

**Retrospektive Datenanalyse von Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom
der Lunge mit und ohne K-ras-Mutation bzw. TTF1-Überexpression**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Florian Schädlich

Betreuer:

apl. Prof. Dr. med. Wolfgang Schütte

Gutachter:

PD Dr. med. Marcus Krüger

Prof. Dr. med. habil. Jens Schreiber

Datum der Verteidigung: 12.03.2025

Referat

Es sollte den Fragen nachgegangen werden, ob es einen Unterschied im OS oder PFS zwischen Patienten mit und ohne K-ras bzw. TTF-1-Mutation geben könnte, wie häufig diese auftreten und ob deren Expression mit anderen Merkmalen assoziiert sein könnte. Zu diesem Zweck wurden von 207 Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Lunge in einer explorativen, retrospektiven Studie anonymisiert krankheits- und personenbezogene Daten zusammengetragen und ausgewertet. Überlebensdaten wurden in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und HR mit Cox-Regression ermittelt. Assoziation zwischen verschiedenen Merkmalen wurde mit Fischers exaktem Test überprüft.

Unter den 185 Patienten mit vollständig bekanntem Mutationsstatus waren 25,4% K-ras-positiv. Auch traten EGFR, ALK, ROS und BRAF-Mutationen auf. Unter den K-ras-Mutationen waren G12V, G12C und G12D die häufigsten Subtypen mit jeweils 32%, 32% und 17%.

Es scheint eine Assoziation zu geben zwischen dem Auftreten einer K-ras-Mutation und sowohl Rauchen als auch Asbestexposition. Für doppelt Exponierte ist das Risiko noch stärker erhöht (RR=3,32; 95% KI: 1,22 – 9,09; p=0,047). Ein Zusammenhang zwischen dem Subtyp und Raucherstatus zeigte sich nicht.

K-ras-Positive wiesen weder im PFS (HR=1,02; 95% KI: 0,71-1,46; p=0,93) noch im OS (HR=0,93; 95% KI: 0,63-1,37; p=0,71) einen Unterschied im Überleben zum WT auf. Auch unter den Subtypen konnte kein klarer Vor- oder Nachteil für bestimmte Gruppen gefunden werden.

80,2% aller Getesteten wiesen eine nukleäre TTF-1-Expression auf. Es wurde keine Assoziation von TTF-1-Positivität und weiblichem Geschlecht oder Nichtraucherstatus gefunden, allerdings zwischen EGFR-Mutation und TTF-1-Expression (RR= 1,28; 95% KI: 1,18-1,38; p=0,015).

Ob TTF-1-Positive einen Überlebensvorteil im OS (HR=0,726; 95% KI: 0,495-1,065; p=0,102) und im PFS (HR=0,697; 95% KI: 0,480-1,012; p=0,058) verzeichnen, konnte nicht sicher gezeigt werden, zumindest im PFS ist ein Vorteil für TTF-1-Positive jedoch zu vermuten.

Als unabhängige Risikofaktoren im OS und PFS erwiesen sich mittels multivariabler Regression Alter, ECOG-Status und Geschlecht.

Schädlich, Florian: Retrospektive Datenanalyse von Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Lunge mit und ohne K-ras-Mutation bzw. TTF-1-Überexpression, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 57 Seiten, 2024

Inhalt

Referat	
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie Lungenkrebs weltweit und in Deutschland	1
1.2 Einteilung Lungenkarzinom	1
1.2.1 Übersicht.....	1
1.2.2 Adenokarzinom	2
1.3 Grundlagen K-ras.....	2
1.3.1 Ras als molekularer Schalter	2
1.3.2 Ras als Protoonkogen.....	3
1.3.3 Ras Isoformen und ihre Lokalisation an der Membran	3
1.3.4 Die Aktivierung von K-ras.....	4
1.3.5 Die downstream Signalkaskaden von Ras	5
1.4 Grundlagen TTF-1.....	7
1.4.1 Überblick.....	7
1.4.2 TTF-1 unter den Transkriptionsfaktoren	8
1.4.3 TTF-1 in der Schilddrüse.....	8
1.4.4 TTF-1 in der Lunge	9
1.4.5 TTF-1 als immunhistochemischer Marker	9
2 Zielstellung	10
3 Methoden	11
4 Ergebnisse	13
4.1 Studienpopulation	13
4.2 Häufigkeiten von Mutationen.....	13
4.2.1 Alle Treibermutationen	13
4.2.2 K-ras-Mutationen.....	15
4.2.3 Raucherstatus, Berufsexposition und K-ras.....	16

4.2.4	Treibermutationen nach Raucherstatus.....	18
4.2.5	TTF-1 Häufigkeit	19
4.3	Überleben aller Patienten.....	20
4.3.1	Gesamtüberleben (OS) und Progressionsfreies Überleben (PFS) aller Patienten	20
4.3.2	Überleben nach Alter	21
4.3.3	Überleben nach Geschlecht	21
4.3.4	Überleben nach ECOG	23
4.4	Überleben nach K-ras-Status	24
4.5	Überleben nach K-ras-Subtyp	26
4.6	Überleben nach TTF-1-Expression.....	27
5	Diskussion	31
5.1	Häufigkeit der Treibermutationen	31
5.1.1	K-ras gesamt.....	31
5.1.2	K-ras-Subtypen	32
5.1.3	Weitere Treibermutationen.....	33
5.2	Häufigkeit von TTF-1.....	34
5.3	Überleben aller Patienten.....	34
5.4	Überleben nach K-ras-Status	36
5.5	Überleben nach K-ras-Subtyp	39
5.6	Überleben nach TTF-1-Status.....	41
6	Literaturverzeichnis	44
7	Thesen	57
	Erklärungen.....	

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ADC	Adenokarzinom
AF-6	Afadin
ALK	anaplastic lymphom kinase
BE	Berufsexposition
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDC	cell division cycle
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
c-Myc	Cellular Myelocytomatosis Oncogene
CNrasGEF	Cyclic nucleotide Ras GEF
CT	Computertomographie
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
ED	Erstdiagnose
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Elk-1	ETS Like-1-Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	extracellular-signal regulated kinase
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanin nucleotide-exchange factor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
HD	Homöodomäne
HNF3	hepatocyte nuclear factor 3
HR	Hazard Ratio
H-ras	harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
KI	Konfidenzintervall
K-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MEK	MAP-Kinase-Kinase
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian target of rapamycin
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum
NF1	Neurofibromin 1
Nkx2-1	NK2 homeobox 1
Nore1	Novel Ras effector 1
N-ras	Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
NSCLC	Non small cell lung cancer
OS	Overall Survival (Gesamtüberleben)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDK1	phospholipid dependent kinase 1
PFS	Progression Free Survival (Progressionsfreies Überleben)
PH	pleckstrin homology

PI3-Kinase	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat</i>
PIP ₃	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat</i>
PKB	<i>Proteinkinase B</i>
PM	<i>Plasmamembran</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ral	<i>Ras-like</i>
RALGDS	<i>Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator</i>
Ras	<i>rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RASA1	<i>RAS P21 Protein Activator 1</i>
RasGRP	<i>RAS guanyl nucleotide-releasing protein</i>
RASSF1	<i>Ras Association Domain Family Member 1</i>
REM	<i>Ras exchange motif</i>
RIN1	<i>Ras And Rab Interactor 1</i>
RKI	<i>Robert-Koch-Institut</i>
ROS	<i>c-Ros oncogene 1 receptor tyrosine kinase</i>
RTK	<i>Rezeptortyrosinkinase</i>
SCLC	<i>Small cell lung cancer</i>
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SH3	<i>Src-homology 3</i>
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
T/EBP	<i>thyroid-specific enhancer-binding protein</i>
Tiam1	<i>T-lymphoma invasion and metastasis</i>
TITF	<i>thyroid transcription factor-1 gene</i>
TSH	<i>Thyreoidea-stimulierendes Hormon</i>
TTF-1	<i>Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
v-Src	<i>Rous sarcoma virus-Src</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WT	<i>Wildtyp</i>

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie Lungenkrebs weltweit und in Deutschland

Das Lungenkarzinom ist sowohl in Deutschland als auch weltweit eine der klinisch und sozial relevantesten aller Erkrankungen. Trotz intensiver Forschung und wertvollen neuen Erkenntnissen in den vergangenen Jahren handelt es sich um eine Diagnose mit weiterhin sehr schlechter Prognose.

Der „International Agency for Research on Cancer“ der WHO zufolge, ist Lungenkrebs die weltweit häufigste krebsbedingte Todesursache mit fast 1,8 Millionen Toten weltweit im Jahr 2020 (Global Cancer Observatory, 2020). Das entspricht 18% aller durch Krebs verursachten Todesfälle. An zweiter und dritter Stelle folgen mit deutlichem Abstand kolorektale Karzinome (9,4%) und maligne Neubildungen der Leber (8,3%). Mit einer gewaltigen Anzahl neuer Fälle weltweit von jährlich etwa 2,207 Millionen wird das Lungenkarzinom einzig vom Brustkrebs übertroffen (2,261 Millionen). Damit macht es 11,4% aller malignen Neubildungen aus (Global Cancer Observatory, 2020).

Laut den Zahlen der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland des RKI, erkrankten 2016 deutschlandweit 21.500 Frauen und fast 36.000 Männer an Lungenkrebs (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019). Das Lebenszeitrisko, an Lungenkrebs zu versterben, beträgt für Frauen 3,1%, bei Männern sind es sogar 5,7%. Bei Erstdiagnose befinden sich bereits über die Hälfte der Karzinome im metastasierten Stadium, diese Fälle haben eine ernüchternde 5-Jahres-Überlebensrate von nur 5% (Frauen) bzw. 3% (Männer).

Die hohen Inzidenzraten und die anhaltend sehr schlechte Prognose verdeutlichen den dringenden Bedarf an weiterführender Forschung im Bereich Lungenkrebs, um Prävention, Therapie und Nachsorge zu optimieren. Im Rahmen dieser Dissertation soll dazu ein Beitrag geleistet werden. Schwierigkeiten ergeben sich dabei neben der Aggressivität der Tumore aus der Heterogenität des großen Feldes „Lungenkarzinom“. Da in dieser Studie der Fokus auf einem bestimmten Subtyp, dem Adenokarzinom, liegt, folgt zunächst eine kurze Einordnung und Überblick über verschiedene maligne Neubildungen der Lunge.

1.2 Einteilung Lungenkarzinom

1.2.1 Übersicht

Das Lungenkarzinom differenziert sich in viele unterschiedliche Entitäten. Die Einteilung nach histologischen Kriterien bestimmt wesentlich die Prognose und

Therapie. Die WHO unterscheidet 2004 zunächst kleinzellige (SCLC) und nicht kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC). Letztere werden weiter unterteilt in Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome, großzellige Karzinome, neuroendokrine Tumore und weitere, seltenere Entitäten. Diese Einteilung ist bis zur neuen aktuellen Klassifikation von 2015 zwar in ihren Grundzügen erhalten geblieben, wurde jedoch in vielen Punkten weiterentwickelt. Die größten Veränderungen betreffen unter anderem die Verwendung immunhistochemischer Marker und molekularer Mutationsanalysen, um personalisierte Therapien anbieten zu können (Travis *et al.*, 2015). Zu diesen Markern gehören auch TTF-1 und K-ras.

1.2.2 Adenokarzinom

Das Adenokarzinom ist mit etwa 40% aller Lungenkarzinome die häufigste Art (Kraywinkel & Schönfeld, 2018). Es ist definiert als maligner epithelialer Tumor mit glandulärer Differenzierung und meistens Muzinproduktion. (Rodriguez-Canales *et al.*, 2016). Typische Marker sind Napsin A und Thyreoidaler Transkriptionsfaktor 1 (TTF-1) (Ye *et al.*, 2011).

1.3 Grundlagen K-ras

Um wirksame Therapien für Karzinome mit K-ras-Mutation entwickeln zu können, ist ein detailliertes Verständnis seiner biologischen Funktion Voraussetzung. Deshalb folgt zunächst eine Zusammenfassung über die bisher erforschten biochemischen Mechanismen.

1.3.1 Ras als molekularer Schalter

Alle drei bekannten Isoformen der Ras-Gen-Familie, K-ras, N-ras und H-ras, kodieren für etwa 21kDa große Proteine mit 188-189 Aminosäuren, welche zur Gruppe der guaninnukleotidbindenden Proteine gehören und häufig auch „p21“ genannt werden (McGrath *et al.*, 1984). Diese G-Proteine fungieren in unseren Zellen als eine Art molekularer Schalter und zeichnen sich durch ihr Vorkommen in einem aktiven und inaktiven Zustand aus. (Barbacid, 1987) Dieser wird durch eine Konformationsänderung bestimmt, welche wiederum vom gebundenen Guaninnukleotid abhängt. Handelt es sich um ein GDP, liegt das G-Protein in seiner inaktiven Form vor (Barbacid, 1987). Durch sogenannte guanin nucleotide-exchange factors (GEF) wird jedoch eine Dissoziation des GDP ermöglicht, indem die nukleotidbindende Domäne umstrukturiert, und damit die Dissoziation von GDP erleichtert wird, um anschließend ein neues Guaninnukleotid zu binden und das Protein zu aktivieren (Vetter & Wittinghofer, 2001). Dieses aktive Protein kann nun viele verschiedene Signalkaskaden in der Zelle anregen, bis es wieder inaktiviert wird. Das geschieht durch ein GTPase aktivierendes Protein (GAP), welches die intrinsische

GTPase des G-Proteins aktiviert und zur Hydrolyse des Phosphatrestes führt, sodass der Komplex erneut mit einem GDP in seiner inaktiven Form vorliegt (Sweet *et al.*, 1984; Vetter & Wittinghofer, 2001). In gesunden Zellen scheint es eine basale Aktivität dieser GAPs zu geben, die Ras schnell wieder inaktivieren, solange dies nicht mutiert ist (Trahey & McCormick, 1987).

1.3.2 Ras als Protoonkogen

Kommt es zu einer Mutation im Ras-Gen, so kann es vorkommen, dass das GAP die intrinsische GTPase nicht mehr aktivieren kann (Trahey & McCormick, 1987). Daraus resultiert ein dauerhaft GTP-gebundener Zustand und damit eine nicht mehr vorübergehende, sondern nun konstitutive Aktivierung des G-Proteins, welches fortwährend Signale an seine vielen Effektormoleküle weiterleitet und so zu Veränderungen der Zellmorphologie und -wachstum führt (Sweet *et al.*, 1984). Daher handelt es sich bei dem veränderten Ras-Protein um ein Onkogen.

Die onkogene Wirkung der mutierten Form von Ras ist eindeutig. So liegt eine konstitutiv aktive Form in etwa 25-30% aller menschlichen Krebsformen vor (Scheffzek *et al.*, 1997). K-ras ist insbesondere beim Kolonkarzinom (46%) (Wiesweg *et al.*, 2019) und Pankreaskarzinom (92%) (Bailey *et al.*, 2016) mutiert. Beim Adenokarzinom der Lunge wird der Anteil bisher auf 15-33% geschätzt, mit höherer Quote in der westlichen Bevölkerung (Dogan *et al.*, 2012; Tomasini *et al.*, 2016; Wiesweg *et al.*, 2019; Chen & Zhao, 2020). Die Häufigkeit bei Patienten in Halle ist eine der Fragestellungen in dieser Studie.

1.3.3 Ras Isoformen und ihre Lokalisation an der Membran

Alle Isoformen von Ras besitzen eine N-terminale hochkonservierte Domäne mit der intrinsischen GTPase, welche sich kaum unterscheidet (90-100% identisch) und eine C-terminale hypervariable Region (HVR), welche vor allem für den Transport und die Verankerung in der Plasmamembran verantwortlich ist und zwischen den Formen stark variiert (Hancock, 2003).

Um seine Funktion erfüllen zu können bzw. Tumorentstehung zu fördern, muss Ras an einer Membran lokalisiert sein (Jackson *et al.*, 1990). Bei den Isoformen H-ras, N-ras und dem C-terminalen Exon 4A von K-ras wird die dafür nötige Avidität zur Membran durch Palmitoylierung an Cystein in der hypervariablen Region (HVR), vermittelt durch ein CAAX-Motiv, zusätzlich zu einer Isoprenylierung erreicht (Jackson *et al.*, 1990). Das hauptsächlich exprimierte alternative Exon 4B von K-ras besitzt dort allerdings kein Cystein und wird daher isoprenyliert, aber nicht palmitoyliert (Casey *et al.*, 1989; Hancock *et al.*, 1989). Das Hinzufügen dieses einen hydrophoben Restes scheint nicht ausreichend zu sein, um K-ras an der Membran zu stabilisieren. (Hancock *et al.*, 1990) K-ras 4B besitzt daher eine polybasische Domäne, gebildet durch sechs Lysine an

Position 175-180, die vermutlich mit der negativ geladenen Plasmamembran elektrostatisch interagiert. Erst diese polybasische Domäne gemeinsam mit dem CAAX-Motiv, welches für die Isoprenylierung verantwortlich ist, gewährleistet die Lokalisation an der Plasmamembran und damit die Möglichkeit zur Zelldifferenzierung und Wachstum durch K-ras (Hancock *et al.*, 1990).

Es gibt starke Evidenz dafür, dass die Ras Proteine nicht nur von der Plasmamembran aus ihre weiteren Signalwege anstoßen, sondern internalisiert werden und in Endosomen Kaskaden aktivieren (Pol *et al.*, 1998; Howe *et al.*, 2001; Jiang & Sorkin, 2002). Weiterhin scheinen Ras Proteine, die sich im Golgi oder ER ansammeln, die Fähigkeit zu haben, aktiviert zu werden und Signale weiterzuleiten (Chiu *et al.*, 2002). Dies betrifft jedoch vor allem H-ras und N-ras, da sich K-ras zum aller größten Teil an der Zellmembran befindet (Chiu *et al.*, 2002).

1.3.4 Die Aktivierung von K-ras

Die Aktivierung von K-ras erfolgt vor allem durch Rezeptortyrosinkinasen (z.B. EGFR) mit Hilfe von Adaptermolekülen. Nach Stimulation durch einen Wachstumsfaktor (z.B. EGF) erfolgt eine Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors an Tyrosinresten in C-terminalen Domänen, die nun verschiedene Adapterproteine binden können (Margolis *et al.*, 1989; Honegger *et al.*, 1990; Ferguson *et al.*, 2003). Zu diesen Proteinen gehört auch Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), das mit seiner SH2-Domäne an die phosphorylierte RTK (Lowenstein *et al.*, 1992) und mit seinen beiden SH3-Domänen an die prolinreiche Region von SOS binden kann und dieses damit an die Plasmamembran, in räumliche Nähe von K-ras, rekrutiert (Gale *et al.*, 1993). Bei SOS handelt es sich um einen der wichtigsten GEFs. Ist es an der PM lokalisiert, kann es selbstständig Ras aktivieren (Aronheim *et al.*, 1994). Es sorgt für die Dissoziation von GDP, woraufhin ein neues GTP an K-ras binden kann und das Protein in seinen aktiven Zustand überführt. Das GTP-gebundene K-ras wird nun proliferationsfördernde und apoptosehemmende Kaskaden anstoßen, bis das GTP durch die intrinsische GTPase hydrolysiert wird. Das wird durch die GAPs beschleunigt und reguliert. (Trahey & McCormick, 1987) Onkogen mutiertes Ras kann nicht mehr durch GAPs inaktiviert werden (Schweighoffer *et al.*, 1992). Zu diesen GAPs gehören unter anderem p120RasGAP (RASA1) (Trahey & McCormick, 1987; Sung *et al.*, 2016) und NF1 (Martin *et al.*, 1990). Mutationen im NF1-Gen sind verantwortlich für Neurofibromatose Typ 1 und mit erhöhter Ras-Aktivität in menschlichen Zellen verbunden (Basu *et al.*, 1992). RASA1-Mutationen sind – anders, als man vermuten würde – jedoch nur selten mit Tumoren assoziiert, sondern vor allem mit Gefäßmissbildungen. Das konnte sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen gezeigt werden (Henkemeyer *et al.*, 1995; Revencu *et al.*, 2008).

Bei den SH2 bzw. SH3 Regionen (Src homology) handelt es sich um nichtkatalytische Domänen, die erstmals in Nichtrezeptortyrosinkinasen der v-Src-Familie beschrieben wurden (Koch *et al.*, 1991). Die Phosphorylierung der RTK stellt das Signal für die SH2 Domäne dar, zu binden und so die Bildung eines Komplexes verschiedener Moleküle an der Membran zu initiieren (Sadowski *et al.*, 1986; Koch *et al.*, 1991).

Typische Domänen von GEFs sind CDC25 (benannt nach einem Gen in *Saccharomyces cerevisiae* mit homologer Funktion (Broek *et al.*, 1987)) und REM (Ras exchange motif) (Sacco *et al.*, 2006). CDC25 ist im Stande, das Guaninnukleotid in Ras zu befreien (Lai *et al.*, 1993), REM wird benötigt, um diese Interaktion zu gewährleisten. Eine besondere Rolle scheint ein Phenylalanin an Position 577 zu spielen, das eine Interaktion innerhalb der REM-Domäne vermittelt (Sacco *et al.*, 2006).

Dieses Modell eines aktivierten Rezeptors mit Kinaseaktivität, der über Adapterproteine Ras aktiviert und so die Wachstumssignale weiterleitet, ist jedoch stark vereinfacht. So können GEFs posttranslational verändert und so reguliert werden und mit second messenger Molekülen oder weiteren Proteinen interagieren. RasGRP, ein weiterer GEF, besitzt beispielsweise DAG und Ca²⁺-bindende Domänen (Ebinu *et al.*, 1998). CNrasGEF steigert seine Ras-aktivierende Aktivität durch Bindung von cAMP und cGMP (Pham *et al.*, 2000). Des Weiteren scheint die PI3K die Aktivierung von Ras zu verstärken, indem es die Inaktivierung durch GAPs vermindert (Rubio & Wetzker, 2000).

