012). Das mediane Alter von Frauen lag damals bei 62 Jahren.

Mit 40 % ist der Frauenanteil des vorliegenden Kollektivs vergleichbar mit dem Frauenanteil (44 %) einer in Deutschland in den Jahren 2017 und 2018 durchgeführten Analyse des Robert-Koch-Instituts. Dagegen war der Frauenanteil in der zum Vergleich herangezogenen Literatur mit 59-74 % wesentlich höher (Leichsenring et al., 2017; Chiosea et al., 2011; Oakley und Chiosea, 2011; Villaruz et al., 2013). Der abweichende Frauenanteil in den Kollektiven von Leichsenring et al. (2017) und Oakley und Chiosea (2011) ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich der Frauenanteil in diesen Kollektiven auf Patienten mit EGFR-Mutation bezog. In dieser Subgruppe lag der Frauenanteil der vorliegenden Studie ebenfalls bei 60 %.

90 % der Patienten waren (Ex)raucher mit einem Median von 40 yrs. Sowohl das Verhältnis von Rauchern zu Nichtrauchern als auch die Anzahl gerauchter Zigaretten ähneln den Werten des Kollektivs von Frau Dr. Eich aus den Jahren 1995-2007. In diesem Kollektiv lag der Anteil von (Ex)rauchern bei 94 % und der Mittelwert von yrs bei 41. In der weiteren zum Vergleich herangezogenen Literatur (Leichsenring et al., 2017; Chiosea et al., 2011; Oakley und Chiosea, 2011; Villaruz et al., 2013) ergab sich im Hinblick auf den Raucheranteil eine breite Spannweite (20-93 %). Der geringe Raucheranteil in den Studien von Leichsenring et al. (2017) sowie Oakley und Chiosea (2011) ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass deren Kollektive ausschließlich aus Patienten mit EGFR-Mutationen bestanden und diese Mutationen häufig mit dem Status „Nieraucher“ einhergehen. In der vorliegenden Studie lag der (Ex)raucheranteil bei Patienten mit „häufiger EGFR-Mutation“ bei 50 %.

Bei der Datenerhebung und der statistischen Testung erfolgte eine dichotome Aufteilung des Parameters „Stadium“ in die Gruppen I-III A und III B-IV, weil bei Patienten in den UICC8-Stadien I-III A im Gegensatz zu Patienten in den UICC8-Stadien III B-IV häufig eine Operation und damit eine kurative Behandlung in Betracht gezogen werden kann (Flentje und Schumann, 2018).

Zum Diagnosezeitpunkt befanden sich 78 % der Patienten in den Stadien III B-IV und nur 22 % der Patienten in den Stadien I-III A. Ähnlich verhielt sich die Häufigkeitsverteilung der UICC-Stadien in dem Kollektiv von Leichsenring et al. (2017). Dort befanden sich 75 % der Patienten in Stadium IV und 16 % der Patienten in Stadium III. In den Kollektiven von Oakley und Chiosea (2011), Chiosea (2011) und Villaruz et al. (2013) war der Anteil der Patienten in Stadium IV mit 14-20 % um einiges niedriger.

Die Quote der Patienten ohne regionäre Lymphknotenmetastasen ist vergleichbar mit anderen Studien: Sowohl im analysierten Kollektiv als auch in dem Kollektiv von Ostermayer (2015) lag der Anteil von Patienten ohne Lymphknotenmetastasen zum Diagnosezeitpunkt bei 24 %. Im Kollektiv von Leichsenring et al. (2017) war der Anteil von Patienten ohne Lymphknotenmetastasen mit 14 % etwas geringer.

Der Anteil der schlecht differenzierten Tumore (G3) des zugrundeliegenden Kollektivs entsprach mit 57 % in etwa jenem aus anderen Studien (Ostermayer, 2015; Eich, 2012), in denen der Anteil bei 49-58 % lag. Für die statistische Testung wurden die Vergleichsgruppen G1-2 und G3 gebildet.

## 5.2 Mutationsanalysen

Eine Analyse der Exons 18-21 des EGFR-Gens lag bei 387 Patienten vor. Bei 6 weiteren lag nur eine Analyse der Exons 18, 19 und 21 vor. Eine Mutation im EGFR-Gen war bei 52 Patienten (13 %) zu finden (wobei auf den Q787Q SNP an späterer Stelle gesondert eingegangen wird). Auch nach Ausschluss der 7 Patienten mit EGFR-Mutation aus den Jahren 2017 und 2007, die zur Gruppenvergrößerung ins Patientenkollektiv einbezogen wurden, ist der Anteil von EGFR-Mutationsträgern mit 12 % mit dem in der einschlägigen Literatur angeführten Anteil von EGFR-Mutationsträgern (10-15 %) an pADC-Patienten kaukasischen Ursprungs vergleichbar (Leichsenring et al., 2017; Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao und Miller, 2005).

Bei 41 der 52 Patienten mit Mutation im EGFR-Gen (79 %) lag eine „häufige EGFR-Mutation“ (Deletionsmutation in Exon 19 oder Punktmutation L858R in Exon 21) vor. Dies stimmt mit den Erkenntnissen der Studien von Truini et al. (2019) und Inamura et al. (2010) überein, wonach diese Mutationen 85-90 % der Mutationen im EGFR-Gen ausmachen.

Bei 29 der Patienten mit „häufiger EGFR-Mutation“ (71 %) lagen Deletionen in Exon 19 vor. Bei den restlichen 12 Fällen (29 %) handelte es sich um die Mutation L858R in Exon 21. Eine ähnliche Relation ergab sich in dem Kollektiv von Oakley und Chiosea (2011), in dem Deletionen in Exon 19 mit 55 % etwas häufiger vertreten waren als die Mutation L858R (45 %).

Bei 340 Patienten mit Analyse des Exons 20 lagen keine oder nur synonyme Mutationen im EGFR-Gen vor. Der Q787Q SNP war bei ca. 80 % dieser Patienten anzutreffen. Vergleichbar häufig kam der Q787Q SNP in den kaukasischen Studienpopulationen mit Lungenkarzinom von Zhang et al. von 2006 (84 %) und Leichsenring et al. von 2017 (71 %) vor. In asiatischen Kohorten von NSCLC-Patienten ist der Q787Q SNP mit einem Anteil von 24-28 % wesentlich seltener (Koh et al., 2016). Im zugrundeliegenden Kollektiv lag der Polymorphismus in 38 % der Fälle in homozygoter Form vor. Damit lag der Anteil von Patienten mit homozygotem Polymorphismus (Genotyp AA) zwischen dem Anteil der Patienten im Kollektiv von Leichsenring et al. aus 2017 (22 %) und dem im Kollektiv von Bonin et al. aus 2016 (53 %).

Da in dem für die Studie relevanten Untersuchungszeitraum personalisierte Therapien leitliniengemäß präferenziell für die EGFR-Mutationen 19 und 21 zum Einsatz kamen, war die Zahl der Patienten mit Untersuchung des KRAS-Gens deutlich geringer als die Zahl der Patienten mit EGFR-Mutationsanalyse: Eine Analyse von Exon 2 des KRAS-Gens lag bei 104 der Patienten vor. Eine Mutation war bei 31 dieser Patienten (30 %) auffindbar. Nach Ausschluss der Fälle aus dem Jahr 2017 lag der KRAS-Mutationsträgeranteil noch bei ca. 24 %. Somit ist davon auszugehen, dass KRAS-Mutationen bei pADC-Patienten kaukasischen Ursprungs in etwa doppelt so häufig anzutreffen sind wie EGFR-Mutationen (siehe auch Izumi et al., 2020). Der Anteil von Patienten mit KRAS-Mutation stimmt in etwa mit der Datenlage überein, der zufolge bei 15-30 % der Patienten mit pulmonalem Adenokarzinom eine Mutation im KRAS-Gen vorliegt (Ostermayer, 2015; Pao et al., 2005).

### 5.3 Bestimmung der semiquantitativen Mutationslast und Gruppenbildung

Zur semiquantitativen Bestimmung der Mutationslast wurden – in Konkordanz zu den Studien von Oakley und Chiosea (2011), Chiosea et al. (2011) und Villaruz et al. (2013) – die durch die Sanger-Sequenzierung angefertigten Mutationsanalysen genutzt.

In den Fällen, in denen Mutationen vorlagen, wurden die Amplituden der mutierten Allele und der Wildtypallele im Chromatogramm ausgemessen und zueinander in Relation gesetzt (Amplitude des mutierten Allels/Amplitude des Wildtypallels). Der resultierende Wert wurde als Mutationslast des

Tumors betrachtet. Die Bestimmung dieser Relation ähnelt der in NGS-Verfahren geübten Praxis zur Ermittlung der Allelfrequenz (Soh et al., 2009; Offin et al., 2019).

