

Universitätsmedizin Rostock
Aus dem Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. A. Erbersdobler

**Immunhistochemische und molekularbiologische Charakterisierung von
nichtkleinzelligen Lungentumoren unter besonderer Berücksichtigung
von Adenokarzinomen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Stephan Johannes Hammer

Rostock, im November 2016

Dekan: Prof. Dr. Emil Christian Reisinger, MBA

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Prall, Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. Marek Lommatzsch, Zentrum für Innere Medizin, Abteilung für Pneumologie, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. Gustavo Baretton, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Dresden

Einreichung: 8. November 2016

Verteidigung: 11. Oktober 2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Lungentumoren.....	8
1.2 Antigen-Antikörper-Reaktionen.....	10
1.2.1 Zytokeratine	10
1.2.2 Thyreoidaler Transkriptionsfaktor 1.....	10
1.2.3 P63.....	11
1.2.4 Napsin A	11
1.2.5 CD 56 und Chromogranin A.....	11
1.2.6 Estrogen- und Progesteronrezeptor, GATA-3	11
1.2.7 PTEN	12
1.2.8 EGFR und ALK	12
2 Zielstellungen	13
3 Material und Methoden	14
3.1 Archiv und Auswahlkriterien	14
3.2 Krebsregister	14
3.3 Zweitbegutachtung	14
3.4 Tissue Microarray	15
3.4.1 Das Prinzip des Tissue Microarrays	15
3.4.2 Durchführung	15
3.5 Simulation einer Biopsie am TMA.....	17
3.6 Immunhistochemie	17
3.6.1 Das Prinzip der Immunhistochemie	17
3.6.2 Die Antikörper	17
3.6.3 Durchführung	18
3.6.4 Auswertung der Immunhistochemie	18
3.7 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	19
3.7.1 Allgemeines zur Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	19
3.7.2 Herstellung der FISH-Präparate	20
3.7.3 Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	21

3.8 Bildverarbeitung.....	22
4 Ergebnisse	23
4.1 Untersuchungsgut und histopathologische Typisierung.....	23
4.2 Klinisch-pathologische Daten und Überlebensanalyse	23
4.3 Charakteristika der TMA-Studienfälle	25
4.4 Zweitbegutachtung	26
4.5 Untersuchungen am TMA	27
4.5.1 Qualität des TMA.....	27
4.5.2 Simulation einer Biopsie am TMA	28
4.5.3 Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen.....	30
4.5.3.1 Zytokeratine, TTF-1, p63, Napsin A, neuroendokrine Marker.....	32
4.5.3.2 Vergleich ausgewählter Antikörper mit den Ergebnissen aus der Routinediagnostik	32
4.5.3.3 Estrogen- und Progesteronrezeptor, GATA-3, PTEN	33
4.5.4 Ergebnisse der Untersuchungen zu EGFR und ALK	33
4.5.4.1 EGFR	34
4.5.4.2 ALK.....	34
4.6 Zusammenhangsanalysen	35
5 Diskussion	37
5.1 Zweitbegutachtung und Simulation einer Biopsie	37
5.1.1 Zweitbegutachtung und das bronchioloalveoläre Wachstumsmuster	37
5.1.2 Simulation einer Biopsie.....	38
5.2 Methodenkritik	39
5.3 Einzelne Marker im Vergleich	39
5.3.1 Zytokeratine, TTF-1, p63, Napsin A, neuroendokrine Marker	40
5.3.1.1 Zytokeratin 5/6 im Wesentlichen negativ	40
5.3.1.2 Zytokeratin 7 deutlich präsent in Adenokarzinomen.....	40
5.3.1.3 Nachweis von Ck hmw grenzt neuroendokrine Tumoren ab.....	41
5.3.1.4 Ck 20 im Wesentlichen negativ	41
5.3.1.5 Kein eindeutiges Profil bei TTF-1.....	42
5.3.1.6 Nachweis von p63 auch in Adenokarzinomen	42
5.3.1.7 Napsin A deutlich spezifischer für Adenokarzinome.....	42
5.3.1.8 CD 56 und Chromogranin A belegen eine neuroendokrine Differenzierung	43
5.3.2 PTEN-Expression am höchsten in großzelligen Karzinomen	43
5.3.3 Steroidrezeptoren in Lungentumoren	44
5.3.4 Zusammenhänge zwischen immunhistochemischen Profilen und Diagnosen	45

5.3.5 Die „Großzeller-Frage“	48
5.4 Molekulare Zielstrukturen.....	49
5.4.1 EGFR	49
5.4.2 ALK.....	51
5.5 Überleben.....	52
6 Zusammenfassung	54
7 Thesen.....	56
Literaturverzeichnis	58
Selbständigkeitserklärung.....	70
Danksagung.....	71
Lebenslauf und Publikation.....	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: <i>Manual Tissue Arrayer</i>	15
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Probenrasters zur eindeutigen Orientierung und Zuordnung der Einzelproben	16
Abbildung 3.3: TMA-Blöcke mit nach Schema eingebrachten Gewebezyllindern	16
Abbildung 3.4: Bild eines HE-Schnittes von einem TMA-Block	17
Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Hybridisierungsorte	20
Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Analyse der EGFR-FISH	21
Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Analyse der ALK-FISH	22
Abbildung 4.1: Häufigkeiten der Tumordiagnosen im Untersuchungszeitraum pro Jahr	23
Abbildung 4.2: Gesamtüberleben nach onkologischer Operation (nach Kaplan-Meier)	24
Abbildung 4.3: Gesamtüberleben (nach Kaplan-Meier) nach onkologischer Operation in Abhängigkeit vom Tumorstadium nach UICC-Klassifikation	25
Abbildung 4.4: Verteilung der TMA-Tumorfälle (ADC und LCLC) nach zum Zeitpunkt der Diagnose gültiger UICC-Klassifikation	26
Abbildung 4.5: Ausgewählte HE-Schnitte	29
Abbildung 4.6: Exemplarische immunhistochemische Färbungen von Zytoplasma, Kern und Membran	30
Abbildung 4.7: Gesamtübersicht über die Ergebnisse der Biopsiesimulation und der IHC, ohne EML4-ALK	31
Abbildung 4.8: FISH-Reaktionen	33
Abbildung 4.9: Flussdiagramm ausgewählter Antikörperreaktionen in Abhängigkeit vom histopathologischen Typ	36

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Übersicht der verwendeten Antikörper	18
Tabelle 3.2: Auswertungskriterien für immunhistologische Untersuchungen aus dem TMA	18
Tabelle 3.3: Cut-Offs für die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen	19
Tabelle 3.4: Übersicht FISH-Sonden	21
Tabelle 4.1: Verteilung der Originaldiagnosen aller Tumorpatienten aus dem Untersuchungszeitraum	23
Tabelle 4.2: Geschlechtsverteilung aller Tumorpatienten	23
Tabelle 4.3: Operationsalter aller Tumorpatienten	24
Tabelle 4.4: Histologische Typen der im TMA untersuchten Lungenkarzinome	25
Tabelle 4.5: Reklassifizierte Karzinome nach lichtmikroskopischer Zweitbegutachtung	26
Tabelle 4.6: Diagnosenverteilung vor und nach Revision	27
Tabelle 4.7: Fälle mit revidierten Diagnosen	27
Tabelle 4.8: Ausfallquoten bezogen auf 375 tumortragende Einzelproben	28
Tabelle 4.9: Übersicht der prozentualen Verteilung der IHC-Ergebnisse	32
Tabelle 4.10: Übersicht zum Vergleich TMA und Ganzschnitt	32
Tabelle 4.11: Übersicht TMA-Ergebnisse EGFR-FISH und Vergleich mit den Ergebnissen aus der IHC	34
Tabelle 4.12: Gesamtübersicht der ALK-Untersuchungen	35

Abkürzungsverzeichnis

- ADC – Adenokarzinom
- ADSQC – adenosquamöses Karzinom
- ALK – anaplastische Lymphomkinase
- ATS – *American Thoracic Society*
- BAC – bronchioloalveoläres Karzinom
- BCR – *Breakpoint Cluster Regions*
- CD – *Cluster of Differentiation*
- Ck – Zytokeratin
- Ck hmw – Ck *high molekular weight*
- DAPI – 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
- DNA – Desoxyribonukleinsäure
- ebd. – ebenda
- EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure
- EGFR – epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
- EML4 – *Echinoderm microtubule-associated protein-like 4*
- ER – Estrogenrezeptor
- ERBB – ERBB-Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie
- ERS – *European Respiratory Society*
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FISH – Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
- G – Grading/Grad der Differenzierung
- GATA-3 – GATA bindendes Protein 3
- HE – Hämatoxylin-Eosin
- HER2 – *Human epidermal growth factor receptor 2*
- HGNEC – *high-grade neuroendocrine carcinomas*
- IASLC – *International Association for the Study of Lung Cancer*
- IHC – Immunhistochemie
- k. D. – keine Daten
- KRAS – *Kirsten Rat Sarcoma*
- LCLC – großzelliges Karzinom
- LCNEC – großzellig neuroendokrines Karzinom
- MM – monoklonaler Mausantikörper
- Napsin A – *Novel aspartic proteinases of the pepsin family*

NCAM – *Neural Cell Adhesion Molecule*

NET – neuroendokriner Tumor

NKX2-1 – *NK2 Homeobox 1*

NK-Zellen – Natürliche Killerzellen

NOS – *not otherwise specified*/nicht näher bezeichnet

NSCLC – nichtkleinzelliges Lungenkarzinom

NSCC – nichtkleinzelliges Karzinom

OP – Operation

p40 – Tumor Protein p40

p63 – Tumor Protein p63

PAS – *Periodic Acid* Schiff Reaktion

PEC – Plattenepithelkarzinom

PI3K – Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weg

PIK3CA – *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha*

pCa – pleomorphes Karzinom

PR – Progesteronrezeptor

PTEN – Phosphatase und Tensin Homolog

RT-PCR – Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

SCLC – kleinzelliges Karzinom

SD – Standardabweichung

TKI – Tyrosinkinase-Inhibitoren

TMA – *Tissue Microarray*

TNM – Klassifikation zur Tumorausbreitung: Ausbreitung des Primärtumors (T), regionäre Lymphknotenmetastasierung (N), Fernmetastasen (M)

TP53 – Tumor Protein p53

Tris – Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TTF-1 – thyreoidaler Transkriptionsfaktor 1

UICC – Internationale Vereinigung gegen Krebs

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*

WHO – Weltgesundheitsorganisation

wt-EGFR – EGFR-Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Lungentumoren

Die Weltgesundheitsorganisation WHO listet Lungenkrebs als die weltweit häufigste Form der malignen Neoplasien. Für das Jahr 2012 wurden etwa 1,8 Millionen Fälle geschätzt, was einem Anteil von 13 % an allen Krebserkrankungen entspricht. Auch in der Rangfolge für Todesursachen durch Krebs führen Lungentumoren mit 1,6 Millionen Toten, dies entspricht 19,4 % [140].

Für Deutschland ermittelte das Statistische Bundesamt für 2012 Krebserkrankungen nach den Herzkreislauferkrankungen als die zweithäufigste Todesursache. Für das männliche Geschlecht wurden Lungentumoren nach gastrointestinalen als am bedeutsamsten aufgeführt; beim weiblichen Geschlecht wurden Lungentumoren an dritter Stelle nach den Neubildungen an Brustdrüse und Verdauungsorganen identifiziert [116].

Die Diagnostik und Therapie von Lungenkrebs nimmt demnach eine wesentliche Rolle in der medizinischen Arbeit ein. Neben den epithelialen Tumoren, die sich unmittelbar aus Zellen des Lungengewebes entwickeln und sich vornehmlich den Adenokarzinomen (> 45 %, Tendenz zunehmend), Plattenepithelkarzinomen (< 40 %, Tendenz deutlich abnehmend) und großzelligen Karzinomen (ca. 10 %) mit ihren jeweiligen histomorphologischen Subtypen zuordnen lassen [5, 76], finden sich Tumoren, die dem neuroendokrinen System (die ehemals als Karzinoide bezeichneten neuroendokrinen Tumoren [33], großzellige neuroendokrine Karzinome, kleinzellige Karzinome) sowie der Pleura oder dem Stroma entstammen oder sich als Metastasen eines pulmonalen oder eines nichtpulmonalen Malignoms präsentieren. Etwa 5 % der Lungentumoren sind benigne (Hamartome, Adenome) [5]. Je nach Tumorentität und Tumorstadium kommen kurative oder palliative Therapiekonzepte zum Einsatz, die sich aus Operation, Strahlen- und Chemotherapie zusammensetzen. Diese Therapieschemata sind vor allem in der letzten Zeit intensiv diskutiert worden.

Die Weiterentwicklungen der vergangenen Jahre in Diagnostik und Therapie haben zu einem Paradigmenwechsel im Umgang mit Lungentumoren geführt [110]. Während in der Vergangenheit in der Praxis die Unterscheidung zwischen kleinzelligen (SCLC) und nichtkleinzelligen Karzinomen (NSCLC) der Lunge üblich und eine möglichst genaue Differenzierung noch Mitte der 1990er Jahre ohne therapeutische Relevanz war [11], erschien es aufgrund erweiterter diagnostischer und v. a. therapeutischer Möglichkeiten notwendig, diese recht undifferenzierte Betrachtung zu erweitern [39, 88, 129]. Besonders auf dem Gebiet der NSCLC hat sich gezeigt, dass eine möglichst genaue Differenzierung auf der Grundlage von Lichtmikroskopie, Immunhistochemie (IHC) und Molekularbiologie für eine individualisierte Therapie unerlässlich ist [88], was sich in der entsprechenden WHO-Klassifikation von 2015 wiederfindet [126]. Es unterscheiden sich nicht nur die Behandlungsstrategien bei Plattenepithel-(PEC) und Adenokarzinomen (ADC) [129]. Auch innerhalb der ADC, die unter den Lungentumoren die inter- und intraindividuell heterogenste Form darstellen, ergeben sich möglicherweise Konsequenzen für die Therapie [50], ähnlich auch [105], da sich aufgrund verschiedener morphologischer Strukturen möglicherweise unterschiedliche Prognosen ergeben [128].

Vor allem die Erkenntnisse in der Tumorgenetik und im Bereich der Signaltransduktion haben eine individualisierte Tumorthherapie näher rücken lassen. Die Identifizierung bestimmter Onkogene

fürte zur Entwicklung von Medikamenten, die gezielt in die Signalwege von Tumorzellen eingreifen können. Dabei handelt es sich um Rezeptorblockaden oder Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), die die Transkriptionsprodukte von mutierten Genloci angreifen. Für die Lungentumoren wurden verschiedene Onkogene als die Onkogenese startend und aufrechterhaltend beschrieben und in dieser Funktion als „Driver-Mutationen“ charakterisiert [5]. Für ADC der Lunge werden EGFR, KRAS, ALK, HER2, PIK3CA genannt, daneben eine Reihe inaktiver Tumorsuppressorgene beschrieben, von denen TP53 als Beispiel genannt werden soll (ebd.). Während Zigarettenrauchen als sicherer und wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung von NSCLC gilt [5, 30], werden bei etwa der Hälfte der Nichtraucher, die an NSCLC erkranken, onkogene Veränderungen vermutet. Dabei reicht eine einzelne Veränderung der genannten „Driver-Mutationen“ aus, welche zudem exklusiv vorkommen, d. h. diese Mutationen schließen sich normalerweise aus [4, 5, 28].

Eine onkogene EGFR-Mutation, die sich je nach Quelle in 10-50 % der NSCLC findet, ist mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet [106], während sich durch den Einsatz von entsprechenden TKI das Überleben bzw. das rezidivfreie Überleben verbessern [17, 38, 132]. Auch für EML4-ALK-Translokationen wurden hohe Ansprechraten und ein verlängertes progressionsfreies Überleben beschrieben [15, 91]. Jedoch findet sich diese Mutation in deutlich weniger als 10 % der NSCLC [2], was zudem prinzipiell gesundheitsökonomische Fragestellungen aufwirft. In der Literatur wird darüber hinaus auch deutlich, dass hinsichtlich der Detektionsmethoden insbesondere für EGFR keine Einigkeit besteht und somit die Therapieresultate jeweils in Abhängigkeit vom eingesetzten diagnostischen Verfahren bewertet werden.

In die Diskussion um die möglichst differenzierte Betrachtung der Tumoren ist die Diagnose der großzelligen Karzinome (LCLC) eingeschlossen. Als LCLC wurden bislang die NSCLC beschrieben, die aufgrund ihrer Morphologie nicht den ADC oder PEC zugeordnet werden konnten. Im Zuge der weitergehenden molekularbiologischen Charakterisierung mit entsprechenden möglichen Therapiekonsequenzen stellt sich jedoch die Frage, ob die Kategorie der LCLC eine eigene Tumorentität ist oder ob es sich um die entdifferenzierte Form eines ADC oder PEC handelt [94]. Einer Neubewertung wurde zudem das bronchioloalveoläre Karzinom (BAC) unterzogen, dessen Tumorzellen entlang der Alveolarwände wachsen. Diese nicht eindeutige Beschreibung wurde zuletzt im Konsens präzisiert, um zwischen einem Wachstumsmuster und einer in-situ-Situation unterscheiden zu können [127].

Die Diagnose eines Lungentumors erfolgt in der überwiegenden Zahl in einem bereits fortgeschrittenen Stadium [128]. Die sich derzeit in Überarbeitung befindliche S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des Lungenkarzinoms sieht unter Berücksichtigung der Gesamtsituation des Patienten in den Stadien I und II (nach UICC) eine radikale operative Therapie vor. Tumoren, die im TNM-System als T3N1M0 diagnostiziert werden und somit zur Kategorie IIIA gehören, werden wie die Stadien I und II ebenfalls als potentiell kurativ betrachtet. Für die Kategorie IIIA werden mittlerweile sehr differenziert Untergruppen (IIIA₁ bis IIIA₄) gebildet, für die das weitere Verfahren in der Therapie abgestimmt werden sollte. Zudem werden in der Leitlinie unter bestimmten Voraussetzungen im Stadium IIIB primäre Operationen vorgeschlagen [30]. Aufgrund der häufig jedoch bereits fortgeschrittenen Erkrankung ist oftmals kein Operationspräparat zur vollständigen Aufarbeitung zu erwarten, so dass die Bedeutung der Biopsie umso wichtiger wird [36, 132]. An diesem wenigen verfügbaren Material sollten daher die Diagnose sowie alle

weiteren notwendigen Zusatzuntersuchungen durchgeführt werden können. Dabei stellt jedoch vor allem die beschriebene Tumorerogenität eine besondere Herausforderung dar.

Die zentrale methodische Komponente in der vorliegenden Arbeit bildete die Tissue Microarray-Technik (TMA), die nicht nur eine Vielzahl von parallelen Gewebeuntersuchungen zulässt, sondern darüber hinaus auch die Begrenztheit des Untersuchungsmaterials einer Biopsie simulieren kann.

In der folgenden Arbeit wurden alle operierten primären Lungentumoren aus einem Zeitraum von 10 Jahren aus den Beständen des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock erneut gesichtet. Das Hauptaugenmerk lag auf ADC und LCLC, PEC wurden nicht untersucht. Neben einer erneuten Begutachtung der Schnittpräparate erfolgte die Simulation einer Biopsie mittels TMA. Zur immunhistochemischen Charakterisierung der ausgewählten Tumoren wurde ebenfalls der TMA genutzt. Die einzelnen Antikörper werden im nächsten Abschnitt aufgeführt. Die Untersuchung auf onkogene Veränderungen erfolgte in Kombination von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und IHC.

1.2 Antigen-Antikörper-Reaktionen

Die Weiterentwicklung in der Diagnostik von Lungentumoren erfordert neben der konventionellen Lichtmikroskopie weitere Methoden. Die Immunhistochemie ist dabei die Methode der Wahl [88]. Für die einzelnen histopathologischen Typen listet die WHO verschiedene Antigene auf, die dabei zum Einsatz kommen können [130]. Darauf bezieht sich auch die S3-Leitlinie zum Lungenkarzinom und nennt verschiedene Zielstrukturen, die in der weiterführenden Diagnostik sinnvoll erscheinen [30]. Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antigen-Antikörper-Reaktionen kurz vorgestellt.

1.2.1 Zytokeratine

Zytokeratine (Ck) gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente, die als Teil des Zytoskeletts die Zelle passiv stabilisieren. Abhängig vom zu Grunde liegenden Gewebe finden sich verschiedene Typen, wobei Zytokeratine in epithelialen Geweben nachgewiesen werden und einen großen Variantenreichtum zeigen [59]. Die vorhandene oder fehlende Expression bestimmter Zytokeratine in Tumoren gilt mitunter als wegweisend für die Diagnose. Ck 5/6 gilt als Marker für PEC [52, 88, 130] und unterstützt die Abgrenzung zu ADC, was besonders für die weitere differenzierte Diagnose der LCLC von Interesse ist. Der positive Nachweis von Ck 7 spricht für ein pulmonales ADC, während bei diesem Typ für Ck 20 ein negatives Ergebnis erwartet wird [100]. Gleich mehrere Zytokeratine werden mit dem Einsatz von Antikörpern gegen Ck hmw (*high molekular weight*) getestet. Der entsprechende Antikörper-Klon 34 β E12 reagiert auf die Zytokeratine 1, 5, 10 und 14 (vgl. u. a. die Produktinformation des Herstellers, auch [118]).

1.2.2 Thyreoidaler Transkriptionsfaktor 1

Der thyreoidale Transkriptionsfaktor 1 (TTF-1) – auch als NKX2-1 bekannt – wurde als Regulator der Transkription von Thyreoglobulin sowie mitwirkend bei der Gewebeentwicklung von Schilddrüse, Lunge und Zwischenhirn entdeckt und später als „Immunmarker“ für ADC der Lunge und für Schilddrüsenkarzinome identifiziert [57, 72]. Primäre pulmonale Tumoren, insbesondere ADC präsentieren sich überwiegend positiv, Metastasen nichtpulmonalen Ursprungs überwiegend negativ [30, 46, 130].

1.2.3 P63

Das Protein p63 ist Teil der „p53-Familie“ und somit als Transkriptionsfaktor charakterisiert [86]. Eine der Aufgaben dieser Gene und ihrer korrespondierenden Produkte ist die Einleitung der Apoptose und im Fall von p63 die Beteiligung bei der Differenzierung von Zellen und Geweben [7, 86]. In der Diagnostik gilt p63 als ein Marker für den Nachweis von PEC [22], findet sich jedoch auch in unterschiedlicher Ausprägung in ADC der Lunge wieder [87].

1.2.4 Napsin A

Napsin A ist das Akronym für *novel aspartic proteinases of the pepsin family*, einer Asparagin-Protease, die in Lunge und Niere gefunden wurde [120]. In der Lunge konnte diese Struktur in Pneumozyten Typ II und in ADC nachgewiesen werden [21]. Für den Nachweis dieses Karzinoms sowie für die Unterscheidung zwischen primärem Lungentumor und Metastase eines nichtpulmonalen ADC kommt Napsin A zur Anwendung [131].

1.2.5 CD 56 und Chromogranin A

Das Oberflächenmolekül CD 56 (NCAM – *Neural Cell Adhesion Molecule*) dient Zell-Zellkontakten und findet sich auf Zellen des Immunsystems (NK-Zellen), in neuronalen und neuroendokrinen Geweben und in neuroendokrinen Tumoren (NET) [96, 102]. Für die Diagnostik dieser Tumoren sowie für die weitere Differenzierung von LCLC findet CD 56 u. a. als positiver neuroendokriner Marker Verwendung [96, 130].

Chromogranin A findet sich regelhaft in chromaffinen Zellen des neuroendokrinen Systems und wird dort zusammen mit Adrenalin und Noradrenalin ausgeschüttet [125]. Möglicherweise spielt Chromogranin A eine Rolle u. a. bei verschiedenen Entzündungen, bei kardiovaskulären Erkrankungen und im Bereich der Angiogenese [34]. Zudem wird dieses Protein vor allem bei NET verstärkt exprimiert und kann als Tumormarker im Serum bestimmt werden.

1.2.6 Estrogen- und Progesteronrezeptor, GATA-3

Die Funktion der Estrogen- (ER) und Progesteronrezeptoren (PR) außerhalb der Reproduktion ist Gegenstand der Diskussion. In ihrer Übersicht zum Stand der Dinge zeigten Verma, Miki & Sasano, dass die Steroidrezeptoren Einfluss auf die Entwicklung und den Verlauf u. a. von Lungentumoren, aber auch anderen pulmonalen Erkrankungen haben könnten. Für die Expression von Progesteronrezeptoren wurde zudem auf die sehr unterschiedliche Studienlage hingewiesen, wonach sich diese in den jeweils untersuchten Lungentumoren entweder überhaupt nicht oder in bis zu zwei Dritteln nachweisen ließen [133].

Das GATA bindende Protein 3 (GATA-3) ist ein Transkriptionsfaktor, für den verschiedene Funktionen und Orte des Vorkommens beschrieben wurden [19]. Neben einer Rolle bei der Entwicklung von T-Lymphozyten und einer normalen Entwicklung des Brustgewebes ergibt sich aus tumorpathologischer Sicht u. a. eine Bedeutung bei der Diagnostik von Mamma- und Urothelkarzinomen [18, 19].

Neben einer grundsätzlichen Erhebung eines Steroidrezeptorstatus im Untersuchungsmaterial sollte mit dem Einsatz von GATA-3 eine pulmonale Metastasierung von Mamma- und Urothelkarzinomen immunhistochemisch ausgeschlossen werden.

1.2.7 PTEN

PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) ist ein Enzym, das die Signaltransduktion des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Wegs (PI3K) antagonisiert [143]. PTEN-Genmutationen wurden bei Glioblastomen sowie bei Prostata-, Endometrium- und Magenkarzinomen nachgewiesen. Für NSCLC wurde hingegen v. a. der teilweise oder vollständige Verlust der Genexpression beschrieben [64].

1.2.8 EGFR und ALK

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die ähnlich wie andere Elemente der zellulären Signaltransduktion in Folge einer Fehlsteuerung Anteil an der Onkogenese haben können [143]. Dabei handelt es sich häufig um Deletionen von Exon 19 und Punktmutationen in Exon 21, die zu einer Wirkungsverstärkung führen [109]. Durch entsprechende medikamentöse Blockade können Therapievorteile erreicht werden. Die Methoden zur Identifikation entsprechender Patienten werden nach wie vor kontrovers diskutiert. Neben der Mutationsanalyse kommen dabei Verfahren zur Proteindetektion mittels IHC und Amplifikationsanalysen mittels FISH zum Einsatz.

Die anaplastische Lymphomkinase (ALK) ist ebenfalls eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die zur Übergruppe der Insulinrezeptoren gezählt wird und eine Rolle für die Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystem zu spielen scheint [84]. Im Rahmen von chromosomalen Veränderungen wurde die onkogene Wirkung von ALK zuerst im anaplastischen großzelligen Lymphom nachgewiesen, später aber auch u. a. in NSCLC [16, 28, 113]. Diese strukturellen Aberrationen konnten als Grundlage für eine therapeutische Intervention identifiziert werden [55]. Eine der häufigsten Veränderungen ist die Fusion von ALK mit EML-4 (*Echinoderm microtubule-associated protein like 4*) [83, 108]. Neben EML-4 wurden noch weitere, jedoch in geringerer Häufigkeit auftretende Fusionspartner beschrieben [62, 84]. Der Nachweis von ALK-Veränderungen erfolgt durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, zusätzlich befinden sich immunhistochemische Nachweisverfahren in der Erprobung, so z. B. [23, 62, 108].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Tumoren mittels FISH auf EGFR-Amplifikationen sowie auf ALK-Translokationen und mittels IHC auf Proteinüberexpression von EGFR und EML4-ALK untersucht.

2 Zielstellungen

Mit dieser Arbeit wurde auf folgende Fragen eingegangen:

1. Aus welchen histologischen Typen setzen sich die operierten Lungenkarzinome aus einem Zeitraum von zehn Jahren zusammen?
2. In welchem Maße kommt es im Rahmen einer Zweitbegutachtung zu Änderungen der ursprünglichen Diagnosen?
3. Wie sicher können auf der Grundlage von Biopsien Diagnosen getroffen werden?
4. Welches immunhistochemisches Profil präsentiert sich im Untersuchungsgut? Welchen Einfluss nehmen diese Ergebnisse auf die Diagnostik und Beurteilung von
 - Adenokarzinomen (ADC),
 - großzelligen Karzinomen (LCLC),
 - großzellig neuroendokrinen Karzinomen (LCNEC),
 - neuroendokrinen Tumoren (NET),
 - adenosquamösen Karzinomen (ADSQC)?
5. Wie präsentieren sich EGFR und ALK mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Untersuchungsgut?
6. Wie gestaltet sich das Gesamtüberleben nach onkologischer Operation?

