

Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie
der Universität Tübingen
Abteilung Immunologie

**Ligandombasierte Analyse der
Signaltransduktionswege
des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Groß, Thorben Hermann Konrad

2022

Dekan: Professor Dr. Bernd Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Lauer

Tag der Disputation: 20.04.2022

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	11
Abkürzungsverzeichnis	13
Liste der Quellproteine	16
1 Einleitung.....	20
1.1 Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome	20
1.1.1 Häufigkeit in Deutschland	21
1.1.2 Risikofaktoren	22
1.1.3 Klinik	23
1.1.4 Diagnostik.....	24
1.1.5 Therapie und Prognose	27
1.2 Immunsystem.....	37
1.2.1 Geschichtliche Aspekte	38
1.2.2 Aufbau und Funktion des MHC-Moleküls	39
1.2.3 Aufbau und Funktion von HLA-Klasse I	39
1.2.4 Aufbau und Funktion von HLA-Klasse II	40
1.2.5 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation auf HLA-Klasse I- Molekülen	41
1.2.6 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation auf HLA-Klasse II- Molekülen	42
1.2.7 T-Zell-Rezeptor und T-Zell-Aktivierung.....	42
1.2.8 Erkennung und Signaltransduktion	43
1.2.9 Tumore und Immunsystem	44
1.3 Immuntherapeutische Angriffspunkte	48
1.3.1 Antikörpertherapie	48

1.3.2	Chimärer Antigenrezeptor T-Zellen.....	48
1.3.3	Tumorstabilisierung	49
1.4	Analyse der Signaltransduktionswege (<i>Pathway</i> -Analyse).....	50
1.5	Ziele der Arbeit.....	52
2	Material und Methoden	54
2.1	Chemikalienliste	54
2.2	Antikörperliste	54
2.3	Geräteliste.....	55
2.4	Softwareliste.....	55
2.5	Liste der Verbrauchsmaterialien.....	55
2.6	Probenmaterial.....	56
2.7	HLA-Typisierung	58
2.7.1	Probenmaterial	58
2.7.2	HLA-Typisierung.....	58
2.8	Identifikation MHC-Klasse I- und II-gebundener Peptide.....	58
2.8.1	Antikörperproduktion und –Kopplung.....	59
2.8.2	HLA-Ligandomanalyse	60
2.9	Assoziation betroffener KEGG- Signaltransduktionswege	67
2.9.1	KEGG-Zuordnung tumorspezifischer, hochregulierter oder herunterregulierter Proteine	67
2.9.2	Zuordnung Karzinom-/Karzinogenese assoziierter Interaktionen .	68
2.9.3	Zuordnung betroffener Quellproteine.....	69
2.10	Analyse klinischer Korrelation	70
3	Ergebnisse.....	71
3.1	Analyse der Patientenkohorte	72
3.1.1	Erkrankungsalter.....	72

3.1.2	Geschlechterverteilung	73
3.1.3	Tumorstadien.....	74
3.1.4	Nikotinabusus	75
3.1.5	Histologie	76
3.1.6	Lymphknotenbefall.....	77
3.1.7	Histologischer Differenzierungsgrad	78
3.1.8	Vorliegen von Zweitmalignomen.....	79
3.1.9	Krankheitsverlauf.....	80
3.2	KEGG-basierte Analyse von Signaltransduktionswegen.....	81
3.2.1	Analyse der Signaltransduktionswege tumorspezifischer Antigene bzw. derer Quellproteine mit Vorkommen in mindestens 2 Probenpaaren	81
3.2.2	Analyse der Signaltransduktionswege semi-quantitativ hoch- regulierter Quellproteine	86
3.2.3	Analyse der Signaltransduktionswege semi-quantitativ herunterregulierter Quellproteine	90
3.3	Aufarbeitung relevanter Quellproteine in Korrelation zur Patientenkohorte	94
3.3.1	Aufarbeitung tumorspezifischer Quellproteine in Korrelation zur Patientenkohorte.....	94
3.3.2	Korrelation der in ≥ 10 Probenpaaren semi-quantitativ hoch- regulierten Quellproteine gegenüber klinischen Daten	94
3.3.3	Korrelation semi-quantitativ erhöhter Quellproteine mit klinischen Daten unter Berücksichtigung Karzinom-assoziiertes Signaltransduktionswege	99
3.3.4	Korrelation der in ≥ 10 Probenpaaren semi-quantitativ herunter- regulierten Quellproteine gegenüber klinischen Daten	102

3.3.5	Korrelation semi-quantitativ erniedrigter Quellproteine mit klinischen Daten unter Berücksichtigung Karzinom-assoziiierter Signaltransduktionswege	105
3.4	Patientenzuordnung relevant betroffener Signaltransduktionswege .	112
4	Diskussion	114
4.1	Repräsentativität der Patientenkohorte	115
4.2	Analyse der Signaltransduktionswege zur Eingrenzung tumorspezifischer Peptide.....	117
4.3	Klinische Korrelationen.....	122
4.3.1	Klinische Korrelation tumorspezifischer Quellproteine.....	122
4.3.2	Klinische Korrelation hochregulierter Quellproteine	122
4.3.3	Klinische Korrelation herunterregulierter Quellproteine	125
4.4	Patientenzuordnung stark betroffener Signaltransduktionswege	128
5	Zusammenfassung	130
6	Literaturverzeichnis.....	131
7	Eigenanteil	149
8	Veröffentlichungen mit Beteiligung des Autors	151
9	Danksagung.....	152

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hämatoxylin-Eisen-(HE)-Färbung: oben links: ein pulmonales Adenokarzinom, oben rechts: ein pulmonales Plattenepithelkarzinom, unten: ein kleinzelliges Bronchialkarzinom, mit freundlicher Genehmigung des Institut für Pathologie der Universität Tübingen	20
Abbildung 2: Diagnostischer Algorithmus für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (*IIIA ₁₋₄ nach Robinson-Klassifikation) orientierend an Leitlinienprogramm Onkologie [6].....	25
Abbildung 3: Wirkweise der Checkpoint-Inhibitoren; orientierend an: Raman et al. [38].	30
Abbildung 4: Wirkungsweise der Treibermutationen beim NSCLC; orientierend an: Länger, Florian, et al. [54,55].....	33
Abbildung 5: Verteilungsmuster der Treibermutationen; orientierend an: Hirsch, et al. [56].....	34
Abbildung 6: Prozessierung von HLA-Klasse I-präsentierten Antigenen und Beladung von HLA-Klasse I-Molekülen. Orientierend an N. P. Trautwein [144]46	
Abbildung 7: Verteilung Patientenalter	72
Abbildung 8: Verteilung der Geschlechter in der Patientenkohorte	73
Abbildung 9: Verteilung der Tumorstadien nach UICC 8 in der Patientenkohorte, Stadium IA1-3 zu Stadium IA zusammengefasst	74
Abbildung 10: Verteilung der Raucher und Nichtraucher in der Patientenkohorte	75
Abbildung 11: Verteilung Histologie in der Patientenkohorte.....	76
Abbildung 12: Verteilung Lymphknotenbefall	77
Abbildung 13: Histologischer Differenzierungsgrad.....	78
Abbildung 14: Vorliegen von Zweitmalignomen.....	79
Abbildung 15: Therapieverlauf der Patienten	80
Abbildung 16: Schematische Abbildung der Ligandomanalyse und nachfolgenden Datenbankbasierten Aufbereitung; modifiziert nach: www.dctk.dkfz.de [204]	81
Abbildung 17: Zuordnung betroffener tumorspezifischer Quellproteine nach Kategorie der KEGG-Signaltransduktionswege.....	83

Abbildung 18: Zuordnung betroffener Prozesse nach Kategorie der KEGG-Signaltransduktionswege	84
Abbildung 19: Zuordnung betroffener tumorspezifischer Quellproteine nach Unterkategorie der Karzinom-assoziierten KEGG-Signaltransduktionswege ...	85
Abbildung 20: Zuordnung betroffener Prozesse nach Unterkategorie der Karzinom-assoziierten KEGG-Signaltransduktionswege.....	85
Abbildung 21: Zuordnung betroffener hochregulierter Quellproteine nach Kategorie der KEGG-Signaltransduktionswege.....	87
Abbildung 22: Zuordnung betroffener Prozesse nach Kategorie der KEGG-Signaltransduktionswege	88
Abbildung 23: Zuordnung betroffener Proteine nach Unterkategorie der Karzinom-assoziierten KEGG-Signaltransduktionswege.....	89
Abbildung 24: Zuordnung betroffener Prozesse nach Unterkategorie der Karzinom-assoziierten KEGG-Signaltransduktionswege.....	89
Abbildung 25: Zuordnung betroffener herunterregulierter Quellproteine nach Kategorie der KEGG-Signaltransduktionswege.....	91
Abbildung 26: Zuordnung betroffener Prozesse nach Kategorie der KEGG-Signaltransduktionswege	92
Abbildung 27: Zuordnung betroffener herunterregulierter Quellproteine nach Unterkategorie der Karzinom-assoziierten KEGG-Signaltransduktionswege ...	93
Abbildung 28: Zuordnung betroffener Prozesse nach Unterkategorie der Karzinom-assoziierten KEGG-Signaltransduktionswege.....	93
Abbildung 29: Verteilung von hochreguliertem P12110 nach Histologie	95
Abbildung 30: Verteilung von hochreguliertem P42766 nach Geschlecht	96
Abbildung 31: Verteilung von hochreguliertem Q99715 nach Lymphknotenbefall	97
Abbildung 32: Verteilung von hochreguliertem Q5VWP2 nach Differenzierungsgrad	99
Abbildung 33: Verteilung von hochreguliertem P09237 nach Lymphknotenbefall	101
Abbildung 34: Verteilung von herunterreguliertem P02768 nach Histologie.	103
Abbildung 35: Verteilung von herunterreguliertem Q07157 nach Histologie	104

Abbildung 36: Verteilung von herunterreguliertem P12821 nach Geschlecht	106
Abbildung 37: Verteilung von herunterreguliertem P35968 nach Lymphknotenbefall	107
Abbildung 38: Verteilung von herunterreguliertem Q96PQ7 nach Nikotinkonsum.....	109
Abbildung 39: Verteilung von herunterreguliertem Q8WWI1 nach Nikotinkonsum.....	110
Abbildung 40: Verteilung von herunterreguliertem P12821 nach Nikotinkonsum.....	111
Abbildung 41: PI3K/AKT-assoziierte hochregulierte Quellproteine nach Patientenprobe	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tumorgröße nach TNM; adaptiert nach: Leitlinienprogramm Onkologie [6], [28]	26
Tabelle 2: Lymphknotenmanifestation nach TNM; adaptiert nach: Leitlinienprogramm Onkologie [6], [28].....	27
Tabelle 3: Fernmetastasierung nach TNM; adaptiert nach: Leitlinienprogramm Onkologie [6], [28]	27
Tabelle 4: Übersicht zugelassener und in Studien befindlicher zielgerichteter Therapeutika Stand 11/2021	36
Tabelle 5: Übersicht verwendeter monoklonaler Mausantikörper für die Immunaффinitätschromatografie	54
Tabelle 6: Übersicht Tumorproben mit Alter, Geschlecht und Histologie.....	57
Tabelle 7: Verwendete Probenmengen	60
Tabelle 8: Kategorien gefundener KEGG- Signaltransduktionswege	69
Tabelle 9: Quellproteine ohne Zuordnung zu betroffenen KEGG- Signaltransduktionswege	82
Tabelle 10: Kreuztabelle Histologie P12110	95
Tabelle 11: Signifikanz der P12110 Hochregulation zur Histologie	95
Tabelle 12: Kreuztabelle Geschlecht P42766.....	96
Tabelle 13: Signifikanz der P42766 Hochregulation zur Geschlechtsverteilung	97
Tabelle 14: Kreuztabelle Q99715 und Lymphknotenbefall	97
Tabelle 15: Signifikanz der Q99715 Hochregulation zum Lymphknotenbefall .	98
Tabelle 16: Kreuztabelle Q5VWP2 und Differenzierungsgrad	98
Tabelle 17: Signifikanz der Q5VWP2 Hochregulation zum Differenzierungsgrad	99
Tabelle 18: Kreuztabelle P09237 und Lymphknotenbefall.....	100
Tabelle 19: Signifikanz der P09237 Hochregulation zum Lymphknotenbefall	101
Tabelle 20: Kreuztabelle P02768 und Histologie	102
Tabelle 21: Signifikanz der P07268 Herunterregulation zur Histologie.....	103
Tabelle 22: Kreuztabelle Q07157 und Histologie.....	104
Tabelle 23: Signifikanz der Q07157 Herunterregulation zur Histologie	104

Tabelle 24: Kreuztabelle P12821 und Geschlecht.....	106
Tabelle 25: Signifikanz der P12821 Herunterregulation zum Geschlecht.....	106
Tabelle 26: Kreuztabelle P35968 und Lymphknotenbefall.....	107
Tabelle 27: Signifikanz der P35968 Herunterregulation zum Lymphknotenstatus	108
Tabelle 28: Kreuztabelle Q96PQ7 und Nikotinkonsum.....	108
Tabelle 29: Signifikanz der Q96PQ7 Herunterregulation zum Nikotinkonsum	109
Tabelle 30: Kreuztabelle Q8WWI1 und Nikotinkonsum	109
Tabelle 31: Signifikanz der Q96PQ7 Herunterregulation zum Nikotinkonsum	110
Tabelle 32: Kreuztabelle P12821 und Nikotinkonsum	111
Tabelle 33: Signifikanz der P12821 Herunterregulation zum Nikotinkonsum	111

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg/ mg/ g	Mikrogramm/ Milligramm/ Gramm
µl/ ml	Mikroliter/ Milliliter
µm/ mm	Mikrometer/ Millimeter
µM/mM/M	Mikromol/ Millimol/ Mol
Abb	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
ACN	Acetonitril
ADCC	<i>antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
AKT	Protein kinase B
ALK	anaplastische Lymphomkinase
B-(Zellen)	<i>Bone marrow</i>
BrCN/CNBr	Bromcyan
C18	Octadecylsilan
CAR-T-Zellen	<i>Chimeric Antigen Receptor-T-Zellen</i>
CD (3/4/8/16/28)	<i>Cluster of Differentiation (3/4/8/1&/28)</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CoVid-19	<i>coronavirus disease 2019 (Coronavirus-Krankheit-2019)</i>
CRISPLD	<i>Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing</i>
CT	Computer Tomographie
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein-4</i>
DLX	<i>Distal-less homeobox</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)</i>
Dr. med.	Doctor medicinae (Doktor der Medizin)
Dr. rer. nat.	doctor rerum naturalium (Doktor der Naturwissenschaften)
e. V.	Eingetragener Verein
ECM	<i>extracellular matrix (Extrazelluläre Matrix)</i>
EFI	<i>European Federation for Immunogenetics</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
Et al	Et alii/Und andere
FAM46C	<i>family with sequence similarity 46, member C</i>
FAS-L	Fas-Ligand
FcR	Fc-Rezeptor
FDR	Rate falscher Zuordnungen
FIBCD	<i>Fibrinogen C domain-containing protein</i>
Fyn	Tyrosinkinase Fyn
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff

HE	Hämatoxylin-Eosin
Her2/neu	<i>human epidermal growth receptor 2</i>
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRSG	Herausgeber
IL-10	Interleukin 10
ITAMS	Immunorezeptor Tyrosin-abhängige Aktivierungsmotive
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KLHL	<i>Kelch-like protein</i>
KRAS	monomeres G-Protein KRAS
LAT	<i>Linker for activation of t-cells</i>
Lck	<i>lymphocyte specific protein-tyrosine kinase</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography Mass Spectroscopy</i>
LFQ	<i>Label-free Quantitation</i> (markierungsfreie Quantifizierung)
LMO	<i>LIM domain only protein</i>
LMP (2/7)	<i>low molecular mass polypeptides (2/7)</i>
MAGEA	<i>Melanoma-associated antigen</i>
MET	Tyrosin-Protein-Kinase Met
MF59	Mikrofluidisierung 59 (Adjuvans)
MFSD	<i>Major facilitator superfamily domaincontainingprotein</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIIC	MHC Klasse II-Kompartiment
MMP-7	Matrilysin
MS	<i>Mass Spectroscopy</i> (Massenspektrometrie)
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i> (Ziel des Rapamycins im Säugetier)
MUC1	Mucin 1
Nab	<i>nanoparticle albumin bound</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NCT	Nationales Zentrum für Tumorerkrankungen
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
NICN	Nicolin
NK	<i>Natural killer</i>
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungen-/Bronchialkarzinom
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death protein 1 ligand 1</i>
PET	Positronen Emissions-Tomographie
pH	Pondus hydrogenii (Potenzial des Wasserstoff)

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
Plk	Polo like Kinase
PRAME	<i>Preferentially expressed antigen in melanoma</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
RGCC	<i>Regulator of cell cycle</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonucleinsäure)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SARS-CoV	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>
SBT	<i>Sanger-sequencing-based typing</i>
SCLC	Kleinzelliges Lungen-/Bronchialkarzinom
SH3	<i>Src-homology 3</i>
SLC	<i>Solute carrier-Transporter</i>
Src	Tyrosinkinase Src (Sarcoma)
SSO	Sequenz-spezifische Oligonukleotid-typisierung
T-(Zelle)	Thymus
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TAP1	<i>transporter associated with peptides</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TJP	<i>Tight junction protein</i>
TMC	<i>Transmembrane channel-like protein</i>
TMEM	Transmembrane protein
TNM	Tumor Nodes Metastasen
TSA	Tumorspezifische Antigene
TUB1AC	Tubulin-Alpha-1C-Kette
UICC	<i>Union for international cancer control</i>
UK	<i>United Kingdom</i> (Grossbritannien)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
Vgl.	vergleiche
WHO	<i>World health organisation</i>
Wnt	<i>Wingless Int-1</i>
z. B.	zum Beispiel
ZAP70	zeta-assoziiertes Protein 70
ZO-1	Zonula Occludens Protein 1

Liste der Quellproteine

A5YKK6	CCR4-NOT transcription complex subunit 1
B9A064	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5
O00160	Unconventional myosin-I _f
O14682	Ectoderm-neural cortex protein 1
O15020	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2
O15119	T-box transcription factor TBX3
O15427	Monocarboxylate transporter 4
O60239	SH3 domain-binding protein 5
O60479	Homeobox protein DLX-3 (DLX3)
O60512	Beta-1,4-galactosyltransferase 3 (B4GALT3)
O60895	Receptor activity-modifying protein 2
O75475	PC4 and SFRS1-interacting protein
O75636	Ficolin-3
O94855	Protein transport protein Sec24D
O94915	Protein furry homolog-like
O95236	Apolipoprotein L3
O95382	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6
O95521	PRAME family member 1/13 (PRAMEF1; PRAME13)
O95810	Serum deprivation-response protein
O95994	Anterior gradient protein 2 homolog
P00325	Alcohol dehydrogenase 1B
P00451	Coagulation factor VIII
P01037	Cystatin-SN (CST1)
P02452	Collagen alpha-1(I) chain
P02751	Fibronectin
P02768	Serum albumin
P04275	von Willebrand factor
P04434	Ig kappa chain V-III region VH (Fragment)
P05388	60S acidic ribosomal protein P0
P06400	Retinoblastoma-associated protein
P06703	Protein S100-A6
P06756	Integrin alpha-V
P07327	Alcohol dehydrogenase 1A
P09237	Matrilysin
P09914	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
P0CAP1	Myocardial zonula adherens protein
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain
P12821	Angiotensin-converting enzyme
P13284	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase
P13611	Versican core protein
P17861	X-box-binding protein 1 (XBP1)
P20827	Ephrin-A1 (EFNA1)

P22223 Cadherin-3 (CDH3)
P22748 Carbonic anhydrase 4
P23381 Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic
P23458 Tyrosine-protein kinase JAK1
P23467 Receptor-type tyrosine-protein phosphatase beta
P23921 Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit
P28070 Proteasome subunit beta type-4
P29972 Aquaporin-1
P30281 G1/S-specific cyclin-D3
P31350 Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2
P33151 Cadherin-5
P35237 Serpin B6
P35968 Vascular endothelial growth factor receptor 2
P36269 Gamma-glutamyltransferase 5
P37023 Serine/threonine-protein kinase receptor R3
P40305 Interferon alpha-inducible protein 27, mitochondrial
P42766 60S ribosomal protein L35
P42830 C-X-C motif chemokine 5 (CXCL5)
P43357 Melanoma-associated antigen 3 (MAGEA3)
P43360 Melanoma-associated antigen 6 (MAGEA6)
P46977 Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A
P48960 CD97 antigen
P49755 Transmembrane emp24 domain-containing protein 10
P49918 Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
P51512 Matrix metalloproteinase-16 (MMP16)
P52789 Hexokinase-2
P55089 Urocortin (UCN)
P55196 Afadin
P56199 Integrin alpha-1
P61247 40S ribosomal protein S3a
P61647 Alpha-2,8-sialyltransferase 8F
P62081 40S ribosomal protein S7
Q00341 Vigilin
Q01543 Friend leukemia integration 1 transcription factor
Q01995 Transgelin
Q07157 Tight junction protein ZO-1
Q12965 Unconventional myosin-le
Q13200 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2
Q14392 Leucine-rich repeat-containing protein 32
Q14511 Enhancer of filamentation 1
Q14697 Neutral alpha-glucosidase AB
Q15021 Condensin complex subunit 1
Q15063 Periostin
Q15109 Advanced glycosylation end product-specific receptor

Q15293 Reticulocalbin-1
Q15599 Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF2
Q16555 Dihydropyrimidinase-related protein 2
Q2KJY2 Kinesin-like protein KIF26B
Q32P51 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2
Q495A1 T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT)
Q53EP0 Fibronectin type III domain-containing protein 3B
Q5TBA9 Protein furry homolog
Q5U651 Ras-interacting protein 1
Q5VWM6 PRAME family member 1/13 (PRAMEF1; PRAME13)
Q5VWP2 Protein FAM46C
Q63HR2 Tensin-like C1 domain-containing phosphatase
Q63ZY3 KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2
Q6UXD7 Major facilitator superfamily domain-containing protein 7 (MFSD7)
Q6UXY8 Transmembrane channel-like protein 5 (TMC5)
Q86WT6 E3 ubiquitin-protein ligase TRIM69 (TRIM69)
Q8IY63 Angiomotin-like protein 1
Q8IZF2 Probable G-protein coupled receptor 116
Q8N539 Fibrinogen C domain-containing protein 1 (FIBCD1)
Q8N766 ER membrane protein complex subunit 1
Q8NCS7 Choline transporter-like protein 5 (SLC44A5)
Q8NHW5 60S acidic ribosomal protein P0-like
Q8WUI4 Histone deacetylase 7
Q8WWI1 LIM domain only protein 7
Q92959 Solute carrier organic anion transporter family member 2A1
Q96CG8 Collagen triple helix repeat-containing protein 1 (CTHRC1)
Q96D15 Reticulocalbin-3
Q96PP8 Guanylate-binding protein 5
Q96PQ7 Kelch-like protein 5
Q99467 CD180 antigen
Q99715 Collagen alpha-1(XII) chain
Q9BSH3 Nicotin-1 (NICN1)
Q9BT22 Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase
Q9BXM0 Periaxin
Q9BYB0 SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3
Q9H0B8 Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2 (CRISPLD2)
Q9H254 Spectrin beta chain, non-erythrocytic 4
Q9H4X1 Regulator of cell cycle RGCC
Q9HCC6 Transcription factor HES-4 (HES4)
Q9NP61 ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3
Q9NTJ3 Structural maintenance of chromosomes protein 4
Q9NV64 Transmembrane protein 39A (TMEM39A)
Q9NYJ7 Delta-like protein 3 (DLL3)
Q9NZA1 Chloride intracellular channel protein 5

Q9P0J6 39S ribosomal protein L36, mitochondrial (MRPL36)
Q9P0J7 E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1 (KCMF1)
Q9UBH0 Interleukin-36 receptor antagonist protein (IL36RN)
Q9UBT7 Alpha-catulin
Q9UJF2 Ras GTPase-activating protein nGAP
Q9UKX5 Integrin alpha-11 OS=Homo sapiens GN=ITGA11 PE=1 SV=2 - [ITA11_HUMAN]
Q9UNW9 RNA-binding protein Nova-2
Q9UPQ0 LIM and calponin homology domains-containing protein 1
Q9Y256 CAAX prenyl protease 2 (RCE1)

1 Einleitung

1.1 Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome

Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC = *non-small-cell-lung-cancer*) umfassen verschiedene maligne Erkrankungen, deren gemeinsamer Ausgangspunkt das epitheliale Lungengewebe ist. Das entscheidende histologische Merkmal im Vergleich zu kleinzelligen Bronchialkarzinomen (SCLC = *small-cell-lung-cancer*) ist das primäre Erscheinungsbild unter dem Mikroskop. Während sich NSCLCs unterschiedlich präsentieren, zeigen sich die SCLCs namensgebend kleinzellig und meist oval geformt, wie sich Abbildung 1 entnehmen lässt.

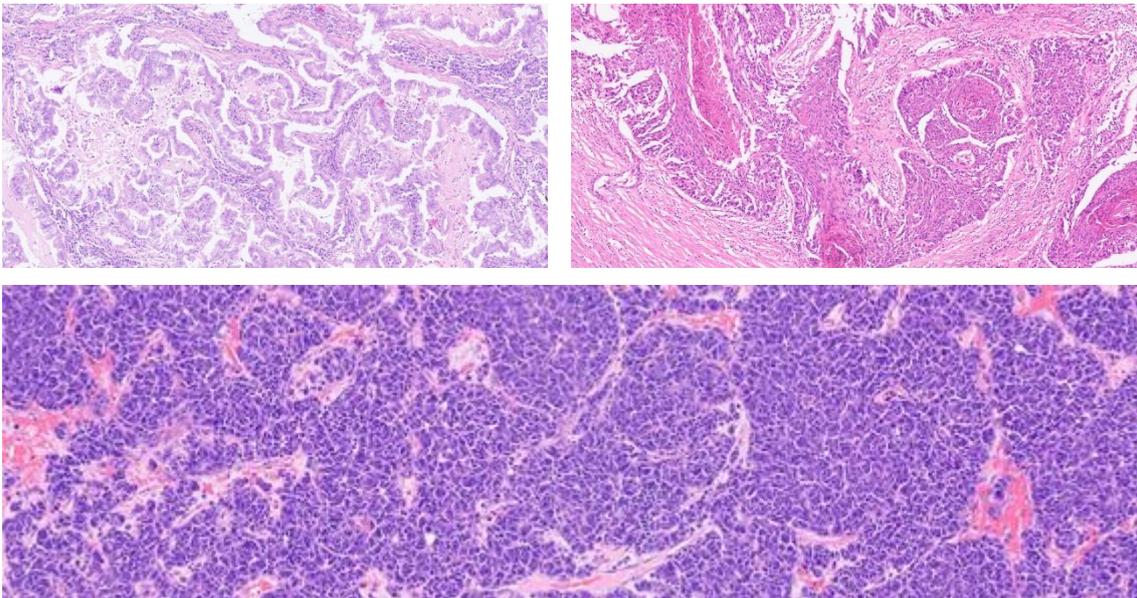


Abbildung 1: Hämatoxylin-Eisen-(HE)-Färbung: oben links: ein pulmonales Adenokarzinom, oben rechts: ein pulmonales Plattenepithelkarzinom, unten: ein kleinzelliges Bronchialkarzinom, mit freundlicher Genehmigung des Institut für Pathologie der Universität Tübingen

Die grobe Ersteinteilung in kleinzellige und nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome wurde über die Jahre beibehalten, obwohl die Gruppe der NSCLCs inzwischen in zwölf histologische Subtypen unterteilbar ist [1,2]. So gehören neben den drei anteilmäßig größten Vertretern Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und großzelligem Karzinom, auch adenosquamöse, sarkomatoide oder neuroendokrine Karzinome dazu.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf dem Adeno- und dem Plattenepithelkarzinom, da diese beiden Entitäten den größten Anteil unter den NSCLCs ausmachen und ähnliche Risikofaktoren, Therapiestrategien und Prognosen aufweisen. Die Einleitung dieser Arbeit wird sich dementsprechend auf diese beiden Subgruppen beschränken.

1.1.1 Häufigkeit in Deutschland

Das Deutsche Krebsregister veröffentlichte zuletzt im Jahr 2014 Daten zu den tumorspezifischen Inzidenzen für die Bundesrepublik Deutschland. Hier wird eine jährliche Neuerkrankungsrate an Bronchialkarzinomen von 34 560 Männern sowie 19 280 Frauen angegeben, das entspricht zusammengenommen fast 90 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner jährlich [3]. Somit erkranken fast 0,1 % der Bevölkerung pro Jahr neu an einem Bronchialkarzinom. International liegt die Neuerkrankungsrate bei jährlich über 2 Millionen Menschen [4]. Für Deutschland zeigt sich das Bronchialkarzinom somit nach Kolorektalen Karzinomen und Prostata-/Mamma-Karzinomen als dritthäufigste Tumorerkrankung.

Bei zunehmender Exposition gegenüber Risikofaktoren, anhaltend steigender Lebenserwartung und auch verbesserten Therapiemöglichkeiten stieg die Anzahl an Patienten, welche ambulant-vertragsärztlich mit Bronchialkarzinomen versorgt werden, bereits von 2008 bis 2013 um 11,1 % auf 96 908 Männer, sowie um 32,2 % auf 60 468 Frauen und ein weiterer Anstieg zeichnet sich bereits ab [5].

Unverändert verbleibt der Erkrankungsgipfel zwischen dem 55. und 75. Lebensjahr ohne größere geschlechtsspezifische Unterschiede [5].

Einen hohen Stellenwert erhält das Bronchialkarzinom durch die damit verbundene hohe Mortalitätsrate. So ist es aufgrund seiner ungünstigen Prognose bei Männern mit 24 % der Fälle die häufigste Krebstodesursache und bei Frauen mit 15 % die zweithäufigste. Umgerechnet zeigt sich eine Sterberate

von 47,6/100 000 Männern sowie 21,7/100 000 Frauen, sowie 5-Jahres-Überlebensraten von 15 % (Männer) und 20 % (Frauen) [3]. Ein entscheidender Faktor für die hohe Mortalitätsrate ist das bereits häufig fortgeschrittene Tumorstadium bei Erstdiagnose.

Während die Erkrankungsrate bei Männern mit rückläufiger Zahl der Raucher ihren Erkrankungsgipfel in den 1980er-Jahren überschritten zu haben scheint, steigt die Zahl der erkrankenden Frauen weiterhin an [6]. Maßgeblichen Anteil an dieser Entwicklung hat die zunehmende Zahl weiblicher Raucher [7].

1.1.2 Risikofaktoren

Trotz intensivierter Werbeverbote, Warnhinweise und steuerlicher Erschwernisse ist das Rauchen bei etwa 85 % der Lungenkrebstodesfälle der wichtigste Risikofaktor [8]. Nachdem bereits in den 1950er Jahren Tabakrauch als Hauptrisikofaktor des Bronchialkarzinoms beschrieben wurde, konnte seine vorrangige kanzerogene Wirkung in über einhundert Studien der WHO nachgewiesen werden. Der führende kanzerogene Faktor ist dabei in der Mutagenität des Tumorsuppressorgens p53 [9] zu finden.

Nach Zusammenfassung bis dato vorliegender Studien gibt die WHO als geschlechtsunabhängige Risikowarnung eine Korrelation der Dauer des Rauchens zur Erkrankungshäufigkeit an, die durch frühzeitigen Beginn und steigenden Umfang des Rauchens weiter erhöht wird. Positiv wirkt sich hingegen eine frühzeitige Beendigung aus [10]. Trotz klarer Warnungen rauchen in Deutschland weiterhin etwa ein Viertel der über 18-Jährigen. Jedoch zeigt sich erfreulicherweise ein deutlicher Rückgang der jugendlichen Raucher, die vormals einen europäischen Spitzenplatz innehatten [11]. Laut aktuellen Befragungen liegt die Raucherquote im Alter zwischen 12 und 17 Jahren bei ihrem historischen Tiefstand von 7 % [12]. Häufig wird dabei angenommen, dass das Inhalationsrauchen bei Zigaretten das höchste Risiko bildet [13,14]. Doch auch Passivrauchen wurde aufgrund mehrerer Studien bereits 1998 als humankanzerogen eingestuft. Auch hier spielen der Umfang sowie die Dauer

der Exposition die entscheidende Rolle [15,16]. Im Rahmen dieser Erkenntnisse wird der Nichtraucherchutz, vor allem am Arbeitsplatz, in Deutschland immer weiter ausgebaut [17].

In der beruflichen Belastung spielt jedoch nicht nur Tabakrauch der Kollegen eine Rolle. Es werden auch mit bestimmten Berufsgruppen verbundene Einwirkungen als kanzerogen betrachtet, dies gilt beispielsweise für Berufstätige im Bergbau mit erhöhter Radonexposition [18]. Auch die Strahlungsexposition, sei es im Röntgenbereich oder im Bereich erhöhter kosmischer Strahlung ist als kanzerogen anzusehen. Aufgrund der erhöhten Zahl exponierter Personen ließ sich bisher unter anderem für Feinstaub [19], Dieselmotorenemissionen [20], Asbest, künstliche Mineralfasern und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe eine Risikosteigerung nachweisen, an Bronchialkarzinomen zu erkranken. Für eine Exposition gegenüber Tonerstäuben konnte in bisherigen Studien bei normaler Exposition hingegen keine Kanzerogenität nachgewiesen werden [21].

1.1.3 Klinik

Wie ein Großteil maligner Erkrankungen zeigen sich auch Bronchialkarzinome in frühen Stadien eher symptomarm bis symptomlos. Häufig ist als frühestes klinisches Merkmal ein anhaltender trockener Husten vorhanden, der jedoch auch gehäuft im Rahmen eines Nikotinabusus vorkommen kann. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weisen jedoch etwa 90 % der Bronchialkarzinompatienten Symptome wie Husten, Gewichtsverlust, thorakale Schmerzen, Dyspnoe oder Gewichtsabnahme auf [22,23]. Im metastasierten Stadium werden diese Primärtumorsymptome durch Symptome des betroffenen Organs wie zum Beispiel Schwindel, Sehstörung oder Ikterus ergänzt.

1.1.4 Diagnostik

Die Diagnosefindung beginnt im Rahmen eines klar definierten Algorithmus (Abbildung 2) mit Anamnese und körperlicher Untersuchung und wird durch laborchemische sowie radiologische Maßnahmen ergänzt. Zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose ist die histologische Sicherung erforderlich. Aufgrund vielfältiger Weiterentwicklungen in diesem Bereich ist inzwischen meist eine genaue Diagnosestellung möglich [24].

Eine zentrale Rolle spielt in diesem Zusammenhang die Bronchoskopie, die bei geringem Letalitätsrisiko unterstützt durch endobronchiale Ultraschalldiagnostik eine zuverlässige Möglichkeit der Materialgewinnung bietet [25,26].

Nach gesicherter Diagnose ist eine Ausbreitungsdiagnostik erforderlich. Dabei werden invasive Methoden (z. B. Mediastinoskopie) mehr und mehr durch bildgebende Verfahren abgelöst oder ergänzt [27]. Eine PET-CT-Diagnostik vor kurativer Therapie ist in Lungenkrebszentren bereits als Standard anzusehen.

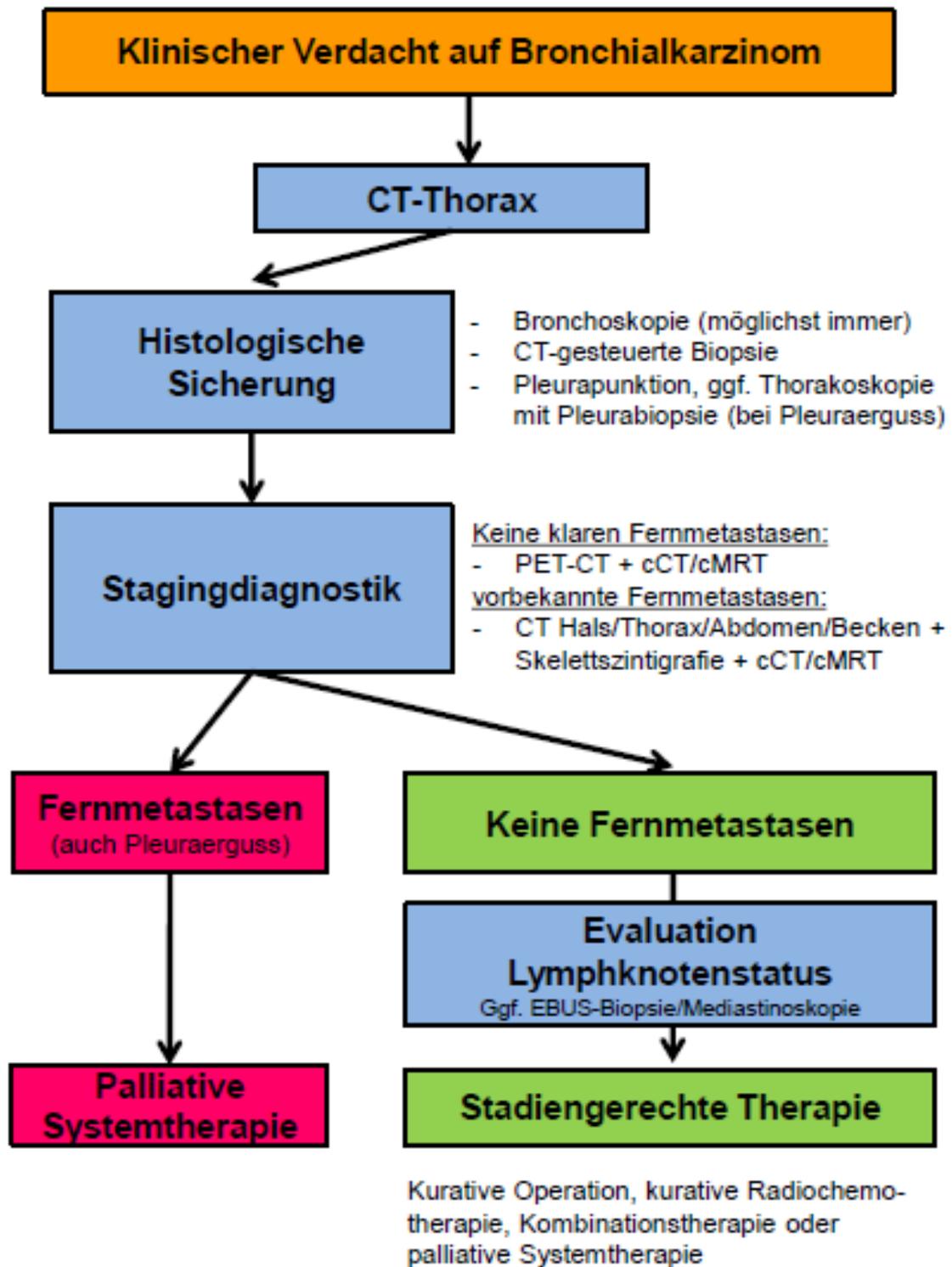


Abbildung 2: Diagnostischer Algorithmus für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (*IIIA₁₋₄ nach Robison-Klassifikation) orientierend an Leitlinienprogramm Onkologie [6]

1.1.4.1 Staging

Zur Förderung der Übersichtlichkeit ist wie bei den meisten übrigen Tumorarten eine Einteilung nach TNM sowie UICC 8, wie in den nachfolgenden Tabellen 1-3 dargelegt, üblich.

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

Tabelle 1: Tumorgroße nach TNM; adaptiert nach: Leitlinienprogramm Onkologie [6], [28]

Stadium	Kurzbeschreibung
N0	keine Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in ipsilateralen, peribronchialen und / oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und / oder intrapulmonalen Lymphknoten oder direkte Invasion dieser Lymphknoten
N2	Metastase in ipsilateralen mediastinalen und / oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastase in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsi- oder kontralateral tief zervikalen, supraclaviculären Lymphknoten

Tabelle 2: Lymphknotenmanifestation nach TNM; adaptiert nach: Leitlinienprogramm Onkologie [6], [28]

Stadium	Kurzbeschreibung
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
• M1a	<ul style="list-style-type: none"> • separater Tumorknoten in einem kontralateralen Lungenlappen • Pleura mit knotigem Befall • maligner Pleuraerguss • maligner Perikarderguss
• M1b	<ul style="list-style-type: none"> • isolierte Fernmetastase in einem extrathorakalen Organ
• M1c	<ul style="list-style-type: none"> • mehrere Fernmetastasen (> 1) in einem oder mehreren Organen

Tabelle 3: Fernmetastasierung nach TNM; adaptiert nach: Leitlinienprogramm Onkologie [6], [28]

1.1.5 Therapie und Prognose

Die Therapie richtet sich nach Art, Größe und Ausbreitungsstatus des jeweiligen Tumors und ist ein multimodales Konzept mit Einbezug verschiedener Fachrichtungen. Die Einteilung erfolgt auf der Grundlage des histologischen Ergebnisses, sowie des invasiven und nicht-invasiven Stagings.

1.1.5.1 Kurative Therapien

Etwa ein Drittel der Primärfälle kann in einem frühen, operablen Stadium diagnostiziert werden [29], wobei eine alleinige Operation mit systematischer Lymphadenektomie nur in etwa 20 % der Primärfälle ausreichend ist. Weitere 10 % können mit Hilfe multimodaler Konzepte aus neoadjuvanter

Radiochemotherapie [30] oder adjuvanter Chemotherapie [31] einer operativen Versorgung zugänglich gemacht werden.

Weitere 20 % sind aufgrund Tumorausdehnung oder funktioneller Inoperabilität einer stereotaktischen Radiatio [32] oder definitiven Radiochemotherapie [33] zugänglich.

Nahezu die Hälfte der Primärfälle wird jedoch im bereits metastasierten Stadium diagnostiziert. Daher kommt trotz zunehmender individueller Ansatzpunkte bei Oligometastasierung [34] der palliativen Systemtherapie eine entscheidende Rolle zu.

1.1.5.2 Palliative Therapie

1.1.5.2.1 Klassische Chemotherapie

Klassische Therapien des metastasierten NSCLC basieren auf einer platinhaltigen Komponente in unterschiedlicher Kombination [35]. Die vorrangig verwendeten Kombinationen bestehen aus Pemetrexed, Paclitaxel, nab-Paclitaxel, Vinorelbin oder Gemcitabin [36]. Im Rahmen multipler Zulassungsstudien der letzten Jahre ist inzwischen jedoch ein deutlich differenzierteres Vorgehen etabliert. So richtet sich die palliative Systemtherapie neben Performancestatus und Begleiterkrankungen vorrangig nach der erweiterten histologischen Diagnostik.

Eine primäre Therapieeinteilung erfolgt bereits aufgrund des histologischen Subtyps. So sind bei Nicht-Plattenepithelkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen unterschiedliche Herangehensweisen erforderlich [6]. Bei der Erstlinientherapie sind bereits verschiedene zielgerichtete Therapien etabliert, deren Einsatz sich nach immunhistochemischer und molekulargenetischer Diagnostik richtet. Ein Überblick über Relevanz und Einsatzmöglichkeit soll anhand der jeweiligen Zielstrukturen gegeben werden.

1.1.5.2.2 Immuntherapien

Die bis dato wichtigste Rolle im Bereich der Immuntherapien beim NSCLC spielt die Checkpoint-Inhibition mittels Inhibition von *Programmed Cell Death Protein 1* (PD-1) oder von *Programmed Cell Death – Ligand 1* (PD-L1) (Abbildung 3). Die immunhistochemische Bestimmung von PD-L1 auf der Zelloberfläche sollte inzwischen bei allen Erstdiagnosen eines NSCLC standardmäßig durchgeführt werden.

Grundlage der Therapieoptionen bildet die Beobachtung, dass durch PD-1 eine Dämpfung der Immunantwort ausgelöst wird [37]. Für dessen Entdeckung Tasuku Honjo 2018 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde.

PD-1 wird von aktivierten T-Zellen exprimiert und führt über Bindung an tumorzellständiges PD-1 zur T-Zell-Erschöpfung. CTLA-4 konkurriert mit CD28 um B7-Liganden und führt bei Aktivierung zum Rückgang von T-Zell-Proliferation und Aktivität. Blockade von CTLA-4 und PD-1 bzw. PD-L1 regt T-Zellen zur Immunantwort an. Einen schematischen Ablauf der PD-1 bzw. PD-L1-Inhibition liefert Abbildung 3.