In der klassischen Genetik gelten Befunde, bei denen in einer Nukleotidposition lediglich eine Base detektiert wird, als „homozygote“ Befunde (z.B. „Wildtypbefunde“). Dagegen gelten Befunde, bei denen in der gleichen Lokalisation Amplituden von zwei unterschiedlichen Basen vorliegen, als „heterozygote“ Befunde. Aus Voruntersuchungen (Oakley und Chiosea, 2011; Chiosea et al. 2011; Villaruz et al., 2013) ist bekannt, dass die Amplitudenrelation zwischen zwei Basen stark variieren kann. In der vorliegenden Studie nahm die Relation zwischen mutiertem Allel und Wildtypallel Werte zwischen 0,08 und 5,63 an.

Ein Ansatz der vorliegenden Arbeit richtete sich nach dem Median der Mutationslast. Während die Höhe der medianen EGFR-Mutationslast (0,67) und die Höhe der medianen KRAS-Mutationslast (0,69) einander ähnelten, lag die Höhe der medianen Q787Q-Last mit einem Wert von 1,03 um einiges höher. Es konnten zwar keine vergleichbaren Studien zur medianen semiquantitativen Mutationslast gefunden werden, eine Studie von Friedlaender et al. (2021) befasste sich allerdings mit den Auswirkungen der medianen EGFR-Allelfrequenz (NGS), die in deren Studie bei 0,47 lag.

In Anlehnung an die Studie von Offin et al. (2019), die den prädiktiven Einfluss der „tumor mutation burden“ bei NSCLC-Patienten mit TKI-Therapie untersuchte, wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine der Gruppenbildungen anhand von Terzilen der Mutationslast vorgenommen. Bei der „tumor mutation burden“ berücksichtigten Offin et al. allerdings Mutationen in 341 Genen. Die Terzilbereiche von Offin et al. lagen bei <2,83 Mutationen/Mb, 2,84-4,85 Mutationen/Mb und >4,85 Mutationen/Mb. In der vorliegenden Arbeit ähnelten sich die Terzilbereiche der EGFR-Mutationslast (0,01-0,53, 0,54-1,04, >=1,05) und KRAS-Mutationslast (0,01-0,47, 0,48-0,99, >=1), während sich der auf die Q787Q-Last beziehende Terzilbereich durch höhere Werte auszeichnete (0,01-0,82, 0,83-1,35, >=1,36).

In einem weiteren Ansatz wurden Fälle, bei denen die Amplitude des mutierten Allels mindestens so hoch war wie die Amplitude des Wildtypallels, der Gruppe „hohe Mutationslast“ und Fälle, bei denen die Amplitude des Wildtypallels höher war als die des mutierten Allels, der Gruppe „niedrige Mutationslast“ zugeordnet. Schon Studien von Oakley und Chiosea (2011), Chiosea et al. (2011) und Villaruz et al. (2013) legten ihrer Gruppeneinteilung dieses Größenverhältnis der Amplituden zugrunde.

Weiterhin wurden die Fälle des untersuchten Kollektivs in Abhängigkeit von der Homozygotie in Gruppen eingeteilt. Es existieren Studien von Leichenring et al. (2017) und Bonin et al. (2016), die sich daran orientierten, ob die Mutation heterozygot oder homozygot vorliegt.

## 5.4 Bedeutung der Mutationen und ihrer semiquantitativen Last für die klinisch-histopathologischen Parameter und die Prognose

### 5.4.1 „Häufige EGFR-Mutationen“ (19-del/21-L858R)

Die Gruppen mit „häufiger EGFR-Mutation“ unterschieden sich im Hinblick auf ihren Frauenanteil. Eine hohe EGFR-Mutationslast war öfter bei Frauen vorzufinden ( $p=0,00-0,01$ ): In den Gruppen mit hoher EGFR-Mutationslast war der Frauenanteil mit 82-83 % höher als in der Gruppe mit mittlerer EGFR-Mutationslast (67 %) und sogar wesentlich höher als in den Gruppen mit niedriger EGFR-Mutationslast (27 %-45 %). Obwohl EGFR-Mutationen für ihr Vorkommen bei Frauen bekannt sind (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao und Miller, 2005), wurde in der zum Vergleich herangezogenen Literatur kein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der EGFR-Mutationslast beschrieben.

Da Frauen im verwendeten Kollektiv signifikant ( $p=0,03$ ) häufiger Nieraucher waren als Männer (15 % vs. 7 %) und der Status „Nieraucher“ signifikant ( $p=0,00$ ) häufig mit dem Vorliegen von „häufigen EGFR-Mutationen“ einherging, wurden zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Geschlecht und EGFR-Mutationsstatus weitere Untersuchungen durchgeführt.

Dadurch sollte herausgefunden werden, ob das Vorliegen von „häufigen EGFR-Mutationen“ eher mit dem Status „Nieraucher“ oder eher mit dem weiblichen Geschlecht zusammenhängt: Weder in der Subgruppe „Nieraucher“ noch in der Subgruppe „(Ex)raucher“ kamen „häufige EGFR-Mutationen“ signifikant öfter bei Frauen als bei Männern vor. In der Subgruppe „Nieraucher“ lag bei 47 % der Frauen und bei 40 % der Männer eine „häufige EGFR-Mutation“ vor ( $p=0,1$ ). In der Subgruppe „(Ex)raucher“ lag bei 9 % der Frauen und bei 3 % der Männer eine „häufige EGFR-Mutation“ vor ( $p=0,06$ ). Andererseits kamen EGFR-Mutationen sowohl in der Subgruppe „Frauen“ als auch in der Subgruppe „Männer“ signifikant öfter bei Nierauchern als bei (Ex)rauchern vor. In der Subgruppe „Frauen“ traten bei 47 % der Nieraucher und nur bei 9 % der (Ex)raucher EGFR-Mutationen auf ( $p=0,00$ ). In der Subgruppe „Männer“ waren EGFR-Mutationen bei 40 % der Nieraucher und bei 3 % der (Ex)raucher zu finden ( $p=0,00$ ). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das Vorliegen von EGFR-Mutationen in der Kohorte des UKS mehr mit dem Status „Nieraucher“ als mit dem Status „weiblich“ assoziiert ist.

Das gehäufte Vorhandensein von EGFR-Mutationen bei Nichtrauchern/Nierauchern geht auch aus anderen Studien hervor (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao und Miller, 2005).

Daten zum Zusammenhang zwischen der Höhe der EGFR-Mutationslast und dem Raucherstatus lagen dagegen zum Vergleich nicht vor. In der vorliegenden Arbeit stand die Höhe der EGFR-Mutationslast

in keiner Beziehung mit der Raucheranamnese: Sowohl Patienten mit niedriger EGFR-Mutationslast als auch Patienten mit mittlerer und hoher EGFR-Mutationslast waren häufiger Nieraucher (43-57 %) als Patienten mit Wildtyp im EGFR-Gen (94 %). Gemäß der Studie von Friedlaender et al. (2021) ist auch die Höhe der EGFR-Allelfrequenz unabhängig vom Raucherstatus.

Keine signifikanten Zusammenhänge waren zwischen „häufigen EGFR-Mutationen“ bzw. deren Mutationslast und dem Alter der Patienten zum Diagnosezeitpunkt oder dem Stadium nach UICC zu finden. Damit weichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von denen der Pittsburgher Studie von Oakley und Chiosea (2011) ab. In deren Studie kam eine hohe, semiquantitativ ermittelte EGFR-Mutationslast besonders häufig bei jungen Patienten (Alter jünger als 65 Jahre) und bei Patienten mit hohem UICC-Stadium vor (UICC-Stadium IV). Ein Grund für die Diskrepanz der Ergebnisse könnte in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Kollektive liegen. So war in der Pittsburgher Studie der Anteil von Patienten, die sich zum Diagnosezeitpunkt in einem niedrigen Stadium (I-III 75 %, IV 25 %) befanden, erheblich größer als in der Kohorte des UKS (I-IIIA 22 %, IIIB-IV 78 %).