3 Material und Methoden

3.1 Archiv und Auswahlkriterien

Aus der Datenbank des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock wurden alle Fälle von operierten primären Tumoren der Lunge aus dem Zeitraum 2000 bis einschließlich 2009 herausgesucht. Nach der Anwendung der folgenden Ausschlusskriterien

- Plattenepithelkarzinome (PEC)
- mikrofokale Herde (einzelne Tumorzellen)
- neoadjuvant behandelte Karzinome

ergab sich gemäß den Erstdiagnosen ein Untersuchungsgut, das sich aus den folgenden Varianten des NSCLC zusammensetzte:

- Adenokarzinome (ADC)
- adenosquamöse Karzinome (ADSQC)
- großzellige/pleomorphe Karzinome (LCLC/pICa)
- neuroendokrine Tumoren (NET)
- großzellig neuroendokrine Karzinome (LCNEC).

Für alle zu untersuchenden Fälle wurden aus dem Archiv des Instituts für Pathologie alle verfügbaren Schnittpräparate für die folgende mikroskopische Zweitbegutachtung herausgesucht.

3.2 Krebsregister

Die ermittelten Fälle bildeten die Grundlage für die Anfrage beim Gemeinsamen Krebsregister der Länder Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und der Freistaaten Sachsen und Thüringen (GKR, Berlin) zum Gesamtüberleben nach onkologischer Operation. Als Berechnungsgrundlage zur Überlebenszeit wurde der Mai 2013 gewählt, die Zeiten wurden in postoperativen Monaten gezählt. Postoperative Mortalität innerhalb von 30 Tagen [47] und metachrome Tumoren führten zum Ausschluss. Die Auswertung der Überlebenszeiten nach Kaplan-Meier erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 13.0.

3.3 Zweitbegutachtung

Nach Einweisung und Einarbeitung durch Prof. Dr. Friedrich Prall, Oberarzt am Institut für Pathologie, wurden alle Fälle einer Zweitbegutachtung (*Slide review*) an einem JENAVAL-Durchlichtmikroskop (CARL ZEISS JENA, Jena) hinsichtlich Diagnose, Morphologie und Grading (Grad der Zelldifferenzierung) unterzogen. Das Grading umfasste die Beurteilung der Zellkerne auf Kernatypien [8]. Die Begutachtung der Morphologie der Adenokarzinome orientierte sich an den Kriterien der WHO-Klassifikation von 2004 [130]:

- azinär
- papillär
- mikropapillär
- bronchioloalveolär
- solid-kribriiform
- solide
- undifferenziert
- muzinös/nichtmuzinös.

Darüber hinaus erfolgte eine Bestandsaufnahme der durchgeführten Färbungen und Spezialuntersuchungen. Mit dem *Slide Review* wurden die für die weiteren Untersuchungen in Frage kommenden Präparate identifiziert, so dass für jeden Tumor ein repräsentatives HE-Schnittpräparat mit korrespondierendem Paraffinblock (sofern verfügbar) aus dem Archiv des Instituts für Pathologie vorlag.

Abweichungen von der ursprünglichen Diagnose sowie Grenzfälle wurden im Rahmen wiederholter Konsensussitzungen am Diskussionsmikroskop überprüft und diskutiert.

3.4 Tissue Microarray

Die im Rahmen der Zweitbegutachtung zur weiteren Untersuchung ausgesuchten repräsentativen HE-Schnitte und korrespondierenden Paraffinblöcke wurden im nächsten Schritt mittels der Tissue Microarray-Technik für die weiteren Untersuchungen vorbereitet.

3.4.1 Das Prinzip des Tissue Microarrays

Die Tissue Microarray-Technik (TMA) wurde entwickelt, um eine Vielzahl von Gewebeproben gleichzeitig untersuchen zu können [45]. Aus einem Paraffinblock, in dem das zu untersuchende Gewebe eingebettet ist, wird mittels einer kleinen Hohlneedle ein Gewebezylinder herausgestanzt und in einen weiteren, leeren Paraffinblock übertragen. Die Durchmesser dieser Gewebezylinder betragen abhängig von der gewählten Hohlneedle 0,6 mm bis 2 mm. Durch die Wiederholung dieses Vorgangs können bis zu 1.000 Gewebeproben auf einen sogenannten Empfängerparaffinblock übertragen werden. Von diesem Block können wiederum bis zu 300 Schnitte angefertigt und für verschiedene Untersuchungen verwendet werden (ebd.).

3.4.2 Durchführung

Für die Anfertigung der TMA-Blöcke wurde ein Stanzgerät der Firma BEECHER INSTRUMENTS, INC (Wisconsin, USA), der *Manual Tissue Arrayer MTA-1*, genutzt.

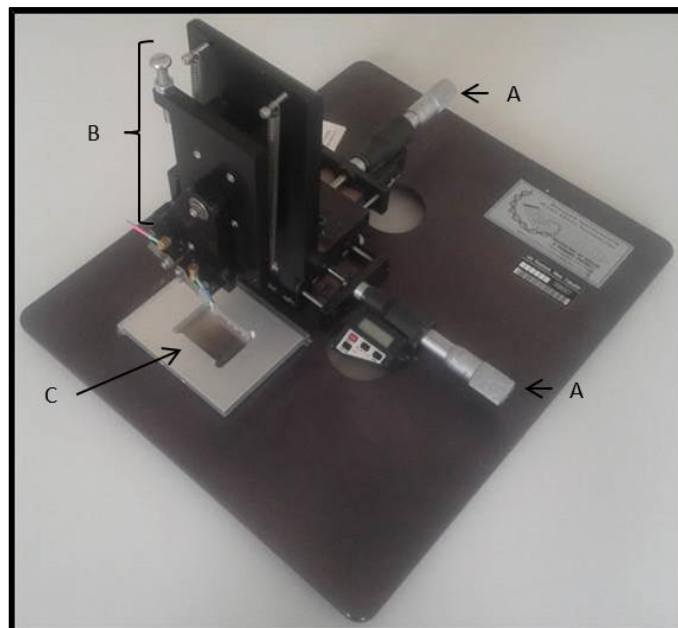


Abbildung 3.1: *Manual Tissue Arrayer* (Beecher Instruments, Inc). A: Mikrometerschrauben zur exakten Positionierung. B: Spiralfedergelagerter Stanzmechanismus mit farblich gekennzeichneten Stanznadeln. C: Aufnahmeplatte für den Empfängerblock, exakt positionierbar.

Dieses Gerät erlaubt eine exakte Positionierung der Gewebezylinder im Empfängerblock. In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Hohlzylinder mit einem Durchmesser von 1 mm gewählt.

Mit Hilfe der selektierten HE-Schnitte wurden auf dem korrespondierenden Tumorparaffinblock die für den Tumor repräsentativen Ausschnitte mit einem Filzstift markiert. Aus diesem Areal wurden mit dem *Tissue Arrayer* Gewebezylinder herausgestanzt. Der Durchmesser betrug einheitlich 1 mm, die Länge variierte abhängig vom Zustand des Tumorparaffinblocks zwischen 2 und 5 mm. Dieses Material wurde bündig zur Oberfläche in den Empfängerparaffinblock in ebenfalls mit dem *Tissue Arrayer* vorgestanzte Löcher mit einem Durchmesser von 1 mm umgesetzt, aus jedem Tumor wurden 3 bis 4 Stenzen entnommen. Zur genauen Zuordnung der Fälle wurde ein eindeutiges Muster auf dem Empfängerblock gewählt (siehe Abbildungen 3.2 und 3.3). Es entstanden fünf Empfängerparaffinblöcke (TMA-Blöcke) mit insgesamt 133 Fällen.

	1	2	3		4	5	6	7	8	9	10	11	12
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Probenrasters zur eindeutigen Orientierung und Zuordnung der Einzelproben.

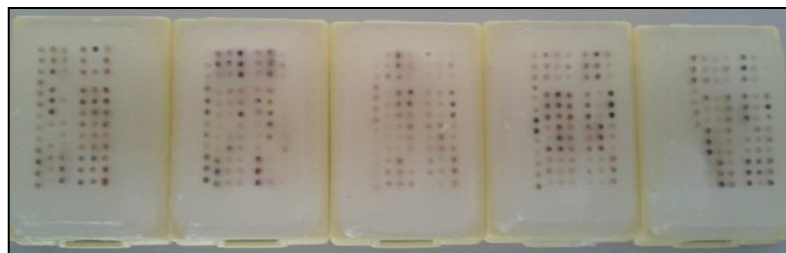


Abbildung 3.3: TMA-Blöcke mit nach Schema eingebrachten Gewebezylindern.

Zur Vorbereitung für den Zuschnitt am Mikrotom wurden die TMA-Blöcke für 20 Minuten bei 50°C im Hybridisierungsinubator (GFL 7601, Burgwedel) erwärmt, um eine Verbindung zwischen dem Paraffin des Empfängerblockes und den Gewebezylindern zu erreichen. Nach dem vollständigen Abkühlen auf Zimmertemperatur konnten im histopathologischen Labor des Instituts mit einem Mikrotom (LEICA MICROSYSTEMS, Wetzlar, Deutschland) nach standardisiertem Protokoll (u. a. Abkühlen auf -14°C) Zuschnitte für die weiteren Untersuchungen erstellt werden. Alle Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger (DAKO, Glostrup, Dänemark) aufgebracht:

- 2 µm-Schnitt zur Färbung mit HE
- Leerschnitte (2 µm) für immunhistologische Untersuchungen
- Leerschnitte (5 µm) für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen.

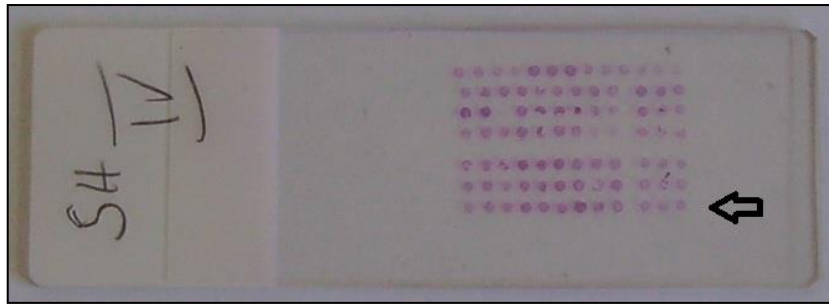


Abbildung 3.4: Bild eines HE-Schnittes von einem TMA-Block. Der eingefügte Pfeil zeigt den Beginn des Auswertungsschemas (Position 1.1, siehe Abbildung 3.2).

Die Herstellung der HE-Färbung erfolgte ebenfalls im histopathologischen Labor nach einem für die Färbung standardisierten Protokoll.

Alle Einzelproben auf den HE-TMA-Schnitten wurden hinsichtlich Treffgenauigkeit mit *Tumor vorhanden/Tumor nicht vorhanden* bewertet. Für die nachfolgenden immunhistologischen Untersuchungen wurde eine Ausfallquote erhoben.

3.5 Simulation einer Biopsie am TMA

Die mit HE gefärbten TMA-Schnitte bildeten das Material für die Modellbiopsie. Jeder Tumorfall wurde ohne weitere Vorangaben durch einen Pathologen (F.P.) gesichtet. Diese vorläufige und ausschließlich auf konventioneller Lichtmikroskopie beruhende Biopsie-Diagnose wurde mit der bereits bekannten und durch den *Slide Review* überprüften Diagnose verglichen.

3.6 Immunhistochemie

3.6.1 Das Prinzip der Immunhistochemie

Die Technik der Immunhistochemie (IHC) ist ein histopathologisches Standardverfahren, das Strukturen am histologischen Schnittpräparat visualisiert. Die nachzuweisende Struktur dient als Antigen für eine Antigen-Antikörper-Reaktion in situ, die mit einer histochemischen Reaktion für die lichtmikroskopische Betrachtung sichtbar gemacht wird. Der Nachweis oder das Fehlen bestimmter Strukturen erweitert die Möglichkeiten zur Diagnose [59, 60, 68].

3.6.2 Die Antikörper

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit den in Tabelle 3.1 dargestellten Antikörpern durchgeführt.

Tabelle 3.1: Übersicht der verwendeten Antikörper, alphabetisch. MM – monoklonaler Mausantikörper; H – EnVision Flex Target Retrieval Solution, High pH, Tris/EDTA-Puffer, pH 9; A – Andau mit Proteinase K. Vor – Vorbehandlung. *Der Name des Antikörpers bezieht sich auf die Zielstruktur.

Name*	Klon	Typ	Bezugsquelle	Titer	Vor	Linker
AE 1/3	AE1/AE3	MM	DCS Innovative Diagnostik Systeme	1:500	H	-
EML4-ALK	5A4	MM	Novocastra	1:50	H	Mouse Linker
CD 56	1B6	MM	Novocastra	1:50	H	-
Chromogranin A	Rabbit poly		Dako	gebrauchsfertig	keine	-
Ck 20	Ks 20.8	MM	Dako	1:20	H	-
Ck 5/6	D5/16B4	MM	Dako	1:50	H	-
Ck 7	Ks 7.18	MM	Progen	1:100	H	-
Ck hmw	34βE12	MM	Dako	1:100	H	-
EGFR	31G7	MM	Zytomed	1:20	A	-
ER	1D5	MM	Dako	1:50	H	-
GATA-3	L50-823	MM	BioCare Medical	1:100	H	-
Ki-67	MIB-1	MM	Dako	1:500/1:100	H	-
Napsin A	KCG1.1	MM	Diagnostic BioSystems	1:100	H	-
p63	4A4	MM	Dako	1:100	H	-
PR	PgR636	MM	Dako	1:200	H	-
PTEN	6H2.1	MM	Dako	1:100	H	-
TTF-1	8G7G3/1	MM	Dako	1:100/1:25	H	-

3.6.3 Durchführung

Die Färbungen wurden im immunhistochemischen Labor des Instituts angefertigt. Nach einer Übernachtrocknung bei 40°C wurden alle Präparate mit Ausnahme der für die EGFR-Färbung automatisiert entparaffiniert. Das EGFR-Präparat wurde manuell mithilfe von Xylol und einer absteigenden Ethanolreihe entparaffiniert. Anschließend erfolgte für den EGFR-Nachweis die Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung mit Proteinase K. Für alle anderen Nachweise erfolgte die Vorbehandlung ebenfalls automatisiert mittels Tris/EDTA-Puffer mit einem pH 9,0.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden alle nach standardisiertem Protokoll automatisiert mit Hilfe eines *Autostainer Link 48* (DAKO) durchgeführt. Die Protokolle enthielten Positivkontrollen.

3.6.4 Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen erfolgte an einem JENAVAL-Durchlichtmikroskop. Jede Einzelprobe (Spot) wurde nach einem festgelegten Schema beurteilt (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Auswertungskriterien für immunhistologische Untersuchungen aus dem TMA.

1. Ort der Reaktion	2. markierte Tumorzellen/ gesamte Tumorzellen pro Spot	3. Intensität der Markierung
nukleär	0 %	Schwach
zytoplasmatisch	< 10 %	mittel
membranös	10 bis 50 %	stark
	50 bis 90 %	
	> 90 %	

In Anlehnung an Thunissen et al. konnten starke Markierungen bereits mit einem 4-fach vergrößernden Objektiv sicher identifiziert werden, während für eine schwache Markierung die Nutzung der 20-fach bis 40-fach vergrößernden Objektive notwendig war [122].

Die Einzelinformationen für jeden Tumor wurden semiquantitativ zu einem Gesamtergebnis pro Tumorfall zusammengefasst. Für jeden Antikörper wurden Entscheidungsgrenzen festgelegt (Tabelle 3.3). Ein bestimmtes Merkmal wurde als positiv für den jeweiligen Tumor gewertet, wenn mindestens ein Spot die entsprechenden Kriterien sowohl für den Anteil als auch die Intensität erfüllte.

Die Festlegung der Entscheidungsgrenzen (*Cut-Offs*) orientierte sich an der Routinediagnostik und wurde durch den Vergleich mit den bereits aus der Routinediagnostik vorhandenen immunhistochemischen Untersuchungen angepasst (siehe auch Abschnitt 4.5.3.2).

AE1/3 und Ki-67 (1:500/1:100) dienten als Reaktionskontrolle von Zytoplasma und Kern. Dabei war es unerheblich, ob es sich bei der markierten Zelle um eine Tumorzelle handelte oder um eine andere beliebige Zelle. Für beide Untersuchungen erfolgte eine qualitative Form der Auswertung als *positiv* oder *negativ*.

Tabelle 3.3: Cut-Offs für die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen (TMA).

Antikörper gegen	Reaktionsort	Entscheidungsgrenzen	
		Anteil positiv ab:	Intensität positiv ab:
EML4-ALK	Zytoplasma	1 %	stark
CD 56	Zellmembran	10 %	mittel
Chromogranin A	Zytoplasma	50 %	mittel
Ck 20	Zytoplasma	10 %	mittel
Ck 5/6	Zytoplasma	10 %	mittel
Ck 7	Zytoplasma	10 %	mittel
Ck hmw	Zytoplasma	10 %	mittel
EGFR	Zellmembran	1 %	stark
ER	Zellkern	10 %	stark
GATA-3	Zellkern	10 %	stark
Napsin A	Zytoplasma	50 %	mittel
p63	Zellkern	50 %	mittel
PR	Zellkern	10 %	stark
PTEN	Zytoplasma	10 %	mittel
TTF-1	Zellkern	10 %	schwach

3.7 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

3.7.1 Allgemeines zur Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die molekularbiologische Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) dient der Darstellung von Nukleinsäuren in einzelnen Interphasenkernen und bietet die Möglichkeit ganze Chromosomen oder auch umschriebene Abschnitte von Genen zu identifizieren. Dafür werden die in Zellen enthaltenden bekannten DNA-Zielstrukturen technisch zugänglich gemacht, um diese mit einer Fluorochrom-gekoppelten DNA-Sonde zu hybridisieren. Das Hybridisierungsergebnis kann im nächsten Schritt mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet und ausgewertet werden [75].

Die Untersuchung zum EGFR-Status erfolgte mit einer Polynukleotid-Sonde (Tabelle 3.4), deren Zielstrukturen zum einen im EGFR-Gen (7p12), zum anderen im Zentromer des Chromosoms 7

liegen. Somit werden zwei Ziele auf einem Chromosom dargestellt. Das EGFR-Ziel wird grün markiert, das Zentromer orange/rot (vgl. Hersteller-Datenblatt).

Im Fall einer normalen chromosomalen Ausstattung (Euploidie) sind zwei dicht aneinander liegende Signalepaare zu erwarten. Bei abweichender Ausstattung (Aneuploidie) können mehrere Chromosomen (Polysomie) oder auch eine selektive Amplifikation des EGFR-Gens beobachtet werden. Es findet sich demnach eine numerische Aberration (siehe auch Abbildungen 3.5 A und 3.6) [13].

Der Nachweis der strukturellen Aberration des ALK-Gens erfolgte ebenfalls mit einer Polynukleotid-Sonde. Die Hybridisierung erfolgt um einen für strukturelle Veränderungen bekannten Lokus auf dem Chromosom 2 (2p23), den BCR (*breakpoint cluster regions*), herum. Die grün markierte Sonde bindet oberhalb (*upstream/zentromerisch/proximal*), die rot/orange markierte Sonde unterhalb (*downstream/telomerisch/distal*).

Eine Translokation kann nachgewiesen werden, wenn sich die normalerweise dicht beieinander liegenden Signale voneinander entfernt oder einzeln darstellen (vgl. Hersteller-Datenblatt).

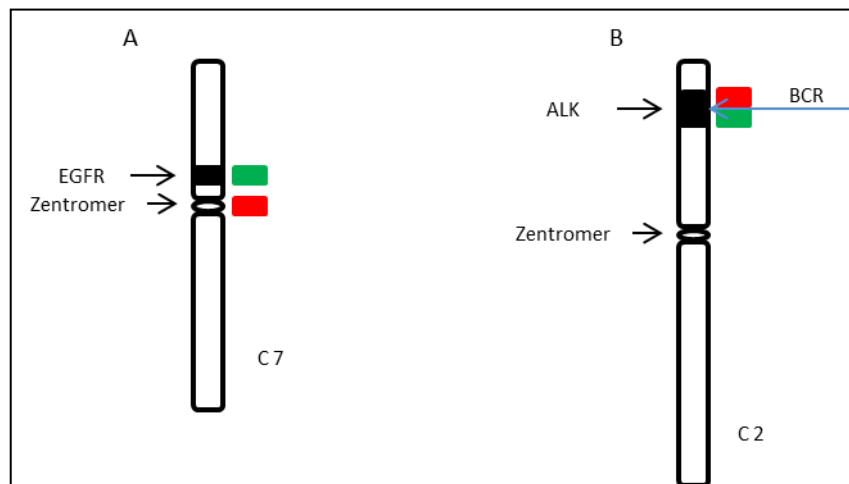


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Hybridisierungsorte. A: Das Chromosom 7 trägt auf dem kurzen Arm das EGFR-Gen in sehr enger Nachbarschaft zum Zentromer. B: Das Chromosom 2 trägt auf dem kurzen Arm das ALK-Gen. Der blaue Pfeil deutet auf die Breakpoint Cluster Region (BCR), um den herum die Sonden hybridisieren. (Abbildung in Anlehnung an eine Produktinformation des Herstellers.)

3.7.2 Herstellung der FISH-Präparate

Die Untersuchungen erfolgten primär an TMA-Schnitten. Auffällige Ergebnisse bei den ALK-FISH- und/oder EML4-ALK-IHC-Untersuchungen wurden zusätzlich an Ganzschnitten vom Tumorresektat nachuntersucht.

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden von den TMA-Blöcken und den im weiteren Verlauf für die ALK-Nachuntersuchungen ausgewählten Tumorblöcken 5 µm-Schnitte auf beschichtete Objektträger (DAKO) angefertigt. Die Durchführung der Hybridisierung erfolgte im molekularpathologischen Labor des Instituts für Pathologie. Die Herstellung erfolgte mit den Materialien und nach dem Protokoll des *ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits* (ZytoVISION, Bremerhaven), mit dessen Hilfe aus den bereits formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Proben die Zielstrukturen hybridisiert wurden.

Tabelle 3.4: Übersicht FISH-Sonden. Die Sondenmarkierungen sind für beide Untersuchungen gleich. (vgl. Hersteller-Datenblatt)

Untersuchung	Sonde	Bezugsquelle
EGFR	ZytoLight SPEC EGFR/CEN 7 Dual Color Probe (PL15)	Zytovision
ALK	ZytoLight SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe (PL81)	Zytovision
Sondenmarkierung	Absorption	Emission
Grün (ZyGreen)	503 nm	528 nm
Rot (ZyOrange)	547 nm	572 nm

Die Hybridisierung erfolgte verteilt über zwei Tage und wird im Folgenden übersichtsartig dargestellt. Der erste Tag diente dem Entparaffinieren. Dazu wurde das vorgewärmte Präparat mit Xylol sowie absteigend mit Ethanol inkubiert. Dem Aufbringen von *Heat Pretreatment Solution Citric* folgte die Demaskierung der DNA (Proteolyse umhüllender Proteine) mit *Pepsin Solution*. Im weiteren Verlauf wurden die FISH-Sonden unter Lichtschutz aufgetragen, die Objektträger mit Deckgläschen abgedeckt und mittels Fixogum abgedichtet. Die Denaturierung erfolgte bei 75°C. Anschließend wurden die Schnitte zur Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer über Nacht gelagert. Am zweiten Tag wurde nach dem Entfernen des Deckglases und der Durchführung einer aufsteigenden Ethanol-Reihe die *DAPI/Antifade-Solution* aufgetragen und der Objektträger abschließend wieder mit einem Deckglas belegt. Die weitere Lagerung erfolgte kühl und dunkel.

3.7.3 Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mit Quecksilberbrenner (OLYMPUS BX 53, OLYMPUS U-RFL-T, OLYMPUS U-LH100HGAP0). Für die Orientierung auf dem Objektträger galten die für die TMA-Methode beschriebenen Grundsätze; die Betrachtung erfolgte mit einem 100x-Objektiv und Immersionsöl (ZEISS Immersol 518F, Jena) sowie unter Reduktion von polychromatischem Licht. Als Filter wurden ein DAPI-Filter sowie ein Orange-Grün-Dual Bandpass-Filter (ZyGreen – Absorption: 503 nm, Emission: 528 nm, ZyOrange – Absorption: 547 nm Emission: 572 nm) verwendet. Der DAPI-Filter diente dem Aufsuchen der Tumorzellkernstrukturen, die Beurteilung der Hybridisierung erfolgte mit Hilfe des Orange-Grün-Dual Bandpass-Filters. Ein Zählraster diente als Unterstützung zur Orientierung und Zählung.

Als EGFR-FISH-positiv wurde ein Verhältnis Gen zu Chromosom von ≥ 2 bezogen auf mindestens 30 Kerne betrachtet. Das deutliche Vorliegen von Gen-Clustern wurde ebenso als EGFR-FISH-positiv gewertet. Nicht weiter verfolgt wurde die Frage der Polysomie. Zur schematischen Darstellung siehe Abbildung 3.6.

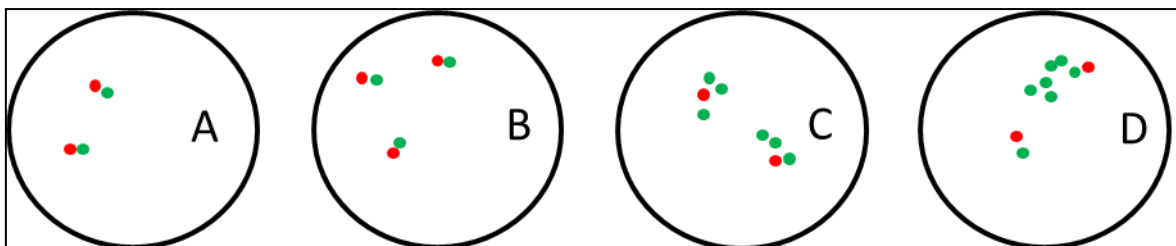


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Analyse der EGFR-FISH. Orange/rot repräsentiert das Zentromer, grün das Gen. Es wird hier beispielhaft von je einer Tumorzelle ausgegangen. A: EGFR-FISH-negativ. B: Polysomie (hier: Trisomie). C: EGFR-FISH-positiv mit einer Ratio Gen : Chromosom ≥ 2 . D: EGFR-FISH-positiv bei deutlicher Clusterbildung.

Die Auswertung der ALK-FISH folgte den Herstellerempfehlungen und orientierte sich in leicht modifizierter Weise an Thunnissen et al. [122]. Als ALK-FISH-positiv wurde gewertet, wenn das rote und grüne Signal zusammen auftraten, jedoch mehr als zwei Signaldurchmesser voneinander entfernt waren. Das alleinstehende Auftreten eines grünen Signals bei gleichzeitig grundsätzlich vorhandenem roten Signal bzw. dicht beieinander liegenden rotem und grünem Signal wurde ebenso positiv bewertet. Die genannten Signalkonstellationen mussten bei mindestens 50 Prozent der Tumorzellen nachweisbar sein (Abbildung 3.7).

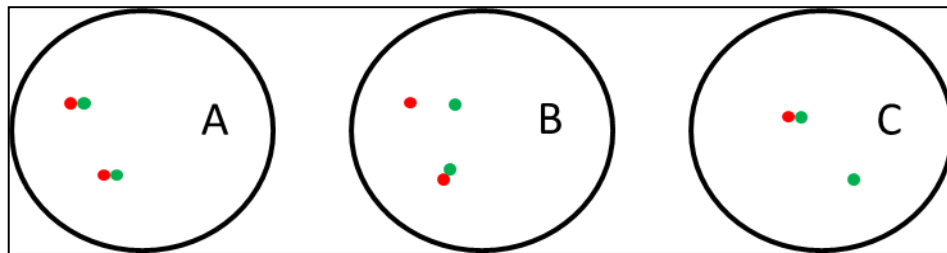


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Analyse der ALK-FISH. Orange/rot markiert unterhalb (*downstream*/telomerisch) des ALK-Lokus, grün oberhalb (*upstream*/zentromerisch). Es wird hier beispielhaft von je einer Tumorzelle ausgegangen. A: ALK-FISH-negativ. B: ALK-FISH-positiv mit deutlich vergrößertem Abstand zwischen den Signalen, dies entspricht einem rearrangierten ALK-Lokus. C: ALK-FISH-positiv bei singulärem grünen Signal, dies entspricht dem Verlust von DNA unterhalb (*downstream*) des ALK-Lokus. (Abbildung in Anlehnung an eine Produktinformation des Herstellers.)

3.8 Bildverarbeitung

Die Aufnahme der dargestellten mikroskopischen Bilder erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (OLYMPUS BX 53, OLYMPUS U-RFL-T, OLYMPUS U-LH100HGAP0) mit einer Kamera Olympus DP72 und der Software *cellSens Dimension 1.5* (OLYMPUS).

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungsgut und histopathologische Typisierung

Die Recherche im digitalen Archiv ergab 268 Patienten, die im Zeitraum von 2000 bis einschließlich 2009 aufgrund eines primären Malignoms der Lunge operiert wurden. In Tabelle 4.1 sind die Fälle nach den im Originalbefund angegebenen histologischen Typen aufgelistet. Die Differenz zwischen der Anzahl der Tumoren und der dazugehörigen Patientenzahl ergab sich aus verschiedenen Mehrfachkarzinomen einzelner Patienten.