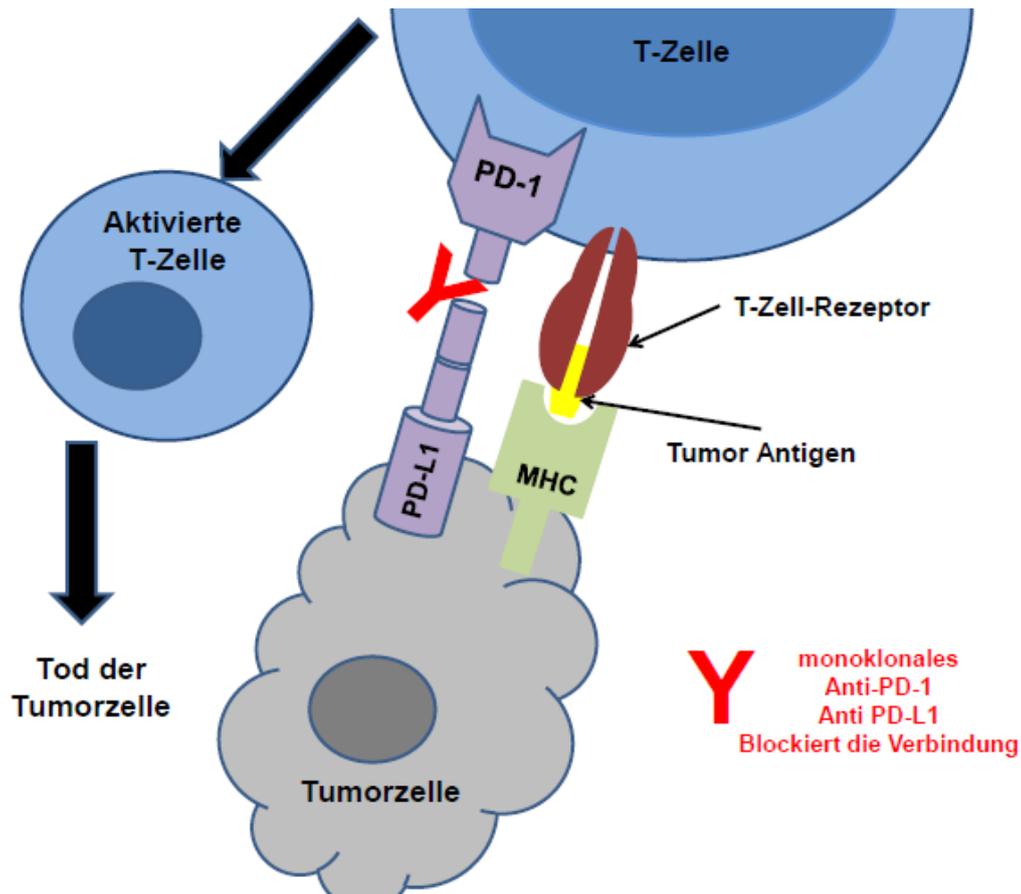


Abbildung 3: Wirkweise der Checkpoint-Inhibitoren; orientierend an: Raman et al. [38]

Maßgebliche Erfolge der Therapie spiegelt dabei vor allem die KEYNOTE-024-Studie mit Pembrolizumab bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (Plattenepithel- und Nicht-Plattenepithelkarzinome) ohne Treiber Mutationen und mit hoher Expression des PD-1-Liganden $\geq 50\%$ wider. Hier zeigten sich unter Therapie mit dem PD-1-Inhibitor Pembrolizumab ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben bei längerer progressionsfreier Zeit und insgesamt deutlich besserer Verträglichkeit gegenüber klassischer Chemotherapie [39].

Aber auch bei NSCLCs ohne hohe PD-L1-Expression zeigen Immuntherapien überzeugende Möglichkeiten. So konnte die CHECK-MATE057 zeigen, dass durch den PD-1-Inhibitor Nivolumab das Gesamtüberleben im Vergleich zur klassischen Zweitlinientherapie mit Docetaxel um etwa ein Drittel gesteigert werden konnte [40]. Entsprechend dieser Ergebnisse wurde die zugelassene

Therapie des NSCLC im Stadium IV in den letzten Jahren deutlich erweitert und gehört inzwischen auch bei fehlender PD-L1-Expression im Rahmen einer Triple-Therapie zum Erstlinienstandard [41,42].

Nicht nur die PD-1-Inhibition, sondern auch der Ansatzpunkt an der PD-L1-Inhibition, zeigt signifikante Verbesserungen und Erweiterungen zugelassener Therapiealternativen. So zeigte Atezolizumab im Rahmen der OAK-Studie ebenfalls eine deutlich verbesserte Gesamtüberlebensrate [43] und kommt als weitere Therapiealternative in Frage.

Die größte Rolle in Bezug auf die PD-L1-Inhibition spielt in der klinischen Praxis bis dato für das NSCLC Durvalumab als Erhaltungstherapie nach Radiochemotherapie. Entsprechend der Daten der PACIFIC-Studie konnte das progressionsfreie Überleben von durchschnittlich 5,6 auf 17,2 Monate gesteigert werden [44] und kann somit als erste wirkliche Entwicklung im Rahmen der Adjuvanz betrachtet werden.

Vor allem bei Patienten mit geringer klinischer Einschränkung und insgesamt gutem Allgemeinzustand kommt auch eine Vierfachtherapie in Frage. So konnte die IMpower150-Studie zeigen, dass eine Kombination aus klassischer Systemtherapie (Carboplatin/Paclitaxel), Checkpoint-Inhibition (Atezolizumab) und Blockade des endothelialen vaskulären Wachstumsfaktors (Bevacizumab) in der Erstlinientherapie das mediane Gesamtüberleben signifikant steigern konnte [45]. Grundlage bilden dabei mehrere Eigenschaften der Angiogenesehemmung.

1.1.5.2.3 Angiogenesehemmer

Bei vielen Krebsarten spielt eine Erhöhung des endothelialen vaskulären Wachstumsfaktors (VEGF) eine große Rolle bei Rezidiven, Metastasierung und Tumorwachstum, so auch beim NSCLC [46,47]. Der humanisierte monoklonale Antikörper Bevacizumab bindet dabei an VEGF und verhindert somit eine Signalübertragung des Wachstumsanreizes [48].

In Verbindung mit einer klassischen Systemtherapie (Carboplatin/Paclitaxel) zeigte sich eine signifikante Verbesserung des medianen Gesamtüberlebens bei jedoch deutlichem Risikoprofil insbesondere bezüglich pulmonaler Hämorrhagie.

Auch in der Zweitlinientherapie kommen Angiogenesehemmer zum Einsatz, so zeigen der Anti-VEGF-Rezeptor2-Antikörper Ramucirumab oder der orale Angiokinase-Inhibitor Nintedanib in Kombination mit Docetaxel verbesserte Wirksamkeiten verglichen mit alleiniger Chemotherapie [49,50].

Im Rahmen der oben erwähnten Vierfachtherapie macht man sich jedoch eine Nebenwirkung der Angiogenesehemmung zu nutze. So steigert anti-VEGF die intratumorale T-Zell-Invasion und unterstützt in Kombination mit einer PD-L1-Inhibition die antigen-spezifische T-Zell-Migration [51].

Die Vierfachtherapie stellt somit aktuell bei NSCLCs ohne Treibermutationen oder hohe PD-L1-Expression die wirksamste zugelassene Therapiealternative allerdings auch mit dem höchsten Nebenwirkungspotenzial dar.

Die bis dato weitreichendsten Therapieerfolge bei entsprechenden Voraussetzungen zeigen jedoch Therapien bei bestimmten Treibermutationen.

1.1.5.2.4 Zielgerichtete Therapie

Die molekularpathologische und immunhistochemische Diagnostik sogenannter Treibermutationen hat sich in den letzten Jahren zur Standarddiagnostik entwickelt, da eine zielgerichtete Therapie für die betroffenen Patienten eine Verbesserung der Ansprechrate, der progressionsfreien Zeit und der Gesamtüberlebenszeit bedeutet [52]. Unter Treibermutationen versteht man molekulare Veränderungen, die eine entscheidende Rolle für das maligne Wachstum von Zellen spielen. Insgesamt kommen diese bekannten Treibermutationen jedoch nur bei 13-15 % der in Deutschland diagnostizierten NSCLCs vor, wobei der Anteil von Plattenepithelkarzinomen mit

Treibermutationen sehr gering ist [53]. Einen Überblick über die Wirkweise soll Abbildung 4 geben.

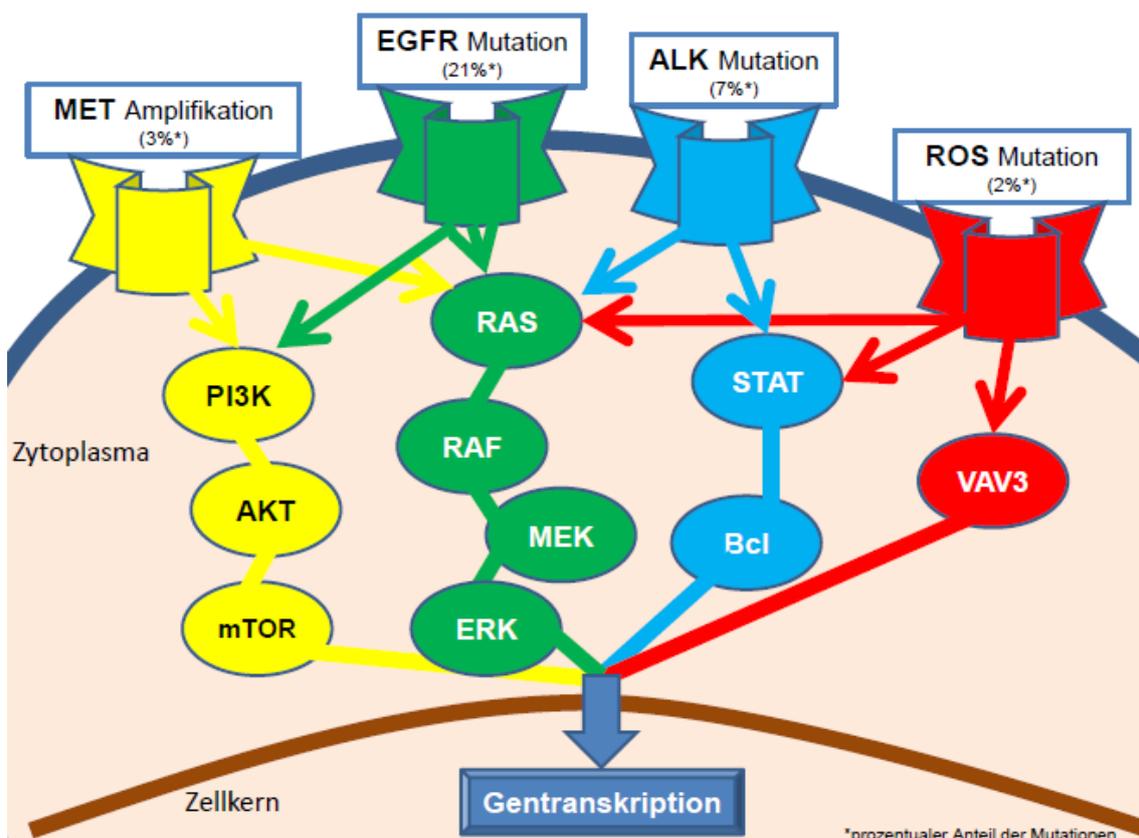


Abbildung 4: Wirkungsweise der Treibermutationen beim NSCLC; orientierend an: Länger, Florian, et al. [54,55]

Den prozentual größten Anteil der detektierten Treibermutationen beim Adenokarzinom der Lunge nimmt die KRAS-Mutation ein. Da für diese mutmaßlich aufgrund der komplexen Struktur sowie des dynamischen Wachstumsverhaltens bis dato jedoch noch keine von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) zugelassene Therapiemöglichkeit besteht, wird in dieser Arbeit auf eine detailliertere Beschreibung verzichtet. Einen weiteren Überblick über das Verteilungsmuster diagnostizierter Treibermutationen liefert Abbildung 5.

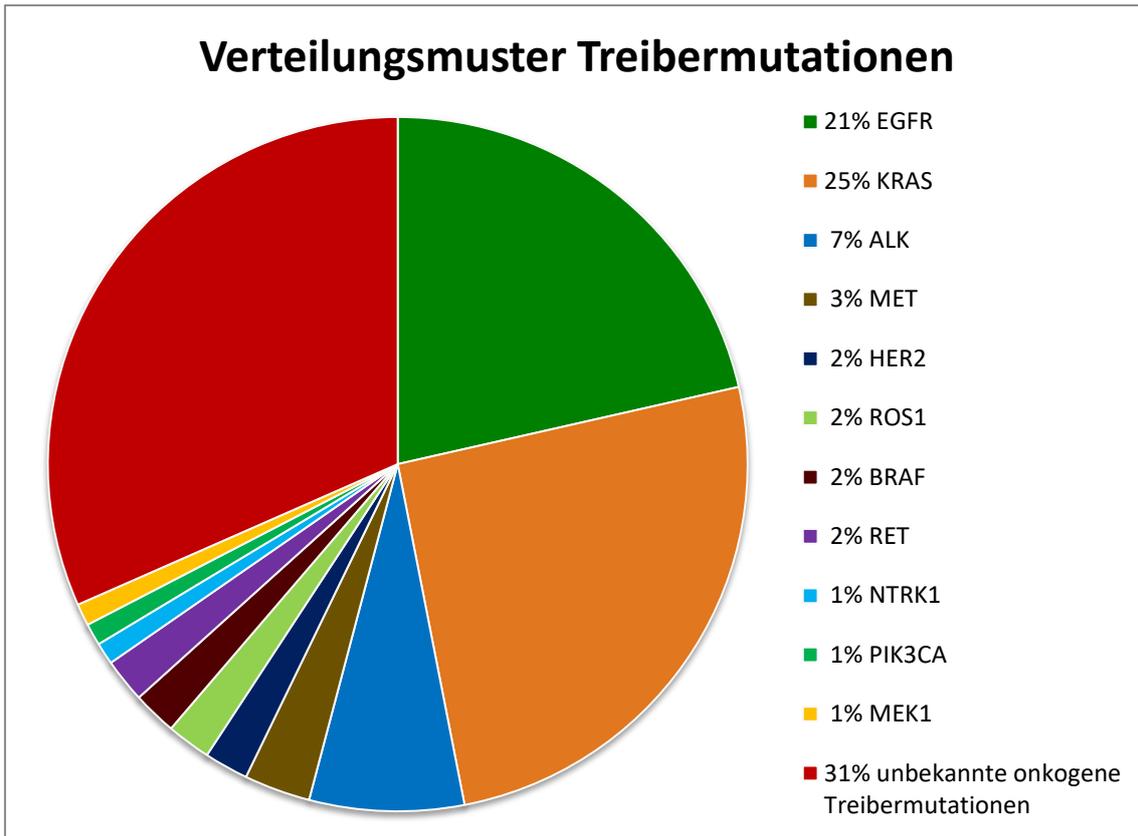


Abbildung 5: Verteilungsmuster der Treibermutationen; orientierend an: Hirsch, et al. [56]

Entsprechend zugelassener Therapiemöglichkeiten und prozentualer Verteilungshäufigkeit spielen die Therapien bei EGFR-Mutation und ALK-Fusion die größte Rolle in der Therapie und sollen deshalb näher vorgestellt werden.

1.1.5.2.4.1 EGFR-Mutation

Als häufigster Angriffspunkt einer zielgerichteten Therapie des NSCLC zeigt sich in etwa 12 % der Fälle eine EGFR-Mutation. Den Großteil machen hierbei Mutationen des Exon 19 und 21 aus, jedoch kommen auch Mutationen im Exon 18 und 20 vor [52]. Mittels Hemmung des Rezeptors für den epithelialen Wachstumsfaktor (EGFR) unterbinden die Tyrosinkinaseinhibitoren eine intrazelluläre Weiterleitung der Signale [57].

Seit Etablierung der Therapie durch den Erstgenerations-EGFR-Inhibitor Erlotinib anhand Daten der OPTIMAL-Studie, welche einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Carboplatin/Gemcitabin zeigte [58], kann die zielgerichtete Therapie EGFR-mutierter Adenokarzinome als Erfolgsgeschichte betrachtet werden. So bringt neben den EGFR-Inhibitoren der ersten Generation (Erlotinib und Gefitinib) vor allem für EGFR-Exon 19-mutierte Adenokarzinome der EGFR-Inhibitor der zweiten Generation (Afatinib) entsprechend Daten der LUX Lung 3 & 6-Studie einen signifikanten Überlebensvorteil [59].

Ein weiterer Benefit der EGFR-Inhibition konnte insbesondere für den EGFR-Inhibitor der dritten Generation Osimertinib in der FLAURA-Studie nachgewiesen werden. Es zeigt sich eine signifikant verbesserte ZNS-Gängigkeit, sodass sich die Möglichkeiten ergibt, eine palliative Radiatio unter Umständen zurückzustellen [60]. Und auch Dacomitinib erweitert entsprechend Daten der ARCHER 1050-Studie die Therapiemöglichkeiten mittels EGFR-Inhibition [61].

Kombinationstherapien sind bis dato nicht etabliert, werden jedoch im Rahmen von Studien wie beispielsweise der EATON-Studie untersucht [62].

1.1.5.2.4.2 ALK-Translokationen

Als zweithäufigste therapierelevante Treibermutation zeigen sich in etwa 4 % der Fälle Translokationen im anaplastic lymphoma kinase-Gen (ALK) [52]. ALK-Inhibitoren führen durch Hemmung der Tyrosinkinase ALK ebenfalls zur intrazellulären Unterbrechung der Signalweiterleitung bezüglich Zellvermehrung und Gefäßneubildung [63].

Nachdem durch den ALK-Tyrosinkinase-Inhibitor der ersten Generation Crizotinib entsprechend Daten der PROFILE 1007 & 1014 eine ALK-Inhibition etabliert wurde [64,65], erweitern die ALK-Inhibitoren der nächsten Generation

Ceritinib durch die ASCEND-4-Studie [66] und Alectinib entsprechend der ALEX-Studie [67] die Möglichkeiten.

Ähnlich der EGFR-Inhibitoren wird auch hier mit den Generationen eine Verbesserung der ZNS-Gängigkeit deutlich [67].

Weitere Möglichkeiten im Sinne einer Stufentherapie bieten Brigatinib [68] und Lorlatinib [69].

1.1.5.2.4.3 Übersicht

Eine weitere Übersicht über zugelassene und in Studien befindliche zielgerichtete Therapeutika gibt die Tabelle 4.

Target	EGFR	ALK/EML-4	ROS1	BRAF	MET	RET	NTRK1/2/3	HER2
Zugelassen laut EMA	Gefitinib Erlotinib Afatinib Dacomitinib Osimertinib	Crizotinib Alectinib Ceritinib Brigatinib Lorlatinib	Crizotinib Entrectinib	Dabrafenib + Trametinib		Selpercatinib	Entrectinib	
	Nazartinib		Ceritinib Lorlatinib Cabozantinib Entrectinib Roprectinib DS-6051b	Vemurafenib	Crizotinib Cabozantinib Capmatinib Savolitinib Tepotinib Merestinib Glesatinib	Cabozantinib Vandetanib Sunitinib Lenvatinib Alectinib Ponatinib BLU-667 LOXO-292 RXDX-105	Larotrectinib Loxo-195 Cabozantinib DS-6051b Repotrectinib	Neratinib +/- Temsirolimus Afatinib Dacomitinib Poziotinib Pyrotinib TAK-788 Trastuzumab TDM-1 DS8201a
Weitere Ansatzpunkte	ERBB3, KRAS, NRG1							

Tabelle 4: Übersicht zugelassener und in Studien befindlicher zielgerichteter Therapeutika Stand 11/2021

In den letzten Jahren haben sich viele Therapieentwicklungen mit hohem Benefit für Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen ergeben [70]. Eine entscheidende Rolle spielt in vielen Therapieansätzen das Immunsystem. Dies soll nun in einem kurzen Überblick dargestellt werden.

1.2 Immunsystem

Jeder Körper muss versuchen sich gegen Angriffe zu schützen, dies gilt sowohl für Angriffe von außen, beispielsweise durch Bakterien oder Viren, aber auch gegen Angriffe von innen, das heißt durch eigene, aber schädigend wachsende Zellen. Nach mechanischen und chemischen Barrieren wie der Haut oder der Magensäure spielt dabei das Immunsystem eine entscheidende Rolle. Hat der „Feind“ erst einmal die schützende Barriere überwunden, oder kommt er gar aus dem Körper selbst, so ist es die Aufgabe des Immunsystems, den Körper vor der Ausbreitung zu schützen und ein Überleben des Erregers zu verhindern. Es stehen dafür verschiedene Werkzeuge zur Verfügung, welche im Rahmen eines komplizierten Systems interagieren und kooperieren [71].

Die erste Schwierigkeit tritt dabei bereits zu Beginn eines jeden Abwehrprozesses auf und es stellt sich die zentrale Frage der Erkennung von Pathogenen. Sind diese einmal erkannt, so ist es ein ausgeklügeltes Zusammenspiel der sogenannten nicht-adaptiven Abwehr – bestehend aus Phagozytose, Entzündung und Zellyse- sowie spezifischer Immunantwort – mit spezifischer Pathogenerkennung und Etablierung eines Gedächtnisses. Hauptbestandteil der nicht-adaptiven Immunabwehr stellen dabei Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen und das Komplementsystem dar. Sie sind bereits bei Geburt aktiv und bedürfen keiner separaten „Programmierung“, weshalb man auch von angeborener Immunabwehr spricht. Diese Programmierung und Ausbildung eines Gedächtnisses spielt hingegen die zentrale Rolle bei der adaptiven oder auch erworbenen Immunantwort, nur durch sie ist eine genaue Pathogenerkennung möglich. Hauptakteur sind in diesem Fall Lymphozyten, die durch entsprechenden Antigenkontakt in Aktion treten [71]. Nach Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen kommt es zur Proliferation des bestimmten Zellklons und in der Folge zur Aktivierung einer ganzen Abwehrkaskade. Im Knochenmark (bone marrow) ausgebildete B-Zellen produzieren Antikörper, welche extrazelluläre Pathogene binden. Im Thymus ausgebildete T-Zellen können dann andere Abwehrbestandteile aktivieren und infizierte bzw. entartete

Zellen eliminieren. Um dann die Abwehr für einen erneuten Angriff zu verbessern, differenziert ein Teil dieser B- und T-Zellen zu Gedächtniszellen. In Kombination bilden diese Abwehrmechanismen eine Verteidigungslinie hoher Spezifität und Schlagkraft.

1.2.1 Geschichtliche Aspekte

Mit der Erforschung dieser Mechanismen und ihrer möglichen Nutzbarmachung für eine Optimierung unserer Gesundheitsforschung beschäftigt sich die medizinische Fachrichtung der Immunologie. Obwohl bereits im antiken Griechenland um 429 v. Chr. durch Thucydides eine grobe Beschreibung einer Immunität nach stattgehabter Virusinfektion bekannt ist [72] und auch im Orient und Asien eine frühe Form der Vakzinierung gegen Pocken schon im Mittelalter praktiziert wurde [73], so gilt weiterhin Sir Edward Jenner als Vater der Immunologie. Nach Aufstellung einer Theorie der adaptiven Immunität von Avicenna im elften Jahrhundert [73] war Jenner seinerzeit der erste Forscher, der nachweisbar eine Vakzinierung vornahm, um Patienten zu immunisieren [74]. Im Rahmen dieser Entdeckung entstanden weitere Impfungen, vor allem gegen Bakterien und Viren, deren Bedeutung heute zwar von manchen verkannt wird, die jedoch weiterhin große Erfolge zeigt. Im Laufe der Jahrzehnte entwickelte sich häufiger die Idee auch andere Erkrankungsarten durch eine Immunisierung des Körpers abzumildern, zu bekämpfen oder zu verhindern. Die erste Strategie der Krebstherapie verfolgte dabei ab Mitte des 19. Jahrhunderts der Bonner Chirurg Wilhelm Busch (1866) und nachfolgend William Coley (1891), der mit Hilfe einer massiven Entzündungsreaktion eine Heilungsrate von 10 % bei Sarkomen erreichen konnte [75-78]. Die erste direkte These zur Immunüberwachung „aberrierender Keime“ stammt jedoch von Paul Ehrlich und wurde im letzten Jahrhundert häufig aufgegriffen, ausformuliert, verfeinert und für weitere Entwicklungen genutzt [73,79].

So fällt auch im Rahmen der Liste medizinischer Nobelpreisträger die bedeutende Erforschung des menschlichen Immunsystems mit Darlegung ihrer

unterschiedlichen Mechanismen ins Auge [73]. Detaillierter dargelegt wird nun aufgrund ihrer Bedeutung für die nachfolgende Arbeit vor allem der Ablauf mit Antigenpräsentation durch veränderte Zellen, Immunsuppression und Tumorprogression bei der Entstehung von Malignomen, sowie eine kleine Übersicht möglicher Ansatzpunkte für eine therapeutische Intervention.

1.2.2 Aufbau und Funktion des MHC-Moleküls

Die Führungsrolle bei der zellulären Immunantwort übernehmen die T-Lymphozyten, sie erkennen Antigene, die ihnen durch betroffene Zellen präsentiert werden. Die Erkennung erfolgt über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC), der als gleichnamige Gengruppe auf dem menschlichen Chromosom 6 zu finden ist [80] und hochpolymorphe, membrangebundene Glykopeptide codiert [81]. Über die so entstehende polygene und polymorphe Glykopeptidstruktur, auch HLA-Molekül genannt, werden T-Zellen Peptidfragmente präsentiert. Diese entstehen im Zellinneren oder werden über vorherige Internalisierungsprozesse verfügbar gemacht und geben so einen Überblick über Abläufe im Zellinneren. Kommt es nun zum Kontakt zwischen T-Zell-Rezeptor (TCR) und MHC-Ligand, so wird mit Hilfe verschiedener Co-Rezeptoren die T-Zell-Aktivität geregelt [71].

1.2.3 Aufbau und Funktion von HLA-Klasse I

Nach bisherigem Wissensstand sind mit HLA-A, -B und -C drei MHC-Klasse I-Genprodukte mit Expression auf fast allen menschlichen Zellen bekannt. Die Bedeutung von HLA-E, HLA-F und -G ist jedoch noch nicht eindeutig belegt, da sie wenig polymorph auftreten und nicht auf allen Geweben exprimiert sind [82-84]. Die Expression und Vererbung der klassischen HLA-Typen erfolgt kodominant. Durch den ausgeprägten Polymorphismus und das Vorhandensein zweier Allele werden bis zu sechs unterschiedliche klassische HLA-Klasse I-Moleküle exprimiert. Dies ermöglicht aufgrund der Vielfalt an Möglichkeiten eine bessere Spezifität des Einzelnen.

Biochemisch gesehen bestehen Moleküle des MHC-I-Komplexes aus zwei Polypeptidketten, das heißt einer größeren α -Kette und einer kleineren Kette, dem β_2 -Mikroglobulin. Die schwerere (45kDa) und im MHC-Lokus kodierte α -Kette ist als Glykoprotein in der Zellmembran verankert [85]. Das leichtere (12kDa) β_2 -Mikroglobulin ist nicht im MHC-Lokus (sondern Chromosom 15) kodiert, nicht polymorph und löslich angelagert [86]. Die zur Peptidbindung erforderliche Struktur wird durch die Domänen α_1 und α_2 der aus insgesamt drei Domänen bestehenden α -Kette gebildet [87]. Diese Bindung der HLA-Klasse I-Moleküle ist für Peptide bestehend aus 8-11 Aminosäuren geeignet [88,89]. Gebunden wird das Peptid über entsprechende Verankerungsreste mit Hilfe von Wasserstoffbrücken an den unveränderten Bereichen der Peptidbindungsstelle. Zusätzlich führen nichtkovalente Wechselwirkungen im polymorphen Bereich der Peptidbindungsstelle zu einer stabilen Anhaftung [90-92]. Da HLA-Allele eine typische Peptidbindungsstelle besitzen, können Peptide mithilfe ihrer Sequenz einem HLA-Allel zugeordnet werden [93,94]. Präsentiert werden $CD8^+$ -T-Zellen vor allem Peptide, die im Zellinneren entstehen, sogenannte Selbstantigene sowie Tumor- oder Viruspeptide. Die Erkennung dieser Peptide aktiviert unter Berücksichtigung weiterer Mechanismen die T-Zelle und deren zytotoxische Effekte. Werden zu wenige oder keine HLA-Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert, so aktiviert dies NK-T-Zellen, die ebenfalls zum Zelltod führen [71].

1.2.4 Aufbau und Funktion von HLA-Klasse II

Anders als HLA-Klasse I Moleküle werden HLA-Klasse II-Moleküle vor allem durch spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen exprimiert. Zu diesen gehören neben Monozyten und Makrophagen auch dendritische Zellen, B-Zellen und aktivierte T-Lymphozyten [71]. Analog der HLA-Klasse I-Moleküle bestehen die der Klasse II aus einer α - und β -Kette, die nicht kovalent gebunden, jedoch beide die Zellmembran durchspannen und jeweils in zwei Domänen unterteilt werden. Der peptidbindende Bereich wird durch die Untereinheiten α_1 und β_1 gebildet und bindet im Gegensatz zu HLA-Klasse I-

Komplexen nicht über die Peptidenden, sondern lagert Peptide in ausgestreckter Konformation längs an. Dies ermöglicht variierende Peptidlängen von mindestens 13 Aminosäuren. Da die Bindung jedoch über Seitengruppen und verschiedene Interaktionen erfolgt, erschwert dies die Möglichkeit der Vorhersage, welches Peptid an welches HLA-Klasse I-Molekül binden kann [71,90,91,95]. Über die Bindung des Peptides wird dieses CD4-positiven T-Helferzellen präsentiert, sodass sie nach Erkennung von Peptid und HLA-Klasse II-Molekül ihr immunogenes Potenzial über Zytokinausschüttung entfalten können [85].

1.2.5 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation auf HLA-Klasse I-Molekülen

Die Präsentation auf MHC-Klasse I-Molekülen ist hauptsächlich zytosolischen Proteinen vorbehalten. Um diese für eine Präsentation gegenüber den CD8⁺-Zellen verfügbar zu machen, werden sie für das Proteasom kenntlich gemacht [96] und im Proteasom proteolytisch in Aminosäuregruppen gespalten [97]. Nach weiteren proteasenabhängigen Modifikationen im Zytosol und Anpassung im Endoplasmatischen Retikulum [98] können die entstandenen Peptide schließlich mit Hilfe des Peptidbeladungskomplexes mit den präsentierenden MHC-Molekülen verbunden werden [99]. Die so entstandene fertige Kombination wird mithilfe des Golgi-Apparates auf der Zellmembran präsentiert. Das Verhältnis von initial durch Spaltung entstandenen Peptiden zu letztendlich präsentierten Peptiden ist jedoch deutlich unter ein Prozent [100].

Diese Oberflächenpeptide konnten vor etwa 30 Jahren (1990) erstmalig durch Aufreinigung und Edman-Abbau von Tumorzellreihen sequenziert werden. Bekannt war zu dieser Zeit bereits, dass T-Zellen Peptidfragmente aus Proteinen erkennen können.

1.2.6 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation auf HLA-Klasse II-Molekülen

Spezielle Antigen-präsentierende Zellen sind in der Lage, Proteine endozytotisch aufzunehmen und über MHC-Klasse II-Moleküle der Erkennung fassbar zu machen. Nachdem Proteine endozytotisch aufgenommen wurden, werden diese ins endosomale Kompartiment, auch MHC Klasse II-Kompartiment (MIIC), transportiert [101]. Hier erfolgt durch Proteasen und Cadherine die Proteolyse. Über den Golgi-Apparat gelangen die im Endoplasmatischen Retikulum hergestellten MHC-Klasse II-Moleküle in den MIIC. Eine zwischenzeitlich invariant stabilisierende Kette wird im sauren Milieu erst reduziert und dann durch Peptide höherer Affinität ersetzt, was den MHC-Klasse II-Peptid-Komplex vervollständigt [102-104]. Eine unterstützende Rolle in diesem Peptidaustausch durch Steigerung der Dissoziation spielt HLA-DM [105,106]. Jedoch werden nicht nur endozytotisch aufgenommene Proteine präsentiert, auch zytosolische Peptide können nach Autophagie präsentiert werden [107].

1.2.7 T-Zell-Rezeptor und T-Zell-Aktivierung

Um körpereigene Zellen von fehlerhaften Zellen anhand der MHC-präsentierten Peptide zu unterscheiden, besitzen T-Zellen einzigartige Rezeptoren. Bis zu 30 000 dieser Antigenrezeptoren trägt jede T-Zelle auf ihrer Oberfläche [108]. T-Zellrezeptoren teilen sich in zwei verschiedene Klassen. Die Einteilung erfolgt mithilfe der bildenden Strukturen, so bestehen α : β -T-Zell-Rezeptoren aus einer α -Kette sowie einer β -Kette [109]. Die γ : δ -T-Zell-Rezeptoren setzen sich folglich aus einer γ - und einer δ -Kette zusammen [110-112]. Der Anteil von γ : δ -T-Zellen macht nach bisherigen Erkenntnissen zwischen 1 % und 10 % der T-Zellen aus [113,114]. Die Funktion ist nicht vollständig klar, vermutet wird die Erkennung vor allem mikrobieller Antigene [115].

Der durch seine Mitarbeit im Rahmen der Erkennung maligner Zellen wichtige α : β -T-Zell-Rezeptor besteht aus α - und β -Peptidketten, die durch eine

Disulfidbrücke verbunden sind. Er besitzt eine konstante Region sowie eine variable Antigenbindungsstelle. Verankert sind beide Ketten transmembranär durch eine hydrophobe Domäne, die in einem kurzen intrazellulären Rest endet [116,117]. Der Aufbau mit variabler Region ermöglicht eine große Varianz an jeweiliger Spezifität, welche in der Entstehung durch somatische Rekombination festgelegt wird. Aufgrund der so möglichen Diversität kann dies auch bei einer limitierten Anzahl der codierenden Gene erreicht werden [110,118].

Zur nachfolgenden Signalübertragung und Aktivierung der Lymphozyten ist jeder Antigenrezeptor mit Cofaktoren ausgestattet. Dieser Cofaktor des T-Zell-Rezeptors wird durch den CD3-Komplex gebildet, welcher aus jeweils einer γ - und δ -Untereinheit sowie zwei ϵ -Untereinheiten besteht [119-121]. Dieser bildet mit dem T-Zellrezeptor und einer ζ -Kette den TCR-CD3-Komplex.

1.2.8 Erkennung und Signaltransduktion

Die letztendliche Erkennung erfolgt über den CD4- beziehungsweise CD8-Rezeptor, wobei MHC II-Moleküle durch CD4 und MHC I-Moleküle durch CD8 erkannt werden. Diese für die passende Verbindung entscheidende Interaktion soll nun am Beispiel der MHC I und TCR-Interaktion dargestellt werden.

Die TCR- und Peptid-MHC-I-Komplex-Bindung ist relativ schwach bei einer Affinität von 1-100 μ M. Dabei kommt der TCR röntgenkristallografisch diagonal über dem Peptid und der peptidbindenden Spalte zum Liegen. Die α -Kette des T-Zell-Rezeptors orientiert sich über die α_2 -Domäne und das Aminoende des gebundenen Peptids, während die β -Kette des T-Zell-Rezeptors über der α_1 -Domäne und dem Carboxyende des Peptids liegt. Die drei extrem variantenreichen antigenerkennenden Domänen befinden sich über den zentralen Peptidaminosäuren [122,123]. Die eigentliche T-Zellantwort wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Das System ist derart sensibel, dass ein Austausch einer Aminosäure, sei diese im Peptid oder im MHC-Komplex lokalisiert, eine Zellantwort verhindern oder auslösen kann [124,125]. Neben der Qualität aufgrund dieser doppelten Spezifität hängt die T-Zell-Antwort auch

von der Anzahl peptidpräsentierender MHC-Komplexe ab. Eine genaue Grenze kann bis heute nicht definiert werden. So unterscheiden sich die Publikationen deutlich, da erforderliche Peptid-MHC-Komplexe sowohl im vierstelligen, als auch im einstelligen Bereich angegeben werden [108,126]. Aufgrund dieser sehr unterschiedlichen Mengenangaben wird aktuell angenommen, dass die Aktivierung nicht von der Menge der präsentierten Antigene, sondern von ihrer spezifischen Präsentation abhängt [127,128].

Bindet nun ein Antigen an den T-Zell-Rezeptor, so werden die an der intrazellulären Domäne des CD3-Rezeptors liegenden zehn ITAMs (immunoreceptor tyrosin-based activation motifs) über Kinasen der Src-Familie, wie Lck oder Fyn, phosphoryliert [129,130]. Dies führt zur Bindung der (ζ -Ketten-assoziierten) ZAP-70, welche ebenfalls durch Lck aktiviert wird [131-133]. Die nun aktive ZAP-70 phosphoryliert das mit der Membraninnenseite assoziierte LAT (linker of activation in T-cells) [134]. Dieser phosphorylierte Adapter aktiviert in der Folge eine Reihe weiterer nachgelagerter Moleküle, die teilweise erneut durch Lck phosphoryliert werden [135]. Nach Übermittlung an den Zellkern kommt es dort zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Expression eines Gens. CD8 positive T-Zellen wurden in der Vergangenheit auch als T-Killerzellen bezeichnet, wobei der Begriff heutzutage in zytotoxische T-Zellen abgeändert wurde. Die durch die Genexpression ausgelöste Tätigkeit besteht in der Freisetzung lytischer Granula, sowie Caspasenaktivierung mit Einleitung eines programmierten Zelltodes und Produktion von Zytokinen.

1.2.9 Tumore und Immunsystem

Ähnlich der Verteidigung nach Außen besitzt der Körper verschiedene Schutzmechanismen gegen die Entstehung und Etablierung maligner Zellen. Dies beginnt bei der Kontrolle und Reparatur schadhafter DNA und setzt sich bei dennoch stattfindender, unkontrollierter Proliferation mit der Immunüberwachung fort [136]. Klinisch bedeutsam zeigt sich diese so genannte Immunüberwachung vor allem im Rahmen von Neoplasien bei

Immunsuppression [137,138]. Andererseits lässt die überwiegende Anzahl Viren-assoziiierter Tumore auch Gegenargumente zur Immunüberwachungstheorie nachvollziehbar erscheinen.

Betrachtet man die Entstehung maligner Erkrankungen, so gehen diese von körpereigenen Zellen aus, die beispielsweise durch Noxen geschädigt sind und veränderte DNA besitzen. Dies löst ein unkontrolliertes Wachstum aus. Die somit körpereigenen Zellen weisen ein sehr ähnliches Muster der Proteine auf, was die Erkennung durch das Immunsystem deutlich erschwert. Im Rahmen der genetischen oder epigenetischen Veränderungen sowie der genetischen Instabilität entstehen jedoch auch Antigene, die durch T-Zellen erkannt werden können [139]. Unterteilt werden diese in Tumor-assoziierte Antigene (TAA) und Tumorspezifische Antigene (TSA). Tumorassoziierte Antigene sind Proteine oder nicht proteinogene Strukturen, die auch in Normalgewebe exprimiert werden, aber auf Tumorzellen stark überexprimiert sind. Am bekanntesten sind Her2/neu [140] und MUC1 [141], die über quantitative Effekte ihre immunogene Wirkung entwickeln [142,143]. Tumorspezifische Antigene werden hingegen nur auf Tumorzellen exprimiert. Ihre Liganden entstammen Quellproteinen des infizierenden Virus, durch Mutationen veränderten Quellproteinen oder Genprodukten, die in einem normalerweise nicht zugänglichen Leseraster der DNA entstammen. Als Quellproteine (oder engl. *native / source protein*; s. Abbildung 6) werden dabei alle Proteine bezeichnet, aus deren Abbau über das Proteasom an der Zelloberfläche exprimierte Peptide hervorgebracht werden.

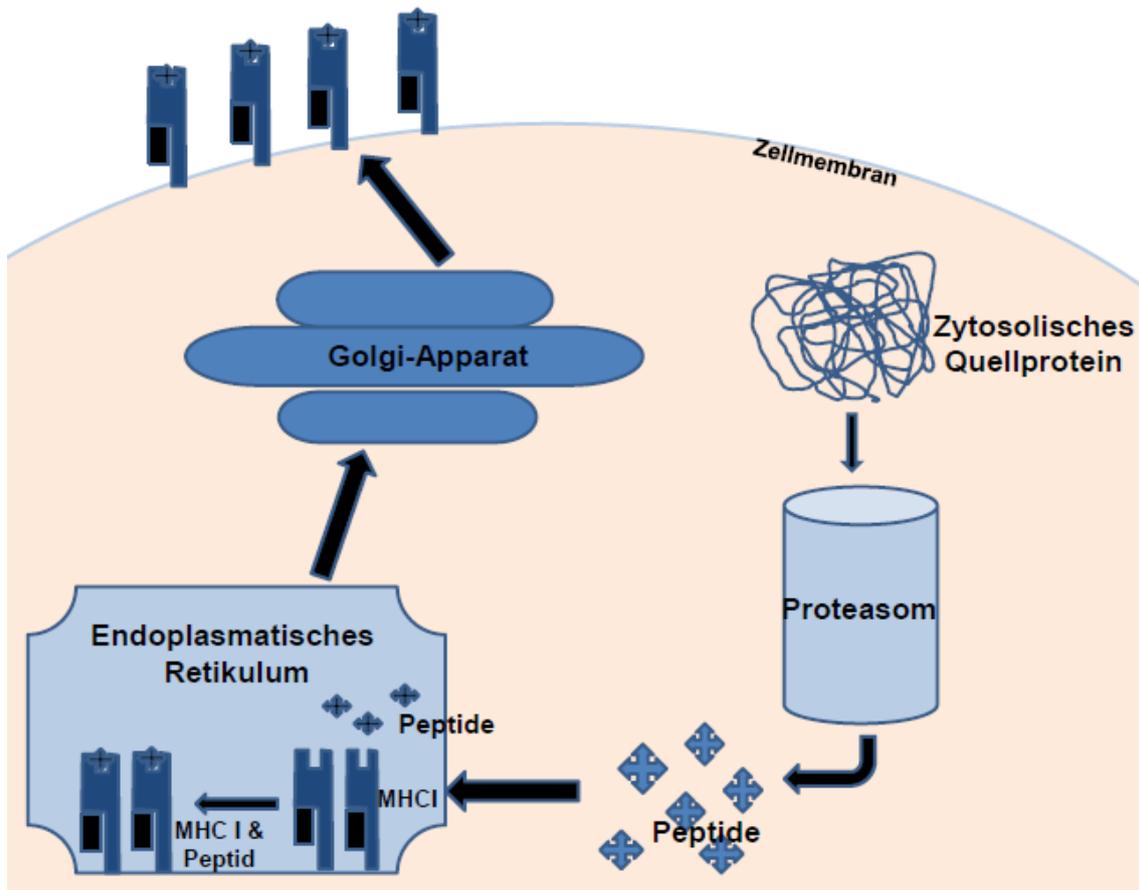


Abbildung 6: Prozessierung von HLA-Klasse I-präsentierten Antigenen und Beladung von HLA-Klasse I-Molekülen. Orientierend an N. P. Trautwein [144]

Werden die Liganden durch T-Zellen erkannt, so können diese ihre spezifische Antwort auslösen. Diese zeigt jedoch nur in Ausnahmefällen ein sichtbares Ergebnis [145], wobei eine vermehrte T-Zellinfiltration bei verschiedenen Malignomen die Prognose verbessert [146-148].

Die eigentliche Eliminierung erfolgt über CD8-positive zytotoxische T-Zellen, über die T-Helferzellen und B-Zellen ins akquiriert werden. Über die Ausschüttung von Granzyme, Perforin und Granlysin sowie mittels membranständiger FAS-Liganden induzierter Apoptose greifen zytotoxische T-Zellen die erkannten Zellen direkt an. Ausgeschüttetes Interferon- γ aktiviert Makrophagen und fördert die Expression von HLA-Klasse I Molekülen [149]. Zusätzlich binden an der Oberfläche exprimierte Antikörper an CD16 auf NK-

Zellen und Makrophagen, dies führt zur Aktivierung des Komplementsystems sowie über ADCC auch teilweise zur direkten Eliminierung [150].