In der vorliegenden Arbeit war das Gesamtüberleben (OS) von Patienten mit hoher EGFR-Mutationslast mit einem Median (MD) von 1008-1193 Tagen (d) länger als bei Patienten mit mittlerer EGFR-Mutationslast (MD=900 d), niedriger EGFR-Mutationslast (MD=291-529 d) oder der Gruppe ohne EGFR-Mutation (MD=471 d). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Dagegen ging eine hohe EGFR-Mutationslast mit einem signifikant längeren krankheitsspezifischen Überleben (DSS) einher: Das DSS von Patienten mit hoher EGFR-Mutationslast war mit einem Median von 1008 d signifikant ( $p=0,03$ ) länger als das von Patienten ohne EGFR-Mutation (MD=356 d) und tendenziell ( $p=0,06$ ) länger als das von Patienten mit niedriger EGFR-Mutationslast (MD=291 d). Insbesondere in der Subgruppe „Stadium IIIB-IV“ war eine hohe EGFR-Mutationslast mit einem Überlebensvorteil assoziiert. In dieser Subgruppe unterschied sich das DSS von Patienten mit einer hohen EGFR-Mutationslast (EGFR-MT/WT-Ratio $\geq$ Median, MD=1008 d) sowohl signifikant ( $p=0,01$ ) von dem der Patienten ohne Mutation (MD=289 d) als auch von dem der Patienten mit niedriger EGFR-Mutationslast (MD=274 d).

Weder in der Subgruppe „Stadium IIIB-IV“ noch im Gesamtkollektiv gab es allerdings einen signifikanten Unterschied zwischen dem DSS der Gruppe „Niedrige EGFR-Mutationslast“ (MD=274 d und 291 d) und dem der Gruppe mit Wildtyp im EGFR-Gen (MD=289 d und 356 d).

Eine hohe semiquantitativ ermittelte EGFR-Mutationslast ging im Pittsburgher Kollektiv von Oakley und Chiosea (2011) im Gegensatz zur vorliegenden Studie mit einer schlechteren Prognose einher. Dies könnte auf die schon beschriebenen Unterschiede in der Kollektivstruktur oder auf unterschiedliche Therapiemaßnahmen zurückzuführen sein. So könnte der Prognosevorteil von Patienten mit hoher EGFR-Mutationslast gegenüber Patienten mit niedriger EGFR-Mutationslast in der Kohorte des UKS

daher zustande gekommen sein, dass Patienten mit hoher EGFR-Mutationslast besser auf eine Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) ansprechen und TKI bei Patienten der Pittsburgher Studie nicht zur Anwendung kamen. Für diese Annahme spricht, dass Patienten mit einer hohen EGFR-Allelfrequenz und TKI-Therapie bereits in einer Kohorte von Friedlaender et al. (2021) eine bessere Prognose zeigten als Patienten mit niedriger EGFR-Allelfrequenz.

Die Höhe der EGFR-Mutationslast spielte weder für die TNM-Stadien noch für das Grading oder den Gewebersprung eine Rolle. Vergleichbare Studien hierzu lagen nicht vor.

Zusammenfassend ging eine hohe EGFR-Mutationslast (insbesondere in fortgeschrittenem Erkrankungsstadium) in der vorliegenden univariaten Analyse mit einer besseren Prognose einher. Ob die EGFR-Mutationslast einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt, gilt es in weiteren, multivariaten Analysen herauszufinden. Auch der Zusammenhang zwischen der EGFR-Mutationslast und dem Ansprechen auf TKI sollte in weiteren Studien erforscht werden.

#### 5.4.2 Mutationen in Exon 2 des KRAS-Gens

Die Höhe der KRAS-Mutationslast zeigte sich – in Übereinstimmung mit der Studie von Chiosea et al. (2011) – unabhängig von den Parametern „Alter zum Diagnosezeitpunkt“, „Geschlecht“ und „Stadium nach UICC“.

Sie stand auch in keiner Beziehung mit dem Raucherstatus, dem T-Stadium, dem Vorliegen von Fernmetastasen, dem Gewebersprung und dem Grading. Diese Parameter wurden von Chiosea et al. (2011) nicht thematisiert.

Eine signifikante Antikorrelation ergab sich allerdings zwischen der Höhe der KRAS-Mutationslast und dem Vorliegen von regionären Lymphknotenmetastasen:

So ging eine hohe KRAS-Mutationslast seltener mit einer zum Diagnosezeitpunkt bestehenden regionären Lymphknotenmetastasierung einher als eine niedrige KRAS-Mutationslast. In der an Terzilen orientierten Gruppenbildung waren Patienten mit hoher KRAS-Mutationslast (44 %) signifikant ( $p=0,01$ ) seltener von Lymphknotenmetastasen betroffen als Patienten ohne KRAS-Mutation (88 %). Zwischen Patienten mit mittlerer (57 %) oder niedriger KRAS-Mutationslast (71 %) und Patienten ohne KRAS-Mutation (88 %) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Bedeutung der KRAS-Mutationslast für die Lymphknotenmetastasierung wurde in der zum Vergleich herangezogenen Literatur (Chiosea et al., 2011) nicht untersucht.

Mit einem medianen Gesamtüberleben (OS) von 719 d überlebten Patienten ohne KRAS-Mutation nicht signifikant länger als Patienten mit niedriger KRAS-Mutationslast (MD=679 d) oder hoher KRAS-Mutationslast (MD=152 d).

Die Höhe der KRAS-Mutationslast spielte auch in einer Studie von Chiosea et al. (2011) bei Patienten in den UICC-Stadien II, III und IV keine prognostische Rolle. Dagegen ging eine hohe KRAS-Mutationslast bei Chiosea et al. (2011) in der Subgruppe „UICC-Stadium I“ mit einer signifikant ( $p=0,00$ ) schlechteren Prognose einher. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Überlebenszeitanalyse von Patienten mit KRAS-Mutation in niedrigem Stadium aufgrund der geringen Fallzahl ( $N=5$ ) nicht durchgeführt.

Eine hohe KRAS-Mutationslast stellte auch in der Studienpopulation von Villaruz et al. (2013) einen signifikant schlechten Prognosefaktor dar. Der Anteil von Patienten in niedrigem UICC-Stadium (UICC-Stadium I-III) war in dieser Population mit 79 % allerdings größer als der in dem hier untersuchten Unterkollektiv (Stadium I-III 17 %).

Der Unterschied im Hinblick auf die prognostische Bedeutung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die KRAS-Mutationslast, möglicherweise aufgrund anderer Therapieoptionen, insbesondere bei Patienten in niedrigem UICC-Stadium bedeutsam ist.

### 5.4.3 Der Q787Q Einzelnukleotid-Polymorphismus (Exon 20 im EGFR-Gen)

Zum Q787Q SNP gibt es bei Patienten mit pulmonalem Adenokarzinom derzeit nur wenige Informationen. Da der Q787Q SNP ebenso wie die bekannte Resistenzmutation T790M in Exon 20 zu finden ist, könnte man vermuten, dass auch dem Q787Q SNP eine prognostische Relevanz zukommt. Dennoch legen einzelne Studien (Leichsenring et al., 2017; Koh et al., 2016) nahe, dass der Q787Q SNP für den Krankheitsverlauf von pADC-Patienten keine Rolle spielt. Eine neue Studie von Wu et al. (2022) deutet allerdings darauf hin, dass der Q787Q SNP zumindest bei Patienten mit einer aktivierenden EGFR-Mutation einen positiven prognostischen Einfluss ausübt. Bei Patienten ohne weitere EGFR-Mutation kam dem Polymorphismus jedoch auch dort keine prognostische Rolle zu.

Der Q787Q SNP ohne weitere EGFR-Mutation erwies sich auch in dem vorliegenden Kollektiv zunächst als irrelevant für die Prognose.

Allerdings stellte der Q787Q SNP bei (ehemalig) rauchenden Patienten mit pulmonalem Adenokarzinom einen prognostischen Vorteil dar ( $p=0,03$ ). So belief sich bei (Ex)rauchern mit Q787Q SNP die Überlebensrate nach 3 Jahren immerhin noch auf 33 %, hingegen nur noch auf 13 % bei jenen ohne den Polymorphismus. Auch die Höhe der Q787Q-Last zeigte sich in der Kohorte des UKS relevant für das Überleben in der Subgruppe „(Ex)raucher“: Eine hohe Q787Q-Last wirkte sich positiv auf das Überleben aus. So war das mediane OS in den Gruppen mit hoher Q787Q-Last (MD=523-642 d)

signifikant ( $p=0,01-0,03$ ) höher als in der Gruppe ohne Q787Q SNP (MD=433 d). Eine niedrige Q787Q-Last beeinflusste das OS hingegen nicht signifikant: Das OS von Patienten mit niedriger Q787Q-Last (MD=367-405 d) wich nicht signifikant von dem der Patienten ohne Q787Q SNP (MD=433 d) und nur tendenziell ( $p=0,09-0,14$ ) von dem der Patienten mit hoher Q787Q-Last (MD=523-642 d) ab.