Tabelle 4.1: Verteilung der Originaldiagnosen aller Tumorpatienten aus dem Untersuchungszeitraum.

Originaldiagnose	Anzahl der Tumoren $\Sigma = 285$	Anzahl der Patienten
Adenokarzinom (ADC)	116	110
Plattenepithelkarzinome (PEC)	131	129
Großzellige Karzinome (LCLC)	22	21
Neuroendokrine Tumoren (NET) + großzellige neuroendokrine Karzinome (LCNEC)	8	8
Adenosquamöse Karzinome (ADSQC)	4	4
Pleomorphe Karzinome (pCa)	2	2
Karzinom Sarkom	1	1
NSCLC in Kombination mit einem SCLC	1	1

Die Verteilung der Tumordiagnosen über den Untersuchungszeitraum zeigt Abbildung 4.1.

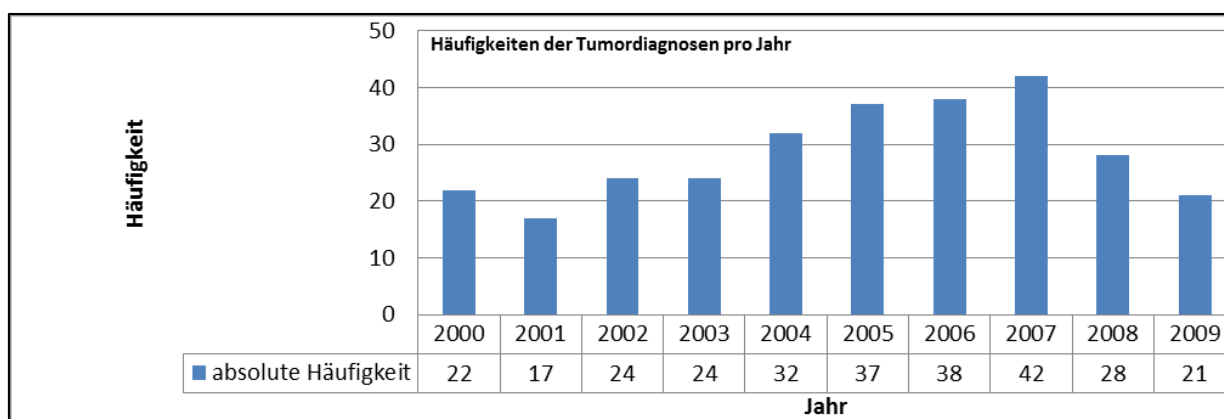


Abbildung 4.1: Häufigkeiten der Tumordiagnosen im Untersuchungszeitraum pro Jahr.

4.2 Klinisch-pathologische Daten und Überlebensanalyse

Die Verteilung der Geschlechter wies ein Verhältnis männlich zu weiblich von 4 : 1 auf.

Tabelle 4.2: Geschlechtsverteilung aller Tumorpatienten, diagnosenunabhängig.

Geschlecht	absolut	relativ in Prozent
männlich	212	79,1
weiblich	56	20,9
Summe	268	100

Das Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt lag im Durchschnitt bei 65 Jahren, der älteste Patient war 84, der jüngste 16 Jahre (NET).

Tabelle 4.3: Operationsalter aller Tumorpatienten, diagnosenunabhängig. SD – Standardabweichung.

	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
Alter bei OP in Jahren	16	84	65,77	9,65

Das Gesamtüberleben nach onkologischer Operation wurde für Patienten mit ADC, LCLC, ADSQC, NET, LCNEC ermittelt. Patienten, die zum Zeitpunkt der Abfrage lebten, wurden als *zensiert* gewertet [137]. Es konnten 115 Patienten in die Überlebensanalyse aufgenommen werden; davon waren 63 zum Stichtag verstorben. Die Kaplan-Meier-Kurve für das Kollektiv ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Das geschätzte durchschnittliche Überleben für diese Gruppe betrug 81 Monate, die mediane Überlebenszeit 73 Monate.

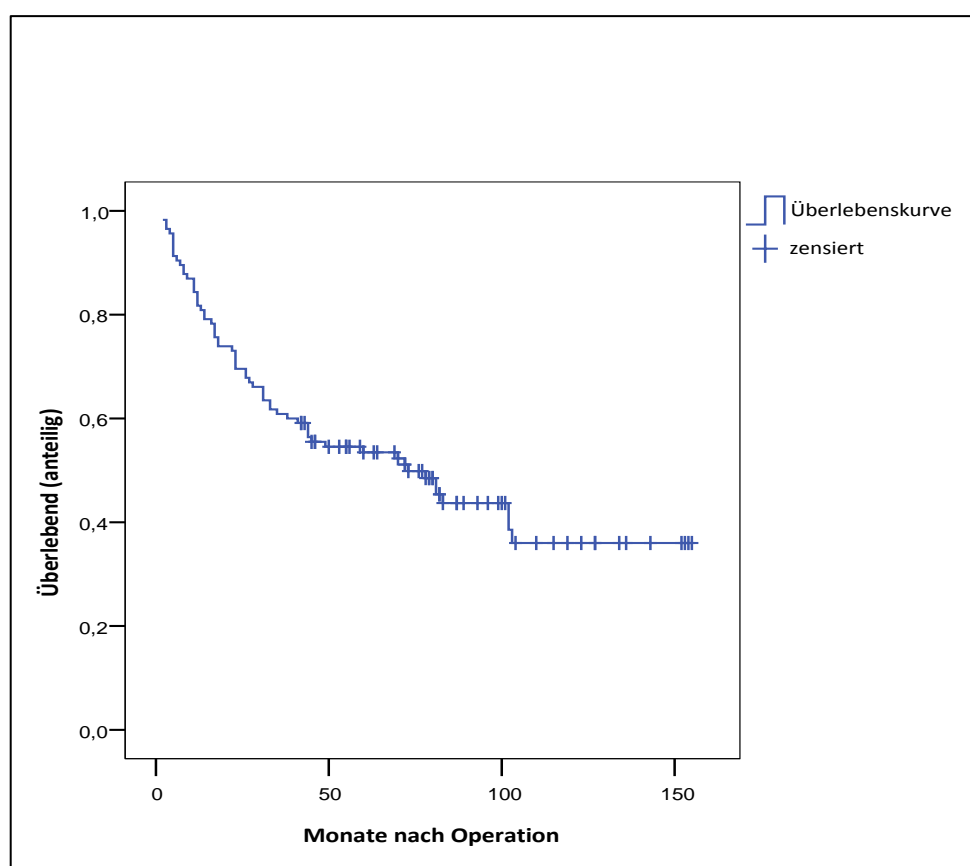


Abbildung 4.2: Gesamtüberleben nach onkologischer Operation (nach Kaplan-Meier).

Das Überleben in Abhängigkeit vom jeweils zum Diagnosezeitpunkt gültigen Tumorstadium (nach UICC) ist in Abbildung 4.3 dargestellt. NET und LCNEC wurden vor Einführung der 7. Auflage der TNM-Klassifikation nicht entsprechend klassifiziert und wurden daher hier nicht berücksichtigt [141, 142]. Erwartungsgemäß zeigte sich eine Reduktion des medianen Überlebens mit höherem Tumorstadium. Für die in Hauptstadien zusammengefassten Fälle wurden für Stadium I 105 Monate und für Stadium IV 4 Monate als durchschnittliche Überlebenszeit angenommen.

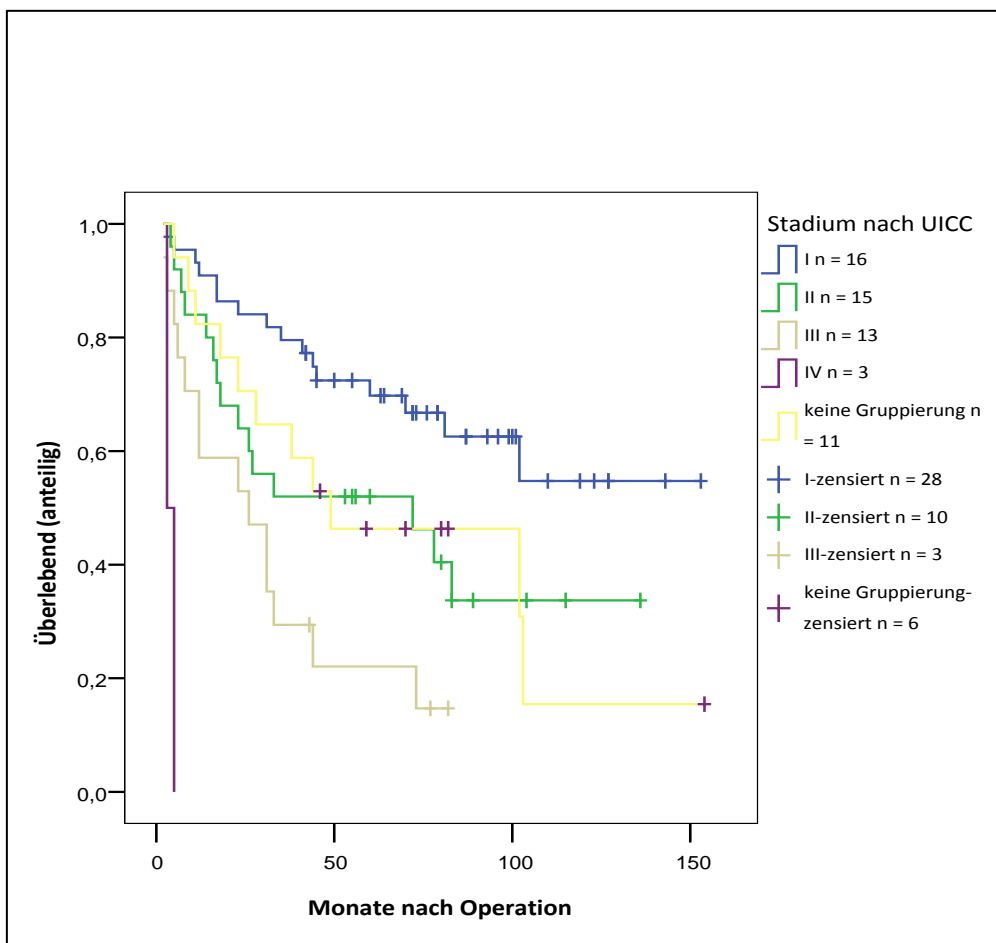


Abbildung 4.3: Gesamtüberleben (nach Kaplan-Meier) nach onkologischer Operation in Abhängigkeit vom Tumorstadium nach UICC-Klassifikation. Aufgeführt sind Hauptstadien. Ohne NET und LCNEC. Stadium I gesamt n = 44, II n = 25, III n = 16, IV n = 3, keine Gruppierung n = 17.

4.3 Charakteristika der TMA-Studienfälle

Für die Untersuchungen zum immunhistochemischen und molekularbiologischen Profil wurden nach den Einschlusskriterien 133 Tumoren verwendet, die sich auf 125 Patienten verteilten (siehe Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Histologische Typen der im TMA untersuchten Lungenkarzinome.

Histotyp	Anzahl der Tumoren	Anzahl der Patienten
ADC	99	96
LCLC	20	19
NET + LCNEC	8	8
ADSQC	4	4
pICa	2	2

Stadiengruppiert nach zum Diagnosezeitpunkt gültiger TNM-Klassifikation [141, 142] ergab sich für die ADC und LCLC die in Abbildung 4.4 gezeigte Verteilung. Es überwogen die Stadien I und II mit zusammen 63 %. Insgesamt konnten 72 % der vorliegenden Tumoren den Stadien I bis IIIA (nach UICC) zugeordnet werden.

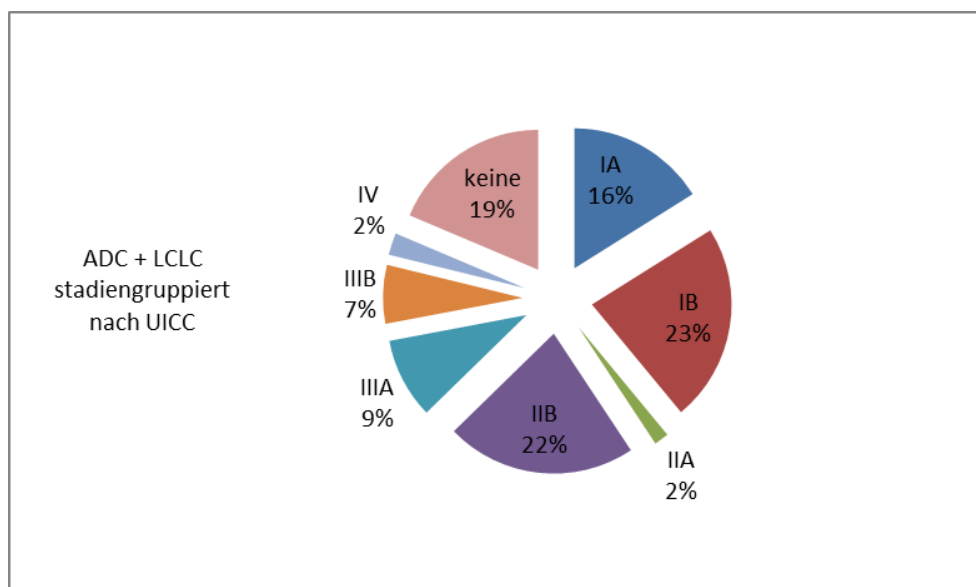


Abbildung 4.4: Verteilung der TMA-Tumorfälle (ADC und LCLC) nach zum Zeitpunkt der Diagnose gültiger UICC-Klassifikation. Unter *keine* sind Tumoren ohne vollständige Klassifizierung nach Aktenlage zusammengefasst.

4.4 Zweitbegutachtung

Die Zweitbegutachtung diente zum einen der Vorbereitung der Untersuchungen mittels der TMA-Technik, zum anderen der Bestätigung oder der Reklassifikation der Diagnosen des histopathologischen Originalbefunds.

Im Rahmen von Zweitbegutachtung und Konsensussitzungen am Diskussionsmikroskop wurden die Diagnosen von neun Tumoren revidiert (Tabelle 4.5). Der eine neu als PEC klassifizierte Tumor wurde den Ein- und Ausschlusskriterien entsprechend nicht in die TMA-Untersuchung aufgenommen. Die anderen Tumoren fanden mit ihrer revidierten Diagnose Eingang in den weiteren Untersuchungsverlauf. Im Weiteren ergab sich die Diagnosenverteilung wie in Tabelle 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.5: Reklassifizierte Karzinome nach lichtmikroskopischer Zweitbegutachtung.

G – Grading nach TNM-Klassifikation. ID – interne Sortierung. *In den Folgeuntersuchungen mittels TMA nicht weiter berücksichtigt.

ID	Originaldiagnose	Diagnose nach Zweitbegutachtung
152	ADC G 3	LCLC
243	ADC G 3	NET G 2
212	ADC G 3	LCNEC
169	LCLC	ADC G 3
80	LCLC	ADSQC G 3
215.2	LCLC	ADC G 3
251	LCNEC	NET G 2
200	Großzellig anaplastisches Karzinom	PEC G 3*
64	pCa	ADC G 3/pCa

Tabelle 4.6: Diagnosenverteilung vor und nach Revision. Die zwei pCa wurden nach Zweitbegutachtung einmal den LCLC, einmal den ADC zugeordnet.

Tumorart	Anzahl der Tumoren		
	Originaldiagnose	Nach Revision	Nach Revision – im TMA verfügbar
ADC	99	99	96
LCLC	20	19	19
NET	4	6	6
LCNEC	4	4	3
ADSQC	4	5	4
pCa	2	//	//
Σ	133	133	128

Bei zwölf Fällen wurde die Diagnose nach der lichtmikroskopischen Begutachtung präzisiert. Dies betraf elf ADC und einen NET (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: Fälle mit revidierten Diagnosen. Zum Begriff „bronchioloalveolär“ siehe Abschnitt 5.1.1.

Originaldiagnose	Diagnose nach Revision mit Haupt- und Nebenkomponten und Grading
Bronchioloalveoläres ADC, nichtmuzinös, G 1	ADC, große lepidische Komponente, z.T. verbreiterte Septen, azinäre und papilläre Anteile, G 1
BAC, nichtmuzinös, G 1	ADC, papillär, mit lepidischer Komponente, G 1
BAC, G 2	ADC, tubuloazinär, mit lepidischer Komponente, G 2
Papilläres bronchioloalveoläres ADC, G 1	ADC, papillär, mit lepidischer Komponente, G 1
ADC vom bronchioloalveolären Typ, nichtmuzinös, G 1	ADC, azinär, papillär, tubulär, G 1-2
BAC, überwiegend nichtmuzinös mit kleiner Komponente eines azinären ADC	ADC, azinär, tubulär, papillär, kleinere Abschnitte lepidisch, G 2
Bronchioloalveoläres ADC, teils nichtmuzinös, G 2	ADC, azinär, stark verbreiterte Septen mit Tumorzellen ausgekleidet, vereinzelt tubuloazinär, G 2
Bronchioloalveoläres ADC, nichtmuzinös, G 2	ADC, tubuloazinär, lepidischer Aspekt mit z.T. hochprismatischen Tumorzellen, z.T. mehrreihig, G 2
Bronchioloalveoläres ADC, nichtmuzinös, G 1	ADC, deutliche verbreiterte, von Tumorzellen überkleidete Septen, z. T. azinäre Formationen, G 2
Bronchioloalveoläres ADC, nichtmuzinös, G 1	ADC, lepidische Hauptkomponente, teils azinär, sehr geringer papillärer Anteil, G 1
Bronchioloalveoläres ADC, nichtmuzinös, zwei regionäre Lymphknotenmetastasen, G 1	ADC, lepidische Hauptkomponente, z.T. azinäre und (mikro-) papilläre Strukturen, G 1
Hochdifferenzierter NET	glandulärer NET, G 2

4.5 Untersuchungen am TMA

4.5.1 Qualität des TMA

Für den TMA wurden aus jedem Tumor (Fall) drei Proben (Spots) entnommen. Insgesamt ergaben sich 403 Spots, die in die weitere Auswertung gingen. Nach Durchsicht der HE-gefärbten TMA-Schnitte wurden 28 Spots ohne Tumoranteil aussortiert. Es ergaben sich 375 tumortragende Einzelproben, was einer Tumortrefferquote von 93,1 % entspricht. Fünf Fälle (3 ADC, 1 LCNEC, 1 ADSQC) konnten nicht weiter begutachtet werden, da jeweils alle drei Spots als nicht tumortragend klassifiziert wurden. Insgesamt standen damit 128 Tumorfälle zur weiteren Auswertung zur Verfügung.

Für jede einzelne immunhistochemische Untersuchung wurde eine Ausfallquote erhoben. Als Ausfall galten Einzelproben, die nicht ausreichend Tumormaterial aufwiesen oder aus technischen Gründen (z. B. Abschwimmen, zerrissenes Material) nicht begutachtet werden konnten. Die Ausfallquoten der tumortragenden Spots in den einzelnen Untersuchungen bewegten sich zwischen 1,9 % und 8,3 % (Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: Ausfallquoten bezogen auf 375 tumortragende Einzelproben (Spots)

Antikörper gegen	Ausfall – absolut	Ausfall – relativ in Prozent
EML4-ALK	8	2,1
ALK FISH	32	8,5
CD 56	20	5,3
Chromogranin A	0	0
Ck 20	24	6,4
Ck 5/6	16	4,3
Ck 7	7	1,9
Ck hmw	15	4,0
EGFR	16	4,3
EGFR FISH	22	5,9
ER	12	3,2
GATA 3	13	3,5
Napsin A	14	3,8
p63	17	4,5
PR	14	3,8
PTEN	31	8,3
TTF-1	9/20	2,4/5,3

Zusätzlich zu den internen Kontrollen im immunhistochemischen Labor wurden alle TMA-Proben einer Kontrolle mit der AE1/3- und einer zweimaligen Kontrolle mit der Ki-67-Immunreaktion unterzogen. Ein LCLC blieb bei der AE1/3-Reaktion negativ und außer bei der Ki-67-Reaktion auch bei den restlichen Antikörpern. Bei Ki-67 zeigten 13 Fälle für beide Proben keine Reaktion. Davon waren acht Fälle (7 x ADC, 1 x LCLC) zusätzlich auch negativ für beide TMA-TTF-1-Färbungen und ebenso auch für p63 (Kernfärbungen). Die restlichen fünf zeigten hingegen für diese Antikörper zumindest eine positive Reaktion. Ein Fall war qualitätsbedingt für Ki-67 nicht auswertbar.

4.5.2 Simulation einer Biopsie am TMA

Die Beurteilung einer Biopsie wurde an HE-gefärbten TMA-Schnittpräparaten simuliert. Jeder Tumor wurde anhand der auswertbaren Spots histologisch typisiert und das Ergebnis mit der Diagnose am Operationspräparat verglichen. In 98 von 128 auswertbaren Fällen (76,6 %) stimmte die Diagnose der simulierten Biopsie mit der endgültigen Diagnose überein.

In 17 Fällen wurde an der simulierten Biopsie ein LCLC gesehen, die Diagnose eines ADC ließ sich somit nur am Tumor im Operationspräparat stellen. Die LCNEC und NET wurden in der Modellbiopsie – ohne IHC – als LCLC mit möglicher neuroendokriner Komponente gesehen. In einem Fall präsentierte sich ein NET mit einer glandulären Morphologie, so dass zunächst ein ADC diagnostiziert wurde. Die ADSQC wurden in der Modellbiopsie drei Mal als LCLC, einmal als ADC eingestuft. Ein weiteres LCLC wurde eingangs als ADC klassifiziert.

In der Abbildung 4.5 finden sich zur Veranschaulichung Mikrofotos von HE-Schnittpräparaten.

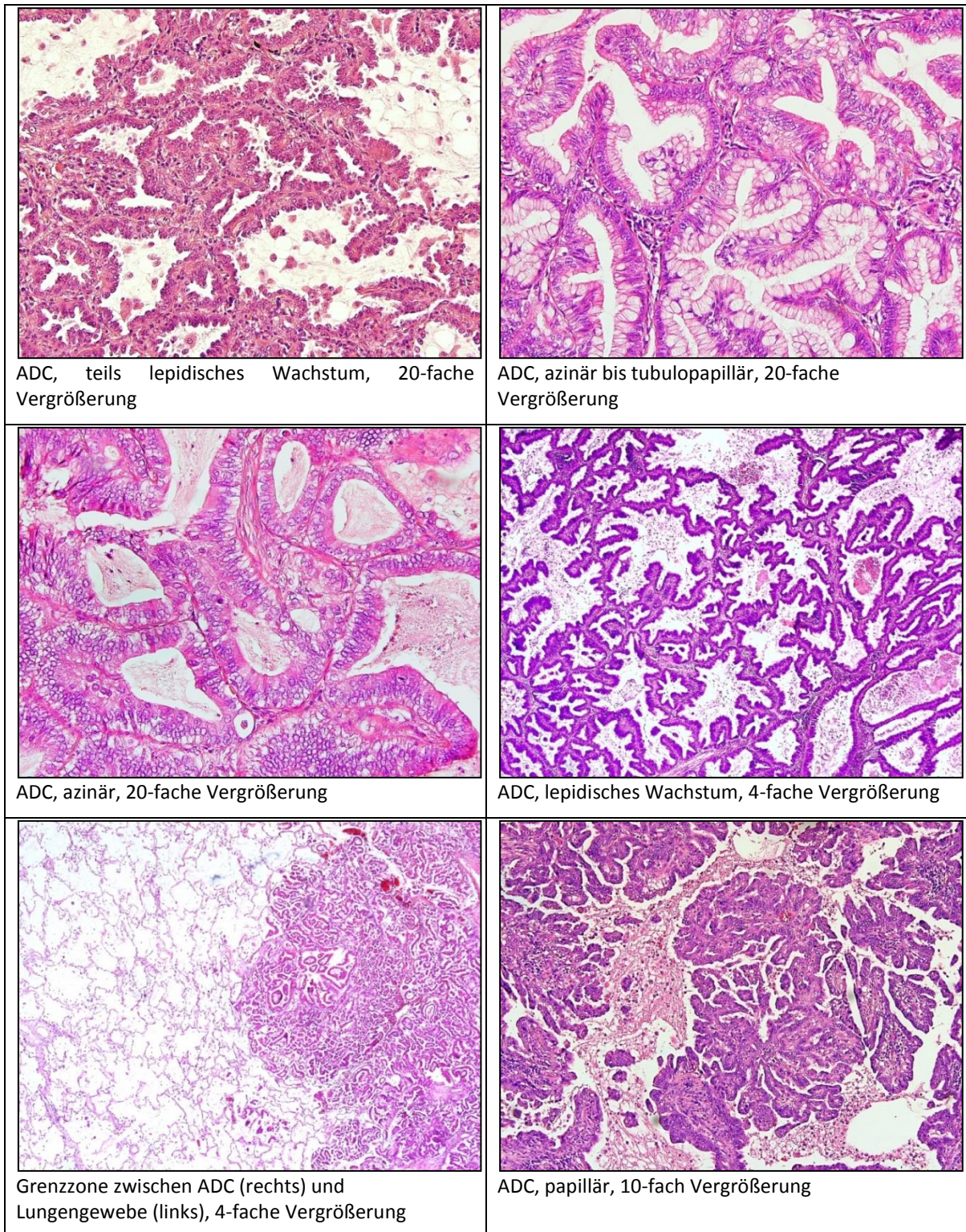


Abbildung 4.5: Ausgewählte HE-Schnitte. Fortsetzung auf der folgenden Seite.

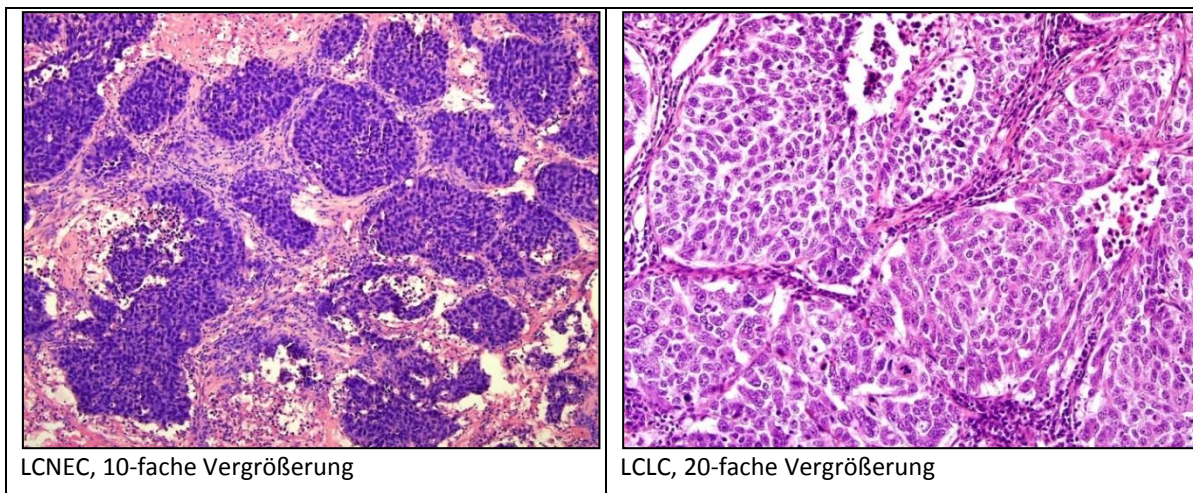


Abbildung 4.5 (Fortsetzung): Ausgewählte HE-Schnitte.

4.5.3 Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Beurteilung der Modellbiopsie und der immunhistologischen Untersuchungen sind in der Abbildung 4.7 zusammengefasst.

In der Abbildung 4.6 sind exemplarisch einige ausgewählte IHC-Reaktionen dargestellt, die eine Kern-, Zytoplasma- und Zellmembranfärbung zeigen.