Aber um klinisch manifest zu werden, mussten auch Tumorzellen Wege entwickeln der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entfliehen, bezeichnet wird dies als „*immune escape*“. Ein bedeutender Weg, der Erkennung zu entgehen, ist die reduzierte Expression von HLA-Klasse I-Molekülen. Bekannt sind verschiedene Wege dies zu erreichen, die teilweise reversibel und teilweise irreversibel sind. Als reversible Art des HLA-Verlustes im Rahmen der Antigenprozessierung muss unter anderem eine Herunterregulation von LMP2, LMP7 und TAP1 genannt werden, welche durch Interferon- γ -Gabe ausgeglichen werden konnte [151]. Zu irreversiblen HLA-Verlusten führen hingegen verschiedene Mutationen oder chromosomale Defekte in Genen, die die schwere Kette oder β_2 -Mikroglobulin kodieren. So ist der Verlust des HLA Haplotyps über den hemizygoten Verlust von HLA-A, -B oder -C-Allelen oder durch den Verlust einer Kopie des Chromosom 6 [152] möglich. Auch über den Verlust einzelner HLA-Allele im Rahmen genetischer Defekte wie Punktmutationen, Leserasterverschiebungen oder Deletionen kann ein HLA-Verlust erreicht werden [153].

Eine weitere Möglichkeit von Malignomen sich der Immunantwort zu entziehen ist die immunsuppressive Wirkung. Diese erfolgt sowohl lokal als auch systemisch. So sind verschiedene Malignome in der Lage immunsuppressive, vom Tumor stammende, lösliche Faktoren zu produzieren, dazu gehören zum Beispiel IL-10 (Interleukin 10) oder TGF- β (*transforming growth factor β*) [154]. Unterstützt wird diese latente Immunsuppression auch durch ein erhöhtes Vorkommen regulatorischer T-Zellen im Blut und in der Tumorumgebung, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [155,156].

Doch auch bei erfolgreich eingeleiteter Immunantwort besitzen Malignome Möglichkeiten, die letztendliche Ausführung der Eliminierung zu erschweren oder sogar zu unterbinden. Einen wichtigen Eingriffspunkt stellt dort der Apoptosesignalweg dar. Hauptbestandteile sind Inhibitoren der Apoptose, die in Tumorgewebe deutlich überrepräsentiert sind, wie zum Beispiel Survivin [157].

Viele weitere befinden sich im Rahmen der Diagnostik bezüglich möglicher Therapieansatzpunkte in der aktuellen Erforschung [158].

1.3 Immuntherapeutische Angriffspunkte

1.3.1 Antikörpertherapie

Einen Überblick über Antikörper und Inhibitoren, die bereits in klinischer Erforschung bei NSCLCs sind, gibt bereits Kapitel I.I.VII, sodass auf eine erneute Erwähnung in diesem Kapitel verzichtet wird. Eine breite Beschreibung einer Antikörpertherapie ermöglicht die Aufteilung in zwei Gruppen. So kann man diese funktionell in monoklonale Antikörper mit eindeutiger Zielstruktur, sogenannte targetierende Antikörper, und agonistische oder antagonistische monoklonale Antikörper, sogenannte funktionale Antikörper, unterteilen. Targetierende Antikörper binden an bestimmten Zielstrukturen und markieren so die Zielstruktur-tragenden Zellen. Dies löst wiederum über den konstanten Teil des Immunglobulins (Fc) durch Rekrutierung des Komplementsystems oder zytotoxische Immuneffektorzellen die effiziente Zelllyse aus [159]. Funktionelle Antikörper hingegen agieren als Antagonisten oder Agonisten von Targetmolekülen mit tumorbiologisch relevanter Funktion. Beispielsweise blockieren sie Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder haben selbst proapoptotische Wirkung [159].

1.3.2 Chimärer Antigenrezeptor T-Zellen

Als momentaner Schwerpunkt in der Erforschung und medial stark vermarktete Intervention mit einem der größten Potentiale müssen sogenannte CAR-T-Zellen in dieser Arbeit ihre Erwähnung finden.

Patienteneigene T-Zellen werden dem Patienten mittels Leukapherese entnommen. Diese werden durch Implantation eines neuen stabilen Gens verändert, sodass die Synthese eines spezifischen Proteins erfolgt. Das Endprodukt wird als chimärer Antigenrezeptor bezeichnet. Nach extrakorporaler

Multiplikation und vorangehender lymphodepletierender Konditionierungstherapie erfolgen die Rückgabe und im Verlauf die intrakorporale Vermehrung. Diese Zellen können durch Bindung des zum CAR passenden Antigens apoptotische Prozesse einleiten [160,161]. Dennoch bietet diese Therapie auch ein nicht zu unterschätzendes Nebenwirkungspotenzial.

Eine Zulassung dieser Therapie besteht bereits bei therapierefraktärer akuter lymphoblastischer Leukämie sowie bei therapierefraktärem diffus großzelligem B-Zell-Lymphom. Bei aktuell rekrutierenden Studien für Bronchialkarzinome beispielsweise NCT02133196 ist in naher Zukunft mit Fallberichten und klinischen Studien zu rechnen [162].

1.3.3 Tumorkvakzinierung

Einen nach aktuellem Wissensstand deutlich nebenwirkungsärmeren Therapieansatz bietet die tumorspezifische Vakzinierung. Ziel ist es dabei, durch aktive Immunisierung sowohl Effektor-T-Zellen als auch Gedächtniszellen zu induzieren.

Essenziell für die Wahl eines entsprechenden Vakzins ist dabei die Spezifität und Immunogenität. So sind tumorspezifische Antigene mit entsprechender Immunogenität sicherlich die am besten geeignete Variante, wobei auch tumorassoziierte Antigene in Frage kommen. Zur Analyse dieser Antigene stehen verschiedene Möglichkeiten der HLA-Ligandomdiagnostik zur Verfügung. Neben der cDNA-Expressionsklonierung, Genexpressionsanalyse und Epitopvorhersage spielt insbesondere für diese Arbeit die HLA-Ligandensequenzierung mit zusätzlicher Überprüfung der Eignung als T-Zell-Epitop eine entscheidende Rolle.

Ist nun die Wahl der Vakzine getroffen, so besteht die Problematik diese in den entsprechenden Organismus zu bekommen. Die ursprünglichste Form stellt dabei die direkte Injektion von separierten Tumorzellen [163], Antigen kodierenden DNA-Plasmiden [164], tumorassoziierten Proteinen oder eben

tumorassoziierte Peptiden [165] dar. Im Fokus der Öffentlichkeit stehen zudem aktuell vor allem auch mRNA-Vakzine [166]. Häufig ist die Injektionsfähigkeit jedoch eingeschränkt und Vektoren müssen ins Spiel kommen. Hier kommen Viren in den Fokus, die bekanntermaßen eine hohe Immunogenität mitbringen [167]. Alternativ besteht auch die Möglichkeit dendritische Zellen zu injizieren, die zuvor mit Peptiden beladen wurden [168,169].

Sind die Vakzine in ihrer Zielstruktur angelangt und haben eine entsprechende Immunantwort ausgelöst, so verbleibt die Frage, ob die Immunantwort ausreichend stark erfolgt. Zur Unterstützung sind hier vor allem bei Peptidvakzinierungen immunogene Adjuvanzien erforderlich. Das Repertoire reicht hier von Aluminiumverbindungen [170] bis hin zu Squalene-basierten Stoffen wie MF59® [171] und wird jährlich erweitert. Ein besonders vielversprechendes Adjuvanz ist dabei im synthetischen Toll-like Rezeptor-1/2-Liganden XS15 zu sehen [172].

1.4 Analyse der Signaltransduktionswege (*Pathway*-Analyse)

Der reinen Übersetzung nach bedeutet das englische Wort „*pathway*“ Weg oder Pfad. Als Anglizismus vorwiegend in Medizin und Wissenschaft gebräuchlich, erhält „*Pathway*“ die Bedeutung einer schematischen Darstellung eines Abschnitts der molekular-physiologischen Abläufe. Als Korrelat in der deutschen Übersetzung kann der Signaltransduktionsweg betrachtet werden. In den letzten Jahren hat sich initial zur Verbesserung der Datenanalyse auf dem Gebiet des Proteoms (der Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment, unter exakt definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt) die Analyse des Zusammenspiels der Proteine, der verschiedenen Proteinkomplexe, als auch der Signalwege etabliert [173]. Erstmals wurde 2001 durch Ideker et al. das Modell eines Signaltransduktionsweges (*Pathways*) aufgestellt, um gefundene Proteine einem Signaltransduktionsweg zuzuordnen [174].

Die Indikation aller Analysen der Signaltransduktionswege besteht darin, Messergebnisse aus Messverfahren mit hohem Durchsatz wie beispielsweise der Massenspektrometrie für weitere Analysen zugänglich zu machen [175]. Gerade in Anbetracht großer Datenmengen resultierend aus den Analysen des Proteoms, Metaboloms oder Transkriptoms ist zur Bestimmung beispielsweise relevanter Proteine eine Assoziation relevanter Gruppen erforderlich. Um dies zu erreichen wurde bestehendes biologisches Wissen gebündelt mit statistischen Tests, mathematischen Analysen und rechnerischen Algorithmen [176]. Dieses Wissen wird anhaltend erweitert, korrigiert und überarbeitet.

Die Bündelung dieses Wissens erfolgt in verschiedenen Datenbanken, die unterschiedlich umfangreich und mit unterschiedlichem Augenmerk Analysen ermöglichen. Eine der bekanntesten und umfangreichsten bioinformatischen Datenbanken ist die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)* [177]. 1995 führend durch Minoru Kanehisa initiiert, hat die Datenbank das Ziel die gesamten Organismen bioinformatisch zu repräsentieren. Eingeflossen sind Informationen über die Strukturen von Biomolekülen, Medikamenten, Reaktionsgleichungen, Stoffwechselwegen und Genen, um unter anderem einen Überblick der funktionalen Hierarchie biologischer Systeme in verschiedenen Organismen zu geben [178]. Die Datenbank gliedert sich in drei wesentliche Faktoren auf. So ist die Hauptkomponente die PATHWAY-Datenbank, diese enthält graphische Darstellungen zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel Metabolismus, Membrantransport oder Zellzyklus. Erweitert wird dieser Abschnitt durch eine Anzahl Tabellen orthologer Gruppen, die Informationen über Unter-Signaltransduktionswege enthalten und vor allem zur Vorhersage von Genvorhersagen nützlich sind [179]. Die KEGG-Datenbank enthält die meisten metabolischen Signaltransduktionswege und auch einen Teil der regulatorischen Signaltransduktionswege. Zusätzlich liefert die Datenbank Informationen in orthologen Tabellen mit entsprechenden Gruppen [178]. Weitere Bestandteile der KEGG-Datenbank sind die GENES-Datenbank, welche möglichst vollständige Genome aller Organismen enthält, sowie die LIGAND Datenbank, die Informationen über chemische Verbindungen und

Enzyme enthält. Eine Alternative stellt beispielsweise die REACTOME-Datenbank dar [180].

Über den genauen diagnostischen Nutzen der Datenbank-Analyse von Signaltransduktionswegen wird häufig diskutiert, da verschiedene Einflussfaktoren, wie beispielsweise schon die Heterogenität der Proben oder die Variationen in der Präparation, unterschiedliche Ergebnisse erzeugen können. Dennoch ist es mittels Datenanalyse bereits gelungen, potentielle Biomarker bei Morbus Parkinson [181] oder mögliche Morbus Alzheimer-assoziierte Gene [182] zu identifizieren.

Die Analyse der Signaltransduktionswege im Rahmen von Karzinom-erkrankungen ist bis dato vorwiegend für das Proteom [183] und Transcriptom[184] etabliert. Aber auch Ligandom-basierte Analysen der Signaltransduktionswege sind bereits beschrieben [185].

1.5 Ziele der Arbeit

Trotz hochkarätiger Entwicklungen und auch Medikamentenzulassungen stellen NSCLCs im klinischen Alltag nach wie vor Patienten und behandelnde Ärzte vor sehr große Herausforderungen. Wie in Kapitel 1.1.5 beschrieben kommt dabei auch der Entwicklung von neuartigen Behandlungskonzepten und Medikamenten sowohl für die adjuvante oder additive Therapie nach kurativ-intendierter primärer Tumorsektion als auch für die palliative Therapie eine große Bedeutung zu. Diese Konzepte müssen gut verträglich, wirkungsvoll, aber auch zeitlich und letztendlich auch finanziell realisierbar sein. Einen dieser Therapieansätze stellt die Identifikation eines auf den einzelnen Tumorpatienten maßgeschneiderter Peptid-Vakzins mittels Massenspektrometrie-basierter Ligandomanalyse dar. Dieser Ansatzpunkt zeichnet sich aufgrund seiner Spezifität und seines Umfangs durch einen verhältnismäßig hohen zeitlichen und diagnostischen Aufwand aus, der aber aufgrund der Perspektive der Erzielung langanhaltender Remissionen in jeder Hinsicht gerechtfertigt ist.

Ziel dieser Arbeit ist es, nach Identifikation der auf den Tumorzellen exprimierten Peptide mittels massenspektrometrischer Analyse diese auf ihre Tumorspezifität beziehungsweise Tumorassoziation zu prüfen. Hierzu sollten 26 Probenpaare (aus operativ gewonnenem NSCLC-Tumorgewebe und dazu korrespondierendem Normalgewebe Lunge der gleichen Patienten) aufbereitet und massenspektrometrisch untersucht werden. Im Ergebnis dieser Analytik sollten die dabei ermittelten Peptide den jeweiligen Quellproteinen mittels Datenbankabfrage zugeordnet werden. Weiterhin sollten die ermittelten Quellproteine auch den jeweils relevanten zellulären Signaltransduktionswegen zugeordnet werden, um deren jeweilige Funktion zuordnen zu können. Auf diese Weise sollte die Relevanz der gefundenen Peptide als Vakzinierungsoption weiter eingegrenzt werden.

Zusätzlich sollte den als tumorassoziiert identifizierten Quellproteinen mittels Datenbank-Analyse eine Bedeutung im Rahmen Karzinom-assoziiierter Signaltransduktionswege zugeordnet werden. Anhand dieser Daten sollten in den Proben überrepräsentierte Signaltransduktionswege identifiziert und auf mögliche therapeutische Ansatzpunkte untersucht werden.

Ebenso sollte in dieser Arbeit versucht werden, ob möglicherweise Korrelationen zwischen den Patienten-spezifisch identifizierten Tumor-assoziierten Signaltransduktionswegen und den jeweiligen klinischen Merkmalen (z.B. dem Differenzierungsgrad des jeweiligen Tumors) bestehen. Auf dieser Basis könnte sich dann künftig eine Rationale für weitergehende Analysen (z.B. Tumorgenomsequenzierungen und andere) ergeben, die helfen könnten, weitere Patienten-spezifische molekulare Therapieansätze zu identifizieren.

Außerdem sollte anhand der klinischen Merkmale Datenbank-basiert evaluiert werden, ob die Probandengruppe die durchschnittliche NSCLC-Patientenkohorte ausreichend repräsentiert. Ähnliche Ansätze wurden bis dato für das kolorektale Karzinom beschrieben [185].

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalienliste

CHAPS 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate 1.2 % (w/v)	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
cOplete™ Proteasehemmer-Cocktail Tabletten	Roche, Basel, Schweiz
Bromcyan (CNBr)-aktivierte Sepharose 4B	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Glycine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chlorwasserstoff HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS without CaCl ₂ and MgCl ₂	In-house by Claudia Falkenburger
Natriumbicarbonat NaHCO ₃	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Natriumchlorid NaCl	VWR Chemicals / VWR International, Leuven, Belgien
Natriumhydroxyd NaOH	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trifluoressigsäure C ₂ HF ₃ O ₂ (MS grade TFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.2 Antikörperliste

Sämtliche monoklonalen Mausantikörper, die für die Immunaффinitätschromatografie verwendet wurden, wurden im Haus durch Claudia Falkenburger hergestellt. Einen Überblick gibt Tabelle 5.

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp	Herkunft
W6/32	HLA Klasse I	(HLA-A, -B, -C)	IgG2a; im Hause
L243	HLA Klasse II	(HLA-DR)	IgG2a; im Hause
Tü39	HLA Klasse II	(HLA-DP, -DQ, -DR)	IgG2a; im Hause

Tabelle 5: Übersicht verwendeter monoklonaler Mausantikörper für die Immunaффinitätschromatografie

2.3 Geräteliste

Branson Ultrasonics™ Sonifier™ 250 G	Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Zentrifuge MIKRO 200 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Gefrierschrank Skadi DF8517GL	Skadi, Wilmington, NC, USA
Kreisschüttler KS 250	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Megafuge 1.0R	Unity Lab Services, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Förderpumpe rotarus® smart 30	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland

2.4 Softwareliste

Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
IBM SPSS Statistics 27	International Business Machines Corporation (IBM), Armonk NY, USA
STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins)	European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg, Deutschland und Universität Zürich, Zürich, Schweiz

2.5 Liste der Verbrauchsmaterialien

Amicon-Ultra 0.5 ml centrifugal Filters 3 kDa	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Amicon-Ultra 0.5 ml centrifugal Filters 10 kDa	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cellstar Falcon Tubes 15 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Falcon Tubes 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Corning® DeckWorks 1 – 200 µL Low Binding Pipet Tips	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Econo-Column® Chromatography Columns, 0.5 cm x 5 cm	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Hamilton syringe 20 µl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hamilton syringe 50 µl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
KIMTECH Science Precision Wipes 7552	Kimberly Clark, Irving, TX, USA
Millex-Spritzenvorsatzfilter low protein binding, Durapore® (PVDF) 5.00 µl	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Petrischalen (Ø 60 mm)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Petrischalen (Ø 100 mm)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Polypropylene Luer-Adapter mit 1/8" lock rings und 1/8" teflon tubing	Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA
Potter Glas	Wheaton, Milville, NJ, USA
Protein LoBind Tube 1.5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Drei-Wege-Hähne (weiblich auf männlich Luer-Anschluss)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Safe-Lock Tubes 1.5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Chirurgische Skalpelle	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Syringes mit BD Luer-Lok™ Tip 20 ml	Becton Dickinson, Drogheda, Irland
Syringes mit BD Luer-Lok™ Tip 50 ml	Becton Dickinson, Drogheda, Irland

2.6 Probenmaterial

Alle verwendeten Proben wurden gesammelt, pseudonymisiert und zur Verfügung gestellt durch die Kollegen der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen in Kooperation mit Herrn Professor Dr. med. Sebastian P. Haen[†]. Eingeschlossen wurden Patienten nach ausführlicher Aufklärung, entsprechender Bedenkzeit und schriftlicher Einverständniserklärung. Die Probensammlung erfolgte entsprechend der durch die lokale Ethikkommission (Ethik-Nummer 222/2015BO2) genehmigten Vorgaben.

Tumorproben wurden nach Entnahme im Rahmen der entsprechenden Operation (vollständiger Resektion) direkt in ein 50 ml Falcon-Gefäß gegeben und dieses mithilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Transport erfolgte auf Trockeneis und die Lagerung bei -80°C im Gefrierschrank.

Verwendet wurden insgesamt 26 Probenpaare von Adeno- oder Plattenepithelkarzinomen der Lunge (zusammengefasst als nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome) und entsprechendem benignem Gewebematerial. Eine Übersicht über die entsprechenden Spender liefert Tabelle 6.

Nummer	Erkrankungsalter in Jahren	Geschlecht	Histologie
LCA 101	78	w	pulmonales Plattenepithelkarzinom
LCA 102	62	m	pulmonales Plattenepithelkarzinom
LCA 103	58	m	pulmonales Adenokarzinom
LCA 104	68	w	pulmonales Adenokarzinom
LCA 105	58	w	pulmonales Adenokarzinom
LCA 106	74	w	pulmonales Plattenepithelkarzinom
LCA 107	63	m	pulmonales Adenokarzinom
LCA 108	72	w	pulmonales Adenokarzinom
LCA 109	87	m	pulmonales Plattenepithelkarzinom
LCA 110	62	m	pulmonales Plattenepithelkarzinom
LCA 111	61	w	pulmonales Adenokarzinom
LCA 112	68	m	pulmonales Plattenepithelkarzinom
LCA 113	62	m	pulmonales Plattenepithelkarzinom
LCA 115	60	w	pulmonales Adenokarzinom
LCA 116	65	m	pulmonales Plattenepithelkarzinom
LCA 117	74	w	pulmonales Adenokarzinom
LCA 118	68	m	pulmonales Plattenepithelkarzinom
LCA 119	69	w	pulmonales Plattenepithelkarzinom
LCA 120	61	w	pulmonales Adenokarzinom
LCA 122	55	m	pulmonales Plattenepithelkarzinom
LCA 123	77	w	pulmonales Plattenepithelkarzinom
LCA 124	71	m	pulmonales Plattenepithelkarzinom
LCA 125	68	m	pulmonales Adenokarzinom
LCA 127	65	m	pulmonales Adenokarzinom
LCA 128	57	m	pulmonales Adenokarzinom
LCA 129	69	m	pulmonales Adenokarzinom

Tabelle 6: Übersicht Tumorproben mit Alter, Geschlecht und Histologie

2.7 HLA-Typisierung

2.7.1 Probenmaterial

Für 25 der 26 Spender erfolgte die Typisierung aus Normalgewebe nach DNA-Purifikation, für LCA 110 war nicht ausreichend Material asserviert, sodass der HLA-Typ mittels in-house server Ligandosphere von Linus Backert vorhergesagt werden musste.

2.7.2 HLA-Typisierung

Die HLA-Typisierung der Spenderproben erfolgte durch das HLA-Labor des Universitätsklinikums Tübingen, Innere Medizin, Abteilung II Onkologie, Hämatologie, Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie, welches seit 1997 durch das EFI (European Federation for Immunogenetics) akkreditiert ist. Verwendet wurden SSO-PCR und NGS SBT HLA-Typisierung.

2.8 Identifikation MHC-Klasse I- und II-gebundener Peptide

Mit der Zielstellung einer T-Zell-basierten tumorspezifischen Immuntherapie ist die Kenntnis tumorspezifischer Proteine erforderlich. Entsprechend der obig beschriebenen Präsentationsmuster (siehe Kapitel 1.2) bieten MHC-präsentierte Peptide eine Möglichkeit des Rückschlusses auf tumor-assoziierte oder -spezifische Antigene [186]. Diese auch als „direkte“ oder „zelluläre“ Identifikationsweise der HLA-Liganden bezeichnete Herangehensweise fußt auf den Mechanismen der Umkehrphasen-HPLC-Fraktionierung des Edman-Abbaus und der Massenspektrometrie und wurde über die Jahre immer weiter verfeinert [187-189].

Für alle 26 Probenpaare erfolgte der Zellaufschluss, die Immunpräzipitation durch Affinitätschromatographie mittels HLA-Klasse I- und -II-spezifischer Antikörper sowie Peptidlösung durch Elution und Ultrafiltration [190,191]. Die anschließende Identifikation der Aminosäuresequenzen der einzelnen Peptide

sowie deren Quellproteine erfolgte mittels Massenspektrometrie und Datenbankabgleich [192]. In der Folge wurden sämtliche identifizierten Peptide der Tumorzellproben mit denen der Normalgewebeproben des selben Spenders verglichen, um einen Anhalt für tumorassoziierte Peptide (hoch- oder herunterreguliert) sowie tumorspezifische Peptide zu bekommen. Zusätzlich erfolgte der datenbankbasierte Abgleich zu bekannten Peptiden weiterer Proben von Normalgewebe im Rahmen einer im Haus vorhandenen Dokumentation. Die so identifizierten tumorspezifischen Peptide wurden daraufhin mit publizierten, immunogenen Peptiden verglichen, um mögliche Vakzinierungsmöglichkeiten zu identifizieren [185,193].

Dabei erfolgte Antikörperkopplung, Zellyse sowie Immunaффinitätschromatografie mittels BrCN-Säule für die Probenpaare LCA104, LCA105, LCA106, LCA107, LCA108, LCA110, LCA113, LCA115, LCA117, LCA118 und LCA120 eigenständig. Die Aufreinigung mittels ZipTip_{C18}[®]-Pipettenspitzen, sowie die Massenspektrometrische Analyse isolierter Peptide, die relative quantitative Messung zur Analyse von Ligandomveränderungen und die HLA-Ligandom abhängige Definition tumorassoziiierter Antigene erfolgten durch Eva-Maria Wolfschmitt und Dr. rer. nat. Lena Freudenmann. Für die Probenpaare LCA101, LCA102, LCA103, LCA109, LCA112, LCA116, LCA119, LCA121, LCA122, LCA 123, LCA124, LCA125, LCA127, LCA128 und LCA129 erfolgten die vollständige Identifikation MHC-Klasse I und II gebundener Peptide durch die Masterstudentin Eva-Maria Wolfschmitt unter Supervision durch Dr. rer. nat. Lena Freudenmann.

2.8.1 Antikörperproduktion und –Kopplung

Alle verwendeten Antikörper wurden im Hause durch die medizinisch technische Assistentin Claudia Falkenburger hergestellt und im Rahmen etablierter Abläufe der Qualitätssicherung kontrolliert.

Zur Kopplung wurden pro Milligramm des zu koppelnden Antikörpers 40 mg CNBr Sepharose 4B mit 45 ml 1 mM HCl über 30 Minuten aktiviert. Nach

Zentrifugation und Entfernung des Überstandes erfolgte die Zugabe von Kopplungspuffer (0.5 M NaCl, 0.1 M NaHCO₃, pH 8.3) und des entsprechenden Antikörpers bis zu einer Gesamtmenge von 45 ml. Nach zweistündiger Kopplungszeit und erneuter Zentrifugation und Entfernung des Überstandes, wurden verbleibende freie Bindungsstellen der mit Antikörper gekoppelten Sepharose mittels 0,2 M Glycin geblockt und erneut für 60 Minuten inkubiert. Nach vollständiger Blockade erfolgte mittels Zentrifugation, Entfernung des Überstandes und zweimaliger Zugabe Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) die Reinigung. Ebenfalls mittels Phosphat-gepufferter Salzlösung erfolgte die Herstellung einer Grundlösung von 1 mg Antikörper pro 40 mg Sepharose pro ml. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Kühlraum.

2.8.2 HLA-Ligandomanalyse

2.8.2.1 Zelllyse

Alle Schritte erfolgten im Kühlraum oder auf Eis. Zunächst wurden sämtliche Proben mittels Feinwaage quantifiziert und die zu verwendenden Proben auf eine angestrebte Menge von ~1 g begrenzt (vergleiche Tabelle 7). Von jeder Probenmenge wurden nach Möglichkeit gewichtsmäßig geringe Proben für weitere Untersuchungen zurückbehalten und bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

Probennummer	Tumorprobe	Benigne Probe
LCA104	1000 mg	1000 mg
LCA105	1000 mg	1000 mg
LCA106	970 mg	1010 mg
LCA107	1000 mg	1000 mg
LCA108	1020 mg	1010 mg
LCA110	1010 mg	1000 mg
LCA113	1040 mg	1000 mg
LCA115	1100 mg	1300 mg
LCA117	990 mg	980 mg
LCA118	1000 mg	1020 mg
LCA120	1020 mg	1000 mg

Tabelle 7: Verwendete Probenmengen

Zur Homogenisierung und Zellyse wurde zuerst doppelt-konzentrierter Lysepuffer (33 ml PBS, eine Proteaseinhibitortablette, 40 mg CHAPS) hergestellt. Die zu untersuchende Probe wurde im gefrorenen Zustand in eine Plastik-Petrischale gegeben und unter Zugabe eines Volumens doppelten Lysepuffers aufgetaut. Bereits im gefrorenen Zustand wurde das Gewebe mittels Skalpell und Pinzette in kleine Stücke zerteilt. Nach Überführung in ein geeignetes gläsernes Pottergefäß wurden unter Ausspülen der Petrischale zweimal zwei Volumina einfachen Lysepuffers hinzugegeben und die Probe auf Eis zwischengelagert. Ebenfalls auf Eis erfolgten das schonende Pottern zur Herstellung einer möglichst homogenen Flüssigkeit, sowie über Spülung des Potters die erneute Zugabe von zweimal zwei Volumina einfachen Lysepuffers. Zur weiteren Lyse wurde die Probe nach Rückgabe in das originale Falcon-Tube mittels Shaker für eine Stunde gerührt. Um die weitere Lyse zu vervollständigen erfolgte im Anschluss die Sonifikation bei Stufe 5 für dreimal 20 Sekunden mit entsprechenden zwischenzeitlichen Pausen und auf Eis, um ein Überhitzen zu vermeiden. Zur Trennung von Zelllysate und verbleibendem Detritus wurden die Proben bei 4°C und 4000 Umdrehungen für 45 Minuten zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde zusätzlich in ein neues Falcon-Tube steril filtriert (Porengröße 45 µm) [192,194].

2.8.2.2 Immunaффinitätschromatographie mittels BrCN-Säule

Vor der eigentlichen Verwendung wurden die Niederdruck-Glas-Chromatografie-Säulen mittels 70 %igen Ethanol und destillierten Wassers gereinigt. Für jede Probe wurden zwei Säulen mit Dreiwegehahn verbunden und mittels Halteklammern befestigt. Diese wurden im Anschluss entsprechend beschriftet und mittels flexibler Silikonschläuche und korrelierender Luer-Verbindungen verbunden. Zusätzlich wurden die nacheinander-geschalteten Säulen (1. HLA-Klasse I, 2. HLA-Klasse II) mit einer peristaltischen Pumpe verbunden. Das so entstandene System wurde mittels Phosphat-gepufferter Salzlösung erneut gereinigt, auf Dichtigkeit überprüft und Durchflussgeschwindigkeiten der unterschiedlichen Systeme pro Pumpe

wurden mittels Wendelschraube aufeinander abgestimmt. Die zuvor hergestellten Antikörper/Sepharose-Lösungen wurden entsprechend der Probenmenge auf die Säulen verteilt. So wurde auf die im System vorderen Säulen jeweils 1 mg HLA-I-Antikörper W6/32 pro Milligramm Probe gegeben und auf die zweite Säule im Mischverhältnis 1:1 jeweils 1 mg L243 und Tü39 HLA-II-Antikörper pro Milligramm Probe. Die noch im System befindliche Phosphat-gepufferte Salzlösung wurde durch einfachen Lysepuffer ersetzt und die lysierte und steril filtrierte Probe hinzugegeben.

Das mit Lysat gefüllte System wurde über mindestens 12 Stunden im Sinne einer Endlosschleife bei 10 Umdrehungen zyklisiert. Am Folgetag wurde das zyklisierende Zelllysate durch Phosphat-gepufferte Salzlösung ersetzt und das im System-befindliche Lysat aufgefangen. Das verbleibende Lysat wurde für mögliche weitere Diagnostik erneut bei -80°C eingefroren und gelagert. Die Niederdruck-Glas-Chromatografie-Säulen mit enthaltenem Sepharosebett wurden im Anschluss für 30 Minuten mit Phosphat-gepuffertem Salzlösung und für 60 Minuten mit demineralisiertem Wasser gereinigt, ohne das Sepharosebett trocknen zu lassen. Diese Trocknung erfolgte erst nach vollständiger Reinigung.

Aus den nun trocken gelaufenen Sepharose-Antikörper-Betten wurden die Antikörper-HLA-Peptid-Komplexe durch saure Elution entfernt. Zur Elution wurden im ersten Schritt 200 µl 0,2 %ige Trifluoressigsäure (TFA) per Hamilton Spritze in die BrCN-Säule auf das Sepharose-Antikörper-Bett gegeben, sodass dieses vollständig bedeckt wurde. Um Konzentrationsunterschiede durch eventuell noch verbliebene PBS auszugleichen erfolgte zusätzlich die Zugabe eines Tropfens (ca. 50 µl) 10 %iger TFA [195]. Die Inkubation erfolgte über 30 Minuten auf dem Shaker (4°C und 300 Umdrehungen). Entnommen wurde die TFA-Peptid-Lösung durch Inflation mithilfe einer 50 ml Spritze und das Eluat wurde aufgefangen in 1,5 ml LoBind Eppendorf Röhrchen. Dieser Schritt wurde insgesamt weitere drei Mal wiederholt, wobei auf die Zugabe 10 %iger TFA verzichtet wurde.

Um die Peptide von den HLA-Molekülen zu trennen, wurde das gesamte Eluat durch Amicon Filtereinheiten filtriert. Verwendet wurden 3 kDa Amicon-Filter für

HLA-Klasse I-Peptide und 10 kDa-Filter für HLA-Klasse II-Peptide [196,197]. Diese wurden zuvor durch Zugabe von 500 µl MS grade H₂O und Zentrifugation für 10 Minuten bei 13 000 Umdrehungen getestet. Das entstandene Filtrat wurde verworfen und der verbleibende Überstand durch Ausklopfen auf Zellstofftüchern entfernt. Die Äquilibration der Amicon Filter erfolgte durch Zugabe von 500 µl 0,1 M MS grade NaOH, Zentrifugation bei 13 000 Umdrehungen für 15 Minuten und Entfernung von Filtrat und Überstand, entsprechend des vorangegangenen Testschrittes. Vervollständigt wurde dies durch einen gleich ablaufenden Schritt mit MS grade H₂O und zwei Schritte mit MS grade 0,2 % TFA. Die Zentrifugation des zweiten TFA-Schrittes erfolgte jedoch erst sobald die im Anschluss zu filtrierenden Proben verfügbar waren, um ein Austrocknen der Filter zu vermeiden. Zusätzlich wurde, um eine Verunreinigung des folgenden Filtrates zu vermeiden, ein neues Auffanggefäß verwendet, welches entsprechend beschriftet wurde. Das Eluat bestehend aus TFA sowie HLA-Proteinen und Peptiden wurde währenddessen bei 13 000 Umdrehungen und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde in Portionen von 450 µl in die Filtereinheit gegeben, wobei vermieden wurde das entstandene Pellet mit zu entnehmen. Durch erneute Zentrifugation bei 13 000 Umdrehungen bei 4°C für 15 Minuten wurde die Filtration beschleunigt. Das entstandene Filtrat wurde erneut in gekennzeichnete 1,5 ml LoBind Eppendorf Gefäße überführt. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis das gesamte Eluat filtriert war. Als abschließenden Filtrationsschritt wurden 450 µl AB_E-Lösung (32,5 % ACN/0.2 %TFA) hinzugegeben um hydrophobe Peptide zu eluieren [198]. Auch dieses Filtrat wurde in das Eppendorf-Gefäß überführt.

Jedes Eppendorf-Gefäß wurde im Anschluss mit einem Deckel ausgestattet, der mit 4 Nadellöchern (1,2 mm Außendurchmesser) präpariert wurde. Die Proben wurden daraufhin für mindestens 12 Stunden bei -80°C tiefgefroren und im Anschluss in ein gläsernes Lyophilisationsgefäß überführt, wobei dieses mit enthaltenen Proben erneut für ca. 1 Stunde eingefroren wurde. Dieses Lyophilisationsgefäß wurde an der Kühlfalle angeschlossen und die Lyophilisierung erfolgte für mindestens 5 Stunden, bis ein Volumen von etwa

50 µl erreicht wurde. Bei zu starker Einreduktion wurde A*-Lösung (0.1 % TFA in H₂O) hinzugegeben und das Röhrchen mehrfach sonifiziert und gevortext um eine Lösung zu erzeugen. Das Lyophilisat wurde im Anschluss bei -80°C gelagert.

Zur Entsalzung und Aufreinigung der Peptid-Proben wurden ZipTip_{C18}[®]-Pipettenspitzen verwendet. Die aufgetauten Peptid-Proben wurden initial bei 4°C für 3 Minuten bei 13 000 Umdrehungen zentrifugiert. Die ZipTip-Spitzen wurden auf 10 µl Pipetten verwendet, wobei die Aspiration von Luft vermieden werden musste. Das Harz wurde durch zehnmahlige Aspiration und Abgeben von AB_E aktiviert und dann durch zehnmahliges Aufnehmen und Abgeben von A* equilibriert. Daraufhin wurde zehnmahl langsam Probenlösung aufgenommen und abgegeben und nachfolgend durch dreimaliges Aufnehmen und Abgeben von A* entsalzen. Die entsalzenen und aufgereinigten Peptide wurden durch zehnmahliges rasches Aufnehmen und Abgeben in gekennzeichnete Autosampler-Gefäße, gefüllt mit 35 µl AB_E, überführt. Beginnend beim Equilibrierungs-Schritt wurde dies vier weitere Male wiederholt. Eine ZipTip-Spitze wurde nach erneuter Reinigung durch zehnmahliges rasches Aufnehmen und Abgeben von AB_E für insgesamt sechs Proben verwendet und daraufhin verworfen. Enthaltenes Acetonitril wurde mittels Vakuumzentrifuge entfernt und die Proben auf ca. 5 µl eingengt. Im Anschluss wurden die Proben mittels A_{Load} (1 % ACN/0.05 % TFA) auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt und bei -80°C gelagert.

2.8.2.3 Massenspektrometrische Analyse isolierter Peptide

Die Analyse des HLA-Ligandenextraktes erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie-gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) auf einem LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher Scientific) oder einem Orbitrap FusionTMLumosTMTribidTM-Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific). So wurden die Proben LCA112, LCA113, LCA116, LCA117, LCA122, LCA123, LCA124, LCA125 und LCA 127 mittels des

Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™-Massenspektrometers und die übrigen mittels LTQ Orbitrap XL gemessen.

Die massenspektrometrische Diagnostik teilte sich auf in drei Abschnitte. Zuerst wurden die Peptide nach ihrer Hydrophobie mittels des UltiMate 3000 RSCLC nanoSystems (Dionex) aufgetrennt. Peptide besitzen unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der C18 Trennsäule und ihrer Löslichkeit in Acetonitril, sodass Peptid-spezifische Retentionszeiten entstehen. Nach Separation können die freigesetzten Peptide massenspektrometrisch identifiziert werden. Das heißt Ionen in der Gasphase, in unserem Fall erzeugt durch kollisionsinduzierte Dissoziation, können hinsichtlich ihrer Molekülmasse beurteilt werden. In einem Massenanalysator werden Ionen bezüglich ihres Masse/Ladungsquotienten (m/z) qualitativ und der relativen Menge semiquantitativ analysiert [191]. Schaltet man zwei Analysatoren hintereinander, so können ausgewählte Massen abgetrennt, fragmentiert und sehr selektiv identifiziert werden. Verwendet wird dafür eine datenabhängige Aufnahme, die jeweils die fünf abundantesten Vorläuferionen des Übersichtsscans zur Fragmentierung auswählt. Die Auswertung der Massenspektrometriedaten erfolgte im Anschluss mittels ProteomeDiscoverer (ThermoFisher), der Ergebnisse der Mascot-Suchmaschine (Matrix Science, London, UK) mit der Swiss-Prot Datenbank (20 279 bewertete humane Proteinsequenzen; Stand 2013) integriert [192]. Die Rate falscher Zuordnungen (FDR) wurde mittels Percolator-Algorithmus abgeschätzt und bei 5 % festgeschrieben [199]. Die Peptidlängen wurden für MHC-Klasse I-Peptide auf 8-12 Aminosäuren und für MHC-Klasse II-Peptide auf 9-25 Aminosäuren festgesetzt. Eine Methionin-Oxidierung wurde als dynamische Veränderung akzeptiert und *Proteininterference* wurde deaktiviert, sodass verschiedene Protein-Assoziationen pro Peptid zugelassen wurden [185]. Die HLA-Zuordnung identifizierter Peptide erfolgte mittels hauseigener, aus erweitertem SYFPEITHI [200,201] und NetMHC 3.4 [202] bestehender Datenbank. Die Auswertung aller Proben erfolgte nach Dosisfindungs-Messung in fünf technischen Replikaten. Alle Messungen wurden freundlicherweise durch Dr. rer. nat. Lena Freudenmann und Eva-Maria Wolfschmitt durchgeführt.

2.8.2.4 Relative Quantitative Messung zur Analyse von Ligandomveränderungen

Im Hinblick auf tumorassoziierte Antigene war es bei unterschiedlicher Probengröße und variierender HLA-Expression erforderlich, Veränderungen nicht nur qualitativ, sondern nach Möglichkeit auch quantitativ zu erfassen. Die Messungen erfolgten daher als label-free Quantifizierung über eine vorangeschaltete Dosisfindungs-Messung. Entsprechend des ermittelten Messbereiches für HLA-Klasse I und II erfolgte bei höheren Messbereichen die Verdünnung mit A_{Load} . Die anschließende dosis-adaptierte Messung erfolgte in fünf technischen Replikaten. Zur relativen Quantifizierung wurde der Bereich von Vorläuferpeptiden genutzt, der mittels ProteomeDiscoverer (ThermoFisher) aus den Ionen-Chromatogrammen bestimmt wurde [185]. Aufgrund großer Unterschiede in der Peptidausbeute und somit der Area-under-the-curve innerhalb der verschiedenen Messdurchgänge konnten von den 26 Probenpaaren für die semi-quantitative Messung nur 21 Probenpaare verwendet werden.

2.8.2.5 HLA-Ligandom abhängige Definition tumorassoziierter Antigene

Nach Datenbank-basierter Identifikation der entsprechenden Peptide erfolgte der Abgleich des HLA-Motivs mit dem vorbekannten probenspezifischen HLA-Allotyp. Peptide, die für den entsprechenden HLA-Allotyp nicht passen, wurden für die weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Entsprechend im Hause etablierter Strategie erfolgte vorrangig ein Vergleich der Probenpaare, zusätzlich wurden alle divergenten und für das Probenpaar tumorspezifischen Antigene mit Normalgewebe verglichen. Hierzu wurden sowohl sämtliche benignen Kontrollen der Proben abgeglichen, als auch HLA-Ligandome von 132 Normalgewebeproben, welches im Hause bekannt ist [185]. Betrachtet wurden nur Peptide, deren HLA-Liganden bei mindestens zwei Massenspektrometerläufen auf Tumor oder Normalgewebe nachgewiesen werden konnten.

Zur Veranschaulichung der Variationen wurde die Darstellung und Auswertung mithilfe von Volcano plots genutzt. Es wurde für die Darstellung die Verhältnisse der mittleren Menge der einzelnen Peptide, gemessen in fünf LFQ-Replikationsläufen, verwendet (Faltänderung; x-Achse). Zusätzlich wurden zweiseitige Student-t-Tests verwendet, bei denen die Peptidabundanz in Karzinomproben und korrelierendem Normalgewebe unter Anwendung der Benjamini-Hochberg-Korrektur für mehrere Tests verglichen wurde (y-Achse). Um fehlende Peptididentifikationen zu berücksichtigen, wurde der mittlere Bereich der fünf niedrigsten Intensitätsidentifizierungen im gleichen Lauf, als Schätzung der Nachweisgrenze verwendet. Peptide wurden als hochreguliert beziehungsweise herunterreguliert bezeichnet, wenn die Faltänderung mindestens vierfach bei p-Werten $< 0,01$ verändert war [185]. Den in den vorhergehenden Schritten detektierten Peptiden wurden mittels ProteomeDiscoverer (ThermoFisher) jeweils die tumorspezifischen, hochregulierten oder herunterregulierten Quellproteine zugeordnet.

2.9 Assoziation betroffener KEGG- Signaltransduktionswege

Die Daten der Identifikation tumorspezifischer, hochregulierter oder herunterregulierter Quellproteine wurden durch Eva-Maria Wolfschmitt und Dr. rer. nat. Lena Freudenmann freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.9.1 KEGG-Zuordnung tumorspezifischer, hochregulierter oder herunterregulierter Proteine

Zur Identifikation direkter oder indirekter Interaktionen und der Darstellung dieser Interaktion wurden den ermittelten Quellproteinen eigenständig mittels der frei zugänglichen Bioinformatik-Datenbank STRINGdb (*European Molecular Biology Laboratory* und Universität Zürich) [203] KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)- Signaltransduktionswege zugeordnet [204]. Die Assoziation wurde dabei auf den Organismus „homo sapiens“ begrenzt.

2.9.2 Zuordnung Karzinom-/Karzinogenese assoziierter Interaktionen

Basierend auf der bestehenden Zuordnung der ermittelten KEGG-Signaltransduktionswege erfolgte die Gliederung zur Differenzierung möglicher therapierelevanter Interaktionen. Die Gliederung erfolgt orientierend an der KEGG Orthology beziehungsweise KEGG BRITE Hierarchie in verschiedene hierarchische Strukturen [205].

Bei primärem Augenmerk auf Karzinom- bzw. Karzinogenese assoziierter Interaktion wurde von der rein funktionell und biologisch aufgebauten KEGG BRITE Hierarchie abgewichen. So wurden beispielsweise bekannt Karzinom-assoziierte Signaltransduktionswege wie der PI3K/Akt-Signalweg auch als Karzinom-assoziiert gewertet.

Basierend auf diesen Grundlagen erfolgte die Einteilung in Kategorien und Unterkategorien. Einen Überblick gibt Tabelle 8.