1.3.5 Die downstream Signalkaskaden von Ras

Seine mitogene Wirkung erreichen die Ras-Proteine über viele komplexe Signalkaskaden. Dazu zählen die **MAP-Kinase-Kaskade**, **PI3-Kinase** und **RALGDS** (Ferrer *et al.*, 2018).

Die kleinen G-Proteine der Ras-Familie aktivieren den MAP-Kinase Signalweg mit den drei Kinasen Raf (MAPKKK mit den Isoformen c-Raf-1, B-raf und A-raf), MEK (MAPKK) und Erk (MAPK), die sich in einer Kaskade phosphorylieren und aktivieren. Das aktivierte Erk interagiert schließlich nicht nur mit Substraten im Zytosol, sondern kann auch in den Zellkern translozieren und dort in die Regulation von Genen eingreifen, die für Wachstum, Differenzierung und Zellzykluskontrolle wichtig sind (Ferrer *et al.*, 2018). GTP-gebundenes Ras – und zwar nur GTP-gebundenes Ras - (Vojtek *et al.*, 1993) rekrutiert zunächst Raf an die Plasmamembran, (Leevers *et al.*, 1994) indem es an die N-terminale regulatorische Domäne von Raf mit hoher Affinität bindet (Zhang *et al.*, 1993). Raf scheint dann umgekehrt GAPs zu inhibieren (Zhang *et al.*, 1993). Die Lokalisation an der PM ist vermutlich der einzige notwendige Schritt zur Aktivierung von Raf (Stokoe *et al.*, 1994). Man geht davon aus, dass Ras an der Plasmamembran

Dimere bildet, um Raf zu aktivieren (Inouye *et al.*, 2000). Raf selbst ist eine Serin/Threonin-Kinase, die MEK, also die MAP-Kinase-Kinase phosphoryliert und damit aktiviert (Dent *et al.*, 1992; Kyriakis *et al.*, 1992). Diese kann anschließend die MAP-Kinase Erk phosphorylieren und aktivieren (Crews *et al.*, 1992). Aktives Erk transloziert in den Zellkern und phosphoryliert dort viele verschiedene Substrate, darunter auch Transkriptionsfaktoren wie c-Myc oder Elk-1, die letztendlich Proliferation, Differenzierung und Wachstum fördern (Wada & Penninger, 2004). Die Rolle von Ras in der Verstärkung des PI3K Weges ist noch nicht ohne jeden Zweifel verstanden, sicher ist jedoch, dass auch dieser Signalweg eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung durch onkogenes Ras spielt (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 2007). Die Phosphatidylinositol-3-Kinase wird durch eine phosphorylierte Rezeptortyrosinkinase (RTK, z.B. EGFR oder PDGFR), vermittelt durch das Adapterprotein SH2, rekrutiert und kann bei ausreichender Phosphorylierung bereits aktiviert werden (Carpenter *et al.*, 1993). Das volle Ausmaß wird aber erst im synergistischen Zusammenspiel mit dem ebenfalls durch die RTK aktivierten GTP-Ras erreicht, wobei GTP-Ras die PI3K nicht oder kaum allosterisch aktiviert, sondern an der Plasmamembran, in unmittelbarer Nähe zu ihren Substraten, stabilisiert und so deren Effektivität deutlich erhöht (Buckles *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). Die nun aktive katalytische Untereinheit von PI3K phosphoryliert das in der Membran vorhandene Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zum Signalmolekül Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃) (Martini *et al.*, 2014). Letzteres bindet an Proteine mit einer PH (pleckstrin homology) Domäne und damit sowohl an die Proteinkinase Akt als auch an PDK1 (phospholipid dependent kinase), wodurch beide an die Membran transloziert werden. Dies ist ein essenzieller Schritt für ihre Phosphorylierung von Akt durch die PDK1. Ist Akt (auch Proteinkinase B / PKB genannt) aktiv, greift sie ihrerseits durch die Phosphorylierung verschiedener Substrate mit ihrer stark antiapoptotischen und proliferationsfördernden Wirkung in die Mechanismen des Zellzyklus ein. Eine sehr entscheidende Rolle spielt hier der Transkriptionsfaktor mTOR (mammalian target of rapamycin) (Martini *et al.*, 2014). Ein weiterer Pathway geschieht durch die Interaktion mit RalGEF-Proteinen wie RalGDS, (Hofer *et al.*, 1994) einem Guaninnukleotidaustauschfaktor für die G-Proteine der Ral-Familie (Ras-like). Ral-A und Ral-B sind ebenfalls Protoonkogene, wobei Ral-A vor allem proliferationsfördernde und Ral-B apoptosehemmende Wirkung zeigen (Chien & White, 2003).

Die hier beschriebenen Signalwege sind nur eine Auswahl der von Ras angestoßenen Kaskaden. Es gibt weitere Moleküle, die mit Ras interagieren, wodurch Ras nicht nur Wachstum und Proliferation, sondern auch Migration und Chemotaxis (Charest *et al.*,

2010), Zell-Zell-Kontakte über AF-6 (Yamamoto *et al.*, 1997) und Endozytose über RIN1 (Tall *et al.*, 2001) steuert. Weiterhin ist Ras in der Lage, über Tiam1 Rac1 (ebenfalls ein G-Protein) zu aktivieren (Lambert *et al.*, 2002). Interessanter Weise kann Ras ebenfalls über Nore1 und RASSF1 Apoptose induzieren, jedoch sind diese beiden Tumorsuppressorgene in Tumoren meistens durch Hypermethylierung deren Promotoren herunterreguliert (Hesson *et al.*, 2003; Vos *et al.*, 2003). Zusammenfassend kann man also festhalten, dass die Ras-Proteine vor allem als ein molekularer Schalter für die Weiterleitung von Wachstumssignalen dienen, die viele verschiedene und äußerst komplexe Kaskaden anstoßen und für Proliferation, Differenzierung und Migration eine entscheidende Rolle spielen, jedoch auch in Apoptose induzierenden Mechanismen involviert sind. Kommt es im Ras-Gen zu einer onkogenen Mutation, wie etwa der Inaktivierung der intrinsischen GTPase, so fördern die Ras-Proteine Tumorentstehung.

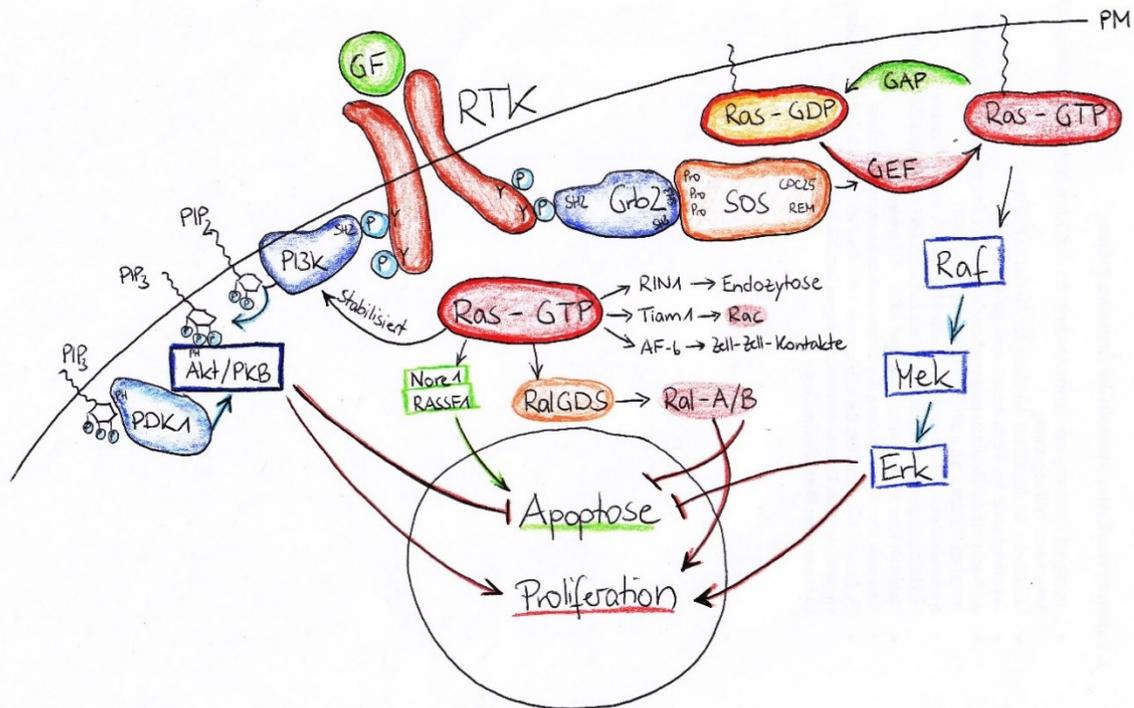


Abbildung 1: Signaltransduktion durch Ras. Aus Gründen der Darstellbarkeit konnten nicht alle in Wirklichkeit an der Membran lokalisierten Proteine auch an die Plasmamembran (PM) gezeichnet werden. Eigene Darstellung.

1.4 Grundlagen TTF-1

1.4.1 Überblick

Der Thyroideale Transkriptionsfaktor 1 ist ein im Zellkern lokalisiertes Protein, das die Transkription von Genen reguliert und unter anderem für die Expression von gewebsspezifischen Proteinen in der Schilddrüse und Lunge essenziell ist (Civitarella

et al., 1993; Kelly *et al.*, 1996). Weiterhin spielt er eine entscheidende Rolle während deren Organogenese und der des Gehirns (Lazzaro *et al.*, 1991). Medizinisch besonders relevant ist seine Funktion als immunhistochemischer Marker für die Identifizierung des Primärtumors bei einer Metastase oder der Differenzierung von Karzinomen. TTF-1 deutet dabei auf ein Adenokarzinom der Lunge hin (Moldvay *et al.*, 2004).

TTF-1 bzw. sein Gen werden auch bezeichnet als Nkx2-1 (Nkx homeobox-1 gene), T/EBP (thyroid-specific enhancer-binding protein) oder TITF (thyroid transcription factor-1 gene).

1.4.2 TTF-1 unter den Transkriptionsfaktoren

Ein Transkriptionsfaktor reguliert die Bildung von Proteinen, indem er die Expression von Genen steuert. Dafür gibt es auf der DNA bestimmte Regionen, die Promotoren, an die die Transkriptionsfaktoren binden können und damit das Ablesen beeinflussen. Guazzi *et al.* konnten zeigen, dass es sich bei der DNA-bindenden Region von TTF-1 um eine Homöodomäne handelt. Weiterhin, dass sein Gen auf Chromosom 14 liegt und damit nicht in einer zuvor beschriebenen homöobox-enthaltenden Region (Guazzi *et al.*, 1990). Eine Homöobox ist eine DNA-Sequenz, die für eine Homöodomäne, also eine bestimmte DNA-bindende Region eines Proteins, codiert. Sie ist gemeinsames Merkmal der homöotischen Gene (Hox-Gene), die im Allgemeinen besonders für die embryonale Entwicklung und Differenzierung eine fundamentale Rolle spielen.

Dementsprechend wurden bereits mehrere Fehlbildungen beschrieben, die durch fehlerhafte Homöogene verursacht sind, insbesondere Synpolydaktylie (Akarsu *et al.*, 1996; Goodman *et al.*, 1997; Bosley *et al.*, 2008). Die Homöodomäne (HD) von TTF-1 weicht jedoch von den anderen ab. Im Gegensatz zu den bekannten Hox-Genen kamen Lazzaro *et al.* in einer Studie mit Rattenembryonen zu dem Schluss, dass TTF-1 sehr gewebsspezifisch in der embryonalen Schilddrüse, Lunge und Teilen des Gehirns exprimiert wird und dort zur Differenzierung beiträgt (Lazzaro *et al.*, 1991). Das stehe in Kontrast zu den üblichen Hox-Genen, welche weniger gewebsspezifisch, sondern regional überlappend exprimiert werden um besonders die Entstehung von Organen in der anterior-posterioren Achse zu steuern (Gaunt *et al.*, 1988).

1.4.3 TTF-1 in der Schilddrüse

TTF-1 ist ein essenzieller Faktor für die Transkription schilddrüsenspezifischer Gene, wie Thyreoglobulin (Civitareale *et al.*, 1989), Thyreoperoxidase (Francis-Lang *et al.*, 1992) und der TSH-Rezeptor (Civitareale *et al.*, 1993). Auch in der Entwicklung der Schilddrüse spielt TTF-1 eine Rolle und stellt einen frühen Marker für sich später in Thyreozyten entwickelnde Zellen dar (Lazzaro *et al.*, 1991).

1.4.4 TTF-1 in der Lunge

In einem Modell mit embryonalen Mauslungen konnte gezeigt werden, dass TTF-1 die Bildung der epithelialen Strukturen in den Luftwegen reguliert. Bei blockierter TTF-1-Aktivität kam es zu unorganisierter hyperplastischer Proliferation der Epithelzellen. Die mesenchymalen Strukturen blieben unbeeinflusst (Minoo *et al.*, 1995). In sich entwickelnden Mäuselungen wurde TTF-1 früh in den Epithelzellen der Hauptbronchien gefunden, nicht jedoch in dem sie umgebenden Mesenchym. Später wiesen die Trachea, Bronchien, Bronchiolen und vor allem die sich neu bildenden distalen Luftwege eine hohe Expression auf. Auch in erwachsenen Tieren wurde insbesondere in Typ II Pneumozyten TTF-1-Expression nachgewiesen, wenn auch schwächer (Zhou *et al.*, 1996). Knock-out Mäuse, denen das TTF-1-Gen homozygot fehlt, werden tot geboren aufgrund fehlenden Lungenparenchyms. Diese Mäuse hatten nur einen rudimentären Bronchialbaum und keine Schilddrüse (Kimura *et al.*, 1996). In einer Studie, in der menschliche fetale und neonatale Lungen mit und ohne Dysplasien untersucht wurden, fand man TTF-1-Expression vor allem in gesunden Bereichen und regenerierenden Abschnitten in Typ-II-Pneumozyten. Gefehlt hat TTF-1 in kollabierten oder infizierten Bereichen. Auch das deutet auf seine fundamentale Rolle in der Differenzierung von Epithelzellen hin (Stahlman *et al.*, 1996). TTF-1 bindet direkt an die Promotoren spezifischer Gene und fördert damit deren Expression. Zu diesen Proteinen gehören die Surfactantproteine und ein Protein der Keulenzellen (ehemals „Clara-Zellen“) (Bruno *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997). Diese sind von großer Bedeutung für die Stabilität und Erregerabwehr der Lunge. Dabei arbeitet TTF-1 mit anderen Faktoren zusammen, wie HNF3 (hepatocyte nuclear factor 3) (Bohinski *et al.*, 1994).

TTF-1 spielt also eine fundamentale Rolle sowohl in der pulmonalen Entwicklung als auch in adulten Lungen für die Transkription elementarer Proteine.

1.4.5 TTF-1 als immunhistochemischer Marker

Die Unterscheidung zwischen einem primären von einem metastatischen Adenokarzinom (ADC) in der Lunge kann insbesondere bei nur wenig verfügbarem Gewebe eine Herausforderung sein und ist nicht immer aufgrund rein morphologischer Kriterien möglich. Nukleäre TTF-1-Expression eignet sich als sensitiver und spezifischer immunhistochemischer Marker für die Unterscheidung zwischen primär pulmonalem ADC und pulmonaler Metastase eines anderen Primärtumors (Moldvay *et al.*, 2004).

In Kombination mit anderen Markern wie CK7 und CK20 wird eine noch sicherere Aussage über die Herkunft einer Metastase getroffen. Dabei sind beispielsweise

Adenokarzinome der Lunge und Brust für gewöhnlich CK7+CK20- und ADC des Kolons CK7-CK20+ (Su *et al.*, 2006).

2 Zielstellung

Hauptziel dieser Datenanalyse ist es, potentielle Unterschiede im Gesamtüberleben und Progressionsfreien Überleben zwischen Patienten mit und ohne K-ras-Mutation bzw. TTF-1-Expression aufzudecken.

Darüber hinaus soll untersucht werden, wie häufig bekannte Mutationen mit welchen bestimmten Subtypen in dieser Stichprobe auftreten und ob es einen Zusammenhang zwischen deren Auftreten und dem Raucherstatus oder Berufsexposition gibt.

Diese Fragestellungen sind besonders relevant im Hinblick auf die sich zurzeit (2021) in klinischen Studien befindlichen Medikamente gegen Subtypen wie K-ras G12C.

3 Methoden

Die hier vorgelegte Arbeit wurde durch die lokale Ethik-Kommission der Martin-Luther-Universität positiv votiert (2020-199).

Zunächst wurden alle Patienten mit metastasiertem, histologisch gesicherten Adenokarzinom der Lunge, die von 2016-2019 im Krankenhaus Martha-Maria in Halle-Dörlau behandelt wurden, in diese retrospektive Kohortenstudie mit explorativem Charakter aufgenommen. Es handelt es sich also um eine Gelegenheitsstichprobe. Von diesen 207 Patienten wurden die für die Fragestellungen erforderlichen Daten mithilfe vorhandener Arztbriefe, Tumorboardprotokolle, Pathologieberichte, Molekularanalysen, radiologischer Berichte und ähnlicher Dokumente, welche durch das Praxisverwaltungssystem des MVZ (Qmed) und das Krankenhausinformationssystem (Orbis) zur Verfügung standen, zusammengetragen und anonymisiert dokumentiert. Zu diesen zählte das Datum der Erstdiagnose (ED), definiert durch den Zeitpunkt der Biopsie, die zur histologischen Bestätigung der Diagnose ADC der Lunge im Stadium IV führte, das Alter bei ED, biologisches Geschlecht, Performance Status (ECOG), Stadium bei ED (IVA, IVB, bzw. bei Patienten mit ED im Jahr 2016 lediglich IV), Raucherstatus (Nieraucher, Exraucher, Raucher) und Vorhandensein einer Berufsexposition. Den Pathologieberichten wurde der TTF-1-Status und die Mutationsanalyse entnommen. Die Mehrheit wurde auf die häufigen Treibermutationen des NSCLC getestet: K-ras, EGFR, ALK, ROS und BRAF. Doch nicht bei allen Patienten wurden diese Analysen durchgeführt. Da es sich allerdings um eine retrospektive Studie handelt, bei der die Daten der Patienten lediglich anonymisiert verwendet werden durften, konnte in diesem Fall nur „unbekannt“ dokumentiert werden. Folglich schieden diese Patienten in den entsprechenden Datenauswertungen aus. Weiter wurde erfasst, ob und wann das Karzinom operiert wurde und welche Therapie in 1st und 2nd Line verabreicht wurde (Immunchemotherapie, Chemotherapie, Immuntherapie, nur Tyrosinkinaseinhibitoren, nur Bestrahlung, keine). Das Erstellen der Überlebenskurven erforderte die Kenntnis des Progressionsfreien Überlebens (PFS), berechnet aus dem Datum der ED bis zum Datum des gesicherten Progresses (meist durch CT oder MRT) sowie des Gesamtüberlebens, errechnet von ED bis zum Todesdatum unabhängig von der Todesursache und des Beobachtungszeitraums, definiert durch die Zeitspanne von ED bis zum Zeitpunkt des letzten dokumentierten Kontakts mit medizinischem Personal. Da die Patienten im MVZ regelmäßig zur Behandlung und Kontrolle erscheinen und viele auf der Palliativstation in Dörlau verstorben sind, konnte die Mehrheit gut nachverfolgt werden.

Die verwendeten Verfahren zur Mutationsanalyse waren Nukleinsäureamplifikationen mittels PCR der für K-ras Exon 2 Codon 12/13, EGFR Exon 18, 19, 20, 21 sowie BRAF Exon 15 Codon 600 codierenden Abschnitte mit spezifischen Sonden und anschließender Sequenzierung mit direktem Nachweis potentieller Punktmutationen mit einer Sensitivität von 5% (K-ras, BRAF) bzw. 20% (EGFR) mutierter DNA. Für die Bestimmung des ALK- und ROS-Status wurden chromogene Hybridisierungen (CISH) mit den die entsprechenden Genloci umspannenden DNA-Sondenkombinationen ZytoDot 2C SPEC ALK bzw. ROS der Firma Zytovision mit Darstellung einer Translokation durch Zuordnung der verschiedenfarbigen Signale im Sinne einer so genannten break-apart-Sonde und anschließender Auszählung von mindestens 50 Tumorzellen durchgeführt.

Für die statistischen Analysen diente IBM SPSS Statistics 27. Die Überlebenskurven mit den dazugehörigen Werten wie medianes Überleben und dessen Konfidenzintervalle wurden mit einer Kaplan-Meier-Kurve und dem dazugehörigen Log-Rank-Test erstellt. Hazard Ratios und deren 95%-Konfidenzintervalle sowie p-Werte wurden mittels Cox-Regression ermittelt. Ob eine Assoziation zwischen kategorialen Merkmalen existiert, wurde mit Fischers exaktem Test überprüft.

Für die unterschiedlichen Fragestellungen wurden verschiedene Subgruppen der insgesamt 207 Patienten eingeschlossen. So entfielen für den Vergleich zwischen K-ras bzw. TTF-1-Positiven und -Negativen alle Nichtgetesteten und alle mit anderen Treibermutationen (EGFR, BRAF, ALK, ROS) aus der Betrachtung.

4 Ergebnisse

4.1 Studienpopulation

207 Patienten mit metastasiertem ADC der Lunge wurden zwischen 2016 und 2019 im MVZ oder stationären Bereich des Krankenhauses Martha-Maria behandelt.

185 dieser Patienten erhielten eine vollständige Mutationsanalyse und konnten daher in den Vergleich der Überlebenskurven eingeschlossen werden.

Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose war 67 Jahre (Spannweite 41-87 Jahre). Etwa zwei Drittel der Patienten waren männlich (139 $\hat{=}$ 67%), ein Drittel weiblich (68 $\hat{=}$ 33%).