Warum in meiner Studie das Vorliegen des Q787Q SNP in Verbindung mit einer positiven Raucheranamnese beim pulmonalem Adenokarzinom einen positiven Prognosefaktor darstellte, ist noch nicht geklärt. Möglicherweise spielt die Isoform D des EGFR, die durch den Polymorphismus vermehrt exprimiert wird und ihn auch zugänglicher für eine Therapie mit TKI macht (Tan et al., 2017; zitiert nach Wu et al., 2022), eine Rolle. Der Q787Q SNP ist übrigens nicht der einzige Einzelnukleotid-Polymorphismus, der in Kombination mit der Raucherhistorie von Belang ist. Bereits Ag et al. (2014) untersuchten in ihrer Studie Polymorphismen („CYP1A1 m1“ und „CYP1A1 m2“) und kamen dort zu dem Schluss, dass diese in Kombination mit einer positiven Raucheranamnese das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, steigern.

Dass dem Q787Q SNP in den Studien von Leichsenring et al. (2017) und Koh et al. (2016) im pADC keine prognostische Bedeutung zukommt, könnte daran liegen, dass dort keine separaten Überlebenszeitanalysen an Patienten mit positiver Raucheranamnese durchgeführt wurden. Auch Wu et al. (2022) untersuchten die prognostische Bedeutung des Polymorphismus nicht in dieser Subgruppe.

Der Q787Q SNP kam sowohl in der vorliegenden Studie als auch in den Studien von Wu et al. (2022) und Leichsenring et al. (2017) unabhängig vom Raucherstatus vor. Dagegen war er in der Studie von Koh et al. (2016) mit einer positiven Raucheranamnese assoziiert. Dieses abweichende Ergebnis von Koh et al. (2016) könnte darauf zurückzuführen sein, dass in deren Studie lediglich Patienten mit Q787Q SNP und Patienten mit anderen EGFR-Mutationen (u.a. 21-L858R und del-19), nicht aber Patienten ohne EGFR-Mutation, verglichen wurden. Die beiden letztgenannten EGFR-Mutationen gehen häufig mit einer negativen Raucheranamnese einher und sind möglicherweise maßgeblich für die Ergebnisse von Koh et al. (2016). Dies gilt auch für die Assoziation des Q787Q SNP mit dem Status „männlich“ in der Studie von Koh et al. (2016). Weder in der Kohorte des UKS noch in den Untersuchungen von Wu et al. (2022) stand der Q787Q SNP in einem Zusammenhang mit dem Geschlecht.

Während der Q787Q SNP in der Subgruppe „(Ex)raucher“ einen positiven Prognosefaktor darstellte, wirkte er sich bei Patienten in der Subgruppe „Alter $\geq$ 65 Jahre“ negativ auf die Prognose aus: Die Überlebenszeitmediane von Patienten ohne Q787Q SNP (MD OS=633 d, MD DSS=633 d) lagen über denen der Patienten mit Q787Q SNP (MD OS=409 d, MD DSS=324 d). Während sich die Analyse des OS als nicht signifikant ( $p=0,18$ ) erwies, zeigten sich beim DSS signifikante Unterschiede ( $p=0,01$ ). Diese Subgruppenanalysen wurden in der zum Vergleich herangezogenen Literatur (Leichsenring et al., 2017; Koh et al., 2016; Wu et al., 2022) nicht durchgeführt. Welche Mechanismen dem negativen

Einfluss des Q787Q SNP bei Patienten mit einem Alter von über 65 Jahren in der Kohorte des UKS zugrunde liegen, ist aktuell unklar.

Allerdings hatte der Q787Q SNP bei (Ex)rauchern, die zum Diagnosezeitpunkt älter als 65 Jahre waren, keinen Einfluss. Im Kollektiv des UKS scheint somit der positive prognostische Effekt des Q787Q SNP bei (Ex)rauchern durch den negativen prognostischen Effekt des Q787Q SNP bei Patienten, die zum Diagnosezeitpunkt älter als 65 Jahre waren, kompensiert zu werden.

Bei (Ex)rauchern, die zum Diagnosezeitpunkt jünger als 65 Jahre alt waren, wirkte sich das Vorhandensein des Q787Q SNP positiv auf das Gesamtüberleben aus. In dieser Subgruppe war das OS von Patienten mit dem Q787Q SNP (MD=523 d) signifikant ( $p=0,02$ ) länger als das OS von Patienten ohne Q787Q SNP (MD=318 d). Die DSS der beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant.

Zur weiteren Evaluation der prognostischen Bedeutung des Q787Q SNP scheint die Durchführung von multivariaten Überlebenszeitanalysen sinnvoll. Darüber hinaus sollten prädiktive Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen die semiquantitative Q787Q-Last berücksichtigt wird.

Des Weiteren waren Patienten mit hoher Q787Q-Last (MT/WT-Ratio $\geq 1,36$ ) im terzilorientierten Ansatz mit ca. 70 % signifikant ( $p=0,03$ ) häufiger von Fernmetastasen betroffen als Patienten mit einer niedrigeren Q787Q-Last (47-59 %). Wenn eine hohe Q787Q-Last mit einer vorhandenen Fernmetastasierung in Verbindung stehen sollte, würde es allerdings naheliegen, dass der Anteil von Patienten mit Fernmetastasen signifikant höher in der Gruppe mit homozygotem Q787Q SNP ist als in der Gruppe ohne Q787Q SNP oder heterozygotem Q787Q SNP, da in der Gruppe mit homozygotem Q787Q SNP die Q787Q-Last am höchsten ist. Da dies weder in der vorliegenden Arbeit noch in der Arbeit von Leichsenring et al. (2017) der Fall war, handelt es sich bei der Korrelation zwischen hoher Q787Q-Last und dem Vorliegen einer Fernmetastasierung im terzilorientierten Ansatz am ehesten um eine Zufallsbeobachtung.

Der Q787Q SNP und seine Last waren in der vorliegenden Arbeit (ebenso wie in der Studie von Leichsenring et al. [2017]) unabhängig vom Alter zum Diagnosezeitpunkt, dem Stadium nach UICC und dem TN-Stadium. Ein Zusammenhang zwischen der Q787Q-Last und dem Differenzierungsgrad des Tumors oder dem Gewebersprung konnte nicht gefunden werden und wurde auch in der vorliegenden Literatur (Leichsenring et al., 2017; Koh et al., 2016; Wu et al., 2022) nicht beschrieben.

## 5.5 Fazit: Mutationslast und Allelfrequenz

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass die durch Sanger-Sequenzierung ermittelte Mutationslast eine Bedeutung für das biologische Verhalten von Tumoren haben könnte. Dafür spricht, dass in der Kohorte des UKS die Höhe der EGFR-Mutationslast eine Rolle für das Überleben spielte und abhängig von der KRAS-Mutationslast ein Unterschied hinsichtlich des Vorliegens von regionären Lymphknotenmetastasen zum Diagnosezeitpunkt beobachtet werden konnte. Außerdem wirkte sich die Höhe der Q787Q-Last in Kombination mit einer positiven Raucheranamnese auf die Prognose der Patienten aus. In diesen Untersuchungen entsprach das Verhalten der Tumore mit niedriger Mutationslast eher dem der Tumore ohne Mutation als dem der Tumore mit hoher Mutationslast.

Auch in Arbeiten, die NGS zur quantitativen Bestimmung von Mutationen heranzogen, ähnelte das Verhalten der Tumore mit niedriger Allelfrequenz mehr dem der Tumore ohne Mutation als dem der Tumore mit hoher Allelfrequenz. So zeigten Patienten mit niedriger EGFR-Allelfrequenz in einer Studie von Friedlaender et al. (2021) ein schlechteres Ansprechen auf eine TKI-Therapie als Patienten mit hoher EGFR-Allelfrequenz, und Patienten mit niedriger KRAS-Allelfrequenz sprachen in der CRYSTAL-Studie besser auf eine Therapie mit Anti-EGFR-Antikörpern an als Patienten mit hoher KRAS-Allelfrequenz (Stintzing und Heinemann, 2019).

Damit weist die vorliegende Arbeit darauf hin, dass die klinische Bedeutung der semiquantitativ ermittelten Mutationslast vergleichbar mit der Bedeutung der Allelfrequenz ist. Diese Erkenntnis stimmt überein mit der Untersuchung von Malapelle et al. (2015), nach der eine hohe KRAS-Mutationslast im kolorektalen Karzinom mit einer hohen KRAS-Allelfrequenz einherging.