Hauptkategorie	Unterkategorie
Karzinom-assoziiert	Medikamentenresistenz
	Tumorpromotor
	Tumorsuppressor
	Homöostase
	mTOR
	PI3K-Akt
	Wnt
	übrige
	VEGF
	Tumorangiogenese
	ECM
	spezifische Tumorerkrankungen
	Medikamenten Metabolismus
Verarbeitung genetischer Informationen	Replikation
	Translation
Erkrankungen des Menschen	Endokrinologische und metabolische Erkrankungen
	Neurodegenerative Erkrankungen
	Kardiovaskuläre Erkrankungen

	Infektionserkrankungen
	Autoimmunerkrankungen
	übrige
Organismussysteme	Alterung
	Kardiovaskuläres System
	Entwicklung und Regeneration
	Immunsystem
	Endokrines System
	Verdauungstrakt
	Nervensystem
	Exokrines System
	übrige
Signalweg des metabolischen Stoffwechsels	Fettstoffwechsel
	Kohlenhydratstoffwechsel
	Aminosäurenstoffwechsel
	Glykanstoffwechsel
	Antioxidanzien
	übrige
Zellstoffwechsel	Zelldegeneration
	Zellzyklus
Zelluläre Prozesse	Chemokine
	<i>second messenger</i>
	Zytokinrezeptor
	Zellkommunikation
	<i>Cell growth and death</i>
	Transport und Katabolismus
	Zellverband
	übrige

Tabelle 8: Kategorien gefundener KEGG- Signaltransduktionswege

2.9.3 Zuordnung betroffener Quellproteine

Zur näherungsweisen Quantifizierung des Interaktionsumfangs wurden nachfolgend den obigen Kategorien sowohl die betreffenden Quellproteine, als auch die Menge betroffener Prozesse zugeordnet.

2.10 Analyse klinischer Korrelation

Zur Evaluation möglicher klinischer Indikatoren für die Initiierung einer Ligandom-Analyse sowie einer darauf beruhenden Analyse der Signaltransduktionswege erfolgte die Assoziierung klinisch bedeutsamer Faktoren. So wurde mittels eigenständiger Anamnese, Sichtung bestehender ärztlicher Dokumente und Rücksprache mit den aktuell oder zuletzt betreuenden Kollegen die Patientenkohorte erweitert aufgearbeitet. Es wurden deshalb folgende Kriterien berücksichtigt:

- Erkrankungsalter
- Geschlecht
- Histologie (pulmonales Plattenepithel- oder Adenokarzinom)
- Grad der histologischen Entdifferenzierung (*Grading*)
- Lymphknotenbefall
- Nikotinabusus als Hauptrisikofaktor
- Vorliegen eines Zweitmalignoms

Anhand der Kriterien wurde eine klinische Signifikanz mittels IBM® SPSS Statistics 27 ermittelt. Die Auswertung erfolgte jeweils mittels Kreuztabelle, Chi-Quadrat-Test sowie als Balkendiagramm.

3 Ergebnisse

Nach Immunaффinitätschromatografie und massenspektrometrischer Analyse der isolierten Peptide wurden im Rahmen der Vorarbeit durch Eva-Maria Wolfschmitt unter Supervision von Dr. rer. nat. Lena Freudenmann mittels Datenbankabgleich Quellproteine zugeordnet. Diese wurden im Rahmen der Vorarbeit mittels Abgleichs in der hauseigenen Datenbank als tumorspezifische Quellproteine, sowie mittels direktem Vergleich hochregulierte und herunterregulierte Quellproteine definiert.

Im Folgenden wurden die Quellproteine, der auf Tumorzellen relevant verändert exprimierten Peptide, weitergehend auf ihre Tumorspezifität beziehungsweise Tumorassoziation geprüft. Um eine weitere Eingrenzung möglicher therapeutischer Ansatzpunkte zu erhalten, wurden die Quellproteine relevanten Signaltransduktionswegen zugeordnet. Anhand dieser Daten wurden überrepräsentierte Signaltransduktionswege identifiziert.

Zudem wurde die Kohorte anhand klinischer Merkmale tiefergehend aufgearbeitet. So erfolgte eine Analyse von Patientenalter, Geschlechterverteilung, Tumorstadien, Nikotinabusus, Histologischem Subtyp, Lymphknotenbefall, histologischem Differenzierungsgrad und des Vorliegens eines Zweitmalignoms. Anhand der klinischen Merkmale wurde zudem eine Korrelation zum Vorliegen tumorspezifischer Ligandomveränderungen erhoben.

3.1 Analyse der Patientenkohorte

3.1.1 Erkrankungsalter

Alle Patienten (n=26) wurden im Rahmen der Erstdiagnose zunächst operativ mittels Resektion therapiert, somit kann das Alter bei Operation als Erkrankungsalter betrachtet werden. Das Erkrankungsalter erstreckt sich wie in Abbildung 7 aufgeführt in der Kontrolle von 55 bis 87 Jahren. Im Median zeigt sich ein Erkrankungsalter von 67 Jahren mit einer durchschnittlichen Varianz zwischen dem 61. und 71. Lebensjahr.

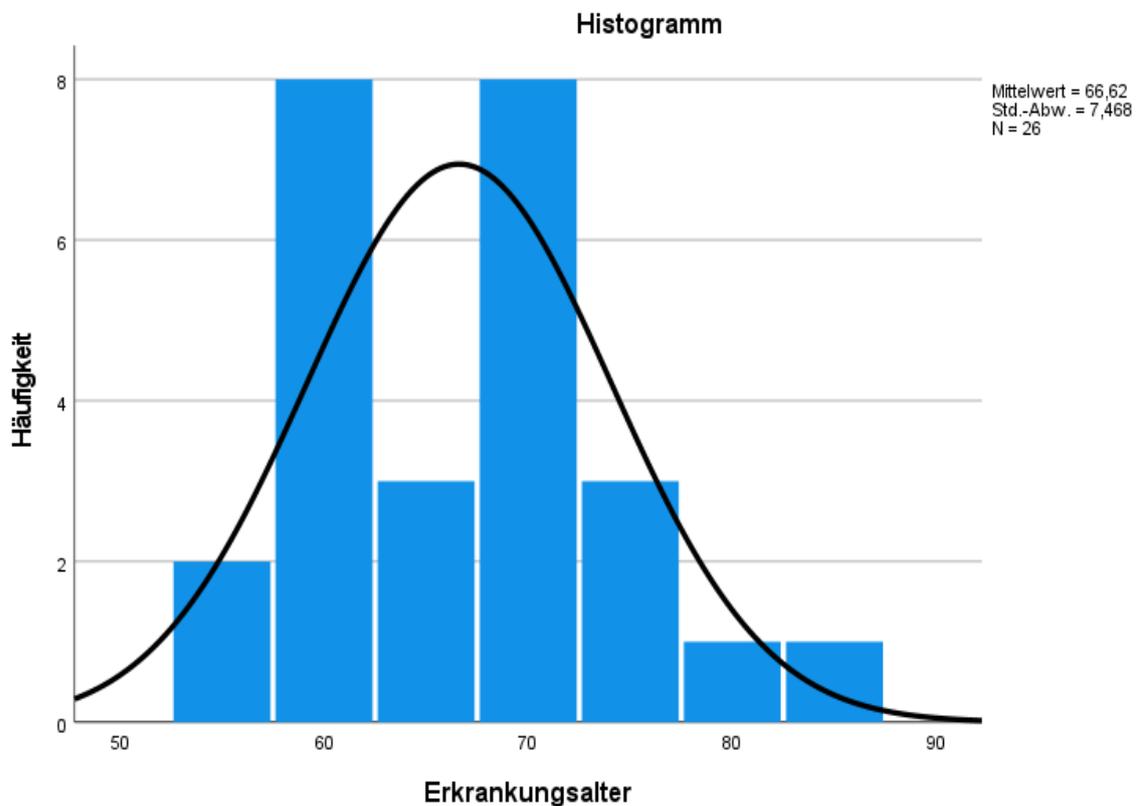


Abbildung 7: Verteilung Patientenalter

Legende: Mittelwert = 66,62, Standard-Abweichung = 7,468, n=26

3.1.2 Geschlechterverteilung

Die Geschlechter sind in der Kohorte nahezu gleich verteilt, wobei mit 58 % ein leichtes Übergewicht für Patienten männlichen Geschlechts (n=15) besteht (vgl. Abbildung 8).

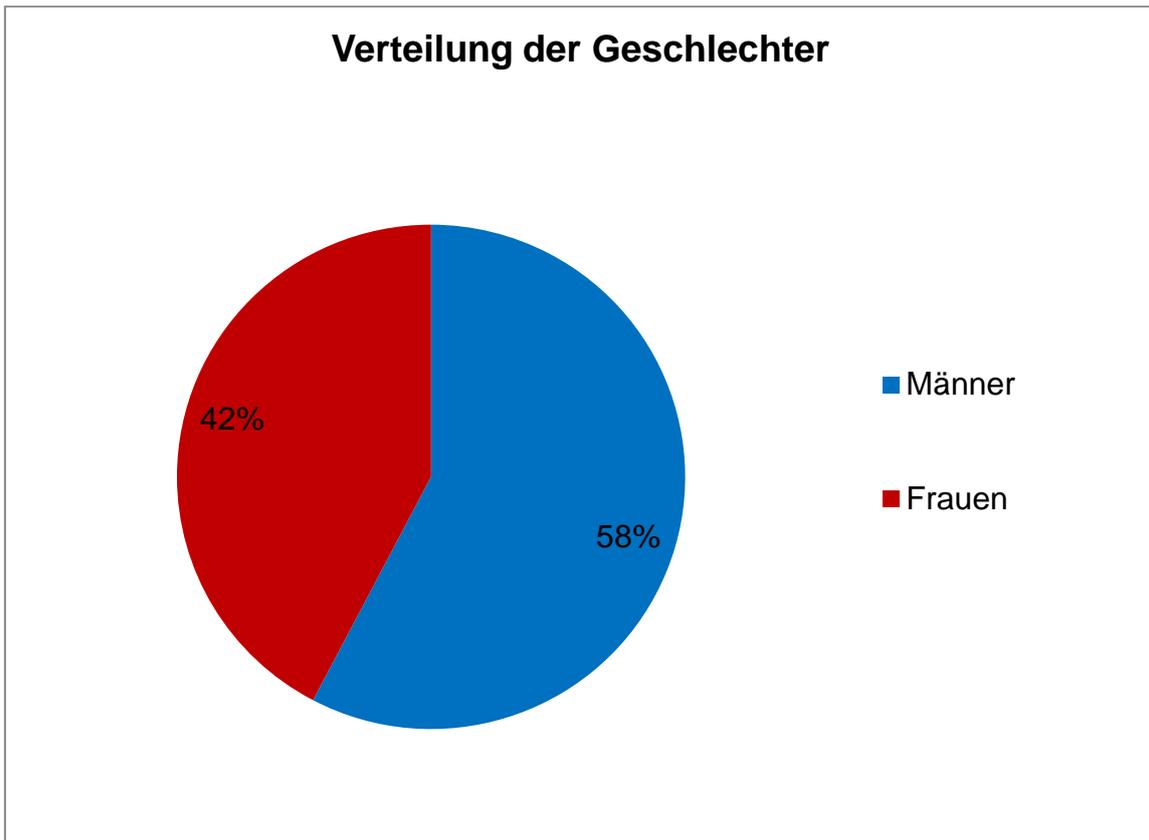


Abbildung 8: Verteilung der Geschlechter in der Patientenkohorte

3.1.3 Tumorstadien

Die postoperativen Tumorstadien der untersuchten Patientenkohorte umfassen frühe und fortgeschrittene Tumorstadien. Aufgrund der Probengewinnung im Rahmen operativer Eingriffe ist das Tumorstadium IV nicht vertreten, da in diesem Fall normalerweise keine Resektion erfolgt. Zusätzlich wurden zur verbesserten Darstellung die UICC 8 (Union internationale contre le cancer) – Stadien IA1-3 bei jeweils n=1 für die Darstellung zusammengefasst. Es zeigen sich somit n=3 Patienten mit einer NSCLC-Erkrankung im Stadium IA (12 %), n=9 Patienten mit einem NSCLC im Stadium IB (36 %). Bei einem Patienten liegt ein Stadium IIA (4 %) vor und bei 8 Patienten ein Stadium IIB (32 %). Das für die Patientenkohorte fortgeschrittenste Stadium IIIA wird bei 4 Patienten (16 %) diagnostiziert. Ein Patient kann aufgrund nicht-erfolgter Lymphadenektomie nicht zugeordnet werden. Eine Aufteilung ist Abbildung 9 zu entnehmen.

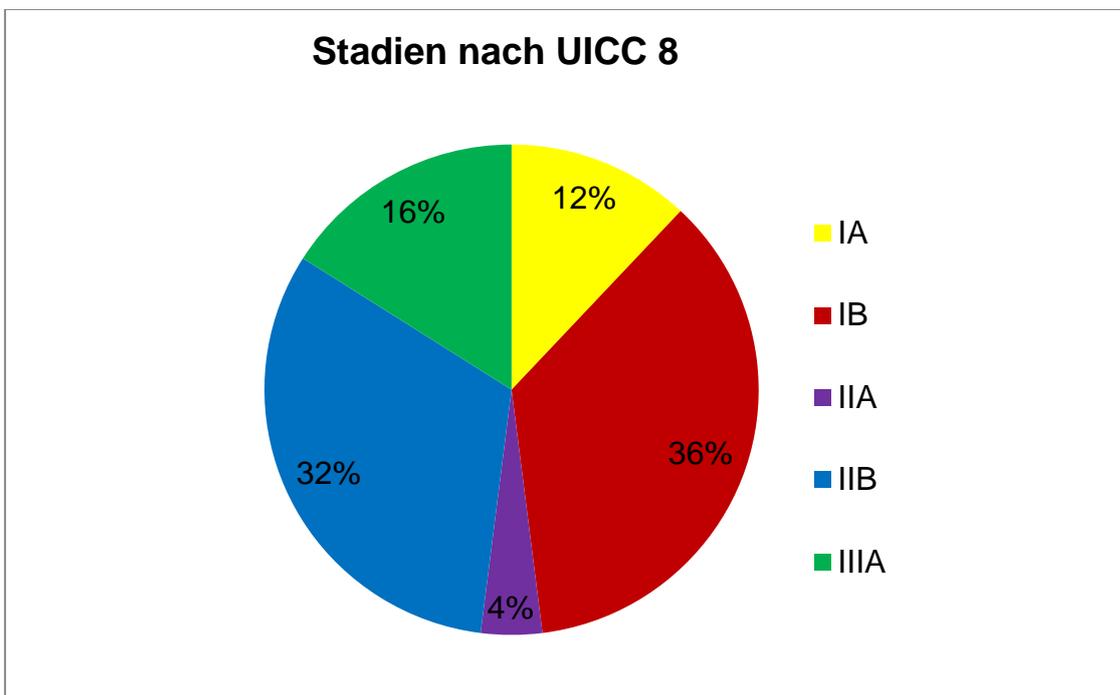


Abbildung 9: Verteilung der Tumorstadien nach UICC 8 in der Patientenkohorte, Stadium IA1-3 zu Stadium IA zusammengefasst

3.1.4 Nikotinabusus

In der Kohorte von 26 Patienten geben 4 Patienten (~15 %) an niemals geraucht zu haben (vgl. Abbildung 10). Aussagen über passiven Nikotinkonsum liegen nicht vor.

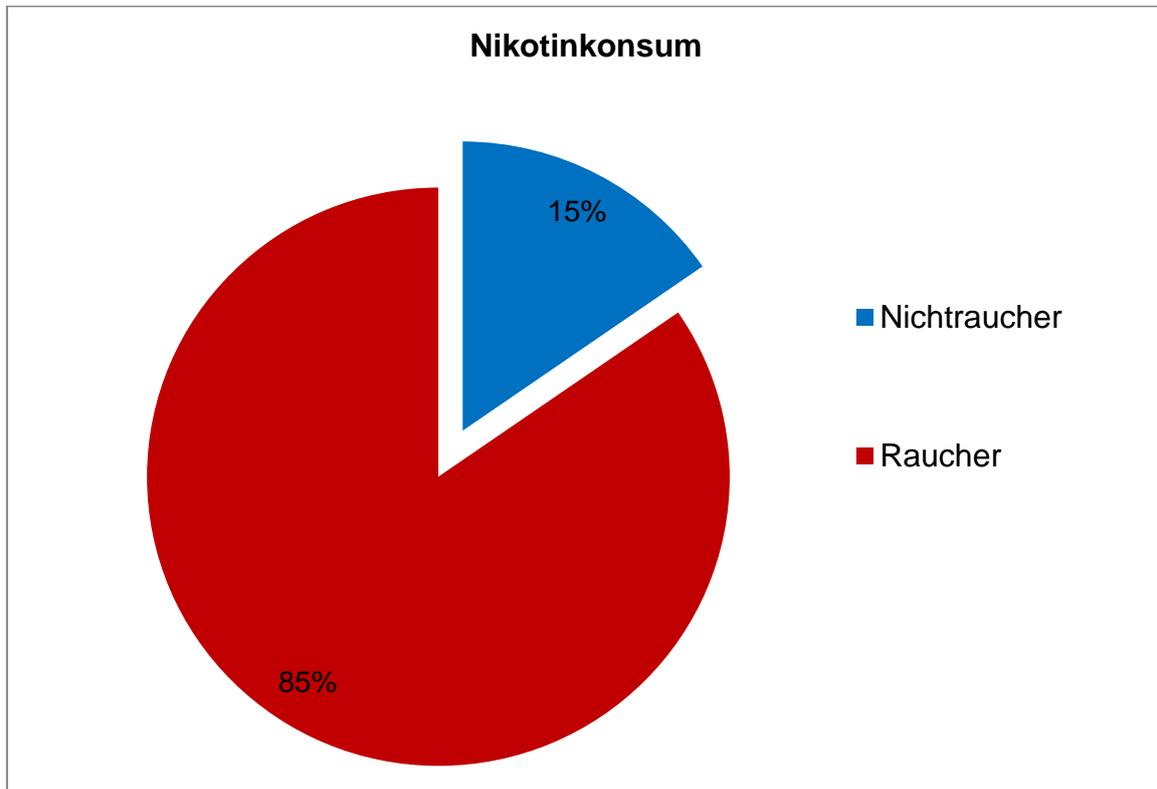


Abbildung 10: Verteilung der Raucher und Nichtraucher in der Patientenkohorte

3.1.5 Histologie

Berücksichtigt man die Histologie, so findet sich in der Patientenkohorte eine paritätische Verteilung. Beschränkt auf die beiden vorliegenden Entitäten des pulmonalen Plattenepithelkarzinoms und des pulmonalen Adenokarzinoms sind jeweils 13 der 26 Patienten an pulmonalen Adenokarzinomen und pulmonalen Plattenepithelkarzinomen erkrankt (siehe Abbildung 11).

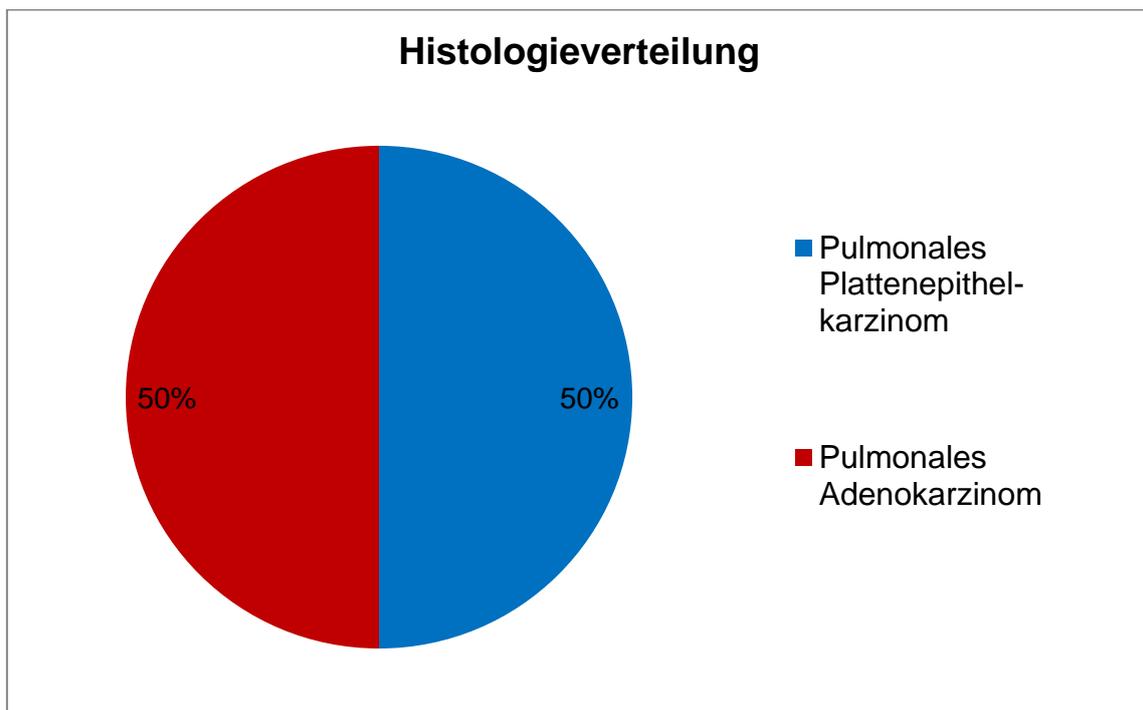


Abbildung 11: Verteilung Histologie in der Patientenkohorte

3.1.6 Lymphknotenbefall

Zur Evaluation der lokalen Metastasierungsrate ist der Lymphknotenbefall relevant. In der Patientenkohorte wurde gemäß histologischen Kriterien bei 7 Patienten (28 %) ein Befall der hilären/lokoregionären Lymphknoten (N1) festgestellt, während bei 18 Patienten (72 %) keine lymphogene Metastasierung gefunden wurde. 1 Patient verweigerte die Lymphadenektomie, sodass keine histologische Diagnostik möglich war (vgl. Abbildung 12). Eine subcarinale oder mediastinale Lymphknotenmanifestation (N2) liegt in der Kohorte nicht vor.

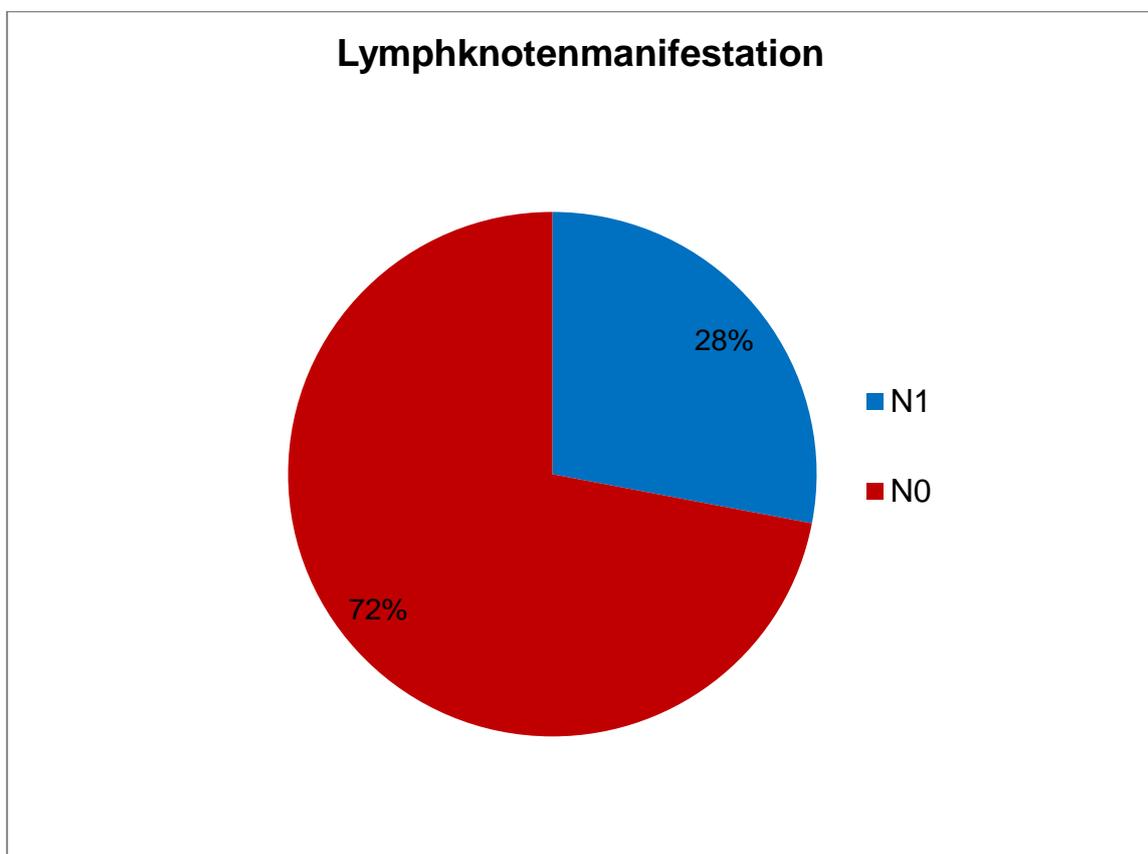


Abbildung 12: Verteilung Lymphknotenbefall

3.1.7 Histologischer Differenzierungsgrad

Klinisch wird zur Abschätzung der Aggressivität einer Tumorerkrankung häufig der histologische Grad der Entdifferenzierung herangezogen. In der vorliegenden Kohorte liegen mit 54 % (n=14) vorwiegend entdifferenzierte Karzinome (G3) vor (siehe Abbildung 13). Bei 42 % (n=11) mäßig differenzierten Karzinomen (G2) kann histologisch lediglich 1 Karzinom (4%) als gut differenziert betrachtet werden.

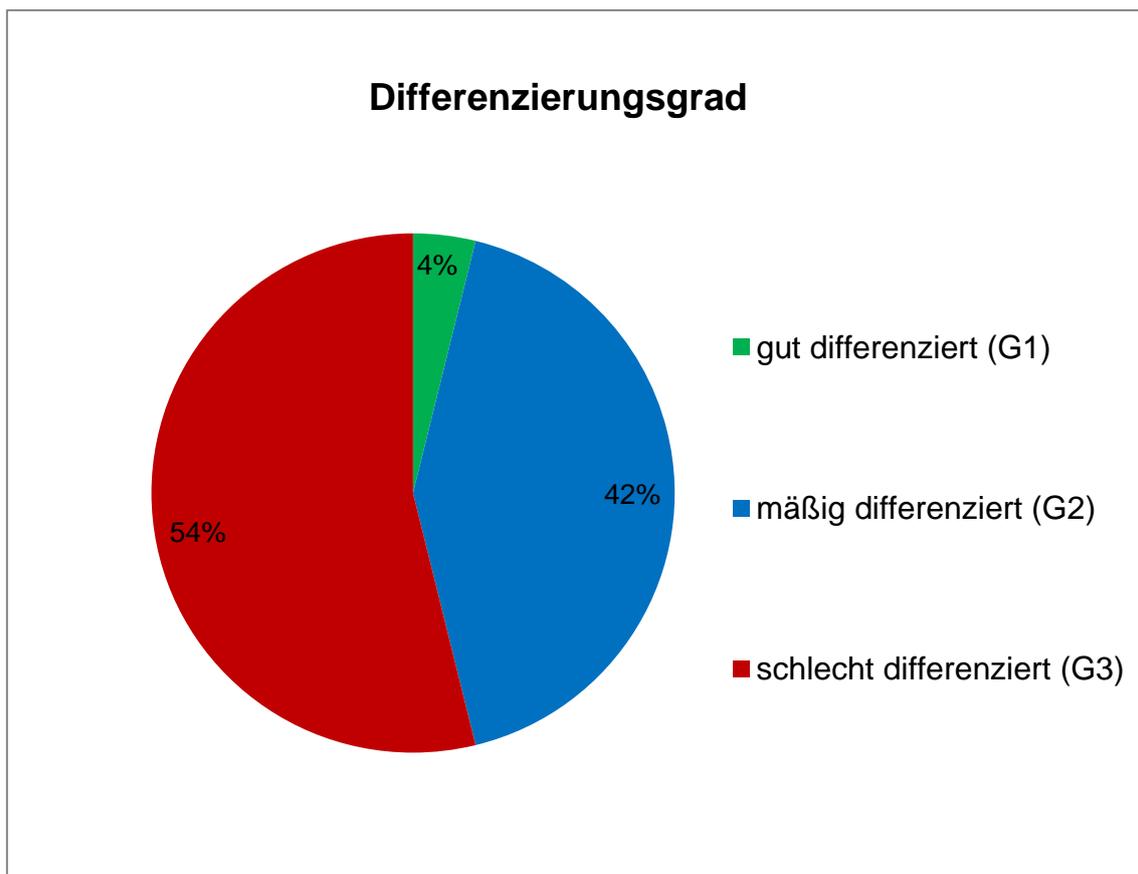


Abbildung 13: Histologischer Differenzierungsgrad

3.1.8 Vorliegen von Zweitmalignomen

Veränderungen in den Signaltransduktionswegen könnten unter Umständen auch durch andere Malignome begünstigt werden, beziehungsweise veränderte Signaltransduktionswege könnten auch andere Malignome begünstigen. In der vorliegenden Kohorte zeigt sich bei 7 Patienten (27 %) ein Zweitmalignom, reichend von hämatologischen Neoplasien wie Chronisch lymphatischer Leukämie bis hin zu Kolon-Karzinomen. Bei jeweils nur singulärem Vorliegen der Zweitkarzinomsentität in der Kohorte wurden diese für weitere Analysen als Zweitmalignome zusammengefasst. Es zeigen sich jedoch entsprechend Abbildung 14 bei den vorliegenden Zweitmalignomen vor allem solide Tumore (n=6, 23 %).

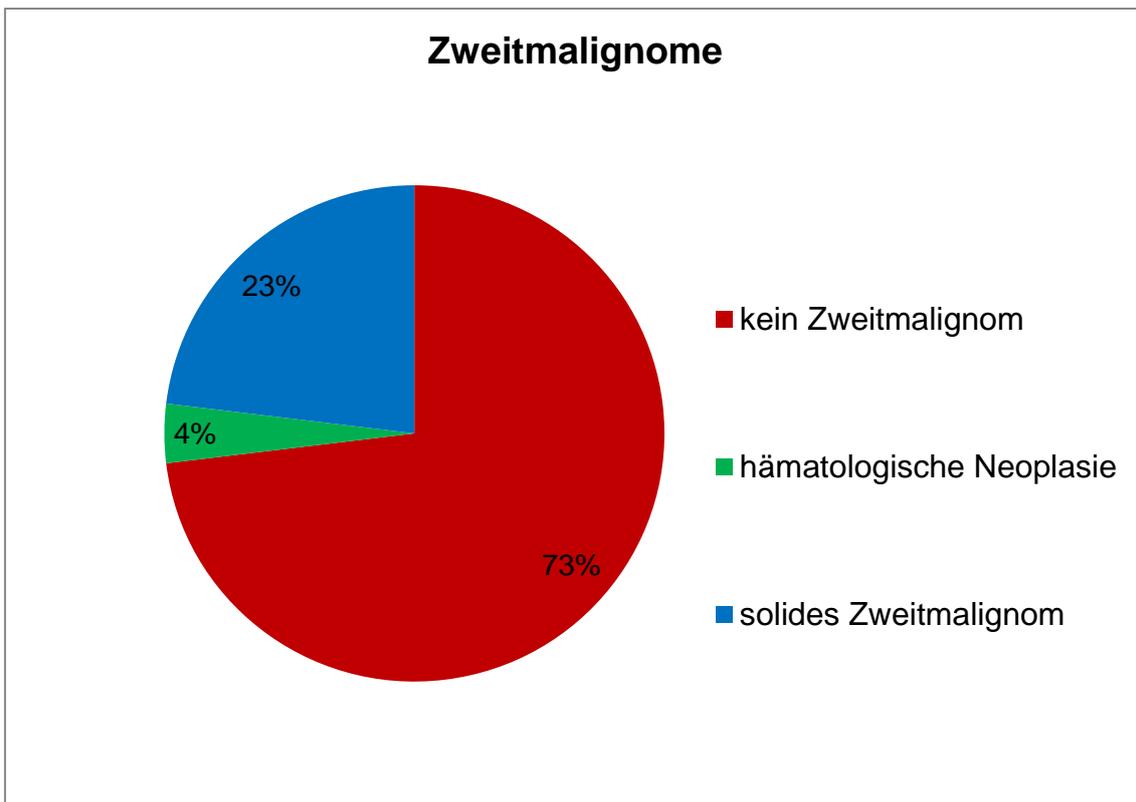


Abbildung 14: Vorliegen von Zweitmalignomen

3.1.9 Krankheitsverlauf

Bei 6 der 26 Patienten (23 %) ist zum Zeitpunkt der Auswertung ein Rezidiv bekannt; dieses ist im Mittel nach 16 Monaten (3-55 Monate) aufgetreten. 5 Patienten (19 %) waren zum Zeitpunkt der Auswertung bereits verstorben, wobei nur bei 4 aufgrund ausgeprägten Rezidivs die Tumorerkrankung als Todesursache bekannt ist. Bei dem fünften Todesfall wurde aufgrund Multimorbidität auf eine Abklärung der genauen Todesursache verzichtet (vgl. Abbildung 15).

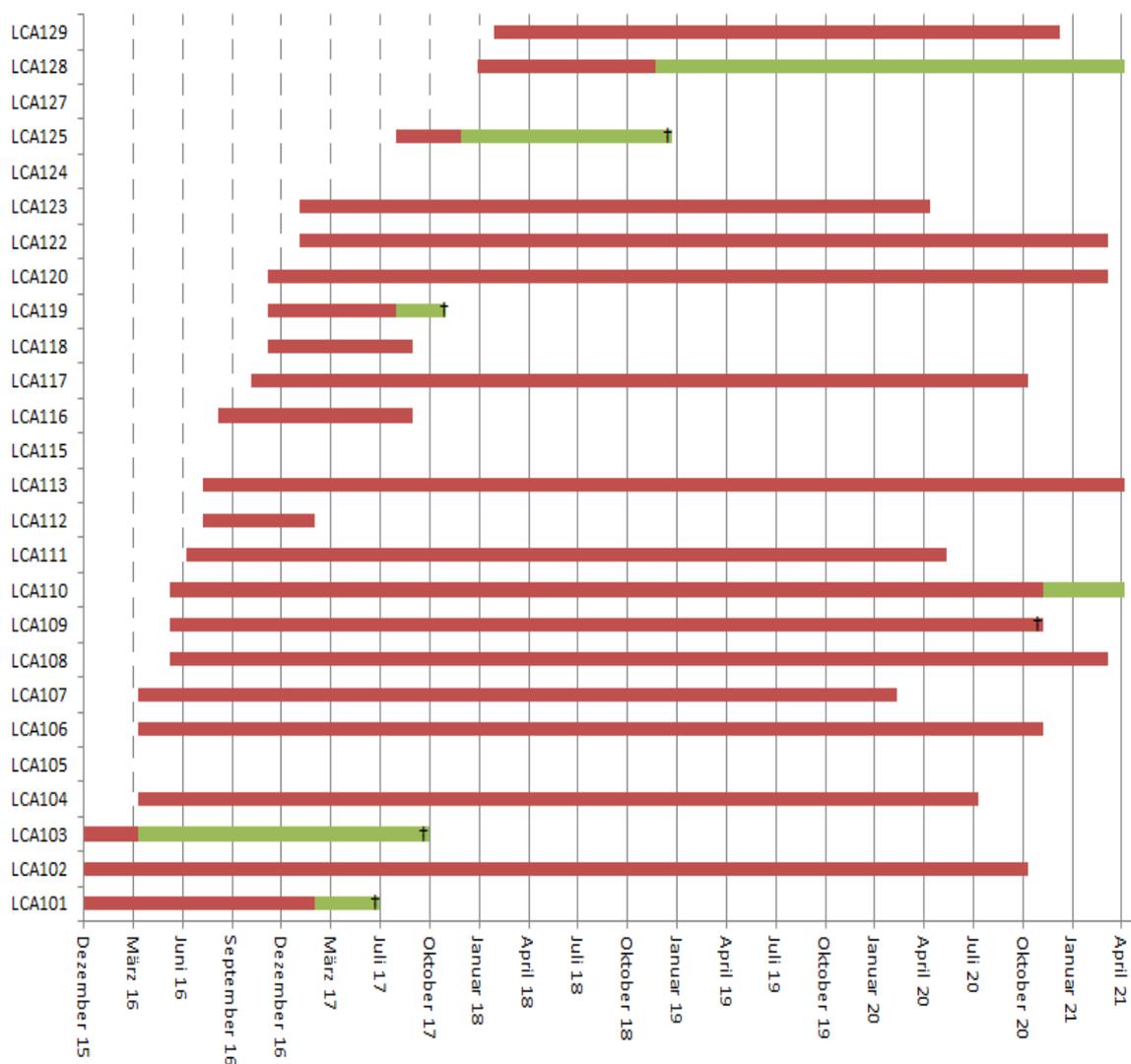


Abbildung 15: Therapieverlauf der Patienten

Legende: rot = rezidivfreie Überlebenszeit, grün = Überlebenszeit mit Rezidiv, † = Todeszeitpunkt

3.2 KEGG-basierte Analyse von Signaltransduktionswegen

3.2.1 Analyse der Signaltransduktionswege tumorspezifischer Antigene bzw. derer Quellproteine mit Vorkommen in mindestens 2 Probenpaaren

In der vorhergehenden Analyse massenspektrometrisch gefundener Peptide waren durch Eva Wolfschmitt unter Supervision durch Dr. rer. nat. Lena Freudenmann mittels Datenbankabgleich Proteine zugeordnet worden, bei deren Abbau die gefundenen Peptide hervorgegangen sind. Diese wurden als isoliert in Tumorproben vorkommende Quellproteine bezeichnet. Einen Überblick der im Vorfeld erfolgten Diagnostik und über das weitere Vorgehen veranschaulicht Abbildung 16. Die Relevanz im Organismus wird anhand der in der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) hinterlegten Daten mittels Zuordnung der Signaltransduktionswege evaluiert. So wird mittels hinterlegter Informationen über Stoffwechselwege, Strukturen von Biomolekülen, Reaktionsgleichungen, Medikamenten und Genen die Bedeutung der gefundenen Quellproteine weitergehend evaluiert.

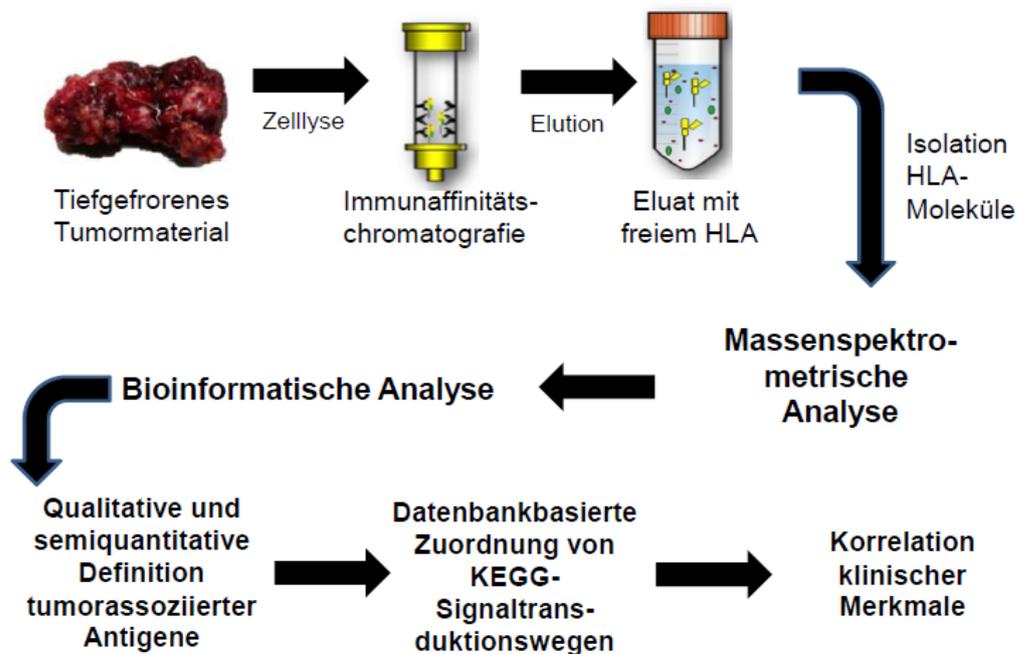


Abbildung 16: Schematische Abbildung der Ligandomanalyse und nachfolgenden Datenbankbasierten Aufbereitung; modifiziert nach: www.dktk.dkfz.de [206]

3.2.1.1 Betroffene KEGG- Signaltransduktionswege

In der Analyse der KEGG-Signaltransduktionswege zeigen sich durch die tumorspezifische Expression in mindestens 2 Probenpaaren insgesamt 106 Signaltransduktionswege betroffen. Ein Quellprotein (Q5VWM6- PRAME family member 1/13 (PRAMEF1; PRAME13)), kann nicht zugeordnet werden. Für 11 weitere Proteine kann kein betroffener KEGG- Signaltransduktionsweg zugeordnet werden (Tabelle 9).

Protein	Name
P43357	Melanoma-associated antigen 3 (MAGEA3)
O60479	Homeobox protein DLX-3 (DLX3)
O95521	PRAME family member 1/13 (PRAMEF1; PRAME13)
P43360	Melanoma-associated antigen 6 (MAGEA6)
Q6UXD7	Major facilitator superfamily domaincontainingprotein 7
Q6UXY8	Transmembrane channel-like protein 5 (TMC5)
Q8N539	Fibrinogen C domain-containing protein 1 (FIBCD1)
Q9BSH3	Nicolin-1 (NICN1)
Q9H0B8	Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2 (CRISPI D2)
Q9NV64	Transmembrane protein 39A (TMEM39A)
Q9P0J7	E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1 (KCMF1)

Tabelle 9: Quellproteine ohne Zuordnung zu betroffenen KEGG-Signaltransduktionswege

3.2.1.2 Zuordnung betroffener KEGG- Signaltransduktionswege

Ordnet man den betroffenen Signaltransduktionswege Hauptgruppen wie Karzinom-Assoziation, Medikamenten-Metabolismus, Verarbeitung genetischer Informationen, Erkrankungen des Menschen, Organismussysteme, Signalwegen des metabolischen Stoffwechsels oder zellulären Prozessen zu, so zeigen sich vorrangig Karzinom-assoziierte Signaltransduktionswege sowie Signaltransduktionswege mit Assoziation von Organismussystemen betroffen (Abbildung 17).

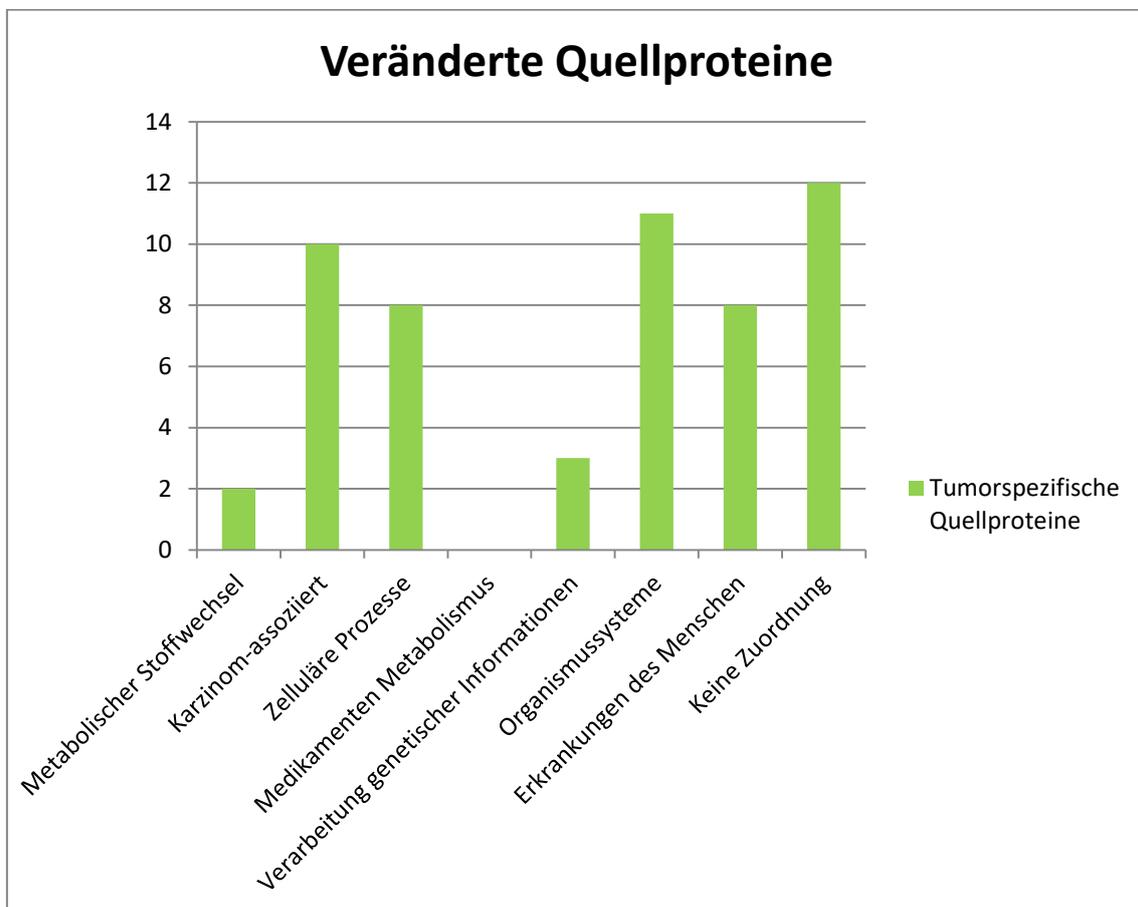


Abbildung 17: Zuordnung betroffener tumorspezifischer Quellproteine nach Kategorie der KEGG-Signaltransduktionswege

Viele Proteine treten jedoch nicht nur in einem der Signaltransduktionswege in Erscheinung. Meist werden mehrere Signaltransduktionswege getroffen, was besonders bei Signaltransduktionswegen mit Assoziation zu Erkrankungen des Menschen und Karzinom-assoziierten auffällt (Abbildung 18).