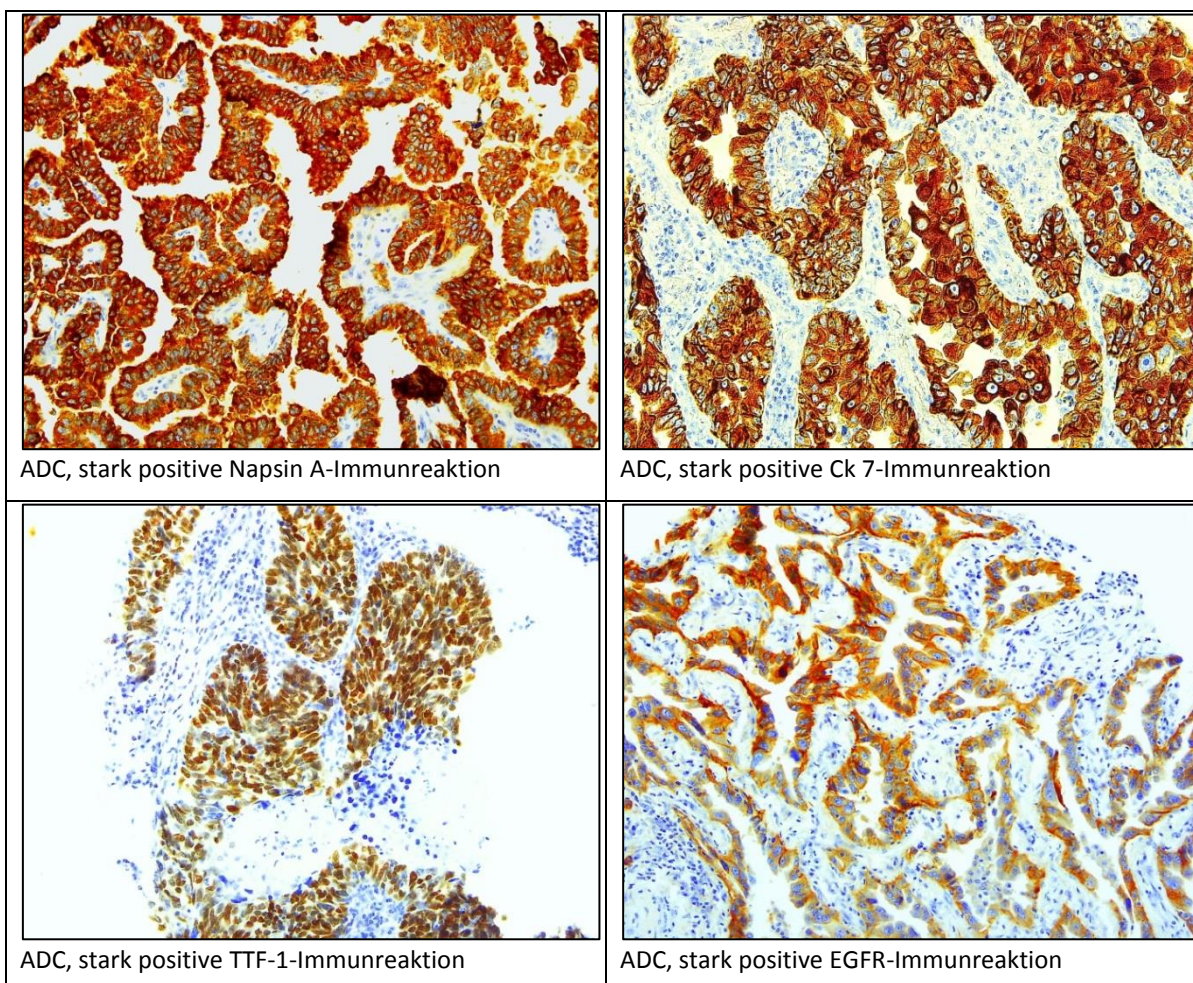


Abbildung 4.6: Exemplarische immunhistochemische Färbungen von Zytoplasma, Kern und Membran. Alle Bilder in 20-facher Vergrößerung.

4.5.3.1 Zytokeratine, TTF-1, p63, Napsin A, neuroendokrine Marker

Für jeden TMA-Antikörper wurde mit Hilfe einer Kreuztabulation die absolute und relative Verteilung auf den histologischen Haupttyp und für die ADC in Abhängigkeit vom histopathologischen Grading ausgewertet (Tabelle 4.9). Die Fälle mit einem nicht eindeutigen Differenzierungsgrad (z.B. G 1-2) wurden in Analogie zu den allgemeinen Regeln des TNM-Systems dem weniger fortgeschrittenen Stadium zugeordnet (z.B. G 1-2 zu G 1) [141, 142].

Ck 7 zeigte sich bei den ADC in knapp 84 % positiv, Napsin A zeigte sich bei 79 % der ADC positiv. Bei beiden Antikörperreaktionen konnte eine Abnahme der Expression mit abnehmender Differenzierung beobachtet werden. Die Untersuchungen für TTF-1 wurden mit zwei verschiedenen Antikörperkonzentrationen durchgeführt. Im Wesentlichen zeigten sich für beide Varianten ähnliche Ergebnisse. Die ADC zeigten bei 50 bis 54 % der Fälle eine positive Reaktion.

Tabelle 4.9: Übersicht der prozentualen Verteilung der IHC-Ergebnisse (Chromo = Chromogranin A, Napsin = Napsin A, für TTF-1 sind die Ergebnisse beider Ansätze dargestellt).

Diagnose	Ck 5/6	Ck hmw	Ck 7	Ck 20	TTF-1	TTF-1	P63	Napsin	CD 56	Chromo
	Positiv in Prozent									
ADC G1	0	54,2	87,5	8,3	58,3	50	20,8	87,5	0	0
ADC G2	0	61,5	87,2	2,8	53,8	47,4	21,1	82,1	5,1	0
ADC G3	9,1	57,6	78,8	6,3	48,5	53,1	33,3	69,7	9,1	0
LCLC	5,6	42,1	63,2	0	36,8	42,1	31,6	50	10,5	0
NET	0	0	16,7	0	16,7	16,7	0	0	83,3	100
LCNEC	0	0	0	0	66,7	66,7	0	0	66,7	33,3
ADSQC	100	100	25	0	0	25	100	0	25	0

4.5.3.2 Vergleich ausgewählter Antikörper mit den Ergebnissen aus der Routinediagnostik

Die TMA-Ergebnisse für Ck 7 und TTF-1 wurden mit denen aus der initialen Diagnostik vorhandenen Ergebnissen am Operationspräparat verglichen, dabei handelte es sich v. a. um ADC und LCLC (Tabelle 4.10). Für Ck 7 lagen 82 Fälle zum Vergleich vor. Die Gegenüberstellung von Ck 7 zeigte bei den abweichenden Ergebnissen ausnahmslos die Konstellation eines negativen TMA-Ergebnisses bei einer positiven Reaktion am Ganzschnitt. Die Ergebnisse des Ganzschnittes als endgültige Diagnose annehmend, ergaben sich für die TMA-Ergebnisse eine Sensitivität von 76,9 % sowie eine Spezifität von 100 %.

Aufgrund der Versuchsdurchführung mit zwei verschiedenen TTF-1-Antikörperkonzentrationen konnten pro Fall drei Ergebnisse zum Vergleich herangezogen werden. Es lagen für TTF-1 94 Fälle zum Vergleich vor. Eine vollständige Übereinstimmung ergab sich bei 56 Fällen, eine Teilübereinstimmung zwischen einem TMA-Ergebnis und dem Ganzschnitt zeigte sich bei acht Fällen. In 30 Fällen unterschieden sich die Ergebnisse, dabei stellte sich hier die gleiche Konstellation wie bei Ck 7 dar: negatives TMA-Ergebnis bei positivem Ganzschnitt. Die Sensitivität für die TTF-1-TMA-Untersuchungen ergaben 57,6 % bzw. 55,1 %, durch Kombination beider Testreihen erhöhte sich die Sensitivität auf 61,5 %. Die Spezifität betrug 100 %.

Tabelle 4.10: Übersicht zum Vergleich TMA und Ganzschnitt.

	Vollständige Übereinstimmung		Teilübereinstimmung		Diskrepanz		Summe	
	TTF-1	Ck 7	TTF-1	Ck 7	TTF-1	Ck 7	TTF-1	Ck 7
Absolut	56	64	8	-	30	18	94	82
Relativ in Prozent	59,6	78,0	8,5	-	31,9	22,0	100	100

4.5.3.3 Estrogen- und Progesteronrezeptor, GATA-3, PTEN

Die Untersuchungen für die Estrogen- und Progesteronrezeptoren erbrachten jeweils zwei positive untereinander schnittmengenfreie Ergebnisse innerhalb der ADC. Der ER fand sich bei zwei männlichen Patienten, jeweils in einem G 2- und G 3-Tumor. Der PR fand sich in einem G 1-Tumor bei einer Patientin sowie in einem G 3-Tumor bei einem männlichen Patienten. Die Suche nach GATA-3 erbrachte kein positives Ergebnis.

Für PTEN konnten 19 % der ADC als positiv gewertet werden. 28 % der LCLC, 25 % der ADSQC sowie 83 % der NET waren ebenfalls positiv für die Reaktion mit PTEN. LCNEC zeigten keine Reaktionen.

4.5.4 Ergebnisse der Untersuchungen zu EGFR und ALK

EGFR und ALK wurden jeweils mittels IHC und FISH dargestellt. Die Abbildung 4.8 zeigt entsprechende FISH-Reaktionen.

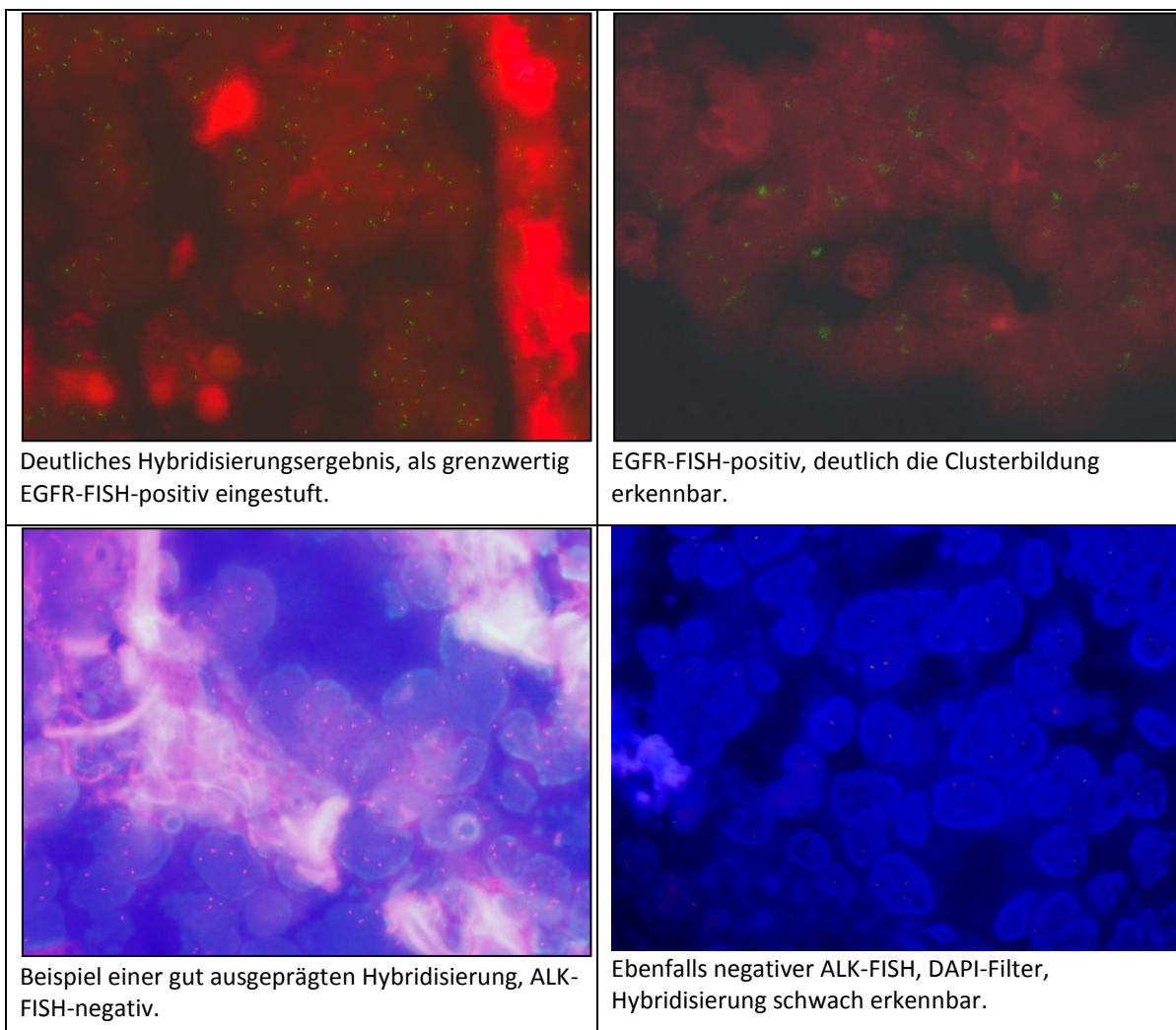


Abbildung 4.8: FISH-Reaktionen. Erste Reihe EGFR, zweite Reihe ALK. Eine repräsentative druckfähige Abbildung des ALK-FISH-positiven Falls gelang technisch bedingt nicht (keine motorisierte Z-Achse und entsprechende Software zum Kamerasystem).

4.5.4.1 EGFR

Die Antikörper-Antigen-Reaktion (IHC) erbrachte insgesamt 17 positive Fälle, davon 11 bei ADC (11,5 % positiv). Vier LCLC (21 %) zeigten eine positive Reaktion, weiterhin 25 % der ADSQC und 16,7 % der NET. Die LCNEC blieben negativ.

Eine Amplifikation des EGFR-Gens ließ sich per FISH bei acht von insgesamt 126 verwertbaren Fällen nachweisen, zwei weitere Fälle wurden als fraglich positiv eingeschätzt. Damit wurden 6 % der ADC und 11 % der LCLC sicher als EGFR-FISH-positiv gewertet.

Bei den EGFR-IHC-positiven Ergebnissen ergaben sich folgende Patientenmerkmale: 10 männliche Patienten, durchschnittlich 65,2 Jahre bei OP, 7 weiblichen Patientinnen, durchschnittlich 64,1 Jahre bei OP. Bei den sicher EGFR-FISH-positiven Ergebnissen: männlich 4/69,25 Jahre, weiblich 4/72 Jahre.

Tabelle 4.11: Übersicht TMA-Ergebnisse EGFR-FISH und Vergleich mit den Ergebnissen aus der IHC.
Die mit * gekennzeichneten Fälle wurden als fraglich-positiv eingeschätzt.

Diagnose	FISH-positiv	EGFR-FISH- und EGFR-IHC-positiv
ADC G 1	2*	1
ADC G 2	3	2
ADC G 3	3	1
LCLC	2	2

4.5.4.2 ALK

Immunhistologisch ergaben sich aus 128 verwertbaren Fällen ein sicher positives sowie fünf grenzwertige Ergebnisse. Die ALK-Translokation zeigte sich mittels FISH einmal bei 127 verwertbaren Fällen, weiterhin zwei grenzwertige FISH-Fälle. Die positiven/grenzwertigen Fälle beider Methoden wurden zusätzlich per FISH am Ganzschnitt vom Operationspräparat nachuntersucht. Von den drei TMA-ALK-FISH-positiven/grenzwertigen Fällen wurde zusätzlich die EML4-ALK-IHC am Ganzschnitt vom Originaltumorparaffinblock durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4.12. Aus der Kombination der Methoden wurde schließlich ein Tumor als ALK-positiv gewertet. Unter der Annahme, dass die Ergebnisse der FISH als endgültig zu betrachten sind, ergaben sich für die EML4-ALK-IHC am TMA eine Sensitivität von 0 % und eine Spezifität von 95 %, während die Sensitivität der Antigen-Antikörper-Reaktion am Ganzschnitt bei 100 % lag.

Tabelle 4.12: Gesamtübersicht der ALK-Untersuchungen. Unter TMA sind die positiven/auffälligen Ergebnisse des ersten Schrittes zusammengefasst. Unter Ganzschnitt sind die Ergebnisse des darauf aufbauenden zweiten Schrittes dargestellt. Zusätzlich sind für jeden Fall das OP-Alter sowie das Geschlecht aufgeführt. Der als ALK-positiv bewertete Fall ist als Kasten hervorgehoben.

Diagnose	TMA		Ganzschnitt		Alter bei OP und Geschlecht
	ALK-FISH	ALK-IHC	ALK-FISH	ALK-IHC	
ADC-Fälle	96	96			
Gesamtfälle	127	128			
ADC G 1	fraglich positiv	negativ	negativ	negativ	78 Jahre, m
ADC G 1	negativ	schwach	negativ		65 Jahre, w
ADC G 1	negativ	schwach	negativ		34 Jahre, m
ADC G 2	positiv	negativ	positiv	positiv	68 Jahre, m
ADC G 2	fraglich positiv	positiv	negativ	positiv	70 Jahre, m
ADC G 2	negativ	schwach	negativ		76 Jahre, m
ADC G 3	negativ	schwach	negativ		74 Jahre, m
ADC G 3	negativ	schwach	negativ		43 Jahre, m
Summe <i>positiv</i>	1 + 2	1 + 5	1	2	
Anteil an ADC	1 %	3,1 %	1 %	6,3 %	2,1 %
Anteil an Gesamt	0,8 %	2,4 %	0,8 %	4,7 %	1,6 %

4.6 Zusammenhangsanalysen

Die unterschiedlichen histopathologischen Tumortypen wurden auf Zusammenhänge zwischen ausgewählten Antikörperreaktionen überprüft (siehe auch Abbildung 4.7). Dafür wurde in Anlehnung an die Bedeutung der Antikörper für die Routinediagnostik (siehe auch Abschnitt 1.2) eine Rangfolge erstellt. Diese rangfolgenabhängigen Zusammenhänge wurden in einem Flussdiagramm grafisch dargestellt (Abbildung 4.9). Die beiden Untersuchungen für TTF-1 wurden dafür zusammengefasst. Die Reaktionen für TTF-1, Napsin, CD 56, p63 und Ck 7 wurden in dieser Reihenfolge aufgeschlüsselt.

Die fünf positiven Ergebnisse für Ck 20 (alle bei ADC) wurden nicht aufgeführt. Ebenso wurde Ck hmw nicht weiter berücksichtigt. Dessen Ergebnisse sind eng an die von Ck 7 gekoppelt. Insgesamt waren es zwar deutlich weniger positive Fälle (68:95), diese zeigten sich im Fall der ADC jedoch immer nur dann positiv, wenn auch Ck 7 positiv reagierte. Reagierte Ck 7 bei den ADC nicht (negativ), war auch immer Ck hmw negativ.

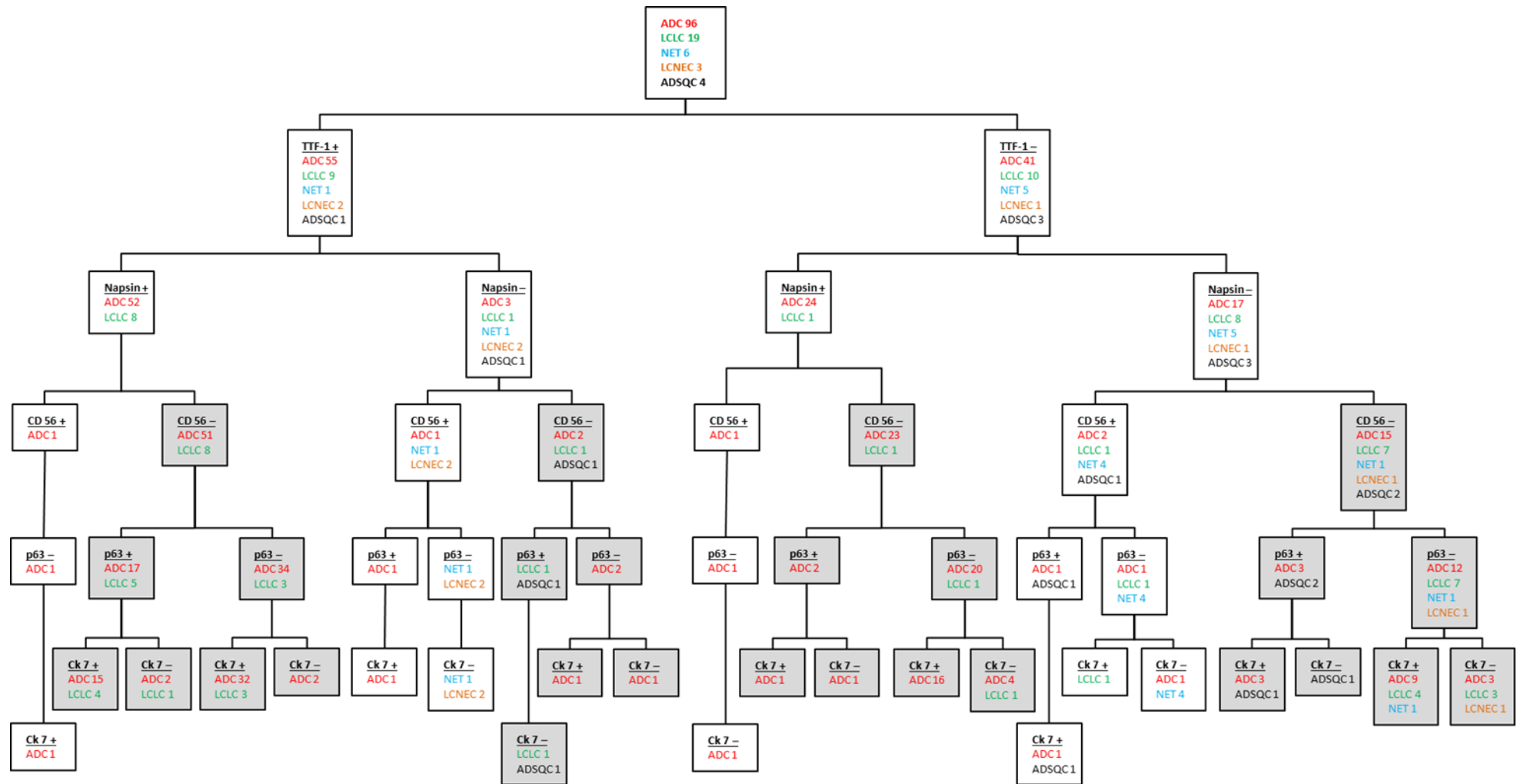


Abbildung 4.9: Flussdiagramm ausgewählter Antikörperreaktionen in Abhängigkeit vom histopathologischen Typ. Differenzen bei den Fallzahlen kommen durch Ausfälle im TMA zustande. Graue Markierungen dienen der Übersicht. Napsin = Napsin A.

5 Diskussion

5.1 Zweitbegutachtung und Simulation einer Biopsie

5.1.1 Zweitbegutachtung und das bronchioloalveoläre Wachstumsmuster

Interobserverstudien konnten zeigen, dass die Begutachtung von Präparaten durch verschiedene Betrachter zu abweichenden Diagnosen führen kann [50]. Daher wurden alle zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung archivierten Schnittpräparate inklusive der Sonderfärbungen erneut gesichtet. Neun Tumoren wurden reklassifiziert (7 % aller Diagnosen). Darunter waren 5 LCLC, die weiter differenziert werden konnten (Tabelle 4.5). Weitere 12 Fälle erfuhren eine Präzisierung der ursprünglichen Diagnosen (Tabelle 4.7). Die Präzisierung der 11 ADC spiegelt den Wandel in der Beschreibung und Interpretation des bronchioloalveolären Karzinoms (BAC) wider [50]. Von einer ehemals rein morphologischen Beschreibung von Tumorzellen, die entlang vorbestehender Alveolarwände wachsen, wurde die Definition des BAC deutlich enger und präziser gefasst und um ein wesentliches Merkmal der Tumorbiologie ergänzt, nämlich das Fehlen von Hinweisen für ein invasives Wachstum (ebd.). Somit wurde Kerr gefolgt und diejenigen ADC neu klassifiziert bzw. spezifiziert, die zwar auch ein sogenanntes lepidisches Wachstumsmuster aufwiesen, bei denen jedoch stellenweise ein invasives Wachstum gefunden wurde.

Aus therapeutischer Sicht ist eine präzise Definition nicht unerheblich, da es sich bei einem bronchioloalveolären Karzinom in diesem streng definierten Sinn um ein in-situ-Karzinom der Lunge handelt, das in der nicht-muzinösen Form eine sehr gute Prognose aufweist [50]. Die gemeinsame Klassifikation verschiedener Fachgesellschaften (IASLC/ATS/ERS) sowie die aktuelle WHO-Klassifikation von 2015 begegnen dieser potentiellen Verwechslungsgefahr daher durch die Verwendung der Begriffe „Adenocarcinoma-in-situ“ und „lepidisches Tumorwachstum“ als Ersatz für das „bronchioloalveoläre Karzinom“ [88, 126, 127, 128]. Zudem zeigte sich die Tumorheterogenität (siehe auch Abschnitt 5.1.2) der ADC mit einem Nebeneinander verschiedener Morphologien. In der aktuellen Klassifikation der Lungentumoren wurde empfohlen, auf die Bezeichnung „Mischtyp“ zugunsten des vorherrschenden morphologischen Haupttyps unter Berücksichtigung von weiteren Morphologien zu verzichten [126, 127].

Ältere Studien zur diagnostischen Sicherheit von histopathologischem Material aus Lungentumoren beschäftigten sich vorrangig mit der Frage nach einer sicheren Unterscheidung zwischen kleinzelligen und nichtkleinzelligen Karzinomen anhand von Biopsiematerial und meist ohne weitere Färbungen oder Spezialuntersuchungen. So konnten Thomas et al. und mehrmals Burnett et al. zeigen, dass die Unterscheidung zwischen SCLC und NSCLC im Wesentlichen ohne Probleme gelang [11, 12, 121]. Die weitere Subklassifizierung der NSCLC gestaltete sich bereits schwieriger und zeigte sich abhängig von der Tumorart: PEC wurden sicherer diagnostiziert als ADC [121]. Weitere diagnostische Verfahren zur Diagnosesicherung, wie z. B. Zytologie wurden in diese Studien bewusst nicht gewählt, um sich nur an histologischen Mustern gemäß WHO-Vorgaben zu orientieren. Zum Zeitpunkt des Erscheinens dieser Studien waren zudem noch keine therapeutischen Konsequenzen aus der möglichst genauen Differenzierung und Subtypisierung zu ziehen [11].

5.1.2 Simulation einer Biopsie

Die Simulation einer Biopsie mithilfe des TMA stellte eine „Biopsie unter besten Bedingungen“ dar, da durch Sichtung vor Entnahme aus dem im Spenderblock verfügbaren Tumor möglichst repräsentative Partien identifiziert werden konnten. Dennoch kam es zu einer Ausfallquote von 3,8 %. Die Beurteilung der „Modellbiopsien“ erfolgte ausschließlich an den HE-Schnitten des TMA. In 98 von 128 Fällen stimmten Biopsieergebnis und endgültige Diagnose überein. In den Fällen mit abweichenden Diagnosen wurde anhand der Biopsie überwiegend die Diagnose LCLC gestellt, die am Ganzschnitt korrigiert wurde.

Histologische Mischtypen stellen den größten Anteil der ADC; bis zu 80 % der Tumoren werden als solche beschrieben [130], wobei die Beschreibung eines Haupttyps empfohlen wird (siehe Abschnitt 5.1.1). Diese bereits mehrfach erwähnte Tumorerogenität stellt eines der Hauptprobleme in der Diagnostik dar, v. a. beim Vorliegen von begrenztem Tumormaterial, wie es im Rahmen verschiedener Biopsietechniken vorkommt [11, 50]. Aus den Operationspräparaten wurden die repräsentativen Anteile, d. h. das Hauptwuchsmuster „bioptiert“. Jedoch konnten in einem Großteil der Spots verschiedene Morphologien nebeneinander gesehen werden.

Die Begrenztheit einer Biopsie birgt prinzipiell die Möglichkeit einer „Überinterpretation“ [121]. Aktuell verfügbare neue Therapien erfordern auch an Biopsien eine möglichst präzise Histotypisierung von Lungentumoren über die grundsätzliche Unterscheidung SCLC/NSCLC hinaus. Eine nur konventionell-lichtmikroskopische Diagnostik anhand von HE-/PAS-Färbungen ist nicht mehr zeitgemäß und allenfalls bei eindeutigen Fällen alleine anzuwenden [126]. Somit haben sich mittlerweile immunhistochemische und molekulare Zusatzverfahren als Notwendigkeit erwiesen [88]. Prinzipiell sollte die endgültige Diagnose am Tumorsektat erfolgen, um das ganze Ausmaß des malignen Geschehens beurteilen zu können (ebd.); in einem solchen Fall steht zudem aus praktischer Sicht mehr Material für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung. Im Gegensatz zur beschriebenen teils heterogenen Tumormorphologie scheint das immunhistochemische Profil innerhalb eines Tumors deutlich weniger zu variieren. Abweichungen zwischen den Ergebnissen aus der Biopsie und dem folgenden Resektat wurden eher als ungewöhnlich beschrieben, was die Sicherheit von Diagnosen an Biopsien somit deutlich belastbarer machen könnte [47, 82].

Trotz dieser materialbedingten Limitationen ist die Biopsie Methode der Wahl. Diese sollte dann aber weiter als die Differenzierung NSCLC vs. SCLC gehen und bis zur Unterscheidung von PEC und ADC führen. Nur wenn sich trotz Nutzung von weiterführenden Methoden keine Subklassifizierung ergibt, sollte die Diagnose eines „nicht näher spezifizierbaren NSCLC“ (NSCLC-NOS) erfolgen [88]. Alternativ ist im Falle eines noch nicht abgeschlossenen Stagings die Bezeichnung NSCC-NOS zu wählen, um einer möglichen Metastasierungssituation gerecht werden zu können [126]. Die abschließende Diagnose eines LCLC ist wie die endgültige Diagnose eines in-situ-Karzinoms (siehe Abschnitt 5.1.1) nach heutiger Auffassung am bioptischen Material nicht zu stellen, sondern erfordert weiterhin die Aufarbeitung des gesamten Tumorsektats [127]. Insgesamt betrachtet ist die Biopsie jedoch trotzdem von großem Wert. Für bronchoskopisch gewonnene Proben werden Sensitivitäten von mehr als 85 % angegeben, transthorakale Feinnadelaspirationen oder Stanzbiopsien erbringen „in 70 bis 95 % wegweisendes Material“ [5].