Der Performance Status ECOG war 0-1 bei 183 Patienten ($\hat{=}$ 88,4%), 2-3 bei 20 Patienten ($\hat{=}$ 9,7%) und bei 4 Patienten (1,9%) wurde ein ECOG von 4 ermittelt.

167 ($\hat{=}$ 80,7%) waren aktive oder frühere Raucher, 40 ($\hat{=}$ 19,3%) haben nie geraucht.

Das Stadium bei ED war IVA bei 79, IVB bei 96 nach UICC8 und IV bei 32 nach UICC7. Dabei ist zu beachten, dass im Jahr 2016 gemäß UICC noch keine Einteilung in IVA oder IVB erfolgte.

4.2 Häufigkeiten von Mutationen

4.2.1 Alle Treibermutationen

Tabelle 1: Treibermutationen aller Patienten

Mutation	Anzahl absolut	Anteil an allen Patienten (207)	Anteil an allen mit Mutationsanalyse (185)
keine	110	53,1%	59,5%
KRAS	47	22,7%	25,4%
EGFR	22	10,6%	11,9%
BRAF	4	1,9%	2,2%
ALK	3	1,4%	1,6%
ROS	1	0,5%	0,5%
unbekannt	22	10,6%	

22 (10,6%) Patienten erhielten keine Mutationsanalyse. Um die Verteilung der Mutationen in dieser Stichprobe einzuschätzen, können daher nur die Daten der übrigen 185 Patienten verwendet werden.

Bei knapp 60% der Getesteten konnte keine Mutation gefunden werden. Unter den Treibermutationen macht K-ras den mit Abstand größten Anteil mit über einem Viertel (25,4%) aller Getesteten aus, gefolgt von EGFR (11,9%). BRAF, ALK und ROS wurden nur selten nachgewiesen mit 2,2%, 1,6% bzw. 0,5% aller Patienten mit Mutationsanalyse.

Die Summe aller absoluten Häufigkeiten in Tabelle 1 übertrifft mit 209 die Anzahl der 207 untersuchten Patienten. Die Ursache hierfür liegt in der Tatsache, dass bei zwei Patienten sowohl eine EGFR- als auch eine K-ras-Mutation festgestellt wurde. Einer der beiden wies in derselben Molekularanalyse beide Mutationen auf und wird in dieser Studie in den Überlebenskurven trotz seiner positiven EGFR-Analyse als K-ras-positiv eingeschlossen. Der zweite wurde zunächst als EGFR-positiv und K-ras-negativ getestet, später allerdings genau anders herum. Um Verfälschungen zu reduzieren, wird dieser Patient daher für alle Überlebenskurven ausgeschlossen. Das gilt ebenfalls für einen weiteren, dessen Primärtumor in der Lunge mehrmals negativ auf EGFR getestet wurde, während die Hirnmetastase positiv war. In der oben aufgeführten Tabelle und den zuvor genannten Daten wurde dieser als EGFR-negativ gewertet.

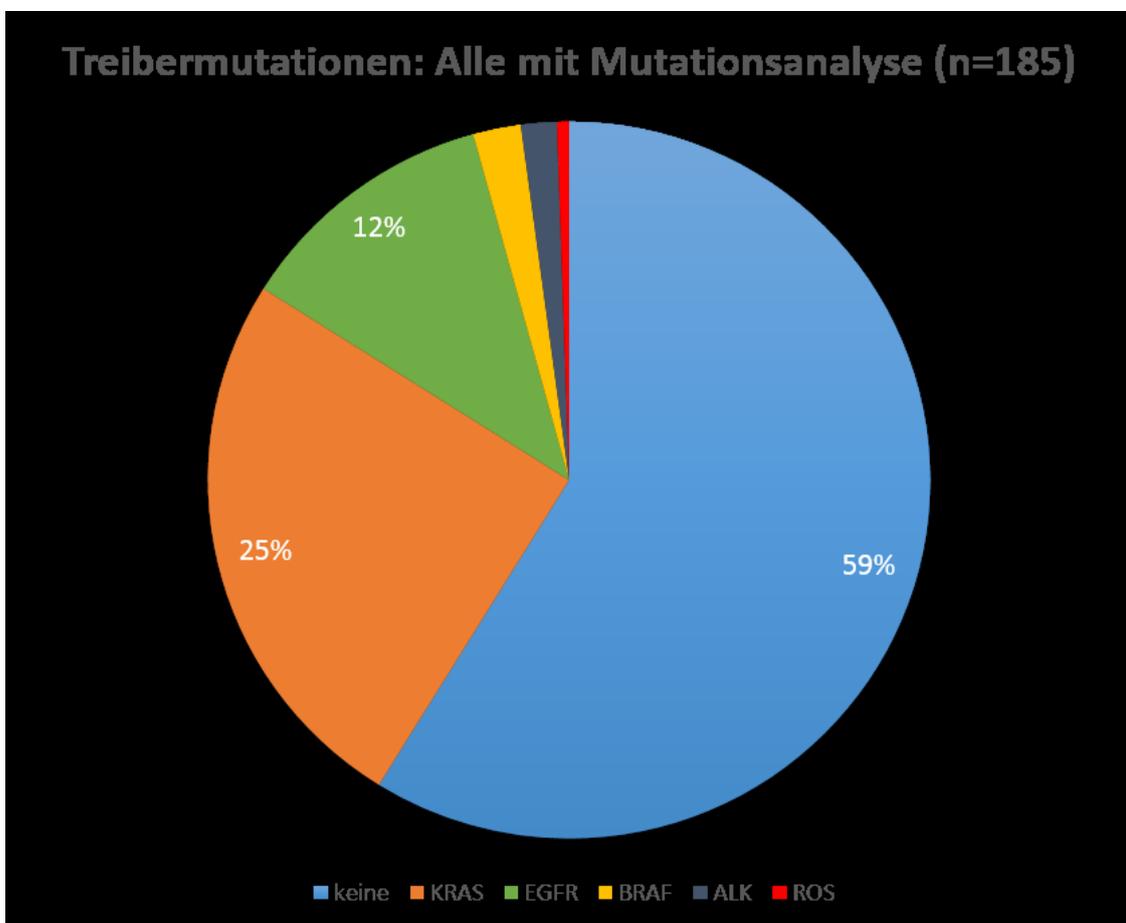


Abbildung 2: Treibermutationen aller Getesteten

4.2.2 K-ras-Mutationen

47 Patienten (25,4%) waren positiv auf K-ras getestet. Zusätzlich wurden die Subtypen bestimmt.

Tabelle 2: K-ras Subtypenanalyse

KRAS Mutation	Anzahl absolut	Anteil alle Patienten (207)	Anteil alle mit Mutationsanalyse (185)	% der KRAS Mutationen
G12C	15	7,2%	8,1%	31,9%
G12V	15	7,2%	8,1%	31,9%
G12D	8	3,9%	4,3%	17,0%
G12S	3	1,4%	1,6%	6,4%
G12A	3	1,4%	1,6%	6,4%
G12F	1	0,5%	0,5%	2,1%
G13C	1	0,5%	0,5%	2,1%
G13X	1	0,5%	0,5%	2,1%
negativ	138	66,7%	74,6%	
unbekannt	22	10,6%		

Die am häufigsten ausgebildeten Mutationen waren G12C (c.34G>T) und G12V (c.35G>T) mit je 15 Patienten und damit knapp je 32% aller K-ras-Mutationen. Es folgte G12D (c.35G>A) mit 8 Patienten (17%). Diese drei Typen nahmen zusammen über 80% aller Mutationen im K-ras Gen in dieser Stichprobe ein. Die übrigen rund 19% entfielen auf G12S (c.34G>A), G12A (c.35G>C), G12F (c.34GG>TT) und zwei Mutationen in Codon 13. Das Codon 61 wurde nicht untersucht.

Eine Assoziation zwischen Geschlecht und K-ras gab es nicht (26% Positive unter Männern und 24% unter Frauen).

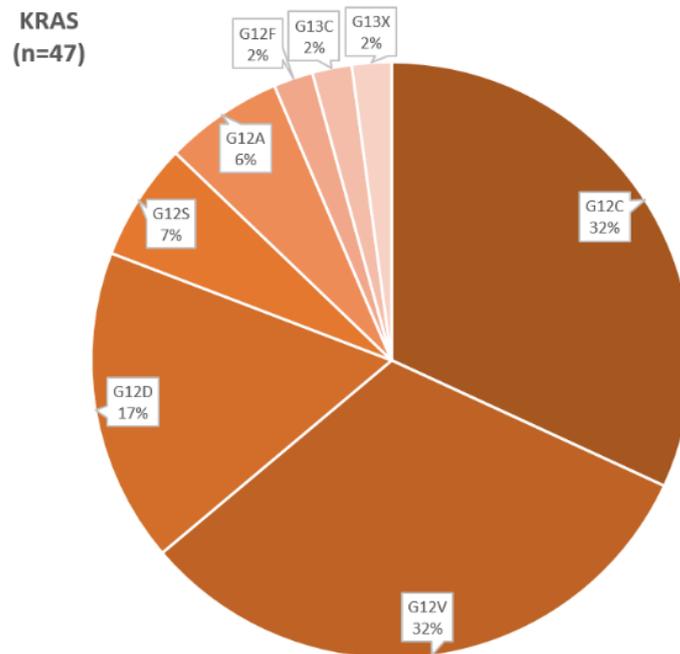


Abbildung 3: Anteile einzelner Subtypen an allen K-ras-Mutationen

4.2.3 Raucherstatus, Berufsexposition und K-ras

Unter den 185 Patienten mit Mutationsanalyse waren 80,5% aktive oder ehemalige Raucher, 19,5% hatten nie geraucht. Fast 90% der K-ras-Positiven waren Raucher oder Exraucher, während nur 77,5% der K-ras-Negativen jemals geraucht hatten. Dieser Unterschied wird noch deutlicher, wenn die Werte aus einer alternativen Perspektive analysiert werden. So liegt die Quote der K-ras-Positiven unter den Rauchern bei 28,2% und ist damit etwa doppelt so hoch wie die der Nichtraucher mit 13,9%. Das relative Risiko (RR) beträgt 2,02 (95% KI: 0,87-4,76). Mit Hilfe von Fischers exaktem Test wurde für die Frage nach einer möglichen Assoziation zwischen Raucherstatus und K-ras-Mutation ein p-Wert von 0,090 bestimmt.

Tabelle 3: Raucheranteil unter K-ras-Mutierten und Nicht-Mutierten

	Raucher/Exraucher	Nichtraucher
Alle mit Analyse (185)	80,5% (149)	19,5% (36)
KRAS+ (47)	89,4% (42)	10,6% (5)
KRAS- (138)	77,5% (107)	22,5% (31)

Die 22 Patienten, deren K-ras-Status unbekannt ist, hatten einen Raucheranteil von 81,8% (18).

Tabelle 4: Anteil K-ras-Mutierter unter Rauchern und Nichtrauchern

	KRAS+	KRAS-
Alle mit Analyse (185)	25,4% (47)	74,6% (138)
Raucher/Exraucher (149)	28,2% (42)	71,8% (107)
Nichtraucher (36)	13,9% (5)	86,1% (31)

Ein sehr ähnliches Bild zeigt der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Berufsexposition (BE) im Sinne von Asbestkontakt. Unter den K-ras-Mutierten war der Anteil der Patienten mit BE mit 12,8% etwa 2,5-mal so hoch wie unter den K-ras-Negativen mit 5,1%. Mit 46,2% wiesen Berufsexponierte fast doppelt so häufig K-ras-Mutationen auf wie Patienten ohne BE. Damit beträgt das relative Risiko 1,94 (95% KI: 1,02-3,69; p=0,097).

Tabelle 5: Anteil Berufsexponierter unter K-ras-Mutierten und Nicht-Mutierten

	Berufsexposition	keine BE
Alle mit Analyse (185)	7,0% (13)	93,0% (172)
KRAS+ (47)	12,8% (6)	87,2% (41)
KRAS- (138)	5,1% (7)	94,9% (131)

Unter den 22 Patienten mit unbekanntem K-ras-Status wiesen 9,1% (2) eine Berufsexposition auf.

Tabelle 6: Anteil K-ras-Mutierter unter Patienten mit und ohne Berufsexposition

	KRAS+	KRAS-
Alle mit Analyse (185)	25,4% (47)	74,6% (138)
Berufsexposition (13)	46,2% (6)	53,8% (7)
keine BE (172)	23,8% (41)	76,2% (131)

Vergleicht man Patienten mit sowohl Berufsexposition als auch Raucheranamnese mit Nichtrauchern ohne Asbestkontakt, so stellt sich ein noch deutlicherer Unterschied dar. In der Gruppe der doppelt Exponierten traten K-ras-Mutationen mehr als 3-mal so häufig auf. Das relative Risiko liegt bei 3,32 (95% KI: 1,22-9,09; p=0,047).

Tabelle 7: Anteil K-ras-Mutierter unter Patienten mit sowohl BE als auch Raucheranamnese im Vergleich zu Patienten ohne beide Einflüsse

	KRAS+	KRAS-
Berufsexposition und Raucher (13)	46,2% (6)	53,8% (7)
weder BE noch Raucher (36)	13,9% (5)	86,1% (31)

4.2.4 Treiber Mutationen nach Raucherstatus

Neben dem bereits beschriebenen Unterschied in der Häufigkeit von K-ras-Mutationen unter Rauchern und Nichtrauchern fällt außerdem auf, dass der Anteil der EGFR-Mutierten unter den Nichtrauchern 6-mal so hoch ist wie unter den Rauchern. Das relative Risiko beträgt daher 5,98 (95% KI: 2,77-12,89; $p < 0,001$). In Tabelle 8 sind nur die 185 Patienten mit Mutationsanalyse berücksichtigt. Auch hier beträgt die scheinbare Summe aller Patienten 187, was mit den beiden oben beschriebenen Fällen zu erklären ist, in denen zwei Patienten sowohl auf K-ras als auch auf EGFR positiv getestet wurden.

Tabelle 8: Treiber Mutationen nach Raucherstatus

Mutation	(Ex)Raucher	Anteil bei Rauchern	Nichtraucher	Anteil bei Nichtrauchern
keine	93	62,4%	17	47,2%
KRAS	42	28,2%	5	13,9%
EGFR	9	6,0%	13	36,1%
BRAF	4	2,7%	0	0,0%
ALK	1	0,7%	2	5,6%
ROS	1	0,7%	0	0,0%

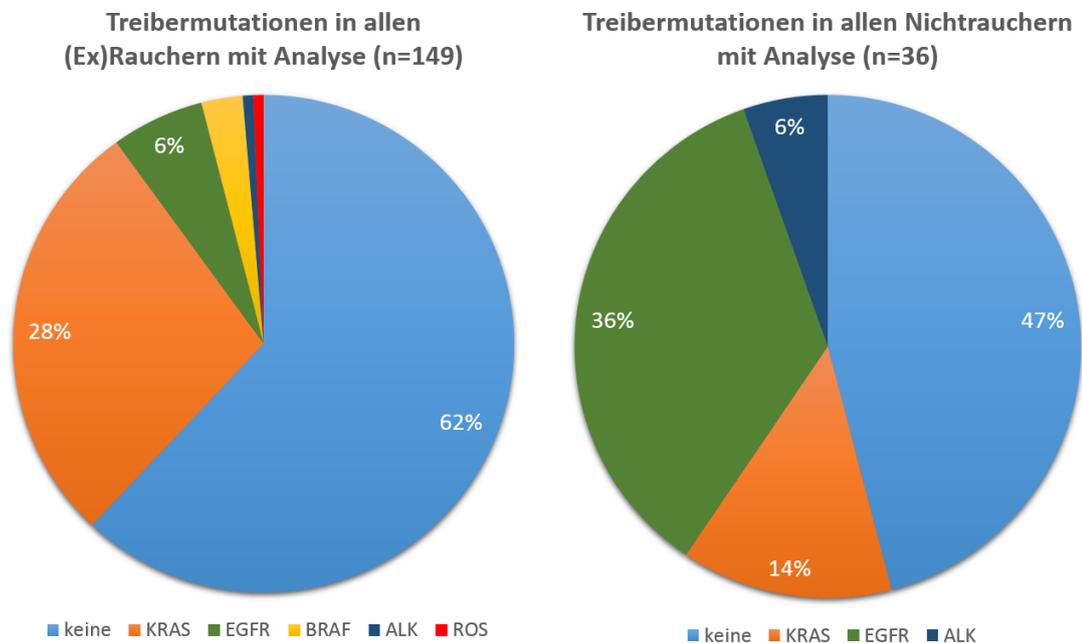


Abbildung 4: Treiber Mutationen in Rauchern und Nichtrauchern mit vollständiger Mutationsanalyse

Während bei den Rauchern die K-ras-Mutationen mit 28% den größten Anteil einnehmen, sind dies bei den Nichtrauchern mit über einem Drittel die EGFR Mutationen.

4.2.5 TTF-1 Häufigkeit

197 der 207 Patienten wurden auf TTF-1 getestet. Von den Getesteten zeigten 80,2% (158) eine mindestens schwache TTF-1-Expression in den Kernen. Unter den TTF-1-Positiven ist der Frauenanteil mit 35,4% (56 von 158) höher als unter den Negativen mit 25,6% (10 von 39). 84,4% aller getesteten Frauen waren TTF-1-positiv (56 von 66), jedoch nur 77,9% aller Männer (102 von 131). Fischers exakter Test auf Assoziation zwischen biologischem Geschlecht und TTF-1-Expression ermittelt einen p-Wert von $p=0,264$. Unter Nichtrauchern war die TTF-1-Quote mit 83,8% sehr leicht erhöht ($p=0,651$). Die K-ras-Positiven zeigten etwas seltener eine TTF-1-Expression (74,5% Positive vs. 83,1%; $p=0,203$). Unter den 21 EGFR-positiven und auf TTF-1 getesteten Patienten wiesen alle eine TTF-1-Expression auf (RR= 1,28; 95% KI: 1,18-1,38; $p=0,015$). Eine Person wurde zwar positiv auf EGFR getestet, ihr TTF-1-Status ist jedoch nicht bekannt.

Tabelle 9: TTF-1-Expression

	Alle Getesteten	getestete Raucher	getestete Nichtraucher	getestete KRAS+	getestete KRAS-
TTF-1-Positiv	158	127	31	35	113
TTF-1-Negativ	39	33	6	12	23
Anteil TTF-1-Positiver	80,2%	79,4%	83,8%	74,5%	83,1%

Tabelle 10: TTF-1-Expression nach Geschlecht

	Männer	Frauen	Gesamt
TTF-1-negativ	29	10	39
TTF-1-positiv	102	56	158
Gesamt	131	66	197

77,9% Positive 84,8% Positive $p=0,264$

Tabelle 11: TTF-1-Expression nach EGFR

	EGFR+	EGFR-	Gesamt
TTF-1-negativ	0	35	35
TTF-1-positiv	21	127	148
Gesamt	21	162	183

100% Positive 78,4% Positive $p=0,015$

4.3 Überleben aller Patienten

Wie bereits unter 4.2.1. erläutert, wurden für die folgenden Überlebensstatistiken zwei der 207 Patienten ausgeschlossen, sodass mit einer Fallzahl von 205 gerechnet wurde.

Für die zentrale Fragestellung, ob es einen Unterschied im Überleben zwischen K-ras bzw. TTF-1-Positiven und Negativen gibt, ist es wichtig zu wissen, ob es andere Merkmale als Einflüsse auf das Überleben gibt als die Mutation, in welchen sich die beiden beobachteten Gruppen unterscheiden. Dazu könnte das Geschlecht, das Alter und der Performance Status zählen. Aus diesem Grund folgen zunächst einige Auswertungen, um Tendenzen erkennen zu können und später korrekt zu interpretieren.

4.3.1 Gesamtüberleben (OS) und Progressionsfreies Überleben (PFS) aller Patienten

In den folgenden Kaplan-Meier-Kurven ist das OS und PFS aller 205 Patienten dargestellt. Nach steilem Abfallen der Kurven in den ersten eineinhalb Jahren treten die Ereignisse danach seltener auf. Nach 8,0 Monaten (95% KI 5,8-10,2) war die Hälfte der Patienten verstorben. Nach Ende des Beobachtungszeitraums von bis zu fünf Jahren waren noch schätzungsweise 10% am Leben. Nach 6,3 Monaten (95% KI: 4,7-7,9) war es bei 50% der Patienten zu einer Progression gekommen.