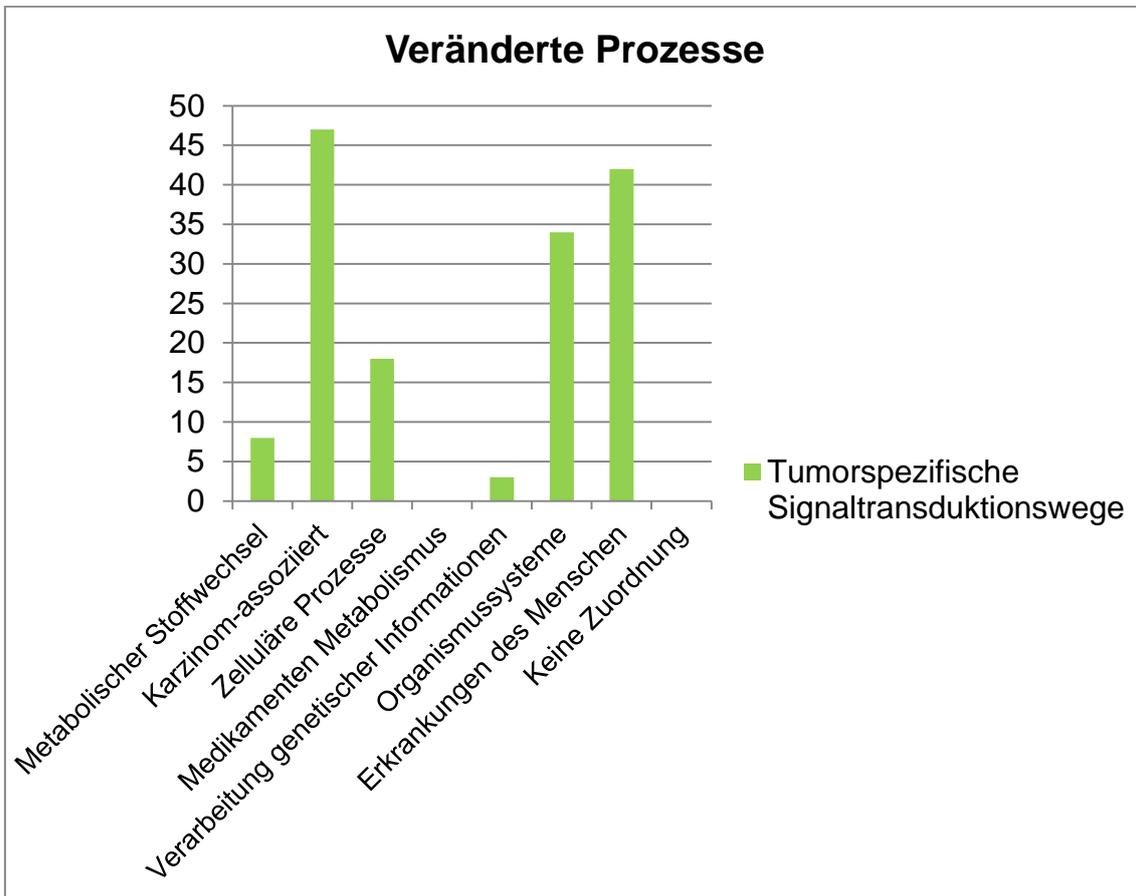


Abbildung 18: Zuordnung betroffener Prozesse nach Kategorie der KEGG-Signaltransduktionswege

Betrachtet man zusätzlich die Prozesse Karzinom-assoziiierter Signaltransduktionswege, so fällt insbesondere die deutliche Überexpression von Proteinen mit Relevanz in Prozessen der Tumorpromotion auf (Abbildung 19, Abbildung 20).

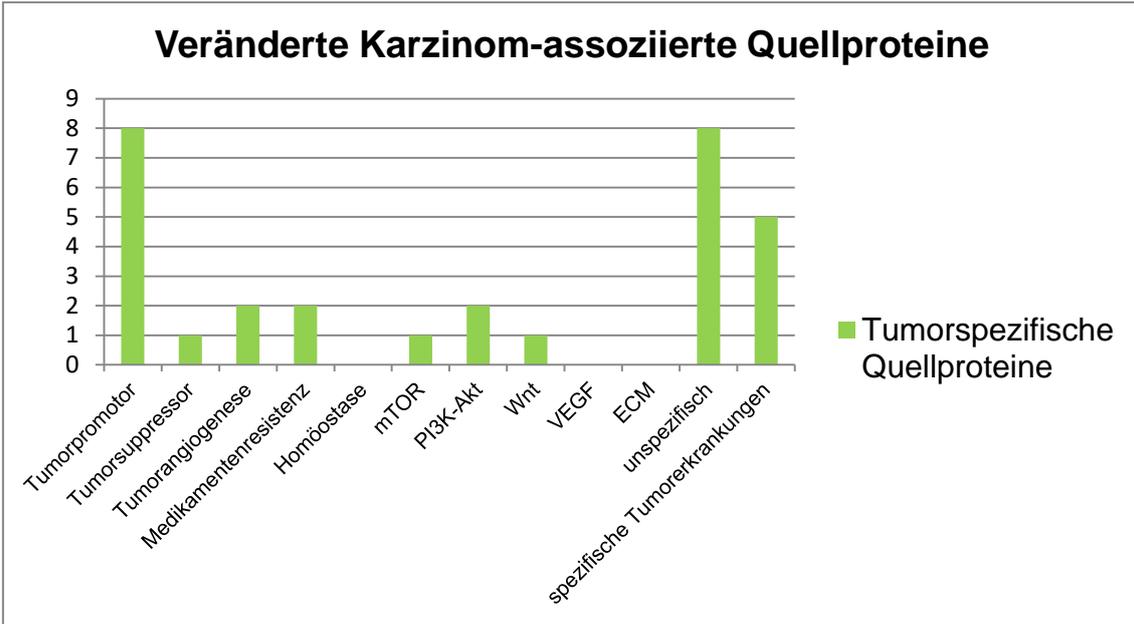


Abbildung 19: Zuordnung betroffener tumorspezifischer Quellproteine nach Unterkategorie der Karzinom-assoziierten KEGG-Signaltransduktionswege

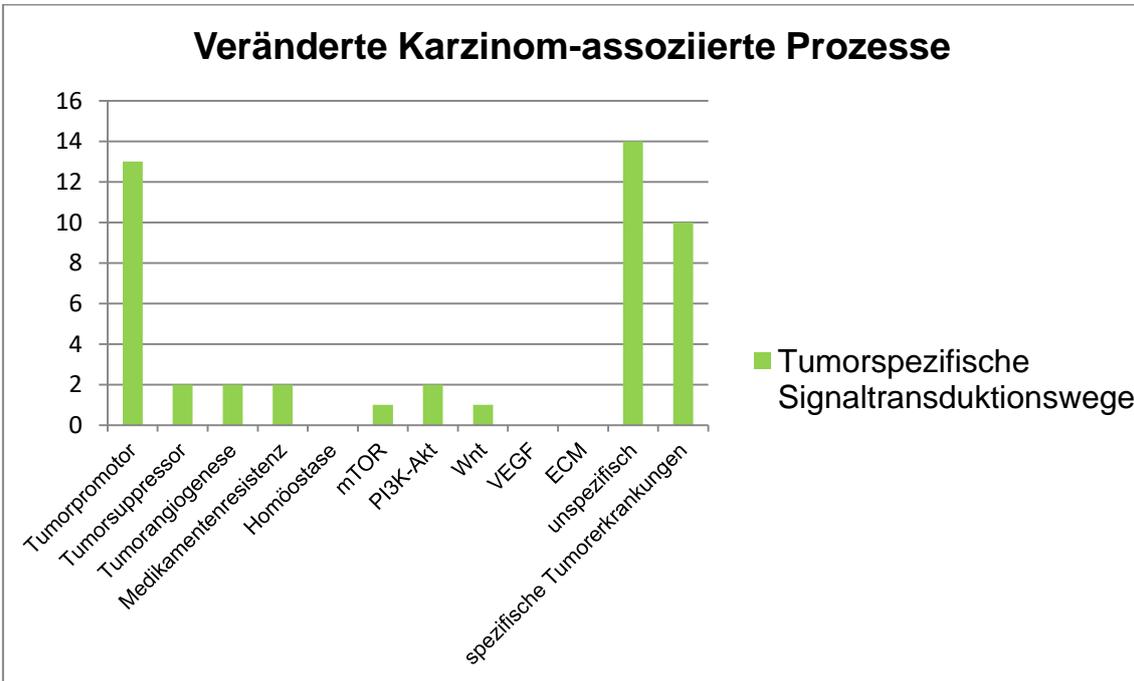


Abbildung 20: Zuordnung betroffener Prozesse nach Unterkategorie der Karzinom-assoziierten KEGG-Signaltransduktionswege

3.2.2 Analyse der Signaltransduktionswege semi-quantitativ hoch-regulierter Quellproteine

In der vorhergehenden Analyse massenspektrometrisch gefundener Peptide war durch Eva Wolfschmitt unter Supervision durch Dr. rer. nat. Lena Freudenmann mittels *Volcano plotting* eine Liste überexprimierter Quellproteine erstellt worden.

3.2.2.1 Betroffene KEGG- Signaltransduktionswege

In der Analyse der KEGG- Signaltransduktionswege zeigen sich durch die Hochregulation insgesamt 133 Signaltransduktionswege betroffen.

Zwei Quellproteine (P04434-Ig kappa chain V-III region VH (Fragment)], sowie Q8NHW5-60S acidic ribosomal protein P0-like) konnten nicht zugeordnet werden. Für 5 weitere Quellproteine (Q96D15-Reticulocalbin-3, Q53EP0-Fibronectin type III domain-containing protein 3B, Q8N766-ER membrane protein complex subunit 1, O14682- Ectoderm-neural cortex protein 1, O95994-Anterior gradient protein 2 homolog) konnte kein betroffener KEGG-Signaltransduktionsweg zugeordnet werden.

3.2.2.2 Zuordnung betroffener KEGG- Signaltransduktionswege

Ordnet man die betroffenen Signaltransduktionswege Hauptgruppen wie Karzinom-Assoziation, Medikamenten-Metabolismus, Verarbeitung genetischer Informationen, Erkrankungen des Menschen, Organismussystemen, Signalwegen des metabolischen Stoffwechsels oder zellulären Prozessen zu, so zeigen sich vorrangig KEGG- Signaltransduktionswege hochreguliert, die bei Erkrankungen des Menschen eine Rolle spielen. Zusätzlich sind entsprechend der hochregulierten Proteine Signaltransduktionswege mit Karzinom-Assoziation, Organismussystemen und zellulären Prozessen betroffen (Abbildung 21).

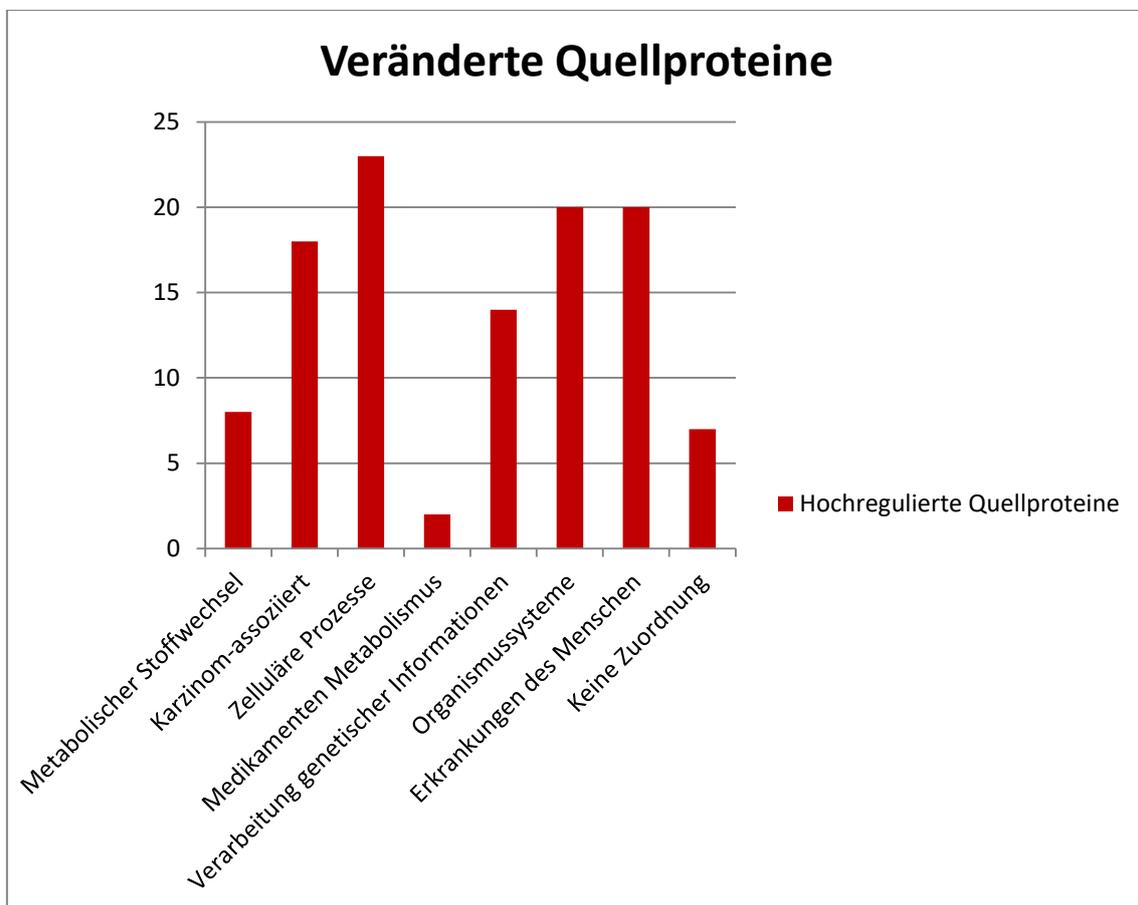


Abbildung 21: Zuordnung betroffener hochregulierter Quellproteine nach Kategorie der KEGG-Signaltransduktionswege

Auch hier treten viele Proteine jedoch nicht nur singulär in ausschließlich einem der Signaltransduktionswege in Erscheinung. Meist sind mehrere Signaltransduktionswege betroffen. Dies fällt besonders bei Signaltransduktionswegen auf, die zu menschlichen Erkrankungen oder Karzinomen assoziiert sind (Abbildung 22).

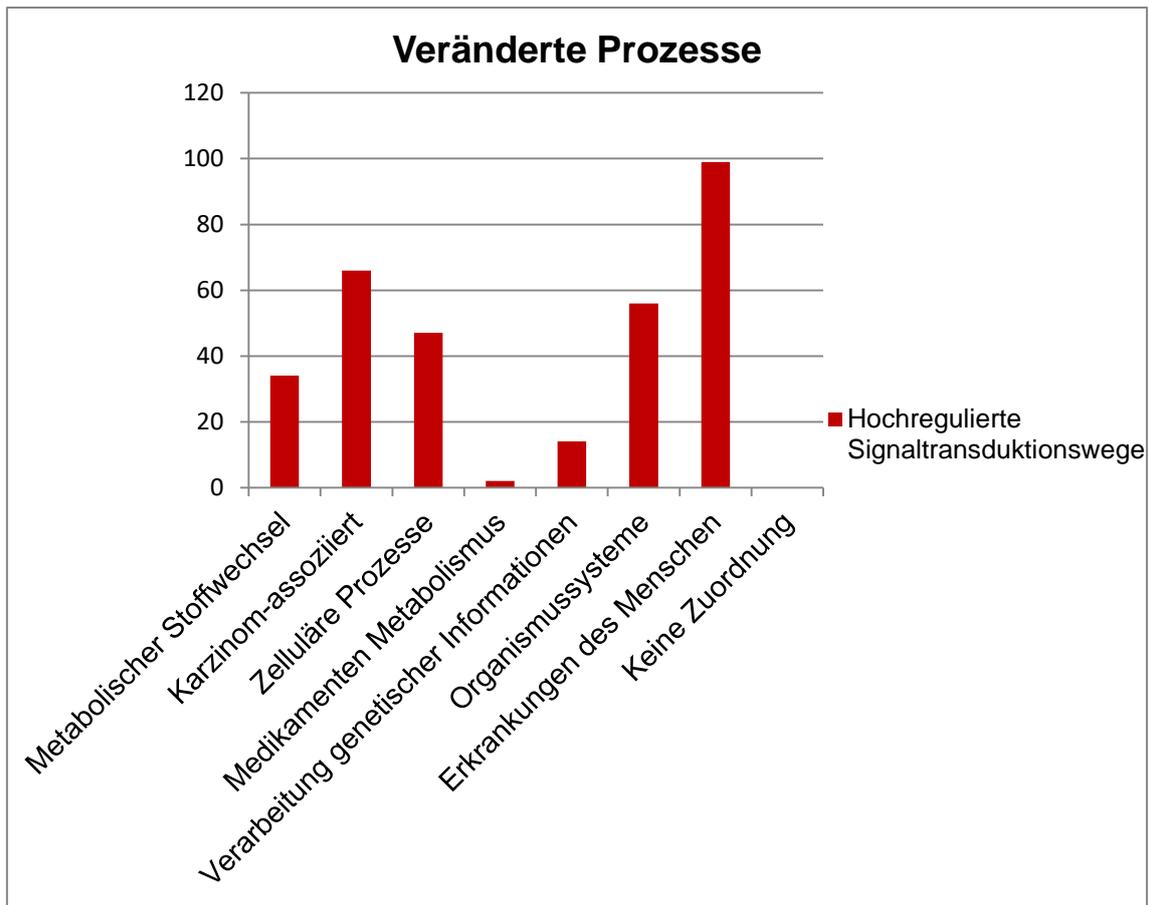


Abbildung 22: Zuordnung betroffener Prozesse nach Kategorie der KEGG-Signaltransduktionswege

Betrachtet man zusätzlich die Prozesse Karzinom-assoziiierter Signaltransduktionswege, so fällt insbesondere die deutliche Überexpression von Proteinen mit Relevanz als Tumorpromotor oder für den PI3K-Akt-Signaltransduktionsweg sowie den ECM-Rezeptor Signaltransduktionsweg auf (Abbildung 23, Abbildung 24).

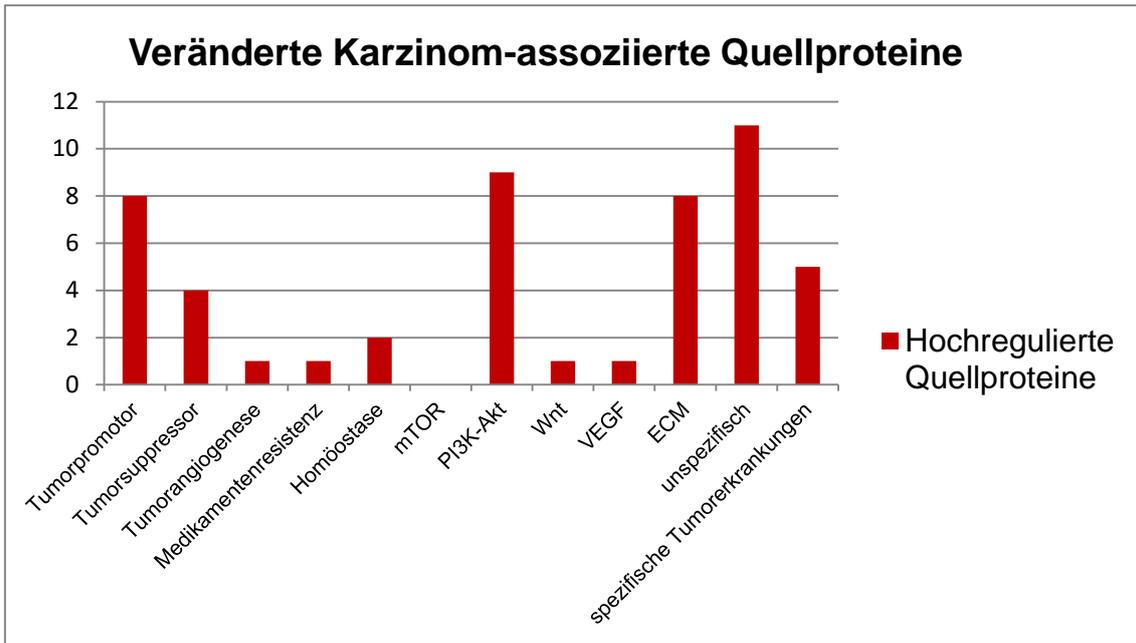


Abbildung 23: Zuordnung betroffener Proteine nach Unterkategorie der Karzinom-assozierten KEGG-Signaltransduktionswege

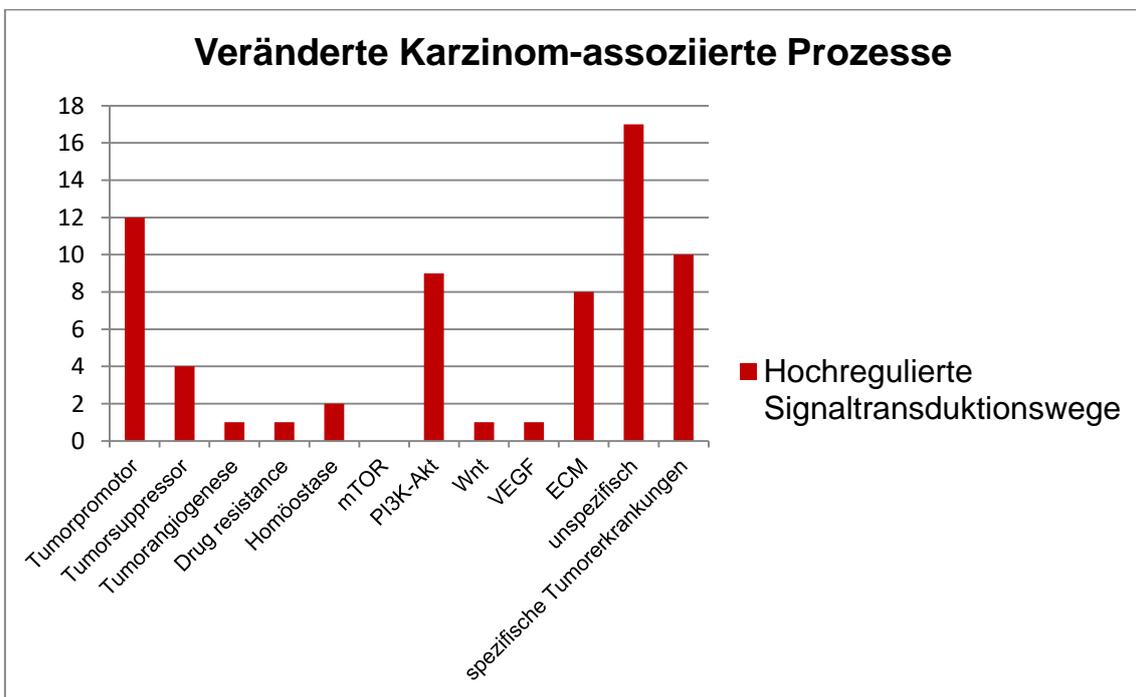


Abbildung 24: Zuordnung betroffener Prozesse nach Unterkategorie der Karzinom-assozierten KEGG-Signaltransduktionswege

3.2.3 Analyse der Signaltransduktionswege semi-quantitativ herunterregulierter Quellproteine

3.2.3.1 Betroffene KEGG-Signaltransduktionswege

In der Analyse der KEGG-Signaltransduktionswege semi-quantitativ herunterregulierter Quellproteine zeigen sich durch die Herunterregulation insgesamt 194 Signaltransduktionswege betroffen. Ein Quellprotein (Q9BYB0-SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3) kann nicht zugeordnet werden. Für 9 weitere Proteine (Q9H4X1- Regulator of cell cycle RGCC, O94915- Protein furry homolog-like, O95236-Apolipoprotein L3, Q63HR2-Tensin-like C1 domain-containing phosphatase, Q8IZF2- Probable G-protein coupled receptor 116, Q9BXM0- Periaxin, Q9UNW9-RNA-binding protein Nova-2, Q9UPQ0-LIM and calponin homology domains-containing protein und Q63HR2-Tensin-like C1 domain-containing phosphatase) kann kein betroffener KEGG-Signaltransduktionsweg zugeordnet werden.

3.2.3.2 Zuordnung betroffener KEGG-Signaltransduktionswege

Ordnet man die betroffenen Signaltransduktionswege Hauptgruppen wie Karzinom-Assoziation, Medikamenten-Metabolismus, Verarbeitung genetischer Informationen, Erkrankungen des Menschen, Organismussystemen, Signalwegen des metabolischen Stoffwechsels oder zellulären Prozessen zu, so zeigen sich vorrangig KEGG-Signaltransduktionswege herunterreguliert, die bei Tumorerkrankungen eine Rolle spielen. Zusätzlich sind entsprechend der herunterregulierten Proteine Signaltransduktionswege mit Assoziation zu Organismussystemen, Erkrankungen des Menschen und zellulären Prozessen betroffen (Abbildung 25).

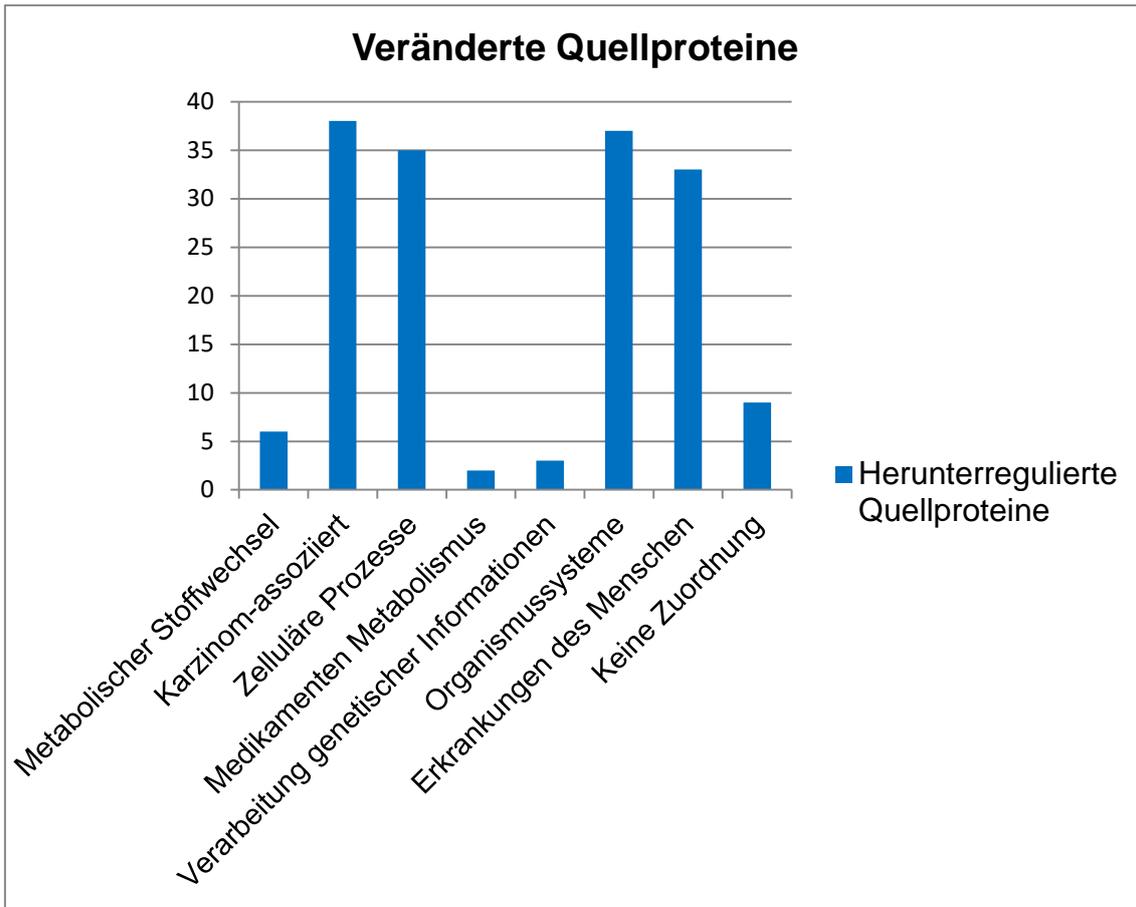


Abbildung 25: Zuordnung betroffener herunterregulierter Quellproteine nach Kategorie der KEGG-Signaltransduktionswege

Auch hier treten viele Proteine jedoch nicht nur singulär in einem bestimmten Signaltransduktionsweg in Erscheinung. Meist sind mehrere Signaltransduktionswege betroffen, was besonders bei Karzinom-assoziierten Signaltransduktionswegen auffällt (Abbildung 26).

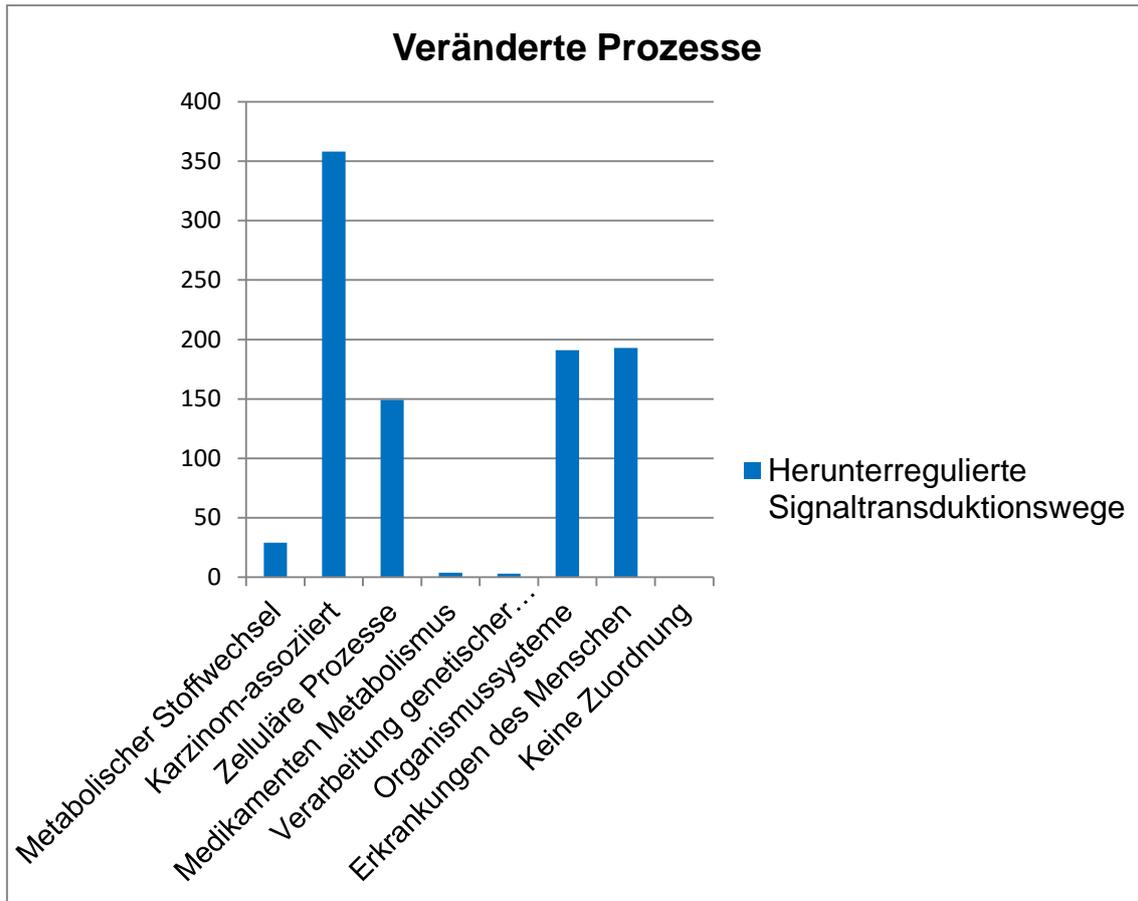


Abbildung 26: Zuordnung betroffener Prozesse nach Kategorie der KEGG-Signaltransduktionswege

Betrachtet man zusätzlich die Prozesse Karzinom-assoziiertes Signaltransduktionswege, so fällt insbesondere die deutlich reduzierte Expression von Proteinen mit Relevanz als Tumorsuppressor auf, aber auch Tumorpromotoren, der PI3K-Akt-Signaltransduktionsweg und die Medikamentenresistenz scheinen von der Herunterregulation betroffen (Abbildung 27, Abbildung 28).

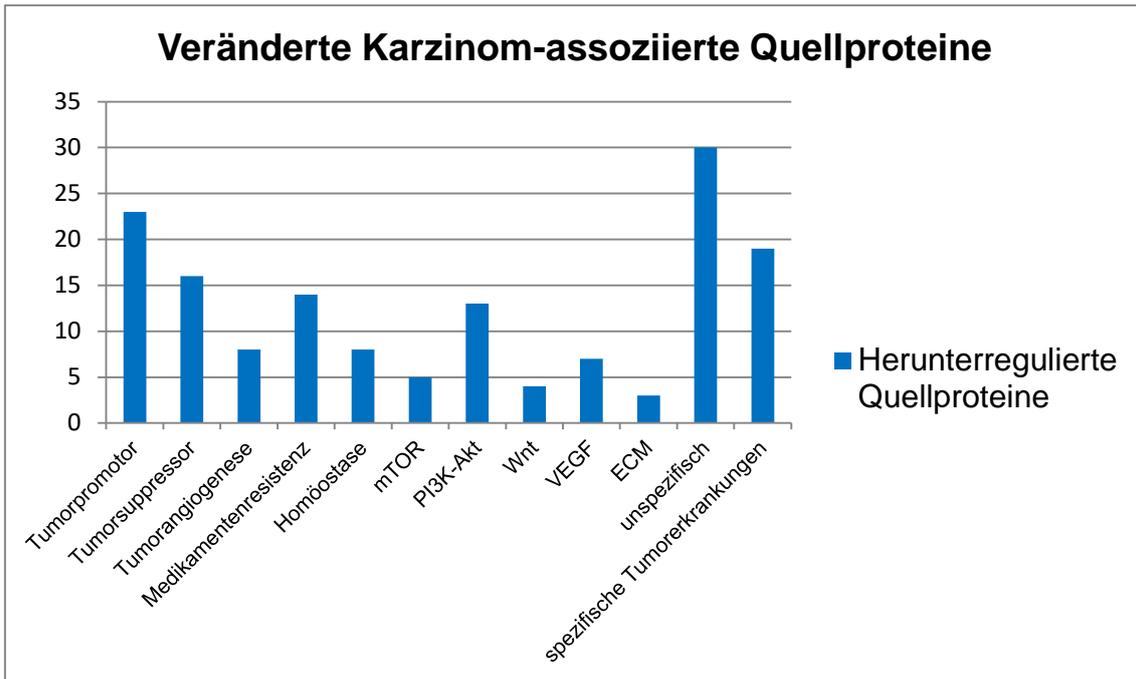


Abbildung 27: Zuordnung betroffener herunterregulierter Quellproteine nach Unterategorie der Karzinom-assoziierten KEGG-Signaltransduktionswege

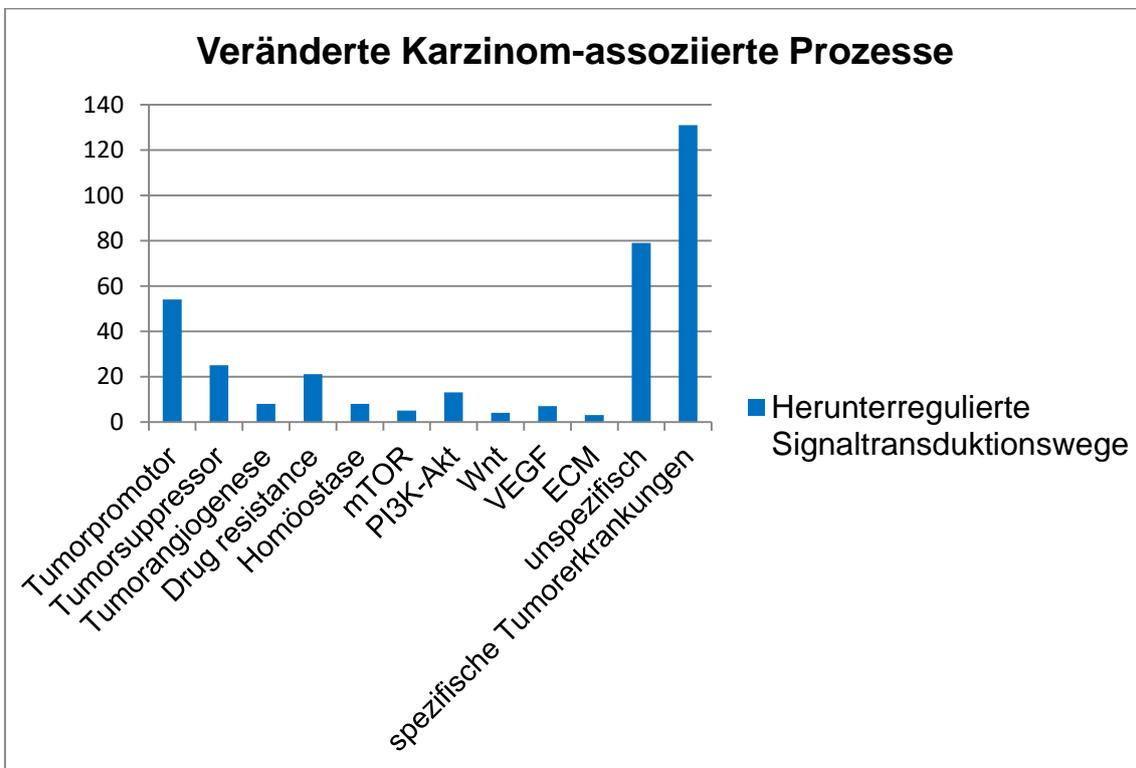


Abbildung 28: Zuordnung betroffener Prozesse nach Unterategorie der Karzinom-assoziierten KEGG-Signaltransduktionswege

3.3 Aufarbeitung relevanter Quellproteine in Korrelation zur Patientenkohorte

3.3.1 Aufarbeitung tumorspezifischer Quellproteine in Korrelation zur Patientenkohorte

Insgesamt wurde bei der Bestimmung tumorspezifischer Antigene in der Patientenkohorte nur ein Quellprotein (P43357- Melanoma-associated antigen 3 (MAGEA3) in 4 Probenpaaren in der Tumorprobe und nicht in der korrelierenden Normalgewebeprobe gefunden. Weitere tumorspezifische Quellproteine wurden in maximal 3 Probenpaaren als tumorspezifisch festgestellt. Eine Aussage zur Signifikanz gegenüber klinischen Daten kann somit aufgrund der sehr geringen Probengröße nicht festgestellt werden.

3.3.2 Korrelation der in ≥ 10 Probenpaaren semi-quantitativ hochregulierten Quellproteine gegenüber klinischen Daten

Beschrieben werden im Verlauf signifikante Korrelationen zu klinischen Daten. Die Darstellung erfolgt jeweils mittels Kreuztabelle, Chi-Quadrat-Test sowie als Balkendiagramm.

3.3.2.1 Histologie

Korreliert man die Überexpression der in mindestens 10 Vergleichspaaren semi-quantitativ hochregulierten Quellproteine mit den klinischen Daten, so zeigt sich in Korrelation zur Histologie für P12110 (Collagen alpha-2(VI) chain) eine relevant höhere Überexpression bei Plattenepithelkarzinomen (Tabelle 10, Tabelle 11 und Abbildung 29).

		Histologie		Gesamt
		Pulmonales Plattenepithelkarzinom	Pulmonales Adenokarzinom	
P12110	nicht hochreguliert	4	7	11
	hochreguliert	8	2	10
Gesamt		12	9	21

Tabelle 10: Kreuztabelle Histologie P12110

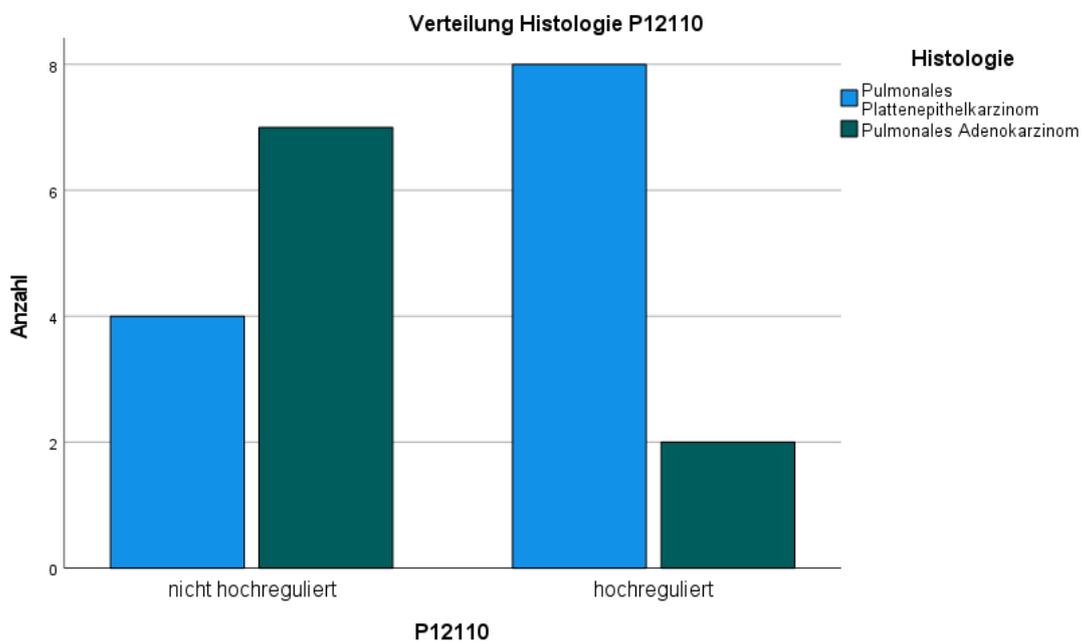


Abbildung 29: Verteilung von hochreguliertem P12110 nach Histologie

Chi-Quadrat-Tests		
	Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	4,073 ^a	0,044
Anzahl der gültigen Fälle	21	

a. 2 Zellen (50%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,29.

Tabelle 11: Signifikanz der P12110 Hochregulation zur Histologie

3.3.2.2 Geschlecht

Relevante Geschlechtsunterschiede bezüglich der Überexpression zeigen sich in der Kohorte für P42766 (60S ribosomal protein L35) zugunsten einer Überexpression bei Tumorproben männlicher Patienten (Tabelle 12, Tabelle 13 und Abbildung 30).