5.2 Methodenkritik

Die Konstruktion und Nutzung der Möglichkeiten des TMA bieten entscheidende Vorteile bei der Bearbeitung größerer Untersuchungsmengen. So können eine Vielzahl von Untersuchungen am immer gleichen Gewebeausschnitt eines Zielgewebes vorgenommen werden. Diese kleinen Gewebeausschnitte entsprechen im Wesentlichen einer Biopsiesimulation. Andererseits werden mit diesem Verfahren nur sehr begrenzte Ausschnitte eines Tumors untersucht. Unter Berücksichtigung der vielfach beschriebenen Heterogenität der pulmonalen ADC bleiben somit abhängig vom Ausmaß des Tumors große Teile nicht weiterführend untersucht. Nichtsdestotrotz überwiegen die Vorteile. Alle Gewebeproben unterliegen der gleichen Behandlung und die Auswertung kann schneller erfolgen (ebd.). Voraussetzung ist ausreichend Material, das adäquat in Formalin eingebettet wurde. Hinsichtlich des Alters der Proben geben die Beschreiber der TMA-Technik keine festen Grenzen vor; die Nutzung Jahrzehnte alten Materials ist möglich.

Im vorliegenden Versuch wurde knapp drei bis 14 Jahre altes Material verwendet, pro Tumor mindestens drei Proben gewonnen, jeweils mit einem Durchmesser von 1 mm. In mehr als 93 % der Fälle wurde der Tumor im TMA abgebildet, so dass weiterführende Untersuchungen möglich waren. Gründe für Ausfälle waren hochgradige Desmoplasie mit nur sehr wenigen Tumorzellen im Spot, Schnitt- und Rissartefakte sowie den Tumor verfehlende Stanzungen.

Prinzipiell konnten in den immunhistochemischen Färbungen keine Unterschiede abhängig vom Alter des Gewebes beobachtet werden. Die schwache Sensitivität des TMA im Vergleich zu den bereits aus der Routinediagnostik vorliegenden Untersuchungen zu Ck 7 und TTF-1 bleibt unter Berücksichtigung der beschriebenen immunhistochemischen Homogenität (Abschnitt 5.1.2) unklar und unterschied sich von der weitgehenden Deckungsgleichheit bei Mukhopadhyay & Katzenstein [73].

In den FISH-Untersuchungen ergaben sich zwischen den Tumoren deutliche Unterschiede bei der Hybridisierungsintensität. Unabhängig vom Gewebeatler und der Position des Tumors auf dem Objektträger zeigten einige Tumoren sehr kräftige Hybridisierungssignale, während diese bei anderen Tumoren schwach blieben. Bei Gleichbehandlung der Proben mittels TMA bleibt die Frage nach den Gründen für diese verschiedenen Signalantworten. Neben unterschiedlichen Formalinfixierungen der Operationspräparate wäre zu erörtern, ob unterschiedliche biologische Eigenschaften der Tumoren bestehen, die zu dieser Beobachtung führen oder ob hier eine individuelle Bearbeitung die Aussagekraft erhöhen würde. Letzteres würde jedoch die Methode des TMA konterkarieren, zumal diese Technik auch für den Einsatz von molekularbiologischen Methoden wie der in-situ-Hybridisierung entwickelt wurde [45].

5.3 Einzelne Marker im Vergleich

Zur Diagnosesicherung bei bösartigen Erkrankungen gehört ein komplettes Staging zum Nachweis oder Ausschluss von Metastasen. Die Lunge ist im Rahmen zahlreicher Tumorerkrankungen Manifestationsort von Absiedlungen. Daher ist in jedem Fall bei Lungentumoren zu prüfen, ob es sich um ein primäres Lungenmalignom oder um eine pulmonale Metastase eines anderweitig lokalisierten Primarius handelt. In das vorliegende Untersuchungsmaterial wurden nur primäre Lungentumoren eingeschlossen wie das bei vergleichbaren Untersuchungen ebenfalls der Fall war. Da sich die Ergebnisse der einzelnen Studien jedoch z. T. deutlich unterscheiden, werden im Folgenden die Ergebnisse einzeln besprochen, um danach auf mögliche Zusammenhänge einzugehen.

5.3.1 Zytokeratine, TTF-1, p63, Napsin A, neuroendokrine Marker

5.3.1.1 Zytokeratin 5/6 im Wesentlichen negativ

In verschiedenen Untersuchungen, der aktuellen Leitlinie und entsprechenden Empfehlungen wird Ck 5/6 zur Unterscheidung zwischen ADC oder PEC aufgeführt [30, 88]. Daher fand Ck 5/6 aus differentialdiagnostischen Gründen Anwendung und war in 3 % der ADC und 6 % der LCLC positiv. In den neuroendokrinen Malignomen blieb dieser Marker ohne Nachweis. Die ADSQC waren erwartungsgemäß positiv für Ck 5/6.

Diese Ergebnisse decken sich z. B. mit den Untersuchungen von Kim et al., die Ck 5/6 in 2 % der ADC und in 90 % der PEC nachwies [52]. In einem etwas kleinerem Umfang war Ähnliches bereits zuvor von Nicholson et al. gezeigt worden [78]. Vergleichbare Daten fanden auch Warth et al. in einer sehr umfangreichen Studie für ADC und PEC, die LCLC zeigten mit 28 % eine deutliche höhere Expressionsrate [136]. Bei Rekhtman et al. stellten sich die Ergebnisse jedoch weniger eindeutig dar; hier zeigten sich – wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß – bis zu 18 % der ADC positiv für Ck 5/6, so dass in Kombination mit den Ergebnissen weiterer Antikörper die Autoren von einer deutlichen Immunheterogenität sprachen [93]. Entsprechend unterschieden sich auch die Beurteilung der unmittelbaren Bedeutung dieses Markers für die Differenzialdiagnostik von ADC und PEC.

5.3.1.2 Zytokeratin 7 deutlich präsent in Adenokarzinomen

Ck 7 gilt als einer der wichtigen Marker in der Diagnostik des pulmonalen ADC, v. a. zur Abgrenzung von primären Lungentumoren zu Metastasen [30, 88, 100]. Knapp 84 % der vorliegenden ADC zeigten sich positiv, wobei mit Abnahme des Differenzierungsgrades (G) der Anteil der positiven Reaktionen weniger wurde. Die LCLC waren zu 63 % positiv für diesen Antikörper. Deutlich weniger als die Hälfte der restlichen Tumorarten zeigten positive Ergebnisse für CK 7, die LCNEC insgesamt negativ. Bei den ADSQC ergab sich nur bei einem Viertel eine positive Reaktion auf Ck 7.

Für mehr als 80 % der primären pulmonalen ADC ergab sich somit der erwartete Immunphänotyp. Allerdings gilt Ck 7 in der Literatur als nicht spezifisch für pulmonale ADC. In Kombination mit anderen Markern empfahlen sich entsprechend positive ADC als primäre Lungentumoren, jedoch exprimieren auch verschiedene gynäkologische ADC Ck 7 [100]. Scarpatetti et al. bewerteten Ck 7 insgesamt als weniger hilfreich für die diagnostische Sicherung eines primären pulmonalen ADC. In deren Untersuchung zeigten sich auch die ADC der Lunge positiv, ähnliche Reaktionen fanden sich ebenfalls in pulmonalen Metastasen aus ADC der Mamma, der Prostata oder des Magens [104].

Im Rahmen der Differenzierung der primären Lungentumoren erscheint die Situation etwas übersichtlicher: In einer Übersichtsarbeit stellten Rossi et al. [98] den Immunphänotyp verschiedener Lungentumoren anhand einiger Antikörper zusammen und konnten für CK 7 positive Reaktion um 90 % für ADC, um 70 % für LCLC, dagegen 20-30 % für PEC aufzeigen; vergleichbare Zahlen fanden sich auch bei Warth et al. [136]. Demgegenüber verwiesen Rekhtman et al. auf etwas höhere Werte (30-60 %) für PEC [93], andere Autoren sahen aufgrund einer schwachen Spezifität keinen Differenzierungsgewinn durch Ck 7 [73].

Die Expression von Ck 7 in NET war in ca. 17 % der Fälle nachweisbar, in den LCNEC wurde kein Nachweis erbracht. In einer Übersicht über großzellige Lungenkarzinome stellten Rossi et al.

hingegen für 47 LCNEC eine durchgängig positive Reaktion für Ck 7 fest [97]. Yamada et al. zeigten für kombinierte *high-grade neuroendocrine carcinomas* (HGNEC) in den neuroendokrinen Anteilen mit ca. 80 % einen hohen positiv für Ck 7 reagierenden Anteil [144]. Die Aussagekraft der hier vorliegenden Ergebnisse bleibt jedoch aufgrund der geringen Fallzahl begrenzt, was sich auch in der Leitlinie widerspiegelt, wonach durch die geringe Inzidenz neuroendokriner Tumoren der Lunge keine größeren prospektiven Studien zu erwarten seien [30].

5.3.1.3 Nachweis von Ck hmw grenzt neuroendokrine Tumoren ab

Etwa 58 % der Adenokarzinome zeigten sich positiv für 34 β E12, ebenso wie 42 % der LCLC. Kim et al. untersuchten mögliche Antikörperreaktionen zur Unterscheidung zwischen PEC und ADC und sahen dabei 19 % positive Reaktionen bei den ADC und 90 % bei den PEC, zudem keine Reaktionen bei einer kleineren Zahl von Lungenmetastasen und sahen differentialdiagnostischen Wert bei der Frage ADC oder PEC [52]. Hingegen stellten Rektman et al. eine, wenn auch in der Intensität variierende (repräsentiert durch den H-Score), überwiegend positive Reaktion (82 %) für Ck hmw bei ADC und eine noch größere und homogene Reaktion für PEC fest [93]. Tendenziell ähnliche Ergebnisse zeigten auch Nicholson et al. [78].

Das vollständige Fehlen einer Reaktionen in neuroendokrinen Malignomen deckt sich mit den Untersuchungen von Sturm et al., die in einer umfangreichen Untersuchung von neuroendokrinen Proliferationen und Malignomen der Lunge keinen Nachweis von Ck hmw (34 β E12) fanden und im Umkehrschluss den positiven Nachweis als Ausschluss einer neuroendokrinen Formation werteten [118]. Ck hmw als Differenzierungsmerkmal zwischen SCLC und NSCLC sahen auch Butnor et al. [14]. Ähnlich argumentierten Viberti et al., die bei kleinerem Umfang der Studie zudem für nichtneuroendokrine Tumoren (ADC, PEC) eine nahezu vollständig positive Reaktion für Ck hmw sahen [134]. Yamada et al. wiesen bei 9 % der HGNEC Ck hmw nach [144]. Für großzellige Karzinome der Lunge fanden Rossi et al. bei 29 % eine entsprechende Reaktion [96].

5.3.1.4 Ck 20 im Wesentlichen negativ

Der positive Nachweis von Ck 20 ist für Tumoren des Gastrointestinal- und Harntraktes sowie für Merkelzellkarzinome beschrieben [100] und spielt daher eine Rolle in der Differentialdiagnostik von ADC, besonders bei der Unterscheidung zwischen Colon- und Lungenkarzinomen. Die Kombination von Ck 7 und Ck 20 wird dafür als besonders hilfreich angesehen (ebd.). Im vorliegenden Untersuchungsgut zeigten sich 5 ADC (5 %) für Ck 20 positiv. Von diesen fünf waren drei ebenfalls (kräftig) positiv für Ck 7, während die anderen zwei negativ für Ck 7 waren.

Lungentumoren mit einem positiven Nachweis von Ck 20 gelten als verdächtig auf eine Metastase eines nicht pulmonalen Tumors, jedoch sind auch für muzinöse ADC der Lunge ebensolche Nachweise beschrieben worden [77]. Bei extrapulmonalen ADC in der Anamnese bewerteten Montezuma et al. bei ähnlich starker Reaktion von Ck 20 und Ck 7 Tumoren in der Lunge als dringend metastasenverdächtig [71]. In einem der genannten Fälle aus dem vorliegenden Untersuchungsgut ergab sich ausschließlich für Ck 20 eine positive Reaktion. In diesem Fall wurde im Originalbericht auch eine mögliche Metastase eines Rektumkarzinoms diskutiert, unter Berücksichtigung der klinisch-pathologischen Gesamtsituation wurde jedoch die Diagnose eines primären Lungentumors gestellt, was noch einmal die praktische Herausforderung deutlich macht.

5.3.1.5 Kein eindeutiges Profil bei TTF-1

TTF-1 gilt als immunhistologischer Leitmarker in der Diagnostik von primären ADC der Lunge. In der vorliegenden Serie waren etwas mehr als die Hälfte der ADC, ca. 40 % der LCLC und 67 % der LCNEC positiv für die Reaktion mit TTF-1. Rekhtman et al. konnten in ihren Untersuchungen zu Immunhistoprofilen bei 89 % der untersuchten ADC eine deutliche Reaktion nachweisen; darin eingeschlossen zeigten sich auch schwach differenzierte ADC mit einer ähnlich ausgeprägten positiven Reaktion [93]. Im Vergleich dazu sahen Kim et al. mit 70 % deutlich weniger positive Reaktionen bei primären ADC der Lunge, zudem bei 10 % der untersuchten Fälle von Lungenmetastasen von nicht pulmonalen ADC [52]. In einer Übersichtsarbeit stellten Rossi et al. eine Reaktion bei 70-90 % der ADC und bei 40-50 % der LCLC fest. Zudem fanden sich kaum positive Reaktionen bei PEC, jedoch bei 70-80 % der SCLC [98]. Warth et al. zeigten ähnliche Werte, die v. a. die Abgrenzung zu PEC stützen [136]. Bei 83 % der untersuchten LCNEC sowie bei 80 % der LCLC konnten Rossi et al. in einer weiteren Studie eine Reaktion für TTF-1 zeigen [97].

5.3.1.6 Nachweis von p63 auch in Adenokarzinomen

Die Reaktion mit p63 gilt als Hinweis für das Vorliegen einer squamösen/plattenepithelialen Komponente. Entsprechend reagierten die vier eingeschlossenen ADSQC durchgehend p63-positiv. Immunhistochemische Charakterisierungen von primären PEC der Lunge ergaben im Rahmen verschiedener Studien in 90-100 % der Fälle den Nachweis von p63 [52, 86, 93, 136]; Conde et al. wiesen hingegen in unterschiedlichen Ansätzen lediglich 54 bzw. 76 % positive Reaktionen nach [22]. Etwa ein Drittel der LCLC in der vorliegenden Serie zeigten ebenfalls eine positive Reaktion, ähnlich auch [136]. Pelosi et al. konnten in einem vergleichbaren Ansatz bei 67 % der LCLC und 70 % der LCNEC p63 darstellen; zusätzlich bei 4 % der dabei untersuchten Karzinoide [86]. Im vorliegenden Untersuchungsgut fanden sich bei 25 % der ADC ebenfalls p63-positive Reaktionen, was sich in den bereits genannten Studien ebenso wiederfindet: Dort ergaben sich positive Nachweise zwischen 9 und 32 % [22, 52, 86, 93, 136], in einer weiteren Untersuchung bis zu 40 % [87].

5.3.1.7 Napsin A deutlich spezifischer für Adenokarzinome

Der positive Nachweis von Napsin A bei knapp 50 % der LCLC und 79 % der ADC deckte sich teilweise mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen zu Lungentumoren. Ueno et al. wiesen bei knapp 85 % der ADC Napsin A, jedoch nur bei 18 % der LCLC nach; demgegenüber zeigten sich keinerlei Reaktionen bei PEC, SCLC, Karzinoide (die nach neuerer Nomenklatur als NET bezeichnet werden [33], im Weiteren jedoch entsprechend den Originalarbeiten bezeichnet werden) sowie bei 6 % der pulmonalen Metastasen [131]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Kim et al. [52] sowie Johnson et al. Letztere untersuchten zudem die Abhängigkeit der Ergebnisse vom eingesetzten Antikörper (Hersteller und Klon) und sahen dabei positive Reaktionen bei 43-86 % der ADC, zudem bei 4-13 % der PEC [43]. Warth et al. wiesen bei 74 % der ADC, 32 % der LCLC und 0,7 % der PEC Napsin A nach [136]. Rossi et al. konnten mit einer Quote von 60 % deutlich mehr positive Reaktionen bei LCLC nachweisen [97]. In einer weiteren Studie ergaben sich durchweg positive Reaktionen bei pulmonalen ADC, jedoch keine Nachweise bei pulmonalen PEC sowie bei Mamma- und Kolonkarzinomen. Ein extrapulmonaler Nachweis von Napsin A zeigte sich bei etwa der Hälfte der untersuchten papillären Schilddrüsenkarzinome sowie bei fast 88 % der papillären Nierenzellkarzinome [44].

5.3.1.8 CD 56 und Chromogranin A belegen eine neuroendokrine Differenzierung

Erwartungsgemäß ergab sich bei den NET ein hoher Anteil positiver Reaktionen für CD 56 (83 %) und Chromogranin A (100 %). Yeh & Chou stellten in ihren Untersuchungen an einem größerem Kollektiv von neuroendokrinen Malignomen der Lunge (inklusive SCLC) fest, dass etwa 92 % positiv auf CD 56 und 59 % positiv auf Chromogranin A reagierten, jedoch innerhalb dieser Gruppe deutliche Unterschiede herrschten. So fanden sich für CD 56 positive Nachweise bei 100 % der LCNEC und bei mehr als 80 % der Karzinoide (NET). Für Chromogranin A zeigten sich entsprechend 41 % und mehr als 90 % positiv [146].

In der vorliegenden Untersuchung konnte CD 56 bei 67 % und Chromogranin A bei 33 % der LCNEC nachgewiesen werden. Deutlich mehr positive Reaktionen zeigten sich bei Rossi et al., die entsprechend 92 % bzw. 85 % positive Reaktionen nachwiesen [97].

Yamada et al. konnten in ihren Untersuchungen zu kombinierten Tumoren der Lunge für die adenokarzinomatösen Anteile positive Reaktionen von 14 % für CD 56 und 32 % für Chromogranin A feststellen; für die plattenepithelialen Abschnitte ergaben sich zudem für CD 56 etwas höhere Anteile [144]. In der vorliegenden Untersuchung wurden für ADC deutlich weniger positive Nachweise gezeigt: 5 % für CD 56, keine Reaktionen für Chromogranin A. Zudem waren 11 % der LCLC positiv für CD 56 und ebenfalls keines für Chromogranin A, was sich mit den Ergebnissen von Rossi et al. deckt, die bei Untersuchungen an LCLC bei 9 % positive Reaktionen für CD 56 sahen [96], während in einer weiteren Untersuchung keine Nachweise für CD 56 und Chromogranin A bei LCLC erbracht wurden [97].

5.3.2 PTEN-Expression am höchsten in großzelligen Karzinomen

Neben den differentialdiagnostisch bedeutsamen Antikörpern wurde in der vorliegenden Serie der immunhistochemische PTEN-Status erhoben. Positive Reaktionen zeigten sich bei 19 % der ADC, bei 28 % der LCLC und bei 83 % der NET, keine hingegen bei den LCNEC.

PTEN-Mutationen wurden für Glioblastome, Prostata-, Endometrium- und Magenkarzinome beschrieben. Der Mutationsstatus bei NSCLC ist bislang sehr unterschiedlich beschrieben worden, von sehr wenigen Mutationen bis sehr häufigen [58].

Übereinstimmungen ergaben sich jedoch hinsichtlich des verstärkten Verlustes des entsprechenden Proteins. Marsit et al. zeigten für operable NSCLC ohne NET mittels IHC in 74 % der Fälle eine Reduktion oder einen vollständigen Verlust des Proteins, unabhängig von Patienteneigenschaften oder Tumortypen [64]. Die Proteinexpression war jedoch bei den undifferenzierten Tumoren höher, was sich anhand der vorliegenden Daten bestätigte: Expressionszunahme von 12,5 % (ADC G 1) auf ca. 27 % (ADC G 3) sowie die bereits beschriebene 28 % bei LCLC. Identische Daten ergaben sich zudem mit 25 % für ADSQC. Mittels in-situ-Hybridisierung konnten Yun et al. in ca. 67 % der NSCLC einen Expressionsverlust aufzeigen [148]. Mit etwa 12 % bei ADC und etwa 39 % bei PEC sahen Cumberbatch et al. immunhistochemisch einen geringeren Verlust an zytoplasmatischer PTEN-Expression, zeigten jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen ADC und PEC [24].

In ihren Untersuchungen zu NET sahen Lee et al. einen Verlust der Proteinexpression in Abhängigkeit vom neuroendokrinen Subtyp. Bei den Karzinoiden (NET) zeigte sich ein Verlust zwischen 17 % und 44 %, bei den LCNEC von ca. 73 %, bei SCLC von ca. 43 %; jedoch wiesen die

Autoren auf die begrenzte Datenlage zu PTEN bei NET hin [58]. In den eigenen Untersuchungen zeigte sich eine tendenziell ähnliche Verteilung.

Die Signaltransduktion des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weges hat einen wesentlichen Einfluss auf die Regulierung des Zellzyklus inklusive Apoptose. Veränderungen in diesem System konnten bereits eine wichtige Rolle in der Entwicklung verschiedener Malignome zugeordnet werden [143]. PTEN wirkt als direkter Antagonist und nimmt eine Funktion als Tumorsuppressor ein. Darüber hinaus konnte PTEN als ein Schlüsselenzym in der Differenzierung von pulmonalen Stammzellen sowie als wichtiger Faktor in der Regeneration von pulmonalen Epithelien nach Verletzungen identifiziert werden [124, 143], so dass Veränderungen an PTEN mögliche Ursachen für die Malignomentwicklung darstellen könnten [58]. Stankovic et al. untersuchten Mutationen an p53, PTEN und p16 u. a. an NSCLC und sahen mögliche Zusammenhänge hinsichtlich Mutationsstatus und Überleben. Träger von zwei Mutationen zeigten tendenziell kürzere Überlebenszeiten, während diese bei drei Mutationen signifikant verkürzt war, so dass sich der Verdacht auf einen Einfluss auf die Tumorphagenese verstärkt [115]. Der höhere Verlust an PTEN-Expression in besser differenzierten Tumoren konnte in den Untersuchungen von Marsit et al. nicht weiter begründet werden. Verschiedene Ergebnisse weisen darauf hin, dass es in PEC möglicherweise höhere Raten von PI3K-Mutationen und erniedrigte Raten von PTEN-Expression gibt, jedoch sind keine direkten Zusammenhänge zwischen diesen Ausprägungen sowie keine klare Ursache erkennbar. Neben Genmutationen werden epigenetische Prozesse und Veränderungen in der Transkription und Translation diskutiert [9, 24, 64], so dass die genaue Rolle von PTEN in der Onkogenese nicht vollständig geklärt ist.

5.3.3 Steroidrezeptoren in Lungentumoren

Das Vorkommen und die Rolle von Steroidrezeptoren in Geweben und Tumoren außerhalb des Reproduktionstraktes ist nach wie vor Gegenstand der Diskussion. Ein genderspezifischer Aspekt der Betrachtung ergibt sich aus der Beobachtung, dass zum einen der Anteil von Frauen in der Gruppe der Tumorpatienten ohne Raucheranamnese überproportional hoch ist, zum anderen weibliche Patienten eine bessere Prognose haben [35, 69, 70, 99, 133]. In der Literatur werden mit dem Estrogenrezeptor (ER) α und dem ER β zwei Varianten des Estrogenrezeptors diskutiert. Der in diesem Rahmen untersuchte ER α wird teilweise als nur selten bis nicht existent in NSCLC beschrieben; die Rolle dieses Rezeptors bleibt unklar sowohl für die allgemeine Lungenreifung, die Onkogenese und die Prognose der Tumorerkrankung, wobei u. a. möglicherweise eine schlechtere Prognose gegeben sein könnte [35, 42, 69, 70]. Im vorliegenden Material fanden sich ein ADC G 2 und ein ADC G 3 bei zwei männlichen Patienten, bei denen sich ER nachweisen ließ. Mit dem gleichen Antikörper, der auf ER α reagiert, fanden jedoch Rouquette et. in einer bezüglich Umfang und Tumorstadium vergleichbaren Studie bei 14 % der Patientinnen und bei 4 % der Patienten eine Reaktion auf ER α [99], wobei Miki et al. auf große Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung in verschiedenen Studien hinwiesen [69]. Im Gegensatz dazu werden für ER β zwar auch deutliche Unterschiede in der Ausprägung beschrieben [35, 70, 133], jedoch scheint dieser Rezeptor an der regelrechten Lungenentwicklung beteiligt [35] und darüber hinaus möglicherweise mit einer besseren Prognose assoziiert zu sein [70]. Die genannten Quellen sprechen von einer Expression in NSCLC zwischen 45 und 94 %.

Hinsichtlich einer möglichen genderspezifischen Ätiologie von NSCLC wurden zudem Zusammenhänge zwischen ER und EGFR diskutiert [1]. So fanden sich bei Frauen ohne

Nikotinanamnese eine höhere Ausprägung von EGFR-Mutationen und ER α [67], ähnlich auch [92]. Auch hier spiegelt sich die unterschiedliche Bewertung der ER-Rezeptor-Subtypen wider. So sahen andere Arbeitsgruppen dagegen Zusammenhänge zwischen ER β und EGFR [79, 81], bzw. zwischen der gesamten ERBB-Rezeptorfamilie, zu der EGFR gehört, und Steroidhormonen [26]. Shimizu et al. untersuchten darüber hinaus die membrangebundene Form des Estrogenrezeptors (mER) und fanden hier eine prognostisch ungünstige Kombination mit EGFR [107].

Obwohl der genaue Mechanismus des Zusammenwirkens (und die Frage nach dem Rezeptorsubtyp) noch nicht gänzlich geklärt ist, könnte unter Berücksichtigung der korrekten Patientenselektion die Kombination aus antiestrogener und EGFR-inhibierender Therapie signifikante Effekte auf NCSLC-Tumorzellen haben [29, 48].

Die in diesem Rahmen untersuchten und bereits genannten Fälle mit positivem Nachweis von ER α zeigten keinen Nachweis von EGFR sowohl in der IHC- als auch der FISH-Untersuchung, das gleiche galt für die Progesteronrezeptoren.

Für die Progesteronrezeptoren ergab sich zudem ebenfalls eine sehr unterschiedliche und z. T. widersprüchliche Datenlage hinsichtlich Ausprägung und Bedeutung [48]. So ist die Expression von PR in Lungentumoren im Vergleich niedriger als in gesundem Lungengewebe [63, 114]. In Kombination mit ER wird als möglicher Effekt eine verstärkte Expression von VEGF diskutiert, was somit eine verbesserte Vaskularisierung eines Tumors zur Folge hätte [48, 63]. Im Tierversuch konnte weiterhin bei induzierten Lungentumoren durch eine Progesteron-Antagonisierung eine verbesserte Überlebenszeit gezeigt werden [20].

Prinzipiell ergeben sich durch die Suche nach geschlechtsabhängigen Merkmalen in Tumoren mögliche neue Therapieoptionen, deren Wirksamkeit jedoch noch weiterhin zu prüfen bleibt. Dies lässt die Potentiale erahnen, die sich durch eine erweiterte Differenzierung der Tumoren durch immunhistochemische und molekularbiologische Methoden ergeben. In der Literatur wird jedoch auch deutlich, dass sich bislang keine eindeutige Zielstruktur herauskristallisiert hat. Neben den verschiedenen Subtypen bspw. des ER finden sich zudem verschiedene Aussagen zu deren Bedeutung für die Onkogenese und für die mögliche prognostische Bedeutung.

5.3.4 Zusammenhänge zwischen immunhistochemischen Profilen und Diagnosen

Die Entwicklung neuer Therapieoptionen erfordert die möglichst differenzierte Diagnostik der NSCLC. Neben der lichtmikroskopischen Aufarbeitung möglichst des gesamten Tumorsektats kommen sowohl der immunhistochemischen als auch der molekularbiologischen Methodik eine wesentliche Rolle zu. Während Kerr 2009 die Diagnostik anhand des HE-Schnittes für entscheidend hielt, gestand Petersen 2010 der IHC eine hervorstechende Rolle zu [50, 88]. Die Kombination von konventioneller Mikroskopie am HE-Schnitt mit ausgewählten Antikörperreaktionen ist daher die Grundlage der Diagnostik [71] und wird in der aktuellen WHO-Klassifikation zu Lungentumoren auch gefordert [126].