Zur Validierung des Zusammenhangs zwischen der semiquantitativ ermittelten Mutationslast und der durch NGS ermittelten Allelfrequenz sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Außerdem sollten Untersuchungen bezüglich der prädiktiven Bedeutung der semiquantitativen EGFR- und KRAS-Mutationslast vorgenommen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

---

1. Abdulla DSY, Heydt C, Wolf J (2018) Neue Therapieoptionen beim Lungenkarzinom. *Im Focus Onkologie* 21:18–24
2. Acker F, Stratmann J, Aspacher L, Nguyen NTT, Wagner S, Serve H, Wild PJ, Sebastian M (2021) KRAS Mutations in Squamous Cell Carcinomas of the Lung. *Front Oncol* 11:788084
3. Ag H, Hf P, Hm E-S, Dm G, Mm T (2014) CYP1A1 gene polymorphisms and smoking status as modifier factors for lung cancer risk. *Gene* 541:26–30
4. Arbour KC, Jordan E, Kim HR, Dienstag J, Yu HA, Sanchez-Vega F, Lito P, Berger M, Solit DB, Hellmann M, Kris MG, Rudin CM, Ni A, Arcila M, Ladanyi M, Riely GJ (2018) Effects of Co-occurring Genomic Alterations on Outcomes in Patients with KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 24:334–340
5. Bethune G, Bethune D, Ridgway N, Xu Z (2010) Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: An overview and update. *Journal of thoracic disease* 2:48–51
6. Bhopal A, Peake MD, Gilligan D, Cosford P (2019) Lung cancer in never-smokers: a hidden disease. *J R Soc Med* 112:269–271
7. Bohle RM und Fink Ludger (2018) Lunge. In: Kirchner T, Müller-Hermelink HK, Roessner A (eds) *Kurzlehrbuch Pathologie*, 13th edition, Urban&Fischer in Elsevier, München, pp.341-361
8. Bonin S, Donada M, Bussolati G, Nardon E, Annaratone L, Pichler M, Chiaravalli AM, Capella C, Hoefler G, Stanta G (2016) A synonymous EGFR polymorphism predicting responsiveness to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer patients. *Tumor Biol* 37:7295–7303
9. Chiosea SI, Sherer CK, Jelic T, Dacic S (2011) KRAS mutant allele-specific imbalance in lung adenocarcinoma. *Modern Pathology* 24:1571–1577
10. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE (2007) Lung Cancer: Diagnosis and Management. *AFP* 75:56–63
11. Dahse R, Kosmehl H (2008) Detection of drug-sensitizing EGFR exon 19 deletion mutations in salivary gland carcinoma. *British Journal of Cancer* 99:90–92
12. de Muga S, Hernández S, Agell L, Salido M, Juanpere N, Lorenzo M, Lorente JA, Serrano S, Lloreta J (2010) Molecular alterations of EGFR and PTEN in prostate cancer: association with high-grade and advanced-stage carcinomas. *Mod Pathol* 23:703–712
13. Dutta P, Maity A (2007) Dutta, P. R. & Maity, A. Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett.* 254, 165-177. *Cancer letters* 254:165–77
14. Eich SK (2012) Überlebensanalyse eines Patientenkollektivs mit Lungenkarzinom: Erstdiagnose 1995 bis 2007, Dissertation, Medizin, [online] <https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/handle/20.500.11880/21832> (Stand 27.07.2022)
15. Flentje M, Schumann C (2018) Multimodale Ansätze in Diagnose und Therapie beim NSCLC Stadium III - Der aktuelle Standard. *Onkologie heute - Fortbildung aktuell* 2 URL: [https://cme.mgo-fachverlage.de/uploads/exam/exam\\_223.pdf](https://cme.mgo-fachverlage.de/uploads/exam/exam_223.pdf) (Stand 27.07.2022)

16. Fong KM, Sekido Y, Minna JD (1999) Molecular pathogenesis of lung cancer. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 118:1136–1152
17. Friedlaender A, Tsantoulis P, Chevallier M, De Vito C, Addeo A (2021) The Impact of Variant Allele Frequency in EGFR Mutated NSCLC Patients on Targeted Therapy. *Front Oncol* 11:644472
18. Gazdar AF (1994) The molecular and cellular basis of human lung cancer. *Anticancer Res* 14:261–267
19. Gazdar AF (2009) Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 28:S24–S31
20. Grabner C (2019) Genomische Ansätze zur Identifizierung seltener autosomal dominanter/rezessiver Krankheitsgene. Medizinische Universität Graz URL: [https://online.medunigraz.at/mug\\_online/wbAbs.getDocument?pThesisNr=57278&pAutorNr=&pOrgNr=14021](https://online.medunigraz.at/mug_online/wbAbs.getDocument?pThesisNr=57278&pAutorNr=&pOrgNr=14021) (Stand 27.07.2022)
21. Harrison PT, Vyse S, Huang PH (2020) Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol* 61:167–179
22. Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L (2021) KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Sig Transduct Target Ther* 6:1–20
23. Ikeda K, Nomori H, Mori T, Sasaki J, Kobayashi T (2008) Novel germline mutation: EGFR V843I in patient with multiple lung adenocarcinomas and family members with lung cancer. *Ann Thorac Surg* 85:1430–1432
24. Inamura K, Ninomiya H, Ishikawa Y, Matsubara O (2010) Is the Epidermal Growth Factor Receptor Status in Lung Cancers Reflected in Clinicopathologic Features? *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 134:66–72
25. Isaka T, Nakayama H, Ito H, Yokose T, Yamada K, Masuda M (2018) Impact of the epidermal growth factor receptor mutation status on the prognosis of recurrent adenocarcinoma of the lung after curative surgery. *BMC Cancer* 18:959
26. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, Birkbak NJ, Watkins TBK, Veeriah S, Shafi S, Johnson DH, Mitter R, Rosenthal R, Salm M, Horswell S, Escudero M, Matthews N, Rowan A, Chambers T, Moore DA, Turajlic S, Xu H, Lee S-M, Forster MD, Ahmad T, Hiley CT, Abbosh C, Falzon M, Borg E, Marafioti T, Lawrence D, Hayward M, Kolvekar S, Panagiotopoulos N, Janes SM, Thakrar R, Ahmed A, Blackhall F, Summers Y, Shah R, Joseph L, Quinn AM, Crosbie PA, Naidu B, Middleton G, Langman G, Trotter S, Nicolson M, Remmen H, Kerr K, Chetty M, Gomersall L, Fennell DA, Nakas A, Rathinam S, Anand G, Khan S, Russell P, Ezhil V, Ismail B, Irvin-Sellers M, Prakash V, Lester JF, Kornaszewska M, Attanoos R, Adams H, Davies H, Dentre S, Taniere P, O’Sullivan B, Lowe HL, Hartley JA, Iles N, Bell H, Ngai Y, Shaw JA, Herrero J, Szallasi Z, Schwarz RF, Stewart A, Quezada SA, Le Quesne J, Van Loo P, Dive C, Hackshaw A, Swanton C (2017) Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* 376:2109–2121
27. Jänne PA, Johnson BE (2006) Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 12:4416s–4420s

28. Jiang Y, Kimchi ET, Staveley-O'Carroll KF, Cheng H, Ajani JA (2009) Assessment of K-ras mutation: a step toward personalized medicine for patients with colorectal cancer. *Cancer* 115:3609–3617
29. Kempf E, Rousseau B, Besse B, Paz-Ares L (2016) KRAS oncogene in lung cancer: focus on molecularly driven clinical trials. *European Respiratory Review* 25:71–76
30. Koh YW, Kim HJ, Kwon HY, Han J-H, Lee C-K, Lee M-S, Kim C-J, Baek M-J, Jeong D (2016) Q787Q EGFR Polymorphism as a Prognostic Factor for Lung Squamous Cell Carcinoma. *Oncology* 90:289–298
31. Kraywinkel K, Barnes B (2017) Epidemiologie des kleinzelligen Lungenkarzinoms in Deutschland. *Onkologie* 23:334–339
32. Kraywinkel K, Schönfeld I (2018) Epidemiologie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms in Deutschland. *Onkologie* 24:946–951
33. Robert Koch-Institut (eds) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (eds) (2019): Krebs in Deutschland für 2015/2016 12. Ausgabe, [online], DOI 978-3-89606-298-7 10.25646/5977.2 (Stand 10.08.2022)
34. Kumar A, Petri ET, Halmos B, Boggon TJ (2008) Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol* 26:1742–1751
35. Leichsenring J, Volckmar A-L, Magios N, Morais de Oliveira CM, Penzel R, Brandt R, Kirchner M, Bozorgmehr F, Thomas M, Schirmacher P, Warth A, Endris V, Stenzinger A (2017) Synonymous EGFR variant p.Q787Q is neither prognostic nor predictive in patients with lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 56:214–220
36. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2022) Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms Langversion 2.01, AWMF-Registernummer: 020/007OL URL: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/lungenkarzinom/> (Stand 02.01.2023)
37. Li X-M, Yang J-J, Wu Y-L (2019) Association of allele frequency of EGFR mutation with efficacy of EGFR TKIs in advanced non-small cell lung cancer. *JCO* 37:e20678–e20678
38. Lynch TJ, Okimoto RA, Supko JG, Settleman J (2004) Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *The New England Journal of Medicine* 350:2129–39
39. Malapelle U, Sgariglia R, De Stefano A, Bellevicine C, Vigliar E, de Biase D, Sepe R, Pallante P, Carlomagno C, Tallini G, Troncone G (2015) KRAS mutant allele-specific imbalance (MASI) assessment in routine samples of patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Pathol* 68:265–269
40. Marabese M, Ganzinelli M, Garassino MC, Shepherd FA, Piva S, Caiola E, Macerelli M, Bettini A, Lauricella C, Floriani I, Farina G, Longo F, Bonomi L, Fabbri MA, Veronese S, Marsoni S, Brogginini M, Rulli E (2015) cancer patients treated with first-line platinum containing. *6:34041–34022*
41. Mardis ER (2017) DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nat Protoc* 12:213–218

42. Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, Haller A, Lothaire P, Meert A-P, Noel S, Lafitte J-J, Sculier J-P (2005) The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 92:131–139
43. Matsumura Y, Owada Y, Yamaura T, Muto S, Osugi J, Hoshino M, Higuchi M, Ohira T, Suzuki H, Gotoh M (2016) Epidermal growth factor receptor gene mutation as risk factor for recurrence in patients with surgically resected lung adenocarcinoma: a matched-pair analysis. *Interact CardioVasc Thorac Surg* 23:216–222
44. McGrail DJ, Pilié PG, Rashid NU, Voorwerk L, Slagter M, Kok M, Jonasch E, Khasraw M, Heimberger AB, Lim B, Ueno NT, Litton JK, Ferrarotto R, Chang JT, Moulder SL, Lin S-Y (2021) High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Annals of Oncology* 32:661–672
45. Metro G, Chiari R, Duranti S, Siggillino A, Fischer MJ, Giannarelli D, Ludovini V, Bennati C, Marcomigni L, Baldi A, Giansanti M, Minotti V, Crinò L (2012) Impact of specific mutant KRAS on clinical outcome of EGFR-TKI-treated advanced non-small cell lung cancer patients with an EGFR wild type genotype. *Lung Cancer* 78:81–86
46. Moch H, Höfler HK, Lax S, Moll R, Tannapfel A, Zimmermann DR (2019) Tumorerkrankungen. In: Höfler G, Kreipe H, Moch H (eds), *Pathologie Das Lehrbuch*, 6th edition, Urban&Fischer in Elsevier, München, pp.132-177
47. Moch H, Zimmermann DR, Rohrman S (2019) Pathologie: Aufgaben und Methoden. In: Höfler G, Kreipe H, Moch H (eds), *Pathologie Das Lehrbuch*, 6th edition, Urban&Fischer in Elsevier, München, pp.3-17
48. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA (2008) Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clin Proc* 83:584–594
49. Muñoz-Maldonado C, Zimmer Y, Medová M (2019) A Comparative Analysis of Individual RAS Mutations in Cancer Biology. *Frontiers in Oncology* 9:1088
50. Nagahara H, Mimori K, Ohta M, Utsunomiya T, Inoue H, Barnard GF, Ohira M, Hirakawa K, Mori M (2005) Somatic Mutations of Epidermal Growth Factor Receptor in Colorectal Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 11:1368–1371
51. Nakashima K, Kimura M, Akamatsu H, Daga H, Imai H, Taira T, Ko R, Hisamatsu Y, Nishino K, Sugimoto T, Miyashita Y, Takahashi T, et al (2019) Osimertinib for patients with EGFR T790M mutation-positive non-small-cell lung cancer and a poor performance status. *Jpn J Clin Oncol* 49:671–675
52. Nakazaki K, Kato Y, Taguchi T, Inayama Y, Ishiguro Y, Kondo N, Horiuchi C, Sakakibara A, Tsukuda M (2010) Heterozygous mutation (G/G→G/A) at nt 2607 of the EGFR gene is closely associated with increases in EGFR copy number and mRNA half life, but impaired EGFR protein synthesis in squamous cell carcinomas of the head and neck - implication for gefitinib efficacy. *Oncol Lett* 1:1017–1020
53. Nollmann FI, Ruess DA (2020) Targeting Mutant KRAS in Pancreatic Cancer: Futile or Promising? *Biomedicines* 8:281
54. Oberhofer E (2020) Krebspatienten das „relative Überleben“ erklären. *Uro-News* 24:52

55. Oakley GJ, Chiosea SI (2011) Higher dosage of the epidermal growth factor receptor mutant allele in lung adenocarcinoma correlates with younger age, stage IV at presentation, and poorer survival. *J Thorac Oncol* 6:1407–1412
56. Offin M, Rizvi H, Tenet M, Ni A, Sanchez-Vega F, Li BT, Drilon A, Kris MG, Rudin CM, Schultz N, Arcila ME, Ladanyi M, Riely GJ, Yu H, Hellmann MD (2019) Tumor Mutation Burden and Efficacy of EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clin Cancer Res* 25:1063–1069
57. Ostermayer B (2015) Detektion von KRAS-Gen-Mutationen beim Bronchialkarzinom, Dissertation, Zahnheilkunde, [online] <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/handle/ediss/6420> (Stand 30.07.2022)
58. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304:1497–1500
59. Pallis AG, Voutsina A, Kalikaki A, Souglakos J, Briasoulis E, Murray S, Koutsopoulos A, Tripaki M, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V (2007) ‘Classical’ but not ‘other’ mutations of EGFR kinase domain are associated with clinical outcome in gefitinib-treated patients with non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 97:1560–1566
60. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG, Varmus HE (2005) KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. *PLOS Medicine* 2:e17
61. Pao W, Miller VA (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol* 23:2556–2568
62. Pao W, Chmielecki J (2010) Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Cancer* 10:760–774
63. Patel JD, Bach PB, Kris MG (2004) Lung cancer in US women: a contemporary epidemic. *JAMA* 291:1763–1768
64. Petersen I (2011) The Morphological and Molecular Diagnosis of Lung Cancer. *Deutsches Arzteblatt Online* 108:525–31
65. Pfarr N, Penzel R, Klauschen F, Heim D, Brandt R, Kazdal D, Jesinghaus M, Herpel E, Schirmacher P, Warth A, Weichert W, Endris V, Stenzinger A (2016) Copy number changes of clinically actionable genes in melanoma, non-small cell lung cancer and colorectal cancer—A survey across 822 routine diagnostic cases. *Genes, Chromosomes and Cancer* 55:821–833
66. Prudnikow LC, Wünschiers R (2020) DNA-Sequenzierung in der dritten Generation. *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* 7:324–35
67. Rodenhuis S, Slebos RJC (1990) The ras Oncogenes in Human Lung Cancer. *American Review of Respiratory Disease* 142:27–30
68. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19:183–232

