

Aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck

Direktor Prof. Dr. med. S. Perner

in Zusammenarbeit mit der LungenClinic Grosshansdorf

---



PROGRAMMED CELL DEATH-LIGAND 1 -  
BEITRAG DER ZYTOLOGIE ZUR ZIELGERICHTETEN THERAPIE  
VON LUNGENKARZINOMEN

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

**LEA ISABELL SHARI VAN DER LINDE**

aus Ahlen

Lübeck, März 2020

1. Berichtstatterin/Berichtstatter:

PD Dr. med. Lutz Welker

2. Berichtstatterin/Berichtstatter:

PD Dr. med. Bernhard Schaaf

Tag der mündlichen Prüfung:

12.10.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

12.10.2020

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

MAN MERKT NIE, WAS SCHON GETAN WURDE, MAN SIEHT  
IMMER NUR, WAS NOCH ZU TUN BLEIBT

**Marie Curie**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Epidemiologie und Ätiologie des Bronchialkarzinoms .....	1
1.2	Klinische und bioptische Diagnostik.....	3
1.3	Therapie von Lungenkarzinomen.....	4
1.4	PD-1/PD-L1-Signalweg .....	6
1.5	Ziel dieser Arbeit.....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1	Patienten und Untersuchungsgut .....	17
2.2	Immunologische Anfärbungen .....	19
2.3	Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate.....	22
2.4	Auswertung .....	26
2.5	Statistik.....	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
3.1	Tumorzellzahlen in zyto- und histologischen Präparaten .....	30
3.2	Interrater-Variabilität .....	31
3.3	Expressionsraten.....	32
3.4	Tumormerkmale .....	36
3.5	Konkordanzen .....	41
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>44</b>
4.1	Tumorzellzahlen in zyto- und histologischen Präparaten .....	44
4.2	Interrater-Variabilität .....	46
4.3	Expressionsraten.....	47
4.4	Tumormerkmale .....	50
4.5	Konkordanz und Tumorerogenität .....	55
4.6	Ausblick .....	58
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>102</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>103</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung des PD-1/PD-L1-Immuncheckpoints.....	<b>10</b>
<b>Abbildung 2:</b> Anti-PD-L1-Anfärbungen histologischer Schnitte von NSCLC.....	<b>15</b>
<b>Abbildung 3:</b> Auswertungs der PD-L1-Positivität. ....	<b>22</b>
<b>Abbildung 4:</b> Beispiele für zytologische Präparate.....	<b>24</b>
<b>Abbildung 5:</b> Beispiele für histologische Präparate.. ....	<b>25</b>
<b>Abbildung 6:</b> Auswertung der Tumorzellzahl. ....	<b>27</b>
<b>Abbildung 7:</b> Beispiele für zytologische und histologische Präparate. ....	<b>45</b>
<b>Abbildung 8:</b> Diskordante PD-L1-Expression innerhalb eines SQC. ....	<b>57</b>
<b>Abbildung 9:</b> Votum der Ethikkommission.....	<b>101</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verteilung des Untersuchungsguts. ....	<b>18</b>
<b>Tabelle 2:</b> PD-L1-Färbeprotokoll für FFPE Proben. ....	<b>20</b>
<b>Tabelle 3:</b> PD-L1-Färbeprotokoll für zytologische Proben. ....	<b>21</b>
<b>Tabelle 4:</b> Tumorzellzahl in Zyto- und Histologie.....	<b>30</b>
<b>Tabelle 5:</b> Inter-Item-Korrelationsmatrix zwischen den Bewertern.. ....	<b>31</b>
<b>Tabelle 6:</b> Verteilung der medianen PD-L1-Expressionsraten der Exaktwerte.....	<b>33</b>
<b>Tabelle 7:</b> Verteilung der medianen PD-L1-Expressionsraten des TPS. ....	<b>35</b>
<b>Tabelle 8:</b> PD-L1-Expression in verschiedenen Probenaltern. ....	<b>36</b>
<b>Tabelle 9:</b> PD-L1-Expression in verschiedenen Tumorstadien.. ....	<b>37</b>
<b>Tabelle 10:</b> PD-L1-Expression in Primärtumoren und Metastasen. ....	<b>38</b>
<b>Tabelle 11:</b> PD-L1-Expression in ADC und SQC. ....	<b>40</b>
<b>Tabelle 12:</b> PD-L1-Expression in verschiedenen Differenzierungsgraden.....	<b>41</b>
<b>Tabelle 13:</b> Konkordanz der PD-1-Expression als Exaktwerte.. ....	<b>42</b>
<b>Tabelle 14:</b> Konkordanz der PD-1-Expression als TPS.....	<b>43</b>
<b>Tabelle 15:</b> Übersicht der Rohdaten.....	<b>88</b>
<b>Tabelle 16:</b> Materialien für die immunbiologische Anfärbung.. ....	<b>93</b>
<b>Tabelle 17:</b> Protokoll zur PD-L1-Anfärbung von FFPE Präparaten.....	<b>94</b>
<b>Tabelle 18:</b> Protokoll zur PD-L1-Anfärbung von zytologischen Präparaten.....	<b>98</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
$\alpha$	Signifikanzniveau
ADC	Adenokarzinom
AK	Antikörper (Immuncheckpoint-Inhibitor)
<i>ALK</i>	Anaplastische Lymphomkinase
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
<i>BRAF</i>	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma Isoform B</i>
CI	Konfidenzintervall
COPD	chronische obstruktive Lungenerkrankung
CT	Computertomographie
CTLA	Lymphozyten-assoziiertes Protein 4
cTNM	klinischer TNM (Tumor-Nodus-Metastase)
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorat
EBUS	Endobronchialer Ultraschall
<i>EGFR</i>	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
<i>EML4</i>	<i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 4</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration of America</i>
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
G	Differenzierungsgrad
H	Histologie
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HQ	ein an den Antikörper gebundenes Hapten
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IASLC	<i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>
ICC	Intraklassenkoeffizienten
INF	Interferon
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten Rat Sarcoma</i>
LK	Lymphknoten
Lkb1	<i>liver kinase 1</i>
M	Metastase
<i>MET</i>	<i>Mesenchymal Epithelial Transition</i>

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MRT	Magnetresonanztomographie
NSCLC	Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
ORR	objektive Ansprechrate ( <i>objective response rate</i> )
P	Primärtumor
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PD-1	<i>Programmed cell death-protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death-ligand 1</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pT	Postoperatives Tumorstadium
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
pTNM	Postoperativer/pathologischer TNM (Tumor-Nodulus-Metastase)
ROS	<i>proto-oncogene 1 tyrosine-protein kinase</i>
RT	Raumtemperatur
RTU	Fertig zur Benutzung ( <i>Ready to Use</i> )
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
SQC	Plattenepithelkarzinom
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TMB	Mutationslast ( <i>tumor mutational burden</i> )
TNM	Tumor-Nodulus-Metastase
TPS	Tumor-Proportions-Score
TZ	T-Zelle
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
Z	Zytologie

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Bronchialkarzinoms

Lungen- und Bronchuskarzinom, im Folgenden als Lungenkarzinom zusammengefasst, ist weltweit für die meisten durch Krebs verursachten Todesfälle verantwortlich (Ferlay *et al.*, 2013; Ferlay *et al.*, 2014; Siegel *et al.*, 2011). Weltweit handelt es sich bei rund 13% der Krebsdiagnosen um Lungenkarzinom (Torre *et al.*, 2015). Bei Männern und Frauen in den Vereinigten Staaten Amerikas (Siegel *et al.*, 2011) sowie bei Männern in Europa (Ferlay *et al.*, 2013) war Lungenkarzinom die häufigste krebsbedingte Todesursache und bei Frauen in Europa die zweithäufigste Todesursache (Ferlay *et al.*, 2013). Für das Jahr 2019 und 2020 wurde Lungenkarzinom auch bei Frauen als häufigste krebsbedingte Todesursache prognostiziert (Malvezzi *et al.*, 2019; Siegel *et al.*, 2019; Siegel *et al.*, 2020).

Die Inzidenz von Lungenkarzinom nimmt mit dem Alter zu, wobei die meisten Lungenkarzinompatienten älter als 74 Jahre sind (Noone *et al.*, 2016). Die Hauptursache für maligne Neoplasien der Lunge ist das inhalative Tabakrauchen (Doll und Hill, 1950; Harris *et al.*, 2004; Kelley und McCrory, 2003; Kreyberg, 1955; Mattson *et al.*, 1987; Parkin *et al.*, 1994; Parkin *et al.*, 2005). Dies ist auf die über 50 karzinogenen Inhaltsstoffe von Tabakrauch zurückführbar (Hoffmann *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2000a; Smith *et al.*, 2000b). Durch Tabakrauchen verursachter Lungenkarzinom tritt häufiger bei Männern als bei Frauen auf und ist in weiterentwickelten Gebieten wie Nordamerika, Europa, Australien und Neuseeland weiterverbreitet als in Entwicklungsländern (Ferlay *et al.*, 2014; Parkin *et al.*, 2005).

Die Inzidenz von Lungenkarzinom nimmt mit dem Zigarettenkonsum (Doll und Peto 1976; Peto *et al.*, 2000), dem Teergehalt der Zigaretten (Harris *et al.*, 2004) und dem Rauchen ohne Filter zu (Harris *et al.*, 2004). Zudem liegt das Lungenkarzinomrisiko höher, je früher mit dem Rauchen begonnen (Hegmann *et al.*, 1993; Wiencke und Kelsey, 2002) und je später der Tabakkonsum beendet wurde (Ebbert *et al.* 2003; Harris *et al.*, 2004; Peto *et al.*, 2000). Vor allem die Vermeidung und Entwöhnung vom Rauchen reduziert das Lungenkarzinomrisiko und kann die Prognose für Patienten mit Lungenkarzinom verbessern (Ebbert *et al.*, 2003; Doll und Peto 1976; Kelley und McCrory, 2003). Dabei verringert sich das Lungenkarzinomrisiko mit den Jahren der Rauchabstinenz (Harris *et al.*, 2004). Eine Korrelation zwischen der Ausbildung von Rauchgewohnheiten und der Mortalität an Lungenkarzinom sowie der Abnahme der Mortalität an Lungenkarzinom nach Rauchentwöhnung ist weltweit erkennbar (Parkin *et al.*, 2001).



Obwohl Rauchen der Hauptrisikofaktor zur Entwicklung von Lungenkrebs ist, fehlt bei schätzungsweise 25% aller Lungenkarzinome weltweit ein ursächlicher Zusammenhang zum aktiven Rauchen (Parkin *et al.*, 2005). Neben aktivem Tabakkonsum stellen Passivrauchen (Janerich *et al.*, 1990; Trichopoulos *et al.*, 1981), andere maligne Tumoren (Cassidy *et al.*, 2007), benigne Lungenerkrankungen wie Asthma (Wu *et al.*, 1995), chronische Bronchitis (Wu *et al.*, 1995), chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD) (Skillrud *et al.*, 1986), idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) (Hubbard *et al.*, 2000) oder vorherige Pneumonien (Cassidy *et al.*, 2007) Einflüsse zur Entstehung von Lungenkrebs dar. Ebenso können sich genetische Faktoren (Spitz *et al.*, 2003) und Lungenkrebsfälle in der Familie ersten Grades (Cassidy *et al.*, 2007; Coté *et al.*, 2005) auf die Inzidenz von Lungenkrebs auswirken.

Weitere Risikofaktoren sind Expositionen gegenüber karzinogenen Stoffen in der Umwelt, im eigenen Heim und der Arbeitsstätte. Hierzu zählen vor allem Innenraumluftverunreinigungen wie Festbrennstoffverbrennung zum Kochen (Lissowska *et al.*, 2005), Radon (Darby *et al.*, 2004; Lubin *et al.*, 1995), Asbest (Cassidy *et al.*, 2007), Arsen (Chen *et al.*, 1992), Beryllium (Mancuso 1980), Cadmium (Nawrot *et al.*, 2006), Chrom (Gibb *et al.*, 2000), Kieselsäure (Steenland *et al.*, 2001) und Nickel (Grimsrud *et al.*, 2002) sowie atmosphärische Verschmutzung durch Feinstaub und Gase wie Schwefeldioxid oder Nitritoxid (Pope *et al.*, 2002).

Die Mortalität von Lungenkrebs variiert zwischen Personen verschiedener Bildungsniveaus und unterschiedlicher ethnischer Abstammung (Haimann *et al.*, 2006; Siegel *et al.*, 2011). Zusätzlich gibt es weltweit regionale Unterschiede in der Überlebensrate (Francisci *et al.*, 2015; Torre *et al.*, 2015). Die 5-Jahres-Überlebensrate nach der Diagnose von Lungenkrebs liegt in Europa bei 13% (Francisci *et al.*, 2015).

Jüngere Betroffene, Frauen und Nie-Raucher weisen höhere Überlebensraten auf (Francisci *et al.*, 2015; Tammemagi *et al.*, 2004). Auch der Subtyp des Tumors wirkt sich auf die Überlebensrate aus (Francisci *et al.*, 2015). Ein wichtiger Faktor für die Prognose bei Lungenkrebs ist die Diagnose in einem frühen Tumorstadium (Mountain 1997; Zell *et al.*, 2005). Meist wird Lungenkrebs allerdings erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert (Zell *et al.*, 2005). Dies hängt vor allem mit den meist nur unspezifischen Symptomen wie Schmerzen, Gewichtsverlust oder Müdigkeit zusammen (Spiro *et al.*, 2007). In einigen Fällen wird Lungenkrebs erst beim Auftreten von paraneoplastischen Syndromen wie dem Cushing-Syndrom, der Encephalomyelitis oder einer Anämie diagnostiziert (Spiro *et al.*, 2007).

## 1.2 Klinische und bioptische Diagnostik

Die Diagnose von Lungenkarzinomen erfolgt häufig zufällig bei Röntgenuntersuchungen im Rahmen anderer Erkrankungen. Bei Verdacht auf das Vorliegen eines Lungenkarzinoms sollten zeitnah umfangreiche klinische Tests zur Sicherung der Diagnose erfolgen. Die Anamnese, die körperliche klinische Untersuchung, laborchemische Analysen und vor allem die bildgebenden Verfahren (Röntgenthorax, Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) der Thorax-/Oberbauchorgane mit und ohne Kontrastmittel, Oberbauchsonographie und Positronen-Emissions-Tomographie (PET)) sowie die endoskopische Untersuchung (Bronchoskopie einschließlich endosonographie-gestützter Biopsieverfahren) sind wesentliche Bestandteile dieser Diagnostik und dienen sowohl der Erfassung der Tumorausbreitung als auch der Bestimmung des Tumorstadiums (Spiro *et al.*, 2007).

Die Stadieneinteilung erfolgt nach den Kriterien der *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) anhand der Tumor-Nodus-Metastasen (TNM)-Klassifikation und der aktuellen Kriterien vom *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) (Asamura *et al.*, 2015; Detterbeck *et al.*, 2017; Eberhardt *et al.*, 2015; Goldstraw *et al.*, 2016; Nicholson *et al.*, 2016; Rami-Porta *et al.*, 2015). Hierbei werden der Primärtumor (T), der Lymphknotenstatus (N) und eventuelle Fernmetastasen (M) bewertet. Entscheidend für die Einteilung in die einzelnen Stadien sind Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T0-T4), Anzahl und Lokalisation befallener Lymphknoten (N0-N3) sowie das Vorhandensein eventueller intra- oder extrathorakaler Fernmetastasen (M0-M1) (Asamura *et al.*, 2015; Detterbeck *et al.*, 2017; Eberhardt *et al.*, 2015; Goldstraw *et al.*, 2016; Nicholson *et al.*, 2016; Rami-Porta *et al.*, 2015).

In Abhängigkeit von der Art der Sicherung des vorliegenden Tumorstadiums wird zwischen dem klinisch gesicherten TNM-Stadium („clinical TNM“, cTNM) und dem postoperativen oder pathologischen TNM-Stadium (pTNM) unterschieden.

Nach den klinischen und bildgebenden Verfahren zielt die bioptische Diagnostik auf die Sicherung des Lungenkarzinoms sowie die Erkennung des Tumortyps und Differenzierungsgrads ab. Hierzu können Gewebeentnahmen für die Histologie (Stanzbiopsie, Zangenbiopsie, Kryobiopsie, Resektionen) und Proben für die Zytologie (Feinnadelaspiration, Bürstenbiopsie, Katheterbiopsie, Imprintpräparat, Spülung, Bronchioalveoläre Lavage, Bronchialsekret, Absaugung) im Rahmen endoskopischer Untersuchungen, Punktionen von Ergüssen (Pleuraerguss, Aszites, Perikarderguss) sowie transthorakale Feinnadelpunktionen (FNP) und exfoliatives Material (Sputum) beitragen. Gegebenenfalls werden diese Befunde durch chirurgisch gewonnene Proben ergänzt. Die

Auswahl der einzelnen Verfahren wird entscheidend von dem klinischen Zustand des Patienten sowie von der Tumorlokalisation und -ausdehnung beeinflusst.

Rund 35-70% der Lungenkrebsdiagnosen werden an kleinen Biopsaten und zytologischen Proben gestellt (Shah *et al.*, 2006; Skov *et al.*, 2014; Travis *et al.*, 2011; Tsao *et al.*, 2017). Die gewonnenen Proben werden hinsichtlich morphologischer Kriterien bewertet und gegebenenfalls durch immunbiologische Verfahren ergänzt. Diese Untersuchungen ermöglichen eine Beurteilung der Tumorentität und die Bestimmung des Tumortyps (Travis *et al.*, 2015a, Travis *et al.*, 2015b). Beim Lungenkarzinom handelt es sich in 80-85% um Nicht-kleinzellige Karzinome (NSCLC), in circa 15% um Kleinzellige Lungenkarzinome (SCLC) und in 2% um Karzinoide und Sarkome (Francisci *et al.*, 2015). Die meisten NSCLC sind Plattenepithelkarzinome (SQC), Adenokarzinome (ADC) oder Großzellige Karzinome (Francisci *et al.*, 2015). Die bioptische Diagnostik zielt zudem auf die Feststellung des Differenzierungsgrads eines Tumors ab. Dieser teilt sich in gut differenzierte (G1), mäßig differenzierte (G2), schlecht differenzierte (G3) und undifferenzierte (G4) Tumoren. Vor allem das TNM-Stadium liefert Aufschlüsse über die Prognose und beeinflusst die anschließende Therapieplanung (Abschnitt 1.3).

## 1.3 Therapie von Lungenkarzinomen

### 1.3.1 Treibermutationen

Die Lungenkrebstherapie ist in erster Linie von Tumortyp und Tumorstadium abhängig (Novello *et al.*, 2016; Postmus *et al.*, 2017). Neben der chirurgischen Behandlung werden meist Kombinationen aus Radio- und/oder Chemotherapie in das Therapiekonzept eingeschlossen. Bei vielen NSCLC ist die Malignität auf bestimmte genetische Veränderungen zurückführbar, sogenannte Treibermutationen, welche einen Ansatzpunkt für zielgerichtete Therapien bieten (Davies *et al.*, 2017; Novello *et al.*, 2016; Rosell *et al.*, 2009; Travis *et al.*, 2015a; Travis *et al.*, 2015b).

Die onkologischen Leitlinien empfehlen daher bei fortgeschrittenen NSCLC die Überprüfung möglicher Treibermutationen (Griesinger *et al.*, 2018). Liegen ein guter bis mäßig reduzierter Allgemeinzustand beziehungsweise keine ausgeprägten Komorbiditäten vor, sollten Mutationen des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (*EGFR*) oder der Serin/Threonin-Proteinkinase B-Raf („rapidly accelerated fibrosarcoma Isoform B“ = *BRAF*) V600 sowie Translokationen der anaplastischen Lymphomkinase (*ALK*) oder der Protoonkogen-Tyrosinproteinkinase ROS („proto-oncogene 1 tyrosine-

protein kinase“ = *ROS1*) überprüft werden (Griesinger *et al.*, 2018). Liegen entsprechende genetische Veränderungen vor, kann eine zielgerichtete Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren erfolgen (Frampton, 2013; Herbst *et al.*, 2008; Shea *et al.*, 2015). Spezifische Therapiekonzepte für weitere Alterationen werden aktuell geprüft (Michels und Wolf, 2016).

*EGFR*-Mutationen sind bei rund 9-16% der Lungenkrebskranken nachweisbar. Sie liegen häufiger bei Nie-Rauchern, jüngeren Frauen und Patienten mit ADC vor (Rosell *et al.*, 2009; Tsao *et al.*, 2006). *ALK*-Veränderungen treten in 2,9-13% der NSCLC auf, dabei vermehrt bei Männern, bei Nicht- oder Wenig-Rauchern sowie nahezu ausschließlich bei ADC (Bergethon *et al.*, 2012; Shaw *et al.*, 2009). Hierbei scheinen entweder *EGFR*-Mutationen oder *ALK*-Veränderungen, jedoch nicht beide Veränderungen gleichzeitig in einem Tumor aufzutreten (Inamura *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2009; Soda *et al.*, 2007).

*ROS1*-Translokationen finden sich bei 1,7-1,8% der NSCLC, darunter ausschließlich ADC (Bergethon *et al.*, 2012; Go *et al.*, 2013). *ROS1*-Translokationen bestehen vermehrt bei fortgeschrittenen NSCLC (Bergethon *et al.*, 2012; Go *et al.*, 2013), Frauen (Bergethon *et al.*, 2012; Go *et al.*, 2013), jüngeren Patienten und Nie-Rauchern (Bergethon *et al.*, 2012). Sie liegen nahezu nie assoziiert mit Veränderungen von *ALK*, *EGFR*, *Kirsten Rat Sarcoma (KRAS)* oder Protoonkogen Rezeptortyrosinkinase *MET (MET)* vor (Bergethon *et al.*, 2012; Go *et al.*, 2013).

*BRAF*-Mutationen sind in 1,9-3,5% der NSCLC nachweisbar, darunter nahezu ausschließlich ADC (Cardarella *et al.*, 2013; Marchetti *et al.*, 2011; Pratilas *et al.*, 2008). Sie treten in 2-5% der pulmonalen ADC auf (Cardarella *et al.*, 2013; Marchetti *et al.*, 2011; Paik *et al.*, 2011; Villaruz *et al.*, 2014). Die genetischen Veränderungen lassen sich in die zwei Typen V600E- und Nicht-V600E-Mutation einordnen (Brose *et al.*, 2002; Cardarella *et al.*, 2013; Marchetti *et al.*, 2011). Rund 50-80% der *BRAF*-Mutationen sind V600E-Veränderungen (Marchetti *et al.*, 2011; Paik *et al.*, 2011; Villaruz *et al.*, 2014). Diese existieren vermehrt bei Frauen, sind unabhängig vom Raucherstatus, liegen häufig in aggressiveren Tumortypen vor (mikropapilläre Wachstumsmuster) und sollen mit einer schlechten Prognose assoziiert sein (Marchetti *et al.*, 2011; Pratilas *et al.*, 2008). Nicht-V600E-Mutationen kommen hingegen nur bei Rauchern vor und sind nicht mit klinisch-pathologischen Parametern oder der Prognose assoziiert (Marchetti *et al.*, 2011).

Sind keine molekularen Veränderungen nachweisbar, empfehlen die onkologischen Leitlinien bei fortgeschrittenen NSCLC die Testung der PD-L1-Expressionsrate, um die Möglichkeit einer Checkpoint-Therapie zu prüfen (Griesinger *et al.*, 2018).

### 1.3.2 Checkpoint-Therapie

Ein weiterer Ansatz zur Therapie von NSCLC ist beim Nachweis der Expression bestimmter Proteine der Einsatz einer Checkpoint-Therapie, bei welcher die immunsuppressierende Funktion bestimmter Liganden von Tumorzellen inhibiert wird (Brahmer *et al.*, 2010; Davies *et al.*, 2017; Gettinger *et al.*, 2016; Herbst *et al.*, 2016; Horn *et al.*, 2017; Pardoll, 2012; Reck *et al.*, 2016; Rittmeyer *et al.*, 2017). Derartige Therapien basieren auf der Wiederherstellung der immunologischen Kontrolle des Körpers durch Unterbrechung jener Signaltransduktion, welche den Abbau von Tumorzellen durch das Immunsystem, insbesondere durch T-Lymphozyten, verhindert (Pardoll, 2012).