Für keinen der gewählten Antikörper existieren eineindeutige Zusammenhänge hinsichtlich Sensitivität oder Spezifität. Die Kombination einzelner Antikörper erhöht jedoch die diagnostische Sicherheit. In den genannten Leitlinien zur Diagnostik und Therapie von Lungentumoren [30] wird TTF-1 als ein wichtiger Positivmarker genannt. In den vorliegenden Ergebnissen ergab sich jedoch nur bei etwa der Hälfte der ADC eine positive Reaktion, zudem wiesen auch die anderen Tumorentitäten z. T. nennenswerte positive Antikörperreaktionen auf. Petersen verwies auf die

schwierige Situation hinsichtlich TTF-1: Ein Teil der ADC habe scheinbar die Fähigkeit zur TTF-1-Expression verloren, was möglicherweise auf eine schlechtere Prognose hinweise; zudem wäre es möglich, dass bestimmte ADC aufgrund ihres Ausgangsgewebes grundsätzlich TTF-1-negativ seien [88]. Trotzdem sahen Rekhtman et al. TTF-1 und p63 als weitgehend suffiziente Kombination zur Unterscheidung von ADC und PEC an [93]. Deutlich günstigere Ergebnisse wies dagegen das in den Leitlinien nicht vertretene Napsin A auf. Knapp 80 % der ADC waren positiv und wiesen dabei eine Abhängigkeit zum Differenzierungsgrad auf. Weiterhin war die Hälfte der LCLC positiv, die restlichen Tumoren zeigten keine Reaktionen. Ebenso ergaben die Proben für CK 7 ein deutlicheres Verteilungsbild als TTF-1.

Die Verteilung und die Beziehungen einzelner Antikörper sind in den Abbildungen 4.7 und 4.9 dargestellt. 50 % der ADC zeigten eine positive Reaktion für die Kombination aus TTF-1, Napsin A und Ck 7. Die Kombination aus Napsin A und Ck 7 ergab bei knapp 68 % der ADC einen positiven Nachweis. Für die LCLC ergaben die entsprechenden Kombinationen jeweils 37 %.

Der Einsatz von Napsin A u. a. in Kombination mit Ck 7 scheint eine sinnvolle Variante zur Identifizierung von ADC der Lunge zu sein, während der alleinige Einsatz von TTF-1 eine wesentlich geringere Aussagekraft im untersuchten Gut erbrachte. Ye et al. argumentierten in eine ähnliche Richtung und sahen eine höhere Sensitivität für Napsin A im Vergleich zu TTF-1. In der Kombination beider Marker ergaben die Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe in 79 % der Fälle eine positive Doppelfärbung bei primären pulmonalen ADC und damit ein hilfreiches Mittel zur Differenzierung zwischen primären Lungentumoren (ADC) und pulmonalen Metastasen extrapulmonaler ADC [145], was sich ähnlich auch bei Bishop et al. zeigte [6]. Noh et al. kombinierten ebenfalls TTF-1 und Napsin A, erhielten dabei eine verbesserte Sensitivität für ADC, reduzierten jedoch die Spezifität. Als Einzelmarker zeigte sich Napsin A noch vor TTF-1 als am hilfreichsten für die Diagnose eines ADC [80], ähnlich auch [136]. Auch Kim et al. sahen für Napsin A leichte Vorteile bei der Diagnostik insbesondere von Metastasen primärer Lungenkarzinome [53]. Demgegenüber sahen Aulakh et al. zur Unterscheidung von ADC der Lunge gegenüber solchen des Ösophagus weder für TTF-1 noch für Napsin A differentialdiagnostischen Nutzen [3]. Die Kombination von Ck 7, TTF-1 und Napsin A erbrachte in einem großen und unselektierten Untersuchungsgut bei Warth et al. bei fast 93 % der ADC die richtige Diagnose [136]. Napsin A fand bislang in der WHO-Klassifikation von 2004 sowie in der sich in Überarbeitung befindlichen S3-Leitlinie keine Berücksichtigung, während es in den Kommentaren zur aktualisierten WHO-Klassifikation von 2015 als adäquater Marker aufgeführt wird [30, 126, 130].

Unter Berücksichtigung der Literaturlage scheint Ck 5/6 zur weiteren Differenzierung von NSCLC geeignet, da es in ADC und LCLC nur sehr wenig positive Reaktionen erbrachte. Ck 20 dient der weiteren Unterscheidung über die Herkunft eines ADC. Ein Differenzierungsgewinn bei ADC vs. PEC durch Ck hmw ist auch Rekhtman et al. folgend nicht zu erwarten [93], siehe auch [78]. Mit p63 wurde ein Marker für PEC in die vorliegende Untersuchung eingeschlossen, der sich jedoch auch in ADC (25 %) und LCLC (ca. 32 %) positiv zeigte und dadurch nicht im Sinne eines Negativmarkers zu betrachten ist. Rekhtman et al. sowie andere Autoren interpretierten einen Nachweis von p63 bei gleichzeitigem Nachweis von TTF-1 in Adenokarzinomen als nicht ungewöhnlich und damit nicht die Diagnose beeinflussend, währenddessen das Fehlen von p63 ein PEC ausschließe [52, 93]. Dagegen sind für PEC positive Nachweise von TTF-1 selten bzw. nicht vorhanden [93], ähnlich auch [73]. Im vorliegenden Material zeigten sich insgesamt sechs als ADC

identifizierte Tumoren, die sich immunhistologisch als TTF-1 –/p63 + präsentierten; vier davon zudem negativ für Napsin A (siehe auch Abbildungen 4.7 und 4.9).

Die Zahl der untersuchten neuroendokrinen Malignome war im Untersuchungsgut erwartungsgemäß gering. Der Einsatz von neuroendokrinen Markern ließ jedoch eine sehr sichere Differenzierung zwischen ADC und NET zu. Während die NET für die entsprechenden Marker (CD 56 und Chromogranin A) in sehr hohem Maße positiv reagierten, zeigten die NET nur in 17 % der Fälle eine Mitreaktion bei Ck 7 und TTF-1. Zhang et al. fanden etwas höhere Werte für TTF-1, ansonsten aber sehr ähnliche Ergebnisse [149]. Die LCNEC zeigten sich weniger eindeutig. Vor allem Chromogranin A zeigte weniger positive Reaktionen im Vergleich zu den NET, zudem waren 67 % positiv für TTF-1. Die LCLC zeigten bei CD 56 und Chromogranin A ähnliche Muster wie die ADC. Eine Veränderung der Diagnose ergab sich dadurch nicht, da geringe positive Nachweise neuroendokriner Marker für verschiedene nichtneuroendokrine Tumoren der Lunge beschrieben wurden [10]. Yeh & Chou folgerten aus ihren Ergebnissen, dass die alleinige Negativität von CD 56 ein Vorliegen eines SCLC oder eines LCNEC nahezu ausschließt [146]. An einem größeren Untersuchungsgut wäre der Einsatz neuroendokriner Marker zur weiteren sicheren Unterscheidung zwischen LCLC/ADC G 3 und LCNEC zu prüfen, da sich in Gesamtschau der IHC ein entsprechendes Profil herauskristallisierte. Weiterhin wäre der Nutzen von Ck hmw als Negativmarker für neuroendokrin differenzierte Tumoren zu evaluieren.

Die ADSQC boten immunhistochemisch eher das zu erwartende Profil eines PEC und zeigten mit TTF-1 und Ck 7 in Anteilen auch die den ADC zugeordneten Marker (siehe Tabelle 4.9). Vor allem an diesen Tumoren, die definitionsgemäß aus mehreren verschiedenen Histotypen bestehen, wird die Problematik der begrenzten Aussagekraft einer Biopsie im Vergleich zum vollständig aufgearbeiteten Operationsgut deutlich (ähnlich auch [10]). Zudem ist zu berücksichtigen, dass im Falle der „wichtigen“ Marker zwischen einer Coexpression und einer Expression dieser Marker in verschiedenen Zellpopulationen im Tumor zu unterscheiden ist, was dann für ein adenosquamöses Tumor spräche [93].

In der Literatur ergab sich erwartungsgemäß kein eindeutiges immunhistochemisches Schema zur weiteren Identifizierung und Differentialdiagnostik von NSCLC. Wesentlich bleibt die Lichtmikroskopie am HE-Schnitt, so dass das Vorgehen einer Stufendiagnostik entspricht und sich die Möglichkeiten der Differentialdiagnosen – auch unter Berücksichtigung eines korrekten Stagings – einschränken. Überwiegend kam TTF-1 zum Einsatz, welches ggf. mit Napsin A kombiniert oder im Falle von Whithaus et al. [139] durch Napsin A ersetzt wurde. Zur weiteren Unterscheidung zwischen ADC und PEC kamen darüber hinaus Ck 5/6 und/oder p63 zum Einsatz (ähnlich auch [136]). Ck 7 spielte bei dieser Fragestellung eine untergeordnete Rolle; Rossi et al. nutzten diesen Marker zur weiteren Differenzierung von LCLC [96, 97]. In der vorliegenden Untersuchung ergab sich für ADC die stärkste Ausprägung für Napsin A und Ck 7. Diese Kombination zeigte sich, zwar deutlich abgeschwächt, auch bei den LCLC. P63 zeigte sich nicht als Negativmarker bei ADC, was unter den bereits genannten Bedingungen auch nicht erforderlich scheint.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ergibt sich für die Diagnostik von ADC die Kombination aus Ck 5/6, Napsin A und Ck 7 als wegweisend. Allerdings handelte es sich um ein selektiertes Untersuchungsgut, da nur primäre Lungentumoren nach Ausschluss von PEC und SCLC und keine pulmonalen Metastasen extrapulmonaler Tumoren untersucht wurden. Aus diesem Grund ist

keine hinreichende Erhebung von Sensitivitäten und Spezifitäten der einzelnen Antikörper möglich und wäre anhand von ungefiltertem Material zu prüfen.

5.3.5 Die „Großzeller-Frage“

Gemäß der WHO-Definition sind LCLC weder SCLC noch zeigen sie Hinweise für glanduläre oder plattenepitheliale Strukturen [130]. Im Verlauf der bereits dargestellten diagnostischen und therapeutischen Entwicklungen hat sich jedoch gezeigt, dass es sich hierbei nicht um eine eigene und homogene Tumorentität handelt (u. a. [76, 96, 138]). In den zurückliegenden Reklassifikationen der WHO wurden daher bspw. die neuroendokrinen großzelligen Karzinome (LCNEC) als eigenständige Entität zusammengefasst [130] und diese in der aktuellen Klassifikation trotz großer Unterschiede mit den NET und SCLC in einer Gruppe zusammengefasst [126]. Die Diagnose eines LCNEC wird v. a. anhand einer neuroendokrinen Architektur und in den darauf folgenden Untersuchungen anhand von immunhistochemischen Untersuchungen gestellt [47, 127, 130].

Im Wesentlichen geht es bei der Aufarbeitung von LCLC um die Frage, ob es sich bei diesen um entdifferenzierte Tumoren handelt, die den bekannten Entitäten zugeordnet werden können [94]. Diese Tumoren wurden bislang als *nicht näher bezeichnete großzellige Karzinome* zusammengefasst und entsprechend als LCLC-NOS (*not otherwise specified*) bezeichnet. Grundsätzlich ist die Diagnose eines LCLC weiterhin nur als Ausschlussdiagnose und am Resektionspräparat zu stellen [126, 130], was sich anhand der bereits beschriebenen möglichen polymorphen Tumorarchitektur nachvollziehen lässt.

Noch weniger als für ADC existierten für LCLC verlässliche positive Marker, die eine weiterführende Diagnose zuließen [88, 123]. In verschiedenen Studien zur näheren Charakterisierung zeigten sich jedoch deutliche Hinweise, dass es sich bei LCLC nicht um eine eigene Entität handelt, sondern dass sich nach immunhistochemischer Aufarbeitung der größte Teil als entdifferenzierte ADC, ein kleinerer Teil als entdifferenzierte PEC darstellte [97]. Es kam dabei in der Regel nur eine begrenzte Zahl von Antikörpern zum Einsatz, mehrheitlich TTF-1 und p63 [41, 47, 80, 94]; Mukhopadhyay & Katzenstein nutzen für diese Frage TTF-1, Napsin A, p63 und Ck 5/6 [73]. Pardo et al. nutzen dagegen sieben Antikörper [85]. Während Kayser et al. bereits bei LCLC mit einer positiven Reaktion für TTF-1 die Diagnose ADC stellten [47], formulierten Travis et al. am Biopsiepräparat bei entsprechenden Antikörperreaktionen etwas zurückhaltender die Empfehlung zum „*NSCLC-favor adenocarcinoma*“ oder „*NSCLC-favor squamous cell carcinoma*“ [128]. Nach Aufarbeitung am Resektat ergibt sich nun gemäß der WHO-Klassifikation von 2015 bei soliden Tumoren eine weiterführende Diagnose. LCLC, die positiv für TTF-1 reagieren, werden als ADC bezeichnet, entsprechend werden LCLC, die positiv für p40 reagieren als PEC reklassifiziert [126]. Die damit deutlich schrumpfende Kategorie der LCLC-NOS beschreibt somit die Karzinome, die sich auch mittels weiterführender Methoden nicht näher beschreiben lassen.

Kerr sah hingegen keinen Grund die morphologische Klassifikation durch eine molekulare zu ersetzen: Das Vorhandensein von immunhistochemischen Markern ändere nicht die Diagnose eines entdifferenzierten Tumors, zudem sei im Rahmen einer morphologisch basierten Klassifikation eine Kategorie für undifferenzierte Tumoren legitim [51].

Wie auch im Rahmen anderer Studien [94, 96] ist im vorliegenden Material bei den LCLC eine Ähnlichkeit zu den ADC auszumachen, sowohl für die zu erwartenden positiven als auch negativen Ergebnisse (siehe Tabelle 4.9, Abbildung 4.7). Die LCLC mit positivem Nachweis von squamösen

Markern (p63, Ck 5/6) zeigten sich gleichzeitig positiv für TTF-1, teils auch für Napsin A, was eher auf eine adenokarzinomatöse Differenzierung hinweist. Warth et al. beschrieben diese undifferenzierten Karzinome dagegen als „*NSCLC NOS, möglicherweise ADSQC*“ [136]. Weitere zehn LCLC der vorliegenden Reihe waren für TTF-1 und p63 jeweils negativ, entsprechend LCLC-NOS.

Zur Vorstellung der LCLC als einer entdifferenzierten Variante von ADC würde zudem die abnehmende Expression von Napsin A und Ck 7 entsprechend des Verlustes der histomorphologischen Differenzierung passen, was ähnlich auch von verschiedenen Autoren [6, 74, 117] beschrieben wurde. Der aktualisierten WHO-Klassifikation folgend, ergäbe sich aus den vorliegenden LCLC bei drei Fällen eine Reklassifizierung zu soliden ADC [126]. Die „Favorisierung“ zum Adenokarzinom betrifft vor allem die Frage nach möglichen klinischen Konsequenzen. Rekhtman et al. zeigten in ihren Untersuchungen, dass die LCLC eine ähnliche Häufigkeit an therapeutisch relevanten molekularen Veränderungen aufwies wie entsprechende differenzierte Karzinome [94] (ähnlich auch [89, 136]), was eine weiterführende Diagnostik jenseits morphologischer Klassifikationen sinnvoll erscheinen lässt und letztlich im internationalen Konsens auch gefordert wird [126, 127].

5.4 Molekulare Zielstrukturen

Die weitere Charakterisierung von Tumoren konnte neue und therapeutisch nutzbare Zielstrukturen identifizieren, die als prädiktive Marker betrachtet werden. Bei pulmonalen Tumoren werden neben verschiedenen anderen die Zielstrukturen EGFR und ALK untersucht. EGFR ist ein solcher prädiktiver Faktor. Bei Vorliegen bestimmter Mutationen ist eine gezielte Therapie mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor möglich, was in ähnlicher Form auch für ALK gilt. Normalerweise schließen sich diese Mutationen gegenseitig aus, jedoch sind eine Reihe von Fällen mit koexistenten Veränderungen beschrieben worden [4].

Im vorliegenden, selektierten Material wurde der Status mit einer Kombination aus immunhistochemischer und molekularbiologischer Technik erhoben.

5.4.1 EGFR

Die gewählten Methoden lieferten vor allem bei EGFR etwas voneinander abweichende Ergebnisse. Während sich mittels IHC ca. 12 % der ADC und 21 % der LCLC positiv zeigten, ergab die FISH-Analyse jeweils 6 % und 11 % positive Nachweise.

Zur biologischen Rolle und Verteilung von EGFR finden sich unterschiedliche Angaben. Weitgehend Einigkeit besteht hinsichtlich der Bedeutung von verändertem EGFR im Rahmen einer individualisierten Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) [25, 36, 54, 61]. Deren Einsatz speziell gegen EGFR wird derzeit als beste Therapiestrategie gegen entsprechend mutierte NSCLC angesehen. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich dies auf nichtsquamöse Lungentumoren bezieht, während der Nutzen bei PEC bislang nicht gezeigt werden konnte [56, 49]. Jedoch reagieren nicht alle Tumoren mit einer aktivierten Mutation auf eine TKI-Therapie, während hingegen geringe Anteile nichtmutierter Tumoren auf TKI ansprechen [66].

Der Anteil von Tumoren mit *Mutationen* am EGFR-Gen wird mit 10-15 % aller NSCLC beschrieben [25, 106], z. T. auch mit 17-20 % der ADC [95, 109]. In Asien ist die Ausprägung mit bis zu 40-50 % deutlich höher [17, 25, 38, 106]. An einem größeren nicht selektiertem Patientengut konnten Skov

et al. bei 5,4 % EGFR-Mutationen nachweisen und sahen dabei keine Zusammenhänge zu Alter oder Geschlecht der Patienten, konnten jedoch zeigen, dass Mutationen öfter bei Patienten nachzuweisen waren, die nie in ihrem Leben geraucht hatten. Zudem wiesen ADC häufiger als PEC Mutationen auf [112]. Ca. 90 % der Mutationen betreffen die Exone 19 und 21, der übrige Anteil betrifft Mutationen in den Exonen 18 und 20 [106].

Für die 10 % der vor allem fortgeschrittenen NSCLC, die auf eine entsprechende TKI-Therapie reagieren, tragen 75 % eine der bekannten Mutationen, während der Wirkmechanismus bei den restlichen 25 % unklar bleibt [109].

Der Anteil der Tumoren mit erhöhten *Genkopien* wird mit 20-60 % angegeben, wobei in diesen Untersuchungen auch polysome Ergebnisse berücksichtigt wurden, die in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt wurden [27, 37, 40].

Die Angaben für die verstärkte EGFR-Expression in NSCLC schwankten stark und zeigten sich zudem vom histologischen Typ abhängig. Peterson et al. wiesen in ihren Untersuchungen in 77 % der PEC und abhängig von der Morphologie in 12-63 % der ADC sowie in 23 % der LCLC eine EGFR-Expression nach [90]. Gaber et al. sahen an einem gemischten Gut von NSCLC abhängig vom eingesetzten Antikörper (darunter der hier verwendete 31G7) und der Bewertungsmethode in ca. 63-89 % der Fälle eine Überexpression [27], was deutlich mehr war als im vorliegenden Untersuchungsgut. Ähnliche Zahlen fanden sich auch bei Sholl et al. [109].

Die Wahl der Methode zum Nachweis von potentiell therapeutisch nutzbaren EGFR-Veränderungen wird kontrovers diskutiert. So zogen z. B. Wang et al. sowie Sholl et al. die Mutationsanalyse allen anderen Verfahren vor [109, 135], während andere Autoren die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung oder die Immunhistochemie als suffizient bewerteten. Rüschoff et al. sahen in der EGFR-IHC eine Möglichkeit zur Identifizierung von möglichen Zielgruppen für eine Therapie mit TKI, während sie für die FISH keine entsprechenden Ergebnisse zeigen konnten [101].

Hirsch et al. sahen bei der Mehrheit der Patienten mit erhöhter Genkopie auch eine relevante EGFR-Expression; weiterhin zeigten die meisten Patienten mit EGFR-Mutationen auch erhöhte Genkopien und erhöhte Expressionsmuster [40], Ähnliches zeigten auch Wang et al. [135].

Gaber et al. betonten ebenso die fehlende Einigkeit über die richtige Identifikation von therapierelevanten EGFR-Ausprägungen in NSCLC [27]. Neben der Wahl des Antikörpers für die IHC sowie der Entscheidungsgrenzen (*Cut-offs*) ergeben sich bei der FISH Schwierigkeiten vor allem bei niedriger Amplifikation. Zudem wiesen diese Autoren auf eine heterogene Verteilung von EGFR-Gen-Veränderungen hin, was im Kontrast zur bereits beschriebenen immunhistochemischen Tumorphomogenität steht (Abschnitt 5.1.2).

Weiterhin verwiesen u. a. Sholl et al. sowie Gaber et al. auf den unsicheren Zusammenhang zwischen EGFR-Überexpression und dem möglichen Erfolg einer TKI-Therapie [27, 109]. Erhöhte Genkopien wurden zudem auch bei NSCLC mit nicht mutiertem EGFR (wild type-EGFR, wt-EGFR) nachgewiesen [135], für die Sholl et al. keinen Vorteil durch TKI-Therapie beschrieben, während die Kombination aus aktivierter EGFR-Mutation und erhöhter Genkopie als therapierelevant erschien [109].

In den hier vorliegenden Daten ergaben sich bei 6 ADC-EGFR-FISH-pos. und 11 ADC-EGFR-IHC-pos. drei Übereinstimmungen, bei den LCLC waren es zwei Übereinstimmungen bei 2 LCLC-EGFR-FISH-

pos. und 4 LCLC-EGFR-IHC-pos. Bei der Verteilung der Geschlechter innerhalb der EGFR-positiven Fälle zeigte sich eine leichte Verschiebung (ca. 59 % männlich und 41 % weiblich bzw. hälftig bei den FISH-Untersuchungen) im Vergleich zur gesamten Untersuchungspopulation. Keine wesentlichen Abweichungen zeigte das durchschnittliche Alter zum Operationszeitpunkt.

Aktuell zeigten sich deutliche Unterschiede sowohl in der Beschreibung der Häufigkeit der EGFR-Veränderungen als auch der in der Bewertung der einzelnen Verfahren. Der alleinige Nachweis einer EGFR-Überexpression wurde von den meisten Autoren nicht als hinreichend für die TKI-Therapiefähigkeit beurteilt. Mascaux et al. sahen jedoch in der Verwendung eines sehr spezifischen, am intrazellulären Anteil von veränderten EGFR-Molekülen angreifenden Antikörpers eine sehr aussichtsreiche Möglichkeit zur Vorhersage eines TKI-Therapieerfolges [66]. Die Kombination von IHC und FISH wurde teilweise als suffizient zur Identifizierung für eine TKI-Therapie betrachtet. Alternativ fanden sich mehrstufige Verfahren, bei denen die IHC als Screeningmethode einer FISH oder Mutationsanalyse vorgeschaltet wurde. Dieses Screening wurde z. T. als tatsächliche Vorauswahl, z. T. jedoch als Ergänzung aufgefasst, da auch weiterhin die molekularbiologische Aufarbeitung von IHC-negativen Proben diskutiert wurde [111]. Aufgrund der fehlenden bzw. unvollständigen Kongruenz der Ergebnisse der einzelnen Methoden sowie den uneinheitlichen Angaben zur jeweils prädiktiven Aussage bleibt nach wie vor die Kombination der Methoden, um geeignete Kandidaten für eine TKI-Therapie herauszufiltern. Der Einsatz der IHC böte bei Wahl des geeigneten Antikörpers den Vorteil der breiten Verfügbarkeit sowie der kurzen Bearbeitungszeit bei vergleichbar geringem Aufwand.

5.4.2 ALK

Eine weitere Zielstruktur ist ALK, welches sich im vorliegenden Material nur einmal sicher nachweisen ließ. Nachdem diese Struktur 2007 von Soda et al. als mögliche therapeutische Option beschrieben wurde [113], findet sich mit Crizotinib eine entsprechende Substanz im Einsatz, mit Ceritinib wurde eine weitere Substanz 2014 von der FDA zugelassen.

Für ALK stellte sich im Vergleich zu EGFR eine etwas übersichtlichere Situation dar. Die Analyse des Status mittels FISH wird als Mittel der Wahl betrachtet [2, 15, 119], der immunhistochemische Nachweis des entsprechenden Proteins wird derzeit als Screening-Methode diskutiert. Daneben findet zudem die RT-PCR außerhalb der Routinediagnostik Anwendung.

Die Frequenz von nachweisbaren Veränderungen am ALK-Gen wurde teilweise für NSCLC, teilweise nur für pulmonale ADC mit 3-6,7 % angegeben, Yi et al. sahen an einem reinen Nichtraucherkollektiv 9,9 % [2, 15, 31, 103, 147]. Mit großer Mehrheit wurden diese Veränderungen an ADC festgestellt. Hinsichtlich der Charakteristika der entsprechenden Patienten bestand keine durchgehende Übereinstimmung. Einige Autoren beschrieben eher jüngere Patienten, ohne relevante Raucheranamnese [2, 31, 32, 65, 147], eher weiblich, jedoch ohne Einfluss des Alters [15], während an anderer Stelle keine Zusammenhänge von Alter, Geschlecht oder Raucherstatus gesehen wurde [83, 103]. Bis auf wenige Ausnahmen [15, 32, 108] wurde zudem die Exklusivität von EGFR- und ALK- sowie RAS-Mutationen beschrieben, was sich in den vorliegenden Daten für EGFR und ALK ebenfalls zeigte.

Während die FISH als Goldstandard zur Diagnostik von Mutationen des ALK-Gens gehandelt wird und im Gegensatz zur ebenfalls hochsensitiven RT-PCR auch in der Lage ist unbekannte Rearrangements zu erkennen [2, 65], wird der Einsatz der IHC als probater Ersatz noch diskutiert. Verschiedene Autoren betonten die hohe Sensitivität der IHC bei Wahl des richtigen Antikörpers

(u. a. der auch hier gewählte 5A4) und diskutierten ein zweistufiges Diagnostikkonzept: Einem IHC-Screening folgt die Überprüfung der positiven Fälle mittels FISH [16, 65]. Die unzureichende Spezifität der IHC wurde von weiteren Autoren aufgegriffen, zudem verwiesen Camidge et al. auf die auch in diesem Rahmen thematisierte Definition von geeigneten Cut-offs bei der Auswertung der IHC, sahen aber gleichzeitig in ihren Untersuchungen den Antikörperklon D5F3 als suffizient für die Auswahl geeigneter Patienten [16, 119]. Cabillic et al. zeigten anhand ihrer Untersuchungen hingegen, dass nur eine Kombination beider Verfahren ohne Stufenkonzept die diagnostische Sicherheit erhöhe, da die Diskonkordanz beider Verfahren teils erheblich sei [15]. Diese Erkenntnis spiegelte sich auch in den Phase 1-Studien zu Crizotinib wider. Hier hatten Patienten mit einer positiven Kombination aus FISH und IHC ein besseres Ansprechen als diejenigen nur mit einem FISH-Nachweis [32].

Im vorliegenden Untersuchungsgut wurden alle auffälligen ALK-TMA-Befunde einer weiteren Untersuchung am Ganzschnitt unterzogen, was im Gegensatz zum TMA der klinisch-pathologischen Routine entspräche (siehe Tabelle 4.12). Hier hatte sich eine Übereinstimmung zwischen FISH und IHC ergeben, während sich ein positiver IHC-Befund in der FISH nicht bestätigte. Han et al. bewerteten solche Situationen als problematisch, da das Ergebnis einer der beiden Methode nicht abschließend als falsch-positiv oder falsch-negativ zu beschreiben sei, was die kritische Begutachtung besonders der diskrepanten Ergebnisse erfordere. Durch den Einsatz der RT-PCR mit hoher Spezifität bei geringerer Sensitivität könnte in grenzwertige Fällen eine verbesserte Aussage erfolgen [32]. Die Ursachen könnten neben präanalytischen Faktoren in anderen strukturellen Veränderungen zu suchen sein, die ebenfalls zu einer Proteinexpression führen könnten, Cabillic et al. führten bspw. ALK-Amplifikationen oder Punktmutationen an [15]. Die Expression des ALK-Proteins korreliert demzufolge auch nicht mit dem Typ des Rearrangements [108], eine schwache Expression könnte jedoch auch mit einem Funktionsdefizit infolge der strukturellen Veränderung am Genort zusammenhängen (ähnlich auch [147]).

Eine abschließende Bewertung ist jedoch aus den vorliegenden Daten nicht zu erheben. Es zeigte sich aber die geringe Frequenz dieser Mutationen, was zudem die Fehleranfälligkeit für statistische Aussagen erhöht. Bei einer von Palmer et al. geschätzten Zahl von etwa 45.000 ALK-positiven Fällen weltweit [84] und einem mehrfach beschriebenen Therapievorteil bleibt die Screeningmethode jedoch weiterhin intensiv zu diskutieren. Unter Berücksichtigung der kontrovers beschriebenen Sensitivität und vor allem Spezifität der IHC bliebe die vergleichsweise aufwendige FISH-Technik bei bestimmten histopathologischen Typen des NSCLC (ADC, LCLC, Tumoren mit adenokarzinomatösen Anteilen) die Methode der Wahl [62, 119]. Dennoch ist trotz des vergleichsweise geringen Studiumumfangs die IHC als Screening als vielversprechend anzusehen.