		Geschlecht		Gesamt
		Mann	Frau	
P42766 6	nicht hochreguliert	4	6	10
	hochreguliert	9	2	11
Gesamt		13	8	21

Tabelle 12: Kreuztabelle Geschlecht P42766

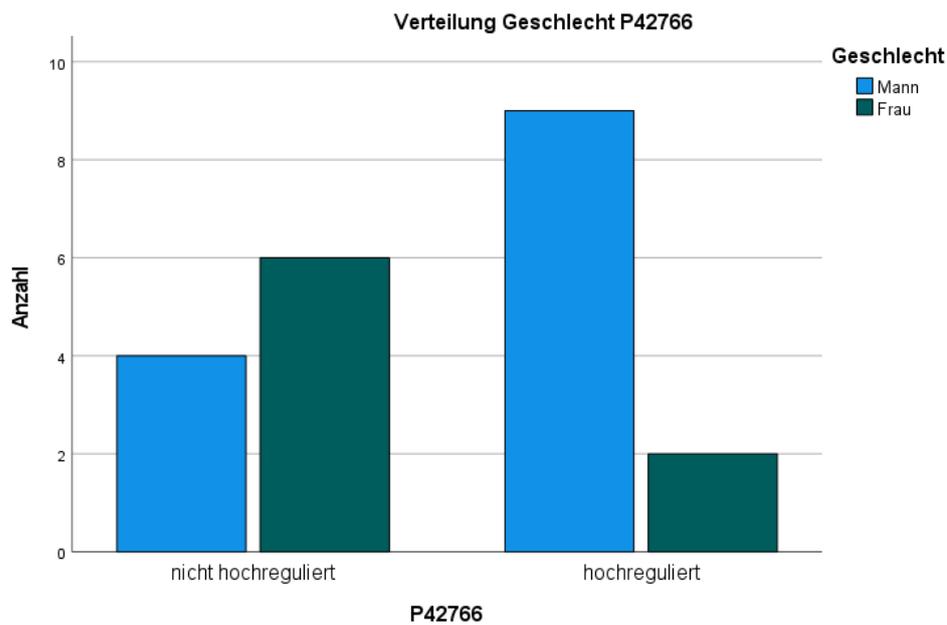


Abbildung 30: Verteilung von hochreguliertem P42766 nach Geschlecht

Chi-Quadrat-Tests		
	Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	3,884 ^a	0,049
Anzahl der gültigen Fälle	21	

a. 2 Zellen (50%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,81.

Tabelle 13: Signifikanz der P42766 Hochregulation zur Geschlechtsverteilung

3.3.2.3 Lymphknotenbefall

Ein fortgeschrittener Lymphknotenbefall scheint einen signifikanten Risikofaktor für eine Überexpression von Q99715 (Collagen alpha-1(XII) chain) darzustellen (Tabelle 14, Tabelle 15 und Abbildung 31).

		Lymphknotenbefall		Gesamt
		N0	N1	
Q99715	nicht hochreguliert	8	0	8
	hochreguliert	7	5	12
Gesamt		15	5	20

Tabelle 14: Kreuztabelle Q99715 und Lymphknotenbefall

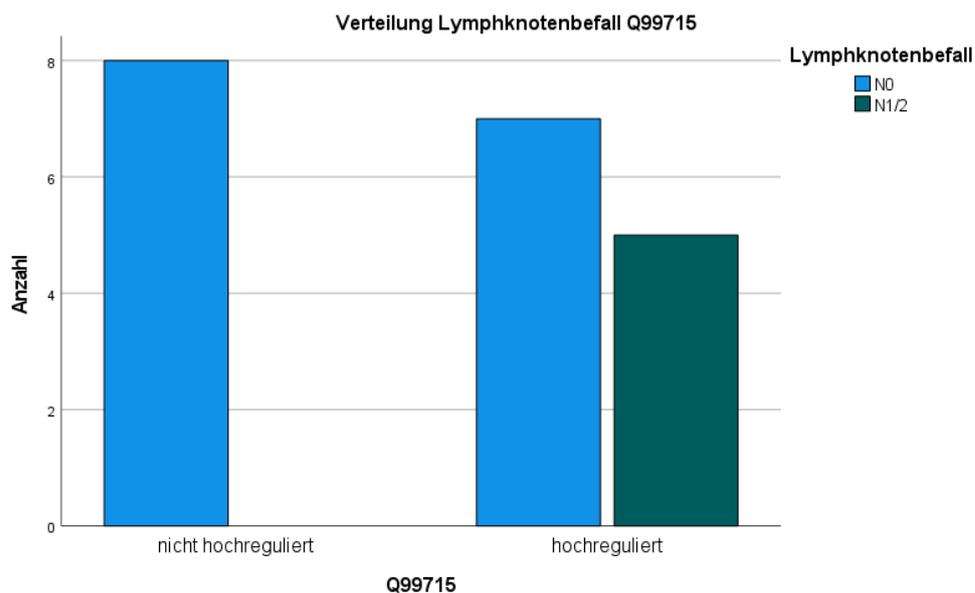


Abbildung 31: Verteilung von hochreguliertem Q99715 nach Lymphknotenbefall

Chi-Quadrat-Tests		
	Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	4,444 ^a	0,035
Anzahl der gültigen Fälle	20	
a. 2 Zellen (50%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,00.		

Tabelle 15: Signifikanz der Q99715 Hochregulation zum Lymphknotenbefall

3.3.2.4 Nikotinkonsum, Zweitmalignome

Im Vergleich der Nikotinexposition zur Darstellbarkeit relevant überexprimierter Proteine zeigt sich in der untersuchten Patientenkohorte keine signifikante Möglichkeit der Zuordnung. Auch zu bekannten Zweitmalignomen ist keine signifikante Assoziation erkennbar.

3.3.2.5 Differenzierungsgrad

Bei Karzinomen mit guter Differenzierung (G1) zeigt sich eine signifikant erhöhte Rate an Überexpression des Proteins Q5VWP2 (Protein FAM46C) (Tabelle 16, Tabelle 17 und Abbildung 32).

		Differenzierungsgrad		Gesamt
		G1/2	G3	
Q5VWP2	nicht hochreguliert	2	9	11
	hochreguliert	7	3	10
Gesamt		9	12	21

Tabelle 16: Kreuztabelle Q5VWP2 und Differenzierungsgrad

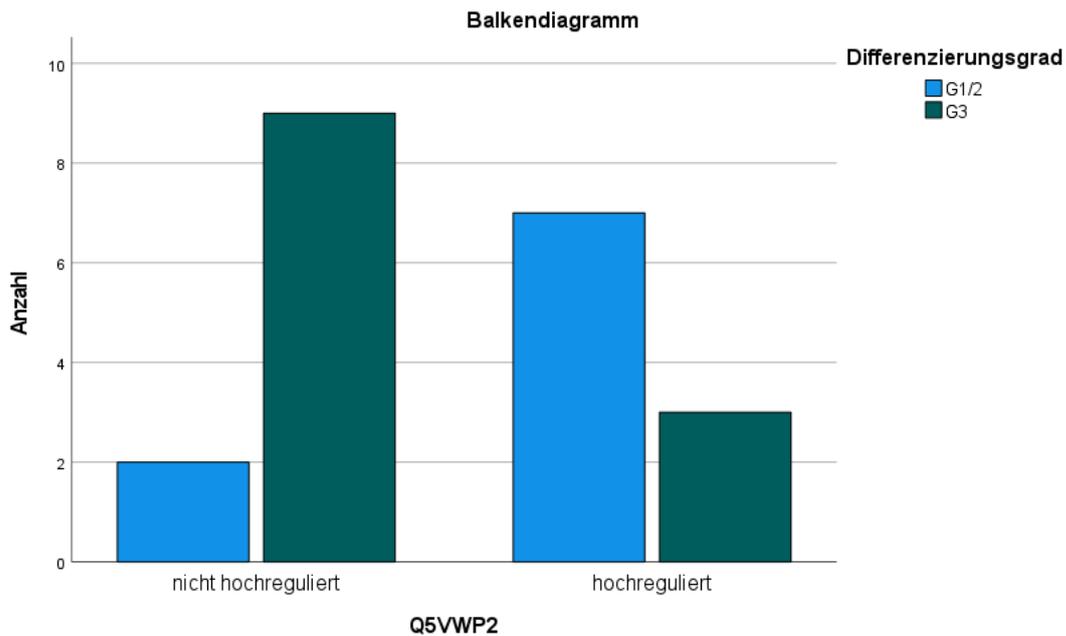


Abbildung 32: Verteilung von hochreguliertem Q5VWP2 nach Differenzierungsgrad

Chi-Quadrat-Tests		
	Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	5,743 ^a	0,017
Anzahl der gültigen Fälle	21	

a. 2 Zellen (50%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,29.

Tabelle 17: Signifikanz der Q5VWP2 Hochregulation zum Differenzierungsgrad

3.3.3 Korrelation semi-quantitativ erhöhter Quellproteine mit klinischen Daten unter Berücksichtigung Karzinom-assoziiertes Signaltransduktionswege

Beschrieben werden im Verlauf nur signifikante Korrelationen zu klinischen Daten. Die Darstellung erfolgt jeweils mittels Kreuztabelle, Chi-Quadrat-Test sowie als Balkendiagramm. Auf eine erneute Darstellung bereits beschriebener Korrelationen wird verzichtet.

3.3.3.1 Histologie

Korreliert man Karzinom-assoziierte Signaltransduktionswege mit den unterschiedlichen Histologien der Patientenkohorte, so zeigt sich außer der bereits im vorherigen Abschnitt beschriebenen Signifikanz für P12110 keine signifikante Korrelation zur Erhöhung eines Proteins und somit anzunehmend des Signaltransduktionsweges.

3.3.3.2 Geschlecht

In dieser Kohorte ergibt sich außer für das bereits beschriebene P42766 (60S ribosomal protein L35) keine signifikante Korrelation von den semi-quantitativ erhöhten Karzinom-assoziierten Quellproteinen zum Geschlecht.

3.3.3.3 Lymphknotenbefall

Neben der bereits beschriebenen Korrelation für eine Überexpression von Q99715 und einem lokal fortgeschrittenen Stadium mit Lymphknotenbefall, kann auch für P09327 (Matrilysin) eine signifikante Überexpression bei Lymphknotenbefall gezeigt werden (Tabelle 18, Tabelle 19 und Abbildung 33).

		Lymphknotenbefall		Gesamt
		N0	N1/2	
P09237	nicht hochreguliert	12	1	13
	hochreguliert	3	4	7
Gesamt		15	5	20

Tabelle 18: Kreuztabelle P09237 und Lymphknotenbefall

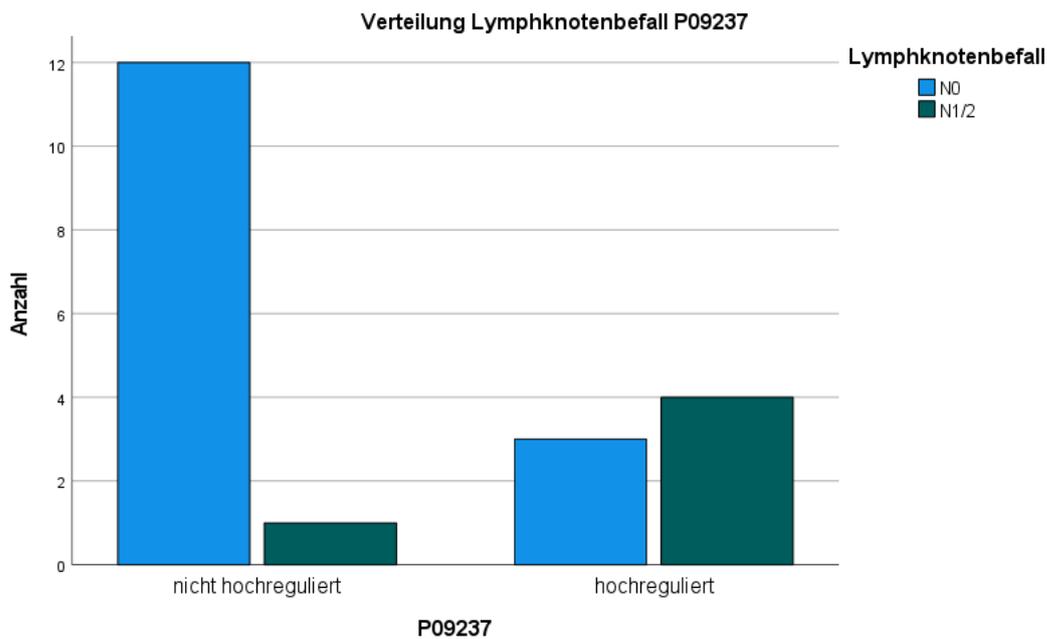


Abbildung 33: Verteilung von hochreguliertem P09237 nach Lymphknotenbefall

Chi-Quadrat-Tests		
	Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	5,934 ^a	0,015
Anzahl der gültigen Fälle	20	

a. 2 Zellen (50%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,75.

Tabelle 19: Signifikanz der P09237 Hochregulation zum Lymphknotenbefall

3.3.3.4 Nikotinkonsum, Zweitmalignome, Grading

Die vergleichende Darstellung überexprimierter Karzinom-assoziiertes Signaltransduktionswege unter Gesichtspunkten des stattgehabten Nikotinkonsums, eines bekannten Zweitmalignoms oder der histologischen Differenzierung weisen außer den bereits erwähnten Korrelationen keine signifikanten Korrelationen zu klinischen Daten auf.

3.3.4 Korrelation der in ≥ 10 Probenpaaren semi-quantitativ herunterregulierten Quellproteine gegenüber klinischen Daten

Beschrieben werden im Verlauf nur signifikante Korrelationen zu klinischen Daten. Die Darstellung erfolgt jeweils mittels Kreuztabelle, Chi-Quadrat-Test sowie als Balkendiagramm.

3.3.4.1 Histologie

Korreliert man die reduzierte Expression der in mindestens 10 Vergleichspaaren semi-quantitativ vermindert exprimierten Quellproteine mit den klinischen Daten, so zeigt sich in Korrelation zur Histologie für P02768 (Serumalbumin) eine signifikant reduzierte Expression bei pulmonalen Adenokarzinomen im Vergleich zu pulmonalen Plattenepithelkarzinomen (Tabelle 20, Tabelle 21 und Abbildung 34).

		Histologie		Gesamt
		Pulmonales Plattenepithelkarzinom	Pulmonales Adenokarzinom	
P02768	nicht herunterreguliert	7	1	8
	herunterreguliert	5	8	13
Gesamt		12	9	21

Tabelle 20: Kreuztabelle P02768 und Histologie

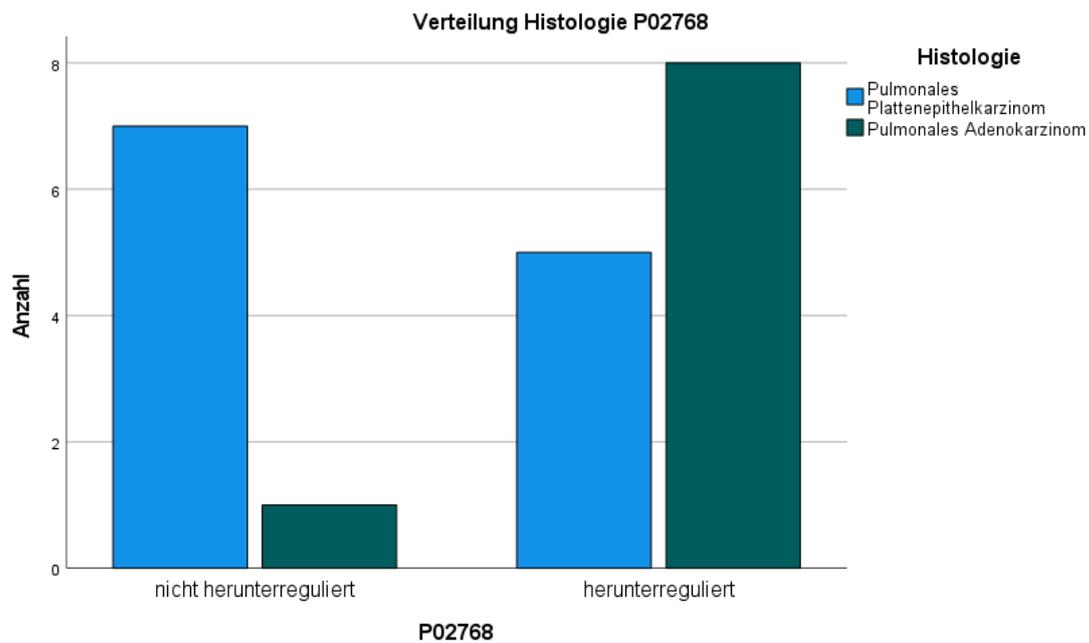


Abbildung 34: Verteilung von herunterreguliertem P02768 nach Histologie

Chi-Quadrat-Tests		
	Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	4,863 ^a	0,027
Anzahl der gültigen Fälle	21	

a. 2 Zellen (50%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,43.

Tabelle 21: Signifikanz der P07268 Herunterregulation zur Histologie

Für die reduzierte Expression von Q07157 (Tight junction protein ZO-1) ergibt sich jedoch eine signifikante Korrelation zu plattenepithelialer Histologie (Tabelle 22, Tabelle 23 und Abbildung 35).

		Histologie		Gesamt
		Pulmonales Plattenepithelkarzinom	Pulmonales Adenokarzinom	
Q07157	nicht herunterreguliert	2	6	8
	herunterreguliert	10	3	13
	Gesamt	12	9	21

Tabelle 22: Kreuztabelle Q07157 und Histologie

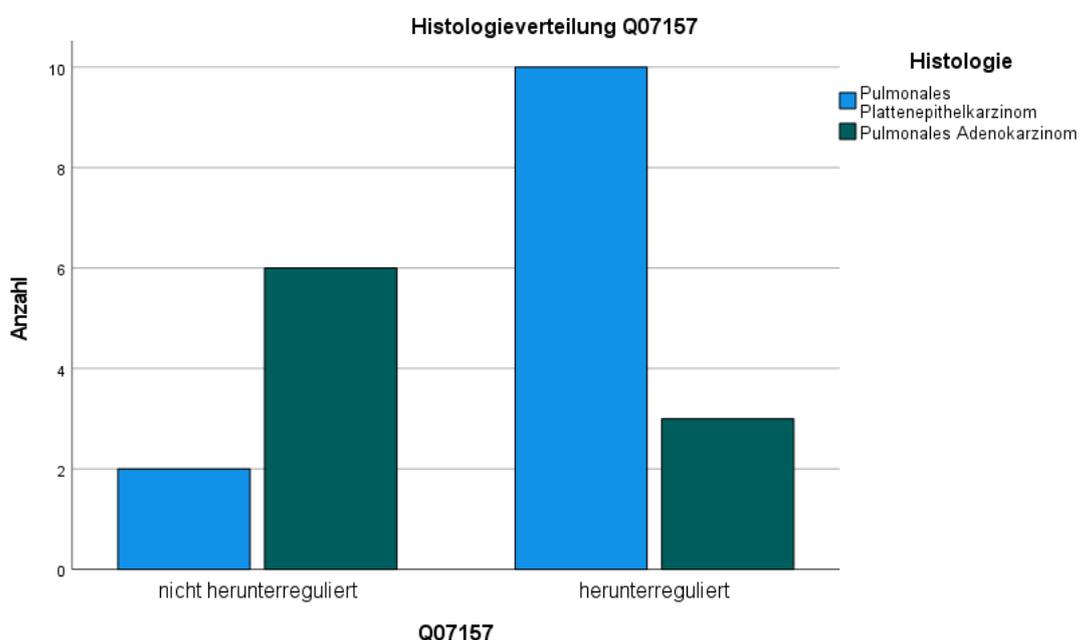


Abbildung 35: Verteilung von herunterreguliertem Q07157 nach Histologie

Chi-Quadrat-Tests		
	Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	5,452 ^a	0,020
Anzahl der gültigen Fälle	21	

a. 2 Zellen (50%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,43.

Tabelle 23: Signifikanz der Q07157 Herunterregulation zur Histologie

3.3.4.2 Geschlecht

Signifikante Geschlechtsunterschiede bezüglich der reduzierten Expressierung finden sich in der Kohorte nicht.

3.3.4.3 Lymphknotenbefall, Nikotinkonsum, Zweitmalignome und Differenzierungsgrad

Ein fortgeschrittener Lymphknotenbefall zeigt sich wie auch der Nikotinkonsum, ein bekanntes Zweitmalignom oder ein hoher Grad der Entdifferenzierung nicht als relevant beeinflussenden Faktor der reduzierten Expression.

3.3.5 Korrelation semi-quantitativ erniedrigter Quellproteine mit klinischen Daten unter Berücksichtigung Karzinom-assoziiertes Signaltransduktionswege

Für verschiedene Signaltransduktionswege lässt sich eine Assoziation zu Karzinomen beziehungsweise deren Entstehung darstellen. Viele Quellproteine spielen dabei in mehreren Signaltransduktionswegen oder an mehreren Stellen unterschiedlicher Signaltransduktionswege eine Rolle.

3.3.5.1 Histologie

Korreliert man Karzinom-assoziierte Signaltransduktionswege mit den unterschiedlichen Histologien der Patientenkohorte, so zeigt sich neben den bereits beschriebenen Korrelationen für Q07157 und P02768 keine relevante Korrelation.

3.3.5.2 Geschlecht

In Korrelation zum Geschlecht der Patienten ergibt sich für Quellproteine mit Einfluss auf Karzinom-assoziierte Signaltransduktionswege eine Korrelation

zwischen P12821 (Angiotensin-converting enzyme) und dem weiblichen Geschlecht. So scheint bei Männern in signifikant weniger Fällen eine Herunterregulation vorzuliegen (Tabelle 24, Tabelle 25 und Abbildung 36).

		Geschlecht		Gesamt
		Mann	Frau	
P12821	nicht herunterreguliert	10	2	12
	herunterreguliert	3	6	9
Gesamt		13	8	21

Tabelle 24: Kreuztabelle P12821 und Geschlecht

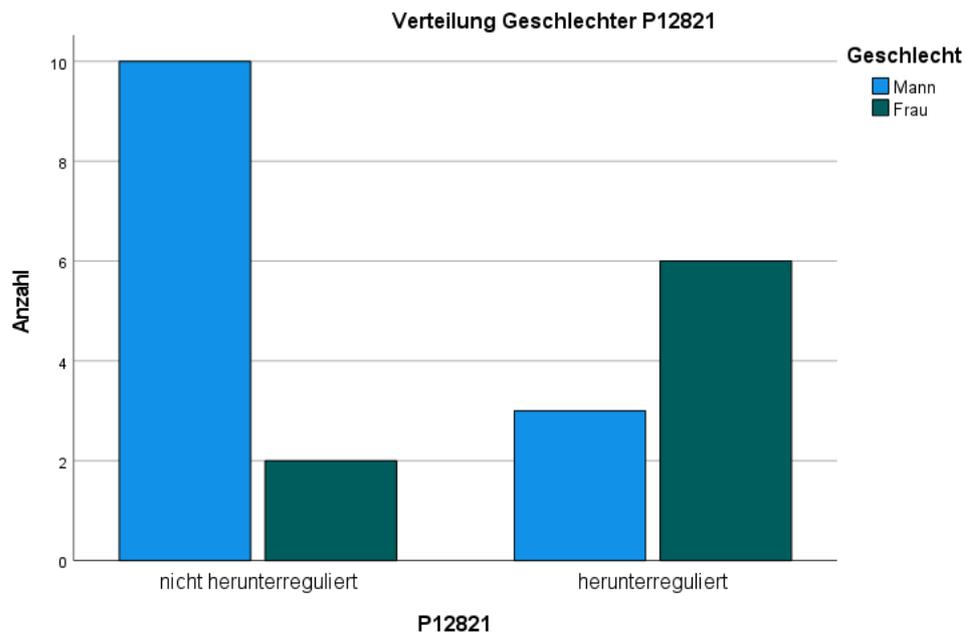


Abbildung 36: Verteilung von herunterreguliertem P12821 nach Geschlecht

Chi-Quadrat-Tests		
	Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	5,452 ^a	0,020
Anzahl der gültigen Fälle	21	

a. 2 Zellen (50%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,43.

Tabelle 25: Signifikanz der P12821 Herunterregulation zum Geschlecht

3.3.5.3 Lymphknotenbefall

Die korrelierende Darstellung des Lymphknotenbefalls zu den herunterregulierten Quellproteinen mit Einfluss auf Karzinom-assoziierte KEGG-Signaltransduktionswege ergibt eine signifikante Negativkorrelation zu einem geringen Lymphknotenstatus für P35968 (Vascular endothelial growth factor receptor 2). Bei fehlenden Lymphknotenmanifestationen erweist sich eine Herunterregulation von P35968 unwahrscheinlich (Tabelle 26, Tabelle 27 und Abbildung 37).

		Lymphknotenbefall		Gesamt
		N0	N1/2	
P35968	nicht herunterreguliert	12	1	13
	herunterreguliert	3	4	7
Gesamt		15	5	20

Tabelle 26: Kreuztabelle P35968 und Lymphknotenbefall

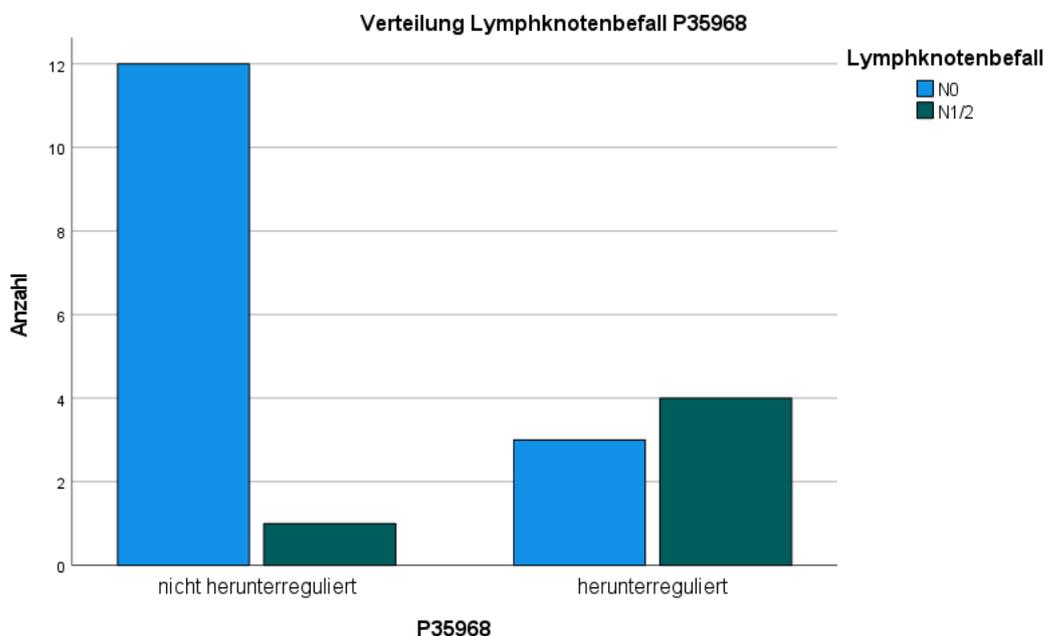


Abbildung 37: Verteilung von herunterreguliertem P35968 nach Lymphknotenbefall

Chi-Quadrat-Tests		
	Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	5,934 ^a	0,015
Anzahl der gültigen Fälle	20	

a. 2 Zellen (50%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,75.

Tabelle 27: Signifikanz der P35968 Herunterregulation zum Lymphknotenstatus

3.3.5.4 Nikotinkonsum

Die vergleichende Darstellung herunterregulierter karzinom-assoziiertes Signaltransduktionswege unter Gesichtspunkten des stattgehabten Nikotinkonsums verdeutlicht die signifikante Korrelation der Quellproteine Q96PQ7 (Kelch-like protein 5), Q8WWI1 (LIM domain only protein 7) und P12821 (Angiotensin-converting enzyme) zum Nikotinkonsum. So ist Q96PQ7 bei sämtlichen Nichtrauchern herunterreguliert, während dies nur bei wenigen Rauchern zutrifft (Tabelle 28, Tabelle 29 und Abbildung 38).

		Nikotinkonsum		Gesamt
		Nichtraucher	Raucher	
Q96PQ 7	nicht herunterreguliert	0	13	13
	herunterreguliert	3	5	8
Gesamt		3	18	21

Tabelle 28: Kreuztabelle Q96PQ7 und Nikotinkonsum

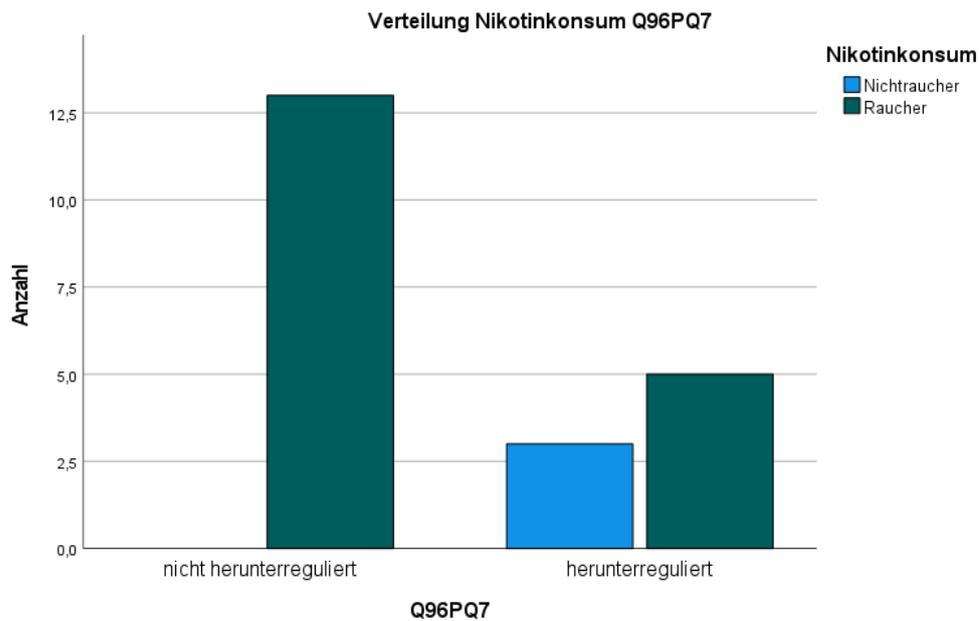


Abbildung 38: Verteilung von herunterreguliertem Q96PQ7 nach Nikotinkonsum

Chi-Quadrat-Tests		
	Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	5,688 ^a	0,017
Anzahl der gültigen Fälle	21	

a. 2 Zellen (50%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,14.

Tabelle 29: Signifikanz der Q96PQ7 Herunterregulation zum Nikotinkonsum

Q8WWI1 ist ebenfalls bei sämtlichen Nichtrauchern herunterreguliert, jedoch nur in knapp einem Viertel der Patienten mit Nikotinkonsum (Tabelle 30, Tabelle 31 und Abbildung 39).

		Nikotinkonsum		Gesamt
		Nichtraucher	Raucher	
Q8WWI 1	nicht herunterreguliert	0	14	14
	herunterreguliert	3	4	7
Gesamt		3	18	21

Tabelle 30: Kreuztabelle Q8WWI1 und Nikotinkonsum

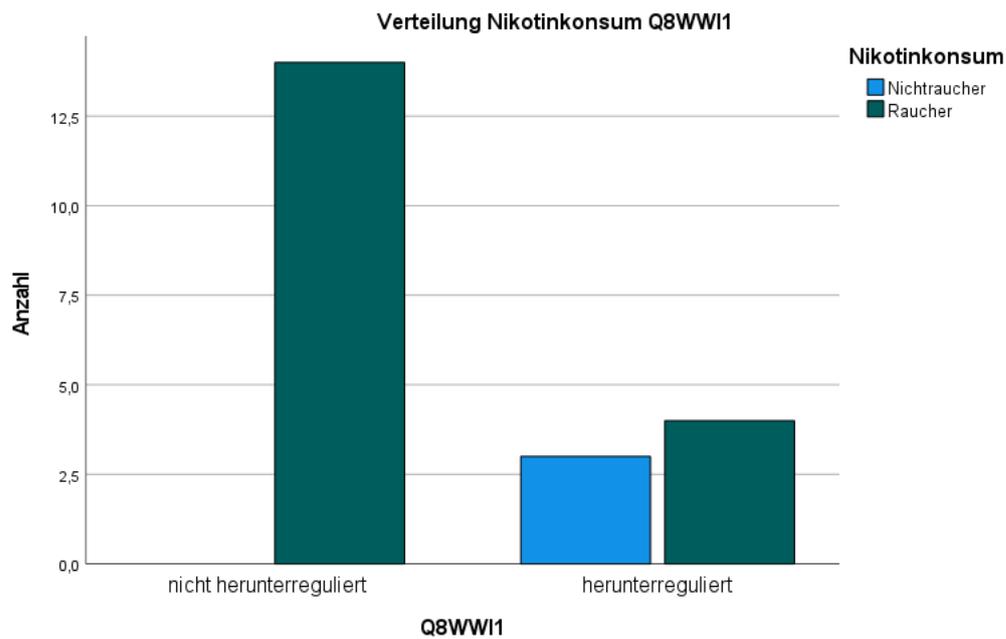


Abbildung 39: Verteilung von herunterreguliertem Q8WW1 nach Nikotinkonsum

Chi-Quadrat-Tests		
	Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	7,000 ^a	0,008
Anzahl der gültigen Fälle	21	
a. 2 Zellen (50%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,00.		

Tabelle 31: Signifikanz der Q96PQ7 Herunterregulation zum Nikotinkonsum

Auch für das dritte signifikant korrelierende Quellprotein P12821 zeigt sich die gleiche Korrelation. So ist auch dieses bei allen Nichtrauchern herunterreguliert, jedoch nur bei einem Drittel der Patienten mit Nikotinkonsum (Tabelle 32, Tabelle 33 und Abbildung 40).

		Nikotinkonsum		Gesamt
		Nichtraucher	Raucher	
P12821	nicht herunterreguliert	0	12	12
	herunterreguliert	3	6	9
Gesamt		3	18	21

Tabelle 32: Kreuztabelle P12821 und Nikotinkonsum

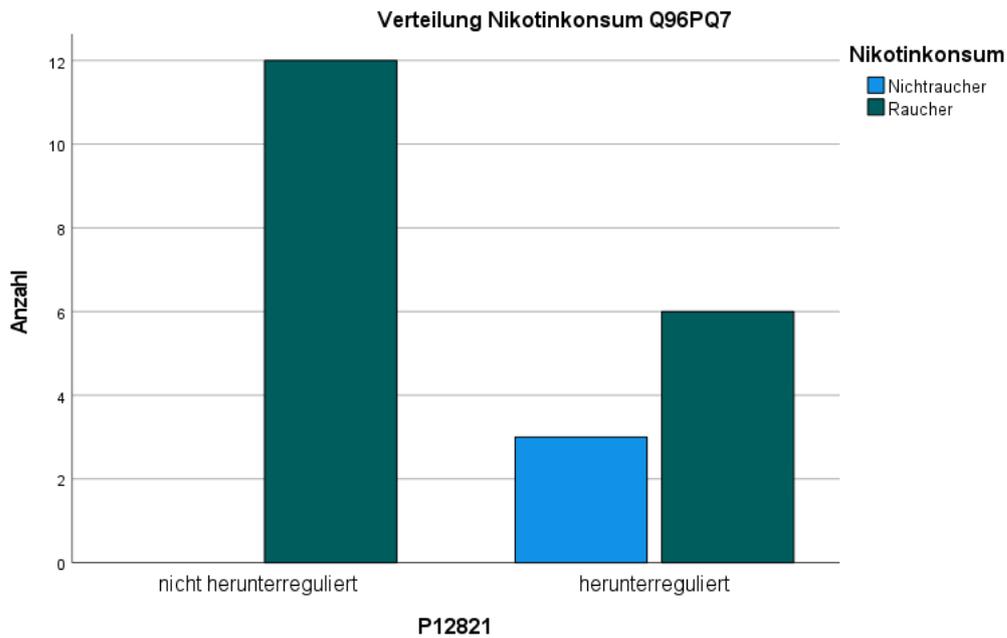


Abbildung 40: Verteilung von herunterreguliertem P12821 nach Nikotinkonsum

Chi-Quadrat-Tests		
	Wert	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	4,667 ^a	0,031
Anzahl der gültigen Fälle	21	

a. 2 Zellen (50%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,29.

Tabelle 33: Signifikanz der P12821 Herunterregulation zum Nikotinkonsum

3.3.5.5 Zweitmalignome, Grading

Die weitergehende Betrachtung unter Berücksichtigung eines bekannten Zweitmalignoms oder der histologischen Differenzierung zeigen keine signifikanten Korrelationen zu klinischen Daten.

3.4 Patientenzuordnung relevant betroffener Signaltransduktionswege

Betrachtet man die weitere Aufteilung der Signaltransduktionswege der karzinom-assoziierten (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20) und der herunterregulierten Quellproteine (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28) sowie der beteiligten Prozesse fällt eine eher breite Verteilung auf. Betont sind vor allem unspezifische oder sehr spezifische Prozesse und Quellproteine. Zwar fällt bei den tumorassoziierten Prozessen zusätzlich eine starke Präsenz von Tumorpromotoren auf, dieses ist jedoch eine sehr inhomogene Gruppe, sodass eine weitere Aufzweigung nicht sinnvoll erscheint.

In der Gruppe der Karzinom-assoziierten, hochregulierten Quellproteine beziehungsweise Prozesse (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24) fällt jedoch eine Überrepräsentation des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Protein-Kinase-B (AKT)-Signaltransduktionsweges auf. Ordnet man diesen nun den Patienten zu, so zeigt sich eine klare Verteilung mit deutlich erhöhter Expression in den Proben LCA 104, 106, 112, 113, 116, 122, 123, 124, 127. Alle PI3K/Akt-zugeordneten, hochregulierten Quellproteine waren in den Proben LCA 113 und 116 überexprimiert. Einen Überblick der pro Probe PI3K/AKT-assoziierten Quellproteine gibt Abbildung 41.

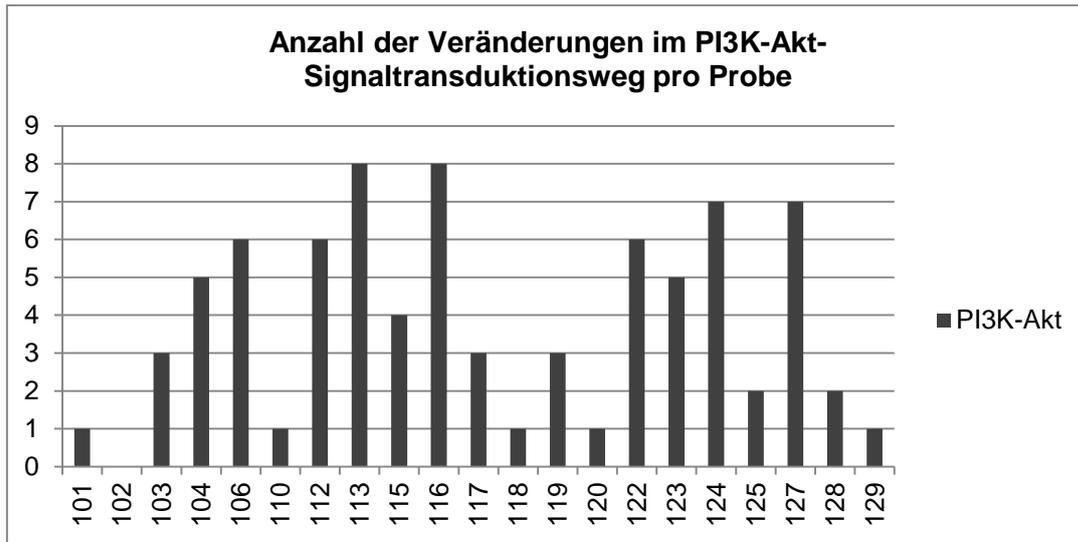


Abbildung 41: PI3K/AKT-assoziierte hochregulierte Quellproteine nach Patientenprobe

Es zeigen sich mehrere Korrelationen zwischen klinischen Faktoren und erhöhten Quellproteinen. Zusätzlich zeigt sich eine Überexpression eines karzinom-relevanten Signaltransduktionswege. Es soll daher nachfolgend bewertet werden, inwiefern die Patientenkohorte als repräsentativ betrachtet werden kann. Zusätzlich soll bewertet werden, ob die Korrelationen zwischen klinischen Faktoren und erhöhten beziehungsweise erniedrigten Quellproteinen anhand bestehender Daten nachvollzogen werden können.

4 Diskussion

Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte in der Therapie des NSCLC mittels Checkpointinhibition und zielgerichteter Therapie gelungen sind, verbleibt die Lebenserwartung im Durchschnitt nahezu unverändert. Zielgerichtete Therapien können bis dato nur einer überschaubaren Patientengruppe angeboten werden und auch die Zahl der Patienten mit hohem Benefit einer Immuntherapie ist bis dato begrenzt. Problematisch ist insbesondere beim NSCLC die meist hohe Mutationslast und Heterogenität der Tumorerkrankung. Diese Heterogenität erscheint durch den großen Einfluss äußerer Risikofaktoren unterstützt zu sein und führt zu einem hohen Bedarf individueller Therapieabwägungen, die den betreuenden Arzt wiederholt vor schwere Entscheidungen stellt.

Essenziell erscheint daher die konsequente Erforschung weiterer Therapiestrategien. Hier weisen die Ligandomanalyse des HLA und die nachfolgende Auswahl von Peptiden zur Immunisierung einen vielversprechenden Weg auf. Die individualisierte Therapie bei Patienten mit NSCLC erscheint ähnlich wie bei anderen Tumorerkrankungen (z.B. Glioblastom [207-209] oder Chronisch lymphatischer Leukämie [210]) vielversprechend. Grundlage ist dabei die Erforschung des HLA-Ligandoms und die Anlage von Datenbanken bzw. Warenhäusern tumorassoziierter Peptide. Über diese kann nach Analytik der jeweiligen Patientenprobe ein individualisiertes Vakzin zur Verfügung gestellt werden. Mit Diagnostik des Immunopeptidoms kann neben dem Allgemeinzustand der Zelle auch der immunologische Fußabdruck der Zelle dargestellt werden. So bietet die Diagnostik von Peptiden, welche auf HLA-Molekülen präsentiert werden, Klarheit über Ansatzpunkte, die das direkte Ziel für T-Zell-basierte Angriffe sein können.

Besonderes Augenmerk bei der Diagnostik liegt dabei auf Peptiden, die tatsächlich nur auf Tumoren vorkommen. Soll später ein Vakzin aus den entsprechenden Peptiden entwickelt werden, so sollte sich dieses

ausschließlich gegen den Tumor richten. Eine unspezifische Reaktion würde verstärkte Nebenwirkungen und somit Risiken für den Patienten bedeuten.

Im Rahmen der individualisierten Tumorthherapie kommt aufgrund des Umfangs der Diagnostik einer Vorauswahl der Patienten eine bedeutende Rolle zu. Nur so kann langwierige und möglicherweise auch erfolglose Diagnostik vermieden werden. Basierend auf der reinen Diagnostik des HLA-Ligandoms gibt diese Arbeit daher Ansatzpunkte für mögliche klinische Auswahlpunkte. Zusätzlich wird mittels Analyse der Signaltransduktionswege die Eingrenzung tumorspezifischer Peptide anhand ihrer Proteine nochmals erweitert.

Und mittels Analyse der Signaltransduktionswege und klinischer Korrelation werden weitere Möglichkeiten des Erkenntnisgewinns aus der Ligandomanalyse dargestellt, welche die Relevanz der Diagnostik noch einmal erweitern.

4.1 Repräsentativität der Patientenkohorte

Betrachtet man das Alter der Patientengruppe dieser Diagnostikstudie, so zeigt sich ein mittleres Erkrankungsalter von 66,5 Jahren. Die Patientenkohorte liegt damit unterhalb des in Deutschland üblichen Alters bei Erstdiagnose, welches sich im Mittel bei 71 Jahren (Männer) und 69 Jahren (Frauen) findet [3]. Eine separate Betrachtung des Alters operativ therapierter Patienten mit Lungenkarzinom liegt auch in den aktuellen Daten der zertifizierten Lungenkarzinomzentren für Deutschland nicht vor [29]. Aufgrund der klinischen Anforderungen der funktionellen Operabilität (z.B. kardiale und pulmonale Funktion) kann auch für das durchschnittliche Erkrankungsalter operativ therapierter Lungenkarzinompatienten ein insgesamt geringeres Alter postuliert werden und das Durchschnittsalter dieser Studienkohorte somit als repräsentativ betrachtet werden.