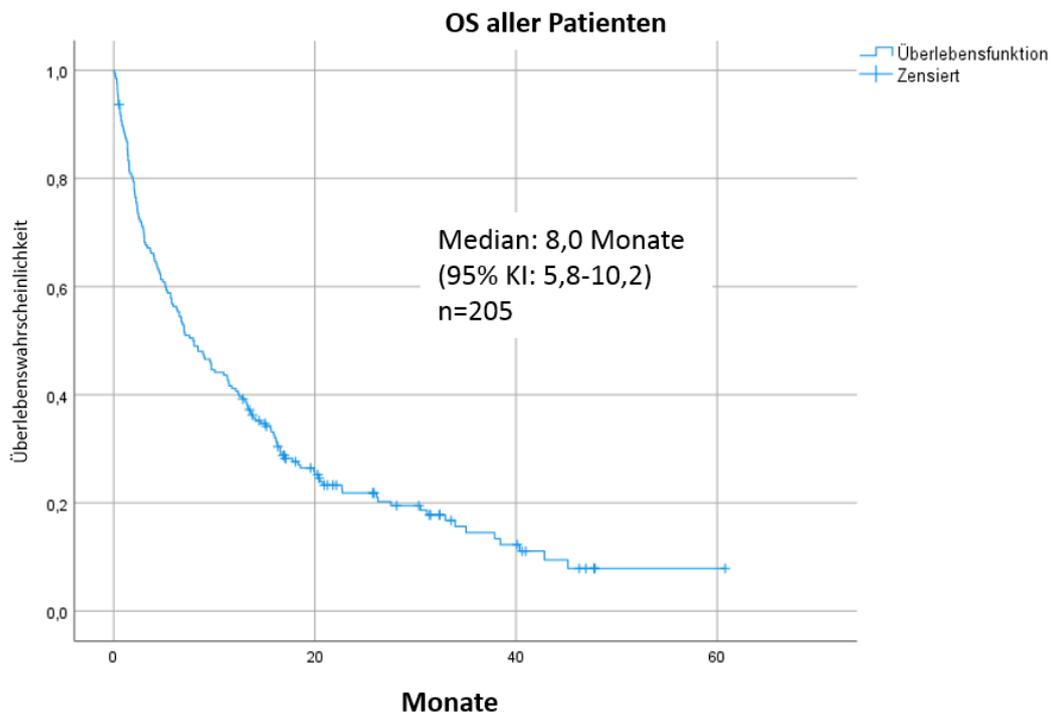


Abbildung 5: Gesamtüberleben aller Patienten

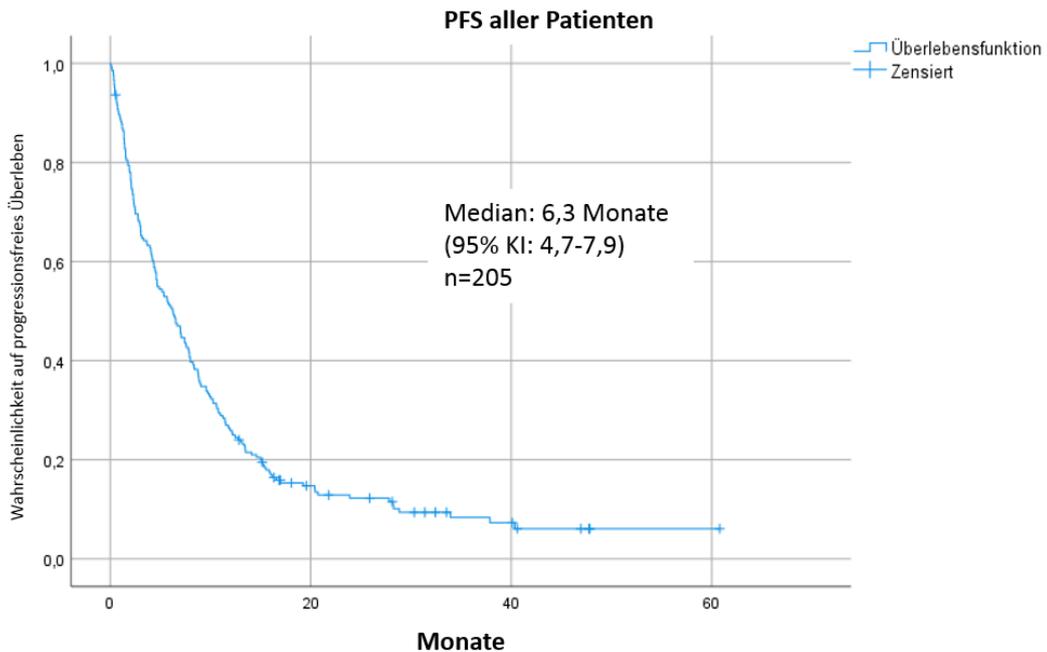


Abbildung 6: Progressionsfreies Überleben aller Patienten

4.3.2 Überleben nach Alter

Bei einer Spannweite von 41-87 Jahren Alter bei ED (Median 67) ist davon auszugehen, dass einige Patienten aufgrund ihres jungen Alters eine bessere Prognose hatten als Ältere. Um diesen Einflussfaktor zu betrachten, wurde das OS aller 205 Patienten mit Hilfe der Cox-Regression analysiert. Dabei lag die Hazard Ratio bei 1,021 (95% KI: 1,005-1,038; $p=0,010$). Dementsprechend steigt in dieser Stichprobe das Risiko, innerhalb eines bestimmten Zeitraums zu versterben, mit jedem Lebensjahr mehr bei ED, etwa um den Faktor 1,021. Ist ein Patient 10 Jahre älter als ein anderer, liegt sein Sterberisiko schon beim 1,23-fachen (95% KI: 1,05-1,45), bei 20 Jahren beim 1,52-fachen (95% KI: 1,10-2,11) des jüngeren Patienten.

4.3.3 Überleben nach Geschlecht

Zwei Drittel (137) aller Patienten waren männlich, 68 waren weiblich. In der folgenden Kaplan-Meier-Kurve ist das OS aller 205 Männer und Frauen, unabhängig von Mutationen dargestellt.

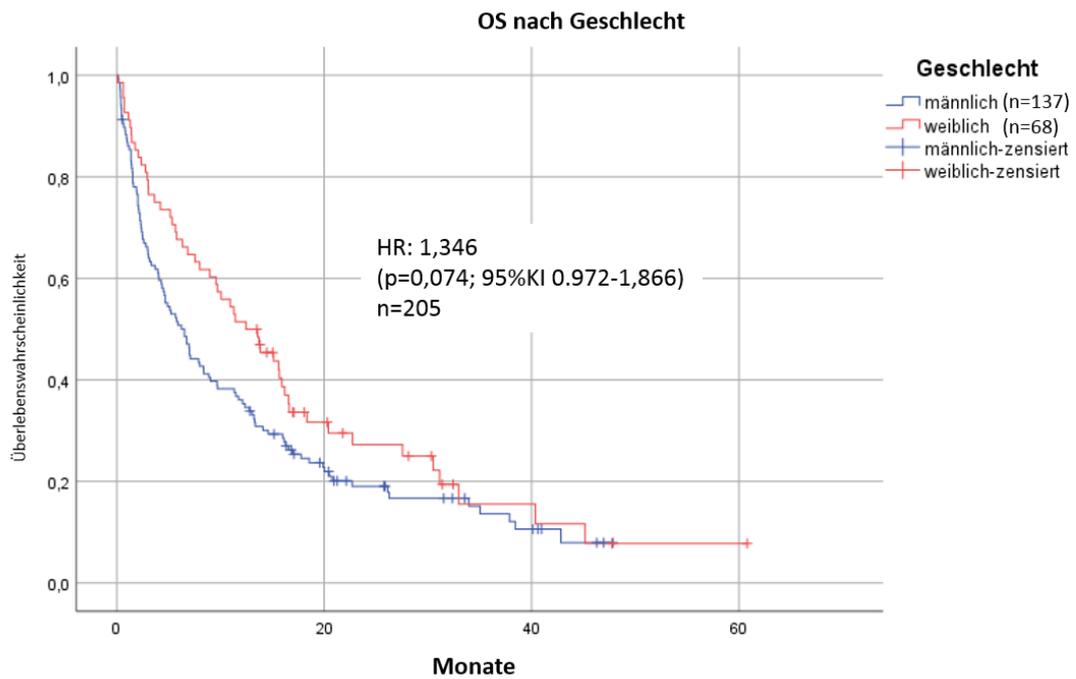


Abbildung 7: Gesamtüberleben nach Geschlecht

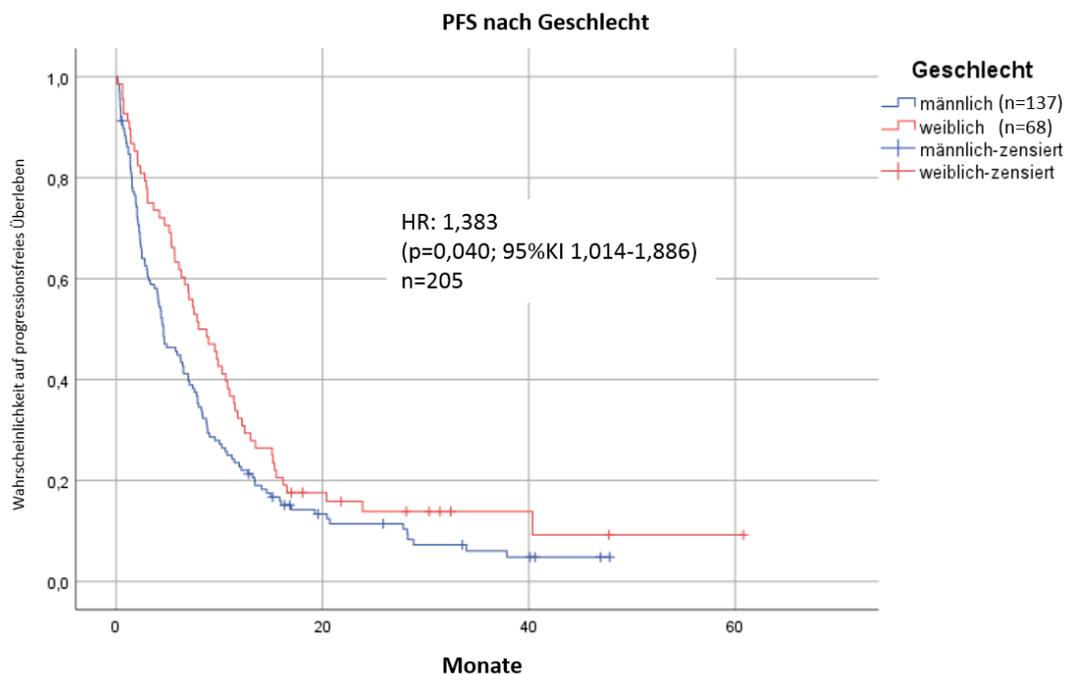


Abbildung 8: Progressionsfreies Überleben nach Geschlecht

In dieser Stichprobe hatten die Männer entsprechend der Hazard Ratio ein 1,35-fach (95% KI: 0,97-1,87) höheres Risiko, in einem bestimmten Zeitraum zu versterben. Das mediane OS war hier ca. 6,5 Monate (95% KI: 4,63-8,44) für Männer und 12,5 Monate (95% KI: 7,52-17,42) für Frauen. Betrachtet man das PFS, zeigt sich ein ähnliches Bild mit einer HR von 1,38 (95% KI: 1,01-1,89; $p=0,040$).

Mit Hilfe der multivariablen Cox-Regression mit den beiden Kovariaten Geschlecht und Alter beträgt die HR für das Geschlecht 1,394 (95% KI: 1,004-1,936; $p=0,047$) und für ein Lebensjahr mehr 1,023 (95% KI: 1,006-1,040; $p=0,007$), wonach mit einem 10 Jahre höheren Alter das Sterberisiko pro Zeiteinheit um etwa 26% steigen würde.

4.3.4 Überleben nach ECOG

100 der in die Studie eingeschlossenen Patienten waren in gutem Allgemeinzustand mit einem ECOG von 0, bei 82 betrug er 1, und 24 wiesen einen stark reduzierten Zustand auf mit einem ECOG von 2-4 auf. Aufgrund der geringeren Fallzahlen wurden diese 24 Patienten in einen Arm eingeteilt. Der Performance Status und damit die allgemeine Verfassung bei ED schien in dieser Stichprobe eine sehr große Rolle in Hinblick auf das Überleben zu spielen. Während die Mehrheit der Erkrankten mit einem ECOG von 0 über ein Jahr überlebte (Median 15 Monate, 95% KI: 12,21-18,99), verstarb die Hälfte derjenigen mit einem Wert von 1 bereits nach 4,37 Monaten (95% KI: 2,38-6,36) und diejenigen mit 2-4 im Median nach nur 1,53 Monaten (0,81-2,26). Keiner der 23 Patienten mit ECOG 2-4 überlebte länger als 16 Monate, wobei hier keine zensierten Ereignisse auftraten.

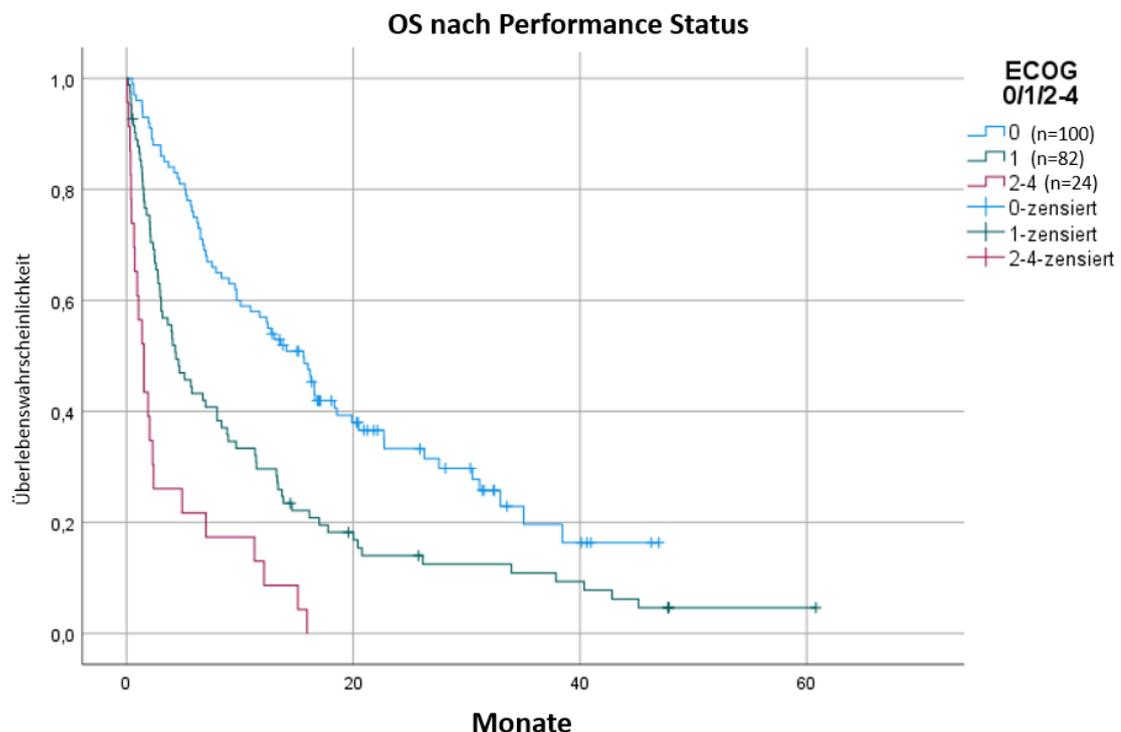


Abbildung 9: Gesamtüberleben nach ECOG

Entsprechend den Hazard Ratios gab es ein fast 2-fach ($HR=1,93$; 95% KI: 1,39-2,68) erhöhtes Sterberisiko für Personen mit ECOG 1 und ein fast 5-fach ($HR=4,94$; 95% KI: 3,04-8,02) erhöhtes für jene mit 2-4 im Vergleich zu Patienten mit einem Wert von 0. ($p<0,001$)

4.4 Überleben nach K-ras-Status

Die in dieser Studie betrachteten Patienten erhielten aufgrund ihrer verschiedenen molekularen Marker (insbesondere PD-L1-Status) unterschiedliche Therapien. Bei Auswertung der verabreichten First Line Therapien der beiden Gruppen im Vergleich fällt jedoch eine in etwa gleiche Verteilung auf.

Tabelle 12: Therapie nach K-ras-Status

1st Line Therapie	K-ras-Mutation (46)	K-ras-WT (110)
Immunchemotherapie	41,3% (19)	39,0% (43)
Immuntherapie Mono	8,7% (4)	6,3% (7)
Chemotherapie	21,7% (10)	21,8% (24)
Nur Radiatio	-	5,4% (6)
Keine / BSC	13,0% (6)	14,5% (16)
Unbekannt	15,2% (7)	12,7% (14)

Um K-ras als möglichen prognostischen Marker zu untersuchen, wurde das OS und PFS aller auf K-ras getesteten Personen analysiert. Ausgeschlossen wurden jedoch alle Patienten mit EGFR, BRAF, ALK oder ROS-Mutationen. Außerdem wurde für diese Überlebenskurven ein weiterer, oben bereits beschriebener Patient ausgeschlossen, dessen Mutationsanalyse zunächst K-ras-Wildtyp ergab, später jedoch die Mutation G12C. Damit stellen die folgenden Kaplan-Meier-Kurven das OS bzw. PFS von 156 Patienten dar, von denen 46 K-ras-Positiv waren.

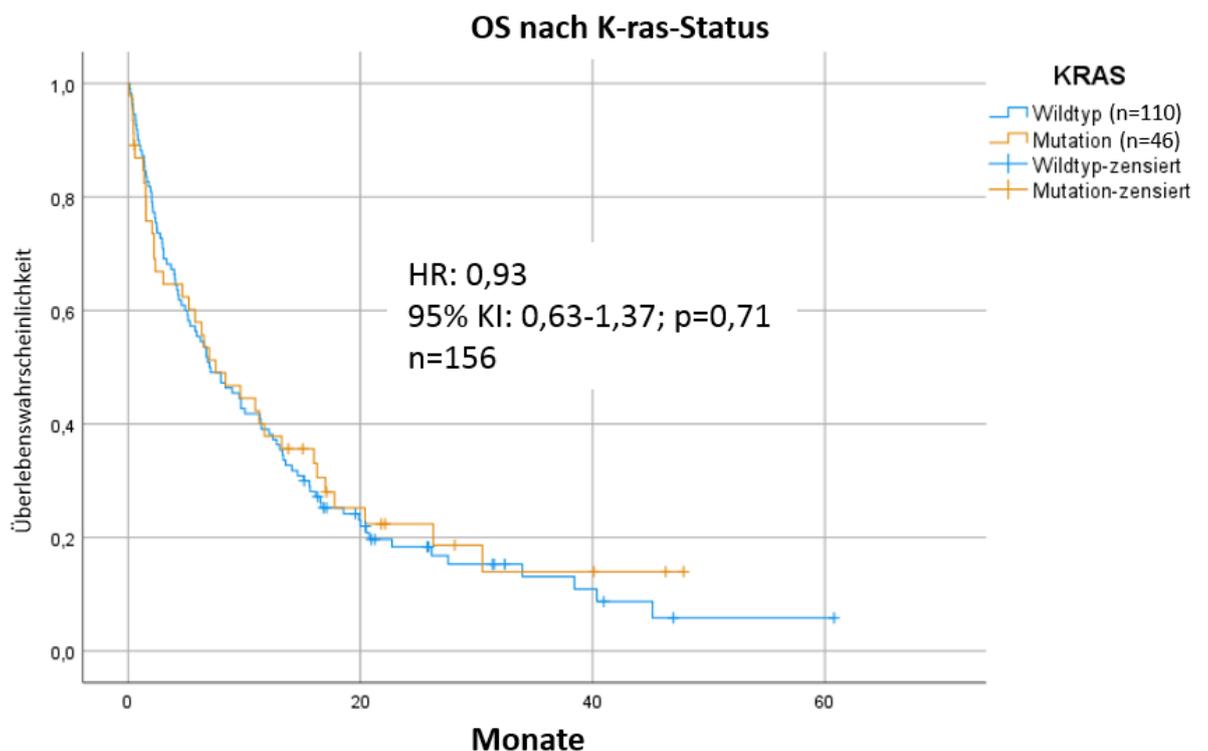


Abbildung 10: OS nach K-ras-Mutation

Hier ist kein Unterschied zwischen K-ras-Mutierten und Wildtyp erkennbar. Die medianen Überlebenszeiten sind mit 7,5 (K-ras-Mutation, 95% KI: 3,16-11,90) und 7,0 Monaten (Wildtyp, 95% KI: 3,86-10,14) beinahe identisch. Die HR von 0,93 (95% KI: 0,63-1,37; $p=0,71$) ist hier auf die K-ras-Positiven bezogen, sodass Mutierte laut diesem Schätzer einen minimalen Überlebensvorteil verzeichnet hätten.

In der multivariablen Regression zeigt sich kein Zusammenhang zwischen OS und K-ras-Mutation. Alle anderen bisher untersuchten Faktoren behalten ihre Tendenz auf die Prognose. So haben ältere Patienten, TTF-1-Negative und Männer eine eher schlechte Prognose laut diesen Werten.

Tabelle 13: Multivariable Regression des OS mit K-ras, TTF-1, Geschlecht und Alter als Kovariaten

	p-Wert	HR	95% KI
K-ras (pos. vs. neg.)	0,980	1,005	0,680-1,486
TTF-1 (pos. vs. neg.)	0,294	0,802	0,531-1,211
Alter bei ED	0,008	1,024	1,006-1,042
Geschlecht (m. vs. w.)	0,340	1,203	0,823-1,759

Im PFS stellte man im Median bei K-ras-Negativen einen Progress nach 5,7 (95% KI: 4,13-7,40) Monaten fest, bei Mutierten nur 17 Tage später nach 6,3 Monaten (95% KI: 3,23-9,44). Auch in der multivariablen Regression zeigt sich kein prognostischer Einfluss von K-ras im PFS.