5.5 Überleben

Für 115 Patienten wurde die Überlebenszeit nach Kaplan-Meier geschätzt. Über alle Personen ergab sich eine mittlere postoperative Überlebenszeit von 81 Monaten. Je fortgeschrittener das Tumorstadium zum Operationszeitpunkt war, desto schlechter war die Prognose. Lediglich das Stadium IIIA zeigte einen negativeren Verlauf als das Stadium IIIB. Es ist jedoch die Selektion zu berücksichtigen, da primär inoperable Tumoren aufgrund des Studiendesigns keinen Eingang in die Berechnungen fanden.

Eine weitere Aufschlüsselung der Überlebensdaten erfolgte aufgrund der dafür geringen Fallzahl nicht. Zudem waren die vorliegenden klinisch-pathologischen Daten nicht vollständig. Somit konnten keine hinreichenden Aussagen zur Abhängigkeit des Verlaufs von der Raucheranamnese und vor allem zu Komorbiditäten oder auch immunhistochemischen/molekularbiologischen Charakteristika gemacht werden. Auch die von Rekhtman et al. erwähnten Studien zur verminderten Überlebenszeit bei gering differenzierten Adenokarzinomen im Vergleich zu besser differenzierten im gleichen Tumorstadium [94] (ähnlich auch [41]) wurden nicht überprüft, um aus den vorgenannten Gründen keine Überinterpretation herzustellen.

6 Zusammenfassung

Lungenkarzinome nehmen weltweit eine führende Rolle bei Erkrankungshäufigkeit und Mortalität ein. Aufgrund von diagnostischen und therapeutischen Weiterentwicklungen ist die möglichst genaue Differenzierung zu einer wesentlichen klinisch-pathologischen Fragestellung geworden. Im besten Fall liegen für die weiteren Untersuchungen vollständige Operationspräparate zur Verfügung. Da jedoch die Diagnose sehr häufig in einem fortgeschrittenen, inoperablen Stadium gestellt wird, müssen aussagekräftige Ergebnisse möglichst auch am Biopsiematerial gewonnen werden. Eine besondere Herausforderung ergibt sich im Falle der LCLC, deren Rolle als eigene Tumorentität oder als entdifferenzierte Form von ADC oder PEC dauerhaft Gegenstand der Diskussion ist.

Auf der Grundlage von operierten primären Lungentumoren aus zehn Jahrgängen der Universitätsmedizin Rostock wurden zunächst in einer Zweitbegutachtung die bestehenden Diagnosen überprüft. Aus den originalen Tumorparaffinblöcken wurde ein TMA erstellt, um zum einen eine Modellbiopsie und zum anderen immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung der Tumoren durchführen zu können.

Es konnten aus dem Archiv des Instituts für Pathologie 285 operierte primäre Lungentumoren identifiziert werden. Etwa die Hälfte wurde bei Erstdiagnose als ADC und LCLC beschrieben. PEC wurden nicht weiter begutachtet. Bei neun Tumoren wurde die Erstdiagnose im Rahmen der Zweitbegutachtung revidiert. Außerdem wurden die Diagnosen der BAC im Sinne der aktuellen Klassifikation (IASLC/ATS/ERS) präzisiert, womit auf die prognostisch bedeutsame Unterscheidung zwischen generellem Wachstumsmuster und der Frage nach Invasivität des Tumors eingegangen wurde.

Die Simulation einer Biopsie unter besten Bedingungen mit Hilfe eines TMA zeigte anhand von HE-Schnitten in 77 % der 133 Fälle eine Übereinstimmung mit der endgültigen Diagnose. Mit diesem TMA wurden insgesamt 128 ADC, LCLC, NET, LCNEC und ADSQC immunhistochemisch charakterisiert. Dafür wurden u. a. Antikörper gegen TTF-1, Ck 7, p63 und der nach wie vor für diese Fragestellung nicht regelhaft als Routine in Pathologieinstituten eingesetzte Napsin A-Antikörper verwendet. Für keinen der gewählten Antikörper konnte eine eindeutige Zuordnung erfolgen. Das für die Diagnose eines ADC wichtige TTF-1 zeigte sich nur bei der Hälfte dieser Tumoren positiv. Napsin A hingegen konnte in 80 % der ADC nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine Abnahme der Expression mit Abnahme der Gewebedifferenzierung, die LCLC exprimierten ebenfalls zur Hälfte Napsin A, die restlichen Tumorentitäten blieben negativ. Unter Berücksichtigung des selektierten Untersuchungsgutes ergab sich für ADC die Kombination von Ck 5/6, Napsin A und Ck 7 als wegweisend für die ergänzende Diagnostik von ADC. Die übrigen Marker erbrachten für ADC keine richtungsweisenden Ergebnisse. Die LCLC präsentierten erwartungsgemäß kein einheitliches immunhistochemisches Profil, jedoch zeigten sich teils deutliche Ähnlichkeiten zu den ADC, die die Einordnung der LCLC als entdifferenzierte Variante von v. a. ADC unterstützen. Die hier untersuchten NET ließen sich immunhistochemisch weitestgehend abgrenzen.

Eine Diagnose ausschließlich durch immunhistologische Verfahren ist aktuell nicht möglich, die konventionelle Lichtmikroskopie am HE-Schnitt bleibt die Grundlage der Diagnostik. Die Kombination beider Verfahren gilt mittlerweile als obligat.

Die Identifikation molekularer Zielstrukturen wie EGFR und ALK dient hingegen nicht der Diagnosefindung, sondern bereitet Therapieentscheidungen vor. Bei EGFR zeigten sich in der Literatur stark divergente Daten. Zudem spiegelte sich vorliegend die unklare Situation hinsichtlich der verlässlichsten Diagnosestrategie wider, bei der sich in der IHC deutlich mehr positive EGFR-Nachweise als bei der FISH ergaben und beide Methoden nur teilweise deckungsgleiche Ergebnisse lieferten. Daher wird auch weiterhin von den meisten Autoren ein mehrstufiges Screeningverfahren oder eine Kombination aus verschiedenen Detektionsmethoden befürwortet. Der Nachweis einer ALK-Translokation gelang sicher nur einmal, was im erwarteten Rahmen lag. Als sichere Nachweismethode bleibt die FISH erste Wahl, die IHC ist ein Screening-Verfahren. Für beide Onkogene zeigten sich keine wesentlichen Besonderheiten beim Alter der Patienten, bei EGFR ergab sich eine leichte Verschiebung zum weiblichen Geschlecht.

Die Untersuchungen auf Steroidrezeptoren und GATA-3 erbrachte weder Hinweise für vorliegende Metastasierungen noch für eine mehrfach diskutierte Überexpression von ER und PR in primären Lungentumoren. PTEN, dessen Rolle nach wie vor unklar ist, zeigte einen deutlichen Verlust der Expression, wobei die am stärksten differenzierten Tumoren (ADC G 1) die höchste Verlustrate zeigten.

Die Überlebenszeitanalyse ergab eine mittlere Überlebenszeit von 81 Monaten nach Operation bei selektionsbedingter Verschiebung zugunsten von primär operationsfähigen Tumoren. Die Überlebenszeit sank mit Ausdehnung der Erkrankung.

7 Thesen

1. Lungenkarzinome gehören zu den wichtigsten Erkrankungen und Todesursachen. Bedingt durch Weiterentwicklungen in Diagnostik und Therapie in den vergangenen Jahren ist die möglichst präzise Diagnostik auf der Grundlage von konventioneller Lichtmikroskopie in Verbindung mit immunhistochemischen und molekularbiologischen Verfahren unabdingbar geworden.
2. Aus dem pathologischen Archiv der Universitätsmedizin Rostock wurden alle primären operierten Lungenkarzinome der Jahre 2000 bis einschließlich 2009 herausgesucht. Es ergaben sich 268 Patienten, die 285 Malignome aufwiesen. Von den Originaldiagnosen ausgehend waren ca. 41 % Adenokarzinome (ADC), ca. 46 % Plattenepithelkarzinome (PEC), ca. 8 % großzellige Karzinome (LCLC), darüber hinaus in geringem Umfang neuroendokrine Tumoren (NET), großzellige neuroendokrine Karzinome (LCNEC), adenosquamöse Karzinome (ADSQC) und pleomorphe Karzinome (plCa), ein Karzinosarkom und ein nichtkleinzelliges Karzinom (NSCLC) in Kombination mit einem kleinzelligem Karzinom (SCLC). Männliche Patienten überwogen mit ca. 79 %, das durchschnittliche Alter bei OP lag bei 65 Jahren.
3. Das Untersuchungsgut wurde nach Anwendung der Ausschlusskriterien einer Zweitbegutachtung unterzogen. Es wurden neun Tumoren (7 %) reklassifiziert. Die Diagnosen von 12 Tumoren wurden präzisiert, was überwiegend die Fragestellung des BAC betraf. Damit wurde auf die von der aktuellen Klassifikation von Lungentumoren empfohlene Unterscheidung zwischen lepidischem Tumorwachstum und Adenocarcinoma-in-situ eingegangen.
4. Die Sicherheit einer Diagnose am Biopsiepräparat ist von großer Bedeutung, da die Erkrankung bei Diagnosestellung bereits häufig fortgeschritten ist. Aus den archivierten Paraffinblöcken der Tumoren wurde ein Tissue Microarray (TMA) angefertigt, womit eine Biopsie simuliert wurde. Bei Verwendung nur der HE-Färbung stimmte die Diagnose der simulierten Biopsie in 98 von 128 auswertbaren Fällen (77 %) mit der endgültigen Diagnose überein.
5. Der TMA wurde zudem verwendet, um die Rolle der Immunhistologie bei der Diagnostik zu untersuchen. Etwa die Hälfte der ADC zeigte sich positiv für TTF-1, während das in der noch gültigen Leitlinie nicht vertretene Napsin A zu 80 % positiv war. Kombinationen von Antikörpern können die Aussagekraft jedoch erhöhen. Als Ergebnis dieser Untersuchungen empfahl sich für die Diagnose eines ADC die Kombination von Ck 5/6, Napsin A und Ck 7. NET stellten sich mit CD 56 und Chromogranin A eindeutig dar. Ck hmw bleibt als Ausschlussmarker für neuroendokrine Malignome zu prüfen.
6. Die Zuordnung der LCLC ist weiterhin in Schweben. Immunhistochemisch ergab sich eine teils starke Ähnlichkeit zum Immunprofil der ADC. Dazu passt die abnehmende Expression von Napsin A und Ck 7 von ADC G1 über ADC G3 zu LCLC. Die Konsequenzen aus der Immunhistologie für LCLC wurden zuletzt unterschiedlich diskutiert, einerseits eine weitergehende Diagnose definierend, andererseits ohne Einfluss nehmend. In der aktuellen WHO-Klassifikation wurde jedoch eine deutlichere Zuordnung zu bestimmten Histotypen festgelegt.

7. Die postoperative mittlere Überlebenszeit betrug 81 Monate bei selektionsbedingter Verschiebung zugunsten von primär operationsfähigen Tumoren. Je höher das Tumorstadium (nach UICC), desto niedriger war die Überlebenszeit.

8. Der Nachweis von EGFR-Veränderungen ist sehr methodenabhängig. In den immunhistochemischen Untersuchungen (IHC) waren ca. 12 % der ADC und 21 % der LCLC positiv, in der Analyse mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) jeweils 6 % und 11 %. Entsprechende Studien zeigen teils deutliche Unterschiede in der Häufigkeit der Veränderungen und bewerten ebenso die Nachweismethoden sehr differenziert. Die Kombination von IHC und FISH wird als zuverlässige Detektionsmethode diskutiert. Der Einsatz der Mutationsanalyse wird in einigen Arbeiten als ergänzend oder als überlegen beschrieben.

9. Im Untersuchungsgut fand sich nur ein Tumor, für den eine ALK-Translokation per FISH nachgewiesen werden konnte, was im erwarteten Rahmen lag. Die FISH wird als Mittel der Wahl gewertet, die IHC wird als Screening-Methode diskutiert.

Literaturverzeichnis

- [1] Alberg, A. J., Wallace, K., Silvestri, G. A., und Brock, M. V. 2013. Invited commentary: the etiology of lung cancer in men compared with women. *Am. J. Epidemiol.* 177, 7, 613–616.
- [2] Ali, G., Proietti, A., Pelliccioni, S., Niccoli, C., Lupi, C., Sensi, E., Giannini, R., Borrelli, N., Menghi, M., Chella, A., Ribechini, A., Cappuzzo, F., Melfi, F., Lucchi, M., Mussi, A., und Fontanini, G. 2014. ALK Rearrangement in a Large Series of Consecutive Non-Small Cell Lung Cancers: Comparison Between a New Immunohistochemical Approach and Fluorescence In Situ Hybridization for the Screening of Patients Eligible for Crizotinib Treatment. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 138, 11, 1449–1458.
- [3] Aulakh, K. S., Chisholm, C. D., Smith, D. A., und Speights, V. O. 2013. TTF-1 and napsin A do not differentiate metastatic lung adenocarcinomas from primary esophageal adenocarcinomas: proposal of a novel staining panel. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 137, 8, 1094–1098.
- [4] Baldi, L., Mengoli, M. C., Bisagni, A., Banzi, M. C., Boni, C., und Rossi, G. 2014. Concomitant EGFR mutation and ALK rearrangement in lung adenocarcinoma is more frequent than expected: Report of a case and review of the literature with demonstration of genes alteration into the same tumor cells. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*.
- [5] Binder, D., Tessmer, A., und Suttorp, N. 2012. Lungentumoren. In *Harrisons Innere Medizin*, M. Dietel, N. Suttorp und M. Zeitz, Eds. Medizin. Lehmanns Media LOB.de, [Berlin], 789–806.
- [6] Bishop, J. A., Sharma, R., und Illei, P. B. 2010. Napsin A and thyroid transcription factor-1 expression in carcinomas of the lung, breast, pancreas, colon, kidney, thyroid, and malignant mesothelioma. *Human Pathology* 41, 1, 20–25.
- [7] Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U., und Aguzzi, A., Eds. 2004. *Pathologie*. Elsevier, Urban und Fischer, München [u.a.].
- [8] Böcker, W., Kleihues, P., Höfler, H. K., Lax, S., Poremba, C., und Moll, R. 2004. Allgemeine Tumorpathologie. In *Pathologie*, W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz und A. Aguzzi, Eds. Elsevier, Urban und Fischer, München [u.a.], 169–218.
- [9] Braccini, L., Ciralo, E., Martini, M., Pirali, T., Germena, G., Rolfo, K., und Hirsch, E. 2012. PI3K keeps the balance between metabolism and cancer. *Advances in Biological Regulation* 52, 3, 389–405.
- [10] Brunnström, H., Johansson, L., Jirström, K., Jönsson, M., Jönsson, P., und Planck, M. 2013. Immunohistochemistry in the differential diagnostics of primary lung cancer: an investigation within the Southern Swedish Lung Cancer Study. *Am. J. Clin. Pathol.* 140, 1, 37–46.
- [11] Burnett, R. A., Howatson, S. R., Lang, S., Lee, F. D., Lessells, A. M., McLaren, K. M., Nairn, E. R., Ogston, S., Robertson, A. J., Simpson, J. G., Smith, G. D., Tavadia, H. B., und Walker, F. 1996. Observer variability in histopathological reporting of non-small cell lung carcinoma on bronchial biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* 49, 2, 130–133.
- [12] Burnett, R. A., Swanson Beck, J., Howatson, S. R., Lee, F. D., Lessells, A. M., McLaren, K. M., Ogston, S., Robertson, A. J., Simpson, J. G., und Smith, G. D. 1994. Observer variability in histopathological reporting of malignant bronchial biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* 47, 8, 711–713.
- [13] Buselmaier, W. und Tariverdian, G. 2007. *Humangenetik. Mit 162 Tabellen*. Springer-Lehrbuch. Springer, Heidelberg.

- [14] Butnor, K. J. und Burchette, J. L. 2013. p40 (Δ Np63) and keratin 34 β E12 provide greater diagnostic accuracy than p63 in the evaluation of small cell lung carcinoma in small biopsy samples. *Hum. Pathol.* 44, 8, 1479–1486.
- [15] Cabillic, F., Gros, A., Dugay, F., Begueret, H., Mesturoux, L., Chiforeanu, D. C., Dufrenot, L., Jauffret, V., Dachary, D., Corre, R., Lespagnol, A., Soler, G., Dagher, J., Catros, V., Le Calve, M., Merlio, J.-P., und Belaud-Rotureau, M.-A. 2014. Parallel FISH and immunohistochemical studies of ALK status in 3244 non-small-cell lung cancers reveal major discordances. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9, 3, 295–306.
- [16] Camidge, D. R., Hirsch, F. R., Varella-Garcia, M., und Franklin, W. A. 2011. Finding ALK-Positive Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 6, 3, 411–413.
- [17] Cappuzzo, F. 2008. EGFR FISH versus mutation: Different tests, different end-points. *Lung Cancer* 60, 2, 160–165.
- [18] Caramori, G., Lim, S., Ito, K., Tomita, K., Oates, T., Jazrawi, E., Chung, K. F., Barnes, P. J., und Adcock, I. M. 2001. Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies. *Eur. Respir. J.* 18, 3, 466–473.
- [19] Chang, A., Amin, A., Gabrielson, E., Illei, P., Roden, R. B., Sharma, R., und Epstein, J. I. 2012. Utility of GATA3 Immunohistochemistry in Differentiating Urothelial Carcinoma From Prostate Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinomas of the Uterine Cervix, Anus, and Lung. *The American Journal of Surgical Pathology* 36, 10, 1472–1476.
- [20] Check, J. H., Sansoucie, L., Chern, J., und Dix, E. 2010. Mifepristone treatment improves length and quality of survival of mice with spontaneous lung cancer. *Anticancer Res.* 30, 1, 119–122.
- [21] Chuman, Y., Bergman, A., Ueno, T., Saito, S., Sakaguchi, K., Alaiya, A. A., Franzén, B., Bergman, T., Arnott, D., Auer, G., Appella, E., Jörnvall, H., und Linder, S. 1999. Napsin A, a member of the aspartic protease family, is abundantly expressed in normal lung and kidney tissue and is expressed in lung adenocarcinomas. *FEBS Lett.* 462, 1-2, 129–134.
- [22] Conde, E., Angulo, B., Redondo, P., Toldos, O., García-García, E., Suárez-Gauthier, A., Rubio-Viqueira, B., Marrón, C., García-Luján, R., Sánchez-Céspedes, M., López-Encuentra, A., Paz-Ares, L., López-Ríos, F., und Aziz, S. A. 2010. The Use of P63 Immunohistochemistry for the Identification of Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *PLoS ONE* 5, 8, e12209.
- [23] Conklin, C. M., Craddock, K. J., Have, C., Laskin, J., Couture, C., und Ionescu, D. N. 2013. Immunohistochemistry is a Reliable Screening Tool for Identification of ALK Rearrangement in Non-Small-Cell Lung Carcinoma and is Antibody Dependent. *Journal of Thoracic Oncology* 8, 1, 45–51.
- [24] Cumberbatch, M., Tang, X., Beran, G., Eckersley, S., Wang, X., Ellston, R. P. A., Dearden, S., Cosulich, S., Smith, P. D., Behrens, C., Kim, E. S., Su, X., Fan, S., Gray, N., Blowers, D. P., Wistuba, I. I., und Womack, C. 2014. Identification of a Subset of Human Non-Small Cell Lung Cancer Patients with High PI3K and Low PTEN Expression, More Prevalent in Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 20, 3, 595–603.
- [25] D'Arcangelo, M. und Cappuzzo, F. 2013. Focus on the potential role of ficlatuzumab in the treatment of non-small cell lung cancer. *Biologics : targets & therapy* 7, 61–68.
- [26] D'Uva, G. und Lauriola, M. 2015. Towards the emerging crosstalk: ERBB family and steroid hormones. *Seminars in cell & developmental biology*.

- [27] Gaber, R., Watermann, I., Kugler, C., Reinmuth, N., Huber, R. M., Schnabel, P. A., Vollmer, E., Reck, M., und Goldmann, T. 2014. Correlation of EGFR expression, gene copy number and clinicopathological status in NSCLC. *Diagnostic pathology* 9, 1, 165.
- [28] Gainor, J. F., Varghese, A. M., Ou, S.-H. I., Kabraji, S., Awad, M. M., Katayama, R., Pawlak, A., Mino-Kenudson, M., Yeap, B. Y., Riely, G. J., Iafrate, A. J., Arcila, M. E., Ladanyi, M., Engelman, J. A., Dias-Santagata, D., und Shaw, A. T. 2013. ALK Rearrangements Are Mutually Exclusive with Mutations in EGFR or KRAS: An Analysis of 1,683 Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*.
- [29] Garon, E. B., Pietras, R. J., Finn, R. S., Kamranpour, N., Pitts, S., Márquez-Garbán, D. C., Desai, A. J., Dering, J., Hosmer, W., von Euw, Erika M, Dubinett, S. M., und Slamon, D. J. 2013. Antiestrogen fulvestrant enhances the antiproliferative effects of epidermal growth factor receptor inhibitors in human non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 8, 3, 270–278.
- [30] Goeckenjan, G., Sitter, H., Thomas, M., Branscheid, D., Flentje, M., Griesinger, F., Niederle, N., Stuschke, M., Blum, T., Deppermann, K.-M., Ficker, J., Freitag, L., Lübke, A., Reinhold, T., Späth-Schwalbe, E., Ukena, D., Wickert, M., Wolf, M., Andreas, S., Auberger, T., Baum, R., Baysal, B., Beuth, J., Bickeböller, H., Böcking, A., Bohle, R., Brüske, I., Burghuber, O., Dickgreber, N., Diederich, S., Dienemann, H., Eberhardt, W., Eggeling, S., Fink, T., Fischer, B., Franke, M., Friedel, G., Gauler, T., Gütz, S., Hautmann, H., Hellmann, A., Hellwig, D., Herth, F., Heußel, C., Hilbe, W., Hoffmeyer, F., Horneber, M., Huber, R., Hübner, J., Kauczor, H.-U., Kirchbacher, K., Kirsten, D., Kraus, T., Lang, S., Martens, U., Mohn-Staudner, A., Müller, K.-M., Müller-Nordhorn, J., Nowak, D., Ochmann, U., Passlick, B., Petersen, I., Pirker, R., Pokrajac, B., Reck, M., Riha, S., Rübe, C., Schmittel, A., Schönfeld, N., Schütte, W., Serke, M., Stamatis, G., Steingraber, M., Steins, M., Stoelben, E., Swoboda, L., Teschler, H., Tessen, H., Weber, M., Werner, A., Wichmann, H.-E., Irlinger Wimmer, E., Witt, C., und Worth, H. 2010. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. *Pneumologie* 64, S 02, e1–e164.
- [31] Halpenny, D. F., Riely, G. J., Hayes, S., Yu, H., Zheng, J., Moskowitz, C. S., und Ginsberg, M. S. 2014. Are there imaging characteristics associated with lung adenocarcinomas harboring ALK rearrangements? *Lung Cancer* 86, 2, 190–194.
- [32] Han, X.-H., Zhang, N.-N., Ma, L., Lin, D.-M., Hao, X.-Z., Liu, Y.-T., Wang, L., Liu, P., Yuan, Z., Li, D., Lin, H., Sun, Y., und Shi, Y.-K. 2013. Immunohistochemistry reliably detects ALK rearrangements in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 463, 4, 583–591.
- [33] Heitz, P. U., Komminoth, P., und Klöppel, G. 2004. Disseminiertes neuroendokrines System. In *Pathologie*, W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz und A. Aguzzi, Eds. Elsevier, Urban und Fischer, München [u.a.], 425–432.
- [34] Helle, K. B. und Corti, A. 2015. Chromogranin A: a paradoxical player in angiogenesis and vascular biology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72, 2, 339–348.
- [35] Hershberger, P. A., Stabile, L. P., Kanterewicz, B., Rothstein, M. E., Gubish, C. T., Land, S., Shuai, Y., Siegfried, J. M., und Nichols, M. 2009. Estrogen receptor beta (ER β) subtype-specific ligands increase transcription, p44/p42 mitogen activated protein kinase (MAPK) activation and growth in human non-small cell lung cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 116, 1-2, 102–109.
- [36] Herth, F., Bubendorf, L., Gütz, S., Morresi-Hauf, A., Hummel, M., Junker, K., Lehmann, U., Petersen, I., Schnabel, P., und Warth, A. 2013. Diagnose und prädiktive Analysen an

- zytologischen und bioptischen Tumorproben nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome: Aktuelle Strategien und Herausforderungen. *Pneumologie* 67, 04, 198–204.
- [37] Hirsch, F. R., Herbst, R. S., Olsen, C., Chansky, K., Crowley, J., Kelly, K., Franklin, W. A., Bunn, P. A., Varella-Garcia, M., und Gandara, D. R. 2008. Increased EGFR Gene Copy Number Detected by Fluorescent In Situ Hybridization Predicts Outcome in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Cetuximab and Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 26, 20, 3351–3357.
- [38] Hirsch, F. R., Jänne, P. A., Eberhardt, W. E., Cappuzzo, F., Thatcher, N., Pirker, R., Choy, H., Kim, E. S., Paz-Ares, L., Gandara, D. R., Wu, Y.-L., Ahn, M.-J., Mitsudomi, T., Shepherd, F. A., und Mok, T. S. 2013. Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 1.
- [39] Hirsch, F. R., Spreafico, A., Novello, S., Wood, M. D., Simms, L., und Papotti, M. 2008. The Prognostic and Predictive Role of Histology in Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 3, 12, 1468–1481.
- [40] Hirsch, F. R., Varella-Garcia, M., Bunn, Paul A Jr, Franklin, W. A., Dziadziuszko, R., Thatcher, N., Chang, A., Parikh, P., Pereira, J. R., Ciuleanu, T., Pawel, J. von, Watkins, C., Flannery, A., Ellison, G., Donald, E., Knight, L., Parums, D., Botwood, N., und Holloway, B. 2006. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24, 31, 5034–5042.
- [41] Hwang, D. H., Szeto, D. P., Perry, A. S., Bruce, J. L., und Sholl, L. M. 2013. Pulmonary Large Cell Carcinoma Lacking Squamous Differentiation Is Clinicopathologically Indistinguishable From Solid-Subtype Adenocarcinoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.*
- [42] Jala, V. R., Radde, B. N., Haribabu, B., und Klinge, C. M. 2012. Enhanced expression of G-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in lung cancer. *BMC Cancer* 12, 1, 624.
- [43] Johnson, H., Cohen, C., Fatima, N., Duncan, D., und Siddiqui, M. T. 2012. Thyroid transcription factor 1 and Napsin A double stain: utilizing different vendor antibodies for diagnosing lung adenocarcinoma. *Acta Cytol.* 56, 6, 596–602.
- [44] Kadivar, M. und Boozari, B. 2012. Applications and Limitations of Immunohistochemical Expression of “Napsin-A” in Distinguishing Lung Adenocarcinoma From Adenocarcinomas of Other Organs. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 1.
- [45] Kallioniemi, O.-P., Wagner, U., Kononen, J., und Sauter, G. 2001. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Human Molecular Genetics* 10, 7, 657–662.
- [46] Kaufmann, O. und Dietel, M. 2000. Thyroid transcription factor-1 is the superior immunohistochemical marker for pulmonary adenocarcinomas and large cell carcinomas compared to surfactant proteins A and B. *Histopathology* 36, 1, 8–16.
- [47] Kayser, G., Csanadi, A., Otto, C., Plönes, T., Bittermann, N., Rawluk, J., Passlick, B., Werner, M., und Lenburg, M. 2013. Simultaneous Multi-Antibody Staining in Non-Small Cell Lung Cancer Strengthens Diagnostic Accuracy Especially in Small Tissue Samples. *PLoS ONE* 8, 2, e56333.
- [48] Kazmi, N., Márquez-Garbán, D. C., Aivazyan, L., Hamilton, N., Garon, E. B., Goodglick, L., und Pietras, R. J. 2012. The role of estrogen, progesterone and aromatase in human non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer Manag* 1, 4, 259–272.
- [49] Kenmotsu, H., Serizawa, M., Koh, Y., Isaka, M., Takahashi, T., Taira, T., Ono, A., Maniwa, T., Takahashi, S., Mori, K., Endo, M., Abe, M., Hayashi, I., Nakajima, T., Ohde, Y., und Yamamoto,