Checkpoint-Inhibitoren werden bei verschiedenen Tumoren eingesetzt, darunter metastasierte Melanome und NSCLC, sowie Nierenzell-, Blasen- und Urothel-Karzinome (Alsaab *et al.*, 2017). Zur Checkpoint-Therapie von NSCLC sind mehrere Antikörper gegen den Rezeptor *programmed cell death-protein 1* (PD-1) oder seinen Liganden *programmed cell death-ligand 1* (PD-L1) zugelassen (Tsao *et al.*, 2017). Da bei der Interaktion zwischen Immunsystem und Tumor auch das Lymphozyten-assoziierte Protein 4 (CTLA-4) an der Immunevasion beteiligt ist (Pardoll 2012), könnte der zusätzliche Einsatz mit CTLA-4-Inhibitoren eine PD-1-/PD-L1-Therapie unterstützen (Chae *et al.*, 2018; Paulsen *et al.*, 2017; Puri und Shafique, 2020; Tsao *et al.*, 2017). Die PD-L1-Inhibitoren Nivolumab (Borghaei *et al.*, 2015; Brahmer *et al.*, 2015; Gettinger *et al.*, 2016; Rizvi *et al.*, 2015b), Pembrolizumab (Garon *et al.*, 2015; Herbst *et al.*, 2016) und Atezolizumab (Fehrenbacher *et al.*, 2016) zeigen vielversprechende Therapieergebnisse bei Patienten mit NSCLC. Daher ist die Testung der PD-L1-Expression vor allem bei Patienten mit fortgeschrittenen NSCLC ohne nachweisbare Treibermutationen sinnvoll (Abschnitt 1.3.1).

## 1.4 PD-1/PD-L1-Signalweg

### 1.4.1 PD-1 und seine Liganden PD-L1 und PD-L2

Der Rezeptor *programmed cell death-protein 1* (PD-1, auch CD279) ist ein Membranprotein, das zur Superfamilie der Immunglobuline gehört (Ishida *et al.*, 1992). Es wird auf aktivierten T-Zellen, Monozyten, B-Zellen, dendritischen Zellen, erschöpften CD8-positiven T-Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert (Francisco *et al.*, 2010; Keir *et al.*, 2008; Nallasamy *et al.*, 2017). PD-1 ist an Prozessen der Zelladhäsion,

Proliferation und Zytokin-Signalkaskade beteiligt und kann auf die Immuntoleranz durch Unterdrückung von T-Zell-Funktionen einwirken (Butte *et al.*, 2007; Francisco *et al.*, 2010; Latchman *et al.*, 2001; Nallasamy *et al.*, 2017; Yokosuka *et al.*, 2012). Gleichzeitig ist PD-1 an der Abschwächung der Immunreaktion durch die Suppression von T-Zell-Funktionen (Butte *et al.*, 2007; Sznol und Chen, 2013; Yokosuka *et al.*, 2012) sowie an der Vermehrung von regulatorischen T-Zellen beteiligt, welche die Autoimmunität reduzieren und eine Selbst-Toleranz bewirken können (Francisco *et al.*, 2010). An PD-1 können der Rezeptor *programmed cell death-ligand 1* (PD-L1, auch CD274, B7-H1) oder *programmed cell death-ligand 2* (PD-L2, auch CD273, B7-H2, B7-DC) binden (Dong *et al.*, 2002; Latchman *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2001).

Der PD-L1-Rezeptor ist ein aus 290 Aminosäuren bestehendes Transmembranprotein, welches das Immunsystem bei physiologischen und pathologischen Ereignissen unterdrückt (Dong *et al.*, 1999). PD-L1 kann in antigenpräsentierenden Zellen (APZ), in durch Interferon- $\gamma$  aktivierten Monozyten, in aktivierten dendritischen Zellen, in Herz- und Skelettmuskelzellen, in Zellen der Plazenta und der Lunge, sowie schwach in Zellen des Thymus, der Milz, der Niere und der Leber, aber nicht in Zellen des Gehirns, des Kolons, der intestinalen Gewebe und in unstimulierten Monozyten exprimiert werden (Dong *et al.*, 1999; Freeman *et al.*, 2000; Latchman *et al.*, 2001). Die Bindung Pathogen-assoziiierter molekularer Muster (PAMP) oder von Interferonen (IFN) lösen Signalkaskaden aus, die zur Induktion der PD-L1-Expression führen (Lee *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Ritprajak und Azuma, 2015).

In manchen Zellen (zum Beispiel Monozyten, Mikrogefäßzellen, Keratinozyten und Endothelzellen) tritt eine nennenswerte PD-L1-Expression erst als Reaktion auf entzündliche Prozesse beziehungsweise nach der Stimulation mit INF auf (Eppihimer *et al.*, 2002; Latchman *et al.*, 2001, Mazanet und Hughes, 2002). Die Interaktion von PD-1 mit PD-L1 bewirkt die Suppression der T-Zell-Aktivierung und somit die Inhibition von T-Zell-Rezeptor vermittelten Lymphozytenproliferationen und Zytokinsekretionen (Freeman *et al.*, 2000; Mazanet und Hughes, 2002; Yokosuka *et al.*, 2012). Der PD-1/PD-L1-Signalweg trägt dadurch zur Regulation von Autoimmunreaktionen sowie von Entzündungen und Infektionen bei (Chang *et al.*, 1999; Giancchetti *et al.*, 2013; Keir *et al.*, 2006; Keir *et al.*, 2008; Nishimura *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005).

Der PD-L2-Rezeptor wird in Zellen des Herzens, der Plazenta, des Pankreas, der Lunge und der Leber sowie schwach in Zellen der Milz, von Lymphknoten und des Thymus exprimiert (Latchman *et al.*, 2001). Zudem findet er sich verstärkt auf dendritischen Zellen (Tseng *et al.*, 2001). Seine Expression wird durch IFN- $\gamma$  in Monozyten

hochreguliert und in dendritischen Zellen induziert (Latchman *et al.*, 2001). PD-L2 bindet an PD-1, jedoch nicht an CD28 oder CTLA-4 (Tseng *et al.*, 2001). Die Interaktion von PD-L2 mit PD-1 inhibiert die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Proliferation und INF- $\gamma$ -Produktion von CD4-positiven T-Zellen (Latchman *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2001). Zudem findet sich PD-L2 zu 50-70% auf ruhenden peritonealen B1 Zellen, aber nicht auf konventionellen B2 Zellen. PD-L2 positive B1 Zellen könnten für die Innervierung der Immunreaktion gegen bakterielle Antigene verantwortlich sein (Zhong *et al.*, 2007).

#### 1.4.2 PD-L1 in Tumoren

Eine Expression von PD-L1 tritt nicht nur in physiologischen Zellen, sondern auch in manchen Tumoren auf. Dazu gehören NSCLC, Melanome, Ovarial- und gastrische Karzinome (Abiko *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2018; Garcia-Diaz *et al.*, 2017; Karachaliou *et al.*, 2018; Mimura *et al.*, 2017). So kann bei einigen NSCLC eine erhöhte PD-L1-Expression in Tumorzellen und Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) nachgewiesen werden (Konishi *et al.*, 2004).

Die Bindung von PAMPs, Wachstumsfaktoren oder IFN an Tumorzellen kann Signalkaskaden auslösen, die zur Induktion der PD-L1-Expression führen, wie zum Beispiel der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalweg (Abiko *et al.*, 2015; Cree *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2018; Garcia-Diaz *et al.*, 2017; Karachaliou *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Mimura *et al.*, 2018; Okita *et al.*, 2017; Ota *et al.*, 2015; Ritprajak und Azuma, 2015). Die beteiligten Signalmoleküle bewirken zellintrinsische Wechsel, die in Verbindung mit der Karzinogenese stehen (Zellzyklus, Zellproliferation, Adhäsion, Migration) (Ritprajak und Azuma, 2015).

Eine erhöhte PD-L1-Expression könnte auch durch Veränderungen von *EGFR* (Akabay *et al.*, 2014; Azuma *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Okita *et al.*, 2017; Ota *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2015), das Vorkommen des *Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4)-ALK*-Fusionsgens (Ota *et al.*, 2015), den Verlust des Tumorsuppressor-Gens *phosphatase and tensin homolog (PTEN)* und der *liver kinase 1 (Lkb1)* (Xu *et al.*, 2014), sowie den Mangel oder die Mutation von PTEN (Crane *et al.*, 2008) ausgelöst werden.

Die PD-L1-Expressionsrate in NSCLC könnte von dem TNM-Status, dem histologischen Tumortyp, dem Grad der Tumordifferenzierung, sowie von genetischen Mutationen und Entzündungen beeinflusst sein (Brody *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2012; Krawczyk *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2015; Shimoji *et al.*, 2016; Uruga *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). Patientenalter, Raucherstatus oder Geschlecht scheinen jedoch nicht mit der

PD-L1-Expressionsrate zu korrelieren (Brody *et al.*, 2017; Ilie *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2015; Skov *et al.*, 2019; Ye *et al.*, 2018).

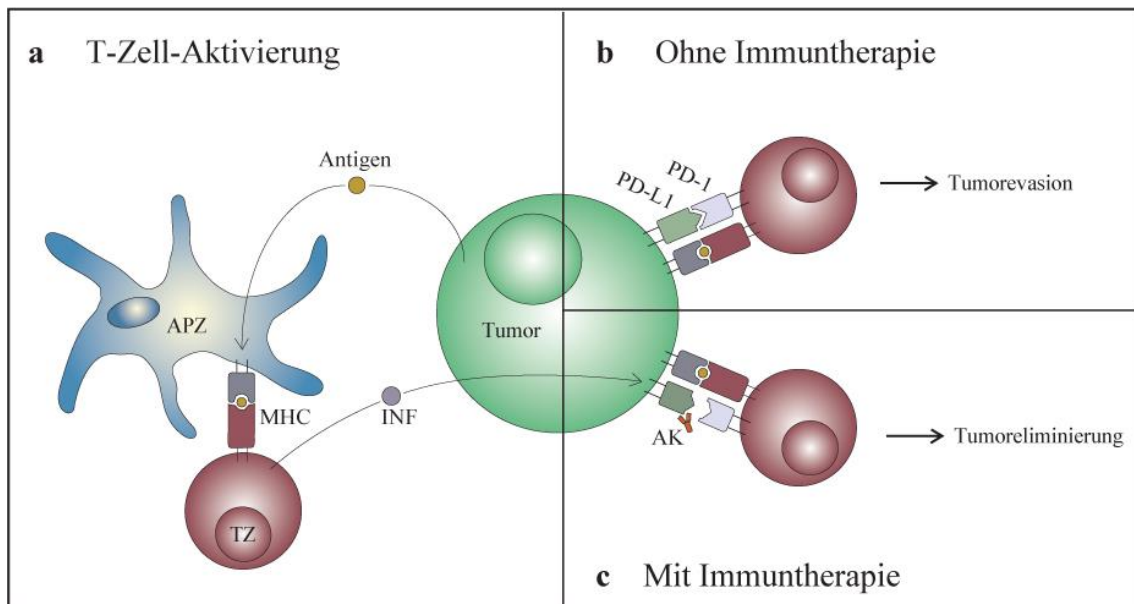
Die Bindung zwischen PD-L1 auf Tumorzellen und PD-1 auf T-Zellen bewirkt eine Blockierung der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort und somit eine Immunevasion des Tumors (Dong *et al.*, 1999). Dadurch schützt dieser Signalweg die Tumorzellen vor dem Abbau durch das Immunsystem (Drake *et al.*, 2006). Der Signalweg von PD-1 und PD-L1 ist dadurch einer der inhibitorischen Checkpoints, der sich bei NSCLC als Therapieansatz nutzen lässt.

### 1.4.3 Anti-PD-1/ PD-L1-Therapie von NSCLC

Die PD-1-/PD-L1-Checkpoint-Blockade setzt zunächst die Erkennung der von Tumoren freigesetzten Peptide voraus. Diese Antigene werden von APZ aufgenommen und über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) präsentiert. Dadurch können die präsentierten Tumorantigene von den T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf T-Lymphozyten erkannt werden. Die Interaktion von TCR und Tumorantigen-MHC auf APZ wird als T-Zell-Aktivierung bezeichnet. Hierbei wird der PI3K-Signalweg inhibiert und die Mikrocluster-Bildung zwischen PD-1 und TCR blockiert. Zudem wird die Expression von PD-1 auf T-Zellen induziert (Drake *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2000; Mahoney *et al.*, 2015a).

Das auf aktivierten T-Zellen exprimierte PD-1 kann an PD-L1 auf Tumorzellen binden, woraufhin PD-1 ein Cluster mit dem TCR bildet. Diese Mikrocluster induzieren die Suppression der T-Zell-Aktivierung, wodurch eine Reduktion der T-Lymphozyten-Funktion entsteht (Sznol und Chen, 2013; Yokosuka *et al.*, 2012). Dadurch bewirkt die Bindung von PD-1 und PD-L1 eine Inhibition der T-Zell-Aktivierung, eine reduzierte Proliferation, eine verringerte Zytokinproduktion und eine veränderte T-Zell-Zytolyse (Freeman *et al.*, 2000; Mahoney *et al.*, 2015a; Rodig *et al.*, 2003). Eine schematische Darstellung des PD-1/PD-L1-Immuncheckpoints findet sich in Abbildung 1.





**Abbildung 1: Schematische Darstellung des PD-1/PD-L1-Immuncheckpoints.** a) Die von Tumoren freigesetzten Antigene werden von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) und über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) präsentiert. Diese präsentierten Antigene werden von T-Zellen (TZ) erkannt. Die dadurch aktivierten T-Zellen setzen Interferone (INF) frei, welche die Expression von PD-L1 in Tumorzellen induzieren. b) Die aktivierten T-Zellen binden über PD-1 an PD-L1 auf den Tumorzellen, wodurch inhibitorische Signale des Immunsystems freigesetzt werden, die die T-Zell-Aktivität reduzieren (reduzierte Proliferation, verringerte Zytokinproduktion, veränderte T-Zell-Zytolyse). Dadurch werden die Tumorzellen nicht durch das Immunsystem abgebaut (Tumorevasion). c) Beim Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren (AK) im Rahmen einer Immuntherapie binden diese an PD-1 oder PD-L1, blockieren dadurch dessen Interaktion und ermöglichen so den Abbau der Tumorzellen (Tumoreliminierung). APZ = antigenpräsentierende Zelle, TZ = T-Zelle, INF = Interferon, PD-1 = *programmed cell death-protein 1*, PD-L1 = *programmed cell death-ligand 1*, AK = Antikörper (Immuncheckpoint-Inhibitor), MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex

Therapeutisch eingesetzte PD-1/PD-L1-Inhibitoren binden an den Liganden oder Rezeptor und blockieren so deren Interaktion. Dieser Mechanismus verhindert eine Immuntoleranz und ermöglicht dadurch die Immunreaktion gegen den Tumor. Für die Anti-PD-1/PD-L1-Therapie von NSCLC sind aktuell vier Inhibitoren zugelassen: Pembrolizumab, Nivolumab, Atezolizumab und Durvalumab. Ihr Einsatz ist jedoch an unterschiedliche Bedingungen bezüglich des Tumorstadiums, vorheriger Therapien, des Nachweises eines möglicherweise vorliegenden Tumorprogresses und der PD-L1-Expressionsrate gebunden (Kythreotou *et al.*, 2017; Noll *et al.*, 2018; Tsao *et al.*, 2017).

Pembrolizumab (KEYTRUDA®) ist von der *Food and Drug Administration of America* (FDA) für Patienten ohne *EGFR*- oder *ALK*-Veränderungen als Erstlinientherapie (für eine PD-L1-Expressionsrate  $\geq 50\%$ , Nachweis mit DAKO 22C3) und Zweitlinientherapie nach Platin-basierter Chemotherapie (für eine PD-L1-Expressionsrate  $\geq 1\%$ , Nachweis mit DAKO 22C3) zugelassen (Garon *et al.*, 2015; Herbst *et al.*, 2016; Kythreotou *et al.*, 2017; Pai-Scherf *et al.*, 2017; Reck *et al.*, 2016; Tsao *et al.*, 2017).

Nivolumab (OPDIVO®) ist als Monotherapie für Patienten nach einer vorherigen Chemotherapie von lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem NSCLC zugelassen, wenn eine PD-L1-Expressionsrate von  $>1\text{-}5\%$  mit dem Antikörper DAKO 28-8 nachwiesen werden kann (Horn *et al.*, 2017; Kythreotou *et al.*, 2017; Tsao *et al.*, 2017).

Atezolizumab (TECENTRIQ®) ist als ergänzende Therapie für Patienten mit metastasierenden NSCLC anerkannt, bei denen eine Tumorprogression unter Erstlinien-Chemotherapie auftritt (Kythreotou *et al.*, 2017; Tsao *et al.*, 2017). Die Zulassung bezieht sich auf eine mit dem Antikörper Ventana SP142 ermittelte PD-L1-Expressionsrate der Immunzellen von  $>10\%$  oder einer Expressionsrate der Tumorzellen von  $\geq 50\%$  (Kythreotou *et al.*, 2017; Rittmeyer *et al.*, 2017).

Durvalumab (IMFINZI™) ist als Monotherapie für Patienten mit lokal fortgeschrittenen, nicht resezierbaren NSCLC mit einer PD-L1-Expressionsrate von  $\geq 1\%$  (Nachweis mit Ventana SP263) zugelassen, sofern nach einer Platin-basierten Radiochemotherapie kein Progress vorliegt (Antonia *et al.*, 2017; Antonia *et al.*, 2018). Die im Mai 2019 beim Jahrestreffen der *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) vorgestellten Ergebnisse bestätigten nach drei Jahren eine höhere Überlebensrate bei der Behandlung mit Durvalumab im Vergleich zum Placebo (Gray *et al.*, 2019).

Alle dieser Inhibitoren gegen PD-L1 führen zu vielversprechenden Ergebnissen bei Patienten mit NSCLC (Antonia *et al.*, 2017; Antonia *et al.*, 2018; Gettinger *et al.*, 2016; Gray *et al.*, 2019; Herbst *et al.*, 2016; Horn *et al.*, 2017; Pai-Scherf *et al.*, 2017; Rittmeyer *et al.*, 2017). Die objektiven Ansprechraten (*objektive response rate* = ORR) variieren zwischen  $14,6\%$  und  $44\%$  (Aguilar *et al.*, 2019; Antonia *et al.*, 2018; Tsao *et al.*, 2017). Aktive und ehemalige Raucher weisen eine erhöhte Ansprechrate auf Checkpoint-Therapien auf (D’Incecco *et al.*, 2014; Garon *et al.*, 2015). Zudem können bestimmte Laborparameter (Laktatdehydrogenase, C-reaktives Protein und Neutrophile/Lymphozyten-Verhältnis) den Erfolg einer Checkpoint-Therapie beeinflussen (Schiwitzka *et al.*, 2019).

Eine höhere Ansprech- und Überlebensrate einer Checkpoint-Therapie liegen auch bei Patienten mit vermehrter PD-L1 Expression vor (Aguilar *et al.*, 2019; Antonia *et al.*, 2018; Fehrenbacher *et al.*, 2018; Garon *et al.*, 2015; Rizvi *et al.*, 2015b). Ein positiver Therapieeffekt durch den Einsatz von PD-L1-Inhibitoren kann jedoch auch ohne nachgewiesene tumorale PD-L1-Expression auftreten (Fehrenbacher *et al.*, 2018; Garon *et al.*, 2015; Horn *et al.*, 2017; Rittmeyer *et al.*, 2017). Ursachen hierfür könnten in der Tumorheterogenität, der unterschiedlichen Sensitivität gegenüber dem Antikörper oder

der dynamischen immunologischen Mikroumgebung liegen (Garon *et al.*, 2015; Mahoney *et al.*, 2015b).

Untersuchungen zeigen für Patienten mit tumoraler PD-L1-Expression teilweise eine bessere Überlebensrate (Cooper *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2015; Velcheti *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014), aber teils auch eine schlechtere Prognose (Azuma *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Inamura *et al.*, 2016; Mu *et al.*, 2010; Okita *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2015; Tokito *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017). Die Überlebensrate bei PD-L1-exprimierenden NSCLC könnte von Faktoren wie Tumorsubtyp, adjuvanten Therapien, Tumorgröße, Geschlecht, Lymphknotenstatus, Raucherstatus, Tumordifferenzierungsgrad und -stadium beeinflusst werden (Schmidt *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017).

Eine bessere Überlebensrate bei tumoraler PD-L1-Expression könnte auch mit gleichzeitig gegebenen, zusätzlichen Faktoren wie der Expression von INF- $\gamma$  (Gao *et al.*, 2018), den im Tumor vorliegenden CD8-positiven T-Zellen (Tokito *et al.*, 2016; Tumeh *et al.*, 2014), einer bestehenden *EGFR*-Mutation (Tang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015) oder einer hohen Mutationslast (*tumor mutational burden* = TMB) korrelieren (Rizvi *et al.*, 2015a; Rizvi *et al.*, 2018).

Die PD-L1-Expression scheint daher nicht in jedem Fall als Biomarker anwendbar zu sein, auch wenn dessen prognostischer Vorhersagewert diskutiert wird (Boland *et al.*, 2013; Brody *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2018; Herbst *et al.*, 2016; Mahoney *et al.*, 2015a; Wang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016, Yang *et al.*, 2014). Dessen ungeachtet bietet der Nachweis einer PD-L1-Expression die Grundlage eines vielversprechenden Therapieansatzes mit Checkpoint-Inhibitoren.

#### 1.4.4 Nachweis der PD-L1-Expression

Der Therapieerfolg mit Anti-PD-1/PD-L1-Inhibitoren hängt unter anderem von der PD-L1-Expressionsrate auf Tumorzellen ab (Gao *et al.*, 2018; Garon *et al.*, 2015; Reck *et al.*, 2016; Taube *et al.*, 2014). Aktuelle Richtlinien und klinische Studien empfehlen eine Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate von NSCLC ausschließlich an histologischen Präparaten (Herbst *et al.*, 2016; Horn *et al.*, 2017; Kythreotou *et al.*, 2017; Reck *et al.*, 2016; Rittmeyer *et al.*, 2017; Tsao *et al.*, 2017).

Für den immunhistochemischen Nachweis der PD-L1-Expression sind bislang vier Antikörper und entsprechende therapeutische Inhibitoren von der FDA zur Behandlung von NSCLC zugelassen: DAKO 22C3 (Pembrolizumab) und DAKO 28-8 (Nivolumab) sowie Ventana SP142 (Atezolizumab) und Ventana SP263 (Durvalumab) (siehe S. 9ff, Anti-PD-1/ PD-L1-Therapie von NSCLC). Studien zeigen eine Vergleichbarkeit zwischen den Antikörpern Ventana SP263, DAKO 22C3 und DAKO 28-8, während die Anfärbung mit Ventana SP142 im Vergleich dazu schwächer ausfällt (Brunnström *et al.*, 2017; Fujimoto *et al.*, 2018; Hirsch *et al.*, 2017; Ratcliffe *et al.*, 2017; Rimm *et al.*, 2017). Eine Übersicht der Anfärbung mit den unterschiedlichen Antikörpern ist in Abbildung 2 dargestellt.

Alle von der FDA zugelassenen immunhistochemischen Verfahren beziehen sich ausschließlich auf Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE) Gewebe (Herbst *et al.*, 2016; Horn *et al.*, 2017; Reck *et al.*, 2016; Rittmeyer *et al.*, 2017, Antonia *et al.*, 2017; Antonia *et al.*, 2018). Trotz scheinbar klarer Richtlinien erschweren jedoch mehrere Faktoren eine einheitliche Auswertung der PD-L1-Expressionsrate.

So kann die Färbung gegen PD-L1 von präanalytischen Faktoren wie der Art des Materials (Heyman *et al.*, 2017; Ilie *et al.*, 2018; Noll *et al.*, 2018), dem Antikörper-Klon (Brunnström *et al.*, 2017; Hirsch *et al.*, 2017; McLaughlin *et al.*, 2016; Scheel *et al.*, 2016), der Fixierungsart und -dauer (Engel und Moore, 2011; Jain *et al.*, 2018; Lloyd *et al.*, 2017), den eventuellen vorherigen Färbungen (Jain *et al.*, 2018; Noll *et al.*, 2018; Tsao *et al.*, 2017), den Auswirkungen durch die Entfernung des Eindeckmediums (Arriola *et al.*, 2018), dem Alter der Proben (Calles *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2018), den Lagerungsbedingungen des Materials (Calles *et al.*, 2015; Grillo *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2018, van der Broek und van de Vijver, 2000) und der Qualität der Proben (Jain *et al.*, 2018; Noll *et al.*, 2018; Sakakibara *et al.*, 2017) beeinflusst sein.