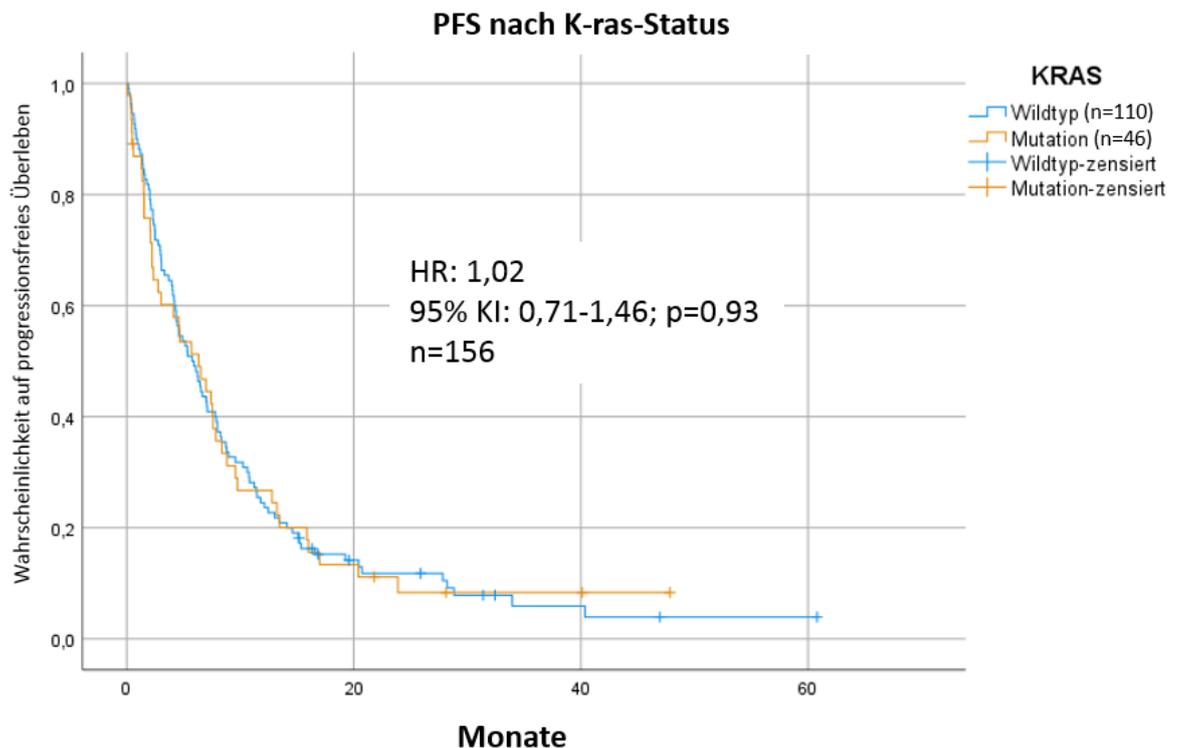


Abbildung 11: PFS nach K-ras-Mutation

Tabelle 14: Multivariable Cox-Regression des PFS mit K-ras, TTF-1, Geschlecht und Alter als Kovariaten

	p-Wert	HR	95% KI
K-ras (pos. vs. neg.)	0,575	1,113	0,766-1,618
TTF-1 (pos. vs. neg.)	0,226	0,781	0,524-1,165
Alter bei ED	0,024	1,019	1,003-1,037
Geschlecht (m. vs. w.)	0,164	1,296	0,899-1,869

4.5 Überleben nach K-ras-Subtyp

Schließlich wurden die Überlebensdaten noch in Hinblick auf die genaue K-ras-Mutation analysiert, um potentielle Unterschiede im Überleben zwischen den einzelnen Subtypen zu identifizieren. Dazu wurden dieselben 156 Patienten eingeschlossen, die auch für die oben beschriebenen Auswertungen zur K-ras-Mutation verwendet werden konnten. Darunter waren 110 Patienten mit K-ras-Wildtyp, 15 mit der Mutation G12V, 14-mal G12C und 8-mal G12D. Die übrigen 9 Mutationen wurden in einem Studienarm zusammengeschlossen, da diese Gruppen ansonsten deutlich zu klein für eine sinnvolle Auswertung wären.

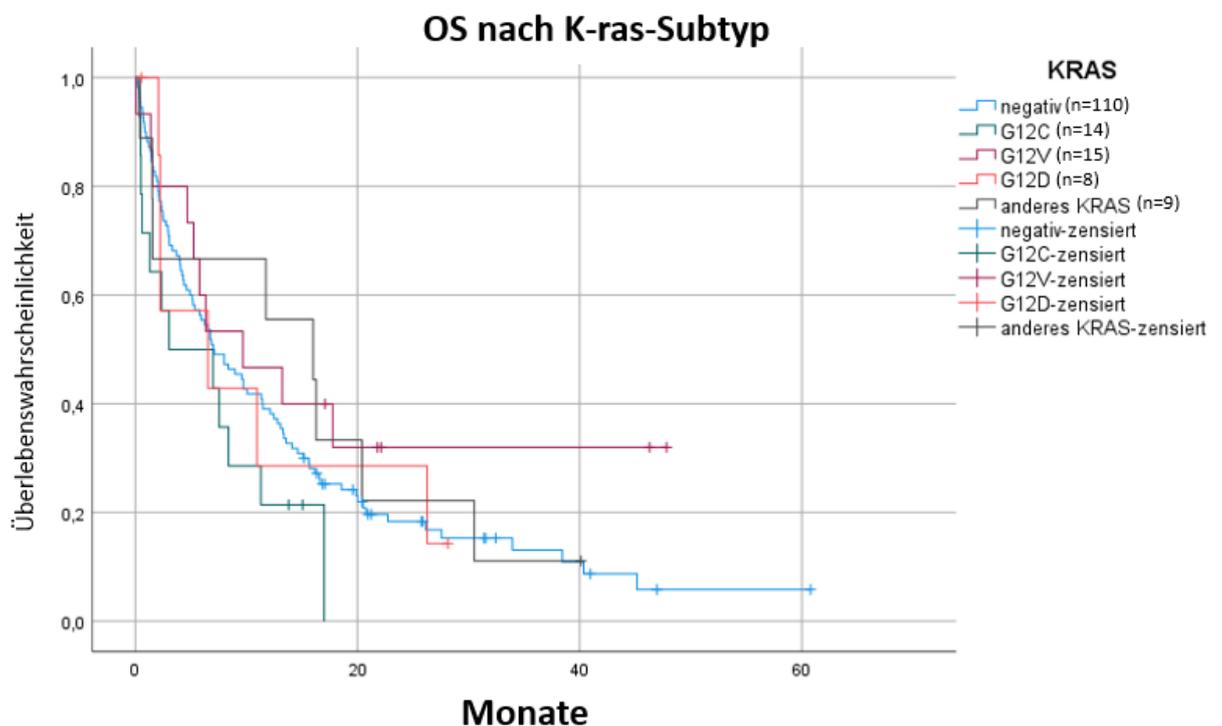


Abbildung 12: OS nach K-ras-Subtyp

Tabelle 15: OS nach K-ras-Subtyp

	p-Wert (HR)	HR im Vergleich zu WT	95% KI (HR)	Medianes OS in Monaten	95% KI (Medianes OS)
KRAS WT				7,000	3,859-10,141
G12C	0,152	1,558	0,850-2,857	3,033	0,0-11,528
G12V	0,19	0,646	0,335-1,242	9,667	0,241-19,092
G12D	0,99	0,995	0,435-2,276	6,533	0,0-17,568
andere	0,639	0,841	0,408-1,734	16,000	3,534-28,466

Bei einer so geringen Anzahl von Personen in den einzelnen Armen ist es schwer, eine Aussage zu treffen, wie die verschiedenen Mutationen das Überleben beeinflussen. Es könnte hier jedoch zumindest durch die G12C-Mutation und G12V ein Risikounterschied zum Wildtyp bestehen. Vergleicht man nur diese beiden Mutationen miteinander (hier nicht dargestellt), so erhält man eine Hazard Ratio von 2,02 (95% KI: 0,84-4,87; p=0,115) und damit ein etwa doppelt so hohes Sterberisiko für Patienten mit G12C im Vergleich zu jenen mit G12V. Die wenigen Patienten mit G12D und anderen Subtypen wiesen hier keinen bzw. nur einen minimalen Überlebensunterschied im Vergleich zum Wildtyp auf.

4.6 Überleben nach TTF-1-Expression

Eine der zentralen Fragestellungen in dieser Studie war, ob es einen Unterschied im OS und PFS zwischen TTF-1-Positiven und Negativen Patienten mit metastasiertem ADC der Lunge geben könnte. Um dieser Frage nachzugehen wurden die Daten von 169 auf TTF-1 getesteten Patienten analysiert (130 Positive und 39 Negative). Ausgeschlossen wurden alle Personen mit EGFR, ALK, ROS oder BRAF-Mutation. K-ras-Mutationen wurden hier nicht berücksichtigt.

Die Verteilung der First Line Therapien zeigt in den beiden zu untersuchenden Gruppen einige Unterschiede. Während 49,2% der TTF-1-Positiven eine Immuntherapie erhielten (Mono oder in Kombination), beläuft sich der Anteil unter den Negativen nur auf 43,6%. Andererseits erhielt unter den Positiven ein größerer Anteil gar keine Therapie (16,2% vs. 10,3%). Dies lag entweder an einem zu frühen Versterben der Patienten vor dem ersten Zyklus oder einem zu schlechten Allgemeinzustand bei Diagnosestellung.

Tabelle 16: Therapie nach TTF-1-Status

1st Line Therapie	TTF-1-Positive (130)	TTF-1-Negative (39)
Immunchemotherapie	40,7% (53)	30,8% (12)
Immuntherapie Mono	8,5% (11)	12,8% (5)
Chemotherapie	21,5% (28)	20,5% (8)
Nur Radiatio	1,5% (2)	10,3% (4)
Keine / BSC	16,2% (21)	10,3% (4)
Unbekannt	11,5% (15)	15,4% (6)

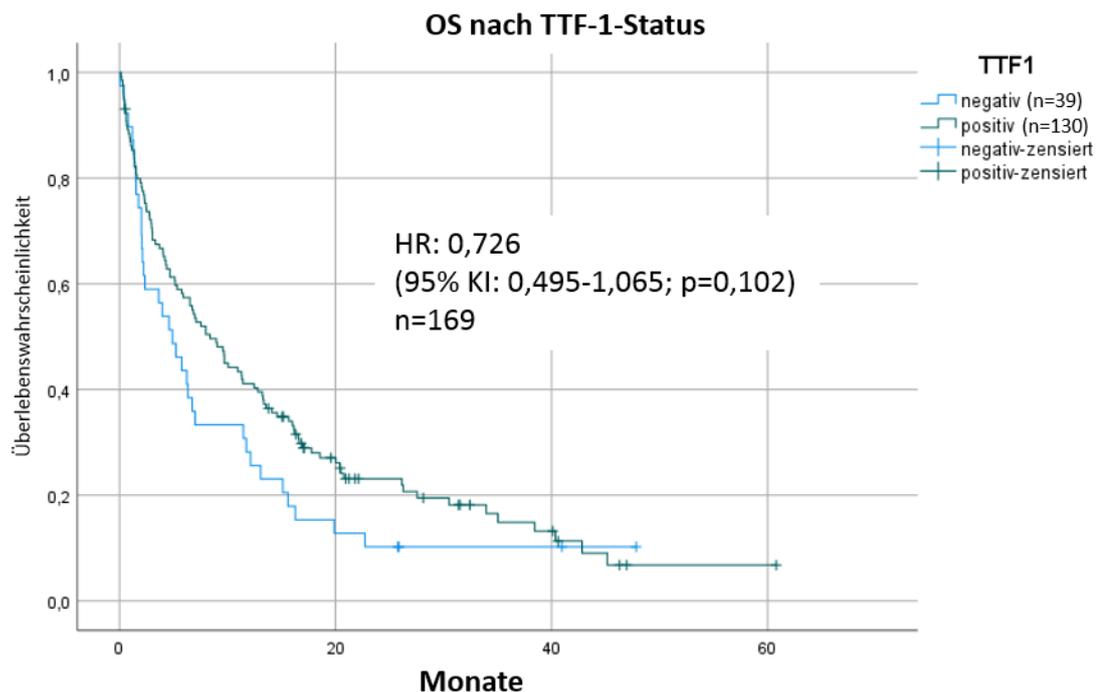


Abbildung 13: OS nach TTF-1-Status

Während Personen ohne TTF-1-Expression im Median nach 4,9 Monaten (95% KI: 2,29-7,51) verstarben, erreichten diejenigen mit Expression erst nach 8,4 Monaten (95% KI: 5,86-10,94) diesen Punkt. Entsprechend der HR standen Positive nur unter einem 0,726-fach (95% KI: 0,495-1,065; p=0,102) so hohem Sterberisiko. Am Ende des betrachteten Zeitraums ist unter den TTF-1-Negativen ein höherer Anteil noch am Leben.

Mit multivariabler Cox-Regression wurde der Einfluss von TTF-1 unabhängig von Geschlecht und Alter untersucht. Dabei gab es bezüglich TTF-1-Status und Alter keine wesentlichen Veränderungen.

Tabelle 17: TTF-1 als Einflussfaktor auf das OS

	p-Wert	HR	95% KI
TTF-1 (pos. vs. neg.)	0,104	0,725	0,492-1,069
Alter bei ED	0,005	1,024	1,007-1,042
Geschlecht (m. vs. w.)	0,542	1,119	0,780-1,605

Nach dem Ergebnis dieser Regression hätten Männer – unabhängig von TTF-1 und Alter – ein 1,12-fach erhöhtes Sterberisiko im Vergleich zu Frauen mit einem großen Konfidenzintervall von 0,78-1,61 und einem hohen p-Wert von 0,542. Damit zeigt sich hier ein niedrigerer Einfluss des Geschlechts als zuvor beschrieben. 84,4% aller getesteten Frauen waren TTF-1-positiv, jedoch nur 77,9% aller Männer.

Die gleichen Tendenzen findet man im PFS:

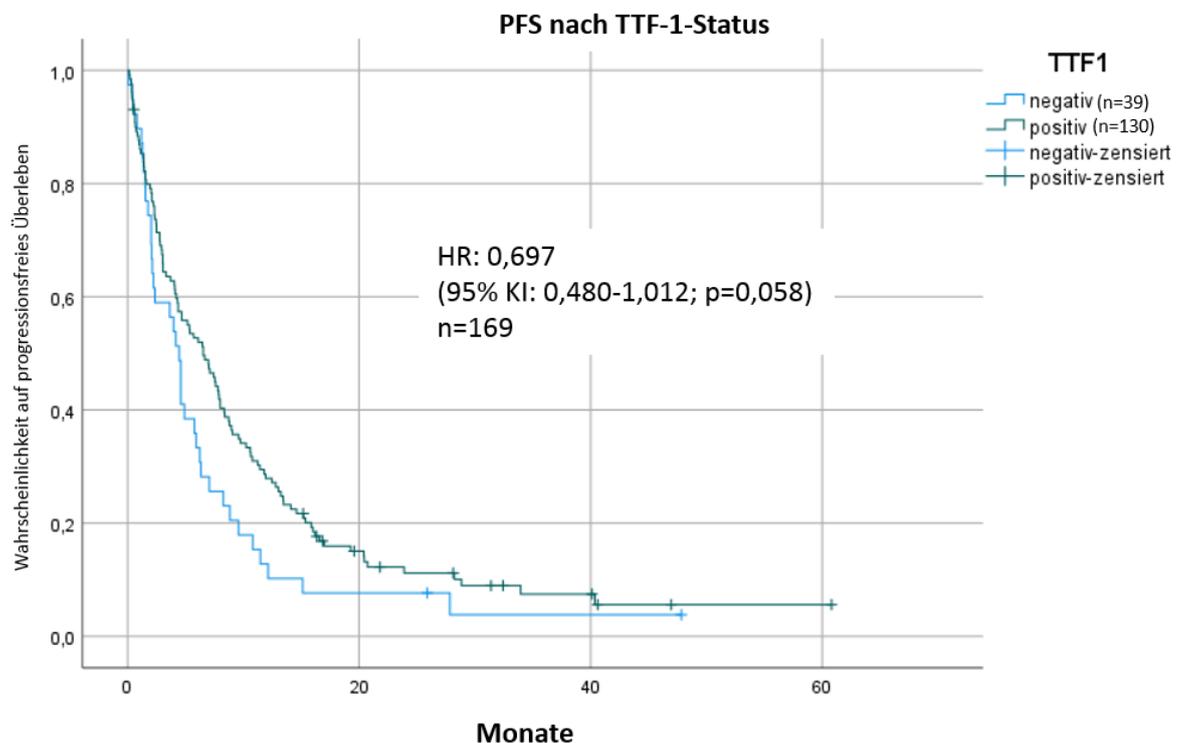


Abbildung 14: PFS nach TTF-1-Status

Auch hier wurde ein Progress bei den TTF-1-Positiven insgesamt erst später festgestellt als bei den Negativen, im Median nach 6,5 Monaten (95% KI: 4,51-8,56) bzw. 4,5 (95% KI: 3,48-5,45). Durch die niedrigere HR von 0,697 (95% KI: 0,480-1,012) und die geringere Anzahl zensierter Fälle kommt ein kleinerer p-Wert als beim OS von 0,058 zustande. Auch hier scheint durch das häufigere Auftreten von TTF-1-Expression unter Frauen innerhalb dieser Stichprobe, der Einfluss des Geschlechtes auf die Prognose kleiner zu sein, als man ursprünglich hätte annehmen können.

Tabelle 18: TTF-1 als Einflussfaktor auf das PFS

	p-Wert	HR	95% KI
TTF-1 (pos. vs. neg.)	0,074	0,709	0,486-1,035
Alter bei ED	0,036	1,017	1,001-1,033
Geschlecht (m. vs. w.)	0,257	1,223	0,864-1,731

5 Diskussion

5.1 Häufigkeit der Treibermutationen

5.1.1 K-ras gesamt

Im Hinblick auf die sich aktuell (2021) in klinischen Studien befindlichen Medikamente gegen den Subtyp K-ras G12C, wie Sotorasib (Hong *et al.*, 2020), ist insbesondere die Frage bedeutsam, wie viele Patienten von diesen Wirkstoffen potentiell profitieren könnten.

25,4% aller getesteten Patienten wiesen eine K-ras-Mutation auf. Damit liegt der Anteil der Mutierten in dieser Studie etwas unter den Ergebnissen vorheriger Untersuchungen in Deutschland. Wiesweg *et al.* beschrieben 2018 eine Mutationsfrequenz von etwa 32% K-ras-Mutationen in 1444 NSCLC, wobei beinahe alle Fälle Adenokarzinome waren, sodass ein Vergleich mit den Patienten dieser Studie möglich ist (Wiesweg *et al.*, 2019). Sebastian *et al.* untersuchten 2021 eine Studienpopulation aus 1039 NSCLC-Patienten, wobei bereits andere Treibermutationen ausgeschlossen wurden. Berücksichtigt man diese ausgeschlossenen und außerdem die K-ras-Positiven, deren Subtyp nicht genau bestimmt wurde, so erhält man mit den Daten dieser Studie eine Mutationsrate von 33%. Auch dort wurden einige Plattenepithelkarzinome eingeschlossen, weshalb mit einer etwas höheren Rate unter den Adenokarzinomen zu rechnen ist (Sebastian *et al.*, 2021). Dogan *et al.* berichteten 2012 jedoch von 26% K-ras-Mutierten unter 2529 Patienten, und damit von einem Wert sehr an den 25,4%, die hier dokumentiert wurden (Dogan *et al.*, 2012). Mindestens in den letzteren beiden genannten Studien bildeten K-ras-Mutationen, so wie auch hier, den größten Anteil, sodass davon auszugehen ist, dass sie unter allen Treibermutationen die häufigste Frequenz unter den Adenokarzinomen der Lunge aufweisen. Warum in dieser Stichprobe aus Halle etwa 7% weniger K-ras Mutationen vorliegen, lässt sich nicht eindeutig sagen. Möglicherweise gibt es für das Auftreten dieser Mutationen auch regionale Unterschiede bei gleicher Ethnie, eventuell würden sich die Zahlen bei einer größeren Anzahl Patienten auch weiter angleichen.

Unter den Patienten dieser Studie kann eine Assoziation zwischen Rauchen bzw. Berufsexposition und K-ras vermutet werden. Unter Rauchern und Patienten mit Asbestkontakt traten die Mutationen je etwa doppelt so häufig auf (28,2% vs. 13,9%; $p=0,090$ bzw. 46,2% vs. 23,8%; $p=0,097$). Der p-Wert für diese Beobachtung liegt offensichtlich nicht unter dem üblicherweise festgelegten Signifikanzniveau von 5%. Da es sich hier jedoch um eine retrospektive, explorative Studie mit Gelegenheitsstichprobe handelt, ist eine Einschätzung allein nach der Signifikanz

ohnehin nicht sinnvoll, da keine Fallzahlberechnung stattgefunden hat. Ein relatives Risiko von 2,02 (95% KI: 0,87 - 4,76) (Rauchen) zeigt jedoch einen deutlichen Trend und es ist davon auszugehen, dass bei einer höheren Fallzahl das so häufig verwendete 5%-Signifikanzniveau erreicht worden wäre. Vergleicht man die Gruppe von Rauchern, die zusätzlich unter Asbestkontakt standen mit Patienten, die weder rauchten noch Asbestkontakt hatten, so stellt sich eine noch stärkere Assoziation mit dem Auftreten von K-ras-Mutationen dar. Unter den doppelt Exponierten traten diese im Vergleich zu Nichtrauchern ohne Berufsexposition 3,3-mal so häufig auf ($p=0,047$). Allein aus diesen Beobachtungen in einer retrospektiven Studie wie dieser lässt sich natürlich noch nicht auf eine Kausalität schließen. Der Zusammenhang zwischen Rauchen, Asbestkontakt und K-ras-Mutationen ist jedoch schon mehrmals beschrieben worden (Husgafvel-Pursiainen *et al.*, 1993; Ahrendt *et al.*, 2001). Rauchen und Asbestexposition lassen sich also bisher nicht als ursächlich für K-ras-Mutationen beweisen, es ist jedoch eine wahrscheinliche Hypothese und zumindest die Assoziation sollte als gesichert gelten.