69. Sasaki H, Endo K, Takada M, Kawahara M, Tanaka H, Kitahara N, Matsumura A, Iuchi K, Kawaguchi T, Okuda K, Kawano O, Yukiue H, Yokoyama T, Yano M, Fujii Y (2008) EGFR polymorphism of the kinase domain in Japanese lung cancer. *J Surg Res* 148:260–263
70. Savic Prince S, Bubendorf L (2019) Lunge. In: Höfler G, Kreipe H, Moch H (eds), *Pathologie Das Lehrbuch*, 6th edition, Urban&Fischer in Elsevier, München, pp.484-521
71. Sekido Y, Fong KM, Minna JD (1998) Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1378:F21-59
72. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF (2005) Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 97:339–346
73. Shigematsu H, Gazdar AF (2006) Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer* 118:257–262
74. Siegel DA, Fedewa SA, Henley SJ, Pollack LA, Jemal A (2021) Proportion of Never Smokers Among Men and Women With Lung Cancer in 7 US States. *JAMA Oncology* 7:302–304
75. Soh J, Okumura N, Lockwood WW, Yamamoto H, Shigematsu H, Zhang W, Chari R, Shames DS, Tang X, MacAulay C, Varella-Garcia M, Voorder T, Wistuba II, Lam S, Brekken R, Toyooka S, Minna JD, Lam WL, Gazdar AF (2009) Oncogene Mutations, Copy Number Gains and Mutant Allele Specific Imbalance (MASI) Frequently Occur Together in Tumor Cells. *PLOS ONE* 4:e7464
76. Statistisches Bundesamt (Destatis) (2017): *Gesundheit Todesursachen in Deutschland 2015 Fachserie 12, Reihe 4*, [online], URL <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Publikationen/Downloads-Todesursachen/todesursachen-2120400157004.html> (Stand 10.08.2022)
77. Stintzing S, Heinemann V (2019) FIRE-5-Studie (AIO TF-0118). *springermedizin.de* 34:367–368
78. Tan DSW, Chong FT, Leong HS, Toh SY, Lau DP, Kwang XL, Zhang X, Sundaram GM, TanGS, Chang MM, Chua BT, Lim WT, Tan EH, Ang MK, Lim TKH, Sampath P, Chowbay B, Skanderup AJ, DasGupta R, Gopalakrishnalyer N (2017) Long Noncoding RNA EGFR-AS1 Mediates Epidermal Growth Factor Receptor Addiction and Modulates Treatment Response in Squamous-Cell Carcinoma. *Nat Med* 23(10):1167–75. doi: 10.1038/nm.4401
79. The AACR Project GENIE Consortium (2017) AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discovery* 7(8):818-831. Dataset Version 8.
80. Truini A, Starrett JH, Stewart T, Ashtekar K, Walther Z, Wurtz A, Lu D, Park JH, DeVeaux M, Song X, Gettinger S, Zelterman D, Lemmon MA, Goldberg SB, Politi K (2019) The EGFR Exon 19 Mutant L747-A750>P Exhibits Distinct Sensitivity to Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 25:6382–6391
81. Tsao MS, Asamura H, Borczuk AC, Dacic S, Devesa SS, Kerr KM, MacMahon H, Rusch VW, Samet JM, Scagliotti GV, Travis WD, Van Schil PEY, Yatabe Y, Znaor A (2021) Tumours of the lung: Introduction. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board (eds), *WHO classification of Tumours. Thoracic tumours*, 5th edition, International Agency for Research on Cancer 2021, Lyon, pp. 19-28

82. Van Cutsem E, Lang I, D'haens G, Moiseyenko V, Zaluski J, Folprecht G, Tejpar S, Kisker O, Stroh C, Rougier P (2008) KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *JCO* 26:2
83. Viallet J, Sausville EA (1996) Involvement of Signal Transduction Pathways in Lung Cancer Biology. *J. Cell Biochem Suppl* 1996; 24: 237-46
84. Vidal J, Bellosillo B, Santos Vivas C, García-Alfonso P, Carrato A, Cano MT, García-Carbonero R, Élez E, Losa F, Massutí B, Valladares-Ayerbes M, Viéitez JM, Manzano JL, Azuara D, Gallego J, Pairet S, Capellá G, Salazar R, Tabernero J, Aranda E, Montagut C (2019) Ultra-selection of metastatic colorectal cancer patients using next-generation sequencing to improve clinical efficacy of anti-EGFR therapy. *Ann Oncol* 30:439–446
85. Villaruz LC, Socinski MA, Cunningham DE, Chiosea SI, Burns TF, Siegfried JM, Dacic S (2013) The prognostic and predictive value of *KRAS* oncogene substitutions in lung adenocarcinoma: *KRAS* Mutations in Lung Adenocarcinoma. *Cancer* 119:2268–2274
86. Wagner BJ, Buettner R (2020) Immunohistochemische und molekularpathologische Diagnostik von Lungenkarzinomen. *Pathologe* 41:3–13
87. Wenning AS, Ryser CO, Andreou A, Gloor B, Berger MD (2021) Neues zur Therapie des Pankreaskarzinoms: Hoffnung am Horizont? *Schweiz Gastroenterol* 2:138–147
88. WHO Classification of Tumours Editorial Board (2021) Thoracic Tumours: WHO Classification of Tumours. 5th ed edition. IARC, Lyon
89. Wu W-J, Yang S-H, Chung H-P, Yen C-T, Chen Y-T, Chang W-C, Su J, Chen H-Y (2022) EGFR Q787Q Polymorphism Is a Germline Variant and a Prognostic Factor for Lung Cancer Treated With TKIs. *Frontiers in Oncology* 12:816801
90. Xu H, Zong H, Ma C, Ming X, Shang M, Li K, He X, Du H, Cao L (2017) Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. *Oncol Lett* 14:512–516
91. Xu J, Wang J, Zhang S (2017) Mechanisms of resistance to irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and therapeutic strategies in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 8:90557–90578
92. Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut: Verteilung des pulmonalen Adenokarzinoms nach Geschlecht, Deutschland 2017–2018. Datensatz des ZfKD auf Basis der epidemiologischen Landesregisterdaten. Version: Epi2020\_1. doi:10.18444/5.03.01.0005.0016.0001. (Stand 05.04.2022)
93. Zhang W, Stabile LP, Keohavong P, Romkes M, Grandis JR, Traynor AM, Siegfried JM (2006) Mutation and polymorphism in the EGFR-TK domain associated with lung cancer. *J Thorac Oncol* 1:635–647
94. Zwiener I, Blettner M, Hommel G (2011) Überlebenszeitanalyse. *Deutsches Ärzteblatt* 12:163–9

## 7 Publikation

---

Geplante Poster-Präsentation im Juni 2023 bei der 106.DGP-Jahrestagung in Leipzig, organisiert von Herrn Prof. Falko Fend und seinen Mitarbeiter\*innen des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Tübingen

Titel: „Prognostic relevance of Q787Q EGFR Polymorphism in adenocarcinomas of the lung“

## 8 Dank

---

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der vorliegenden Arbeit unterstützt und diese ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. M. Bohle, Leiter des Instituts für Allgemeine und Spezielle Pathologie am Universitätsklinikum des Saarlandes, für das Überlassen des Themas, die Bereitstellung der Mutationsanalysen und der histopathologischen Informationen sowie für die ständige freundliche Hilfe und die mannigfaltige fachliche Unterstützung.

Frau C. Stegmaier, der ehemaligen Leiterin des Krebsregisters des Saarlandes, und Herrn Dr. B. Holleccek, dem aktuellen Leiter des Krebsregisters des Saarlandes, sowie den anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Krebsregisters des Saarlandes danke ich für die Hilfe bei der Erhebung und Dokumentation der Patientenüberlebensdaten. Für die Hilfe bei der Erhebung und Dokumentation der klinisch-histopathologischen Standardparameter möchte ich mich auch bei Herrn Dr. M. Becker, dem ehemaligem Leiter des Saarländischen Tumorzentrum am UKS und Koordinator des Lungenkrebszentrum, sowie den weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Tumorzentrum am UKS und Herrn Dr. F. Flockerzi aus dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. E. Ebert aus dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie für die Unterstützung und die konstruktiven Ratschläge.

Gedankt sei auch Frau Dr. A. Seibold aus dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie für die Hilfestellungen beim Übersetzen der Zusammenfassung.

Gerne möchte ich mich auch bei Frau G. Wagenpfeil aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik (IMBEI) für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und bei Herrn J. Schmitt, dem Systemadministrator des IMBEI, für die Unterstützung bei der Anwendung der für die Statistik benötigten Software bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. M. Böhm, Direktor der Klinik für Innere Medizin III – Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin – und Herrn Prof. Dr. Dr. R. Bals, Direktor der Klinik für Innere Medizin V – Abteilung Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin – sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der genannten Kliniken für die konstruktive Zusammenarbeit und das Bereitstellen von klinischen Informationen.