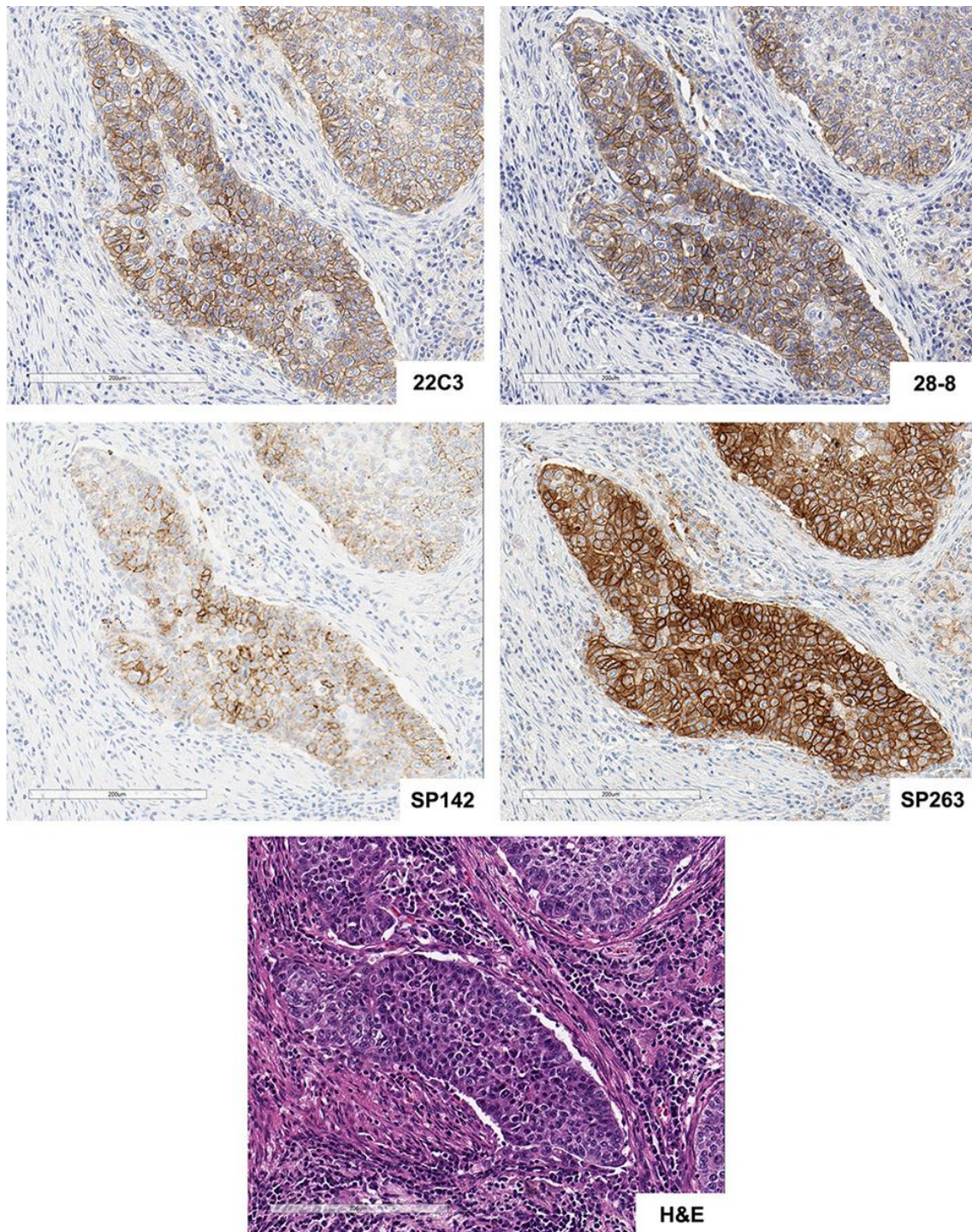
Zusätzlich könnten sich unterschiedliche klinisch-pathologische Eigenschaften auf die ermittelte PD-L1-Expressionsrate auswirken. Dies umfasst Tumortyp (Azuma *et al.*, 2014; Kitazono *et al.*, 2015; Krawczyk *et al.*, 2017; Shimoji *et al.*, 2016; Skov *et al.*,

2019; Sun *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2018), Tumorstadium (Chen *et al.*, 2012; Cooper *et al.*, 2015; Skov *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018), Tumordifferenzierungsgrad (Chen *et al.*, 2012; Cooper *et al.*, 2015; Driver *et al.*, 2017; Inamura *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014) und Tumormanifestation (Büttner *et al.*, 2017; Haragan *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Mansfield *et al.*, 2016; Munari *et al.*, 2018a; Uruga *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018), sowie Raucherstatus und Alter oder Geschlecht des Patienten (Azuma *et al.*, 2014; Driver *et al.*, 2017).

Eine einheitliche Auswertung und Vergleichbarkeit mehrerer Studien werden zudem durch verschiedene Auswertungskriterien eingeschränkt. So erschweren differente Grenzwerte (Cutoff) (Herbst *et al.*, 2016; Hirsch *et al.*, 2017; Horn *et al.*, 2017; Jain *et al.*, 2018; Reck *et al.*, 2016; Rittmeyer *et al.*, 2017; Scheel *et al.*, 2016; Tsao *et al.*, 2017; Udall *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016), abweichende Bestimmungen der auszuwertenden Zellen (in-/exklusive Immunzellen) (Kythreotou *et al.*, 2017; Tsao *et al.*, 2017; Udall *et al.*, 2018), unterschiedliche Auswertungsprinzipien (Tumor-Proportions-Score/Cologne-Score) (Scheel *et al.*, 2016) und abweichende Definitionen der Positivkriterien (zytoplasmatische/membranäre Färbung) (Tsao *et al.*, 2017) die Beurteilung.

Differenten Ergebnisse mehrerer Studien, an unterschiedlichen Materialarten und mit verschiedenen Untersuchungsmethoden dürften vor allem auf der Heterogenität der PD-L1-Expression innerhalb einer Läsion (Casadevall *et al.*, 2017; McLaughlin *et al.*, 2016; Munari *et al.*, 2017; Nakamura *et al.*, 2017), zwischen pulmonalem Primärtumor und dessen Metastasen (Büttner *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Mansfield *et al.*, 2016; Munari *et al.*, 2018a; Uruga *et al.*, 2017), als auch vor und nach einer Chemo-/Radiotherapie (Dovedi *et al.*, 2014; Lacour *et al.*, 2019; Rojkó *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2017; Sheng *et al.*, 2016) oder nach entzündlichen Prozessen (Dong *et al.*, 2002; Eppihimer *et al.*, 2002; Latchman *et al.*, 2001; Mazanet und Hughes, 2002) beruhen.

Unabhängig von diesen Faktoren beeinträchtigt auch die Interrater-Variabilität eine einheitliche Auswertung der Expressionsrate und deren Vergleichbarkeit (Brunnström *et al.*, 2017; Scheel *et al.*, 2016). Übung und Erfahrung in der Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate könnten auf die Interrater-Variabilität einwirken (Brunnström *et al.*, 2017). Bislang ist der Einfluss von Übung auf eine mögliche Verbesserung der Übereinstimmungsraten jedoch nicht abschließend untersucht (Büttner *et al.*, 2017; Cooper *et al.*, 2017).



**Abbildung 2: Anti-PD-L1-Anfärbungen histologischer Schnitte von NSCLC.** Die Anfärbungen gegen PD-L1 mit den Antikörpern DAKO 22C3, DAKO 28-8 und Ventana SP263 zeigen ähnliche Ergebnisse, während mit Ventana SP142 schwächere Anfärbungen der Tumorzellmembranen und weniger positive Tumorzellen auftreten. NSCLC = nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, PD-L1 = *programmed cell death-ligand 1*, H&E = Hämatoxylin-Eosin-Färbung (modifiziert nach Hirsch *et al.*, 2017)

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Der Nachweis einer PD-L1-Expression von Tumorzellen eines Lungenkarzinoms ist derzeit die Voraussetzung für eine Immuncheckpoint-Therapie und stellt damit die Grundlage für ein potenziell besseres Überleben dar (Gettinger *et al.*, 2016; Herbst *et al.*, 2016; Horn *et al.*, 2017; Rittmeyer *et al.*, 2017). Aktuelle Richtlinien empfehlen die Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate von NSCLC ausschließlich an histologischen Präparaten (Herbst *et al.*, 2016; Horn *et al.*, 2017; Reck *et al.*, 2016; Rittmeyer *et al.*, 2017). Derzeit werden jedoch mehr als 50% der Lungenkrebsdiagnosen an zytologischen Präparaten gestellt (Shah *et al.*, 2006; Skov *et al.*, 2014; Travis *et al.*, 2011; Tsao *et al.*, 2017; LungenClinic Grosshansdorf). Die Beschränkung der PD-L1-Expressionsanalyse auf histologische Präparate erschwert daher potenziell vielen Patienten den Zugang zu einer zielgerichteten Therapie.

Immunzytochemische Untersuchungen sind bereits für zahlreiche Antikörper etabliert und gehören zu den Routinediagnostikverfahren (Dey und Gosh, 2018; Fischer *et al.*, 2014). Darin eingeschlossen sind auch quantitative Auswertungen membranärer Anfärbungen wie etwa dem humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor HER2 („*human epidermal growth factor receptor 2*“) (Moriki *et al.*, 2004). Daher sollten auch die Durchführung einer immunologischen PD-L1-Anfärbung und deren quantitative Auswertung an zytologischen Präparaten anwendbar sein.

Erste Studien bestätigen die Eignung unterschiedlicher zytologischer Präparate zur Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate (Capizzi *et al.*, 2018; Heyman *et al.*, 2017; Hernandez *et al.*, 2018; Ilie *et al.*, 2018; Jain *et al.*, 2018; Munari *et al.*, 2018a; Noll *et al.*, 2018; Russel-Goldmann *et al.*, 2018; Sakakibara *et al.*, 2017; Skov und Skov, 2017; Torous *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Bisher wurden jedoch keine zytologischen Imprint-Präparate resezierter Lungentumoren auf ihre PD-L1-Expression untersucht und mit gepaarten histologischen Schnitten derselben Läsion verglichen.

Die Validierung zytologischen Materials zur Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate bietet potenziell vielen Patienten die Chance einer lebensverlängernden Therapie durch den Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren, bei denen histologische Proben nicht verfügbar sind oder die Analyse am histologischen Material nicht möglich ist.

**Hypothese H<sub>0</sub>:** In zytologischen und histologischen Proben liegen unterschiedliche PD-L1-Expressionsraten vor.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten und Untersuchungsgut

In der vorliegenden Arbeit wurden retrospektiv je 247 gepaarte zytologische und histologische Proben primärer Lungentumoren und Metastasen primärer Lungenkarzinome untersucht, deren Resektion zwischen 2013 und 2017 in der LungenClinic Grosshansdorf (LungenClinic Grosshansdorf, Großhansdorf) erfolgt ist. Die histologische Aufarbeitung der Resektate einschließlich der Tumorklassifikation und -typisierung erfolgten in der Pathologie Borstel (Pathologie, Forschungszentrum Borstel, Leibniz Lungenzentrum, Borstel) und in der Pathologie des Universitätskrankenhauses Schleswig-Holstein Campus Lübeck (Institut für Pathologie, Universitätskrankenhauses Schleswig-Holstein, Campus Lübeck) entsprechend den Kriterien der WHO 2015 (Travis *et al.*, 2015a). Die Bestimmung des Tumorstadiums basiert auf den gültigen TNM-Kriterien (Asamura *et al.*, 2015; Detterbeck *et al.*, 2017; Eberhardt *et al.*, 2015; Goldstraw *et al.*, 2016; Nicholson *et al.*, 2016; Rami-Porta *et al.*, 2015). Für die vorliegende Arbeit wurde ausschließlich für die Diagnostik nicht benötigtes Restmaterial resezierter Tumoren herangezogen. Die Ethikkommission der Universität Lübeck hat die Untersuchungen unter der Fallnummer 16-277 angenommen (Abbildung 9).

Eine Übersicht des Untersuchungsguts ist in Tabelle 1 aufgezeigt. Die analysierten Proben stammen von 234 Patienten, darunter 104 Frauen (durchschnittlich 69,9 Jahre (52,5-90,7 Jahre)) und 130 Männer (durchschnittlich 65,2 Jahre (36,2-82,4 Jahre)). Bei den untersuchten Läsionen handelte es sich im Einzelnen um 153 (61,9%) ADC und 94 (38,1%) SQC. Davon waren 198 (80,2%) Primärtumoren und 49 (19,8%) Metastasen primär pulmonaler Karzinome, darunter 29 (11,7%) Lymphknoten (LK)-Metastasen und 20 (8,1%) Pleurametastasen.

Die Verteilung der postoperativen Tumorstadien (pT) ist wie folgend: 19 pT1a (9,6%), 59 pT1b (29,8%), 48 pT1c (24,2%), 38 pT2a (19,2%), 5 pT2b (2,5%), 15 pT3 (7,5%) und 14 pT4 (7,1%). Der Differenzierungsgrad (G) der untersuchten Tumoren liegt in 5 Fällen (3%) bei G1, in 89 Fällen (45%) bei G2 und in 104 Fällen (53%) bei G3. Das zytologische Material setzt sich aus 215 (87%) Imprintpräparaten resezierter Tumoren (Abtupf-/Abkratzmaterial), 31 (13%) intraoperativ gewonnenen FNP und 1 (<1%) intraoperativ gewonnenem Erguss zusammen. Bei den histologischen Präparaten handelte es sich um vollständige Schnitte (4 µm) der gepaarten resezierten Läsionen.



**Tabelle 1: Verteilung des Untersuchungsguts.** Aufgelistet sind Geschlecht, Tumortyp, Manifestation, Stadium, Differenzierungsgrad und Art der zytologischen Proben des Untersuchungsguts. ADC = Adenokarzinom, SQC = Plattenepithelkarzinom, LK = Lymphknoten, FNP = Feinnadelpunktion, pT = postoperatives Tumorstadium (pT1a-pT4), G = Differenzierungsgrad (G1-G4)

Verteilung des Untersuchungsguts			
<b>Patienten</b>	Frauen	104 (44%)	70 Jahre (53-91 Jahre)
	Männer	130 (56%)	65 Jahre (36-82 Jahre)
<b>Tumortyp</b>	ADC	153 (62%)	
	SQC	94 (38%)	
<b>Manifestation</b>	Primarius	198 (80%)	
	Metastase	49 (20%)	29 (59%) LK, 20 (41%) Pleura
<b>Stadium</b>	pT1a	19 (10%)	
	pT1b	59 (30%)	
	pT1c	48 (24%)	
	pT2a	38 (19%)	
	pT2b	5 (3%)	
	pT3	15 (8%)	
	pT4	14 (7%)	
<b>Differenzierungsgrad</b>	G1	5 (3%)	
	G2	89 (45%)	
	G3	104 (53%)	
	G4	0 (0%)	
<b>Zytologische Proben</b>	Imprint	215 (87%)	
	FNP	31 (13%)	
	Erguss	1 (<1%)	

## 2.2 Immunologische Anfärbungen

Die immunologischen Anfärbungen fanden im Institut für Pathologie Campus Lübeck statt (Institut für Pathologie, Universitätskrankenhaus Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und Pathologie, Forschungszentrum Borstel, Leibniz Lungenzentrum, Borstel). Dabei wurden die FFPE Schnitte sowie die Aceton:Methanol (1:1) fixierten zytologischen Präparate mit dem gegen PD-L1 gerichteten Antikörper-Klon 22C3 (mouse anti-PD-L1, mk, Klon DAKO 22C3 von DAKO, Santa Clara (CA), 1:100) gefärbt. Die Anfärbungen verliefen automatisiert am Ventana Discovery Ultra (RUO DISCOVERY Universal (v.00.00.0299), DISCOVERY ULTRA) nach Protokoll-Nummer 158 für FFPE Präparate (Tabelle 17, Anhang S. 94ff) und Protokoll-Nummer 159 für zytologische Präparate (Tabelle 18, Anhang S. 98ff) der Bedienungsanleitung. Die zur Durchführung der Anfärbungen benötigten Reagenzien sind in Tabelle 16 (Anhang, S. 93) aufgeführt. Ein Ablauf der Färbungen ist in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgelistet. Als Positivkontrollen dienten histologische Schnitte humaner Plazenta.

Für den morphologischen Vergleich der PD-L1-gefärbten Präparate wurde von jeder Probe ein korrespondierender histologischer Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die HE-Färbungen fanden im Universitätskrankenhaus Schleswig-Holstein statt (Institut für Pathologie, Universitätskrankenhaus Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und Pathologie, Forschungszentrum Borstel, Leibniz Lungenzentrum, Borstel). Archivierte Giemsa-gefärbte Präparate dienten dem morphologischen Vergleich der korrespondierenden zytologischen Proben.

Alle Bildaufnahmen von PD-L1-, HE- oder Giemsa-gefärbten Präparaten erfolgten an einem LEICA Mikroskop DM2000 (Mikroskopkamera Wenzel Mikroskoptechnik GmbH) mit dem Programm ProgRes® Capture Pro 2.8.8 (Jenoptik, Jena, Deutschland). Bildanordnungen und -beschriftungen wurden mit Adobe® Photoshop® CS3 (Adobe Inc., San José, Kalifornien, USA) vorgenommen. Die schematische Darstellung des PD-1-/PD-L1-Immuncheckpoints entstand mit Adobe® Illustrator CS6 (Adobe Inc., San José, Kalifornien, USA).

**Tabelle 2: PD-L1-Färbeprotokoll für FFPE Proben.** Dargestellt ist die Übersicht des Protokolls zur Anfärbung von FFPE Schnitten mit dem PD-L1-Antikörper 22C3 (mouse anti-PD-L1, mk, Klon DAKO 22C3 von DAKO, Santa Clara (CA), 1:100) mit dem Ventana Discovery Ultra. FFPE = Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet, RT = Raumtemperatur, RTU = Ready to Use, PD-L1 = *programmed cell death-ligand 1*, CCS = *Cell Conditioning Solution*. Die eingesetzten Reagenzien aus dem OptiView DAB IHC Detection Kit und weiteren Lösungen sind in Tabelle 16 (Anhang, S. 93) aufgeführt. Ein ausführliches Färbeprotokoll findet sich in Tabelle 17 auf Seite 94ff im Anhang.

### Ablauf der Anfärbung von FFPE Präparaten

- Erwärmen der Objektträger auf 37°C
- Aufheizen der Objektträger auf 58°C für 4 Minuten
- Dreimalige Inkubation mit CCS für je 8 Minuten
- Deparaffinierung in 3 Zyklen aus je 12 Min Inkubation mit EZ Prep (Ventana Medical System, 950-102) bei 72°C
- Erwärmen der Objektträger auf 37°C
- Spülen mit EZ Prep
- Mehrmalige Inkubation mit CCS bei 95°C (insgesamt 24 Min)
- Spülen mit Reaktionspuffer bei 37°C
- Blockierung durch Inkubation mit 1 Tropfen Inhibitor CM für 4 Minuten
- Inkubation mit 1 Tropfen Primärantikörper (Maus anti-PD-L1, mk, Klon DAKO 22C3 von DAKO, 1:100) für 20 Minuten bei RT
- Spülen mit Reaktionspuffer bei 37°C
- Inkubation mit 1 Tropfen Sekundär-AK (anti-Mouse HQ; RTU) für 20 Minuten bei RT
- Spülen mit Reaktionspuffer bei 37°C
- Inkubation mit 1 Tropfen Anti-HQ HRP (mouse anti-HQ HRP, RTU) für 16 Minuten
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Inkubation mit 1 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> CM für 4 Minuten
- Inkubation mit 1 Tropfen DAB CM für 8 Minuten
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Inkubation mit 1 Tropfen Copper CM für 4 Minuten
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Inkubation mit 1 Tropfen Hämatoxylin II (Gegenfärbung) für 8 Minuten
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Inkubation mit 1 Tropfen Bluing Reagent (Nach-Gegenfärbung) für 4 Minuten
- Spülen mit Reaktionspuffer

**Tabelle 3: PD-L1-Färbeprotokoll für zytologische Proben.** Übersicht des Protokolls zur Anfärbung von zytologischen Präparaten mit dem PD-L1-Antikörper 22C3 (mouse anti-PD-L1, mk, Klon DAKO 22C3 von DAKO, Santa Clara (CA), 1:100) mit dem Ventana Discovery Ultra. RT = Raumtemperatur, RTU = Ready to Use, PD-L1 = *programmed cell death-ligand 1*. Die eingesetzten Reagenzien aus dem OptiView DAB IHC Detection Kit und weiteren Lösungen sind in Tabelle 16 (Anhang, S. 93) aufgeführt. Ein ausführliches Protokoll findet sich in Tabelle 18 auf Seite 98ff im Anhang.

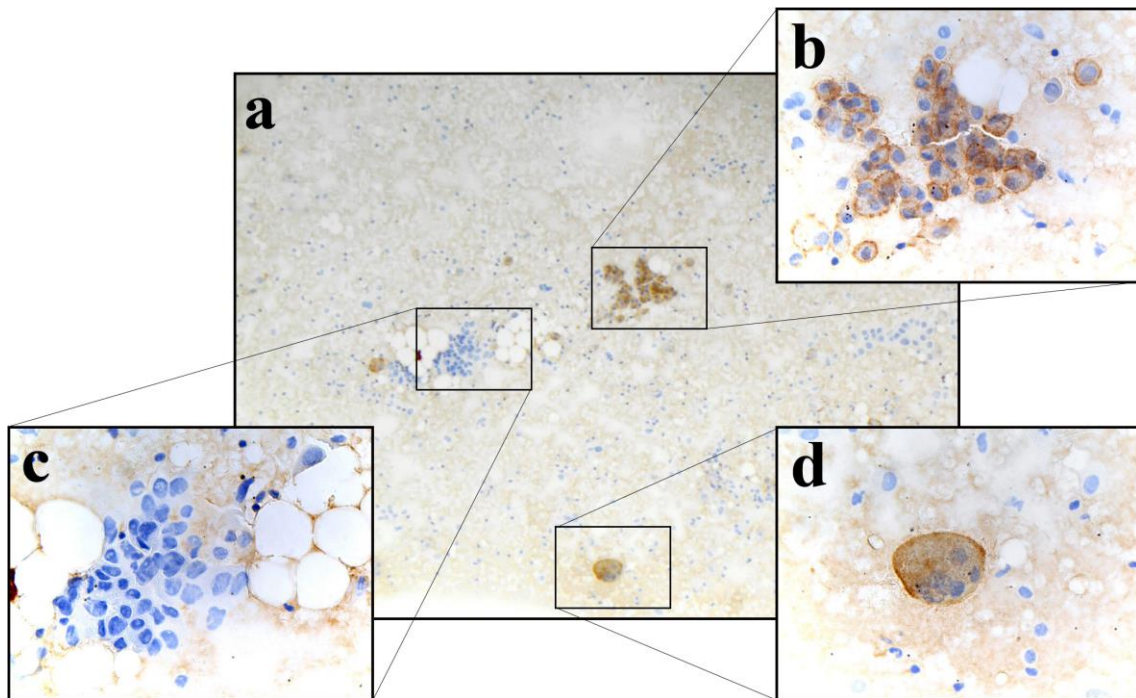
### Ablauf der Anfärbung von zytologischen Präparaten

- Erwärmen der Objektträger auf 37°C
- Spülen mit 300 µl Reaktionspuffer
- Blockierung durch Inkubation mit 1 Tropfen Inhibitor CM für 4 Minuten
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Inkubation mit Reaktionspuffer für 4 Minuten
- Inkubation mit 1 Tropfen Primärantikörper (Maus anti-PD-L1, mk, Klon DAKO 22C3 von DAKO, 1:100) für 20 Minuten bei RT
- Spülen mit Reaktionspuffer bei 37°C
- Inkubation mit Reaktionspuffer für 4 Minuten
- Inkubation mit 1 Tropfen Sekundärantikörper (anti-Mouse HQ; RTU) für 16 Minuten bei RT
- Spülen mit Reaktionspuffer bei 37°C
- Inkubation mit 1 Tropfen Anti-HQ HRP (mouse anti-HQ HRP, RTU) für 16 Minuten
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Inkubation mit 1 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> CM für 4 Minuten
- Inkubation mit 1 Tropfen DAB CM für 8 Minuten
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Inkubation mit 1 Tropfen Copper CM für 4 Minuten
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Inkubation mit 1 Tropfen Hämatoxylin II (Gegenfärbung) für 8 Minuten
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Inkubation mit 1 Tropfen Bluing Reagent (Nach-Gegenfärbung) für 4 Minuten
- Spülen mit Reaktionspuffer

### 2.3 Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate

Jede Probe wurde verblindet und unabhängig voneinander in zufälliger Reihenfolge von drei Bewertern beurteilt. Die Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate basiert auf dem quantitativen Anteil PD-L1-positiver Tumorzellen in der gesamten Probe. Die Expressionsrate wurde dabei in Form von Exaktwerten in den Stufen <1%, 1%, 5%, 10%, 20%...100% sowie in Form eines Tumor-Proportions-Score (TPS) in den Stufen <1% (negativ), 1 bis <50% (intermediär positiv) und  $\geq 50\%$  (hoch positiv) angegeben. Der TPS orientiert sich dabei an den von der FDA zugelassenen Kriterien zur Therapie mit Pembrolizumab (Reck *et al.*, 2016).

Die Analyse der Proben erfolgte lichtmikroskopisch unter 100facher Vergrößerung und unter Hinzunahme der 630fachen Vergrößerung mit Öl zur genauen Überprüfung einer validen membranären Expression. In Abbildung 3 ist beispielhaft ein gegen PD-L1-gefärbtes zytologisches Präparat aufgezeigt.