5.1.2 K-ras-Subtypen

Aus den 47 Patienten, die positiv auf K-ras getestet wurden, waren die beiden häufigsten Subtypen die Mutationen G12C und G12V, beide mit etwa 32%. G12S und G12A wurden bei 6,4% der K-ras-Positiven nachgewiesen und jeweils einmal (2,1%) traten G12F, G13C und eine weitere nicht genau bekannte Mutation in Codon 13 auf. Damit befanden sich 95,7% der Mutationen in Codon G12 und nur 4,3% in G13. Das Codon 61 wurde nicht untersucht. Während die Verteilung der Mutationen zwischen den Codons den Ergebnissen vorheriger Studien entspricht, fällt hier auf, dass in dieser Stichprobe G12C seltener auftrat als zuvor beschrieben (32% vs. 37-47%) und G12V dafür häufiger (32% vs. 18-22%) (Dogan *et al.*, 2012; Villaruz *et al.*, 2013; Cserepes *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2020). Mit den Mutationen G12C, G13C (GGT>TGT), G12V (GGT>GTT) und G12F (GGT>TTT) fanden Punktmutationen von Guanin zu Thymin am häufigsten statt und nehmen zusammen über zwei Drittel aller K-ras-Mutationen ein. Ebenfalls eine Transversion, also die Substitution einer Purin- durch eine Pyrimidinbase oder anders herum, ist der Austausch von Guanin zu Cytosin, wie er bei G12A (GGT>GCT) stattfindet. Transitionen (Purinbase gegen eine andere Purinbase) wie G12D (GGT>GAT) und G12S (GGT>AGT) traten hier seltener auf und machten nur etwa ein Viertel der Substitutionen aus. Dieses Verhältnis von Substitutionen mit einer eindeutigen Dominanz der Transversionen, insbesondere G>T spiegelt sehr gut bekannte Daten aus der Literatur wieder (Dogan *et al.*, 2012; Villaruz *et al.*, 2013; Cserepes *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2020). Obwohl davon ausgegangen wird, dass Transversionen eher mit Rauchen assoziiert sind und Transitionen daher

häufiger bei Nichtrauchern auftreten (Riely *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2013; Shepherd *et al.*, 2013), konnte dies in dieser Stichprobe nicht bestätigt werden, denn unter den Nichtrauchern wurden bei einem Patienten G12S und je zweimal G12C und G12V ermittelt. Bei nur 5 K-ras-positiven Nichtrauchern zeigten die Nichtraucher aber tendenziell sogar einen geringeren Anteil an Transitionen als Raucher (20% vs. 24%). Damit widerspricht das vorliegende Ergebnis den zuvor genannten Studien, muss jedoch bei dieser kleinen Fallzahl mit Vorsicht betrachtet werden.

Ebenfalls lässt sich mit diesen Daten keine valide Aussage treffen, ob Rauchen einen Einfluss auf den Subtyp der Mutation hat. Ein solcher Einfluss ist grundsätzlich vorstellbar und wurde von anderen Studien bereits beschrieben. So soll G12D die häufigste Mutation unter Nichtrauchern sein (Dogan *et al.*, 2012). Riely *et al.* fanden diese Transition (c.35G>A) bei 10 ihrer 12 Nichtraucher (Riely *et al.*, 2008). Da unter den Nichtrauchern dieser Stichprobe keine G12D Mutation vorliegt, können diese Beobachtungen hiermit nicht bestätigt werden. Studien mit einer größeren Anzahl, vor allem von Nichtrauchern, sollten diese Fragen weiter untersuchen.

Zusammenfassend deuten die Daten dieser Studie darauf hin, dass Transversionen, insbesondere G>T, die häufigsten Punktmutationen bei K-ras-Mutierten beim Adenokarzinom der Lunge darstellen, allerdings keine Assoziation besteht zwischen der Art oder dem Subtyp der Mutation und dem Raucherstatus.

5.1.3 Weitere Treiber Mutationen

Mit 11,9% aller getesteten Personen nimmt EGFR nach K-ras den größten Anteil unter den Mutationen ein. In einer systematischen Review von Midha *et al.*, in der 39 europäische Studien eingeschlossen wurden mit über 10.000 Patienten fand man eine durchschnittliche Mutationsfrequenz von 15%, wobei die Studienergebnisse von 6-41% stark schwankten (Midha *et al.*, 2015). Damit liegen die hier ermittelten Werte zwar in der gleichen Größenordnung mit der Vergleichsstudie, erscheinen jedoch initial niedriger als erwartet. Eine detaillierte Betrachtung der Verteilung nach Raucherstatus innerhalb der gleichen Studie zeigt jedoch, dass die Ergebnisse (35% vs. 36% in Nichtrauchern und 8% vs. 6% in Rauchern) (Midha *et al.*, 2015), sehr nah beieinander liegen. Das hohe relative Risiko von 5,98 (95% KI: 2,77-12,89; $p < 0,001$) zeigt die starke Assoziation zwischen Nichtraucherstatus und EGFR-Mutation. Damit decken sich die Ergebnisse sehr gut mit dem bisherigen Stand der Forschung und stärken diese Erkenntnisse weiter.

Mit 2,2%, 1,6% bzw. 0,5% sind die Mutationen BRAF, ALK und ROS nur sehr selten vertreten. Diese niedrigen Zahlen waren so zu erwarten und entsprechen in etwa den in der Literatur zu findenden Häufigkeiten (Bergethon *et al.*, 2012; Selinger *et al.*, 2013; Brustugun *et al.*, 2014).

5.2 Häufigkeit von TTF-1

80,2% aller Getesteten wiesen eine nukleäre TTF-1-Expression auf. Damit entsprechen die Werte in etwa den in anderen Publikationen ermittelten Häufigkeiten (Kaufmann & Dietel, 2000; Barletta *et al.*, 2009; Schilsky *et al.*, 2017). Eine Assoziation zwischen weiblichem Geschlecht sowie Nichtraucherstatus und TTF-1-Positivität wurde in anderen Artikeln beschrieben (Yatabe *et al.*, 2002; Barletta *et al.*, 2009). Obwohl sich auch hier jeweils ein Trend zeigt, der in diese Richtung weisen könnte (85% Positive in Frauen vs. 78% in Männern, $p=0,264$ und 84% in Rauchern vs. 79% in Nichtrauchern, $p=0,651$), kann aus unseren Daten auf keine Assoziation dieser Merkmale geschlossen werden, TTF-1-Expression scheint eher unabhängig von Geschlecht und Raucherstatus aufgetreten zu sein. Weiterhin trat TTF-1-Expression etwas seltener unter den K-ras-Positiven auf (74% vs. 83%; $p=0,203$), auf einen statistischen Zusammenhang sollte aus dieser Beobachtung jedoch nicht geschlossen werden. Auffällig ist jedoch, dass unter den EGFR-Mutierten kein Patient negativ auf TTF-1 getestet wurde und die Rate an Positiven damit mit 100% deutlich höher liegt, als unter Patienten mit EGFR-Wildtyp, bei welchen 78% nukleäre TTF-1-Expression aufwiesen ($p=0,015$). Dieser Zusammenhang wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (Sun *et al.*, 2012; Somaiah *et al.*, 2014; Schilsky *et al.*, 2017). Somaiah *et al.* ermittelten einen hohen negativen Vorhersagewert von über 96% für das Fehlen einer EGFR-Mutation bei Negativität für TTF-1 (Somaiah *et al.*, 2014). In unserer Stichprobe wurde kein einziger TTF-1-negativer Patient mit einer EGFR-Mutation identifiziert. Sun *et al.* schrieben, TTF-1 könne EGFR-Mutationen vorhersagen (Sun *et al.*, 2012). Diese Aussage ist kritisch zu betrachten und ist allenfalls für den Fall der TTF-1-Negativität zutreffend. Bei positivem Befund wäre es hingegen falsch, ebenfalls von einer positiven EGFR-Analyse auszugehen, da auch 78% der EGFR-Negativen eine TTF-1-Expression zeigten. In jedem Fall sollte dennoch eine Molekularanalyse nach EGFR und anderen Treibermutationen erfolgen, um die für die einzelnen Patienten optimale Behandlung zu ermitteln, denn eine Therapie mit TKI ist bei EGFR-Mutierten bekanntlich mit einer besseren Prognose verbunden (Mitsudomi *et al.*, 2010).

5.3 Überleben aller Patienten

8,0 Monate (95% KI: 5,8-10,2) nach Erstdiagnose war die Hälfte aller Patienten verstorben. Nach 6,3 Monaten (95% KI: 4,7-7,9) stellte man bei 50% der Patienten einen Progress fest. Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei etwa 10%, wobei 37 (18%) der Fälle zensiert waren. Diese Ergebnisse zeigen die weiterhin sehr schlechte Prognose des metastasierten Adenokarzinoms der Lunge. Die vielversprechendste Möglichkeit, die Überlebensraten des Lungenkrebses zu erhöhen, wäre sicherlich eine

frühere Diagnose des Tumors in einem resektablen Stadium. Da über die Hälfte der Adenokarzinome jedoch weiterhin erst im metastasierten Stadium erkannt wird, (Kraywinkel & Schönfeld, 2018) ist eine Verbesserung der systemischen Therapie dringend weiter nötig.

Beeinflusst wird die Prognose außerdem von bestimmten Merkmalen des jeweiligen Patienten. So konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass der ECOG Performance Status, das Alter bei ED und auch das Geschlecht das Überleben unabhängig voneinander beeinflussen. Entsprechend den Hazard Ratios standen Patienten mit einem ECOG von 1 unter einem doppelt (95% KI: 1,39-2,68) so hohen Sterberisiko wie jene mit einem Wert von 0, bei einem höheren ECOG war es sogar 5-fach (95% KI: 3,04-8,02) erhöht ($p < 0,001$). Patienten mit einem schlechten Allgemeinzustand zu Beginn verstarben im Schnitt also sehr viel früher als jene mit einem guten. Diese Erkenntnis ist in der Literatur gut dokumentiert und entspricht den allgemeinen Erwartungen. Die beeindruckend großen Unterschiede im medianen OS (15,0 Monate für ECOG 0; 4,4 für ECOG 1 und 1,5 für ECOG 2-4) zeigen aber, wie wichtig körperliche Reserven sind, um nicht nur den Tumor mit seinen Metastasen, sondern auch die aggressive Therapie überstehen zu können.

Weiterhin war ein Unterschied des Überlebens nach Alter bei ED auffällig. In der Cox-Regression wurde eine Hazard Ratio von 1,021 (95% KI: 1,005-1,038; $p = 0,010$) ermittelt. Das Risiko, zu versterben, steigt also mit jedem Lebensjahr mehr zum Zeitpunkt der ED um 2,1%. Damit hat beispielsweise ein 70-Jähriger im Vergleich zu einem 50-Jährigen ein 1,52-fach (95% KI: 1,10-2,11) erhöhtes Sterberisiko. Ein 34 Jahre älterer Patient hat ein etwa doppelt so hohes Sterberisiko (95% KI: 1,18-3,55) wie ein jüngerer. Während die Konfidenzintervalle recht breit sind und die Werte daher nur als grobe Schätzungen angesehen werden sollten, ist eine generelle Risikoerhöhung mit steigendem Alter sehr eindeutig.

Betrachtet man das OS und PFS in Abhängigkeit vom Geschlecht, fällt auf, dass Männer hier eine schlechtere Prognose hatten. Die mediane Überlebenszeit war mit 12,5 Monaten bei Frauen fast doppelt so lang wie die der Männer mit 6,5 Monaten. Die HR liegt bei 1,35 (95% KI: 0,97-1,87; $p = 0,074$). Die Kurven nähern sich im Verlauf jedoch wieder einander an, sodass sie am Ende des Beobachtungszeitraums auf einer Höhe liegen. Etwa 32 Monate nach Beginn der Beobachtung war der Anteil an überlebenden Männern sogar kurzzeitig höher als der der Frauen. Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Kurve und der univariablen Cox-Regression allein bleibt es also zunächst zweifelhaft, ob das Geschlecht tatsächlich einen das Gesamtüberleben beeinflussenden Faktor darstellt. Ein deutlicherer Unterschied zwischen Männern und Frauen wird in der Analyse des PFS sichtbar. Mit einer HR von 1,38 standen die

Männer hier unter einem deutlich höheren Risiko, einen Progress zu entwickeln. Die Graphen in der Kaplan-Meier-Kurve zeigen keine Überschneidungen und liegen am Ende der Beobachtung untereinander, mit einer größeren Überlebensrate bei den Frauen. Durch die geringere Menge an zensierten Fällen resultiert eine geringere statistische Unsicherheit und ein deutlich niedrigerer p-Wert von 0,04. Zusätzlich wurde eine multivariable Cox-Regression mit Alter und Geschlecht durchgeführt, um auszuschließen, dass beide Faktoren miteinander korrelieren und deshalb nur scheinbar beide einen Einfluss nehmen. Denkbar wäre zum Beispiel, dass Frauen früher an Lungenkrebs erkranken und nur deshalb eine bessere Prognose haben. Es zeigt sich jedoch in dieser Analyse, dass der Einfluss beider Faktoren noch größer sein könnte, als in der vorherigen, univariablen Regression angenommen. Danach liegt die HR des OS (männlich vs. weiblich) bei 1,394 (95% KI: 1,004-1,936; $p=0,047$) für das Geschlecht und für ein Lebensjahr mehr bei 1,023 (95% KI: 1,006-1,040; $p=0,007$), wonach mit einem 10 Jahre höheren Alter das Sterberisiko pro Zeiteinheit um etwa 26% steigen würde. Durch Hinzunahme der multivariablen Regression scheint es also tatsächlich nicht nur im PFS, sondern auch im Gesamtüberleben, einen Unterschied zwischen Männern und Frauen zu geben. Männliches Geschlecht als unabhängiger negativer prognostischer Faktor in NSCLC-Patienten wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Visbal *et al.*, 2004; Sakurai *et al.*, 2010). Laut Visbal *et al.* besteht eine Differenz besonders beim Adenokarzinom in fortgeschrittenen Stadien (IIIB und IV), also genau unter den hier untersuchten Patienten. Sakurai *et al.* untersuchten über 12 500 resezierte NSCLC-Patienten und fanden auch für das Adenokarzinom eine sehr viel bessere 5-Jahres-Überlebensrate für Frauen (77,7 vs. 61,9%; $p=0,0000$). Trotz der nicht eindeutigen Kaplan-Meier-Kurve für das OS nach Geschlecht mit einem die 1 einschließenden Konfidenzintervall der HR, ist durch die Ergebnisse der multivariablen Regression, den deutlichen Unterschieden im PFS und den Ergebnissen vorheriger, größerer Studien davon auszugehen, dass das Geschlecht, genau wie das Alter und der Performance Status, einen eigenständigen prognostischen Faktor darstellt, mit einem klaren Überlebensvorteil für junge Frauen in gutem Allgemeinzustand.

5.4 Überleben nach K-ras-Status

Weder im OS noch im PFS zeigt sich ein Unterschied im Überleben zwischen K-ras-Mutierten und Patienten mit Wildtyp. Die Überlebenskurven der K-ras-mutierten Patienten und der Wildtyp-Patienten zeigen eine nahezu identische Entwicklung. Sie überschneiden sich mehrfach und liegen am Ende auf ähnlichem Niveau, wobei in beiden Fällen der Anteil überlebender bzw. progressionsfreier Patienten unter den

Mutierten etwas höher ist. Die berechneten Mediane liegen sehr eng beieinander, ihre Konfidenzintervalle überschneiden sich nicht nur, die Intervallgrenzen der Wildtyp-Patienten liegen sogar vollständig in jenen der Mutierten. Die HR von 0,93 und 1,02 mit sehr hohen p-Werten von 0,71 bzw. 0,93 deuten darauf hin, dass die geringen Unterschiede zufällig sind und keinen klinisch relevanten prognostischen Einfluss haben. Auch die multivariable Regression, in der Alter, Geschlecht und TTF-1-Status berücksichtigt wurden, zeigt keinen prognostischen Einfluss von K-ras. Da es sich hier um eine explorative, retrospektive Studie ohne Fallzahlberechnung handelt, kann nicht sicher geschlossen werden, dass es keinen Unterschied zwischen K-ras-Mutierten und Wildtyp-Patienten gibt, da die untersuchte Fallzahl lediglich zu klein sein könnte, um einen solchen Unterschied aufzudecken. Aus den ausgewerteten Daten deutet jedoch nichts darauf hin, dass es diesen Unterschied gäbe.

Huncharek et al. führten 1999 eine Metaanalyse aus 8 einzelnen Studien mit insgesamt 881 NSCLC-Patienten durch, um aus diesen Daten das Relative Risiko für Mutierte gegenüber Nicht-Mutierten zu ermitteln. Dabei wiesen K-ras-Positive ein 2,35-fach (95% KI: 1,61-3,22) erhöhtes Sterberisiko auf (Huncharek *et al.*, 1999). Allerdings weisen die Autoren darauf hin, dass keine Adjustierung auf das Tumorstadium durchgeführt wurde und die Schwankungen zwischen den Ergebnissen der einzelnen Studien erheblich waren (von 1,08-10,14). Es fällt dennoch auf, dass in jedem der Artikel K-ras eher mit einem verkürzten Überleben assoziiert war, wobei in vier Studien das 95% KI des Relativen Risikos die 1 einschloss. Dieses Ergebnis widerspricht den Schlüssen, die aus unseren Daten gezogen wurden. Obwohl in der Metaanalyse eine größere Patientenzahl einbezogen wurde, bedeutet dies nicht zwangsläufig eine höhere Validität der Ergebnisse. Während in unserer Studie ausschließlich Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom eingeschlossen, Treibermutationen ausgeschlossen und multivariable Regressionen durchgeführt wurden, fehlen diese Adjustierungen in der hier beschriebenen Arbeit. Daher ist eine so große Möglichkeit an Confounding und Bias gegeben, dass ihre Ergebnisse nicht ohne weiteres auf alle Patienten übertragen werden können und kritisch hinterfragt werden sollten. Auch die Autoren selbst merkten an, dass ihre Werte durch sorgfältig designte Studien mit Adjustierung auf bekannte prognostische Faktoren bestätigt werden müssen.

Eine weitere Metaanalyse von Meng et al. aus dem Jahr 2013 mit insgesamt fast 7000 NSCLC-Patienten stellte ebenfalls eine schlechtere Prognose für K-ras-Mutierte fest, mit einer HR von 1,39 (95% KI: 1,24–1,55) unter ausschließlich Adenokarzinomen. Während dieser Unterschied unter den frühen Stadien I-IIIa noch deutlicher ausgeprägt war (HR=1,68; 95% KI: 1,11–2,55), erreichte die HR unter den Stadien IIb-IV einen kleineren Wert und verfehlte knapp das festgelegte Signifikanzniveau

(HR=1,3; 95% KI: 0,99–1,71) (Meng *et al.*, 2013). Zwar basierte die Analyse nicht auf Individualdaten, sondern nur auf den Artikeln selbst und es wurde keine multivariable Regression mit anderen bekannten prognostischen Faktoren wie Alter durchgeführt, anders als in der Metaanalyse von 1999 wurde hier aber klar nach Histologie und Stadium getrennt, die Quellen kritisch auf Publication Bias untersucht und mit einer großen Patientenzahl ein klares Ergebnis präsentiert. Genau genommen wurde in der Subgruppe, die unseren Patienten entspricht, nämlich Adenokarzinome in fortgeschrittenem Stadium, kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt, sodass sich die Ergebnisse nicht widersprechen. Die Autoren gehen jedoch davon aus, dass hier lediglich ihre Patientenzahl zu gering war und betrachten K-ras als ungünstigen prognostischen Faktor für das Adenokarzinom, besonders in frühen Stadien.

Die Diskrepanz zu den hier ermittelten Ergebnissen könnte auch durch unterschiedliche Ethnien und K-ras-Subtypen zustande kommen. So war die von Meng *et al.* ermittelte HR unter Asiaten höher als unter Nichtasiaten und es gibt Hinweise, dass die verschiedenen Arten von K-ras-Mutationen anderen Einfluss auf das Überleben nehmen (Nadal *et al.*, 2014; Aredo *et al.*, 2019). Die Verteilung der Subtypen in dieser Studie ist jedoch nicht ersichtlich. Denkbar wäre, dass in unserer Studienpopulation mehr Mutationen mit einer günstigeren Prognose auftraten. Auch unterschiedliche Therapien zwischen den Patienten dieser Studie und den zuvor beschriebenen könnten die sich widersprechenden Ergebnisse zum Teil erklären: So gibt es Hinweise, dass K-ras-Mutierte besser auf Immuntherapie ansprechen als jene mit Wildtyp, insbesondere bei einer TP53-Comutation (Dong *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017). In den beiden Metaanalysen von 1999 und 2013 wurde allerdings aufgrund der späteren Zulassung der Checkpoint-Inhibitoren vermutlich noch niemand mit diesen behandelt. Unter den 156 Patienten, die in unsere K-ras-Überlebensanalyse eingeschlossen wurden, erhielten 85 eine Immuntherapie in 1st oder 2nd Line, beinahe genau gleich verteilt zwischen K-ras-Positiven und Negativen. Dadurch könnte sich durch die über die Jahre veränderte Therapie ein Vorteil für Positive ergeben, der einen normalerweise vorhandenen Nachteil ausgleichen könnte. Diese Hypothese ist jedoch rein spekulativ und lediglich als ein Erklärungsversuch anzusehen. Trotz dieser beiden zuvor genannten größeren Metaanalysen ist der prognostische Wert von K-ras nach wie vor ungewiss und Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. Shepherd *et al.* führten 2013 eine gepoolte Analyse mit 1543 operierten NSCLC-Patienten durch, in welcher der prognostische und prädiktive Wert von K-ras für adjuvante Chemotherapie untersucht wurde. Dabei handelte es sich um eine Gruppe homogener und sorgfältig gestageter Karzinome. Weder in der Gruppe mit

noch ohne adjuvante Chemotherapie gab es einen signifikanten Unterschied zwischen WT und K-ras G12 Mutierten, insbesondere auch nicht unter ausschließlich Adenokarzinomen (Shepherd *et al.*, 2013). Es gilt jedoch anzumerken, dass K-ras G13 Mutierte scheinbar von einer adjuvanten Chemotherapie Schaden nahmen. Laut den Autoren ist diese Beobachtung angesichts der geringen Fallzahl von G13-Mutationen allerdings mit Vorsicht zu interpretieren. Auch Cui *et al.* fanden 2020 keinen Unterschied im OS zwischen K-ras-Positiven und WT (HR 1,08; 95% KI: 0,83-1,40; $p=0,54$) in einer Studie mit 346 Patienten.