Bei der Geschlechtsverteilung in der Patientengruppe zeigt sich bei 58 % männlichen Patienten und 42 % weiblichen Patienten die Aufteilung

homogener, als im Vergleich zu den allgemeinen Erkrankungsdaten für Deutschland. Hier sind etwa 65 % der Patienten männlich und 35 % weiblich [3]. Die weiblichen Patienten erscheinen also gering überrepräsentiert in der aktuellen Kohorte.

Vergleicht man die Tumorstadien nach UICC8 der Patientenkohorte mit den durchschnittlichen Tumorstadien der in Deutschland operativ therapierten Primärfälle, so fällt eine deutliche Überrepräsentation fortgeschrittener Stadien auf [29]. Dies spiegelt sich erwartungsgemäß auch in der lymphogenen Ausdehnung wider.

Betrachtet man den Nikotinabusus als Hauptrisikofaktor eines Bronchialkarzinoms, so zeigt sich in der Patientenkohorte ein hoher Anteil an Patienten mit Nikotinabusus. Insgesamt konnte nur bei 15 % der Patienten kein Nikotinabusus in der Vergangenheit gefunden werden. Diese 4 Patienten sind ausschließlich weiblichen Geschlechts. Prozentual korreliert der Anteil der Nichtraucher in der Kohorte sehr gut mit dem Gesamtdurchschnitt an Nichtrauchern der Lungenkarzinompatienten [211]. Dieser hat sich über die letzten Jahre kontinuierlich erhöht und betrifft auch global gesehen vorwiegend Personen weiblichen Geschlechts [212]. Dies wird in den meisten Untersuchungen bis dato auf einen hohen Anteil Passivraucherinnen bei vorwiegend männlichen Rauchern zurückgeführt. Jedoch bleiben umfassende Untersuchungen abzuwarten. Unter den Nichtrauchern zeigen sich vorwiegend Adenokarzinome, lediglich ein Plattenepithelkarzinom wurde in der Patientenkohorte erfasst. Dies erscheint ebenfalls repräsentativ, da global betrachtet nur etwa 5 % der Patienten mit pulmonalem Plattenepithelkarzinom Nichtraucher sind [213].

Betrachtet man die Histologien in der Patientengruppe, so zeigt sich eine homogene Verteilung auf die beiden führenden Histologien des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Seltener Entitäten, wie adenosquamöse oder sarkomatoide NSCLCs sind nicht vertreten. Aufgrund der gleichen Verteilung von Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen besteht damit eine Überrepräsentation des Plattenepithelkarzinoms in der Patientenkohorte.

Insbesondere unter Berücksichtigung des Geschlechts sind Plattenepithelkarzinome in der männlichen Patientenkohorte stark überrepräsentiert im Vergleich zu deutschen Gesamtzahlen [3]. Betrachtet man die reduzierte Patientenkohorte in der semi-quantitativen Analyse, so wird die Überrepräsentation bei nun klarer Verteilung zugunsten des Plattenepithelkarzinoms noch deutlicher.

Im Hinblick auf die wichtigsten klinischen Faktoren wie Patientenalter, Geschlecht, Tumorstadium, Risikofaktoren sowie der Histologie kann die Patientenkohorte in den meisten Fällen als repräsentativ betrachtet werden. Jedoch gerade der im Rahmen der Therapie zunehmend bedeutende Faktor der genauen Entität wird durch diese Patientenkohorte nur stark eingeschränkt wiedergespiegelt.

In der Nachsorge der untersuchten 26 Patienten kommt es bei teilweise über 5-jähriger Nachsorge in 23 % der Fälle zu einem Rezidiv. Dies ist vergleichbar zu vorbeschriebenen Daten, die ein Rezidivrisiko von etwa 20 % angeben [214]. Die leicht überdurchschnittliche Rezidivrate ist durch den hohen Anteil fortgeschrittener Karzinome in dieser Kohorte erklärbar. Auch die durchschnittliche Zeit, bis ein Rezidiv diagnostiziert wurde, ist mit 16 Monaten repräsentativ, da ein Rezidiv meist innerhalb der ersten 4 Jahre nach Resektion auftritt [214,215].

4.2 Analyse der Signaltransduktionswege zur Eingrenzung tumorspezifischer Peptide

Mittels vergleichender Ligandomanalyse zwischen Tumormaterial und Normalgewebe des Patienten sowie nachfolgendem Datenbankabgleich mit anderen Geweben konnten in der vorhergehenden Arbeit von Eva-Maria Wolfschmitt insgesamt 181 tumoreigene Quellproteine als mögliche Antigene ausgemacht werden. Zur möglichen Warenhausaufnahme wurden nachfolgend diejenigen ausgewählt, die in mindestens 2 der untersuchten Proben als tumoreigene Quellproteine gefunden werden konnten.

In diesen Fällen stellt sich natürlich die weitergehende Frage, ob das entsprechende Quellprotein tatsächlich nur im Rahmen dieser Tumorerkrankung vorkommt, oder ob dies beispielsweise in bisher bekannten Ligandomdaten, die zum Vergleich herangezogen wurden, nicht oder noch nicht erfasst wurde.

Eine weitere Zuordnung dieser Quellproteine zu bekannten KEGG-Signaltransduktionswegen kann somit Hinweise geben, welche Proteine anderweitig vorkommen und welche Quellproteine zwar bekannt sind, jedoch keine Rolle in bis dato bekannten Signaltransduktionswegen spielen. Ein fehlendes Vorkommen in bekannten Signaltransduktionswegen könnte somit die Hypothese eines tumoreigenen Vorkommens noch unterstützen.

In der untersuchten Kohorte wurden in der vorhergehenden Analyse 28 Quellproteinen als tumorspezifisch bezeichnet, wovon bei 12 Quellproteinen keine Zuordnung zu einem KEGG-Signaltransduktionsweg gelang (vergleiche Tabelle 9). Die Hypothese einer Tumorspezifität aufgreifend werden diese nachfolgend genauer betrachtet.

Das Quellprotein PRAME (Preferentially expressed antigen in melanoma) family member 1/13 (Q5VWM6/O95521) ist als Cancer/Testis-Antigen [216] mit Expression in verschiedenen soliden Tumoren beschrieben [217], unter anderem auch NSCLC [218]. Ein Vorkommen in Normalgewebe ist bis dato nicht bekannt [219]. Durch Inhibition des *retinoic acid/retinoic acid receptor pathways* trägt PRAME zur Tumorgenese bei [220] und beeinflusst Zelldifferenzierung, Zellwachstumskontrolle und Apoptose [220]. Da PRAME als membrangebundenes Protein eine autologe, zytotoxische T-Zell-Antwort auslöst [221], wird es als mögliches Ziel einer Immuntherapie mittels anti-PRAME Vakzinierung bereits in Studien bei akuter myeloischer Leukämie evaluiert [222]. Bezogen auf das NSCLC wurde PRAME als ein wichtiger Bestandteil in der Tumorentwicklung ausgemacht [223], so scheint PRAME eine Rolle bei der Metastasierung zu spielen [224]. Studien mit Gabe rekombinanten PRAME Proteins zeigten bereits die starke humorale Antwort mit starker Antitumoraktivität durch die ausgelöste CD4-Antwort [225] und auch PRAME-

abgeleitete Peptide triggerten spezifische T-Zell-Antworten bei Patienten mit NSCLC [226]. Die vorbeschriebene Assoziation zu Patienten mit Adenokarzinomen und Nikotinkonsum in der Anamnese [218] kann aufgrund der geringen Zahl an Nachweisen (2 Proben) nicht adäquat nachvollzogen werden.

Ebenfalls in die Gruppe der Cancer/Testis-Antigene [216] mit Expression in verschiedenen soliden Tumoren gehören die Quellproteine Melanoma-associated antigen 3 (MAGEA3, P43357) und Melanoma-associated antigen 6 (MAGEA6, P43360) [227]. Mit über 40 menschlichen Proteinen ist die Gruppe der Melanoma associated antigens (MAGE) ebenfalls als immunogene Struktur beschrieben [228]. Die angenommene Funktion von MAGE-A3/6 ist dabei die Ubiquitinierung von p53 [229] und diese scheint so bei der Tumorgenese mitzuwirken [227]. Beide MAGE zeigen ein hohes immunogenes Potenzial, so weist beispielsweise MAGE-A6 eine deutliche CD8- und CD4-T-Zell-Antwort auf [230]. In NSCLCs wurde gerade die Kombination von MAGE-A3/MAGE-A6 als vielversprechende Kombination einer Vakzinierung bei japanischen Patienten mit NSCLC beschrieben [218,231,232], dies könnte in Anbetracht der in dieser Population vorliegenden Messdaten eine vielversprechende Vakzinierungskombination ergeben. Eine angenommene Assoziation zu Adenokarzinomen und die korrelierend eingeschränkte Prognose bei Expression von MAGE-A3 [233] kann aufgrund der geringen Fallzahl in dieser Kohorte nicht suffizient beurteilt werden.

In der Gruppe der vorhergehend als tumorspezifisch gewerteten Quellproteine fällt ebenfalls für Distal-less homeobox 3 (DLX3, O60479) eine fehlende Zuordnung zu KEGG-Signaltransduktionswegen auf. Für DLX3, dessen eigentliche Rolle in der embryonalen Entwicklung und epidermalen Homöostase zu sehen ist [234], konnte für Plattenepithelkarzinome der Haut eine Korrelation zur Prognose gezeigt werden, wobei eine geringe Expression zu einer verschlechterten Prognose führt [234,235]. Eine Beschreibung im Rahmen von NSCLCs ist in der bisherigen Literatur nicht zu finden, jedoch konnte für das

nahe verwandte Distal-less homeobox 5 (DLX5) bei vorliegender Aktivierung eine verschlechterte Prognose bei NSCLC [236] nachgewiesen werden.

Für Major facilitator superfamily domaincontainingprotein 7 (MFSD7; Q6UXD7) gelang ebenfalls keine Zuordnung eines KEGG-Signaltransduktionsweges, eine Assoziation zu Karzinomen lässt sich ebenfalls nicht eindeutig darstellen, allenfalls eine Hypermethylierung bei Lungenkarzinomen ist beschrieben [237]. So kommt MFSD7 als atypischer Solute carrier-Transporter (SLC) [238] in verschiedensten Geweben vor und erscheint eher nicht als Ansatzpunkt einer Vakzinierung geeignet.

Etwas anders verhält es sich mit Transmembrane channel-like protein 5 (TMC5; Q6UXY8), welches bereits in der Vergangenheit als NSCLC-assoziiert aufgefallen ist. Dies wird als möglicher immunhistochemischer Marker bei der Unterscheidung zwischen pulmonalem Adenokarzinom oder pulmonalem Plattenepithelkarzinom [239-241] und auch als Biomarker in Hinblick auf die Prognose bei pulmonalen Adenokarzinomen [240] diskutiert.

Zwar nicht bei Bronchialkarzinomen, sondern bei Hepatozellulären Karzinomen [242], wird auch Fibrinogen C domain-containing protein 1 (FIBCD1; Q8N539), ein weiteres auffälliges Quellprotein, als Biomarker diskutiert. Bei Expressierung auf verschiedenen epithelialen Zellen der Schleimhaut beispielsweise intestinal oder in den Speicheldrüsen [243,244] zeigt sich zudem eine verstärkte Expression im Rahmen von Inflammation beispielsweise durch *Aspergillus fumigatus* [245]. Auch eine Expression auf NSCLC-Zellen [245] konnte nachgewiesen werden, ist jedoch bei häufigem Vorkommen nur eingeschränkt als Ansatzpunkt einer Vakzinierung geeignet.

Für Nicolin-1 (NICN1; Q9BSH3) ist bis dato nur eine Assoziation zu dem möglichen Biomarker Tubulin-Alpha-1C-Kette (TUB1AC) bei pulmonalen Adenokarzinomen [246] diskutiert. Da ein ubiquitäres Vorkommen auf verschiedenen Geweben [247,248] vorbeschrieben ist, erscheint auch hier eine Eignung als Vakzinierungsansatz nicht gegeben.

Dem als tumoreigen diskutierten Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2 (CRISPLD2; Q9H0B8) werden wichtige Aufgaben bei der kraniofazialen Morphogenese [249,250], als auch der alveolären Entwicklung [251] zugeschrieben. So wird bei Asthmapatienten eine Assoziation zur Lungenfunktion [252] diskutiert. Zwar zeigt sich eine starke Assoziation zu inflammatorischen Geschehen [253,254], sodass CRISPLD2 bereits als möglicher Biomarker gehandelt wird, jedoch konnten auch für NSCLC [255] und Ovarialkarzinome [256] eine deutliche Assoziation nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigen sich Veränderungen der CRISPLD2-Expression unter Therapien mit Steroiden [257] und bei NSCLCs unter Therapie mit Bevacizumab/Erlotinib [258,259]. Durch die diskutierte Überexpression bei NSCLC [255] könnte ein sinnvoller Ansatz für eine Vakzinierung diskutiert werden, sodass weitere Beobachtungen angestrebt werden sollten.

Auch für Transmembrane Protein 39A (TMEM39A; Q9NV64) gelang keine Zuordnung zu einem KEGG-Signaltransduktionsweg. Es sind jedoch verschiedene Interaktionen mit Proteinen beschrieben [260,261]. In der Vergangenheit wurde für TMEM 39 A eine Schlüsselrolle als Mediator [261] im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose [262] oder Lupus erythematodes [263] vermutet, zwischenzeitlich konnten jedoch auch deutliche Assoziationen zu Karzinomkrankungen, wie beispielsweise Brustkrebs [264] oder Hirntumoren [265] nachgewiesen werden. Bei NSCLCs konnte in vitro mit dem synthetisch hergestellten Peptid Transmembrane protein (TMEM) 39AS41, welches in TMEM39A gefunden wurde, das Tumorwachstum in KRAS^{LA1} NSCLC-Mäusen unterdrückt werden [266]. TMEM39A besitzt somit ein deutliches therapeutisches Potenzial, sodass weitere Diagnostik, insbesondere auch in Hinblick auf eine mögliche Assoziation zu KRAS-Mutationen, angestrebt werden sollte.

Für die E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1 (KCMF1; Q9P0J7) wird vorrangig eine Rolle in der Tubulogenese beschrieben [267]. Jedoch konnte in den letzten Jahren auch eine starke Assoziation zu epithelialen Karzinomen gezeigt werden [268]. Während bei Ewing-Sarkomen eine reduzierte Expression [269]

nachgewiesen werden konnte, zeigt sich bei epithelialen Karzinomen wie Magenkarzinomen [270,271], Pankreaskarzinomen [268], Mammakarzinomen [272] aber auch pulmonalen Adenokarzinomen [268] eine Überexpression. Weitergehende Analysen über ein mögliches therapeutisches Potenzial sind bis dato nicht beschrieben, diese sind bei deutlicher Karzinom-Assoziation jedoch anzustreben.

4.3 Klinische Korrelationen

Aufgrund des diagnostischen Aufwandes einer weitreichenden Untersuchung des Tumormaterials besteht im Rahmen der personalisierten Medizin ein hoher Bedarf der Eingrenzung diagnostischer Ansatzpunkte mit Hilfe von einfach zu erhebenden klinischen Faktoren. So besteht die Bestrebung unter Betrachtung der Faktoren Histologie, Geschlecht, Nikotinabusus, Differenzierungsgrad sowie Lymphknotenbefall mögliche Korrelation zu evaluieren. Insgesamt können aufgrund der Größe der Patientenkohorte jedoch nur eingeschränkt Aussagen über klinische Korrelationen getroffen werden. Weitere Untersuchungen mit größeren Kohorten wären zur Validierung erforderlich.

4.3.1 Klinische Korrelation tumorspezifischer Quellproteine

Insgesamt wurden nur 5 Proteine in 3 oder 4 Tumorproben exklusiv gefunden, somit kann allein aufgrund der geringen Zahl keine Signifikanz in der Auswertung entstehen, auf eine weitergehende Auswertung wurde daher verzichtet.

4.3.2 Klinische Korrelation hochregulierter Quellproteine

In der Korrelation zur Histologie hat sich in der Auswertung nur bei einem Protein eine signifikante Verteilung zugunsten des Plattenepithelkarzinoms gezeigt. Collagen-alpha-2 (VI)-chain (P12110) ist v.a. in der extrazellulären

Matrix lokalisiert und erweist sich unter anderem mitverantwortlich für die Organisation dieser.

Eine Veränderung des Proteins selbst ist bis dato nur im Rahmen neurologischer Erkrankungen beschrieben. So wird ihm eine Rolle bei Bethlem Myopathie [273], einer autosomal dominant vererbten Myopathie mit Kontrakturen, und bei kongenitaler Muskeldystrophie Typ Ullrich beschrieben [274]. Jedoch wird das nahe assoziierte Proteine Collagen-alpha-2 (V)-chain als möglicher Biomarker bei Magenkarzinomen gehandelt [275]. Das nahe verwandte Protein Collagen-alpha-1 (XII)-chain ist als wichtiger Bestandteil der ECM bereits als überexprimiert im Rahmen kolorektaler Karzinome beschrieben und wird diesbezüglich als Biomarker [276] gehandelt. In Anbetracht der Assoziation zu pulmonalen Plattenepithelkarzinomen sind daher weitere Analysen insbesondere bei NSCLC-Patienten mit Plattenepithelkarzinom notwendig.

Das als nahe verwandte Protein bereits erwähnte Collagen-alpha-1 (XII)-chain (Q99715) weist ebenfalls interessante Korrelationen auf. So zeigt sich eine signifikante Korrelation der Überexpression zu einem fortgeschrittenen Lymphknotenbefall. Einer Überexpression dieses Proteins wird eine starke Assoziation zu Tumoren wie beispielsweise Ovarialkarzinomen [277], Nierenzellkarzinomen [278], kolorektalen Adenokarzinomen [276], Magenkarzinomen [279] und insgesamt soliden Tumoren [280] nachgesagt. Auch wird eine veränderte Expression als differenzierender Faktor zwischen kolorektalen Adenomen und Adenokarzinomen postuliert [281] und auch eine mögliche Verwendung als Biomarker diskutiert [276]. Bei der Beschreibung dieses Proteins als möglicher Biomarker bei kolorektalen Karzinomen [276] und Ovarialkarzinomen [277] scheint dieser mit einer schlechten Prognose einherzugehen. Es besteht eine negative Korrelation zum erkrankungsfreien Überleben. Stichprobenartig kann dieser Zusammenhang in der aktuellen Diagnostik nicht anhand der Rezidive nachvollzogen werden, so liegt hier nur bei 2 von 12 Patienten mit Überexpression ein Rezidiv vor, wohingegen bei 3 der Patienten ohne Überexpression (8) ein Rezidiv bekannt ist. Da jedoch

gerade lymphogen fortgeschrittene Tumore ein hohes Rezidivrisiko aufweisen, kann sekundär ein erhöhtes Rezidivrisiko bei Überexpression des Collagen-alpha-1 (XII)-chain postuliert werden.

Eine Korrelation von lymphogen fortgeschrittenem Stadium besteht auch zu Matrilysin (P09237). In diesem Fall zeigt sich eine signifikante Korrelation der Überexpression zu einem Lymphknotenbefall. Bereits in der Vergangenheit wurde Matrilysin (MMP-7) als Biomarker bei NSCLCs diskutiert [282,283]. Außerdem wurde eine Korrelation zur Tumorproliferation und somit einer schlechteren Prognose dargestellt [284]. Ähnlich der Stichprobe für Collagen-alpha-1 (XII)-chain kann auch für Matrilysin keine klare Assoziation der Überexpression zu Rezidiven nachgewiesen werden. So findet sich in dieser Kohorte nur bei 1 der 7 Patienten mit Überexpression von Matrilysin ein Rezidiv, während sich bei 4 der 13 Patienten ohne Überexpression von Matrilysin ein Rezidiv aufgetreten ist. Auch in diesem Fall kann somit nur sekundär über die Korrelation zum Lymphknotenbefall und eine bei Lymphknotenbefall erhöhte Rezidivrate eine schlechtere Prognose postuliert werden.

Auch in der Korrelation überexprimierter messbarer Peptide beziehungsweise ihrer Quellproteine zu den Differenzierungsgraden der untersuchten Tumorproben ergeben sich markante Auffälligkeiten. So zeigt sich für eine Überexpression des Protein FAM46C eine signifikante Korrelation zu einem hohen Differenzierungsgrad der Tumorproben. Dies erscheint nachvollziehbar, da dem Protein FAM46C eine Inhibition der Polo like Kinase 4 (Plk4) assoziiert ist [285]. Eine erhöhte Plk4 wird bei vielen Malignomerkrankungen beobachtet [286] und ist gerade für Karzinome der Lunge als Faktor für Polyploidie und apoptotischen Tod verantwortlich [287]. Zusätzlich ist durch FAM46C über den PTEN/AKT-Signaltransduktionsweg eine Regulation der Zellproliferation, Zellzyklus-Progression und Einleitung der Apoptose beschrieben. Dies führt bei Prostatakarzinomen zu einer erhöhten Chemotherapie-Sensitivität [288]. Und auch bei Myelomen wird FAM46C als Tumorsuppressor gehandelt [289]. Auch

für Lungenkarzinome kann bei Assoziation zu differenzierten Karzinomen und Überexpression von FAM46C eine Tumorkontrolle diskutiert werden.

4.3.3 Klinische Korrelation herunterregulierter Quellproteine

Auch für die in der semi-quantitativen Analyse herunterregulierten Quellproteine ergeben sich signifikante Korrelationen.

Für Serum-Albumin (P02768) ist eine Herunterregulation des Quellproteins signifikant häufiger bei pulmonalen Adenokarzinomen, als bei pulmonalen Plattenepithelkarzinomen aufgetreten. Zwar wurde bereits häufiger Serum Albumin als prognostischer Faktor bei Tumoren diskutiert [290], da jedoch viele Einflussfaktoren wie beispielsweise Leberfunktion oder Ernährungsstatus eine Rolle spielen, kommt Serum Albumin weiterhin keine erhöhte Aufmerksamkeit als Biomarker in der Tumordiagnostik zu.

Für das Tight junction protein ZO-1 (Q07157) zeigt sich hingegen bezüglich der Herunterregulation eine Assoziation zu plattenepithelialer Histologie. Tight junction protein ZO-1 (TJP1) ist ein Adaptor-Protein, dessen Expression sich während der Tumorentwicklung verändert [291]. PCR-Analysen bei NSCLCs konnten eine reduzierte Expression in Tumorgeweben bereits zeigen [292], eine stark erniedrigte Expression zeigte in den beschriebenen Fällen eine Assoziation zu einer schlechteren Prognose [292]. Auch in anderen Karzinomerkrankungen wie Brustkrebs [293], Kolorektalen Karzinomen [294] oder Hepatozellulären Karzinomen [295] ist eine Wirkung als Tumorsuppressor beschrieben, während für Melanome [296], Magenkarzinome [297] und Pankreaskarzinome [298] eine Steigerung der Zellmotilität beschrieben wird. Signifikante Korrelationen der Herunterregulation zum Differenzierungsgrad oder dem Lymphknotenstatus zeigen sich in der vorliegenden Population jedoch nicht, sodass eine diesbezügliche Korrelation nicht nachvollzogen werden kann. Eine klare Assoziation zu Plattenepithelkarzinomen wird in der Literatur jedoch nicht beschrieben, die genannten NSCLC-Studien geben

teilweise keine differenzierte Histologie an [292,299] oder zeigen den Nachweis anhand von Adenokarzinomlinien [291].

In der vorliegenden Population besteht eine signifikante Korrelation der Herunterregulation des Angiotensin converting enzyme (P12821) zum weiblichen Geschlecht. Angiotensin converting enzyme (ACE) spielt eine Rolle im Renin-Angiotensin-System [300]. ACE stellt ein häufig untersuchtes Protein im Zusammenhang mit Karzinomen dar, diese Rolle wurde 1998 provokant in den Vordergrund gerückt, da Patienten unter Behandlung mit ACE-Hemmern eine geringere Rate an Brust- und Lungenkarzinomen attestiert wurde [301]. In den nachfolgenden Analysen zeigte sich dann eine deutlich verminderte ACE-Expression bei Lungenkarzinomgewebe im Verhältnis zu normalem Lungengewebe. Die Serum-Aktivität von ACE wurde daher als leicht zu messender Faktor in der Verlaufsbeurteilung diskutiert [302]. Es liegen Daten vor, die für eine verstärkte Wirkung systemischer anti-tumor-Therapien unter ACE-Hemmern sprechen [303]. Die Assoziation von einer reduzierten Expression von ACE zum weiblichen Geschlecht erscheint in Betrachtung aktueller Daten im Rahmen der CoVid-19-Pandemie eher unwahrscheinlich. Hier wird bei niedriger Rate an schweren Erkrankungen bei Frauen trotz gleicher Infektionsraten und einer bekannten reduzierten Expression von ACE2 durch SARS-CoV eine Assoziation diskutiert [304]. So wird eine bessere Protektion vor SARS-CoV durch die Hochregulation von ACE2 durch Östrogen [305] und durch die Lokalisation auf dem X-Chromosom und somit genetisch bedingte Überexpression bei Frauen [306] diskutiert. Im Umkehrschluss könnte dies auch die signifikante Korrelation der Herunterregulation zum weiblichen Geschlecht erklären, da dort bei normalem Gewebe eine erhöhte Expression zu finden ist, sodass sich auch schon eine teilweise Herunterregulation deutlich abzeichnet. Eine mögliche Beeinträchtigung der Ergebnisse durch die Einnahme von ACE-Hemmern zeigt sich unter Berücksichtigung der Medikation (4 von 21 Patienten mit Einnahme von ACE-Hemmern, davon 1 Frau) nicht. Anhand der Daten lässt sich jedoch zusätzlich der vorbeschriebene Einfluss von Nikotinkonsum auf die ACE-Expression [307] nachvollziehen. So ist bei allen Patienten ohne Nikotinkonsum eine Herunterregulation von ACE

nachzuweisen, während bei Patienten mit Nikotinkonsum großteils keine Herunterregulation zu erkennen ist. Dies könnte durch die bekannte Hochregulation von ACE durch Nikotin [308] kommen, welches beispielsweise für SARS-CoV-2 einen Risikofaktor [309] bedeutet.

In dieser Studie kann eine Assoziation des Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2; P35968) zum Lymphknotenbefall gezeigt werden. So korreliert eine Herunterregulation des VEGFR2 signifikant mit einem Lymphknotenbefall. Dies scheint nach bisheriger Datenlage eher ungewöhnlich, da VEGFR2 eine wichtige Rolle in der Lymphangiogenese [310-312] spielt und somit eher mit Lymphknotenbefall [313] assoziiert sein könnte. Ein Ungleichgewicht von VEGFR2 könnte an der Karzinogenese [314] beteiligt sein. VEGFR2 selbst hingegen zeigt laut Literatur für NSCLCs das Potenzial eines Biomarkers [315,316] und stellt auch für Therapien des NSCLC eine Möglichkeit in der Unterstützung einer Therapie dar [317,318].

Eine Assoziation zum Nikotinkonsum besteht ebenfalls für LIM domain only protein 7 (LMO7; Q8WWI1), so ist dies bei sämtlichen Nichtrauchern herunterreguliert, jedoch nur bei wenigen Rauchern. Klare Assoziationen zum Nikotinabusus sind bis dato nicht erforscht, jedoch wird LMO7 als Tumorsuppressor bei pulmonalen Adenokarzinomen [319] diskutiert und eine Herunterregulation geht mit einer verschlechterten Prognose [319-321] einher. Daher wird ein Eingriff in diesem Bereich zur Tumorthherapie [321] diskutiert.

Bei Nichtrauchern zeigt sich außerdem eine signifikant häufigere Herunterregulation von Kelch-like protein 5 (KLHL5; Q96PQ7). In der Literatur ist bis dato keine Verbindung zwischen Nikotinkonsum und KLHL5 beschrieben, eine häufige Herunterregulation bei NSCLCs [322] ist jedoch vorbeschrieben. Zusätzlich wird eine deutliche Korrelation zur Prognose [322] und auch ein Einfluss auf die Infiltration von Immunzellen [322] diskutiert. Ein Knockdown von KLHL5 scheint Karzinomen gegenüber verschiedenen Therapien, u.a. Akt/PI3K/mTOR Inhibitoren, zu sensibilisieren [323].

Insgesamt ergeben sich wenige Korrelationen, jedoch scheinen gerade die Assoziation häufiger Herunterregulationen zum Nikotinkonsum weiterer Nachforschungen zu bedürfen.

4.4 Patientenzuordnung stark betroffener Signaltransduktionswege

Ein weiteres Potenzial der Analyse der Signaltransduktionswege besteht in der Feststellung hoch- oder herunterregulierter Signaltransduktionswege, die weitere Ansatzpunkte für eine zielgerichtete Therapie [184] darstellen könnten.

In der aktuellen Population sind durch die tumorspezifischen und herunterregulierten Quellproteine sehr viele verschiedene Signaltransduktionswege betroffen. Ein stark herunterregulierter oder tumorspezifischer Signaltransduktionsweg lässt sich in der Probe nicht darstellen. Aus der Gruppe der hochregulierten Quellproteine kristallisiert sich jedoch klar der PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg als hochreguliert heraus.

Der PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg ist bekanntermaßen in vielen Karzinomen überexprimiert [324] und ist Bestandteil vielfältiger Aufgaben in Karzinomen, wie Zellproliferation, Zelladhäsion, Zellüberleben und Zellmotilität [324,325]. Daher stellt der PI3K-AKT-Signaltransduktionsweg auch einen Therapieansatz bei NSCLCs [326] dar. Vorwiegend werden zur Indikationsstellung einer Therapie der Nachweis von Mutationen oder Amplifikationen genutzt [326]. Bezogen auf die aktuelle Population sind diese bei keiner der Proben bis dato untersucht worden, sodass eine Korrelation mit der molekularpathologischen Diagnostik ergänzt werden sollte.

Zusätzlich ist für eine PI3K/AKT-Überexpression eine Assoziation zu aktivierenden Mutationen wie KRAS oder EGFR [326] beschrieben. Auch dies kann aufgrund fehlender Daten an der vorliegenden Population nicht nachvollzogen werden, da die entsprechende Diagnostik fehlt. Es erscheint zielführend diese anzuschließen.

Nachvollziehen lässt sich jedoch die vorbeschriebene Assoziation zu plattenepithelialer Histologie der NSCLCs [326]. So sind 7 der Proben mit starker Überexpression von PI3K/AKT Plattenepithelkarzinome der Lunge, während 2 Adenokarzinome der Lunge sind.

Bisher besteht ein Therapieansatz für PI3K/Akt-Inhibitoren nur auf dem Boden einer Mutation oder Amplifikation. Es sollten nun vergleichende Sequenzierungen über bestehende Mutationen oder Amplifikationen bei überexprimierten Quellproteinen aus der Ligandomanalyse durchgeführt werden. Sollten sich abweichende Ergebnisse ergeben, sollte zusätzlich z.B. mittels Proteomanalyse eine erweiterte Aufarbeitung der Überexpression erfolgen. Da in der Ligandomanalyse eine Überexpression nachgewiesen werden konnte, sollte das Einsatzgebiet von PI3K/Akt-Inhibitoren überprüft und ggf. erweitert werden.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Therapie des NSCLC erreicht. Es besteht weiterhin bei geringer Gesamtüberlebenszeit und hoher Inzidenz ein dringlicher Bedarf weitere Therapien zu etablieren. Weitere Therapien werden durch Therapieansätze im Rahmen der personalisierten Medizin ermöglicht und Vakzinierungen stellen ein hohes Potenzial für gut verträgliche Therapien dar. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass gerade für die genaue Auswahl von Peptiden beziehungsweise ihren Quellproteinen eine auf die Ligandomanalyse aufbauende Analyse betroffener Signaltransduktionswege ein hohes Selektionspotenzial bietet. So konnten aus den vorher diskutierten tumorspezifischen Quellproteinen durch Ausschluss zugeordneter bekannter Signaltransduktionswege Quellproteine mit hohem Potenzial wie PRAME oder MAGEA3/6 isoliert werden. Zusätzlich konnten weitere Quellproteine mit noch unbekanntem Potenzial wie TMEM39A oder CRISPLD2 für weitere Untersuchungen selektioniert werden.

Klare klinische Korrelationen zur Eingrenzung des diagnostischen Aufwandes ließen sich in der aktuellen Kohorte nicht nachweisen, was am ehesten auf die geringe Kohortengröße zurückzuführen ist. Jedoch konnte an verschiedenen Quellproteinen gezeigt werden, dass durch die Überexpression im untersuchten Ligandom eine Repräsentanz bekannter Assoziationen zu Überexpressionen oder diskutierten Biomarkern gegeben ist.

Zusätzlich konnte belegt werden, dass die teilweise kritisch betrachtete semiquantitative Analyse hoch- oder herunterregulierter Quellproteine mittels anschließender Analyse der Signaltransduktionswege das Potenzial bietet, neue Ansatzpunkte für Therapien zu finden. In diesem Fall scheint bei deutlicher Überexpression im Falle mehrerer Probanden ein Therapieversuch mit PI3K/Akt-Inhibitoren diskussionswürdig. Da bis dato dies nur bei mutiertem PI3K durchgeführt wird, sollte im Rahmen weitergehender Untersuchungen auch eine Korrelation zu Mutationen oder eine unabhängige PI3K-Überregulierung untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Pikor LA, Ramnarine VR, Lam S, Lam WL. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer*. 2013;82(2):179-189.
2. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-1260.
3. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Berlin 2017.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
5. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg), Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin 2016.
6. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0. AWMF-Registernummer: 020/007OL 2018. Accessed 05.11.2021, 2019.
7. Graham H. Smoking prevalence among women in the European Community 1950–1990. *Social Science & Medicine*. 1996;43(2):243-254.
8. Mons U, Kahnert S. Neuberechnung der tabakattributablen Mortalität – Nationale und regionale Daten für Deutschland. *Das Gesundheitswesen*. 2017;81.
9. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002;21(48):7435-7451.
10. International Agency for Research on Cancer (Hrsg.) *Tobacco Smoke and Involuntary Smoking*. Vol 83. Lyon: World Health Organization; 2004.
11. Pöttchke-Langer MK, Sarah; Schaller, Katrin; Viarisio, Verena; Heidt, Christopher; Schunk, Susanne; Mons, Ute; Fode, Kristin. *Tabakatlas Deutschland 2015*. Heidelberg: Deutsches Krebsforschungszentrum; 2015.
12. Orth BM, Christina. *Rauchen bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen in Deutschland. Ergebnisse des Alkoholsurveys 2016 und Trends. BZgA-Forschungsbericht*. Köln: Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung; 2018.
13. Simonato L, Agudo A, Ahrens W, et al. Lung cancer and cigarette smoking in Europe: An update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity. *International Journal of Cancer*. 2001;91(6):876-887.
14. Boffetta P, Pershagen Gr, Jöckel K-H, et al. Cigar and Pipe Smoking and Lung Cancer Risk: a Multicenter Study From Europe. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(8):697-701.
15. Lauby-Secretan B, Straif K, Baan R, et al. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *The lancet oncology*. 2009;10:1033-1034.
16. Brennan P, Buffler PA, Reynolds P, et al. Secondhand smoke exposure in adulthood and risk of lung cancer among never smokers: A pooled analysis of two large studies. *International Journal of Cancer*. 2004;109(1):125-131.
17. Stayner L, Bena J, Sasco A, et al. Lung Cancer Risk and Workplace Exposure to Environmental Tobacco Smoke. *American journal of public health*. 2007;97:545-551.
18. Darby S, Hill D, Auvinen A, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: Collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ: British medical journal*. 2005;330:223.

19. Pope C, Burnett R, Thun M, et al. Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-Term Exposure to Fine Particulate Air Pollution. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2002;287:1132-1141.
20. Brüske I, Möhner M, Ahrens W, et al. Lung cancer risk in male workers occupationally exposed to diesel motor emissions in Germany. *American journal of industrial medicine*. 1999;36:405-414.
21. Gminski R, Volker Mersch S. Evaluation of effects caused by exposure to toner dusts and emissions of laser printers and photocopiers to human health: Current state of knowledge. *Umweltmedizin in Forschung und Praxis*. 2006;11:269-300.
22. Beckles M, Spiro S, Colice G, Rudd R. Initial evaluation of the patient with lung cancer. Symptoms, sign, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. *Chest*. 2003;123:97S-104S.
23. Spiro SG, Gould MK, Colice GL. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007;132(3 Suppl):149s-160s.
24. Hetzel J, Eberhardt R, Herth FJF, et al. Cryobiopsy increases the diagnostic yield of endobronchial biopsy: a multicentre trial. *European Respiratory Journal*. 2012;39(3):685-690.
25. British Thoracic Society guidelines on diagnostic flexible bronchoscopy. *Thorax*. 2001;56 Suppl 1(Suppl 1):i1-21.
26. Yung RC. Tissue diagnosis of suspected lung cancer: selecting between bronchoscopy, transthoracic needle aspiration, and resectional biopsy. *Respir Care Clin N Am*. 2003;9(1):51-76.
27. Sihoe AD, Yim AP. Lung cancer staging. *J Surg Res*. 2004;117(1):92-106.
28. Rami-Porta R, Bolejack V, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2015;10(7):990-1003.
29. Deutsche Krebsgesellschaft e.V.; Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.; Deutsche Gesellschaft für Thoraxchirurgie Zertifizierungskommission Lungenkrebszentren; Hans Hoffmann SZ, Dieter Ukena, Stellv. Sprecher Zertifizierungskommission; Simone Wesselmann, Deutsche Krebsgesellschaft e.V.; Johannes Rückher, Deutsche Krebsgesellschaft e.V.; Agnes Bischofberger, OnkoZert; Orsolya Penzes, OnkoZert; Julia Ferencz, OnkoZert. *Jahresbericht der zertifizierten Lungenkrebszentren - Kennzahlenauswertung 2020*. Berlin 2020.
30. Eberhardt WE, Gauler TC, Lepechoux C, et al. 10-year long-term survival (LTS) of induction chemotherapy with three cycles cisplatin/paclitaxel followed by concurrent chemoradiation cisplatin/etoposide/45 Gy (1.5 Gy bid) plus surgery in locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC)-a multicenter phase-II trial (CISTAXOL). *Lung Cancer*. 2013;82(1):83-89.
31. Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(4):351-360.
32. Rowell NP, Williams CJ. Radical radiotherapy for stage I/II non-small cell lung cancer in patients not sufficiently fit for or declining surgery (medically inoperable). *Cochrane Database Syst Rev*. 2001(2):Cd002935.
33. Fournel P, Robinet G, Thomas P, et al. Randomized phase III trial of sequential chemoradiotherapy compared with concurrent chemoradiotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer: Groupe Lyon-Saint-Etienne d'Oncologie Thoracique-Groupe

- Français de Pneumo-Cancérologie NPC 95-01 Study. *J Clin Oncol*. 2005;23(25):5910-5917.
34. De Ruysscher D, Wanders R, van Baardwijk A, et al. Radical treatment of non-small-cell lung cancer patients with synchronous oligometastases: long-term results of a prospective phase II trial (Nct01282450). *J Thorac Oncol*. 2012;7(10):1547-1555.
 35. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(21):3543-3551.
 36. Socinski MA, Bondarenko I, Karaseva NA, et al. Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: final results of a phase III trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2055-2062.
 37. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo j*. 1992;11(11):3887-3895.
 38. Raman R, Vaena D. *Immunotherapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Comprehensive Review*. Vol 20152015.
 39. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(19):1823-1833.
 40. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(17):1627-1639.
 41. Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(21):2040-2051.
 42. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(22):2078-2092.
 43. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *The Lancet*. 2017;389(10066):255-265.
 44. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(24):2342-2350.
 45. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(24):2288-2301.
 46. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*. 2003;9(6):669-676.
 47. Seto T, Higashiyama M, Funai H, et al. Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006;53(1):91-96.
 48. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber H-P, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004;3(5):391-400.
 49. Garon EB, Ciuleanu T-E, Arrieta O, et al. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. *The Lancet*. 2014;384(9944):665-673.

50. Reck M, Kaiser R, Mellempgaard A, et al. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2014;15(2):143-155.
51. Wallin JJ, Bendell JC, Funke R, et al. Atezolizumab in combination with bevacizumab enhances antigen-specific T-cell migration in metastatic renal cell carcinoma. *Nature Communications*. 2016;7(1):12624.
52. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *The Lancet*. 2016;387(10026):1415-1426.
53. Heigener DF, Reck M. Lungenkarzinom: Mehr Optionen für Patienten im fortgeschrittenen Stadium. *Dtsch Arztebl International*. 2017;114(48):-9-.
54. Villaruz LC, Burns TF, Ramfidis VS, Socinski MA. Personalizing Therapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013;34(06):822-836.
55. Länger F, Lehmann U, Kreipe H, Heigener D, Weichert W, Wellmann A. Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom: Wandel und Möglichkeiten der molekularen Diagnostik. *Dtsch Arztebl International*. 2016;113(8):-8-.
56. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet*. 2017;389(10066):299-311.
57. Cataldo VD, Gibbons DL, Pérez-Soler R, Quintás-Cardama A. Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer with Erlotinib or Gefitinib. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(10):947-955.
58. Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Final overall survival results from a randomised, phase III study of erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment of EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802). *Annals of Oncology*. 2015;26(9):1877-1883.
59. Yang JC-H, Wu Y-L, Schuler M, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *The Lancet Oncology*. 2015;16(2):141-151.
60. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2017;378(2):113-125.
61. Wu YL, Cheng Y, Zhou X, et al. Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(11):1454-1466.
62. Michels SYF, Nogova L, Deschler-Baier B, et al. EATON: An open-label, multicenter, phase I dose-escalation trial of nazartinib (EGF816) and trametinib in patients with EGFR-mutant non-small cell lung cancer – preliminary data on safety and tolerability. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(15_suppl):e20577-e20577.
63. Song Z, Wang M, Zhang A. Alectinib: a novel second generation anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor for overcoming clinically-acquired resistance. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(1):34-37.
64. Blackhall F, Kim DW, Besse B, et al. Patient-reported outcomes and quality of life in PROFILE 1007: a randomized trial of crizotinib compared with chemotherapy in previously treated patients with ALK-positive advanced non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2014;9(11):1625-1633.
65. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, et al. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK-Positive Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(23):2167-2177.

66. Soria JC, Tan DSW, Chiari R, et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2017;389(10072):917-929.
67. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(9):829-838.
68. Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ, et al. Brigatinib Versus Crizotinib in Advanced ALK Inhibitor-Naive ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: Second Interim Analysis of the Phase III ALTA-1L Trial. *J Clin Oncol*. 2020;38(31):3592-3603.
69. Solomon BJ, Besse B, Bauer TM, et al. Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2018;19(12):1654-1667.
70. Rolfo C, Caglevic C, Santarpia M, et al. Immunotherapy in NSCLC: A Promising and Revolutionary Weapon. In: Naing A, Hajar J, eds. *Immunotherapy*. Cham: Springer International Publishing; 2017:97-125.
71. Murphy KM, Weaver, Casey ed *Janeway Immunologie*. 2018 ed. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum Verlag; 2018; No. 9.Auflage.
72. Habs H. Immunological concepts in Thucydides' works. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*. 1982;252: 143-6.
73. Doherty M, Robertson MJ. Some early Trends in Immunology. *Trends in Immunology*. 2004;25(12):623-631.
74. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*. 2005;18(1):21-25.
75. Coley WB. Treatment of inoperable malignant tumors with the toxins of erysipelas and the bacillus prodigiosus. *The American Journal of the Medical Sciences (1827-1924)*. 1894;108(1):50.
76. Coley WB. The Treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *The American Journal of the Medical Sciences (1827-1924)*. 1893;105(6):487.
77. Hopton Cann SA, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgraduate Medical Journal*. 2003;79(938):672-680.
78. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa orthopaedic journal*. 2006;26:154-158.
79. Silverstein AM. Paul Ehrlich, archives and the history of immunology. *Nature Immunology*. 2005;6:639.
80. Trowsdale J. Molecular genetics of the MHC. *Immunology*. 1988;64(Suppl 1):21-23.
81. Hauptmann G, Bahram S. Genetics of the central MHC. *Current Opinion in Immunology*. 2004;16(5):668-672.
82. Pyo C-W, Williams LM, Moore Y, et al. HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphism: genomic sequence defines haplotype structure and variation spanning the nonclassical class I genes. *Immunogenetics*. 2006;58(4):241-251.
83. Lee N, Llano M, Carretero M, et al. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(9):5199-5204.
84. Wei X, Orr HT. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Human Immunology*. 1990;29(2):131-142.
85. Schütt CB, B. *Grundwissen Immunologie*. 3rd Edition. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum Verlag; 2011.