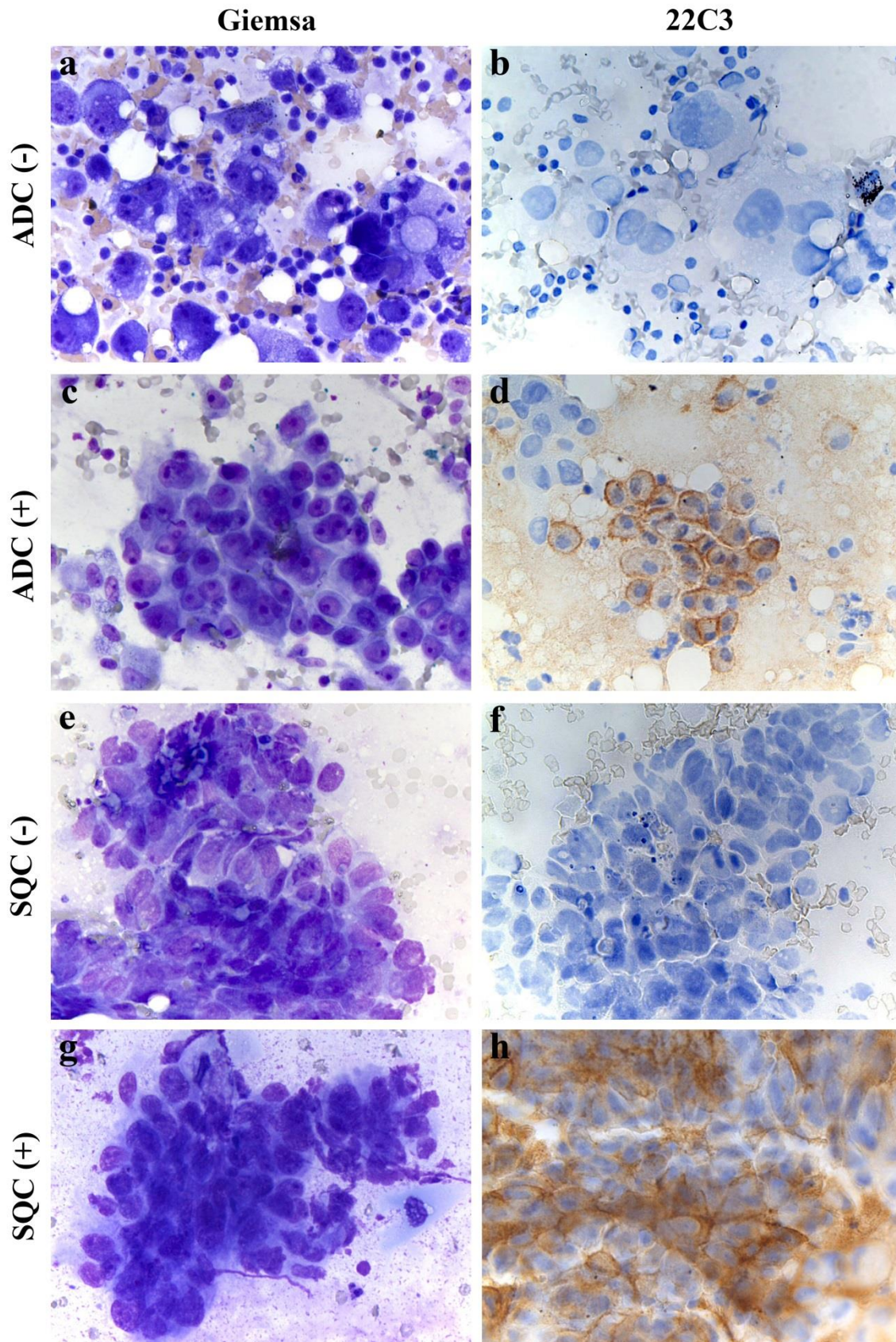


**Abbildung 3: Auswertung der PD-L1-Positivität.** Dargestellt ist ein zytologischer Ausstrich eines ADC nach der Färbung gegen PD-L1 mit dem Antikörperklon DAKO 22C3 (mouse anti-PD-L1, mk, Klon DAKO 22C3 von DAKO, Santa Clara (CA), 1:100). Für die Auswertung wurde der Anteil an membranär positiven Tumorzellen bestimmt. **a)** Übersicht des zytologischen Präparats (100fache Vergrößerung). **b)** Membranär PD-L1-positive Tumorzellen (630fache Vergrößerung). **c)** PD-L1-negative Tumorzellen. **d)** PD-L1-positive Makrophagen, die nicht in die Bewertung einbezogen wurden, aber als interne Kontrolle fungiert haben (630fache Vergrößerung). ADC = Adenokarzinom, PD-L1 = *programmed cell death-ligand 1*

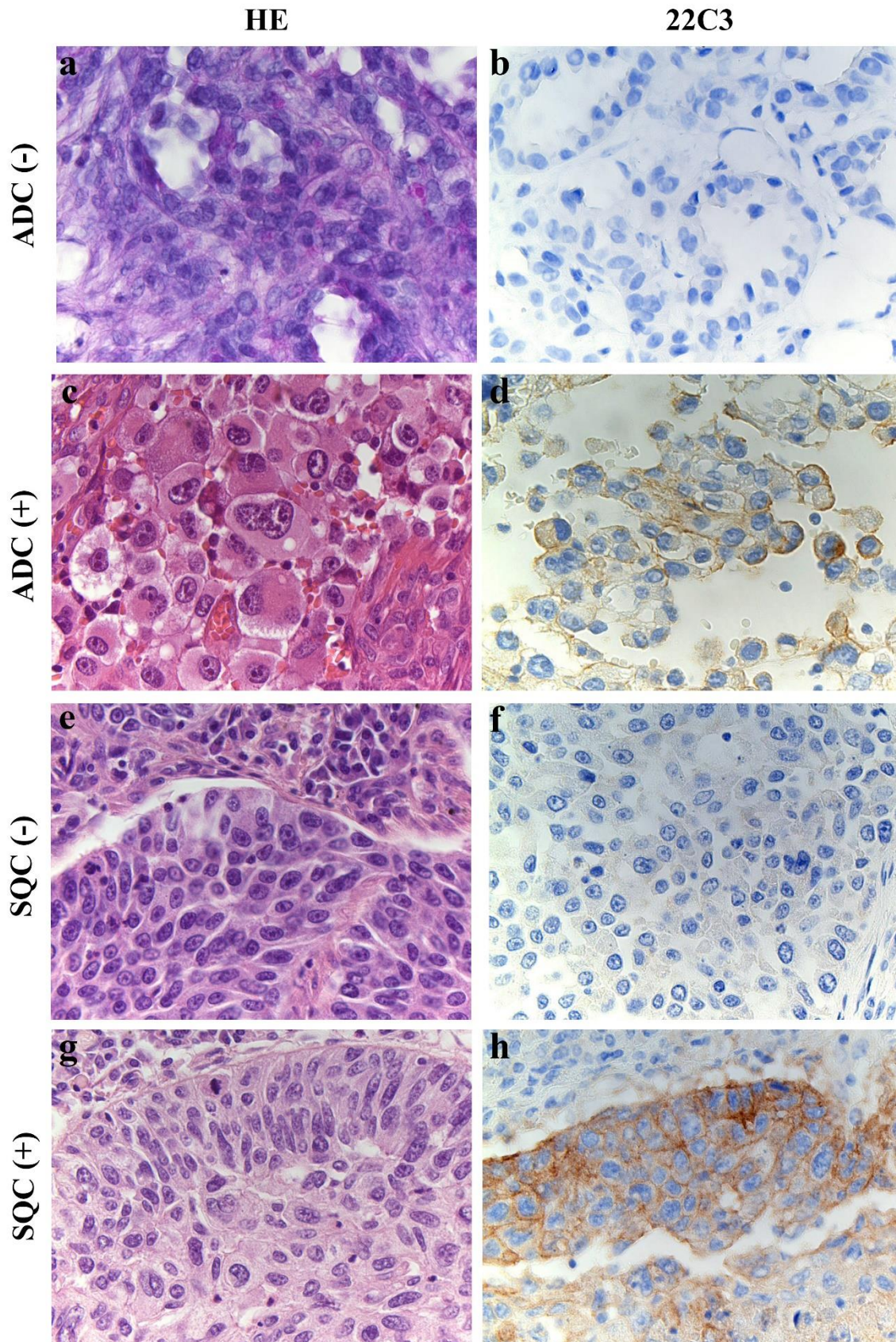
Die Analysen der PD-L1-Expressionsraten schlossen jeweils das gesamte histologische Schnittpräparat, beziehungsweise den gesamten zytologischen Ausstrich ein. Hierbei diente die Hinzunahme des korrespondierenden HE-gefärbten Schnittes oder des Giemsa-gefärbten Ausstriches einer morphologischen Abgrenzung der einzelnen Zelltypen. In Abbildung 4 und Abbildung 5 sind beispielhaft jeweils PD-L1-positive und -negative zytologische und histologische Präparate von ADC und SQC samt korrespondierender HE- beziehungsweise Giemsa-gefärbter Probe aufgezeigt.

Angelehnt an die von der FDA für Pembrolizumab vorgeschriebenen Kriterien, wurde bei der Auswertung der Anteil vitaler Tumorzellen mit partieller oder vollständiger membranärer PD-L1-Positivität unabhängig von ihrer Färbeintensität bestimmt (Reck *et al.*, 2016). Tumorzellen mit ausschließlich zytoplasmatischer PD-L1-Positivität, sowie nekrotische und/oder degenerativ veränderte Tumorzellen wurden unabhängig von der Anfärbung nicht in die Bewertung eingeschlossen (Tsao *et al.*, 2017).

Tumorinfiltrierende Lymphozyten blieben bei der Bewertung unbeachtet, da deren Abgrenzung zu nicht-tumorinfiltrierenden Lymphozyten methodisch bedingt in zytologischen Ausstrichen nicht möglich ist und das Gesamtüberleben einer Therapie von PD-L1-positiven Tumoren nicht von tumorinfiltrierenden Lymphozyten beeinflusst zu werden scheint (Edlund *et al.*, 2019). Proben mit starker Hintergrundfärbung oder mangelnder Anfärbung sowie Präparate mit weniger als 100 Tumorzellen wurden ausgeschlossen. Diese Kriterien führten zum Ausschluss von insgesamt 15 Fällen. PD-L1-positive Makrophagen und Immunzellen fungierten lediglich als interne Kontrollen (Abbildung 3d).



**Abbildung 4: Beispiele für zytologische Präparate.** Von jedem Resektat wurden ein Ausstrich mit Giemsa und ein Ausstrich mit dem PD-L1-Antikörper 22C3 (mouse anti-PD-L1, mk, DAKO 22C3, 1:100) gefärbt. **a-d)** Zytologische Präparate von Adenokarzinomen ohne (b) und mit (d) PD-L1-Positivität (630fache Vergrößerung). **e-h)** Zytologische Präparate von Plattenepithelkarzinomen ohne (f) und mit (h) PD-L1-Positivität (630fache Vergrößerung). ADC = Adenokarzinom, SQC = Plattenepithelkarzinom, PD-L1 = *programmed cell death-ligand 1*



**Abbildung 5: Beispiele für histologische Präparate.** Von jedem Resektat wurden ein Schnitt mit HE und ein Schnitt mit dem PD-L1-Antikörper 22C3 (mouse anti-PD-L1, mk, DAKO 22C3, 1:100) gefärbt. **a-d)** Histologische Schnitte von Adenokarzinomen ohne (b) und mit (d) PD-L1-Positivität (630fache Vergrößerung). **e-h)** Histologische Schnitte von Plattenepithelkarzinomen ohne (f) und mit (h) PD-L1-Positivität (630fache Vergrößerung). HE = Hämatoxylin-Eosin-Färbung, ADC = Adenokarzinom, SQC = Plattenepithelkarzinom, PD-L1 = *programmed cell death-ligand 1*



## 2.4 Auswertung

Aus den einzelnen Ergebnissen der drei Bewerter jeder Probe wurde der Median als mittleres Maß der Exaktwerte und des TPS bestimmt, da es sich hierbei um nicht parametrische Daten handelt und ganzzahlige Werte besser den realen klinischen Erfordernissen beim Umgang mit PD-L1-Positivitäten gerecht werden. Die Berechnung bezog sich jeweils auf die Gesamtergebnisse, sowie getrennt auf die beiden Tumortypen (ADC, SQC).

Die Berechnung der Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der drei Bewerter basiert auf der Interrater-Variabilität in Form des Intraklassenkoeffizienten (ICC). Zusätzlich folgte ein paarweiser Vergleich der Übereinstimmung zwischen den einzelnen Bewertern anhand einer Inter-Item-Korrelationsmatrix.

Für die medianen Exaktwerte und TPS wurden jeweils die Häufigkeiten sowie deren prozentuale Anteile der unterschiedlichen Expressionsraten ermittelt. Zudem schloss sich jeweils eine Bestimmung der durchschnittlichen Expressionsrate als Mittelwert aus den medianen Exaktwerten aller Proben eines Jahres (2013-2017) an.

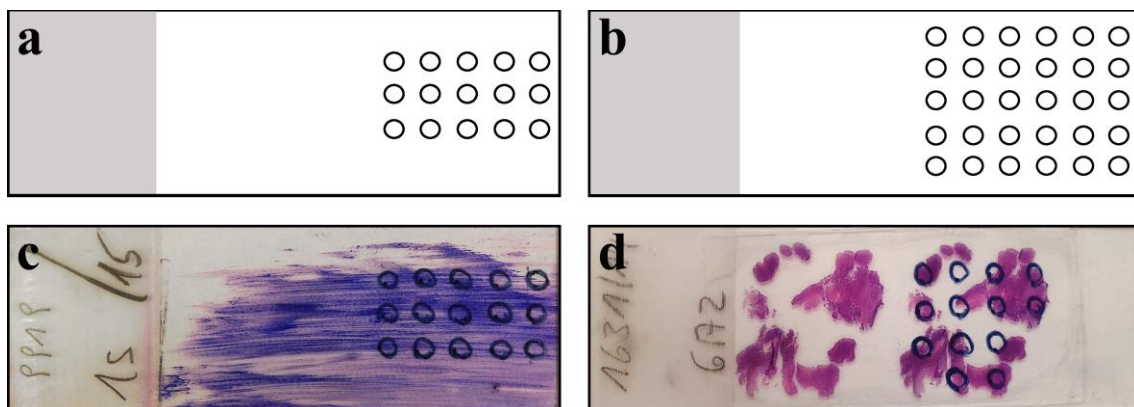
Anschließend erfolgte die Berechnung der Konkordanz zwischen den gepaarten zytologischen und histologischen Proben. Sie dient als Maß aller Fälle, bei denen Zyto- und Histologie ein gleiches Ergebnis aufweisen. Die Konkordanz wurde jeweils für die medianen Exaktwerte und den medianen TPS für die gesamten Fälle, sowie getrennt für ADC und SQC ermittelt. Die Berechnung der Konkordanz anhand der Exaktwerte basierte auf der Anzahl und dem Anteil jener medianen Exaktwerte, bei denen das gepaarte zytologische und histologische Ergebnis genau gleich ( $\Delta 0$ ) war oder um maximal 10 ( $\Delta 10$ ) abwich. Eine Differenz von 10 zwischen dem zytologischen und histologischen Ergebnis wurde gewählt, da dieser Unterschied für Therapie und Klinik überwiegend nicht relevant ist und leicht abweichende Bewertungen zwischen den Bewertern ausgleicht. Die Konkordanz des TPS basiert auf der Anzahl und dem Anteil jener Fälle, bei denen die PD-L1-Expression der gepaarten zyto- und histologischen Proben in der gleichen Stufe ( $<1\%$ ,  $1-49\%$ ,  $\geq 50$ ) lag.

Zusätzliche Untersuchungen bezogen sich auf vier Merkmale der eingeschlossenen malignen Tumoren (Tumormanifestation, -Typ, -Stadium, -Differenzierungsgrad), die mit Unterschieden in der PD-L1-Expressionsrate assoziiert sein könnten. Hierfür wurden aus den zytologischen und histologischen Exaktwerten und dem TPS jeweils Anzahl und Anteil PD-L1-negativer ( $<1\%$ ) und -positiver ( $1-100\%$ ) Fälle für die unterschiedlichen Tumorstadien (pT1a, pT1b, pT1c, pT2a, pT2b, pT2c, pT3, pT4), Tumormanifestationen

(Primärtumor, Metastase eines primären Lungenkarzinoms), Tumortypen (ADC, SQC), und Tumordifferenzierungsgrade (G1, G2, G3, G4) bestimmt.

Von jeweils zehn zufälligen zytologischen und histologischen Proben wurde die Anzahl der Tumorzellen pro Gesichtsfeld ermittelt. Die Auswahl der analysierten Gesichtsfelder erfolgte anhand einer Schablone zur exakten Markierung der auszuwertenden Bereiche auf den Objektträgern. Darauf folgte die Auszählung der Tumorzellen unter 630facher Vergrößerung innerhalb der markierten Bereiche für jenes Gesichtsfeld mit der größten Anzahl an Tumorzellen. Die hierfür genutzten Schablonen und Beispiele sind in Abbildung 6 illustriert.

Für die zytologischen Proben wurden stets 15 identische Bereiche am unteren Bereich des Objektträgers gewählt, da hier in der Regel das meiste Material vorliegt (Abbildung 6a und c). Da die histologischen Gewebeschnitte an variablen Stellen auf dem Objektträger aufgetragen werden, materialfreie Bereiche dazwischen entstehen und die Schnitte unterschiedlich groß sind, fiel die Wahl des auszuwertenden Bereichs bei diesen Präparaten auf ein möglichst großes diagnostisch relevantes Areal des Resektats. Materialfreie Regionen blieben bei der Analyse unbeachtet. Kleine histologische Schnittpräparate mit weniger als fünf auswertbaren Bereichen wurden von der Auswertung ausgeschlossen (Abbildung 6, b und c).



**Abbildung 6: Auswertung der Tumorzellzahl.** Dargestellt sind die verwendeten Schablonen zur Auswahl der Bereiche, in welchen das Gesichtsfeld bei 630facher Vergrößerung mit den meisten enthaltenen Tumorzellen analysiert wurde. **a)** Schablone für zytologische Präparate. Es wurde stets der untere Bereich des Objektträgers ausgewertet, da hier in der Regel das meiste Material vorliegt. **b)** Schablone für histologische Präparaten. Von der Schablone wurden jene Bereiche gewählt (mindestens fünf), bei welchen das meiste Material des Schnitts abgedeckt wurde. Bereiche ohne Material wurden nicht in die Bewertung eingeschlossen. Es wurden nur jene Proben einbezogen, bei denen mindestens fünf Bereiche ausgewertet werden konnten. **c)** Beispiel eines ausgewerteten zytologischen Präparats nach der Markierung der auszuwertenden Bereiche. **d)** Beispiel eines ausgewerteten histologischen Präparats nach der Markierung der auszuwertenden Bereiche

## 2.5 Statistik

Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Programm IBM® SPSS® Version 21. Alle statistischen Untersuchungen wurden selbstständig durchgeführt. Die Auswertungen beziehen sich auf ein Signifikanzniveau  $\alpha$  von 0,05, also auf ein Konfidenzintervall (CI) von 95%. Gemäß der Hypothese basieren alle Auswertungen auf zweiseitigen Tests. Zudem wurde jeder Fall für die statistische Auswertung als unabhängig von den anderen betrachtet. Darin eingeschlossen sind 13 Fälle von sechs Patienten mit zwei oder drei untersuchten Proben. Alle Analysen fanden unter der Voraussetzung für nichtparametrische Daten statt, da es sich jeweils nur um eine zytologische beziehungsweise eine histologische Probe handelt und unterschiedlich viele ADC und SQC vorlagen.

Die Bestimmung der Interrater-Variabilität basiert auf einer Reliabilitätsanalyse. Dafür wurde eine deskriptive Statistik der Exaktwerte (<1%, 1%, 5%, 10%, 20%, ... 100%) mit den Bewertern als Item, dem Konsistenz-Typ und dem zweifach gemischten Modell durchgeführt. Diese Analyse entspricht dem gemischten Zwei-Weg-Effekt, bei dem die Personeneffekte zufällig und die Maßeffekte fest sind ( $ICC_{3,1}$ ). Diese Analyseneigenschaften wurden gewählt, da es sich um mehr als zwei unabhängige Bewerter handelte, die mehrere Beobachtungsobjekte in Form von intervallskalierten Daten bewerteten und deren Einzelwerte justiert miteinander verglichen werden sollten. Zusätzlich schloss sich die Ermittlung einer Inter-Item-Korrelationsmatrix der Bewerter an, in welcher die Ergebnisse zwischen den drei Bewertern jeweils paarweise gegenübergestellt sind. Diese Matrix begründet sich in einer Reliabilitätsanalyse anhand von Cronbachs  $\alpha$ .

Die Bestimmung möglicher signifikanter Unterschiede in den Häufigkeiten der Expressionsraten als Exaktwerte erfolgte anhand des Wilcoxon-Rangsummentests, da es sich um nichtparametrische Daten, ein verbundenes Studiendesign (Proben des gleichen Patienten) und zwei Untersuchungsgruppen (Zytologie und Histologie) handelt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede in den Häufigkeiten der Expressionsrate als TPS erfolgte aufgrund der gleichen Gründe wie für die Exaktwerte mit dem Wilcoxon-Rangsummentest. Bei den Ergebnissen des Wilcoxon-Rangsummentests handelt es sich um exakte Signifikanzen. Signifikante Unterschiede im Probenalter wurden anhand des Kruskal-Wallis-Tests ermittelt, da es sich mit vier Freiheitsgraden (2013, 2014, 2015, 2016, 2017) um mehr als zwei unverbundene Gruppen handelt.

Die Prüfung auf signifikante Unterschiede in der PD-L1-Expression zwischen den Probenentnahmen verschiedener Tumormanifestationen (Primärtumor versus Metastase)

oder dem Tumortyp (ADC versus SQC) basiert auf dem Mann-Whitney-U-Test, da es sich jeweils um zwei unverbundene Gruppen (Primärtumor versus Metastase, beziehungsweise ADC versus SQC) handelt. Die Signifikanzanalyse auf Unterschiede in der PD-L1-Expression zwischen verschiedenen Tumorstadien beziehungsweise zwischen mehreren Differenzierungsgraden wurde aufgrund von sechs (pT1a, pT1b, pT1c, pT2a, pT2b, pT3, pT4) beziehungsweise zwei (G1, G2, G3) Freiheitsgraden anhand des Kruskal-Wallis-Tests ermittelt.

Aus den Tumorzellzahlen wurde zunächst für jede Probe der Mittelwert ermittelt. Anhand dieser Werte erfolgte anschließend jeweils getrennt für Zytologie und Histologie die Bestimmung des Medians als mittlere Tumorzellzahl pro Gesichtsfeld bei 630facher Vergrößerung, da nur jeweils zehn Proben vorlagen. Angesichts zwei unabhängiger Variablen (Zytologie, Histologie) fand die Prüfung auf signifikante Unterschiede mittels Mann-Whitney-U-Tests statt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Tumorzellzahlen in zyto- und histologischen Präparaten

Die Tumorzellzahlen in zytologischen und histologischen Präparaten basieren jeweils auf der mittleren Anzahl an Tumorzellen pro Gesichtsfeld bei 630facher Vergrößerung. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt. In den zytologischen Proben finden sich im Mittel 41 Tumorzellen pro Gesichtsfeld und in der Histologie im Mittel 30 Tumorzellen. Hierbei liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen Zyto- und Histologie vor (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig;  $n_{\text{Zytologie}} = 10$ ,  $n_{\text{Histologie}} = 10$ ;  $U = 48,000$ , Standardfehler: 13,229,  $p = 0,912$ ).

**Tabelle 4: Tumorzellzahl in Zyto- und Histologie.** Dargestellt sind die durchschnittlichen Tumorzellzahlen der ausgezählten Gesichtsfelder bei 630facher Vergrößerung in jeweils zehn zytologischen und histologischen Proben sowie dessen mittlerer Wert als Median. Statistik: Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig;  $n_{\text{Zytologie}} = 10$ ,  $n_{\text{Histologie}} = 10$

Probe	Tumorzellzahl pro Gesichtsfeld	
	Zytologie	Histologie
1	154	29
2	60	332
3	6	56
4	7	40
5	11	19
6	105	12
7	49	23
8	13	57
9	39	31
10	43	5
Median	41	30
p-Wert	0,912	

### 3.2 Interrater-Variabilität

Die Interrater-Variabilität fungiert als Maß der Abweichung zwischen den Einzelergebnissen der drei Bewerter. Der Intraklassenkoeffizient (ICC) liegt für die Zytologie bei 0,90 (ICC<sub>3,1</sub>, n = 247, Cronbachs Alpha 0,964, 3 Items, CI 95%) und für die Histologie bei 0,95 (ICC<sub>3,1</sub>, n = 247, Cronbachs Alpha 0,983, 3 Items, CI 95%), wobei 1 eine vollkommene Übereinstimmung repräsentiert.