Die widersprüchlichen Studienergebnisse der Vergangenheit motivierten die Durchführung dieser Studie. Es ist offenkundig, dass die Frage nach dem prognostischen Wert von K-ras durch diese Arbeit nicht abschließend beantwortet werden kann, es lässt sich jedoch feststellen, dass innerhalb dieser Patientenkohorte in Halle bei metastasierten Adenokarzinomen der Lunge kein relevanter Unterschied im Gesamtüberleben oder progressionsfreien Überleben zwischen K-ras-mutierten und Wildtyp-Patienten nachweisbar war. Zukünftig sollten größere, prospektive Studien mit homogenen und gut charakterisierten Patientenkohorten sowie Metaanalysen mit methodisch streng selektierten Studien durchgeführt werden. Bis weitere Evidenz vorliegt, bleibt unklar, ob K-ras die Prognose beeinflusst.

5.5 Überleben nach K-ras-Subtyp

Aufgrund der begrenzten Anzahl an Patienten sind in der folgenden Analyse die Studienarme sehr klein (14-mal G12C, 15-mal G12V, 8-mal G12D, 9-mal andere). Das resultiert in großer statistischer Unsicherheit und trotz erheblicher Unterschiede in den HRs in hohen p-Werten. Daher sollte die Interpretation der Ergebnisse mit äußerster Vorsicht erfolgen.

Die Daten legen nahe, dass kein relevanter Unterschied im Überleben zwischen G12D-Mutierten und Wildtyp besteht. Auch der Arm aus verschiedenen seltenen Subtypen wies keinen Überlebensvorteil oder Nachteil auf. Die beiden Kurven zeigen mehrere Schnittpunkte und befinden sich zum Zeitpunkt der letzten Nachverfolgung auf vergleichbarem Niveau. Die HRs liegen mit 0,995 (95% KI: 0,435-2,276; $p=0,99$; G12D) und 0,841 (95% KI: 0,408-1,734; $p=0,639$; andere) nahe bei 1. Die großen Konfidenzintervalle sind ein Indikator der Unsicherheit, die durch die geringe Fallzahl entsteht.

Es könnte jedoch zumindest bei G12C und G12V ein Überlebensunterschied zum WT bestehen. Die HR von G12C im Vergleich zum Wildtyp liegt bei 1,558 (95% KI: 0,850-2,857; $p=0,152$), das mediane Überleben nur bei etwa 3 Monaten im Vergleich zu 7. Bei nur zwei zensierten Fällen (14%), fällt auf, dass die Kurve sehr schnell abfällt und

G12C-Positive in dieser Studie deutlich schneller verstarben. Da der p-Wert jedoch so deutlich über dem üblichen 5%-Signifikanzniveau liegt, lässt sich kein definitiv erhöhtes Risiko feststellen. Ein Trend ist jedoch zu beobachten, der in prospektiven Studien mit einer größeren Fallzahl überprüft werden sollte. Mit einer HR von 0,646 (95%KI: 0,335-1,24; $p=0,19$) handelt es sich auch bei G12V um einen Subtyp, der mit einer veränderten Prognose, in diesem Fall einer Risikominderung, einhergehen könnte. Vergleicht man nur diese beiden Mutationen miteinander, so erhält man eine Hazard Ratio von 2,02 (95% KI: 0,84-4,87; $p=0,115$) und damit ein etwa doppelt so hohes Sterberisiko für Patienten mit G12C im Vergleich zu jenen mit G12V. Trotz der klinischen Relevanz dieses Unterschiedes liegt der p-Wert jedoch nicht unter dem konventionellen 5% Signifikanzniveau. Zwar ist es nicht sinnvoll, stur auf diesem Wert zu beharren, die Unsicherheit kommt allerdings nicht nur durch die geringe Fallzahl sondern im Falle von G12V auch durch die unzureichende Nachverfolgung zustande. Denn es fällt auf, dass in dieser Kurve nach dem letzten Ereignis noch vier zensierte Fälle auftreten, wodurch die Kurve nicht weiter sinkt, die Datenlage aber sehr begrenzt wird und der tatsächliche Überlebensanteil möglicherweise überschätzt wird. Im Log-rank-test nach Unterschieden im OS nach K-ras-Subtyp und Wildtyp, unter Berücksichtigung der oben beschriebenen fünf Studienarme, konnte mit einem p-Wert von 0,341 im Gesamtvergleich kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen kann also kein Überlebensvorteil oder Nachteil für einzelne Subtypen nachgewiesen werden. Insbesondere G12D scheint keinen Risikounterschied zum Wildtyp zu verursachen. Lediglich zwischen G12C und G12V zeigt sich jeweils ein Trend, der mit einer größeren Fallzahl erneut eingeschätzt werden muss.

Eine Assoziation zwischen G12C und einem schlechteren Überleben wurde 2014 von Nadal et al. beschrieben, welche in einer retrospektiven Studie 179 resezierte Adenokarzinome mit bekanntem K-ras-Status unter anderem nach OS untersuchten. Ihnen zufolge handelt es sich bei G12C um einen negativen prognostischen Faktor mit einer starken Risikoerhöhung im OS (bei einer HR von 2,35; 95% KI: 1,35-4,10; $p=0,003$) im Vergleich zum WT, aber auch im Vergleich zu anderen K-ras-Mutationen (Nadal *et al.*, 2014). Auch Svaton et al. beschrieben eine schlechtere Prognose für K-ras-Patienten, insbesondere für G12C im Vergleich zum Wildtyp (SVATON *et al.*, 2016). Im Gegensatz dazu konnten Cui et al. 2020 in ihrer Studie mit 346 NSCLC Patienten keinen Unterschied zwischen den 65 G12C Mutierten und den 79 anders mutierten K-ras-Positiven finden (HR=1,19; 95% KI: 0,78-1,80; $p=0,39$) (Cui *et al.*, 2020). Auch Spira et al. ermittelten keinen Überlebensnachteil für G12C in einer retrospektiven Studie mit über 7000 NSCLC-Patienten. In dieser Subgruppe wurde

sogar ein etwas längeres OS festgestellt (Spira *et al.*, 2021). Cai *et al.* stellten wiederum eine schlechtere Prognose für G12D im Vergleich zu G12C und G12V fest ($p < 0,0001$). Dabei standen ihnen 20, 24 bzw. 16 Patienten zur Verfügung (Cai *et al.*, 2020).

Die aktuelle Datenlage ist erkennbar widersprüchlich und basiert in den einzelnen Studien zum Teil nur noch auf kleinen Fallzahlen, da die jeweiligen Subtypen nur noch einen begrenzten Anteil an Patienten ausmachen. Auch im Rahmen dieser Studie ist es nicht möglich, die Fragestellung zufriedenstellend zu beantworten. Aufgrund der kleinen Fallzahl und der daraus folgenden Unsicherheit lässt sich kein Unterschied im OS nach Subtyp bestätigen. Insbesondere zwischen G12C und G12V wäre ein solcher jedoch denkbar.

5.6 Überleben nach TTF-1-Status

Sowohl im OS als auch im PFS zeigt sich insgesamt der Trend, dass TTF-1-Negative eine schlechtere Prognose haben als jene mit TTF-1-Expression. In der Kaplan-Meier-Kurve des OS trennen sich die beiden Graphen nach wenigen Monaten voneinander, mit einem höheren Überlebensanteil unter den Positiven. Dadurch entsteht der große Unterschied im medianen Gesamtüberleben von 8,4 Monaten (95% KI: 5,86-10,94, Positive) vs. 4,9 Monate (95% KI: 2,29-7,51, Negative). Es fällt jedoch auf, dass sich die Kurven am Ende des Beobachtungszeitraums überschneiden und damit nach etwa vier Jahren unter den Negativen ein etwas größerer Anteil noch am Leben ist.

Entsprechend der Hazard Ratio standen Positive unter einem 0,726-fachen (95% KI: 0,495-1,065; $p=0,102$) Sterberisiko im Vergleich zu Negativen. Im PFS zeigen sich die gleichen Tendenzen, allerdings durch die geringere Anzahl zensierter Fälle statistisch etwas sicherer. Die Graphen in den Kaplan-Meier-Kurven überschneiden sich nicht und liegen am Ende der Beobachtung getrennt voneinander mit einem größeren Anteil progressionsfreier Patienten unter den TTF-1-Positiven. Eine Hazard Ratio von 0,697 (95% KI: 0,480-1,012) und einem damit deutlich erniedrigten Risiko für Positive, trifft jedoch auf einen p -Wert von 0,058, der das 5%-Signifikanzniveau nicht erreicht. Fast unveränderte Werte finden sich für TTF-1 in der multivariablen Regression mit Alter und Geschlecht. Während TTF-1-Positivität das Sterberisiko weiter um den Faktor 0,725 senkt und auch der Einfluss des Alters in etwa bei dem zuvor bestimmten Wert bleibt, scheint das Geschlecht einen kleineren Einfluss auf die Prognose zu haben als zuvor errechnet. Der Einfluss des Geschlechts könnte sich auch dadurch verstärkt präsentieren, dass unter den Frauen ein größerer Anteil TTF-1-Expression aufwies. Folgendes könnte eine Ursache für die größere Abweichung der beiden Gruppen im PFS im Vergleich um OS sein: Laut neuen Erkenntnissen sprechen TTF-1-negative

Patienten schlechter auf eine Pemetrexed-basierte Chemotherapie an, als Positive (Frost *et al.*, 2020). Aus den 39 TTF-1-negativen Patienten wurden 18 als First Line Therapie unter anderem mit Pemetrexed behandelt. Daher könnten diese Patienten schneller einen Progress entwickelt haben, nach welchem die Therapie allerdings umgestellt wurde auf eine alternative, Pemetrexed-freie Behandlung. Diese Second Line Therapie, die für TTF-1-Negative besser geeignet zu sein scheint, könnte dann das Versterben effektiver verhindert haben als zuvor die First Line den Progress. Diese Vermutung ist natürlich rein spekulativ und darf nur als ein möglicher Erklärungsversuch angesehen werden.

Die Ergebnisse erweisen sich als komplex in der Interpretation, da sich mit einer Hazard Ratio von 0,726 bzw. 0,697 ein großer und klinisch relevanter Unterschied in der Prognose zeigt, ein p-Wert von 0,10 (OS) deutet jedoch darauf hin, dass dieses Ergebnis auch zufällig entstanden sein kann. In der Literatur wird häufig ein Überlebensvorteil für TTF-1-Positive beschrieben. Die oben bereits erwähnte Publikation von Frost *et al.* mit 741 metastasierten Adenokarzinomen der Lunge zeigte einen deutlichen positiven prognostischen Einfluss durch TTF-1-Expression (HR 0,53; $p < 0,001$ für OS und HR=0,54; $p < 0,001$ für PFS) (Frost *et al.*, 2020). Barletta *et al.* fanden in einer Studie mit 89 operierten Adenokarzinompatienten ein längeres Überleben in TTF-1-Positiven (Medianes Gesamtüberleben bei schwach Positiven 77,8 Monate und bei stark Positiven 72,4 Monate vs. 30,5 Monate bei den Negativen; $p = 0,002$) (Barletta *et al.*, 2009). Der dort beschriebene Unterschied war so ausgeprägt, dass auch mit einer deutlich kleineren Anzahl an Patienten ein niedrigerer p-Wert ermittelt wurde. Außerdem wurde dort, im Gegensatz zu der vorliegenden Studie, eine Abstufung vorgenommen zwischen TTF-1-Positiven bis Negativen. Die Patienten mit geringer und starker Expression wiesen jedoch keine signifikanten Überlebensunterschiede untereinander auf, sondern nur gegenüber den Negativen. Berghmans *et al.* untersuchten acht unabhängige Studien in einer Metaanalyse mit insgesamt 652 Patienten und berichteten ebenfalls von einem Überlebensvorteil für TTF-1-Positive, besonders in Adenokarzinomen in frühen Stadien. Eine der untersuchten Studien fand allerdings einen Überlebensnachteil für TTF-1-Positive. Für Adenokarzinompatienten betrug die kombinierte HR jedoch 0,53 (95% KI: 0,29-0,95; Positive vs. Negative) und zeigt damit einen eindeutigen Vorteil (Berghmans *et al.*, 2006). Schilsky *et al.* fanden in einer retrospektiven Studie mit 479 Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Lunge ein doppelt so langes medianes OS unter TTF-1-Positiven (HR=0,38; 95% KI: 0,29-0,51; $p < 0,0001$). Ein Unterschied, der so groß sei, dass er sogar den in der gleichen Studie festgestellten prognostischen Wert des Karnofsky Index $\geq 80\%$ überträfe (HR=0,62; 95% KI: 0,48-0,80; $p = 0,0003$). Der

prognostische Unterschied blieb auch in der multivariablen Analyse sowie nach Ausschluss der EGFR- und ALK-Mutierten erhalten (Schilsky *et al.*, 2017). Aus den Daten der vorliegenden Studie allein kann also nicht auf einen Überlebensvorteil für TTF-1-Positive geschlossen werden, auch wenn sich mindestens im PFS ein deutlicher Trend zeigt. Durch die eindeutigen Ergebnisse vorheriger Studien, darunter auch Metaanalysen und eine Publikation mit Patienten mit dem gleichen Tumor und Stadium, ist jedoch davon auszugehen, dass mit 169 Patienten im späten Stadium lediglich keine Fallzahl erreicht wurde, die groß genug ist, um signifikant Unterschiede aufzudecken. Allerdings gilt es anzumerken, dass die in den anderen Studien beschriebenen HR, insbesondere der Wert von 0,38, einen sehr hohen Vorteil zeigt, der nicht im hier ermittelten Konfidenzintervall eingeschlossen ist. Damit widersprechen die Ergebnisse der vorliegenden Studie zwar nicht der Tatsache, dass TTF-1-Positive einen Überlebensvorteil verzeichnen, aber dem Ausmaß dieses Unterschiedes.

6 Literaturverzeichnis

- Ahrendt, S.A., Decker, P.A., Alawi, E.A., Zhu, Y., Sanchez-Cespedes, M. & Yang, S.C. et al. (2001) Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer*, 92(6), 1525–1530. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20010915\)92:6<1525::AID-CNCR1478>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010915)92:6<1525::AID-CNCR1478>3.0.CO;2-H).
- Akarsu, A.N., Stoilov, I., Yilmaz, E., Sayli, B.S. & Sarfarazi, M. (1996) Genomic structure of HOXD13 gene: a nine polyalanine duplication causes synpolydactyly in two unrelated families. *Human Molecular Genetics*, 5(7), 945–952. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.7.945>.
- Aredo, J.V., Padda, S.K., Kunder, C.A., Han, S.S., Neal, J.W. & Shrager, J.B. et al. (2019) Impact of KRAS mutation subtype and concurrent pathogenic mutations on non-small cell lung cancer outcomes. *Lung Cancer*, 133, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.05.015>.
- Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., Al-Alawi, N., Schlessinger, J. & Karin, M. (1994) Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell*, 78(6), 949–961. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90271-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90271-2).
- Bailey, P., Chang, D.K., Nones, K., Johns, A.L., Patch, A.-M. & Gingras, M.-C. et al. (2016) Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, 531(7592), 47–52. <https://doi.org/10.1038/nature16965>.
- Barbacid, M. (1987) ras genes. *Annual Review of Biochemistry*, 56(1), 779–827. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.004023>.
- Barletta, J.A., Perner, S., Iafrate, A.J., Yeap, B.Y., Weir, B.A. & Johnson, L.A. et al. (2009) Clinical significance of TTF-1 protein expression and TTF-1 gene amplification in lung adenocarcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8B), 1977–1986. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00594.x>.
- Basu, T.N., Gutmann, D.H., Fletcher, J.A., Glover, T.W., Collins, F.S. & Downward, J. (1992) Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature*, 356(6371), 713–715. <https://doi.org/10.1038/356713a0>.
- Bergethon, K., Shaw, A.T., Ou, S.-H.I., Katayama, R., Lovly, C.M. & McDonald, N.T. et al. (2012) ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 30(8), 863–870. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.6345>.

- Berghmans, T., Paesmans, M., Mascaux, C., Martin, B., Meert, A.-P. & Haller, A. et al. (2006) Thyroid transcription factor 1--a new prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis. *Annals of Oncology*, 17(11), 1673–1676. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl287>.
- Bohinski, R.J., Di Lauro, R. & Whitsett, J.A. (1994) The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Molecular and Cellular Biology*, 14(9), 5671–5681. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.9.5671>.
- Bosley, T.M., Alorainy, I.A., Salih, M.A., Aldhalaan, H.M., Abu-Amero, K.K. & Oystreck, D.T. et al. (2008) The clinical spectrum of homozygous HOXA1 mutations. *American Journal of Medical Genetics. Part a*, 146A(10), 1235–1240. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32262>.
- Broek, D., Toda, T., Michaeli, T., Levin, L., Birchmeier, C. & Zoller, M. et al. (1987) The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell*, 48(5), 789–799. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90076-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90076-6).
- Bruno, M.D., Bohinski, R.J., Huelsman, K.M., Whitsett, J.A. & Korfhagen, T.R. (1995) Lung cell-specific expression of the murine surfactant protein A (SP-A) gene is mediated by interactions between the SP-A promoter and thyroid transcription factor-1. *Journal of Biological Chemistry*, 270(12), 6531–6536. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.12.6531>.
- Brustugun, O.T., Khattak, A.M., Trømborg, A.K., Beigi, M., Beiske, K. & Lund-Iversen, M. et al. (2014) BRAF-mutations in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 84(1), 36–38. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.01.023>.
- Buckles, T.C., Ziemba, B.P., Masson, G.R., Williams, R.L. & Falke, J.J. (2017) Single-Molecule Study Reveals How Receptor and Ras Synergistically Activate PI3K α and PIP3 Signaling. *Biophysical Journal*, 113(11), 2396–2405. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.09.018>.
- Cai, D., Hu, C., Li, L., Deng, S., Yang, J. & Han-Zhang, H. et al. (2020) The prevalence and prognostic value of KRAS co-mutation subtypes in Chinese advanced non-small cell lung cancer patients. *Cancer Medicine*, 9(1), 84–93. <https://doi.org/10.1002/cam4.2682>.
- Carpenter, C.L., Auger, K.R., Chanudhuri, M., Yoakim, M., Schaffhausen, B. & Shoelson, S. et al. (1993) Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 268(13), 9478–9483. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)98375-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)98375-4).

- Casey, P.J., SolSKI, P.A., Der, C.J. & Buss, J.E. (1989) p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(21), 8323–8327. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.21.8323>.
- Charest, P.G., Shen, Z., Lakoduk, A., Sasaki, A.T., Briggs, S.P. & Firtel, R.A. (2010) A Ras signaling complex controls the RasC-TORC2 pathway and directed cell migration. *Developmental Cell*, 18(5), 737–749. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.03.017>.
- Chen, H. & Zhao, J. (2020) KRAS oncogene may be another target conquered in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thoracic Cancer*, 11(12), 3425–3435. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13538>.
- Chien, Y. & White, M.A. (2003) RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival. *EMBO Reports*, 4(8), 800–806. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor899>.
- Chiu, V.K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J.B., Silletti, J. & Wiener, H. et al. (2002) Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nature Cell Biology*, 4(5), 343–350. <https://doi.org/10.1038/ncb783>.
- Civitareale, D., Castelli, M.P., Falasca, P. & Saiardi, A. (1993) Thyroid transcription factor 1 activates the promoter of the thyrotropin receptor gene. *Molecular Endocrinology*, 7(12), 1589–1595. <https://doi.org/10.1210/mend.7.12.8145764>.
- Civitareale, D., Lonigro, R., Sinclair, A.J. & Di Lauro, R. (1989) A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *The EMBO Journal*, 8(9), 2537–2542. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08391.x>.
- Crews, C.M., Alessandrini, A. & Erikson, R.L. (1992) The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5081), 478–480. <https://doi.org/10.1126/science.1411546>.
- Cserepes, M., Ostoros, G., Lohinai, Z., Raso, E., Barbai, T. & Timar, J. et al. (2014) Subtype-specific KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: a retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 50(10), 1819–1828. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.04.001>.
- Cui, W., Franchini, F., Alexander, M., Officer, A., Wong, H.-L. & IJzerman, M. et al. (2020) Real world outcomes in KRAS G12C mutation positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 146, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.06.030>.
- Dent, P., Haser, W., Haystead, T.A., Vincent, L.A., Roberts, T.M. & Sturgill, T.W. (1992) Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3

cells and in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5075), 1404–1407.

<https://doi.org/10.1126/science.1326789>.

- Dogan, S., Shen, R., Ang, D.C., Johnson, M.L., D'Angelo, S.P. & Paik, P.K. et al. (2012) Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(22), 6169–6177. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3265>.
- Dong, Z.-Y., Zhong, W.-Z., Zhang, X.-C., Su, J., Xie, Z. & Liu, S.-Y. et al. (2017) Potential Predictive Value of TP53 and KRAS Mutation Status for Response to PD-1 Blockade Immunotherapy in Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 23(12), 3012–3024. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2554>.
- Ebinu, J.O., Bottorff, D.A., Chan, E.Y., Stang, S.L., Dunn, R.J. & Stone, J.C. (1998) RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5366), 1082–1086. <https://doi.org/10.1126/science.280.5366.1082>.
- Ferguson, K.M., Berger, M.B., Mendrola, J.M., Cho, H.-S., Leahy, D.J. & Lemmon, M.A. (2003) EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Molecular Cell*, 11(2), 507–517. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00047-9).
- Ferrer, I., Zugazagoitia, J., Herbertz, S., John, W., Paz-Ares, L. & Schmid-Bindert, G. (2018) KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer*, 124, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.013>.
- Francis-Lang, H., Price, M., Polycarpou-Schwarz, M. & Di Lauro, R. (1992) Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 12(2), 576–588. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.2.576>.
- Frost, N., Zhamurashvili, T., Laffert, M. von, Klauschen, F., Ruwwe-Glösenkamp, C. & Raspe, M. et al. (2020) Pemetrexed-Based Chemotherapy Is Inferior to Pemetrexed-Free Regimens in Thyroid Transcription Factor 1 (TTF-1)-Negative, EGFR/ALK-Negative Lung Adenocarcinoma: A Propensity Score Matched Pairs Analysis. *Clinical Lung Cancer*, 21(6), e607-e621. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2020.05.014>.
- Gale, N.W., Kaplan, S., Lowenstein, E.J., Schlessinger, J. & Bar-Sagi, D. (1993) Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature*, 363(6424), 88–92. <https://doi.org/10.1038/363088a0>.