86. Madden DR. The Three-Dimensional Structure of Peptide-MHC Complexes. *Annual Review of Immunology*. 1995;13(1):587-622.
87. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 1987;329(6139):506-512.
88. Hewitt EW. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*. 2003;110(2):163-169.
89. Leone P, Shin E-C, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC Class I Antigen Processing and Presenting Machinery: Organization, Function, and Defects in Tumor Cells. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(16):1172-1187.
90. Stern LJ, Wiley DC. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure*. 1994;2(4):245-251.
91. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Frontiers in immunology*. 2017;8:292-292.
92. Yaneva R, Schneeweiss C, Zacharias M, Springer S. Peptide binding to MHC class I and II proteins: new avenues from new methods. *Molecular Immunology*. 2010;47(4):649-657.
93. Meydan C, Otu HH, Sezerman OU. Prediction of peptides binding to MHC class I and II alleles by temporal motif mining. *BMC bioinformatics*. 2013;14 Suppl 2(Suppl 2):S13-S13.
94. Chelvanayagam G. A roadmap for HLA-A, HLA-B, and HLA-C peptide binding specificities. *Immunogenetics*. 1996;45(1):15-26.
95. Fremont DH, Hendrickson WA, Marrack P, Kappler J. Structures of an MHC Class II Molecule with Covalently Bound Single Peptides. *Science*. 1996;272(5264):1001-1004.
96. Hershko A, Ciechanover A. The Ubiquitin System. *Annual Review of Biochemistry*. 1998;67(1):425-479.
97. D. Voges, P. Zwickl a, Baumeister W. The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. *Annual Review of Biochemistry*. 1999;68(1):1015-1068.
98. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11:823.
99. Bles A, Janulienė D, Hofmann T, et al. Structure of the human MHC-I peptide-loading complex. *Nature*. 2017;551:525.
100. Stevanovic S, Schild H. Quantitative aspects of T cell activation—peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Seminars in Immunology*. 1999;11(6):375-384.
101. West MA, Lucocq JM, Watts C. Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. *Nature*. 1994;369(6476):147-151.
102. Bryant PW, Lennon-Duménil A-M, Fiebiger E, Lagaudrière-Gesbert C, Ploegh HL. Proteolysis and antigen presentation by MHC class II molecules. *Advances in Immunology*. Vol 80: Academic Press; 2002:71-114.
103. ten Broeke T, Wubbolts R, Stoorvogel W. MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5(12):a016873-a016873.
104. Busch R, Doebele RC, Patil NS, Pashine A, Mellins ED. Accessory molecules for MHC class II peptide loading. *Current Opinion in Immunology*. 2000;12(1):99-106.
105. Yin L, Maben ZJ, Becerra A, Stern LJ. Evaluating the Role of HLA-DM in MHC Class II-Peptide Association Reactions. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2015;195(2):706-716.

106. Lazarski CA, Chaves FA, Sant AJ. The impact of DM on MHC class II-restricted antigen presentation can be altered by manipulation of MHC-peptide kinetic stability. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(5):1319-1328.
107. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(22):7922-7927.
108. Kageyama S, Tsomides TJ, Sykulev Y, Eisen HN. Variations in the number of peptide-MHC class I complexes required to activate cytotoxic T cell responses. *The Journal of Immunology*. 1995;154(2):567-576.
109. Bentley GA, Mariuzza RA. The structure of the T cell antigen receptor. *Annual Review of Immunology*. 1996;14(1):563-590.
110. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988;334(6181):395.
111. Padlan EA, Margulies DH. T-cell receptors: Feeling out the complex. *Current Biology*. 1997;7(1):R17-R20.
112. Wilson IA, Christopher Garcia K. T-cell receptor structure and TCR complexes. *Current Opinion in Structural Biology*. 1997;7(6):839-848.
113. Esin S, Shigematsu M, Nagai S, Eklund A, Wigzell H, Grunewald J. Different Percentages of Peripheral Blood $\gamma\delta$ T Cells in Healthy Individuals from Different Areas of the World. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1996;43(5):593-596.
114. Garcillán B, Marin AVM, Jiménez-Reinoso A, et al. $\gamma\delta$ T Lymphocytes in the Diagnosis of Human T Cell Receptor Immunodeficiencies. *Frontiers in immunology*. 2015;6:20-20.
115. Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg H-H, Kabelitz D. Innate immune functions of human $\gamma\delta$ T cells. *Immunobiology*. 2008;213(3):173-182.
116. Attaf M, Huseby E, Sewell AK. $\alpha\beta$ T cell receptors as predictors of health and disease. *Cellular And Molecular Immunology*. 2015;12:391.
117. Kappler J, Kubo R, Haskins K, et al. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells in mouse and man: Identification of constant and variable peptides. *Cell*. 1983;35(1):295-302.
118. Minden M, Mak T. The structure of the T cell antigen receptor genes in normal and malignant T cells. *Blood*. 1986;68(2):327-336.
119. Kung P, Goldstein G, L, Reinherz E, F Schlossman S. *Monoclonal Antibodies defining distinctive human T cell surface antigens*. Vol 2061979.
120. Dietrich J, Neisig A, Hou X, Wegener AM, Gajhede M, Geisler C. Role of CD3 gamma in T cell receptor assembly. *The Journal of Cell Biology*. 1996;132(3):299-310.
121. Ashwell JD, Klausner RD. Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annual Review of Immunology*. 1990;8(1):139-167.
122. Buslepp J, Wang H, Biddison WE, Appella E, Collins EJ. A Correlation between TCR $V\alpha$ Docking on MHC and CD8 Dependence: Implications for T Cell Selection. *Immunity*. 2003;19(4):595-606.
123. Kerry SE, Buslepp J, Cramer LA, et al. Interplay between TCR Affinity and Necessity of Coreceptor Ligation: High-Affinity Peptide-MHC/TCR Interaction Overcomes Lack of CD8 Engagement. *The Journal of Immunology*. 2003;171(9):4493-4503.
124. Ding Y-H, Smith KJ, Garboczi DN, Utz U, Biddison WE, Wiley DC. Two Human T Cell Receptors Bind in a Similar Diagonal Mode to the HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids. *Immunity*. 1998;8(4):403-411.
125. Wu LC, Tuot DS, Lyons DS, Garcia KC, Davis MM. Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide-MHC. *Nature*. 2002;418:552.

126. Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ, Eisen HN. Evidence that a Single Peptide–MHC Complex on a Target Cell Can Elicit a Cytolytic T Cell Response. *Immunity*. 1996;4(6):565-571.
127. Weidanz JA, Hawkins O, Verma B, Hildebrand WH. TCR-like biomolecules target peptide/MHC Class I complexes on the surface of infected and cancerous cells. *International reviews of immunology*. 2011;30(5-6):328-340.
128. Weidanz JA, Nguyen T, Woodburn T, et al. Levels of Specific Peptide-HLA Class I Complex Predicts Tumor Cell Susceptibility to CTL Killing. *The Journal of Immunology*. 2006;177(8):5088-5097.
129. Abraham RT, Weiss A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4:301.
130. Lin J, Weiss A. T cell receptor signalling. *Journal of Cell Science*. 2001;114(2):243-244.
131. Wang H, Kadlecik TA, Au-Yeung BB, et al. ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(5):a002279-a002279.
132. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: A 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR ζ chain. *Cell*. 1992;71(4):649-662.
133. Gorentla BK, Zhong X-P. T cell Receptor Signal Transduction in T lymphocytes. *Journal of clinical & cellular immunology*. 2012;2012(Suppl 12):5-5.
134. Visco C, Magistrelli G, Bosotti R, et al. *Activation of Zap-70 tyrosine kinase due to a structural rearrangement induced by tyrosine phosphorylation and/or ITAM binding*. Vol 392000.
135. Abram CL, Lowell CA. The Expanding Role for ITAM-Based Signaling Pathways in Immune Cells. *Science's STKE*. 2007;2007(377):re2-re2.
136. Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *British medical journal*. 1957;1(5022):779-786.
137. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *The Lancet*. 2007;370(9581):59-67.
138. van Leeuwen MT, Webster AC, McCredie MRE, et al. Effect of reduced immunosuppression after kidney transplant failure on risk of cancer: population based retrospective cohort study. *BMJ*. 2010;340:c570.
139. Rammensee H-G, Weinschenk T, Gouttefangeas C, Stevanovi E S. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunological reviews*. 2002;188(1):164-176.
140. L. Disis M, A. Cheever M. *HER-2/neu Oncogenic Protein: Issues in Vaccine Development*. Vol 181998.
141. Karanikas V, Hwang LA, Pearson J, et al. Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-MUC1 fusion protein. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(11):2783-2792.
142. Novellino L, Castelli C, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2005;54(3):187-207.
143. Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2001;50(1):3-15.
144. Trautwein NP. HLA-Liganden für die aktiv personalisierte Immuntherapie von Leberkrebs und Gliomen 2019, Tübingen.
145. Jessy T. Immunity over inability: The spontaneous regression of cancer. *Journal of natural science, biology, and medicine*. 2011;2(1):43-49.
146. Carstens JL, Correa de Sampaio P, Yang D, et al. Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer. *Nature Communications*. 2017;8:15095.

147. Pagès F, Berger A, Camus M, et al. Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(25):2654-2666.
148. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(3):203-213.
149. Maher J, Davies ET. Targeting cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy. *British journal of cancer*. 2004;91:817.
150. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2015;6(368).
151. Meissner M, Reichert T, Kunkel M, et al. *Meissner M, Reichert TE, Kunkel M, Gooding W, Whiteside TL, Ferrone S, Seliger B* Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 11: 2552-2560. Vol 112005.
152. Torres MJ, Ruiz-Cabello F, Skoudy A, et al. Loss of an HLA haplotype in pancreas cancer tissue and its corresponding tumor derived cell line. *Tissue Antigens*. 1996;47(5):372-381.
153. Jiménez P, Cabrera T, Méndez R, et al. A nucleotide insertion in exon 4 is responsible for the absence of expression of an HLA-A*0301 allele in a prostate carcinoma cell line. *Immunogenetics*. 2001;53(7):606-610.
154. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology*. 2006;119(2):254-264.
155. Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Research*. 2016;27:109.
156. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood*. 2006;108(3):804-811.
157. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*. 1999;17:3247.
158. Kuriyama S, Tsuji T, Sakuma T, Yamamoto T, Tanaka M. PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax-Bak hetero-oligomerization through interaction with Bid in human colon cancer. *Cell Death Discovery*. 2018;4(1):11.
159. Huber, C [Hrsg.]; Rammensee, HG [Hrsg.]; Wölfel, T [Hrsg.]; Britten, CM [Hrsg.], ed *Krebsimmuntherapien: Standards und Innovationen*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2008.
160. Krebsinformationsdienst Deutsches Krebsforschungszentrum. www.krebsinformationsdienst.de/fachkreise/nachrichten/2018/fk11-car-t-zell-therapie-krebs-zulassung.php. Accessed 20.03.2019, 2019.
161. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*. 2018;359(6382):1361-1365.
162. Clinicaltrials.gov. Study of Nivolumab in Combination With Ipilimumab Compared to the Standard of Care (Extreme Study Regimen) as First Line Treatment in Patients With Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (CheckMate 651) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02741570>. Accessed 29.11.2021, 2021.
163. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(8):3539-3543.
164. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature reviews. Genetics*. 2008;9(10):776-788.

165. Davila E, Kennedy R, Celis E. Generation of Antitumor Immunity by Cytotoxic T Lymphocyte Epitope Peptide Vaccination, CpG-oligodeoxynucleotide Adjuvant, and CTLA-4 Blockade. *Cancer Research*. 2003;63(12):3281-3288.
166. Beck JD, Reidenbach D, Salomon N, et al. mRNA therapeutics in cancer immunotherapy. *Mol Cancer*. 2021;20(1):69.
167. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*. 2001;411:380.
168. Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, et al. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(1):87-97.
169. Dissanayake D, Murakami K, Tran MD, Elford AR, Millar DG, Ohashi PS. Peptide-pulsed dendritic cells have superior ability to induce immune-mediated tissue destruction compared to peptide with adjuvant. *PLoS One*. 2014;9(3):e92380-e92380.
170. Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines—US perspective. *Vaccine*. 2002;20:S18-S23.
171. O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, Rappuoli R, Giudice GD. The history of MF59® adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert Review of Vaccines*. 2013;12(1):13-30.
172. Rammensee HG, Wiesmüller KH, Chandran PA, et al. A new synthetic toll-like receptor 1/2 ligand is an efficient adjuvant for peptide vaccination in a human volunteer. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):307.
173. Wu X, Hasan MA, Chen JY. Pathway and network analysis in proteomics. *Journal of theoretical biology*. 2014;362:44-52.
174. Ideker T, Thorsson V, Ranish JA, et al. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*. 2001;292(5518):929-934.
175. Gehlenborg N, O'Donoghue SI, Baliga NS, et al. Visualization of omics data for systems biology. *Nature Methods*. 2010;7(3):S56-S68.
176. García-Campos MA, Espinal-Enríquez J, Hernández-Lemus E. Pathway Analysis: State of the Art. *Front Physiol*. 2015;6:383.
177. Kanehisa M. A database for post-genome analysis. *Trends Genet*. 1997;13(9):375-376.
178. Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(1):29-34.
179. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):27-30.
180. Vastrik I, D'Eustachio P, Schmidt E, et al. Reactome: a knowledge base of biologic pathways and processes. *Genome Biol*. 2007;8(3):R39.
181. Santiago JA, Potashkin JA. Network-based metaanalysis identifies HNF4A and PTBP1 as longitudinally dynamic biomarkers for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(7):2257-2262.
182. Reynolds CA, Hong MG, Eriksson UK, et al. Analysis of lipid pathway genes indicates association of sequence variation near SREBF1/TOM1L2/ATPAF2 with dementia risk. *Hum Mol Genet*. 2010;19(10):2068-2078.
183. Goh WW, Wong L. Networks in proteomics analysis of cancer. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24(6):1122-1128.
184. Bao Y, Wang L, Shi L, et al. Transcriptome profiling revealed multiple genes and ECM-receptor interaction pathways that may be associated with breast cancer. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2019;24(1):38.
185. Löffler MW, Kowalewski DJ, Backert L, et al. Mapping the HLA Ligandome of Colorectal Cancer Reveals an Imprint of Malignant Cell Transformation. *Cancer Research*. 2018;78(16):4627-4641.

186. Singh-Jasuja H, Emmerich NPN, Rammensee H-G. The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2004;53(3):187-195.
187. Cox A, Skipper J, Chen Y, et al. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science*. 1994;264(5159):716-719.
188. Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, et al. Integrated Functional Genomics Approach for the Design of Patient-individual Antitumor Vaccines. *Cancer Research*. 2002;62(20):5818-5827.
189. Ramakrishna V, Ross MM, Petersson M, et al. Naturally occurring peptides associated with HLA-A2 in ovarian cancer cell lines identified by mass spectrometry are targets of HLA-A2-restricted cytotoxic T cells. *International Immunology*. 2003;15(6):751-763.
190. Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 1991;351(6324):290-296.
191. Walz SD. HLA-Ligandomanalyse des Multiplen Myeloms. [Promotionsarbeit] Tübingen: Medizinischen Fakultät, Eberhard Karls Universität; 2017.
192. Kowalewski DJ, Stevanovic S. Biochemical large-scale identification of MHC class I ligands. *Methods Mol Biol*. 2013;960:145-157.
193. Schuster H, Peper JK, Bosmuller HC, et al. The immunopeptidomic landscape of ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(46):E9942-E9951.
194. Stickel J, *Tumorantigene des Nierenzellkarzinoms*. [Promotionsarbeit] Saarbrücken: Südwestdeutscher Verlag für Hochschulschriften; 2011.
195. Powell R, Royal College of Physicians of London, *The pharmacopoeia of the Royal College of Physicians of London, M. DCCC. IX*. London: Longman, Hurst, Rees, and Orme; 1809.
196. Guiliano DB, Antoniou AN. Measuring Synthesis and Degradation of MHC Class I Molecules. In: van Endert P, ed. *Antigen Processing: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013:93-108.
197. Kvist S, Wiman K, Claesson L, Peterson PA, Dobberstein B. Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. *Cell*. 1982;29(1):61-69.
198. Peterson A, Hohmann L, Huang L, Kim B, Eng JK, Martin DB. Analysis of RP-HPLC loading conditions for maximizing peptide identifications in shotgun proteomics. *Journal of Proteome Research*. 2009;8(8):4161-4168.
199. Käll L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nature Methods*. 2007;4:923.
200. Rammensee H-G, Bachmann J, Emmerich NPN, Bachor OA, Stevanović S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999;50(3):213-219.
201. Schuler MM, Nastke M-D, Stevanović S. SYFPEITHI. In: Flower DR, ed. *Immunoinformatics: Predicting Immunogenicity In Silico*. Totowa, NJ: Humana Press; 2007:75-93.
202. Andreatta M, Nielsen M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2016;32(4):511-517.
203. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607-d613.
204. Liebermeister W, Noor E, Flamholz A, Davidi D, Bernhardt J, Milo R. Visual account of protein investment in cellular functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(23):8488-8493.

205. Mao X, Cai T, Olyarchuk JG, Wei L. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. *Bioinformatics*. 2005;21(19):3787-3793.
206. Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung . Technologienetzwerke und Serviceeinheiten Tübingen. <https://dktk.dkfz.de/standorte/tuebingen/serviceeinrichtungen>. Accessed 18.11.2021, 2021.
207. Platten M, Bunse L, Wick A, et al. A vaccine targeting mutant IDH1 in newly diagnosed glioma. *Nature*. 2021;592(7854):463-468.
208. Wick W, Dietrich P-Y, Hilf N, et al. ATIM-20. GAPVAC-101 Trial of a highly personalized peptide vaccination for patients with newly diagnosed Glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2018;20(Suppl 6):vi5-vi5.
209. Hilf N, Kuttruff-Coqui S, Frenzel K, et al. Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature*. 2019;565(7738):240-245.
210. Kowalewski DJ, Schuster H, Backert L, et al. HLA ligandome analysis identifies the underlying specificities of spontaneous antileukemia immune responses in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(2):E166-175.
211. Siegel DA, Fedewa SA, Henley SJ, Pollack LA, Jemal A. Proportion of Never Smokers Among Men and Women With Lung Cancer in 7 US States. *JAMA Oncol*. 2021;7(2):302-304.
212. Pelosof L, Ahn C, Gao A, et al. Proportion of Never-Smoker Non-Small Cell Lung Cancer Patients at Three Diverse Institutions. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(7).
213. Lee HY, Lee SH, Won JK, et al. Analysis of Fifty Hotspot Mutations of Lung Squamous Cell Carcinoma in Never-smokers. *J Korean Med Sci*. 2017;32(3):415-420.
214. Lou F, Huang J, Sima CS, Dycoco J, Rusch V, Bach PB. Patterns of recurrence and second primary lung cancer in early-stage lung cancer survivors followed with routine computed tomography surveillance. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;145(1):75-81; discussion 81-72.
215. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(suppl_4):iv1-iv21.
216. Hofmann O, Caballero O, Stevenson B, et al. Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:20422-20427.
217. Xu Y, Zou R, Wang J, Wang Z-W, Zhu X. The role of the cancer testis antigen PRAME in tumorigenesis and immunotherapy in human cancer. *Cell proliferation*. 2020;53(3):e12770-e12770.
218. Thongprasert S, Yang PC, Lee JS, et al. The prevalence of expression of MAGE-A3 and PRAME tumor antigens in East and South East Asian non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2016;101:137-144.
219. Ikeda H, Lethé B, Lehmann F, et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*. 1997;6(2):199-208.
220. Epping MT, Wang L, Edel MJ, Carlée L, Hernandez M, Bernardis R. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell*. 2005;122(6):835-847.
221. van Baren N, Chambost H, Ferrant A, et al. PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. *Br J Haematol*. 1998;102(5):1376-1379.

222. Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, et al. mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *Int J Cancer*. 2004;108(5):704-711.
223. Bankovic J, Stojic J, Jovanovic D, et al. Identification of genes associated with non-small-cell lung cancer promotion and progression. *Lung Cancer*. 2010;67(2):151-159.
224. Huang Q, Wei H, Wu Z, et al. Preferentially Expressed Antigen of Melanoma Prevents Lung Cancer Metastasis. *PLoS One*. 2016;11(7):e0149640.
225. Pujol JL, De Pas T, Rittmeyer A, et al. Safety and Immunogenicity of the PRAME Cancer Immunotherapeutic in Patients with Resected Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase I Dose Escalation Study. *J Thorac Oncol*. 2016;11(12):2208-2217.
226. Babiak A, Steinhauser M, Götz M, Herbst C, Döhner H, Greiner J. Frequent T cell responses against immunogenic targets in lung cancer patients for targeted immunotherapy. *Oncol Rep*. 2014;31(1):384-390.
227. Weon JL, Potts PR. The MAGE protein family and cancer. *Current opinion in cell biology*. 2015;37:1-8.
228. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(8):615-625.
229. Doyle JM, Gao J, Wang J, Yang M, Potts PR. MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell*. 2010;39(6):963-974.
230. Blalock LT, Landsberg J, Messmer M, et al. Human dendritic cells adenovirally-engineered to express three defined tumor antigens promote broad adaptive and innate immunity. *Oncoimmunology*. 2012;1(3):287-357.
231. Tajima K, Obata Y, Tamaki H, et al. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer*. 2003;42(1):23-33.
232. De Pas T, Giovannini M, Rescigno M, et al. Vaccines in non-small cell lung cancer: rationale, combination strategies and update on clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;83(3):432-443.
233. Gure AO, Chua R, Williamson B, et al. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(22):8055-8062.
234. Bajpai D, Mehdizadeh S, Uchiyama A, et al. Loss of DLX3 tumor suppressive function promotes progression of SCC through EGFR–ERBB2 pathway. *Oncogene*. 2021;40(21):3680-3694.
235. Palazzo E, Kellett M, Cataisson C, et al. The homeoprotein DLX3 and tumor suppressor p53 co-regulate cell cycle progression and squamous tumor growth. *Oncogene*. 2016;35(24):3114-3124.
236. Kato T, Sato N, Takano A, et al. Activation of Placenta-Specific Transcription Factor *Distal-less* Homeobox 5 Predicts Clinical Outcome in Primary Lung Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(8):2363-2370.
237. Kiehl S, Zimmermann T, Savai R, et al. Epigenetic silencing of downstream genes mediated by tandem orientation in lung cancer. *Scientific reports*. 2017;7(1):3896-3896.
238. Perland E, Bagchi S, Klaesson A, Fredriksson R. Characteristics of 29 novel atypical solute carriers of major facilitator superfamily type: evolutionary conservation, predicted structure and neuronal co-expression. *Open biology*. 2017;7(9):170142.
239. Zhan C, Yan L, Wang L, et al. Identification of immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinoma from squamous cell carcinoma. *Journal of thoracic disease*. 2015;7(8):1398-1405.
240. Xiao J, Lu X, Chen X, et al. Eight potential biomarkers for distinguishing between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(42):71759-71771.

241. Arroyo M, Larrosa R, Gómez-Maldonado J, Cobo MÁ, Claros MG, Bautista R. Expression-based, consistent biomarkers for prognosis and diagnosis in lung cancer. *Clinical and Translational Oncology*. 2020;22(10):1867-1874.
242. Wang Y, Sun M, Liu J, et al. FIBCD1 overexpression predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*. 2019;19.
243. Schlosser A, Thomsen T, Moeller JB, et al. Characterization of FIBCD1 as an acetyl group-binding receptor that binds chitin. *J Immunol*. 2009;183(6):3800-3809.
244. von Huth S, Moeller JB, Schlosser A, et al. Immunohistochemical Localization of Fibrinogen C Domain Containing 1 on Epithelial and Mucosal Surfaces in Human Tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2018;66(2):85-97.
245. Jepsen CS, Dubey LK, Colmorten KB, et al. FIBCD1 Binds *Aspergillus fumigatus* and Regulates Lung Epithelial Response to Cell Wall Components. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1967-1967.
246. Bian T, Zheng M, Jiang D, et al. Prognostic biomarker TUBA1C is correlated to immune cell infiltration in the tumor microenvironment of lung adenocarcinoma. *Cancer cell international*. 2021;21(1):144-144.
247. The Human Protein Atlas. <http://www.proteinatlas.org>. 2021; 20.1. Accessed 29.07.2021, 2021.
248. Uhlen M, Zhang C, Lee S, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017;357(6352).
249. Chiquet BT, Lidral AC, Stal S, et al. CRISPLD2: a novel NSCLP candidate gene. *Hum Mol Genet*. 2007;16(18):2241-2248.
250. Yuan Q, Chiquet BT, Devault L, et al. Craniofacial abnormalities result from knock down of nonsyndromic clefting gene, *crispld2*, in zebrafish. *Genesis*. 2012;50(12):871-881.
251. Kaplan F, Ledoux P, Kassamali FQ, et al. A novel developmentally regulated gene in lung mesenchyme: homology to a tumor-derived trypsin inhibitor. *Am J Physiol*. 1999;276(6):L1027-1036.
252. Kachroo P, Hecker J, Chawes BL, et al. Whole Genome Sequencing Identifies CRISPLD2 as a Lung Function Gene in Children With Asthma. *Chest*. 2019;156(6):1068-1079.
253. Wang L, Yang X, Zhang S, Zhu M. Value of serum CRISPLD2 levels for the diagnosis and prognosis evaluation of sepsis patients. *Scimago Journal & Country Rank*. 2017;29(8):694-699.
254. Zhang H, Kho AT, Wu Q, et al. CRISPLD2 (LGL1) inhibits proinflammatory mediators in human fetal, adult, and COPD lung fibroblasts and epithelial cells. *Physiological Reports*. 2016;4(17):e12942.
255. Zhou M, Guo M, He D, et al. A potential signature of eight long non-coding RNAs predicts survival in patients with non-small cell lung cancer. *Journal of translational medicine*. 2015;13:231-231.
256. Chen J, Cai Y, Xu R, Pan J, Zhou J, Mei J. Identification of four hub genes as promising biomarkers to evaluate the prognosis of ovarian cancer in silico. *Cancer cell international*. 2020;20:270-270.
257. Joshi T, Johnson M, Newton R, Giembycz M. Glucocorticoids and indacaterol regulated gene expressions profiling in human bronchial epithelial cells. *European Respiratory Journal*. 2013;42(Suppl 57):P677.
258. Baty F, Joerger M, Früh M, Klingbiel D, Zappa F, Brutsche M. 24h-gene variation effect of combined bevacizumab/erlotinib in advanced non-squamous non-small cell lung cancer using exon array blood profiling. *Journal of translational medicine*. 2017;15(1):66-66.

259. Corominas-Faja B, Oliveras-Ferraros C, Cuyàs E, et al. Stem cell-like ALDH(bright) cellular states in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: a novel mechanism of acquired resistance to erlotinib targetable with the natural polyphenol silibinin. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 2013;12(21):3390-3404.
260. Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, et al. The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell*. 2015;162(2):425-440.
261. Tran Q, Park J, Lee H, et al. TMEM39A and Human Diseases: A Brief Review. *Toxicological research*. 2017;33(3):205-209.
262. Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. *Hum Mol Genet*. 2010;19(5):953-962.
263. Lessard CJ, Adrianto I, Ice JA, et al. Identification of IRF8, TMEM39A, and IKZF3-ZPBP2 as susceptibility loci for systemic lupus erythematosus in a large-scale multiracial replication study. *Am J Hum Genet*. 2012;90(4):648-660.
264. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2006;314(5797):268-274.
265. Park J, Lee H, Tran Q, et al. Recognition of Transmembrane Protein 39A as a Tumor-Specific Marker in Brain Tumor. *Toxicological research*. 2017;33(1):63-69.
266. Park S, Kim M, Hong Y, et al. Myristoylated TMEM39AS41, a cell-permeable peptide, causes lung cancer cell death. *Toxicological research*. 2020;36(2):123-130.
267. Li Z, Stuart RO, Eraly SA, Gittes G, Beier DR, Nigam SK. Debt91, a putative zinc finger protein differentially expressed during epithelial morphogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;306(3):623-628.
268. Beilke S, Oswald F, Genze F, Wirth T, Adler G, Wagner M. The zinc-finger protein KCMF1 is overexpressed during pancreatic cancer development and downregulation of KCMF1 inhibits pancreatic cancer development in mice. *Oncogene*. 2010;29(28):4058-4067.
269. Kreppel M, Aryee DNT, Schaefer KI, et al. Suppression of KCMF1 by constitutive high CD99 expression is involved in the migratory ability of Ewing's sarcoma cells. *Oncogene*. 2006;25(19):2795-2800.
270. Jang J-H. FIGC, a novel FGF-induced ubiquitin-protein ligase in gastric cancers. *FEBS Letters*. 2004;578(1-2):21-25.
271. Zhu T, Lou Q, Shi Z, Chen G. Identification of key miRNA-gene pairs in gastric cancer through integrated analysis of mRNA and miRNA microarray. *American journal of translational research*. 2021;13(1):253-269.
272. Apostolou P, Toloudi M, Papisotiriou I. Identification of genes involved in breast cancer and breast cancer stem cells. *Breast cancer (Dove Medical Press)*. 2015;7:183-191.
273. Jöbsis GJ, Keizers H, Vreijling JP, et al. Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contractures. *Nat Genet*. 1996;14(1):113-115.
274. Baker NL, Mörgelin M, Peat R, et al. Dominant collagen VI mutations are a common cause of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2005;14(2):279-293.
275. Ding YL, Sun SF, Zhao GL. COL5A2 as a potential clinical biomarker for gastric cancer and renal metastasis. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(7):e24561.
276. Wu Y, Xu Y. Integrated bioinformatics analysis of expression and gene regulation network of COL12A1 in colorectal cancer. *Cancer Medicine*. 2020;9(13):4743-4755.
277. Sun F, Ding W, He JH, Wang XJ, Ma ZB, Li YF. Stomatin-like protein 2 is overexpressed in epithelial ovarian cancer and predicts poor patient survival. *BMC Cancer*. 2015;15:746.

278. Zhao H, Ljungberg B, Grankvist K, Rasmuson T, Tibshirani R, Brooks JD. Gene expression profiling predicts survival in conventional renal cell carcinoma. *PLoS Med.* 2006;3(1):e13.
279. Jiang X, Wu M, Xu X, et al. COL12A1, a novel potential prognostic factor and therapeutic target in gastric cancer. *Mol Med Rep.* 2019;20(4):3103-3112.
280. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet.* 2003;33(1):49-54.
281. Hauptman N, Boštjančič E, Žlajpah M, Ranković B, Zidar N. Bioinformatics Analysis Reveals Most Prominent Gene Candidates to Distinguish Colorectal Adenoma from Adenocarcinoma. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9416515.
282. Ostroff RM, Bigbee WL, Franklin W, et al. Unlocking biomarker discovery: large scale application of aptamer proteomic technology for early detection of lung cancer. *PLoS one.* 2010;5(12):e15003-e15003.
283. Chu Y, Lai Y-H, Lee M-C, et al. Calsyntenin-1, clusterin and neutrophil gelatinase-associated lipocalin are candidate serological biomarkers for lung adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(64):107964-107976.
284. Liu D, Nakano J, Ishikawa S, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2007;58(3):384-391.
285. Kazazian K, Haffani Y, Ng D, et al. FAM46C/TENT5C functions as a tumor suppressor through inhibition of Plk4 activity. *Communications Biology.* 2020;3(1):448.
286. Mason JM, Lin DC, Wei X, et al. Functional characterization of CFI-400945, a Polo-like kinase 4 inhibitor, as a potential anticancer agent. *Cancer Cell.* 2014;26(2):163-176.
287. Kawakami M, Mustachio LM, Zheng L, et al. Polo-like kinase 4 inhibition produces polyploidy and apoptotic death of lung cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(8):1913-1918.
288. Ma L, He H, Jiang K, et al. FAM46C inhibits cell proliferation and cell cycle progression and promotes apoptosis through PTEN/AKT signaling pathway and is associated with chemosensitivity in prostate cancer. *Aging (Albany NY).* 2020;12(7):6352-6369.
289. Mroczek S, Chlebowska J, Kuliński TM, et al. The non-canonical poly(A) polymerase FAM46C acts as an onco-suppressor in multiple myeloma. *Nature Communications.* 2017;8(1):619.
290. Tanriverdi O, Avci N, Oktay E, et al. Pretreatment Serum Albumin Level is an Independent Prognostic Factor in Patients with Stage IIIB Non-Small Cell Lung Cancer: A Study of the Turkish Descriptive Oncological Researches Group. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(14):5971-5976.
291. Lee SH, Paek AR, Yoon K, Kim SH, Lee SY, You HJ. Tight junction protein 1 is regulated by transforming growth factor- β and contributes to cell motility in NSCLC cells. *BMB Rep.* 2015;48(2):115-120.
292. Ni S, Xu L, Huang J, et al. Increased ZO-1 expression predicts valuable prognosis in non-small cell lung cancer. *International journal of clinical and experimental pathology.* 2013;6(12):2887-2895.
293. Hoover KB, Liao SY, Bryant PJ. Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am J Pathol.* 1998;153(6):1767-1773.
294. Kaihara T, Kusaka T, Nishi M, et al. Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2003;22(1):117-123.

295. Nagai T, Arao T, Nishio K, et al. Impact of Tight Junction Protein ZO-1 and TWIST Expression on Postoperative Survival of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Digestive Diseases*. 2016;34(6):702-707.
296. Smalley KS, Brafford P, Haass NK, Brandner JM, Brown E, Herlyn M. Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *Am J Pathol*. 2005;166(5):1541-1554.
297. Resnick MB, Gavilanez M, Newton E, et al. Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Hum Pathol*. 2005;36(8):886-892.
298. Kleeff J, Shi X, Bode HP, et al. Altered expression and localization of the tight junction protein ZO-1 in primary and metastatic pancreatic cancer. *Pancreas*. 2001;23(3):259-265.
299. Hsu YL, Hung JY, Chang WA, et al. Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. *Oncogene*. 2017;36(34):4929-4942.
300. Feng Y, Wan H, Liu J, et al. The angiotensin-converting enzyme 2 in tumor growth and tumor-associated angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2010;23(4):941-948.
301. Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, et al. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet*. 1998;352(9123):179-184.
302. Rømer FK. Angiotensin-converting enzyme and its association with outcome in lung cancer. *Br J Cancer*. 1981;43(2):135-142.
303. Miao L, Chen W, Zhou L, Wan H, Gao B, Feng Y. Impact of Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Type-1 Receptor Blockers on Survival of Patients with NSCLC. *Sci Rep*. 2016;6:21359.
304. Gagliardi MC, Tieri P, Ortona E, Ruggieri A. ACE2 expression and sex disparity in COVID-19. *Cell Death Discovery*. 2020;6(1):37.
305. Bukowska A, Spiller L, Wolke C, et al. Protective regulation of the ACE2/ACE gene expression by estrogen in human atrial tissue from elderly men. *Experimental Biology and Medicine*. 2017;242(14):1412-1423.
306. Tukiainen T, Villani A-C, Yen A, et al. Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature*. 2017;550(7675):244-248.
307. Ljungberg LU, Persson K. Effect of Nicotine and Nicotine Metabolites on Angiotensin-Converting Enzyme in Human Endothelial Cells. *Endothelium*. 2008;15(5-6):239-245.
308. Saijonmaa O, Nyman T, Fyhrquist F. Regulation of angiotensin-converting enzyme production by nicotine in human endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(5):H2000-2004.
309. Maggi F, Rosellini A, Spezia PG, et al. Nicotine upregulates ACE2 expression and increases competence for SARS-CoV-2 in human pneumocytes. *ERJ Open Research*. 2021;7(2):00713-02020.
310. Goldman J, Rutkowski JM, Shields JD, et al. Cooperative and redundant roles of VEGFR-2 and VEGFR-3 signaling in adult lymphangiogenesis. *Faseb j*. 2007;21(4):1003-1012.
311. Dellinger MT, Meadows SM, Wynne K, Cleaver O, Brekken RA. Vascular endothelial growth factor receptor-2 promotes the development of the lymphatic vasculature. *PLoS One*. 2013;8(9):e74686.
312. Wirzenius M, Tammela T, Uutela M, et al. Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting. *J Exp Med*. 2007;204(6):1431-1440.

313. Fujita G, Sato S, Kishino M, et al. Lymphatic vessels and related factors in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Modern Pathology*. 2011;24(7):885-891.
314. Nakao S, Zandi S, Hata Y, et al. Blood vessel endothelial VEGFR-2 delays lymphangiogenesis: an endogenous trapping mechanism links lymph- and angiogenesis. *Blood*. 2011;117(3):1081-1090.
315. Pu D, Liu J, Li Z, Zhu J, Hou M. Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1), Partly Related to Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2) and Microvessel Density, is an Independent Prognostic Factor for Non-Small Cell Lung Cancer. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2017;23:247-257.
316. Ding M, Liu L, Hu C, Liu Y, Qiao Y, Jiang X. Expression of VEGFR2 and NRP-1 in non-small cell lung cancer and their clinical significance. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*. 2014;26(6):669-677.
317. Watanabe H, Ichihara E, Kayatani H, et al. VEGFR2 blockade augments the effects of tyrosine kinase inhibitors by inhibiting angiogenesis and oncogenic signaling in oncogene-driven non-small-cell lung cancers. *Cancer science*. 2021;112(5):1853-1864.
318. Hu C, Zhuang W, Qiao Y, et al. Effects of combined inhibition of STAT3 and VEGFR2 pathways on the radiosensitivity of non-small-cell lung cancer cells. *OncoTargets and therapy*. 2019;12:933-944.
319. Nakamura H, Hori K, Tanaka-Okamoto M, et al. Decreased expression of LMO7 and its clinicopathological significance in human lung adenocarcinoma. *Exp Ther Med*. 2011;2(6):1053-1057.
320. Karlsson T, Kvarnbrink S, Holmlund C, et al. LMO7 and LIMCH1 interact with LRIG proteins in lung cancer, with prognostic implications for early-stage disease. *Lung Cancer*. 2018;125:174-184.
321. Wu H, Zhou J, Mei S, et al. Circulating exosomal microRNA-96 promotes cell proliferation, migration and drug resistance by targeting LMO7. *J Cell Mol Med*. 2017;21(6):1228-1236.
322. Wu Q, Yin G, Lei J, Tian J, Lan A, Liu S. KLHL5 Is a Prognostic-Related Biomarker and Correlated With Immune Infiltrates in Gastric Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020;7(395).
323. Schleifer RJ, Li S, Nechtman W, et al. KLHL5 knockdown increases cellular sensitivity to anticancer drugs. *Oncotarget*. 2018;9(100):37429-37438.
324. Martínez Martí A, Felip E. PI3K Pathway in NSCLC. *Frontiers in Oncology*. 2012;1(55).
325. Cantley LC. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*. 2002;296(5573):1655-1657.
326. Tan AC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thoracic cancer*. 2020;11(3):511-518.

7 Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen, Abteilung Immunologie unter Betreuung von Professor Dr. med. Sebastian Haen und nach dessen plötzlichem Tode unter der Betreuung von Professor Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Professor Dr. med. Sebastian Haen[†], Arbeitsgruppenleiter in der Abteilung für Immunologie.

Die Antikörperkopplung, Zellyse sowie Immunaффinitätschromatografie mittels BrCN-Säule für die Probenpaare LCA104, LCA105, LCA106, LCA107, LCA108, LCA110, LCA113, LCA115, LCA117, LCA118 und LCA120 erfolgte eigenständig. Die Aufreinigung mittels ZipTip_{C18}[®]-Pipettenspitzen, sowie die Massenspektrometrische Analyse isolierter Peptide, die relative quantitative Messung zur Analyse von Ligandomveränderungen und die HLA-Ligandom abhängige Definition tumorassoziierter Antigene erfolgten durch Eva-Maria Wolfschmitt und Dr. rer. nat. Lena Freudenmann. Für die Probenpaare LCA101, LCA102, LCA103, LCA109, LCA112, LCA116, LCA119, LCA121, LCA122, LCA123, LCA124, LCA125, LCA127, LCA128 und LCA129 erfolgten die vollständige Identifikation MHC-Klasse I und II gebundener Peptide durch die Masterstudentin Eva-Maria Wolfschmitt unter Supervision durch Dr. rer. nat. Lena Freudenmann. Die Daten der Identifikation tumorspezifischer, hochregulierter oder herunterregulierter Quellproteine wurden durch Eva-Maria Wolfschmitt und Dr. rer. nat. Lena Freudenmann freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Zuordnung der KEGG-Pathways zur Identifikation direkter oder indirekter Interaktionen und der Darstellung dieser Interaktion zu den ermittelten Quellproteinen erfolgte eigenständig mittels der frei zugänglichen Bioinformatik-Datenbank STRINGdb. Die Evaluation klinischer Faktoren erfolgte eigenständig mittels eigenständiger Anamnese, Sichtung bestehender ärztlicher Dokumente und Rücksprache mit den aktuell oder zuletzt betreuenden Kollegen.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren, als die von mir angegebenen Quellen genutzt zu haben.

Tübingen, den

8 Veröffentlichungen mit Beteiligung des Autors

- Co-Autor 11/2019 Löffler, Markus W., Nussbaum, Bianca, Jäger, Günter, Jurmeister, Philipp S., Budczies, Jan, Pereira, Philippe L., Clasen, Stephan, Kowalewski, Daniel J., Mühlenbruch, Lena, Königsrainer, Ingmar, Beckert, Stefan, Ladurner, Ruth, Wagner, Silvia, Bullinger, Florian, **Gross, Thorben H.**, Schroeder, Christopher, Sipos, Bence, Königsrainer, Alfred, Stevanović, Stefan, Denkert, Carsten, Rammensee, Hans-Georg, Gouttefangeas, Cécile and Haen, Sebastian P. A Non-interventional Clinical Trial Assessing Immune Responses After Radiofrequency Ablation of Liver Metastases From Colorectal Cancer. *Front Immunol.* 2019;10:2526. Published 2019 Nov 19. doi:10.3389/fimmu.2019.02526
- Co-Autor 05/2020 Häntschel, Maik, Niebling, Johannes, Häring, Almut, Häring, Max-Felix, **Groß, Thorben**, Horger, Marius, Riessen, Reimer, Haap, Michael, Lewis, Richard A, Böckeler, Michael and Hetzel, Jürgen Life-threatening pneumonitis after first-line treatment with osimertinib for primary T790M mutated non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer.* 2020;11(7):2044-2047. doi:10.1111/1759-7714.13476

9 Danksagung

Von Herzen bedanken möchte ich mich bei allen, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich bei Professor Dr. med. Sebastian Haen[†], der mich als Doktorvater in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen hat, leider aber zwischenzeitlich viel zu früh verstorben ist. Ich möchte ihm danken, nicht nur für seine Unterstützung bei diesem Projekt, sondern auch für die Begleitung als Mentor, Vorbild und Freund! Ich wünsche wir könnten das Ergebnis gemeinsam genießen.

Herzlichen Dank an Professor Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee für die Aufnahme in sein Institut, die fachliche und menschliche Unterstützung bei diesem Projekt. Und auch für das Dasein als sichere Bank in der Zeit des plötzlichen Todes von Professor Dr. med. Sebastian Haen.

Besonderen Dank an Dr. med. Markus Löffler, Dr. rer. nat. Nora Mirza, Dr. rer. nat. Heiko Schuster und Daniel Kowalewski für die Unterstützung, Einarbeitung und Betreuung bei der Tumorpräparation sowie die vielen hilfreichen Diskussionen.

Danke an Dr. rer. nat. Lena Freudenmann und Eva-Maria Wolfschmitt für die Unterstützung in der Diagnostik und das Bereitstellen vorhergehender Daten.

Vielen Dank an Dr. med. Sven Mattern für die Hilfe mit den histologischen Darstellungen.

Lieben Dank an Beate Pömmerl für ein stets offenes Ohr für Fragen und eine hilfreiche Unterstützung bei so mancher Problemlösung.

Danke an alle Elche für die vielfältige Unterstützung.

Ein herzlicher Dank auch an Professor Dr. med. Lars Zender und Professor Dr. med. Ulrich Lauer für Tipps bei der Fertigstellung und auch für das nötige Quäntchen an freundlichem Druck.

Zudem kann ich den Dank für meine Familie nur annähernd in Worte fassen.

Herzlichen Dank an meine Familie, meine Eltern und meine Schwester Annika, die mich in jeder Lebenslage unterstützt haben, immer Sicherheit geben und mir alles bisher Erreichte ermöglicht haben.

Und an Sabrina, die viele Momente der Ungeduld, des Ärgers und auch der Frustration mit unendlicher Ruhe und Geduld ertragen hat. Und die mich immer wieder unterstützt und auf den richtigen Weg gebracht hat.

Ich bin sehr glücklich, dass ihr bei mir seid!