Zusätzlich wurde eine Inter-Item-Korrelationsmatrix für den paarweisen Vergleich der Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der drei einzelnen Bewerter aufgestellt (Tabelle 5). Diese Analyse ergibt für den Vergleich zwischen Bewerter 1 und Bewerter 2 in den zytologischen Ausstrichen eine Korrelation von 0,881 und in den histologischen Präparaten von 0,948. Beim Vergleich der Ergebnisse zwischen Bewerter 1 und Bewerter 3 liegt die Korrelation in der Zytologie bei 0,910 und in der Histologie bei 0,959. Bei der Gegenüberstellung der Resultate von Bewerter 2 und Bewerter 3 liegen die Korrelation der zytologischen Ausstriche bei 0,915 und die der histologischen Präparate bei 0,945.

Insgesamt liegt mit einem ICC von 0,90-0,95 eine hohe Übereinstimmung zwischen allen Bewertern, sowie mit 0,881-0,959 beim paarweisen Vergleich der einzelnen Bewerter vor.

**Tabelle 5: Inter-Item-Korrelationsmatrix zwischen den Bewertern.** Ermittlung der Korrelation zwischen den Ergebnissen der drei Bewerter (Bewerter 1-3 für zytologische (unten) und histologische (oben) Proben. Z = Zytologie, H = Histologie. Statistik: Reliabilitätsanalyse, Cronbachs  $\alpha$ , Inter-Item-Korrelation,  $n_{\text{Items}} = 3$

<b>Z</b> \ <b>H</b>	<b>Bewerter 1</b>	<b>Bewerter 2</b>	<b>Bewerter 3</b>
<b>Bewerter 1</b>		0,948	0,959
<b>Bewerter 2</b>	0,881		0,954
<b>Bewerter 3</b>	0,910	0,915	

### 3.3 Expressionsraten

#### 3.3.1 Expressionsraten als Exaktwerte

Die von den drei Bewertern ermittelten Expressionsraten sind in Tabelle 15 aufgelistet (Anhang, S. 88ff.). Die Häufigkeiten der medianen PD-L1-Expressionsraten der Exaktwerte sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Die Mehrzahl der 153 ADC ist in den zytologischen ( $n = 132$ , 86%) und histologischen ( $n = 123$ , 84%) Proben negativ (PD-L1-Positivität  $<1\%$ ). Auch von den 93 untersuchten SQC ist mit 61 (65%) der zytologischen und mit 76 (81%) der histologischen Präparate die Mehrzahl der Fälle PD-L1-negativ. Eine PD-L1-Expressionsrate von 1% tritt in der Zytologie in 9 Fällen (6%) bei den ADC und in 14 Fällen (15%) bei SQC auf. Insgesamt weisen somit 23 zytologische Fälle (9%) eine PD-L1-Positivität von 1% auf. In der Histologie zeigen 2 Fälle (1%) bei den ADC und 4 Fälle (4%) bei den SQC eine Expressionsrate von 1%. In der Histologie ergeben sich somit insgesamt 6 Fälle (2%) mit einer PD-L1-Expression von 1%. In Zyto- und Histologie weisen je 7 Fälle (3%) eine Expressionsrate von 5% auf.

Höhere Expressionsraten von 10-100% treten in Zyto- und Histologie bei ADC und SQC jeweils in 0-4% aller Fälle auf (Tabelle 6). Es finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen zytologischen und histologischen Proben bei den ADC (Wilcoxon-Rangsummentest; zweiseitig,  $n = 153$ ,  $Z = -1,557$ ,  $p = 0,122$ ), den SQC (Wilcoxon-Rangsummentest; zweiseitig,  $n = 94$ ,  $Z = -0,570$ ,  $p = 0,573$ ) oder gesamt (Wilcoxon-Rangsummentest; zweiseitig,  $n = 94$ ,  $Z = -0,748$ ,  $p = 0,458$ ).

Insgesamt sind mit 78-83% die meisten Fälle PD-L1-negativ (PD-L1-Positivität  $<1\%$ ) und nur 17-22% sind positiv (PD-L1-Positivität 1-100%). Hierbei treten weder bei den ADC oder den SQC noch insgesamt signifikante Unterschiede in der Verteilung der PD-L1-Expression zwischen Zyto- und Histologie auf.

**Tabelle 6: Verteilung der medianen PD-L1-Expressionsraten der Exaktwerte.** Dargestellt sind die PD-L1-Expressionsraten von ADC (n = 153), SQC (n = 94) und gesamt (n = 247) als Exaktwerte für zytologische und histologische Proben. ADC = Adenokarzinom, SQC = Plattenepithelkarzinom, Z = Zytologie, H = Histologie, PD-L1 = programmed cell death ligand 1, n = Anzahl. Statistik: Wilcoxon-Rangsummentest; zweiseitig, n<sub>ADC</sub> = 153, n<sub>SQC</sub> = 94, n<sub>Gesamt</sub> = 247

PD-L1	ADC (n (%))		SQC (n (%))		Gesamt (n (%))	
	Z	H	Z	H	Z	H
<1%	132 (86)	129 (84)	61 (65)	76 (81)	193 (78)	205 (83)
1%	9 (6)	2 (1)	14 (15)	4 (4)	23 (9)	6 (2)
5%	1 (1)	3 (2)	6 (6)	4 (4)	7 (3)	7 (3)
10%	1 (1)	3 (2)	4 (4)	1 (1)	5 (2)	4 (2)
20%	1 (1)	4 (3)	3 (3)	2 (2)	4 (1)	6 (2)
30%	3 (2)	3 (2)	0 (0)	0 (0)	3 (1)	3 (1)
40%	3 (2)	2 (1)	1 (1)	2 (2)	4 (2)	4 (2)
50%	0 (0)	1 (1)	1 (1)	3 (3)	1 (<1)	4 (2)
60%	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	1 (<1)	1 (<1)
70%	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (<1)	0 (0)
80%	3 (2)	3 (2)	2 (2)	2 (2)	5 (2)	5 (2)
90%	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (<1)
100%	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (<1)
<b>n</b>	<b>153</b>		<b>94</b>		<b>247</b>	
<b>p-Wert</b>	0,122		0,573		0,458	



### 3.3.2 Expressionsraten als TPS

Die Ergebnisse des TPS (<1%, 1-49%, ≥50%) für jeden Fall basieren auf den einzelnen Ergebnissen der drei Bewerter (Tabelle 15, Anhang, S. 88ff.). An diesen Werten erfolgte die Berechnung der mittleren Expressionsrate als Median. Die so erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7 insgesamt, sowie jeweils für ADC und SQC für Zytologie und Histologie aufgelistet.

Die PD-L1-Expressionsraten der 153 ADC liegen bei den zytologischen Proben in 132 Fällen (86%) bei <1%, in 18 Fällen (12%) bei 1-49% und in 3 Fällen (2%) bei ≥50%. Von den histologischen Proben der ADC wurden 129 (84%) mit <1%, 17 (11%) mit 1-49% und 7 (5%) mit ≥50% bewertet. Zwischen der zytologischen und histologischen Analyse der ADC treten keine signifikanten Unterschiede auf (Wilcoxon-Rangsummentest; zweiseitig, n = 153, Z = -1,100, p = 0,283).

Die PD-L1 Expressionsrate der 94 SQC liegt zytologisch in 61 Fällen (65%) bei <1%, in 28 Fällen (30%) bei 1-49% und in 5 Fällen (5%) bei ≥50%. In der Histologie sind 76 Proben (81%) mit <1%, 13 Proben (14%) mit 1-49% und 5 Proben (5%) mit ≥50% nachweisbar. Zwischen Zyto- und Histologie liegen keine signifikanten Unterschiede vor (Wilcoxon-Rangsummentest; zweiseitig, n = 94, Z = -1,969, p = 0,053).

Unter den insgesamt 247 Fällen fanden sich in den zytologischen Proben 193 (78%) mit einer PD-L1-Expressionsrate von <1%, 46 (19%) mit 1-49% und 8 (3%) mit ≥50%. In der Histologie treten 205 Fälle (83%) mit <1%, 30 Fälle (12%) mit 1-49% und 12 Fälle (5%) mit ≥50% Expressionsrate auf (Tabelle 7). Unter Einbezug aller Proben finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den zytologischen und histologischen Proben (Wilcoxon-Rangsummentest; zweiseitig, n = 247, Z = -0,729, p = 0,476).

Insgesamt ist mit 78-83% ein Großteil der Proben PD-L1-negativ (PD-L1-Positivität <1%), 12-19% sind intermediär positiv (PD-L1-Positivität 1-49%) und nur 3-5% sind hoch positiv (PD-L1-Positivität ≥50%). Bezogen auf den TPS unterscheidet sich die PD-L1-Expression in zytologischen Proben nicht signifikant von der PD-L1-Expression in histologischen Schnittpräparaten.

**Tabelle 7: Verteilung der medianen PD-L1-Expressionsraten des TPS.** Dargestellt sind die PD-L1-Expressionsraten für die einzelnen TPS (<1%, 1-49%, ≥50%) in Zytologie und Histologie jeweils für ADC (n = 153), SQC (n = 94) und gesamt (n = 247). TPS = Tumorproportions-Score, ADC = Adenokarzinom, SQC = Plattenepithelkarzinom, Z = Zytologie, H = Histologie, PD-L1 = programmed cell death ligand 1, n = Anzahl. Statistik: Wilcoxon-Rangsummentest; zweiseitig, n<sub>ADC</sub> = 153, n<sub>SQC</sub> = 94, n<sub>Gesamt</sub> = 247

PD-L1	ADC (n (%))		SQC (n (%))		Gesamt (n (%))	
	Z	H	Z	H	Z	H
<1%	132 (86)	129 (84)	61 (65)	76 (81)	193 (78)	205 (83)
1-49%	18 (12)	17 (11)	28 (30)	13 (14)	46 (19)	30 (12)
≥50%	3 (2)	7 (5)	5 (5)	5 (5)	8 (3)	12 (5)
<b>n</b>	<b>153</b>		<b>94</b>		<b>247</b>	
<b>p-Wert</b>	0,283		0,053		0,476	

### 3.3.3 Expressionsraten nach Probenalter

Aus den medianen Werten aller Proben eines Jahres (2013-2017) wurden die durchschnittlichen Expressionsraten als Mittelwert berechnet. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die durchschnittliche Expressionsrate der zytologischen Proben liegt in 2013 bei 1%, in 2014 bei 6%, in 2015 bei 3%, in 2016 bei 2% und in 2017 bei 10%. Hierbei ergibt sich ein signifikanter Unterschied in der Expressionsrate zwischen den Proben aus den unterschiedlichen Jahren (Kruskall-Wallis-Test, zweiseitig; n = 247; Teststatistik: 15,245; Freiheitsgrade = 4; p = 0,00).

Die durchschnittliche Expressionsrate der histologischen Proben liegt in 2013 bei 6%, in 2014 bei 3%, in 2015 bei 5%, in 2016 bei 6% und in 2017 bei 6%. Hierbei tritt kein signifikanter Unterschied in der Expressionsrate zwischen den unterschiedlichen Jahren auf (Kruskall-Wallis-Test, zweiseitig; n = 247; Teststatistik: 3,317; Freiheitsgrade = 4; p = 0,506).

Insgesamt ist nur in den zytologischen Proben eine signifikant unterschiedliche durchschnittliche Expressionsrate in den verschiedenen Jahren nachweisbar.

**Tabelle 8: PD-L1-Expression in verschiedenen Probenaltern.** Die durchschnittliche Expressionsrate wurde als prozentualer Mittelwert jeweils in Zytologie und Histologie für die Proben aus den Jahren 2013-2017 ermittelt. n = Anzhl, Z = Zytologie, H = Histologie. Statistik: Kruskal-Wallis-Test, zweiseitig; n = 247; Freiheitsgrade = 4. PD-L1 = *programmed cell death-ligand 1*

PD-L1	Mittlere Expressionsrate					p-Wert	
	2013	2014	2015	2016	2017	Z	H
<b>Gesamt</b>						0,004	0,506
<b>Z</b>	1%	6%	3%	2%	10%		
<b>H</b>	6%	3%	5%	6%	6%		
<b>n</b>	<b>24</b>	<b>20</b>	<b>82</b>	<b>76</b>	<b>45</b>		

### 3.4 Tumormerkmale

#### 3.4.1 Tumorstadium

Das Untersuchungsgut setzt sich aus 198 Primärtumoren (80%) und 49 Metastasen (20%) primärer Lungentumoren zusammen, davon sind 29 LK-Metastasen (59%) und 20 Pleurakarzinosen (41%). Die Tumorstadien der Primärtumoren verteilen sich wie folgend: 19 pT1a (10%), 59 pT1b (30%), 48 pT1c (24%), 38 pT2a (19%), 5 pT2b (3%), 0 pT2c (0%), 15 pT3 (8%) und 14 pT4 (7%) (Tabelle 9).

In den zytologischen Proben sind 150 Fälle (76%) PD-L1-negativ und 48 Fälle (24%) positiv (Tabelle 9). Die meisten PD-L1-positiven Proben finden sich mit 26 Fällen (23%) bei pT1a-c und 12 Fällen (6%) bei pT2a-c. In höheren Tumorstadien (pT3-pT4) liegt die PD-L1-Positivität bei 2-3%. Der Vergleich der zytologisch bestimmten PD-L1-Expression zeigt weder bei den Exaktwerten (Kruskal-Wallis-Test, zweiseitig; n = 199; Teststatistik: 9,868; Freiheitsgrade = 6; p = 0,130) noch beim TPS (Kruskal-Wallis-Test, zweiseitig; n = 199; Teststatistik: 4,837; Freiheitsgrade = 6; p = 0,565) signifikante Unterschiede zwischen den Tumorstadien (Tabelle 9).

Unter den histologischen Schnittpräparaten sind 166 Fälle (84%) PD-L1-negativ und 32 Fälle (16%) PD-L1-positiv (Tabelle 12). Die meisten PD-L1-positiven Proben finden sich mit 20 Fällen (10%) bei pT1a-c und 8 Fällen (4%) bei pT2a-c. Für höhere Tumorstadien liegt die PD-L1-Positivität bei jeweils 1%. Die histologischen Analysen der PD-L1-Expression zwischen verschiedenen Tumorstadien zeigen weder bei den Exaktwerten

(Kruskall-Wallis-Test, zweiseitig;  $n = 199$ ; Teststatistik: 5,022; Freiheitsgrade = 6;  $p = 0,541$ ) noch beim TPS (Kruskall-Wallis-Test, zweiseitig;  $n = 199$ ; Teststatistik: 5,389; Freiheitsgrade = 6;  $p = 0,495$ ) signifikante Unterschiede.

Die PD-L1-Expressionsraten in den zytologischen Proben und histologischen Schnittpräparaten ergeben weder für die Exaktwerte noch für den TPS signifikante Unterschiede zwischen den Tumorstadien.

**Tabelle 9: PD-L1-Expression in verschiedenen Tumorstadien.** Dargestellt sind die PD-L1-negativen (<1%) und -positiven (1-100%) Fälle der verschiedenen Tumorstadien (pT1a-c, pT2a-c, pT3, pT4) von 198 Primärtumoren in Zyto- und Histologie. PD-L1 = *programmed cell death-ligand 1*, pT = postoperatives Tumorstadium, Z = Zytologie, H = Histologie, TPS = Tumorproportions-Score, n = Anzahl. Statistik: Kruskall-Wallis-Test, zweiseitig;  $n = 198$ ; Freiheitsgrade = 6

PD-L1	Tumorstadium (n (%))					p-Wert	
	pT1a-c	pT2a-c	pT3	pT4	Gesamt	Exakt	TPS
<b>Z</b>						0,130	0,565
<1%	100 (51)	31 (16)	9 (5)	10 (5)	150 (76)		
≥1%	26 (13)	12 (6)	6 (3)	4 (2)	48 (24)		
<b>H</b>						0,541	0,495
<1%	106 (54)	35 (18)	13 (6)	12 (6)	166 (84)		
≥1%	20 (10)	8 (4)	2 (1)	2 (1)	32 (16)		
<b>n</b>	<b>126</b>	<b>43</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>198</b>		

### 3.4.2 Tumormanifestation

Für die Untersuchung der PD-L1-Expression zwischen den Probenentnahmen unterschiedlicher Tumormanifestationen, wurden die Anzahl und der Anteil PD-L1-negativer (<1%) und -positiver (1-100%) Befunde in Primärtumoren und in Metastasen primärer Lungenkarzinome bestimmt. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 10 aufgeführt. In der Auswertung der zytologischen Proben finden sich 150 (76%) PD-L1-negative und 48 (24%) -positive Primärtumoren, sowie 43 (88%) PD-L1-negative und 6 (12%) -positive Metastasen (Tabelle 10).

Weder bei den Exaktwerten (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig;  $n_{\text{Primärtumor}} = 198$ ,  $n_{\text{Metastase}} = 49$ ;  $U = 4.249$ , Standardfehler: 323,546,  $p = 0,063$ ) noch beim TPS (Mann-

Whitney-U-Test, zweiseitig;  $n_{\text{Primärtumor}} = 198$ ,  $n_{\text{Metastase}} = 49$ ;  $U = 4.245$ , Standardfehler: 321,794,  $p = 0,060$ ) sind signifikante Unterschiede in der PD-L1-Expressionsrate von Primärtumoren oder Metastasen primärer Lungenkarzinome erkennbar.

Die histologische Auswertung ergibt 166 (84%) PD-L1-negative und 32 (16%) -positive Befunde in Primärtumoren, sowie 39 (80%) PD-L1-negative und 10 (20%) -positive Befunde in Metastasen (Tabelle 10). Auch hier unterscheiden sich weder die Exaktwerte (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig;  $n_{\text{Primärtumor}} = 198$ ,  $n_{\text{Metastase}} = 49$ ;  $U = 5.139$ , Standardfehler: 293,025,  $p = 0,326$ ) noch der TPS (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig;  $n_{\text{Primärtumor}} = 198$ ,  $n_{\text{Metastase}} = 49$ ;  $U = 5.102$ , Standardfehler: 292,397,  $p = 0,391$ ) hinsichtlich der PD-L1-Expressionsrate in Primärtumoren und Metastasen signifikant voneinander.

Insgesamt gibt es in der PD-L1-Expressionsrate von Proben primärer Lungentumoren und Metastasen primärer Lungenkarzinome keine signifikanten Unterschiede.

**Tabelle 10: PD-L1-Expression in Primärtumoren und Metastasen.** Dargestellt sind die PD-L1-negativen (<1%) und -positiven (1-100%) Fälle der Tumormanifestation (Primarius, Metastase) in Zyto- und Histologie. Primarius = Primärtumor, Z = Zytologie, H = Histologie, TPS = Tumorproportions-Score, PD-L1 = *programmed cell death-ligand 1*, n = Anzahl, Exakt = Exaktwerte, TPS = Tumor-Proportionsscore. Statistik: Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig;  $n_{\text{Primärtumor}} = 198$ ,  $n_{\text{Metastase}} = 49$

PD-L1	Tumormanifestation (n (%))			p-Wert	
	Primarius	Metastase	Gesamt	Exakt	TPS
<b>Z</b>				0,063	0,060
<1%	150 (76)	43 (88)	193 (78)		
≥1%	48 (24)	6 (12%)	54 (22)		
<b>H</b>				0,326	0,391
<1%	166 (84)	39 (80)	205 (83)		
≥1%	32 (16)	10 (20)	42 (17)		
<b>n</b>	<b>198</b>	<b>49</b>	<b>247</b>		

### 3.4.3 Tumortyp und -differenzierungsgrad

Anhand der ermittelten medianen Exaktwerte beziehungsweise der medianen TPS der PD-L1-Expression (Tabelle 15, Anhang, S. 88ff.) wurde die Anzahl der negativen (<1%) und positiven (1-100%) Fälle in Zyto- und Histologie für ADC und SQC bestimmt. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Die zytologische Analyse zeigt 132 (86%) PD-L1-negative und 21 (14%) -positive ADC, sowie 61 (65%) negative und 33 (35%) positive SQC (Tabelle 11). Hierbei sind sowohl anhand der einzelnen Exaktwerte (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig;  $n_{ADC} = 153$ ,  $n_{SQC} = 94$ ;  $U = 8.688$ , Standardfehler: 393,9236,  $p < 0,000$ ) als auch anhand des TPS (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig;  $n_{ADC} = 153$ ,  $n_{SQC} = 94$ ;  $U = 8.731$ , Standardfehler: 391,794,  $p < 0,000$ ) signifikante Unterschiede in der Expressionsrate zwischen ADC und SQC erkennbar. Anhand der zytologischen Proben sind bei den SQC also signifikant mehr PD-L1-positive Fälle nachweisbar als bei den ADC.

Die Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate anhand der histologischen Proben zeigt 126 (84%) negative und 24 (16%) positive ADC, sowie 76 (81%) negative und 18 (19%) positive SQC. Hierbei treten weder in der Analyse der einzelnen Exaktwerte (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig;  $n_{ADC} = 153$ ,  $n_{SQC} = 94$ ;  $U = 7.394$ , Standardfehler: 356,766,  $p = 0,569$ ) noch des TPS (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig;  $n_{ADC} = 153$ ,  $n_{SQC} = 94$ ;  $U = 7.437$ , Standardfehler: 356,002,  $p = 0,490$ ) signifikante Unterschiede in der Expressionsrate zwischen ADC und SQC auf.

Insgesamt liegen nur in der zytologischen Analyse anhand der Exaktwerte und des TPS signifikante Unterschiede in der PD-L1-Expression zwischen ADC und SQC vor.

**Tabelle 11: PD-L1-Expression in ADC und SQC.** Dargestellt sind die PD-L1-negativen (<1%) und –positiven (1-100%) Fälle der verschiedenen Tumortypen (ADC, SQC) in Zyto- und Histologie. ADC = Adenokarzinom, SQC = Plattenepithelkarzinom, Z = Zytologie, H = Histologie, Exakt = Exaktwerte, TPS = Tumor-Proportionscore, PD-L1 = *programmed cell death-ligand 1*, n = Anzahl. Statistik: Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig;  $n_{ADC} = 153$ ,  $n_{SQC} = 94$

PD-L1	Tumortyp (n (%))			p-Wert	
	ADC	SQC	Gesamt	Exakt	TPS
<b>Z</b>				<0,000	<0,000
<1%	132 (86)	61 (65)	193 (78)		
≥1%	21 (14)	33 (35)	54 (22)		
<b>H</b>				0,569	0,490
<1%	129 (84)	76 (81)	205 (83)		
≥1%	24 (16)	18 (19)	42 (17)		
<b>n</b>	<b>153</b>	<b>94</b>	<b>247</b>		

Die in dieser Arbeit untersuchten 198 Primärtumoren (80%) weisen folgende Differenzierungsgrade auf: 5 G1 (3%), 89 G2 (45%), 104 G3 (53%) und keine G4 (0%) (Tabelle 12). In den zytologischen Proben sind 150 Fälle (76%) PD-L1-negativ, davon 4 Fälle (2%) mit G1, 74 Fälle (37%) mit G2 und 72 Fälle (36%) mit G3. Von den 48 PD-L1-positiven Fällen (24%) liegen ein Fall (1%) bei G1, 15 Fälle (8%) bei G2 und 32 Fälle (16%) bei G3. Die zytologisch ermittelte PD-L1-Expression unterscheidet sich weder bei den Exaktwerten (Kruskall-Wallis-Test, zweiseitig;  $n = 199$ ; Teststatistik: 4,907; Freiheitsgrade = 2;  $p = 0,086$ ) noch beim TPS (Kruskall-Wallis-Test, zweiseitig;  $n = 199$ ; Teststatistik: 5,338; Freiheitsgrade = 2;  $p = 0,069$ ) zwischen den verschiedenen Differenzierungsgraden.

Von den histologischen Präparaten sind 166 (84%) PD-L1-negativ und 32 (16%) positiv. Die negativen Fälle teilen sich in 5 G1 (3%), 77 G2 (39%) und 84 G3 (42%) (Tabelle 12). Unter den histologischen Proben sind 12 (6%) G2 Tumoren und 20 (10%) G3 Tumoren PD-L1-positiv. Die histologisch untersuchten Proben zeigen weder bei der Analyse der Exaktwerte (Kruskall-Wallis-Test, zweiseitig;  $n = 199$ ; Teststatistik: 2,225; Freiheitsgrade = 2;  $p = 0,329$ ) noch des TPS (Kruskall-Wallis-Test, zweiseitig;  $n = 199$ ;

Teststatistik: 2,222; Freiheitsgrade = 2;  $p = 0,329$ ) signifikante Unterschiede in der PD-L1-Expression zwischen den verschiedenen Differenzierungsstadien (Tabelle 12).

Insgesamt weisen weder zytologische Proben noch histologische Schnittpräparate verschiedener Differenzierungsgrade signifikante Unterschiede in der PD-L1-Expression auf.