- Gao, G., Liao, W., Ma, Q., Zhang, B., Chen, Y. & Wang, Y. (2020) KRAS G12D mutation predicts lower TMB and drives immune suppression in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*, 149, 41–45.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.09.004>.
- Gaunt, S.J., Sharpe, P.T. & Duboule Denis (1988) Spatially restricted domains of homeo-gene transcripts in mouse embryos: relation to a segmented body plan. *Development*, 104(Supplement), 169–179. <https://dev.biologists.org/content/104/Supplement/169.short>.
- Global Cancer Observatory (2020) *Cancer fact sheets: Lung*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf> [Accessed 23 October 2021].
- Goodman, F.R., Mundlos, S., Muragaki, Y., Donnai, D., Giovannucci-Uzielli, M.L. & Lapi, E. et al. (1997) Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), 7458–7463.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7458>.
- Guazzi, S., Price, M., Felice, M. de, Damante, G., Mattei, M.G. & Di Lauro, R. (1990) Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *The EMBO Journal*, 9(11), 3631–3639.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07574.x>.
- Gupta, S., Ramjaun, A.R., Haiko, P., Wang, Y., Warne, P.H. & Nicke, B. et al. (2007) Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell*, 129(5), 957–968.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.051>.
- Hancock, J.F. (2003) Ras proteins: different signals from different locations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(5), 373–384. <https://doi.org/10.1038/nrm1105>.
- Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E. & Marshall, C.J. (1989) All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*, 57(7), 1167–1177.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90054-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90054-8).
- Hancock, J.F., Paterson, H. & Marshall, C.J. (1990) A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell*, 63(1), 133–139. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90294-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90294-O).
- Henkemeyer, M., Rossi, D.J., Holmyard, D.P., Puri, M.C., Mbamalu, G. & Harpal, K. et al. (1995) Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature*, 377(6551), 695–701.
<https://doi.org/10.1038/377695a0>.

- Hesson, L., Dallol, A., Minna, J.D., Maher, E.R. & Latif, F. (2003) NORE1A, a homologue of RASSF1A tumour suppressor gene is inactivated in human cancers. *Oncogene*, 22(6), 947–954. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206191>.
- Hofer, F., Fields, S., Schneider, C. & Martin, G.S. (1994) Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), 11089–11093. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.11089>.
- Honegger, A.M., Schmidt, A., Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990) Evidence for epidermal growth factor (EGF)-induced intermolecular autophosphorylation of the EGF receptors in living cells. *Molecular and Cellular Biology*, 10(8), 4035–4044. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.8.4035>.
- Hong, D.S., Fakih, M.G., Strickler, J.H., Desai, J., Durm, G.A. & Shapiro, G.I. et al. (2020) KRASG12C Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *The New England Journal of Medicine*, 383(13), 1207–1217. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1917239>.
- Howe, C.L., Valletta, J.S., Rusnak, A.S. & Mobley, W.C. (2001) NGF Signaling from Clathrin-Coated Vesicles. *Neuron*, 32(5), 801–814. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00526-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00526-8).
- Huncharek, M., Muscat, J. & Geschwind, J.F. (1999) K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases. *Carcinogenesis*, 20(8), 1507–1510. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.8.1507>.
- Husgafvel-Pursiainen, K., Hackman, P., Ridanpää, M., Anttila, S., Karjalainen, A. & Partanen, T. et al. (1993) K-ras mutations in human adenocarcinoma of the lung: association with smoking and occupational exposure to asbestos. *International Journal of Cancer*, 53(2), 250–256. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910530213>.
- Inouye, K., Mizutani, S., Koide, H. & Kaziro, Y. (2000) Formation of the Ras dimer is essential for Raf-1 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 3737–3740. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.3737>.
- Jackson, J.H., Cochrane, C.G., Bourne, J.R., Solski, P.A., Buss, J.E. & Der, C.J. (1990) Farnesol modification of Kirsten-ras exon 4B protein is essential for transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(8), 3042–3046. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.8.3042>.
- Jiang, X. & Sorkin, A. (2002) Coordinated traffic of Grb2 and Ras during epidermal growth factor receptor endocytosis visualized in living cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(5), 1522–1535. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-11-0552>.
- Kaufmann, O. & 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2000.00801.x>.
- Kelly, S.E., Bachurski, C.J., Burhans, M.S. & Glasser, S.W. (1996) Transcription of the lung-specific surfactant protein C gene is mediated by thyroid transcription factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 6881–6888. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.12.6881>.
- Kim, H.R., Ahn, J.R., Lee, J.G., Bang, D.H., Ha, S.-J. & Hong, Y.K. et al. (2013) The impact of cigarette smoking on the frequency of and qualitative differences in KRAS mutations in Korean patients with lung adenocarcinoma. *Yonsei Medical Journal*, 54(4), 865–874. <https://doi.org/10.3349/ymj.2013.54.4.865>.
- Kim, J.H., Kim, H.S. & Kim, B.J. (2017) Prognostic value of KRAS mutation in advanced non-small-cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors: A meta-analysis and review. *Oncotarget*, 8(29), 48248–48252. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17594>.
- Kimura, S., Hara, Y., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Fox, C.H. & Ward, J.M. et al. (1996) The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes & Development*, 10(1), 60–69. <https://doi.org/10.1101/gad.10.1.60>.
- Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C. & Pawson, T. (1991) SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5006), 668–674. <https://doi.org/10.1126/science.1708916>.
- Kraywinkel, K. & Schönfeld, I. (2018) Epidemiologie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms in Deutschland. *Der Onkologe*, 24(12), 946–951. <https://doi.org/10.1007/s00761-018-0480-2>.
- Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L. & Rapp, U.R. et al. (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 358(6385), 417–421. <https://doi.org/10.1038/358417a0>.
- Lai, C.C., Boguski, M., Broek, D. & Powers, S. (1993) Influence of guanine nucleotides on complex formation between Ras and CDC25 proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 13(3), 1345–1352. <https://doi.org/10.1128/MCB.13.3.1345>.
- Lambert, J.M., Lambert, Q.T., Reuther, G.W., Malliri, A., Siderovski, D.P. & Sondek, J. et al. (2002) Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nature Cell Biology*, 4(8), 621–625. <https://doi.org/10.1038/ncb833>.
- Lazzaro, D., Price, M., Felice, M. de & 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. <https://dev.biologists.org/content/113/4/1093.short>.
- Leevers, S.J., Paterson, H.F. & Marshall, C.J. (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*, 369(6479), 411–414. <https://doi.org/10.1038/369411a0>.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B. & Lammers, R. et al. (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, 70(3), 431–442. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90167-B](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90167-B).
- Margolis, B.L., Lax, I., Kris, R., Dombalagian, M., Honegger, A.M. & Howk, R. et al. (1989) All Autophosphorylation Sites of Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor and HER2/neu Are Located in Their Carboxyl-terminal Tails. *Journal of Biological Chemistry*, 264(18), 10667–10671. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81674-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81674-X).
- Martin, G.A., Viskochil, D., Bollag, G., McCabe, P.C., Crosier, W.J. & Haubruck, H. et al. (1990) The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell*, 63(4), 843–849. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90150-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90150-D).
- Martini, M., Santis, M.C. de, Braccini, L., Gulluni, F. & Hirsch, E. (2014) PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Annals of Medicine*, 46(6), 372–383. <https://doi.org/10.3109/07853890.2014.912836>.
- McGrath, J.P., Capon, D.J., Goeddel, D.V. & Levinson, A.D. (1984) Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. *Nature*, 310(5979), 644–649. <https://doi.org/10.1038/310644a0>.
- Meng, D., Yuan, M., Li, X., Chen, L., Yang, J. & Zhao, X. et al. (2013) Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer*, 81(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.03.019>.
- Midha, A., Dearden, S. & McCormack, R. (2015) EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *American Journal of Cancer Research*, 5(9), 2892–2911.
- Minoo, P., Hamdan, H., Bu, D., Warburton, D., Stepanik, P. & deLemos, R. (1995) TTF-1 regulates lung epithelial morphogenesis. *Developmental Biology*, 172(2), 694–698. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.8080>.
- Mitsudomi, T., Morita, S., Yatabe, Y., Negoro, S., Okamoto, I. & Tsurutani, J. et al. (2010) Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405):

- an open label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 11(2), 121–128.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70364-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70364-X).
- Moldvay, J., Jackel, M., Bogos, K., Soltész, I., Agócs, L. & Kovács, G. et al. (2004) The role of TTF-1 in differentiating primary and metastatic lung adenocarcinomas. *Pathology Oncology Research : POR*, 10(2), 85–88.
<https://doi.org/10.1007/BF02893461>.
- Nadal, E., Chen, G., Prensner, J.R., Shiratsuchi, H., Sam, C. & Zhao, L. et al. (2014) KRAS-G12C mutation is associated with poor outcome in surgically resected lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 9(10), 1513–1522.
<https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000305>.
- Pham, N., Cheglakov, I., Koch, C.A., Hoog, C.L. de, Moran, M.F. & Rotin, D. (2000) The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates Ras in response to cAMP and cGMP. *Current Biology*, 10(9), 555–558. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00473-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00473-5).
- Pol, A., Calvo, M. & Enrich, C. (1998) Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. *FEBS Letters*, 441(1), 34–38.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01517-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01517-8).
- Revenu, N., Boon, L.M., Mulliken, J.B., Enjolras, O., Cordisco, M.R. & Burrows, P.E. et al. (2008) Parkes Weber syndrome, vein of Galen aneurysmal malformation, and other fast-flow vascular anomalies are caused by RASA1 mutations. *Human Mutation*, 29(7), 959–965. <https://doi.org/10.1002/humu.20746>.
- Riely, G.J., Kris, M.G., Rosenbaum, D., Marks, J., Li, A. & Chitale, D.A. et al. (2008) Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(18), 5731–5734. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0646>.
- Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2019) *Krebs in Deutschland 2015/2016*. Robert Koch-Institut: Berlin.
- Rodriguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E. & Wistuba, I.I. (2016) Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. *Cancer Treatment and Research*, 170, 25–46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2_2.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Khwaja, A., Marte, B.M., Pappin, D. & Das, P. et al. (1997) Role of Phosphoinositide 3-OH Kinase in Cell Transformation and Control of the Actin Cytoskeleton by Ras. *Cell*, 89(3), 457–467.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80226-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80226-3).

- Rubio, I. & Wetzker, R. (2000) A permissive function of phosphoinositide 3-kinase in Ras activation mediated by inhibition of GTPase-activating proteins. *Current Biology*, 10(19), 1225–1228. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00731-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00731-4).
- Sacco, E., Metalli, D., Busti, S., Fantinato, S., D'Urzo, A. & Mapelli, V. et al. (2006) Catalytic competence of the Ras-GEF domain of hSos1 requires intra-REM domain interactions mediated by phenylalanine 577. *FEBS Letters*, 580(27), 6322–6328. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.040>.
- Sadowski, I., Stone, J.C. & Pawson, T. (1986) A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Molecular and Cellular Biology*, 6(12), 4396–4408. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.12.4396>.
- Sakurai, H., Asamura, H., Goya, T., Eguchi, K., Nakanishi, Y. & Sawabata, N. et al. (2010) Survival differences by gender for resected non-small cell lung cancer: a retrospective analysis of 12,509 cases in a Japanese Lung Cancer Registry study. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 5(10), 1594–1601. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181f1923b>.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A. & Schmitz, F. et al. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, 277(5324), 333–338. <https://doi.org/10.1126/science.277.5324.333>.
- Schilsky, J.B., Ni, A., Ahn, L., Datta, S., Travis, W.D. & Kris, M.G. et al. (2017) Prognostic impact of TTF-1 expression in patients with stage IV lung adenocarcinomas. *Lung Cancer*, 108, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.03.015>.
- Schweighoffer, F., Barlat, I., Chevallier-Multon, M.C. & Tocque, B. (1992) Implication of GAP in Ras-dependent transactivation of a polyoma enhancer sequence. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5058), 825–827. <https://doi.org/10.1126/science.1317056>.
- Sebastian, M., Eberhardt, W.E.E., Hoffknecht, P., Metzenmacher, M., Wehler, T. & Kokowski, K. et al. (2021) KRAS G12C-mutated advanced non-small cell lung cancer: A real-world cohort from the German prospective, observational, nation-wide CRISP Registry (AIO-TRK-0315). *Lung Cancer*, 154, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2021.02.005>.
- Selinger, C.I., Rogers, T.-M., Russell, P.A., O'Toole, S., Yip, P. & Wright, G.M. et al. (2013) Testing for ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: a multicenter comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Modern Pathology*, 26(12), 1545–1553. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.87>.

- Shepherd, F.A., Domerg, C., Hainaut, P., Jänne, P.A., Pignon, J.-P. & Graziano, S. et al. (2013) Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of adjuvant chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 31(17), 2173–2181. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.1390>.
- Somaiah, N., Fidler, M.J., Garrett-Mayer, E., Wahlquist, A., Shirai, K. & Buckingham, L. et al. (2014) Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations are exceptionally rare in thyroid transcription factor (TTF-1)-negative adenocarcinomas of the lung. *Oncoscience*, 1(8), 522–528. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.72>.
- Spira, A.I., Tu, H., Aggarwal, S., Hsu, H., Carrigan, G. & Wang, X. et al. (2021) A retrospective observational study of the natural history of advanced non-small-cell lung cancer in patients with KRAS p.G12C mutated or wild-type disease. *Lung Cancer*, 159, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2021.05.026>.
- Stahlman, M.T., Gray, M.E. & Whitsett, J.A. (1996) Expression of thyroid transcription factor-1(TTF-1) in fetal and neonatal human lung. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 44(7), 673–678. <https://doi.org/10.1177/44.7.8675988>.
- Stokoe, D., Macdonald, S.G., Cadwallader, K., Symons, M. & Hancock, J.F. (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5164), 1463–1467. <https://doi.org/10.1126/science.7811320>.
- Su, Y.-C., Hsu, Y.-C. & Chai, C.-Y. (2006) Role Of TTF-1, CK20, And CK7 Immunohistochemistry for Diagnosis of Primary and Secondary Lung Adenocarcinoma. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 22(1), 14–19. [https://doi.org/10.1016/S1607-551X\(09\)70214-1](https://doi.org/10.1016/S1607-551X(09)70214-1).
- Sun, P.-L., Seol, H., Lee, H.J., Yoo, S.B., Kim, H. & Xu, X. et al. (2012) High incidence of EGFR mutations in Korean men smokers with no intratumoral heterogeneity of lung adenocarcinomas: correlation with histologic subtypes, EGFR/TTF-1 expressions, and clinical features. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 7(2), 323–330. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182381515>.
- Sung, H., Kanchi, K.L., Wang, X., Hill, K.S., Messina, J.L. & Lee, J.-H. et al. (2016) Inactivation of RASA1 promotes melanoma tumorigenesis via R-Ras activation. *Oncotarget*, 7(17), 23885–23896. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8127>.
- SVATON, M., FIALA, O., PESEK, M., BORTLICEK, Z., MINARIK, M. & BENESOVA, L. et al. (2016) The Prognostic Role of KRAS Mutation in Patients with Advanced NSCLC Treated with Second- or Third-line Chemotherapy. *Anticancer Research*, 36(3), 1077–1082. <https://ar.iijournals.org/content/36/3/1077.short>.

- Sweet, R.W., Yokoyama, S., Kamata, T., Feramisco, J.R., Rosenberg, M. & Gross, M. (1984) The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature*, 311(5983), 273–275. <https://doi.org/10.1038/311273a0>.
- Tall, G.G., Barbieri, M., Stahl, P.D. & Horazdovsky, B.F. (2001) Ras-Activated Endocytosis Is Mediated by the Rab5 Guanine Nucleotide Exchange Activity of RIN1. *Developmental Cell*, 1(1), 73–82. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00008-9).
- Tomasini, P., Walia, P., Labbe, C., Jao, K. & Leighl, N.B. (2016) Targeting the KRAS Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist*, 21(12), 1450–1460. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0084>.
- Trahey, M. & McCormick, F. (1987) A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4826), 542–545. <https://doi.org/10.1126/science.2821624>.
- Travis, W.D., Brambilla, E., Nicholson, A.G., Yatabe, Y., Austin, J.H.M. & Beasley, M.B. et al. (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. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>.
- Vetter, I.R. & Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5545), 1299–1304. <https://doi.org/10.1126/science.1062023>.
- Villaruz, L.C., Socinski, M.A., Cunningham, D.E., Chiosea, S.I., Burns, T.F. & Siegfried, J.M. et al. (2013) The prognostic and predictive value of KRAS oncogene substitutions in lung adenocarcinoma. *Cancer*, 119(12), 2268–2274. <https://doi.org/10.1002/cncr.28039>.
- Visbal, A.L., Williams, B.A., Nichols, F.C., Marks, R.S., Jett, J.R. & Aubry, M.-C. et al. (2004) Gender differences in non-small-cell lung cancer survival: an analysis of 4,618 patients diagnosed between 1997 and 2002. *The Annals of Thoracic Surgery*, 78(1), 209-15; discussion 215. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2003.11.021>.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. & Cooper, J.A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf. *Cell*, 74(1), 205–214. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90307-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90307-C).
- Vos, M.D., Martinez, A., Ellis, C.A., Vallecorsa, T. & Clark, G.J. (2003) The pro-apoptotic Ras effector Nore1 may serve as a Ras-regulated tumor suppressor in the lung. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 21938–21943. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211019200>.

- Wada, T. & Penninger, J.M. (2004) Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*, 23(16), 2838–2849. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207556>.
- Wiesweg, M., Kasper, S., Worm, K., Herold, T., Reis, H. & Sara, L. et al. (2019) Impact of RAS mutation subtype on clinical outcome—a cross-entity comparison of patients with advanced non-small cell lung cancer and colorectal cancer. *Oncogene*, 38(16), 2953–2966. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0634-0>.
- Yamamoto, T., Harada, N., Kano, K., Taya, S., Canaani, E. & Matsuura, Y. et al. (1997) The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, 139(3), 785–795. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.3.785>.
- Yatabe, Y., Mitsudomi, T. & Takahashi, T. (2002) TTF-1 Expression in Pulmonary Adenocarcinomas. *The American Journal of Surgical Pathology*, 26(6), 767–773.
- Ye, J., Findeis-Hosey, J.J., Yang, Q., McMahon, L.A., Yao, J.L. & Li, F. et al. (2011) Combination of napsin A and TTF-1 immunohistochemistry helps in differentiating primary lung adenocarcinoma from metastatic carcinoma in the lung. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology : AIMM*, 19(4), 313–317. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e318205b059>.
- Zhang, L., Whitsett, J.A. & Stripp, B.R. (1997) Regulation of Clara cell secretory protein gene transcription by thyroid transcription factor-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1350(3), 359–367. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(96\)00180-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(96)00180-7).
- Zhang, M., Jang, H. & Nussinov, R. (2019) The structural basis for Ras activation of PI3K α lipid kinase. *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP*, 21(22), 12021–12028. <https://doi.org/10.1039/C9CP00101H>.
- Zhang, X.F., Settleman, J., Kyriakis, J.M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S.J. & Marshall, M.S. et al. (1993) Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature*, 364(6435), 308–313. <https://doi.org/10.1038/364308a0>.
- Zhou, L., Lim, L., Costa, R.H. & Whitsett, J.A. (1996) Thyroid transcription factor-1, hepatocyte nuclear factor-3 β , surfactant protein B, C, and Clara cell secretory protein in developing mouse lung. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 44(10), 1183–1193. <https://doi.org/10.1177/44.10.8813084>.

7 Thesen

1. Zwischen Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Lunge mit und ohne K-ras-Mutation scheint es weder im Gesamtüberleben noch im progressionsfreien Überleben einen Unterschied zu geben.
2. Unter Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Lunge, ohne eine andere Treibermutation als K-ras, könnten TTF-1-Positive im Progressionsfreien Überleben einen Vorteil besitzen, während dieser Vorteil im Gesamtüberleben in dieser Studie nicht gezeigt werden konnte.
3. Die Häufigkeit der Treibermutationen unter Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Lunge stellt sich in etwa wie folgt dar: 25% K-ras, 12% EGFR, je unter 2% ALK, ROS und BRAF.
4. Die Häufigkeit der Subtypen unter K-ras-mutierten Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Lunge stellt sich in etwa wie folgt dar: 32% G12C, 32% G12V, 17% G12D, 6% G12S, 6% G12A, 2% G12F, 4% Mutationen an Codon 13.
5. Unter Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Lunge zeigt sich eine Assoziation von Raucherstatus und dem Auftreten einer K-ras-Mutation mit einem geschätzten Relativen Risiko von 2,02.
6. Unter K-ras-positiven Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Lunge scheint es keine Assoziation zwischen Raucherstatus und den einzelnen Subtypen von K-ras zu geben.
7. Unter Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Lunge zeigt sich eine Assoziation von Asbestexposition und dem Auftreten einer K-ras-Mutation mit einem geschätzten Relativen Risiko von 1,94.
8. Unter Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Lunge scheinen EGFR-Mutationen unter Nichtrauchern etwa 6-mal so häufig aufzutreten.
9. Unter Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Lunge ohne TTF-1-Expression ist die Wahrscheinlichkeit einer EGFR-Mutation sehr gering.
10. Unter Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Lunge sollten ein höheres Alter, ein höherer ECOG und männliches Geschlecht als unabhängige Risikofaktoren für schnelleres Versterben und Progress betrachtet werden.

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung des akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum, Unterschrift