- N. 2014. Prospective genetic profiling of squamous cell lung cancer and adenosquamous carcinoma in Japanese patients by multitarget assays. *BMC Cancer* 14, 786.
- [50] Kerr, K. M. 2009. Pulmonary adenocarcinomas: classification and reporting. *Histopathology* 54, 1, 12–27.
- [51] Kerr, K. M. 2012. Classification of lung cancer: proposals for change? *Arch. Pathol. Lab. Med.* 136, 10, 1190–1193.
- [52] Kim, M. J., Shin, H. C., Shin, K. C., und Ro, J. Y. 2013. Best immunohistochemical panel in distinguishing adenocarcinoma from squamous cell carcinoma of lung: tissue microarray assay in resected lung cancer specimens. *Annals of Diagnostic Pathology* 17, 1, 85–90.
- [53] Kim, M.-Y., Go, H., Koh, J., Lee, K., Min, H.-S., Kim, M.-A., Jeon, Y. K., Lee, H.-S., Moon, K.-C., Park, S. Y., Kim, W.-H., und Chung, D. H. 2014. Napsin A is a useful marker for metastatic adenocarcinomas of pulmonary origin. *Histopathology* 65, 2, 195–206.
- [54] Kim, Y. T., Seong, Y. W., Jung, Y. J., Jeon, Y. K., Park, I. K., Kang, C. H., und Kim, J. H. 2013. The presence of mutations in epidermal growth factor receptor gene is not a prognostic factor for long-term outcome after surgical resection of non-small-cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 8, 2, 171–178.
- [55] Kwak, E. L., Bang, Y.-J., Camidge, D. R., Shaw, A. T., Solomon, B., Maki, R. G., Ou, S.-H. I., Dezube, B. J., Jänne, P. A., Costa, D. B., Varella-Garcia, M., Kim, W.-H., Lynch, T. J., Fidias, P., Stubbs, H., Engelman, J. A., Sequist, L. V., Tan, W., Gandhi, L., Mino-Kenudson, M., Wei, G. C., Shreeve, S. M., Ratain, M. J., Settleman, J., Christensen, J. G., Haber, D. A., Wilner, K., Salgia, R., Shapiro, G. I., Clark, J. W., und Iafrate, A. J. 2010. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 363, 18, 1693–1703.
- [56] Landi, L. und Cappuzzo, F. 2014. Pharmacotherapy targeting the EGFR oncogene in NSCLC. *Expert opinion on pharmacotherapy* 15, 16, 2293–2305.
- [57] Lazzaro, D., Price, M., Felice, M. de, und Di Lauro, R. 1991. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* 113, 4, 1093–1104.
- [58] Lee, H. W., Ha, S. Y., und Roh, M. S. 2014. Altered Expression of PTEN and Its Major Regulator MicroRNA-21 in Pulmonary Neuroendocrine Tumors. *Korean J Pathol* 48, 1, 17–23.
- [59] Lüllmann-Rauch, R. 2006. *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme, Stuttgart [u.a.].
- [60] Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., und Myrtek, D. 2009. *Der Experimentator: Immunologie*. Der Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [61] Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J., und Haber, D. A. 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, 21, 2129–2139.
- [62] Marchetti, A., Ardizzone, A., Papotti, M., Crinò, L., Rossi, G., Gridelli, C., Barberis, M., Maiorano, E., Normanno, N., Taddei, G. L., Scagliotti, G., Clemente, C., und Pinto, C. 2013. Recommendations for the Analysis of ALK Gene Rearrangements in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 8, 3, 352–358.
- [63] Marquez-Garban, D. C., Mah, V., Alavi, M., Maresh, E. L., Chen, H.-W., Bagryanova, L., Horvath, S., Chia, D., Garon, E., Goodglick, L., und Pietras, R. J. 2011. Progesterone and

- estrogen receptor expression and activity in human non-small cell lung cancer. *Steroids* 76, 9, 910–920.
- [64] Marsit, C. J., Zheng, S., Aldape, K., Hinds, P. W., Nelson, H. H., Wiencke, J. K., und Kelsey, K. T. 2005. PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Human Pathology* 36, 7, 768–776.
- [65] Martinez, P., Hernández-Losa, J., Cedrés, S., Castellví, J., Martínez-Martí, A., Tallada, N., Murtra-Garrell, N., Navarro-Mendivill, A., Rodríguez-Freixinos, V., Canela, M., Ramon y Cajal, S., Felip, E., und Hoque, M. O. 2013. Fluorescence In Situ Hybridization and Immunohistochemistry as Diagnostic Methods for ALK Positive Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *PLoS ONE* 8, 1, e52261.
- [66] Mascaux, C., Wynes, M. W., Kato, Y., Tran, C., Asuncion, B. R., Zhao, J. M., Gustavson, M., Ranger-Moore, J., Gaire, F., Matsubayashi, J., Nagao, T., Yoshida, K., Ohira, T., Ikeda, N., und Hirsch, F. R. 2011. EGFR protein expression in non-small cell lung cancer predicts response to an EGFR tyrosine kinase inhibitor--a novel antibody for immunohistochemistry or AQUA technology. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 24, 7796–7807.
- [67] Mazières, J., Rouquette, I., Lepage, B., Milia, J., Brouchet, L., Guibert, N., Beau-Faller, M., Validire, P., Hofman, P., und Fouret, P. 2013. Specificities of lung adenocarcinoma in women who have never smoked. *J Thorac Oncol* 8, 7, 923–929.
- [68] McCourt, C. M., Boyle, D., James, J., und Salto-Tellez, M. 2012. Immunohistochemistry in the era of personalised medicine. *Journal of Clinical Pathology* 66, 1, 58–61.
- [69] Miki, Y., Abe, K., Suzuki, S., Suzuki, T., und Sasano, H. 2011. Suppression of estrogen actions in human lung cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology* 340, 2, 168–174.
- [70] Monica, V., Longo, M., Felice, B., Scagliotti, G. V., Papotti, M., und Novello, S. 2012. Role of Hormone Receptor Expression in Patients With Advanced-Stage Lung Cancer Treated With Chemotherapy. *Clinical Lung Cancer* 13, 6, 416–423.
- [71] Montezuma, D., Azevedo, R., Lopes, P., Vieira, R., Cunha, A. L., und Henrique, R. 2013. A panel of four immunohistochemical markers (CK7, CK20, TTF-1, and p63) allows accurate diagnosis of primary and metastatic lung carcinoma on biopsy specimens. *Virchows Arch.* 463, 6, 749–754.
- [72] Mu, D. 2013. The Complexity of Thyroid Transcription Factor 1 with Both Pro- and Anti-Oncogenic Activities. *J. Biol. Chem.*
- [73] Mukhopadhyay, S. und Katzenstein, A.-L. A. 2011. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *The American Journal of Surgical Pathology* 35, 1, 15–25.
- [74] Mukhopadhyay, S. und Katzenstein, A.-L. A. 2012. Comparison of monoclonal napsin A, polyclonal napsin A, and TTF-1 for determining lung origin in metastatic adenocarcinomas. *American Journal of Clinical Pathology* 138, 5, 703–711.
- [75] Mülhardt, C. 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*. SAV Biowissenschaften. Spektrum Akad.-Verlag, Heidelberg.
- [76] Müller, K.-M. 2004. Lunge. In *Pathologie*, W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz und A. Aguzzi, Eds. Elsevier, Urban und Fischer, München [u.a.], 592–628.

- [77] Nanguzgambo, A. B., Razack, R., Louw, M., und Bolliger, C. T. 2011. Immunocytochemistry and Lung Cancer: Application in Diagnosis, Prognosis and Targeted Therapy. *Oncology* 80, 3-4, 247–256.
- [78] Nicholson, A. G., Gonzalez, D., Shah, P., Pynegar, M. J., Deshmukh, M., Rice, A., und Popat, S. 2010. Refining the Diagnosis and EGFR Status of Non-small Cell Lung Carcinoma in Biopsy and Cytologic Material, Using a Panel of Mucin Staining, TTF-1, Cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR Mutation Analysis. *Journal of Thoracic Oncology* 5, 4, 436–441.
- [79] Nikolos, F., Thomas, C., Rajapaksa, G., Bado, I., und Gustafsson, J.-Å. 2014. ERβ Regulates NSCLC Phenotypes by Controlling Oncogenic RAS Signaling. *Mol. Cancer Res.* 12, 6, 843–854.
- [80] Noh, S. und Shim, H. 2012. Optimal combination of immunohistochemical markers for subclassification of non-small cell lung carcinomas: A tissue microarray study of poorly differentiated areas. *Lung Cancer* 76, 1, 51–55.
- [81] Nose, N., Sugio, K., Oyama, T., Nozoe, T., Uramoto, H., Iwata, T., Onitsuka, T., und Yasumoto, K. 2009. Association between estrogen receptor-beta expression and epidermal growth factor receptor mutation in the postoperative prognosis of adenocarcinoma of the lung. *J. Clin. Oncol.* 27, 3, 411–417.
- [82] Okimoto, T., Tsubata, Y., Sutani, A., Fuchita, H., Koba, N., Hotta, T., Hamaguchi, M., Miura, K., Hamaguchi, S., Ohe, M., Kuraki, T., Harada, Y., Maruyama, R., Miyamoto, N., Kishimoto, K., und Isobe, T. 2014. Immunohistochemical comparison of biomarker expression in biopsy and surgical specimens of non-small cell lung cancer. *Anticancer research* 34, 6, 2755–2761.
- [83] Paik, J. H., Choe, G., Kim, H., Choe, J.-Y., Lee, H. J., Lee, C.-T., Lee, J. S., Jheon, S., und Chung, J.-H. 2011. Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6, 3, 466–472.
- [84] Palmer, R. H., Verneris, E., Grabbe, C., und Hallberg, B. 2009. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem. J.* 420, 3, 345–361.
- [85] Pardo, J., Martinez-Peñuela, A. M., Sola, J. J., Panizo, A., Gúrpide, A., Martinez-Peñuela, J. M., und Lozano, M. D. 2009. Large cell carcinoma of the lung: an endangered species? *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* 17, 5, 383–392.
- [86] Pelosi, G., Pasini, F., Olsen Stenholm, C., Pastorino, U., Maisonneuve, P., Sonzogni, A., Maffini, F., Pruneri, G., Frassetta, F., Cavallon, A., Roz, E., Iannucci, A., Bresaola, E., und Viale, G. 2002. p63 immunoreactivity in lung cancer: yet another player in the development of squamous cell carcinomas? *J. Pathol.* 198, 1, 100–109.
- [87] Pelosi, G., Rossi, G., Cavazza, A., Righi, L., Maisonneuve, P., Barbareschi, M., Graziano, P., Pastorino, U., Garassino, M., Braud, F. de, und Papotti, M. 2013. Np63 (p40) Distribution Inside Lung Cancer: A Driver Biomarker Approach to Tumor Characterization. *International Journal of Surgical Pathology* 21, 3, 229–239.
- [88] Petersen, I. 2010. Morphologische und molekulare Pathologie des Lungenkarzinoms. *Pathologe* 31, S2, 204–210.
- [89] Petersen, I. und Warth, A. 2014. Karzinome der Lunge. *Pathologe* 35, 6, 547–556.
- [90] Peterson, M. R., Piao, Z., Bazhenova, L. A., Weidner, N., und Yi, E. S. 2007. Terminal respiratory unit type lung adenocarcinoma is associated with distinctive EGFR immunoreactivity and EGFR mutations. *Applied immunohistochemistry & molecular*

- morphology* : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry 15, 3, 242–247.
- [91] Pillai, R. N. und Ramalingam, S. S. 2012. The biology and clinical features of non-small cell lung cancers with EML4-ALK translocation. *Current oncology reports* 14, 2, 105–110.
- [92] Raso, M. G., Behrens, C., Herynk, M. H., Liu, S., Prudkin, L., Ozburn, N. C., Woods, D. M., Tang, X., Mehran, R. J., Moran, C., Lee, J. J., und Wistuba, I. I. 2009. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors identifies a subset of NSCLCs and correlates with EGFR mutation. *Clin. Cancer Res.* 15, 17, 5359–5368.
- [93] Rekhtman, N., Ang, D. C., Sima, C. S., Travis, W. D., und Moreira, A. L. 2011. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol* 24, 10, 1348–1359.
- [94] Rekhtman, N., Tafe, L. J., Chaft, J. E., Wang, L., Arcila, M. E., Colanta, A., Moreira, A. L., Zakowski, M. F., Travis, W. D., Sima, C. S., Kris, M. G., und Ladanyi, M. 2013. Distinct profile of driver mutations and clinical features in immunomarker-defined subsets of pulmonary large-cell carcinoma. *Mod. Pathol.* 26, 4, 511–522.
- [95] Roberts, P. J. und Stinchcombe, T. E. 2013. KRAS Mutation: Should We Test for It, and Does It Matter? *Journal of Clinical Oncology* 31, 8, 1112–1121.
- [96] Rossi, G., Marchioni, A., Milani, M., Scotti, R., Foroni, M., Cesinaro, A., Longo, L., und Cavazza, A. 2004. TTF-1, Cytokeratin 7, 34βE12, and CD56/NCAM Immunostaining in the Subclassification of Large Cell Carcinomas of the Lung. *American Journal of Clinical Pathology* 122, 6, 884–893.
- [97] Rossi, G., Mengoli, M. C., Cavazza, A., Nicoli, D., Barbareschi, M., Cantaloni, C., Papotti, M., Tironi, A., Graziano, P., Paci, M., Stefani, A., Migaldi, M., Sartori, G., und Pelosi, G. 2014. Large cell carcinoma of the lung: clinically oriented classification integrating immunohistochemistry and molecular biology. *Virchows Arch.* 464, 1, 61–68.
- [98] Rossi, G., Pelosi, G., Graziano, P., Barbareschi, M., und Papotti, M. 2009. A reevaluation of the clinical significance of histological subtyping of non--small-cell lung carcinoma: diagnostic algorithms in the era of personalized treatments. *Int. J. Surg. Pathol.* 17, 3, 206–218.
- [99] Rouquette, I., Lauwers-Cances, V., Allera, C., Brouchet, L., Milia, J., Nicaise, Y., Laurent, J., Delisle, M.-B., Favre, G., Didier, A., und Mazières, J. 2012. Characteristics of lung cancer in women: Importance of hormonal and growth factors. *Lung Cancer* 76, 3, 280–285.
- [100] Rubin, B. P., Skarin, A. T., Pisick, E., Rizk, M., und Salgia, R. 2001. Use of cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* 10, 1, 77–82.
- [101] Rüschoff, J., Kerr, K. M., Grote, H. J., Middel, P., Heydebreck, A. von, Alves, V. A., Baldus, S. E., Büttner, R., Carvalho, L., Fink, L., Jochum, W., Lo, A. W. I., López-Ríos, F., Marx, A., Molina, T. J., Olszewski, W. T., Rieker, R. J., Volante, M., Thunnissen, E., Wrba, F., Celik, I., und Störkel, S. 2012. Reproducibility of Immunohistochemical Scoring for Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Non--Small Cell Lung Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 121227075430005.
- [102] Rutishauser, U., Acheson, A., Hall, A. K., Mann, D. M., und Sunshine, J. 1988. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 240, 4848, 53–57.

- [103] Sakai, Y., Nakai, T., Ohbayashi, C., Imagawa, N., Yanagita, E., Satake, R., Nitta, A., Kajimoto, K., Sakuma, T., und Itoh, T. 2013. Immunohistochemical profiling of ALK fusion gene-positive adenocarcinomas of the lung. *Int. J. Surg. Pathol.* 21, 5, 476–482.
- [104] Scarpatetti, M., Tsybrovskyy, O., und Popper, H. H. 2002. Cytokeratin typing as an aid in the differential diagnosis of primary versus metastatic lung carcinomas, and comparison with normal lung. *Virchows Arch* 440, 1, 70–76.
- [105] Schäfer, R. 2012. Tumorgenetik. In *Harrisons Innere Medizin*, M. Dietel, N. Suttrop und M. Zeitz, Eds. Medizin. Lehmanns Media LOB.de, [Berlin], 710–718.
- [106] Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J., und Haber, D. A. 2007. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature reviews. Cancer* 7, 3, 169–181.
- [107] Shimizu, K., Hirami, Y., Saisho, S., Yukawa, T., Maeda, A., Yasuda, K., und Nakata, M. 2012. Membrane-bound estrogen receptor- α expression and epidermal growth factor receptor mutation are associated with a poor prognosis in lung adenocarcinoma patients. *World J Surg Oncol* 10, 141.
- [108] Sholl, L. M., Weremowicz, S., Gray, S. W., Wong, K.-K., Chirieac, L. R., Lindeman, N. I., und Hornick, J. L. 2013. Combined Use of ALK Immunohistochemistry and FISH for Optimal Detection of ALK-Rearranged Lung Adenocarcinomas. *Journal of Thoracic Oncology* 8, 3, 322–328.
- [109] Sholl, L. M., Xiao, Y., Joshi, V., Yeap, B. Y., Cioffredi, L. A., Jackman, D. M., Lee, C., Janne, P. A., und Lindeman, N. I. 2010. EGFR Mutation Is a Better Predictor of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Carcinoma Than FISH, CISH, and Immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology* 133, 6, 922–934.
- [110] Siegmund-Schultze, N. 2014. Metastasiertes Adenokarzinom der Lunge. Genotyp-angepasste Therapie verbessert Überleben. *Deutsches Ärzteblatt* 111, 45, 1962.
- [111] Simonetti, S., Molina, M. A., Queralt, C., Aguirre, I. de, Mayo, C., Bertran-Alamillo, J., Sanchez, J. J., Gonzalez-Larriba, J. L., Jimenez, U., Isla, D., Moran, T., Viteri, S., Camps, C., Garcia-Campelo, R., Massuti, B., Benlloch, S., Ramon y Cajal, S., Taron, M., und Rosell, R. 2010. Detection of EGFR mutations with mutation-specific antibodies in stage IV non-small-cell lung cancer. *Journal of translational medicine* 8, 135.
- [112] Skov, B. G., Høgdall, E., Clementsen, P., Krasnik, M., Larsen, K. R., Sørensen, J. B., Skov, T., und Møller, A. 2014. The prevalence of EGFR mutations in non-small cell lung cancer in an unselected Caucasian population. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*.
- [113] Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S.-i., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y., und Mano, H. 2007. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 7153, 561–566.
- [114] Stabile, L. P., Dacic, S., Land, S. R., Lenzner, D. E., Dhir, R., Acquafondata, M., Landreneau, R. J., Grandis, J. R., und Siegfried, J. M. 2011. Combined analysis of estrogen receptor beta-1 and progesterone receptor expression identifies lung cancer patients with poor outcome. *Clin. Cancer Res.* 17, 1, 154–164.
- [115] Stankovic, T., Milinkovic, V., Bankovic, J., Dinic, J., Tanic, N., Dramicanin, T., und Tanic, N. 2014. Comparative analyses of individual and multiple alterations of p53, PTEN and p16 in non-small cell lung carcinoma, glioma and breast carcinoma samples. *Biomed. Pharmacother.*

- [116] Statistisches Bundesamt. Wiesbaden 2013. Gesundheit - Todesursachen in Deutschland. *Statistisches Bundesamt, Fachserie 12, Reihe 4, 2012* (Wiesbaden 2013).
- [117] Stoll, L. M., Johnson, M. W., Gabrielson, E., Askin, F., Clark, D. P., und Li, Q. K. 2010. The utility of napsin-A in the identification of primary and metastatic lung adenocarcinoma among cytologically poorly differentiated carcinomas. *Cancer cytopathology* 118, 6, 441–449.
- [118] Sturm, N., Rossi, G., Lantuéjoul, S., Laverrière, M.-H., Papotti, M., Brichon, P.-Y., Brambilla, C., und Brambilla, E. 2003. 34BetaE12 expression along the whole spectrum of neuroendocrine proliferations of the lung, from neuroendocrine cell hyperplasia to small cell carcinoma. *Histopathology* 42, 2, 156–166.
- [119] Sullivan, H. C., Fisher, K. E., Hoffa, A. L., Wang, J., Saxe, D., Siddiqui, M. T., und Cohen, C. 2014. The Role of Immunohistochemical Analysis in the Evaluation of EML4-ALK Gene Rearrangement in Lung Cancer. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*.
- [120] Tatnell, P. J., Powell, D. J., Hill, J., Smith, T. S., Tew, D. G., und Kay, J. 1998. Napsins: new human aspartic proteinases. Distinction between two closely related genes. *FEBS Lett.* 441, 1, 43–48.
- [121] Thomas, J. S., Lamb, D., Ashcroft, T., Corrin, B., Edwards, C. W., Gibbs, A. R., Kenyon, W. E., Stephens, R. J., und Whimster, W. F. 1993. How reliable is the diagnosis of lung cancer using small biopsy specimens? Report of a UKCCCR Lung Cancer Working Party. *Thorax* 48, 11, 1135–1139.
- [122] Thunnissen, E., Bubendorf, L., Dietel, M., Elmberger, G., Kerr, K., Lopez-Rios, F., Moch, H., Olszewski, W., Pauwels, P., Penault-Llorca, F., und Rossi, G. 2012. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch* 461, 3, 245–257.
- [123] Thunnissen, E., Noguchi, M., Aisner, S., Beasley, M. B., Brambilla, E., Chirieac, L. R., Chung, J.-H., Dacic, S., Geisinger, K. R., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Lantéjoul, S., Matsuno, Y., Minami, Y., Moreira, A. L., Pelosi, G., Petersen, I., Roggli, V., Travis, W. D., Wistuba, I., Yatabe, Y., Dziadziuszko, R., Witte, B., Tsao, M.-S., und Nicholson, A. G. 2014. Reproducibility of histopathological diagnosis in poorly differentiated NSCLC: an international multiobserver study. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9, 9, 1354–1362.
- [124] Tiozzo, C., Langhe, S. de, Yu, M., Londhe, V. A., Carraro, G., Li, M., Li, C., Xing, Y., Anderson, S., Borok, Z., Bellusci, S., und Minoo, P. 2009. Deletion of Pten expands lung epithelial progenitor pools and confers resistance to airway injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 8, 701–712.
- [125] Tota, B., Angelone, T., und Cerra, M. C. 2014. The surging role of Chromogranin A in cardiovascular homeostasis. *Frontiers in chemistry* 2, 64.
- [126] Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, John H M, Beasley, M. B., Chirieac, L. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., und Wistuba, I. 2015. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 10, 9, 1243–1260.

- [127] Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., Beer, D. G., Powell, C. A., Riely, G. J., Van Schil, Paul E, Garg, K., Austin, John H M, Asamura, H., Rusch, V. W., Hirsch, F. R., Scagliotti, G., Mitsudomi, T., Huber, R. M., Ishikawa, Y., Jett, J., Sanchez-Cespedes, M., Sculier, J.-P., Takahashi, T., Tsuboi, M., Vansteenkiste, J., Wistuba, I., Yang, P.-C., Aberle, D., Brambilla, C., Flieder, D., Franklin, W., Gazdar, A., Gould, M., Hasleton, P., Henderson, D., Johnson, B., Johnson, D., Kerr, K., Kuriyama, K., Lee, J. S., Miller, V. A., Petersen, I., Roggli, V., Rosell, R., Saijo, N., Thunnissen, E., Tsao, M., und Yankelewitz, D. 2011. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 6, 2, 244–285.
- [128] Travis, W. D., Brambilla, E., und Riely, G. J. 2013. New Pathologic Classification of Lung Cancer: Relevance for Clinical Practice and Clinical Trials. *Journal of Clinical Oncology* 31, 8, 992–1001.
- [129] Travis, W. D., Rekhtman, N., Riley, G. J., Geisinger, K. R., Asamura, H., Brambilla, E., Garg, K., Hirsch, F. R., Noguchi, M., Powell, C. A., Rusch, V. W., Scagliotti, G., und Yatabe, Y. 2010. Pathologic diagnosis of advanced lung cancer based on small biopsies and cytology: a paradigm shift. *J Thorac Oncol* 5, 4, 411–414.
- [130] Travis W.D., Brambilla E., Muller-Hermelink H.K., Harris C.C. 2004. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. World Health Organization classification of tumours. IARC Press, Lyon.
- [131] Ueno, T., Linder, S., und ElMBERGER, G. 2003. Aspartic proteinase napsin is a useful marker for diagnosis of primary lung adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* 88, 8, 1229–1233.
- [132] Ulivi, P., Puccetti, M., Capelli, L., Chiadini, E., Bravaccini, S., Calistri, D., Zoli, W., Amadori, D., und Candoli, P. 2013. Molecular determinations of EGFR and EML4-ALK on a single slide of NSCLC tissue. *Journal of Clinical Pathology*.
- [133] Verma, M. K., Miki, Y., und Sasano, H. 2011. Sex steroid receptors in human lung diseases. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127, 3-5, 216–222.
- [134] Viberti, L., Bongiovanni, M., Croce, S., und Bussolati, G. 2000. 34betaE12 Cytokeratin Immunodetection in the Differential Diagnosis of Small Cell Tumors of Lung. *Int. J. Surg. Pathol.* 8, 4, 317–322.
- [135] Wang, F., Fu, S., Shao, Q., Zhou, Y.-B., Zhang, X., Zhang, X., Xue, C., Lin, J.-G., Huang, L.-X., Zhang, L., Zhang, W.-M., und Shao, J.-Y. 2013. High EGFR copy number predicts benefits from tyrosine kinase inhibitor treatment for non-small cell lung cancer patients with wild-type EGFR. *J Transl Med* 11, 1, 90.
- [136] Warth, A., Muley, T., Herpel, E., Meister, M., Herth, Felix J F, Schirmacher, P., Weichert, W., Hoffmann, H., und Schnabel, P. A. 2012. Large-scale comparative analyses of immunomarkers for diagnostic subtyping of non-small-cell lung cancer biopsies. *Histopathology* 61, 6, 1017–1025.
- [137] Weiß, C. 2008. *Basiswissen Medizinische Statistik*. Springer Verlag.
- [138] Weissferdt, A. 2014. Large cell carcinoma of lung: On the verge of extinction? *Seminars in diagnostic pathology* 31, 4, 278–288.
- [139] Whithaus, K., Fukuoka, J., Prihoda, T. J., und Jagirdar, J. 2012. Evaluation of Napsin A, Cytokeratin 5/6, p63, and Thyroid Transcription Factor 1 in Adenocarcinoma Versus

- Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 136, 2, 155–162.
- [140] WHO - International Agency for Research on Cancer. 2013. *Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed*, Lyon/Genf.
- [141] Wittekind, C. 2003. *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio.
- [142] Wittekind, C. und Meyer, H.-J. 2010. *TNM. Klassifikation maligner Tumoren*. Wiley-Vch Verlag GmbH, [S.l.].
- [143] Wojtalla, A. und Arcaro, A. 2011. Targeting phosphoinositide 3-kinase signalling in lung cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 80, 2, 278–290.
- [144] Yamada, K., Maeshima, A. M., Tsuta, K., und Tsuda, H. 2014. Combined high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung: Clinicopathological and immunohistochemical study of 34 surgically resected cases. *Pathol. Int.* 64, 1, 28–33.
- [145] Ye, J., Findeis-Hosey, J. J., Yang, Q., McMahon, L. A., Yao, J. L., Li, F., und Xu, H. 2011. Combination of napsin A and TTF-1 immunohistochemistry helps in differentiating primary lung adenocarcinoma from metastatic carcinoma in the lung. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 19, 4, 313–317.
- [146] Yeh, Y.-C. und Chou, T.-Y. 2014. Pulmonary neuroendocrine tumors: Study of 90 cases focusing on clinicopathological characteristics, immunophenotype, preoperative biopsy, and frozen section diagnoses. *J Surg Oncol* 109, 3, 280–286.
- [147] Yi, E. S., Boland, J. M., Maleszewski, J. J., Roden, A. C., Oliveira, A. M., Aubry, M.-C., Erickson-Johnson, M. R., Caron, B. L., Li, Y., Tang, H., Stoddard, S., Wampfler, J., Kulig, K., und Yang, P. 2011. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6, 3, 459–465.
- [148] Yun, F., Jia, Y., Li, X., Yuan, L., Sun, Q., Yu, H., Shi, L., und Yuan, H. 2013. Clinicopathological significance of PTEN and PI3K/AKT signal transduction pathway in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 6, 10, 2112–2120.
- [149] Zhang, C., Schmidt, L. A., Hatanaka, K., Thomas, D., Lagstein, A., und Myers, J. L. 2014. Evaluation of napsin A, TTF-1, p63, p40, and CK5/6 immunohistochemical stains in pulmonary neuroendocrine tumors. *American Journal of Clinical Pathology* 142, 3, 320–324.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig erarbeitet und verfasst wurde. Die hierfür verwendeten Quellen und Hilfsmittel wurden entsprechend angeführt und gekennzeichnet.

Weiterhin erkläre ich, dass ich bisher kein weiteres Promotionsverfahren beantragt habe.

Rostock, im November 2016

Stephan J. Hammer

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Friedrich Prall für die Themenvergabe und die intensive und geduldige Betreuung und gute Zusammenarbeit über Raum und Zeit sehr herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Andreas Erbersdobler, Direktor des Instituts für Pathologie, danke ich für die Bereitstellung der Möglichkeiten zur Anfertigung dieser Arbeit.

Den Mitarbeitern der genannten Laboreinrichtungen danke ich für die Anfertigung der verschiedenen Schnitte und Färbungen sowie Frau Dr. Maja Hühns und Herrn Dr. Björn Schneider für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Fragestellungen.

Ich danke meiner Familie, die mir dieses „Projekt“ grundsätzlich erst ermöglichen konnte und Frau Christiane de Groot für die ausdauernde Geduld.

Lebenslauf und Publikation

Stephan Johannes Hammer, M.A.

Publikation:

Hammer, S. H. [sic] und Prall, F. 2015. Close relation of large cell carcinoma to adenocarcinoma by hierarchical cluster analysis: implications for histologic typing of lung cancer on biopsies. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM/official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* 23, 8, 550–557.