**Tabelle 12: PD-L1-Expression in verschiedenen Differenzierungsgraden.** Dargestellt sind die PD-L1-negativen (<1%) und -positiven (1-100%) Fälle der verschiedenen Tumordifferenzierungsgrade (G1, G2, G3, G4) von 198 Primärtumoren in Zyto- und Histologie. pT = postoperatives Tumorstadium, Z = Zytologie, H = Histologie, TPS = Tumorproportions-Score, G = Tumordifferenzierungsgrad, n = Anzahl. Statistik: Kruskal-Wallis-Test, zweiseitig;  $n = 198$ ; Freiheitsgrade = 2

PD-L1	Tumordifferenzierungsgrad (n (%))				p-Wert	
	G1	G2	G3	Gesamt	Exakt	TPS
<b>Z</b>					0,086	0,069
<1%	4 (2)	74 (37)	72 (36)	150 (76)		
≥1%	1 (1)	15 (8)	32 (16)	48 (24)		
<b>H</b>					0,329	0,329
<1%	5 (3)	77 (39)	84 (42)	166 (84)		
≥1%	0 (0)	12 (6)	20 (10)	32 (16)		
<b>n</b>	<b>5</b>	<b>89</b>	<b>104</b>	<b>198</b>		

### 3.5 Konkordanzen

#### 3.5.1 Konkordanzen der Exaktwerte

Für jede Probe wurde die PD-L1-Expression von drei Bewertern in den Raten <1%, 1%, 5%, 10%, 20%, ... 100% bewertet und daraus der mediane Wert als Ergebnis jedes Falls bestimmt. Anhand dieser medianen Werte erfolgte die Berechnung der Konkordanz (Übereinstimmung) zwischen den gepaarten zytologischen und histologischen Proben.

Die Ermittlung der Konkordanz erfolgte zunächst mit den genauen medianen Werten zwischen Zyto- und Histologie ohne jegliche erlaubte Abweichungen ( $\Delta 0$ ). Eine solche Konkordanz fand sich bei 125 (82%) ADC und 52 (55%) SQC. Dies entspricht insgesamt 177 Fällen (72%) (Tabelle 13). Anschließend schloss sich eine Berechnung der



Konkordanz zwischen Zyto- und Histologie mit einer erlaubten Abweichung von 10 ( $\Delta 10$ ) an. Unter diesen Voraussetzungen sind 131 Fälle (86%) der ADC und 75 Fälle (80%) der SQC konkordant. Somit liegt insgesamt in 206 Fällen (83%) eine Konkordanz zwischen Zyto- und Histologie vor.

Insgesamt zeigt der Vergleich der Exaktwerte zwischen gepaarten zytologischen und histologischen Proben eine vollkommene Übereinstimmung ( $\Delta 0$ ) in 72% der Fälle und eine annähernde Übereinstimmung ( $\Delta 10$ ) in 83% der Fälle.

**Tabelle 13: Konkordanz der PD-1-Expression als Exaktwerte.** Aufgeführt sind die konkordanten Fälle zwischen den gepaarten zytologischen und histologischen Proben ohne Abweichung ( $\Delta 0$ ) und mit einer Abweichung von 10 ( $\Delta 10$ ). ADC = Adenokarzinom, SQC = Plattenepithelkarzinom, PD-L1 = *programmed cell death-ligand 1*, n = Anzahl

PD-L1	Abweichung (n (%))		n
	$\Delta 0$	$\Delta 10$	
ADC	125 (82)	131 (86)	153
SQC	52 (55)	75 (80)	94
Gesamt	177 (72)	206 (83)	247

### 3.5.2 Konkordanzen des TPS

Die Konkordanz des TPS repräsentiert die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen den gepaarten zytologischen und histologischen Proben. In Tabelle 14A-C sind die Konkordanzen der medianen Ergebnisse der gepaarten zytologischen und histologischen Proben für die verschiedenen TPS gegenübergestellt.

Unter den 153 ADC liegen 119 konkordante Fälle (78%) ohne PD-L1-Expression ( $<1\%$ ) und 6 konkordante Fälle (4%) mit einer intermediären Expression von 1-49% vor. Im Bereich der hohen Expressionsrate von  $\geq 50\%$  gibt es keine übereinstimmenden Fälle zwischen Zyto- und Histologie. In den übrigen rund 19% der Proben weichen Zyto- und Histologie voneinander ab (Tabelle 14A).

Von den 94 SQC sind 54 Fälle (57%) ohne PD-L1-Expression und 8 Fälle (9%) mit einer Expression von 1-49% zwischen Zyto- und Histologie konkordant. Es finden sich keine übereinstimmenden Fälle mit einer Expressionsrate von  $\geq 50\%$ . In 33% der Fälle treten unterschiedliche Ergebnisse zwischen den zytologischen und histologischen Proben auf (Tabelle 14B).

Im vorliegenden Untersuchungsgut (n = 247) liegt in 173 Fällen (70%) ohne PD-L1-Expression (<1%) und in 14 Fällen (6) mit einer Expression von 1-49% eine Konkordanz zwischen Zyto- und Histologie vor. Es treten keine konkordanten Fälle mit einer Expressionsrate von  $\geq 50\%$  auf. Insgesamt weisen 60 Fälle (24%) keine Konkordanz zwischen Zyto- und Histologie auf. Dabei liegt in 31 Fällen (13%) eine PD-L1-Expression ( $\geq 1\%$ ) in den zytologischen Proben vor, die in den histologischen Präparate nicht detektiert wurde und in 20 Fällen (8%) tritt ein umgekehrter Effekt auf (Tabelle 14C).

Insgesamt zeigt der Vergleich des TPS zwischen gepaarten zytologischen und histologischen Proben eine vollkommene Übereinstimmung in 187 Fällen (76%), von denen 173 Fälle (70%) PD-L1-negativ (<1% Positivität), 14 Fälle (6%) intermediär PD-L1-positiv (1-49% Positivität) und keine Fälle hoch positiv ( $\geq 50\%$  Positivität) sind.

**Tabelle 14: Konkordanz der PD-1-Expression als TPS.** Dargestellt ist die Konkordanz der medianen Ergebnisse als TPS zwischen den gepaarten zytologischen und histologischen Proben für ADC, SQC und gesamt. ADC = Adenokarzinom, SQC = Plattenepithelkarzinom, Z = Zytologie, H = Histologie, n = Anzahl

PD-L1	H (n (%))			n
	<1%	1-49%	$\geq 50\%$	
<b>ADC</b>				<b>153</b>
<1%	119 (78)	9 (6)	4 (3)	
<b>Z</b> 1-49%	9 (6)	6 (4)	3 (2)	
$\geq 50\%$	1 (1)	2 (1)	0 (0)	
<b>SQC</b>				<b>94</b>
<1%	54 (57)	4 (4)	3 (3)	
<b>Z</b> 1-49%	18 (19)	8 (9)	2 (2)	
$\geq 50\%$	4 (4)	1 (1)	0 (0)	
<b>Gesamt</b>				<b>247</b>
<1%	173 (70)	13 (5)	7 (3)	
<b>Z</b> 1-49%	27 (11)	14 (6)	5 (2)	
$\geq 50\%$	5 (2)	3 (1)	0 (0)	

## 4 Diskussion

### 4.1 Tumorzellzahlen in zyto- und histologischen Präparaten

Methodisch bedingt existieren zwischen zyto- und histologischen Präparaten grundsätzliche Unterschiede in der Material- und Zellverteilung. Beispiele für solche Präparate sind in Abbildung 7 aufgezeigt. Bei den histologischen Schnittpräparaten sind meist bis zu 30% eines Objektträgers mit Gewebe bedeckt. Neben Tumorzellen handelt sich dabei auch um für die PD-L1-Analyse nicht relevantes Zellmaterial des Lungenparenchyms, nekrotische Areale, Tumorstroma oder Makrophagen. Aufgrund der Schnittdicke von 2-4µm liegen die Zellen in den histologischen Schnittpräparaten einschichtig vor und bieten dadurch potenziell gute Voraussetzungen für eine gleichmäßige Anfärbung und eine valide Auswertung. Allerdings könnte dessen Fixierung mit Formalin molekulare Untersuchungen beeinflussen (Masuda *et al.*, 1999).

Für die Herstellung zytologischer Proben von resezierten Tumoren wird die entnommene Läsion entweder direkt über den Objektträger gerollt (Abtupfmaterial, Abbildung 7a) oder Material nach einem Anschnitt der Läsion von der Schnittfläche abkratzt und auf einem Objektträger ausgestrichen (Abkratzmaterial, Abbildung 7c). Weiterhin können auch Ausstrichpräparate intraoperativer FNP untersucht werden (Abbildung 7e). Bei den zytologischen Präparaten ist meist rund 80% der Fläche eines Objektträgers mit dem gewonnenen Material bedeckt. Da bei dieser Präparationstechnik bevorzugt leicht aus dem Gewebeverband ablösbare Zellen erfasst werden, weisen diese Proben vergleichsweise geringere Anteile an Tumorstroma und Bindegewebe auf.

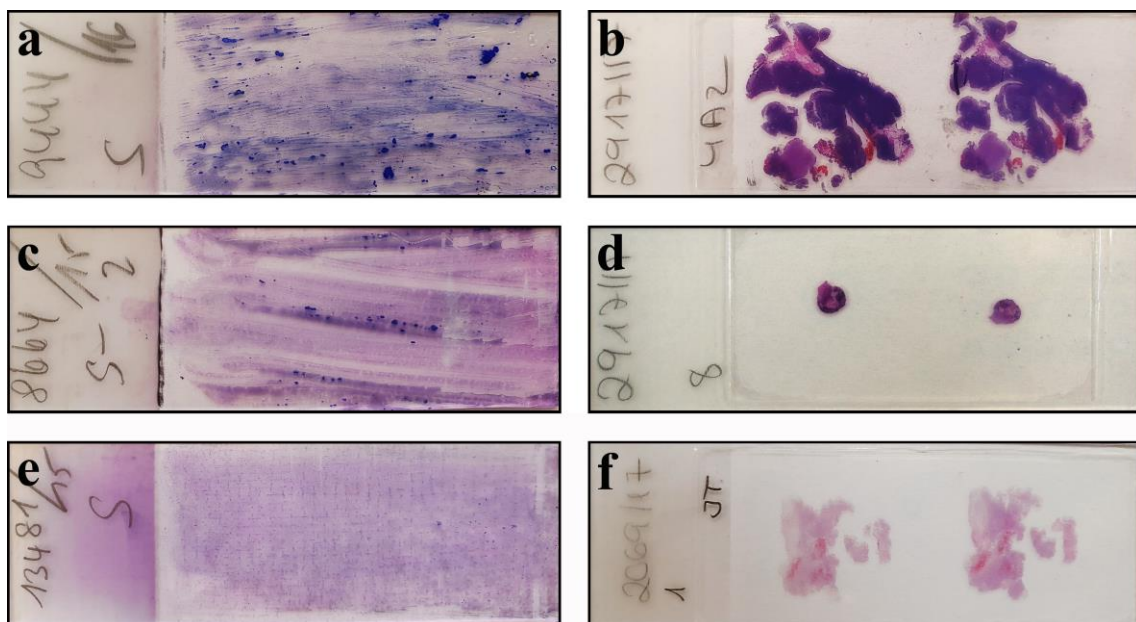
Zytologische Probenentnahmen ermöglichen also potenziell die Erfassung zahlreicher Tumorzellen für die Diagnostik und weiterführende Untersuchungen. Allerdings sollten möglichst Monolayer-Präparate unter Vermeidung von Quetsch- und Bearbeitungsartefakten hergestellt werden. Da im Prozess des Ausstreichens die zu untersuchenden Zellen überwiegend intakt bleiben, sind zytologische Präparate prinzipiell für molekularpathologische Untersuchungen und immunzytologische Anfärbungen geeignet. Zudem kann von zytologischen Proben die für molekulare Untersuchungen benötigte tumorale DNA teils in größeren Mengen und in besserer Qualität als von histologischen Proben gewonnen werden (Gailey *et al.*, 2014).

Zusätzlich können zytologische Proben höhere Tumorzellzahlen als histologische Präparate aufweisen. Mittels Endobronchialen Ultraschall (EBUS) gewonnene zytologische Aspirationspräparate sollen durchschnittlich rund 2,6-mal mehr

Tumorzellen als histologische Präparate von transbronchialen Zangenbiopsien enthalten (Sakakibara *et al.*, 2017). Dabei weisen die zytologischen Präparate weniger störende Quetschartefakte als die histologischen Proben auf (Sakakibara *et al.*, 2017). In einer aktuellen Untersuchung wiesen 92% der EBUS-FNP-Präparate über 100 Tumorzellen auf, davon 63% sogar über 500 Tumorzellen (Smith *et al.*, 2020). Die Tumorzellzahl in zyto- und histologischen Präparaten von resezierten Tumoren ist bislang nicht untersucht.

Zu diesem Zweck erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Ermittlung der Tumorzellzahlen pro Gesichtsfeld bei 630facher-Vergrößerung von ausgewählten zyto- und histologischen Proben. Hierbei fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 4). Allerdings verteilt sich das zytologische Material meist nahezu auf dem gesamten Objektträger, während die untersuchten histologischen Proben meist nur ein Achtel bis ein Drittel des Objektträgers bedecken (Abbildung 7). Aufgrund der höheren Materialmenge könnte also in zytologischen Präparaten potenziell eine größere Zahl an Gesichtsfeldern und somit auch mehr Tumorzellen beurteilt werden. Die Auswertung einer höheren Tumorzellzahl erhöht wiederum die Genauigkeit zur Bestimmung der PD-L1-Expression (Hendry *et al.*, 2020; Hernandez *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2020; Sakakibara *et al.*, 2017).

Da in der Arbeit nur ein kleiner Stichprobenumfang von je zehn Fällen hinsichtlich der vorliegenden Tumorzellzahl untersucht wurde, sollten allerdings umfangreichere Analysen zur Bestätigung dieses Sachverhalts folgen. Dennoch weist diese Auswertung auf die Möglichkeit einer quantitativ umfangreicheren Analyse von zytologischen Proben im Vergleich zu histologischen Schnittpräparaten resezierter Tumoren hin.



**Abbildung 7: Beispiele für zytologische und histologische Präparate.** Illustriert sind je ein zytologisches Abkratztupf- (a), Abtupf- (c) und FNP-Präparat (e) resezierter Lungentumoren sowie histologische Schnitte eines resezierten Lungentumors (b), eines Lymphknotens (d) und einer Pleurakarzinose (f).

## 4.2 Interrater-Variabilität

Die Interrater-Variabilität dient als Maß der Übereinstimmung mehrerer Bewerter („Rater“) derselben Proben und ermöglicht dadurch Rückschlüsse auf die Objektivität der Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit liegt der ICC für die Zytologie bei 0,90 und für die Histologie bei 0,95, während 1 eine vollkommene Übereinstimmung darstellt (siehe S.31, 4.2 Interrater-Variabilität). Der paarweise Vergleich ergibt Korrelationen von 0,881-0,959 (Tabelle 5). Diese Ergebnisse zeigen eine hohe Übereinstimmung zwischen allen sowie zwischen den einzelnen Bewertern und bestätigen dadurch die Verlässlichkeit der PD-L1-Analyse anhand zytologischer und histologischer Proben.

Auch andere Studien untersuchten den Einfluss mehrerer Bewerter auf die Verlässlichkeit der Bestimmung der PD-L1-Expression (Brunnström *et al.*, 2017; Büttner *et al.*, 2017; Esteban-Rodríguez *et al.*, 2020; Ilie *et al.*, 2015; Ilie *et al.*, 2018; Nakamura *et al.*, 2017; Neuman *et al.*, 2016; Ratcliffe *et al.*, 2017; Rehman *et al.*, 2016; Rimm *et al.*, 2017; Scheel *et al.*, 2016; Tsao *et al.*, 2018). Vor allem im Bereich geringer Expressionsraten wurden Abweichung von 20-24% in den Ergebnissen verschiedener Bewerter derselben Proben angegeben (Brunnström *et al.*, 2017; Ratcliffe *et al.*, 2017). Unabhängig davon wurden in mehreren Studien aber auch für zytologische Präparate hohe ICC von 0,78 bis 1 ermittelt (Ilie *et al.*, 2018; Russell-Goldman *et al.*, 2018; Tsao *et al.*, 2018).

In der vorliegenden Arbeit schloss die Untersuchung überwiegend Proben mit geringen Expressionsraten ein (Tabelle 6 und Tabelle 7). Für solche Positivitäten werden in anderen Studien höhere Abweichungen zwischen den Bewertern angegeben (Brunnström *et al.*, 2017; Ratcliffe *et al.*, 2017; Neuman *et al.*, 2016). Die Analyse der ICCs in der vorliegenden Arbeit zeigt dennoch hohe Übereinstimmungen zwischen den Bewertern (siehe S.31, 4.2 Interrater-Variabilität). Diese geringere Interrater-Variabilität könnte durch die hohe Erfahrung der Bewerter in der morphologischen Beurteilung, insbesondere von zytologischen Präparaten, bedingt sein.

Bislang ist der Einfluss von Training auf eine mögliche Verbesserung in den Übereinstimmungsraten jedoch nicht abschließend untersucht (Büttner *et al.*, 2017; Cooper *et al.*, 2017). Eine hohe Erfahrung in der Erkennung und Beurteilung verschiedener Zelltypen und Wachstumsmuster scheint für eine valide Analyse jedoch unerlässlich.

### 4.3 Expressionsraten

Die PD-L1-Expressionsraten der untersuchten Proben ist sowohl als Exaktwerte als auch als TPS angegeben. Aus diesen jeweiligen Einzelergebnissen der drei Bewerter folgte die Ermittlung des Medians. Diese Ergebnisse zeigen in der Zytologie 193 (78%) und in der Histologie 205 (83%) PD-L1-negative Fälle (Tabelle 6 und Tabelle 7). Weiterhin weisen zytologisch 8 Fälle (3%) und histologisch 12 Fälle (5%) eine hohe PD-L1-Expression von  $\geq 50\%$  auf (Tabelle 6 und Tabelle 7).

In anderen Studien werden für NSCLC mit 6-22% vergleichbare Anteile hoch positiver Fälle angegeben (Cooper *et al.*, 2015; Munari *et al.*, 2018b; Russel-Goldmann *et al.*, 2018; Skov und Skov, 2017; Sun *et al.*, 2016; Vigliar *et al.*, 2019), teils aber mit 24-46% auch mehr hoch positive Fälle (Capizzi *et al.*, 2018; Heymann *et al.*, 2017; Ilie *et al.*, 2018; Jain *et al.*, 2018; Munari *et al.*, 2018a; Noll *et al.*, 2018; Russel-Goldmann *et al.*, 2018; Sakakibara *et al.*, 2017; Torous *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Ye *et al.*, 2018). Ein Vergleich zu diesen Studien ist jedoch aufgrund abweichender Studiendesigns (Untersuchungsgut, Antikörper, Fixationsverfahren) und Auswertungskriterien (Grenzwerte, Einschlusskriterien) nur begrenzt möglich.

Unabhängig davon wurden in der vorliegenden Arbeit mit insgesamt 8% in der Zytologie und 12% in der Histologie vergleichbar viele bis geringfügig weniger Fälle mit hoher Positivität gefunden wie in vorherigen Studien. Die Untersuchungen erfolgten mit dem Antikörper-Klon DAKO 22C3, welcher prinzipiell eine gute Anfärbung von Tumorzellen bewirkt (Brunnström *et al.*, 2017; Büttner *et al.*, 2017; Krawczyk *et al.*, 2017; Ratcliffe *et al.*, 2017; Tsao *et al.*, 2018) und bereits in mehreren Studien zum PD-L1-Nachweis als Grundlage einer Therapie mit Pembrolizomab eingesetzt wurde (Garon *et al.*, 2015; Herbst *et al.*, 2016; Reck *et al.*, 2016). Zudem wurde DAKO 22C3 auch zur Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate an zytologischen Präparaten erfolgreich verwendet (Heymann *et al.*, 2017; Noll *et al.*, 2018; Skov und Skov, 2017; Torous *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Dieser Antikörper-Klon zeigte auch bei der automatisierten Färbung mit dem für diese Arbeit genutzten VENTANA ULTRA gute Ergebnisse (Neuman *et al.*, 2016; Sughayer *et al.*, 2018). Demnach ist die insgesamt geringe PD-L1-Expressionsrate nicht auf den Antikörper-Klon oder den genutzten Färbeautomaten zurückführbar.

Eine längerfristige Lagerung von Proben soll zu einer Abnahme der Reaktivität und damit der immunbiologischen Nachweisbarkeit von Epitopen führen (Calles *et al.*, 2015; Grillo *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2018, van der Broek und van de Vijver, 2000). Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich retrospektive Fälle eingeschlossen wurden, könnte

möglicherweise die Zeitspanne zwischen der Materialgewinnung bis zur Auswertung von ein bis fünf Jahren zu einer insgesamt geringer ermittelten Expressionsrate beigetragen haben.

In anderen Studien wird eine Abnahme der Immunoreaktivität verschiedener Epitope bei FFPE Präparaten mit der Zeit der Aufbewahrung in Abhängigkeit von der Art der Lagerung beschrieben (Calles *et al.*, 2015; Grillo *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2018). Bei den histologischen Proben in der vorliegenden Arbeit handelte es sich um frische Schnitte von Paraffinblöcken, bei welchen die Epitope am stabilsten bleiben sollen (Grillo *et al.*, 2015). Bei den hier untersuchten histologischen Proben finden sich keine signifikanten Unterschiede in der mittleren PD-L1-Expressionsrate zwischen den Präparaten der verschiedenen Jahre (Tabelle 8). Für die nativ gelagerten zytologischen Proben konnten jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Proben verschiedener Jahre nachgewiesen werden (Tabelle 8). Hierbei ergeben sich schwankende Mittelwerte mit der kleinsten Expressionsrate in 2013 und der höchsten Expressionsrate in 2017. Dies könnte auf eine Abnahme in der Nachweisbarkeit der PD-L1-Positivität bei älteren zytologischen Proben hindeuten.

Dennoch wurden keine signifikanten Unterschiede in den Häufigkeiten der unterschiedlichen Expressionsraten zwischen Zyto- und Histologie ermittelt (Tabelle 6 und Tabelle 7). Insgesamt ist die Nachweisbarkeit in beiden Methoden also gleich hoch. Zudem zeigen auch andere Studien erfolgreiche Untersuchungen der PD-L1-Expression in zytologischen Präparaten an zwei Jahre altem (Jain *et al.*, 2018), über zwei Jahre altem (Wang *et al.*, 2018) und auch an bis zu fünf Jahre altem Material (Munari *et al.*, 2019). Der geringe Anteil PD-L1-positiver Fälle in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu anderen Studien ist demnach wohl nicht oder nur geringfügig auf die Lagerung der retrospektiv untersuchten Proben zurückführbar.

Die niedrige PD-L1-Positivität könnte auch durch klinische und/oder pathologische Eigenschaften des eingeschlossenen Untersuchungsguts beeinflusst sein. So könnten bestimmte Faktoren wie Raucherstatus, Alter und Geschlecht der Patienten (Azuma *et al.*, 2014; Cooper *et al.*, 2015), Chemo-/Radiotherapie (Dovedi *et al.*, 2014; Rojkó *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2017; Sheng *et al.*, 2016) genetische Mutationen (Calles *et al.*, 2015; Krawczyk *et al.*, 2017; Okita *et al.*, 2017; Ota *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017) oder entzündliche Prozesse (Dong *et al.*, 2002; Eppihimer *et al.*, 2002; Latchman *et al.*, 2001; Mazanet und Hughes, 2002) auf die PD-L1-Expressionsrate einwirken. Diese Zusammenhänge werden in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert und teils nicht bestätigt.

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben stammen von nahezu gleich vielen Frauen ( $n = 104$ ) und Männern ( $n = 130$ ) mit einem vergleichbarem Durchschnittsalter (Frauen: 70 Jahre, Männer: 65 Jahre). Informationen bezüglich des Raucherstatus, vorheriger Therapien, begleitender Entzündungen oder genetischer Veränderungen standen für die Auswertung nicht zur Verfügung. Der Zusammenhang zwischen diesen Faktoren und der ermittelten PD-L1-Positivität bleibt daher unklar. Wahrscheinlich wirken sie sich aber nicht wesentlich auf die PD-L1-Expressionsrate aus, da in einer Metaanalyse von 35 Veröffentlichungen kein Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und dem Geschlecht, Alter, Raucherstatus, Performance Status oder den *EGFR-/KRAS-/ALK*-Veränderungen des Patienten nachweisbar war (Brody *et al.*, 2017).