Herzlich danke ich auch Susanne und Thomas Haffner, Frederik Runge, Rebecca Rogoll, Nicole Schmidt und Larissa Veith für das Korrekturlesen der Arbeit und die stete Unterstützung, ohne die das Fertigstellen dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

## 9 Anhang

### 94.1 TNM-Klassifikation und IASLC / UICC8 Stadieneinteilung

**Tabelle 26: TNM-Klassifikation der Lungenkarzinome, T-Stadium**

Kategorie	Stadium	Beschreibung
T (Tumor)	Tis	Carcinoma in situ
	T1	größter Durchmesser <3 cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus nicht beteiligt
	T1a(mi)	minimal invasives Adenokarzinom (solitäres Adenokarzinom mit überwiegend lepidischem Wachstumsmuster, <3 cm in der größten Ausdehnung mit einem invasiven Anteil <5 mm)
	T1a	größter Durchmesser ≤1 cm
	T1b	größter Durchmesser >1 und ≤2 cm
	T1c	größter Durchmesser >2 und ≤3 cm
	T2	größter Durchmesser >3 und ≤5 cm <u>oder</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>Infiltration des Hauptbronchus unabhängig vom Abstand von der Karina, aber ohne direkte Invasion der Karina <u>oder</u></li> <li>Infiltration der viszeralen Pleura <u>oder</u></li> <li>tumorbedingte partielle Atelektase oder obstruktive Pneumonie, die bis in den Hilus reichen und Teile der Lunge oder die gesamte Lunge umfassen</li> </ul>
	T2a	größter Durchmesser ≤4 cm
	T2b	größter Durchmesser >4 und ≤5 cm
	T3	<ul style="list-style-type: none"> <li>größter Durchmesser &gt;5 aber ≤7 cm <u>oder</u></li> <li>Infiltration von Thoraxwand (inklusive Sulcus superior), parietaler Pleura, N. phrenicus, parietales Perikard <u>oder</u></li> <li>separate(r) Tumorknoten im selben Lungenlappen wie der Primärtumor</li> </ul>
	T4	<ul style="list-style-type: none"> <li>größter Durchmesser &gt;7 cm <u>oder</u></li> <li>mit direkter Infiltration von Diaphragma, Mediastinum, Herz, großen Gefäßen (V. cava, Aorta, Pulmonalarterie, Pulmonalvene intraperikardial), Trachea, N. laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper, Karina <u>oder</u></li> <li>separate(r) Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen</li> </ul>

Quelle: In Anlehnung an Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2022, pp. 123-124

**Tabelle 27: TNM-Klassifikation der Lungenkarzinome, N- und M-Stadium**

Kategorie	Stadium	Beschreibung
N (regionäre Lymphknoten)	N0	keine Lymphknotenmetastasen
	N1	Metastase in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und/oder intrapulmonalen Lymphknoten (einschließlich direkter Invasion dieser Lymphknoten durch den Primärtumor)
	N2	Metastase in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
	N3	Metastase in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsi- oder kontralateral tief zervikalen, supraklavikulären Lymphknoten
M (Fernmetastasen)	M0	keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen
	M1a	separater Tumorknoten in einem kontralateralen Lungenlappen
		Pleura und/oder Perikard mit knotigem Befall
		maligner Pleuraerguss
		maligner Perikarderguss
M1b	isolierte Fernmetastase in einem extrathorakalen Organ	
M1c	mehrere Fernmetastasen (>1) in einem oder mehreren Organen	

Quelle: In Anlehnung an Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2022, pp. 125, 131

**Tabelle 28: Klassifikation der Tumorstadien des Lungenkarzinoms nach UICC (8. Auflage)**

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

Quelle: In Anlehnung an Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2022, p. 132

## 94.2 Ergebnisse der Mutationsanalyse

### 94.2.1 Mutationen im Gesamtkollektiv

**Tabelle 29: Mutationen im EGFR-Gen**

Veränderung auf Ebene der Basen	Exon	Status („häufig“, „selten“, synonym)	N
Q701*	18	„selten“	1
G719A	18	„selten“	2
A722A	18	synonym	1
L707S	18	„selten“	1
G724S	18	„selten“	1
Deletionsmutationen	19	„häufig“	28
L747P	19	„selten“	1
T790M	20	„selten“	4
Q787Q	20	synonym	314
S768I	20	„selten“	1
P794L	20	„selten“	1
F795L	20	„selten“	1
T790A	20	„selten“	2
L858R	21	„häufig“	12
K860E	21	„selten“	1
R836R	21	synonym	1
P848L	21	„selten“	2
Summe (inkl. synonyme Varianten)			374
Summe (exkl. synonyme Varianten)			58

**Tabelle 30: Mutationen im KRAS-Gen**

Veränderung auf Ebene der Basen	Exon	N
G12C	2	15
G12D	2	1
G12S	2	2
G13C	2	3
G12V	2	6
G12A	2	4
G12R	2	1
Summe		32

## 94.2.2 Mutationen im EGFR-Gen

## 94.2.2.1 „Häufige EGFR-Mutationen“

Tabelle 31: Fälle mit Deletion in Exon 19

Fall N=29	MT/WT-Ratio	Komutationen
3	0,56	
4	0,28	
5	2,02	T790M (Exon 20)
6	0,38	
7	0,55	
8	1,42	
9	0,89	
10	homozygot	
11	2,08	
12	0,91	
13	0,67	
14	0,17	
2	0,98	G12C (KRAS-Gen)
15	0,67	
16	1,14	
17	0,47	
18	0,92	
19	0,66	
20	1,00	
21	nicht bestimmbar	
22	0,56	R836R (Exon 21)
23	1,35	
24	1,16	T790M (Exon 20)
25	2,06	T790M (Exon 20)
26	1,33	T790M (Exon 20)
27	0,31	
28	1,47	
29	1,84	
30	1,6	

Tabelle 32: Fälle mit der Punktmutation L858R

Fall N=12	MT/WT-Ratio	Komutation
31	0,46	
32	0,13	
33	0,28	
34	2,87	Q701* (Exon 18)
35	0,30	
36	0,61	
37	homozygot	
38	0,23	
39	0,53	S768I (Exon 20)
40	1,60	
41	0,53	
42	2,6	

## 94.2.2.2. „Seltene Mutationen“

Tabelle 33: Fälle mit „seltene Mutationen“

Fall N=18	Mutation	Komutation
34	Q701* (Exon 18)	L858R (Exon 21)
43	G719A (Exon 18)	
44	G719A (Exon 18)	
45	A722A (Exon 18)	
46	L707S (Exon 18), L747P (Exon 19)	
1	G724S (Exon 18)	G12C (KRAS-Gen)
5	T790M (Exon 20)	Deletionsmutation (Exon 19)
24	T790M (Exon 20)	Deletionsmutation (Exon 19)
39	S768I (Exon 20)	L858R (Exon 21)
47	T794L, F795L (jeweils Exon 20)	
48	T790A (Exon 20)	
49	K860E (Exon 21)	
22	R836R (Exon 21)	Deletionsmutation (Exon 19)
50	P848L (Exon 21)	
51	P848L (Exon 21)	
25	T790M (Exon 20)	Deletionsmutation (Exon 19)
26	T790M (Exon 20)	Deletionsmutation (Exon 19)
52	T790A (Exon 20)	

## 94.2.2.3 Multiple Mutationen

Tabelle 34: Fälle mit multiplen Mutationen

Fall N=8	Mutation
34	Q701* (Exon 18), L858R (Exon 21)
5	T790M (Exon 20), Deletionsmutation (Exon 19)
39	S768I (Exon 20), L858R (Exon 21)
22	R836R (Exon 21), Deletionsmutation (Exon 19)
24	T790M (Exon 20), Deletionsmutation (Exon 19)
25	T790M (Exon 20), Deletionsmutation (Exon 19)
26	T790M (Exon 20), Deletionsmutation (Exon 19)
46	L707S (Exon 18), L747P (Exon 19)

## 94.2.3 Mutationen im KRAS-Gen

Tabelle 35: Fälle mit Mutation im KRAS-Gen

Fall N=31	Mutation	MT/WT-Ratio
53	G12C	2,57
54	G12C	0,31
55	G12D	nicht bestimmbar
56	G12S	0,11
57	G13C	5,63
58	G12V	3,86
59	G12A	nicht bestimmbar
60	G13C	nicht bestimmbar
61	G13C	0,59
62	G12S	0,08
63	G12C	nicht bestimmbar
64	G12C	nicht bestimmbar
65	G12C	1,11
66	G12C	0,37
67	G12R	nicht bestimmbar
68	G12V	0,88
69	G12C	1
70	G12C	0,69
71	G12C	0,95
72	G12C	0,66
73	G12C	nicht bestimmbar
74	G12A	nicht bestimmbar
75	G12C	0,13
76	G12C	0,48
77	G12V	0,66
78	G12V	1,5
79	G12C	1,17
80	G12D	1,17
81	G12C	1,00
82	G12D	0,2
83	G12V	0,22

### 94.3 Genderhinweis

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wurde in der vorliegenden Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Sofern nicht anders kenntlich gemacht, beziehen sich die verwendeten Personenbezeichnungen auf alle Geschlechter.

## 10 Lebenslauf

---

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der  
Dissertation nicht veröffentlicht.

**Tag der Promotion:** 05.12.2023

**Dekan:** Prof. Dr. M. D. Menger

**Berichterstatter:** Prof. Dr. R. M. Bohle  
Prof. Dr. Dr. R. Bals