Neben diesen Faktoren könnte die PD-L1-Expressionsrate auch von der Tumormanifestation (Driver *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2015; Mansfield *et al.*, 2016; Munari *et al.*, 2018a; Uruga *et al.*, 2017), dem histologischen Tumortyp (Azuma *et al.*, 2014; Krawczyk *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2016), dem Differenzierungsgrad (Wang *et al.*, 2015) oder dem Tumorstadium (Chen *et al.*, 2012; Cooper *et al.*, 2015; Skov *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018) beeinflusst sein. Möglicherweise trägt der Einschluss von überwiegend ADC, Primärtumoren, geringen Tumorstadien und/oder schlechten Differenzierungsgraden in der vorliegenden Arbeit zu einer insgesamt etwas geringeren PD-L1-Expression im Vergleich zu anderen Studien bei. Mögliche Zusammenhänge zwischen der PD-L1-Expressionrate und den genannten Merkmalen werden im Abschnitt Tumormerkmale (siehe S. 50, Tumormerkmale) diskutiert.

Die in zytologischen Proben und histologischen Schnittpräparaten ermittelten PD-L1-Expressionsraten zeigen in den vorliegenden Analysen keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 6 und Tabelle 7), weshalb die Hypothese  $H_0$  abzulehnen ist. Eine im Vergleich zu anderen Arbeiten geringfügig niedrigere PD-L1-Positivität ist wahrscheinlich nicht auf die Lagerungsbedingungen, ungenügende Färbungen oder fehlerhafte Auswertungen zurückführbar, sondern könnte vielmehr auf die Zusammensetzung des Untersuchungsguts und die Beschränkung von Tumoren in einem überwiegend niedrigem Stadium zurückführbar sein. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse und der Vergleich mit anderen Studien die Eignung der in dieser Arbeit retrospektiv untersuchten Proben zur PD-L1-Analyse.



#### 4.4 Tumormerkmale

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Tumormerkmalen (Tumorstadium, -Manifestation, -Differenzierungsgrad, -Typ) und der PD-L1-Expressionsrate untersucht. Obwohl es sich bei dem Untersuchungsgut mit 153 ADC und 94 SQC quantitativ um einen adäquaten Stichprobenumfang handelt, lassen sich aufgrund des geringen Anteils PD-L1-positiver Fälle von 17-22% jedoch für diese Merkmale keine verallgemeinernden Rückschlüsse ableiten.

Lungenkarzinome verändern sich im Verlauf ihrer Entwicklung morphologisch und physiologisch aufgrund genetischer Mutationen und des selektiven Drucks der Mikroumgebung (Marusyk und Polyak, 2010). Mutationen und epigenetische Veränderungen können dabei erhalten bleiben oder heraus selektiert werden (Marusyk und Polyak, 2010; Merlo *et al.*, 2006). Ob und welche dieser Mutationen bestehen bleiben, hängt vor allem vom selektiven Druck der Mikroumgebung ab, wobei auch neutrale oder geringfügig nachteilige Mutationen überdauern bleiben können (Marusyk und Polyak, 2010; Merlo *et al.*, 2006; Polyak *et al.*, 2009). Manche Mutationen kommen auch nur in bestimmten Entwicklungsstufen des Tumors vor (Marusyk und Polyak, 2010; Merlo *et al.*, 2006).

Zu den Einflüssen aus der Mikroumgebung gehören vor allem die Verfügbarkeit von Sauerstoff, Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Raum (Marusyk und Polyak, 2010; Michor *et al.*, 2004; Merlo *et al.*, 2006). Aufgrund dieser fortlaufenden Entwicklung und Veränderungen in der Mikroumgebung einer Tumorerkrankung, kann die Expression einzelner Proteine zwischen verschiedenen Tumortypen, -Differenzierungsgraden, -Stadien und -Manifestationen unterschiedlich ausfallen.

Einige Studien zeigen eine erhöhte PD-L1-Expression für Tumoren in fortgeschrittenen Tumorstadien (Chen *et al.*, 2012; Cooper *et al.*, 2015; Skov *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018). Dieser Zusammenhang wird in anderen Studien jedoch nicht bestätigt (Brody *et al.*, 2017; Ilie *et al.*, 2015; Kitazono *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2018). In der vorliegenden Arbeit wurden keine signifikanten Unterschiede in der PD-L1-Expression zwischen den verschiedenen Tumorstadien nachgewiesen (Tabelle 9). Allerdings stützten sich die Analysen ausschließlich auf Proben resezierter Lungentumoren in einem überwiegend niedrigen Stadium (Tabelle 1). Mangels weiter fortgeschrittener und chirurgisch nicht kurativ resezierbarer Tumoren in dem vorliegenden Untersuchungsgut, lässt sich die Frage nach einem kausalen

Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und dem Tumorstadium nicht abschließend klären.

Mehrere Autoren weisen auf genetische Veränderungen von Lungenkarzinomen im Verlauf ihrer Entwicklung hin (Marusyk und Polyak, 2010; Merlo *et al.*, 2006; Polyak *et al.*, 2009). Daher erscheint angesichts des evolutionären Vorteils einer PD-L1-Expression für die Tumorentwicklung, dessen Zunahme mit fortschreitendem Tumorstadium plausibel.

Die tumorale Mikroumgebung wirkt sich auf die Entwicklung einer Tumorerkrankung aus (Marusyk und Polyak, 2010; Michor *et al.*, 2004; Merlo *et al.*, 2006). Daher könnte auch die PD-L1-Expression zwischen mehreren räumlich getrennten Tumormanifestationen unterschiedlich ausfallen (Marusyk und Polyak, 2010; Merlo *et al.*, 2006). Während einzelne Autoren keine abweichenden PD-L1-Expressionsraten zwischen Primärtumor und Metastasen finden (Skov *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015), sind differente Ergebnisse in anderen Untersuchungen mehrfach nachgewiesen worden (Büttner *et al.*, 2017; Haragan *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Mansfield *et al.*, 2016; Munari *et al.*, 2018a; Uruga *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

Wie die vorliegende Arbeit demonstriert, unterscheiden sich die PD-L1-Expressionsraten in den untersuchten Primärtumoren nicht signifikant von den in Metastasen primärer Lungenkarzinome erfassten Raten (Tabelle 10). Ob sich das vorliegende Material aufgrund der geringen Anzahl PD-L1-positiver Fälle zur Klärung eines tatsächlichen Zusammenhangs zwischen PD-L1-Expression und Tumormanifestationen eignet, bleibt jedoch offen.

Eine abweichende biologische Zusammensetzung zwischen Primärtumor und Metastase erscheint aber aufgrund der parallel auftretenden genetischen Veränderungen und ihrer unterschiedlichen Selektion durch die jeweilige Mikroumgebung plausibel (Park *et al.*, 2000; Polyak *et al.*, 2009). Dies trifft vor allem bei Ablösung der später zur Metastase heranwachsenden Tumorzellen in einem frühen Tumorstadium zu (Gray, 2003). Unterschiedliche PD-L1-Expressionsraten in Proben primärer Lungenkarzinome und Metastasen primärer Lungenkarzinome könnten teils auch auf differente, dominierende histologische Wachstumsmuster zwischen diesen Entnahmeorten verschiedener Tumormanifestationen zurückführbar sein (Uruga *et al.*, 2017).

Zudem erscheinen unterschiedliche PD-L1-Expressionsraten an mehreren Tumormanifestationen plausibel, da die PD-L1-Expression auch innerhalb einer Tumorerkrankung heterogen ausfällt (Büttner *et al.*, 2017; Casadevall *et al.*, 2017; Gniadek *et*

*al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; McLaughlin *et al.*, 2016; Munari *et al.*, 2017; Munari *et al.*, 2018b; Nakamura *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). Da genetische Mutationen zufällig auftreten und durch variable äußere Einflüsse der Mikroumgebung selektiert werden, kann die PD-L1-Expression in Primärtumoren und Metastasen jedoch nicht zuverlässig vorausgesagt werden.

Vorherige Studien lassen teils auf eine Korrelation zwischen der PD-L1-Expression und dem Differenzierungsgrad des Tumors schließen. Eine erhöhte Expressionsrate wird überwiegend bei schlechter differenzierten Tumoren beschrieben (Chen *et al.*, 2012; Cooper *et al.*, 2015; Inamura *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu zeigen andere Untersuchungen eine höhere Expressionsrate bei hoch differenzierten Tumoren (Driver *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014). In weiteren Studien wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und dem Differenzierungsgrad nachgewiesen (Chen *et al.*, 2016; Kitazono *et al.*, 2015; Konishi *et al.*, 2004; Lafuente-Sanchis *et al.*, 2017; Mu *et al.*, 2010; Zouh *et al.*, 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurden keine signifikanten Unterschiede in der PD-L1-Expression zwischen den Differenzierungsgraden ermittelt (Tabelle 12). Die unterschiedlichen Häufigkeiten der Differenzierungsgrade im Untersuchungsgut und die insgesamt geringe PD-L1-Expression limitieren aber Aussagen bezüglich eines kausalen Zusammenhangs.

Grundsätzlich könnte sich die PD-L1-Expressionsrate bei verschiedenen Tumordifferenzierungsgraden aufgrund der stetigen Tumorentwicklung unterscheiden (Marusyk und Polyak, 2010; Merlo *et al.*, 2006). Im Hinblick auf die Entdifferenzierung, erscheint vor allem bei schlechter differenzierten Tumoren mit einer für den Tumor vorteilhaften verstärkten PD-L1-Expression plausibel. Derzeit fehlen allerdings klare Richtlinien zur Bestimmung der Differenzierungsgrade pulmonaler Karzinome (Travis *et al.*, 2015a).

Für SQC wird in der neusten WHO-Klassifikation kein System zur Einteilung in Differenzierungsgrade angegeben (Travis *et al.*, 2015a). Aktuelle Studien zeigen jedoch einen Zusammenhang zwischen der Überlebensrate und der Tumornestgröße („nesting“) oder der Tumornestanzahl mit mehr als fünf Tumorzellen („budding“) (Kadota *et al.*, 2014; Weichert *et al.*, 2015). Für pulmonale ADC wird eine rein histopathologische Graduierung beschrieben, bei welcher der prädominante Subtyp des Resektats in 5%-Schritten angegeben wird (Travis *et al.*, 2015a). Hierbei können aber in den Ergebnissen mehrerer Bewerter Abweichungen von bis zu 52% auftreten (Boland *et al.*, 2017).

Da aktuell keine klaren Richtlinien zur Einteilung von NSCLC in Differenzierungsgrade vorliegen, bleibt eine mögliche Korrelation zwischen Differenzierungsgrad und PD-L1-Expressionsrate unklar. Eine unterschiedliche Expressionsrate in verschiedenen Differenzierungsgraden im Zusammenhang mit abweichenden histologischen Wachstumsmustern ist jedoch denkbar.

Der histologische Tumortyp könnte einen Einfluss auf die PD-L1-Expression haben. So sollen teils SQC (Krawczyk *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2018) und teils ADC (Azuma *et al.*, 2014; Kitazono *et al.*, 2015; Skov *et al.*, 2019) eine höhere PD-L1-Expression aufweisen. Andere Autoren bestreiten generell einen Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expressionsrate und dem histologischen Tumortyp (Chen *et al.*, 2012; Cooper *et al.*, 2015; Heymann *et al.*, 2017; Ilie *et al.*, 2015; Konishi *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikanter Unterschied in der PD-L1-Expression zwischen ADC und SQC nur in den zytologischen Präparaten nachgewiesen (Tabelle 11). Möglicherweise sind die ermittelten Unterschiede also nicht oder nicht ausschließlich auf den Tumortyp zurückführbar. Mangelhafte oder fehlerhafte Anfärbungen der zytologischen Präparate können als Ursachen dieses Unterschieds ausgeschlossen werden, da alle Proben standardisiert und weitgehend zeitgleich gefärbt wurden (siehe S. 19, 2.2 Immunologische Anfärbungen). Auch fehlerhafte Auswertungen der zytologischen Proben sind unwahrscheinlich. In diesem Fall wären größere Abweichungen zwischen den drei Bewertern zu erwarten gewesen, die sich mit einem ICC von 0,90 ausschließen lassen (siehe S.31, 3.2 Interrater-Variabilität). Außerdem sind fehlerhafte Auswertungen der zytologischen Proben unwahrscheinlich, da weder für ADC noch für SQC signifikante Unterschiede zwischen Zyto- und Histologie gemessen wurden (Tabelle 6 und Tabelle 7). Mögliche Unterschiede in der PD-L1-Expressionsrate zwischen Zyto- und Histologie aufgrund zeitlicher Differenzen der einzelnen Probenentnahme können ebenfalls ausgeschlossen werden, da beide Präparate nahezu zeitgleich von derselben resezierten Läsion angefertigt wurden.

Abweichende Ergebnisse zwischen Zyto- und Histologie könnten durch die intratumorale Heterogenität der PD-L1-Expression beeinflusst sein, welche im Abschnitt Konkordanz und Tumorheterogenität weiterführend diskutiert wird (siehe S. 55, Absatz 4.5 Konkordanz und Tumorheterogenität). Als Ursache der differenten Ergebnisse sind aber auch methodisch bedingte Unterschiede in der Materialgewinnung denkbar (siehe S. 44, 4.1 Tumorzellzahlen in zyto- und histologischen Präparaten).

Untersuchungen bezüglich der Anteile an Tumorzellen pro Präparat deuten auf höhere Tumorzellzahlen der in dieser Arbeit untersuchten zytologischen Proben hin (siehe S. 44, 4.1 Tumorzellzahlen in zyto- und histologischen Präparaten). Da eine vermehrte Zahl analysierter Tumorzellen die Genauigkeit zur Bestimmung der PD-L1-Expression erhöht (Hendry *et al.*, 2020; Hernandez *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2020; Sakakibara *et al.*, 2017), steigert eine hohe Tumorzellzahl vor allem im Fall von geringen Expressionsraten die Chance zur Detektion einer vorliegenden PD-L1-Expression. Tatsächlich wurden in der Zytologie insgesamt 35 Fälle (14%) und in der Histologie nur 17 Fälle (7%) mit geringen PD-L1-Positivitäten von 1-10% gefunden (Tabelle 6). Vor allem bei den SQC ist der Unterschied mit 24 Fällen (25%) in der Zytologie und 9 Fällen (9%) in der Histologie sichtbar (Tabelle 6).

Obwohl also keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit der verschiedenen Expressionsraten zwischen Zyto- und Histologie nachgewiesen wurden (Tabelle 6), scheinen dennoch abweichende Ergebnisse vorzuliegen, die nur in der Zytologie einen signifikanten Unterschied in der PD-L1-Expression zwischen ADC und SQC zeigen (Tabelle 11). Möglicherweise ist das untersuchte Material aufgrund weniger PD-L1-positiver Fälle nicht zu einer abschließenden Analyse dieser Zusammenhänge geeignet, womöglich zeigt aber auch nur die Zytologie einen tatsächlich vorliegenden Zusammenhang, der in der Histologie verborgen geblieben ist.

Grundsätzlich bestätigen Studien bei mehrfach wiederholten Probenentnahmen eine höhere Genauigkeit im PD-L1-Nachweis (Gniadek *et al.*, 2017; Munari *et al.*, 2017; Munari *et al.*, 2018b). Wird nur in einer dieser Proben eine PD-L1-Expression nachgewiesen, sollte diese prinzipiell nicht als fehlerhaft, sondern als Erfolg im PD-L1-Nachweis angesehen werden. Tatsächlich wurden in der Zytologie insgesamt 32 positive Fälle (13%) detektiert, die in der gepaarten Histologie verborgen geblieben sind, davon 27 Fälle (11%) im Bereich von 1-49% Positivität (Tabelle 14). In solchen Fällen könnte die Zytologie einen wichtigen Beitrag im PD-L1-Nachweis und der anschließenden Therapieplanung liefern.

Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede in der PD-L1-Expression zwischen verschiedenen Tumormanifestationen (Tabelle 10), Tumorstadien (Tabelle 9) oder Differenzierungsgraden (Tabelle 12) ermittelt werden. Dies spricht gegen die Hypothese  $H_0$ . Signifikante Unterschiede in der PD-L1-Expression zwischen ADC und SQC wurden nur in den zytologischen Proben gefunden (Tabelle 11). Die Eignung der eingeschlossenen Proben zur vergleichenden Analyse vorausgesetzt, könnten diese

Ergebnisse auf eine höhere Chance zur Detektion einer (geringen) PD-L1-Expression in zytologischen Proben hindeuten, wie sie vermehrt bei SQC aufgetreten ist. Es bedarf jedoch weiterer Analysen mit einer höheren Zahl an PD-L1-positiven Präparaten zur Überprüfung dieser Zusammenhänge. Unabhängig davon repräsentieren diese Ergebnisse die Schwierigkeiten in der PD-L1-Analyse und unterstreichen dadurch den wichtigen ergänzenden Beitrag der Zytologie zum PD-L1-Nachweis in NSCLC.

#### 4.5 Konkordanz und Tumorheterogenität

Anhand der Exaktwerte der PD-L1-Expressionsrate wurde eine vollkommene Konkordanz ( $\Delta 0$ ) in 72% aller Fälle ermittelt. Bei einer zugelassenen Abweichung von  $\Delta 10$  zwischen gepaarten zytologischen und histologischen Proben wird eine Konkordanz von 83% erreicht. Im TPS ergab sich eine vollkommene Übereinstimmung in 76% der Fälle. Beide Auswertungsverfahren zeigen also vergleichbar hohe Konkordanzen von 72-83% zwischen gepaarter Zyto- und Histologie. Diese hohen Übereinstimmungen sprechen gegen unterschiedliche Ergebnisse zwischen gepaarten zytologischen Proben und histologischen Schnittpräparaten und somit gegen die Hypothese  $H_0$ .

In ähnlichen Studien liegt die Konkordanz zwischen zytologischen und histologischen Proben bei 50-95% (Bozzetti *et al.*, 2020; Hernandez *et al.*, 2018; Ilie *et al.*, 2018; Jain *et al.*, 2018; Munari *et al.*, 2019; Noll *et al.*, 2018; Sakata *et al.*, 2018; Skov und Skov 2017; Song *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2018). Dazu vergleichbare variable Konkordanzen von 50-92% wurden auch bei der Untersuchung von ausschließlich histologischem Material ermittelt (Ilie *et al.*, 2015; Kitazono *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017). Laut einer umfangreichen Metaanalyse liegt die Konkordanz der tumoralen PD-L1-Expressionsrate von zytologischen und histologischen Proben für eine Expressionsrate von  $\geq 50\%$  bei 90% und für eine Expressionsrate von  $\geq 1\%$  bei 88% (Gosney *et al.*, 2020).

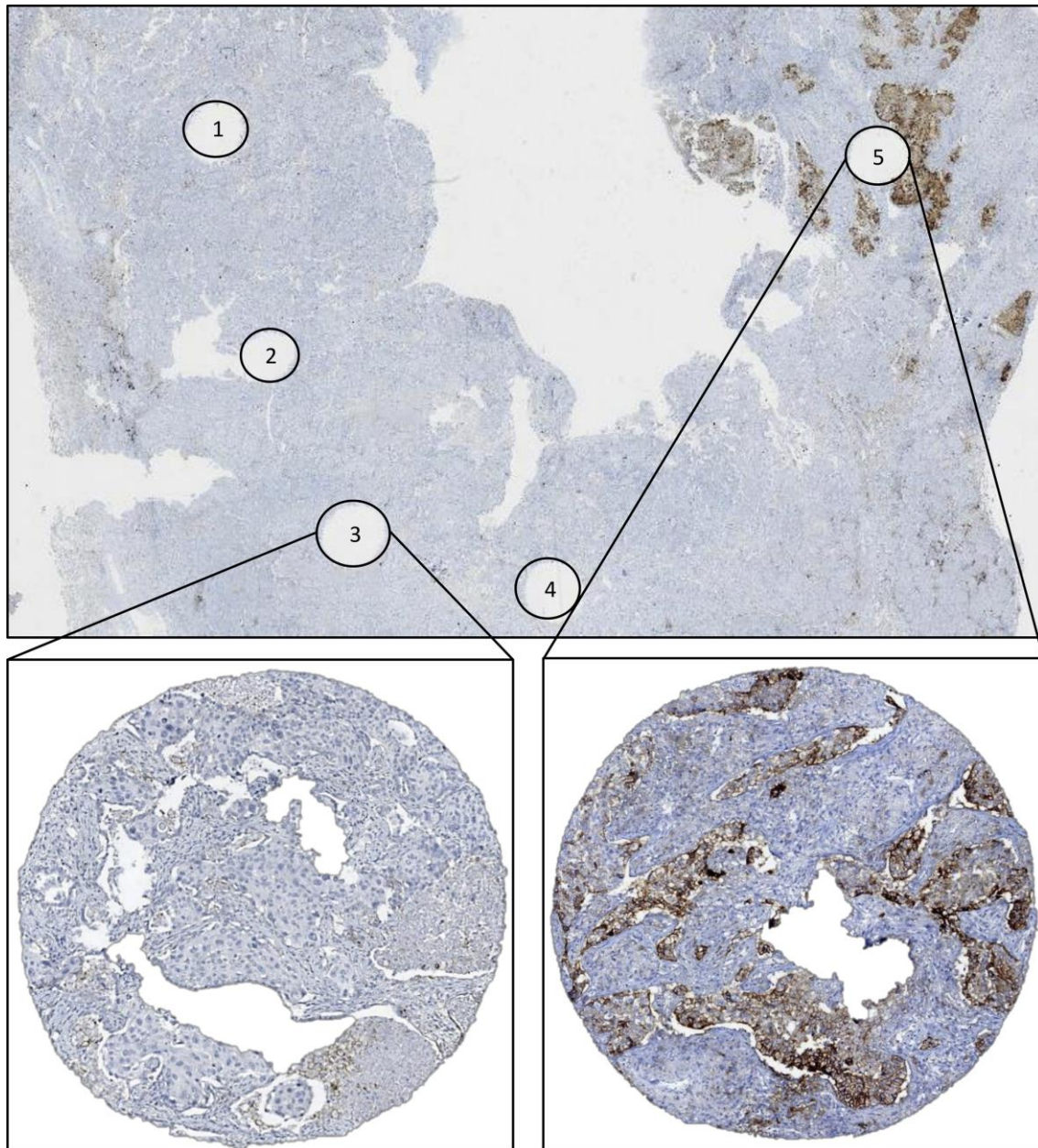
Die Vergleichbarkeit zu anderen Studien ist aber aufgrund unterschiedlicher Studiendesigns und Auswertungskriterien nur bedingt möglich. So wurden selbst in ähnlichen Untersuchungen häufig andere Materialien analysiert, die teils nicht miteinander gepaart waren. Zusätzlich beziehen sich die angegebenen Konkordanzen zum Teil ausschließlich auf hohe PD-L1-Expressionsraten von  $\geq 50\%$ . Dessen ungeachtet werden in der vorliegenden Arbeit mit 72-83% vergleichbar hohe Übereinstimmungen zwischen Zyto- und Histologie erreicht wie in anderen Studien.

Abweichende Ergebnisse in der PD-L1-Expression zwischen unterschiedlichen Materialarten oder mehreren gleichartigen Biopsien treten aufgrund der heterogenen

intratumoralen PD-L1-Expression selbst bei gepaarten Proben auf. Grundlage dieser heterogenen Expression innerhalb einer Tumorkläsion als auch zwischen Primärtumor und Metastase sind wahrscheinlich die spontan auftretenden Mutationen und deren Selektion durch äußere Einflüsse in der Mikroumgebung des Tumors, insbesondere durch die Verfügbarkeit von Sauerstoff, Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Raum (Marusyk und Polyak, 2010; Michor et al., 2004; Merlo et al., 2006).

Die heterogene Verteilung von PD-L1 innerhalb eines Tumors wurde bereits in mehreren Studien untersucht (Büttner *et al.*, 2017; Casadevall *et al.*, 2017; Gniadek *et al.*, 2017; Haragan *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2017; McLaughlin *et al.*, 2016; Munari *et al.*, 2017; Munari *et al.*, 2018b; Nakamura *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). Dabei zeigen sich zwischen mehreren Proben derselben Läsion diskordante Ergebnisse von 13-30% für PD-L1  $\geq 1\%$  und von 5-23% für PD-L1  $\geq 50\%$  (Gniadek *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Munari *et al.*, 2017; Munari *et al.*, 2018b). Die ermittelte Expressionsrate aus einer einzelnen Probenentnahme könnte daher nicht die tatsächlich im gesamten Tumor vorliegende Expressionsrate zeigen (Haragan *et al.*, 2019; Merlo *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse repräsentieren die ausgeprägte heterogene Verteilung der PD-L1-Expression innerhalb eines Tumors, wie sie beispielhaft in Abbildung 8 illustriert ist.

Unterschiedliche Ergebnisse zwischen zytologischen und histologischen Präparaten sind also aufgrund der heterogenen Verteilung der PD-L1-Expression selbst bei Probenentnahmen aus derselben Läsion unabdingbar. So wurden in der vorliegenden Arbeit bei den zytologischen Präparaten in insgesamt 32 Fällen (13%) eine PD-L1-Expression detektiert, die in der Histologie nicht nachweisbar war und in 20 Fällen (8%) andersherum (Tabelle 14c). Die Untersuchungen mehrerer Proben eines Tumors können daher den Nachweis einer existierenden PD-L1-Expression verbessern. Die Überprüfung der PD-L1-Expression an zytologischen Präparaten ist demnach eine zusätzliche Möglichkeit zur Identifikation einer bestehenden Expression und ermöglicht dadurch potenziell weiteren Patienten die Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren.



**Abbildung 8: Diskordante PD-L1-Expression innerhalb eines SQC.** Anhand von fünf ausgestanzten Gewebezylinder eines histologischen Schnitts ist die diskordante PD-L1-Expression innerhalb einer Läsion erkennbar. Die entnommenen Gewebezylinder sind mit den Nummern 1-5 nummeriert. Die Zylinder Nummer 1-4 weisen keine PD-L1-Expression auf, während in Zylinder 5 eine tumorale PD-L1-Expression von 50% vorliegt. Die Ergebnisse der PD-L1-gefärbten Zylinder 3 und 5 sind vergrößert dargestellt. Insgesamt wurde für den Tumor eine PD-L1-Expression von 20% ermittelt (Munari *et al.*, 2018b). SQC = Plattenepithelkarzinom, PD-L1 = *programmed death cell-ligand 1*



## 4.6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Eignung zytologischer Präparate von resezierten Lungentumoren zur Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate. Dies deckt sich mit aktuellen Untersuchungen anderer zytologischer Materialien (Smith *et al.*, 2020; Bozzetti *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2020; Gosney *et al.*, 2020; Hendry *et al.*, 2020). Die Analyse zytologischen Materials erfordert allerdings geeignete Präparate (Monolayer, keine Quetschartefakte, keine Farbrückstände/ artifiziellen Färbungen, ausreichende Tumorzellzahl) sowie eine hohe Expertise in der (quantitativen) Auswertung immunbiologischer Anfärbungen.

Es bedarf weiterer Analysen zur Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der PD-L1-Expressionsrate und klinisch-pathologischen Faktoren. Ebenfalls sollten die Ansprechraten und Überlebensdaten von Patienten mit zytologisch bestimmter PD-L1-Expressionsrate nach Immuncheckpoint-Therapie untersucht werden. Angesichts des verlässlichen Nachweises von PD-L1 an zytologischen Präparaten sind ähnlich bis gleich gute Reaktionen auf Checkpointtherapien nach zytologischer wie nach histologischer PD-L1-Bestimmung zu erwarten.

In 2018 wurden erstmals vergleichbare Reaktionen und Krankheitskontrollraten bei der Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren nach zytologischem und histologischem PD-L1-Nachweis ermittelt (Torous *et al.*, 2018). Zudem wurde die Ansprechrate verschiedener Immuncheckpointtherapien nach der Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate an zytologischen Präparaten von EBUS-FNP untersucht. Hier lag die Ansprechrate bei 100% für eine PD-L1-Expression von  $\geq 50\%$ , bei 33% für eine Expression von 1-49% und bei 0% für eine Expression  $< 1\%$  (Mineura *et al.*, 2020). Diese ersten Ergebnisse bestätigen eine verlässliche Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate an zytologischen Präparaten als Grundlage einer Checkpointtherapie.

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben deuten auf höhere Tumorzellzahlen aufgrund vermehrter Materialmengen auf den zytologischen Präparaten im Vergleich zu den histologischen Schnitten hin. Dieser Zusammenhang sollte allerdings unter Einbezug verschiedener Materialarten und eines höheren Stichprobenumfangs überprüft werden. Erste Untersuchungen lassen auf hohe Tumorzellzahlen in zytologischen Präparaten von EBUS-FNP schließen (Sakakibara *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2020). Hierbei wiesen 92% der Präparate über 100 Tumorzellen auf und wären demnach grundsätzlich für die Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate geeignet (Smith *et al.*, 2020). Die Ermittlung der Tumorzellzahl verschiedener Materialien liefert Aussagen über deren Repräsentativität

in der PD-L1-Analyse, welche hinsichtlich der heterogenen Expression bedeutsam für die Verlässlichkeit der Analyse ist.

Da derzeit mehr als 50% aller Lungenkarzinome an zytologischen Proben gestellt werden (Skov *et al.*, 2014; Shah *et al.*, 2006; Travis *et al.*, 2011; Tsao *et al.*, 2017), kann die PD-L1-Analyse an zytologischen Proben potenziell vielen Patienten als Grundlage einer Immuntherapie dienen. Die Prüfung der Expressionsrate sollte für alle Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC und nicht nachgewiesenen Treibermutationen erfolgen. Es empfiehlt sich eine Bestimmung der PD-L1-Expressionsrate parallel zur Untersuchung möglicher Treibermutationen, um Verzögerungen in der Behandlung zu minimieren.

Die Einführung einheitlicher Verfahren zur Anfärbung und Auswertung der PD-L1-Expression verschiedener Proben sollten folgen, um einen Vergleich der Ergebnisse verschiedener Studien zu ermöglichen und ein verlässliches System zur Therapiezulassung zu bilden. Da sich die PD-L1-Expression im Verlauf der Zeit beziehungsweise im Rahmen einer Therapie (Lacour *et al.*, 2019; Rojkó *et al.*, 2018; Sheng *et al.*, 2016) oder nach Entzündungen (Dong *et al.*, 2002) ändern kann und deren Nachweis bei älteren Materialien möglicherweise eingeschränkt ist (Calles *et al.*, 2015; Grillo *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2018; van der Broek und van de Vijver, 2000), sollten möglichst aktuelle Proben zur PD-L1-Analyse herangezogen werden. Gegebenenfalls müssen Rebiopsien erfolgen (Lacour *et al.*, 2019; Skov *et al.*, 2019). In diesen Fällen ist eine zytologische Beprobung aufgrund einer geringeren Invasivität und einer schnelleren Auswertbarkeit einer histologischen Biopsie vorzuziehen.

Abweichende Ergebnisse zwischen mehreren Probenentnahmen, wie sie in dieser und anderen Arbeiten festgestellt wurden (Ilie *et al.*, 2015; Ilie *et al.*, 2018; Jain *et al.*, 2018; Kitazono *et al.*, 2015; Munari *et al.*, 2019; Noll *et al.*, 2018; Sakata *et al.*, 2018; Skov und Skov 2017; Xu *et al.*, 2018), sind aufgrund der (intratumoralen) Heterogenität der PD-L1-Expression unvermeidbar und verdeutlichen die Notwendigkeit möglichst umfangreicher Untersuchungen (Büttner *et al.*, 2017; Casadevall *et al.*, 2017; Gniadek *et al.*, 2017; Hernandez *et al.*, 2018; McLaughlin *et al.*, 2016; Munari *et al.*, 2017; Munari *et al.*, 2018b; Nakamura *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). Abweichungen in den Ergebnissen unterschiedlicher Proben sollten daher nicht als fehlerhafte Auswertungen, sondern als Zugewinn in der Auswertung der PD-L1-Expression und der Möglichkeit einer Immuncheckpoint-Therapie gesehen werden.

Die Bestimmungen der PD-L1-Expression an zytologischen und histologischen Präparaten ergänzen sich gegenseitig. Ist die Expressionsrate an histologischen Präparaten nicht nachweisbar, sollte die Analyse an geeigneten zytologischen Präparaten

veranlasst werden. Liegen adäquate zytologische Präparate vor, kann auf eine Rebiopsie zum PD-L1-Nachweis verzichtet werden. Dadurch leistet die Zytologie einen wichtigen Beitrag zum PD-L1-Nachweis und einer potenziell darauffolgenden Immuncheckpoint-Therapie.

Die Veröffentlichung der vorliegenden Daten zeigt deren Bedeutung für die aktuelle Therapieplanung von Patienten mit NSCLC (Kuempers *et al.*, 2019). Dies unterstreicht die Bedeutung der Anerkennung zytologischer Verfahren für eine PD-L1-Analyse und der daraus resultierenden Zulassung zur Behandlung mit Checkpointinhibitoren nach zytologisch ermittelter PD-L1-Expressionsrate. Insgesamt kann die Zytologie einen wichtigen Beitrag zum Nachweis der PD-L1-Expressionsrate leisten.

## 5 Zusammenfassung

Lungenkarzinome sind weltweit für die meisten durch Krebs verursachten Todesfälle verantwortlich. Die Behandlung von Lungenkarzinomen umfasst neben chirurgischen Verfahren und Chemo- und/ oder Radiotherapien auch zielgerichtete Therapien bei nachgewiesenen Treibermutationen sowie Immuncheckpoint-Therapien bei gegebener PD-L1-Expression. Der Nachweis einer PD-L1-Expression ist bislang jedoch nur für histologische Schnittpräparate validiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung von zytologischen Präparaten zum PD-L1-Nachweis geprüft. Hierfür wurden retrospektiv 247 gepaarte zytologische Proben und histologische Schnittpräparate von chirurgisch gewonnenen Resektaten untersucht. Die Analysen der Proben erfolgten verblindet und unabhängig voneinander durch drei Bewerter. Hierbei wurde der Anteil membranär PD-L1-positiver Tumorzellen bestimmt.

Insgesamt scheinen die untersuchten zytologischen Proben aufgrund höherer Materialmengen mehr Tumorzellen aufzuweisen als die histologischen Schnittpräparate. Zudem bestätigte eine geringe Interrater-Variabilität die Verlässlichkeit der PD-L1-Analyse anhand zytologischer Proben. In der Zytologie wurden 193 (78%) negative, 46 (19%) intermediär positive und 8 (3%) hoch positive Fälle ermittelt. In der Histologie fanden sich 205 (83%) negative, 30 (12%) intermediär positive und 12 (5%) hoch positive Fälle. Diese Daten sind vergleichbar hoch bis geringfügig niedriger als in anderen Studien.

Bezüglich der untersuchten Tumormerkmale fand sich nur in der Zytologie ein signifikanter Unterschied in der PD-L1-Expression zwischen ADC und SQC. Die Eignung des Materials für diese Untersuchung vorausgesetzt, könnten diese Ergebnisse auf eine höhere Chance zur Detektion einer (geringen) PD-L1-Expression in zytologischen Proben hindeuten, wie sie vermehrt bei SQC ermittelt wurde. Möglicherweise ist dies auf eine durchschnittlich höhere Tumorzellzahl in der Zytologie zurückführbar.

Mit 72-83% liegt eine hohe und zu anderen Studien vergleichbare Konkordanz zwischen gepaarten zytologischen und histologischen Proben vor. Abweichende Ergebnisse zwischen mehreren Probenentnahmen sind aufgrund der intratumoralen Heterogenität unvermeidbar und verdeutlichen somit die Notwendigkeit möglichst umfangreicher Untersuchungen. Die Bestimmungen der PD-L1-Expression an zytologischen und histologischen Präparaten ergänzen sich gegenseitig.

Insgesamt bestätigt die vorliegende Arbeit die Nachweisbarkeit der PD-L1-Expression an zytologischen Präparaten. Dadurch kann die Zytologie insbesondere bei fehlenden adäquaten histologischen Proben einen wichtigen Beitrag zum PD-L1-Nachweis leisten.

## 6 Summary

Lung cancer is responsible for most cancer deaths worldwide. The treatment of lung carcinomas includes surgical procedures and chemo- and/ or radiotherapy as well as targeted therapies for existing driver mutations or immunotherapy for given expression of PD-L1. However, the detection of PD-L1 expression has only been validated for histological sections so far. In the present study, the applicability of cytological preparations for PD-L1 detection was examined. For this purpose 247 paired cytological and histological specimens of resected lung tumors were retrospectively examined. Each specimen was independently analyzed by three observers in a blinded manner. The proportion of membranous PD-L1-positive tumor cells was determined.

Overall, the examined cytological preparations appear to have more tumour cells than the histological samples due to the higher amounts of material. Furthermore, a low interrater variability confirmed the reliability of PD-L1 analysis using cytological samples. In cytology 193 (78%) negative, 46 (19%) intermediately positive and 8 (3%) highly positive cases were detected. In histology, 205 (83%) negative, 30 (12%) intermediate positive and 12 (5%) highly positive cases were found. These data are comparably high or slightly lower than in other studies.

With regard to tumor characteristics, only in cytology a significant difference in PD-L1 expression between ADC and SQC was determined. Assuming the suitability of the material for this study, these results could indicate a higher chance of detecting (low) PD-L1 expression in cytological samples, as found in increased numbers of SQC. This could probably be due to the higher tumor cell amount in cytology.

A high concordance of 72-83% between paired cytological and histological samples was identified, which is comparable to other studies. Divergent results between several samplings are inevitable due to the intratumoral heterogeneity, which illustrates the utility for comprehensive investigations. Therefore, the determinations of PD-L1 expression on cytological and histological specimens complement one another.

Overall, the present study confirms the detectability of PD-L1 expression on cytological preparations. Thus, cytology can enable an important contribution to PD-L1 detection, especially in the absence of adequate histological samples.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abiko, K., Matsumura, N., Hamanishi, J., Horikawa, N., Murakami, R., Yamaguchi, K., Yoshioka, Y., Baba, T., Konishi, I. and Mandai, M. (2015). IFN- $\gamma$  from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 112(9), pp.1501-1509.
- Aguilar, E., Ricciuti, B., Gainor, J., Kehl, K., Kravets, S., Dahlberg, S., Nishino, M., Sholl, L., Adeni, A., Subegdjo, S., Khosrowjerdi, S., Peterson, R., Digumarthy, S., Liu, C., Sauter, J., Rizvi, H., Arbour, K., Carter, B., Heymach, J., Altan, M., Hellmann, M. and Awad, M. (2019). Outcomes to first-line pembrolizumab in patients with non-small-cell lung cancer and very high PD-L1 expression. *Annals of Oncology*, 30(10), pp.1653-1659.
- Akbay, E., Koyama, S., Carretero, J., Altabef, A., Tchaicha, J., Christensen, C., Mikse, O., Cherniack, A., Beauchamp, E., Pugh, T., Wilkerson, M., Fecci, P., Butaney, M., Reibel, J., Soucheray, M., Cohoon, T., Janne, P., Meyerson, M., Hayes, D., Shapiro, G., Shimamura, T., Sholl, L., Rodig, S., Freeman, G., Hammerman, P., Dranoff, G. and Wong, K. (2013). Activation of the PD-1 Pathway Contributes to Immune Escape in EGFR-Driven Lung Tumors. *Cancer Discovery*, 3(12), pp.1355-1363.
- Alsaab, H., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S. and Iyer, A. (2017). PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Frontiers in Pharmacology*, 8.
- Antonia, S., Villegas, A., Daniel, D., Vicente, D., Murakami, S., Hui, R., Yokoi, T., Chiappori, A., Lee, K., de Wit, M., Cho, B., Bourhaba, M., Quantin, X., Tokito, T., Mekhail, T., Planchard, D., Kim, Y., Karapetis, C., Hirt, S., Ostoros, G., Kubota, K., Gray, J., Paz-Ares, L., de Castro Carpeño, J., Wadsworth, C., Melillo, G., Jiang, H., Huang, Y., Dennis, P. and Özgüroğlu, M. (2017). Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 377(20), pp.1919-1929.
- Antonia, S., Villegas, A., Daniel, D., Vicente, D., Murakami, S., Hui, R., Kurata, T., Chiappori, A., Lee, K., de Wit, M., Cho, B., Bourhaba, M., Quantin, X., Tokito, T., Mekhail, T., Planchard, D., Kim, Y., Karapetis, C., Hirt, S., Ostoros, G., Kubota, K., Gray, J., Paz-Ares, L., de Castro Carpeño, J., Faivre-Finn, C., Reck, M., Vansteenkiste, J., Spigel, D., Wadsworth, C., Melillo, G., Taboada, M., Dennis, P. and Özgüroğlu, M. (2018). Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *New England Journal of Medicine*, 379(24), pp.2342-2350.
- Arriola, A., Bashover, E., Joseph, C., Staerckel, G., Wang, W. and Roy-Chowdhuri, S. (2018). The usefulness of various cytologic specimen preparations for PD-L1 immunostaining in non-small cell lung carcinoma. *Journal of the American Society of Cytopathology*, 7(6), pp.324-332.
- Asamura, H., Chansky, K., Crowley, J., Goldstraw, P., Rusch, V., Vansteenkiste, J., Watanabe, H., Wu, Y., Zielinski, M., Ball, D. and Rami-Porta, R. (2015). The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(12), pp.1675-1684.
- Azuma, K., Ota, K., Kawahara, A., Hattori, S., Iwama, E., Harada, T., Matsumoto, K., Takayama, K., Takamori, S., Kage, M., Hoshino, T., Nakanishi, Y. and Okamoto, I. (2014). Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in

- surgically resected nonsmall-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 25(10), pp.1935-1940.
- Bergethon, K., Shaw, A., Ignatius Ou, S., Katayama, R., Lovly, C., McDonald, N., Massion, P., Siwak-Tapp, C., Gonzalez, A., Fang, R., Mark, E., Batten, J., Chen, H., Wilner, K., Kwak, E., Clark, J., Carbone, D., Ji, H., Engelman, J., Mino-Kenudson, M., Pao, W. and Iafrate, A. (2012). ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 30(8), pp.863-870.
- Boland, J., Kwon, E., Harrington, S., Wampfler, J., Tang, H., Yang, P. and Aubry, M. (2013). Tumor B7-H1 and B7-H3 Expression in Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Clinical Lung Cancer*, 14(2), pp.157-163.
- Boland, J., Wampfler, J., Yang, P. and Yi, E. (2017). Growth pattern-based grading of pulmonary adenocarcinoma—Analysis of 534 cases with comparison between observers and survival analysis. *Lung Cancer*, 109, pp.14-20.
- Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D., Steins, M., Ready, N., Chow, L., Vokes, E., Felip, E., Holgado, E., Barlesi, F., Kohlhäufel, M., Arrieta, O., Burgio, M., Fayette, J., Lena, H., Poddubskaya, E., Gerber, D., Gettinger, S., Rudin, C., Rizvi, N., Crinò, L., Blumenschein, G., Antonia, S., Dorange, C., Harbison, C., Graf Finckenstein, F. and Brahmer, J. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 373(17), pp.1627-1639.
- Bozzetti, C., Squadrilli, A., Nizzoli, R., Lagrasta, C., Gasparro, D., Majori, M., Filippo, M., Becchi, G., Azzoni, C., Campanini, N., Pedrazzi, G., Zavani, A., Silini, E., Tiseo, M. and Gnetti, L., 2020. Optimizing PD-L1 evaluation on cytological samples from advanced non-small-cell lung cancer. *Immunotherapy*.
- Brahmer, J., Drake, C., Wollner, I., Powderly, J., Picus, J., Sharfman, W., Stankevich, E., Pons, A., Salay, T., McMiller, T., Gilson, M., Wang, C., Selby, M., Taube, J., Anders, R., Chen, L., Korman, A., Pardoll, D., Lowy, I. and Topalian, S. (2010). Phase I Study of Single-Agent Anti–Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors: Safety, Clinical Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlates. *Journal of Clinical Oncology*, 28(19), pp.3167-3175.
- Brahmer, J., Reckamp, K., Baas, P., Crinò, L., Eberhardt, W., Poddubskaya, E., Antonia, S., Pluzanski, A., Vokes, E., Holgado, E., Waterhouse, D., Ready, N., Gainor, J., Arén Frontera, O., Havel, L., Steins, M., Garassino, M., Aerts, J., Domine, M., Paz-Ares, L., Reck, M., Baudelet, C., Harbison, C., Lestini, B. and Spigel, D. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 373(2), pp.123-135.
- Brody, R., Zhang, Y., Ballas, M., Siddiqui, M., Gupta, P., Barker, C., Midha, A. and Walker, J. (2017). PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer*, 112, pp.200-215.
- Brose, M., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Gerrero, R., Einhorn, E., Herlyn, M., Minna, J., Nicholson, A., Roth, J., Albelda, S., Davies, H., Cox, C., Brignell, G., Stephens, P., Futreal, P., Wooster, R., Stratton, M., Weber, B. (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Research*, 62, pp. 6997–7000.

- Brunnström, H., Johansson, A., Westbom-Fremer, S., Backman, M., Djureinovic, D., Patthey, A., Isaksson-Mettävainio, M., Gulyas, M. and Micke, P. (2017). PD-L1 immunohistochemistry in clinical diagnostics of lung cancer: inter-pathologist variability is higher than assay variability. *Modern Pathology*, 30(10), pp.1411-1421.
- Butte, M., Keir, M., Phamduy, T., Sharpe, A. and Freeman, G. (2007). Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. *Immunity*, 27(1), pp.111-122.
- Büttner, R., Gosney, J., Skov, B., Adam, J., Motoi, N., Bloom, K., Dietel, M., Longshore, J., López-Ríos, F., Penault-Llorca, F., Viale, G., Wotherspoon, A., Kerr, K. and Tsao, M. (2017). Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry Testing: A Review of Analytical Assays and Clinical Implementation in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 35(34), pp.3867-3876.
- Calles, A., Liao, X., Sholl, L., Rodig, S., Freeman, G., Butaney, M., Lydon, C., Dahlberg, S., Hodi, F., Oxnard, G., Jackman, D. and Jänne, P. (2015). Expression of PD-1 and Its Ligands, PD-L1 and PD-L2, in Smokers and Never Smokers with KRAS-Mutant Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(12), pp.1726-1735.
- Capizzi, E., Ricci, C., Giunchi, F., Zagnoni, S., Ceccarelli, C., Gómez, B., Casolari, L., Gelsomino, F., Trisolini, R., Fiorentino, M. and Ardizzoni, A. (2018). Validation of the immunohistochemical expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) on cytological smears in advanced non small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 126, pp.9-14.
- Cardarella, S., Ogino, A., Nishino, M., Butaney, M., Shen, J., Lydon, C., Yeap, B., Sholl, L., Johnson, B. and Janne, P. (2013). Clinical, Pathologic, and Biologic Features Associated with BRAF Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(16), pp.4532-4540.
- Casadevall, D., Clavé, S., Taus, Á., Hardy-Werbin, M., Rocha, P., Lorenzo, M., Menéndez, S., Salido, M., Albanell, J., Pijuan, L. and Arriola, E. (2017). Heterogeneity of Tumor and Immune Cell PD-L1 Expression and Lymphocyte Counts in Surgical NSCLC Samples. *Clinical Lung Cancer*, 18(6), pp.682-691.e5.
- Cassidy, A., Myles, J., van Tongeren, M., Page, R., Liloglou, T., Duffy, S. and Field, J. (2007). The LLP risk model: an individual risk prediction model for lung cancer. *British Journal of Cancer*, 98(2), pp.270-276.
- Chae, Y., Arya, A., Iams, W., Cruz, M., Chandra, S., Choi, J. and Giles, F. (2018). Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 6(1).
- Chang, T., Jabs, C., Sobel, R., Kuchroo, V. and Sharpe, A. (1999). Studies in B7-Deficient Mice Reveal a Critical Role for B7 Costimulation in Both Induction and Effector Phases of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(5), pp.733-740.
- Chen, C., Chen, C., Wu, M. and Kuo, T. (1992). Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *British Journal of Cancer*, 66(5), pp.888-892.



- Chen, Y., Mu, C. and Huang, J. (2012). Clinical Significance of Programmed Death-1 Ligand-1 Expression in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: A 5-year-follow-up Study. *Tumori Journal*, 98(6), pp.751-755.
- Chen, N., Fang, W., Zhan, J., Hong, S., Tang, Y., Kang, S., Zhang, Y., He, X., Zhou, T., Qin, T., Huang, Y., Yi, X. and Zhang, L. (2015). Upregulation of PD-L1 by EGFR Activation Mediates the Immune Escape in EGFR-Driven NSCLC: Implication for Optional Immune Targeted Therapy for NSCLC Patients with EGFR Mutation. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(6), pp.910-923.
- Chen, Z., Mei, J., Liu, L., Wang, G., Li, Z., Hou, J., Zhang, Q., You, Z. and Zhang, L. (2016). PD-L1 expression is associated with advanced non-small cell lung cancer. *Oncology Letters*, 12(2), pp.921-927.
- Cooper, W., Tran, T., Vilain, R., Madore, J., Selinger, C., Kohonen-Corish, M., Yip, P., Yu, B., O'Toole, S., McCaughan, B., Yearley, J., Horvath, L., Kao, S., Boyer, M. and Scolyer, R. (2015). PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer*, 89(2), pp.181-188.
- Coté, M., Kardia, S., Wenzlaff, A., Ruckdeschel, J. and Schwartz, A. (2005). Risk of Lung Cancer Among White and Black Relatives of Individuals With Early-Onset Lung Cancer. *Journal of the American Medical Association*, 293(24), p.3036.
- Crane, C., Panner, A., Murray, J., Wilson, S., Xu, H., Chen, L., Simko, J., Waldman, F., Pieper, R. and Parsa, A. (2008). PI(3) kinase is associated with a mechanism of immunoresistance in breast and prostate cancer. *Oncogene*, 28(2), pp.306-312.
- Cree, I., Booton, R., Cane, P., Gosney, J., Ibrahim, M., Kerr, K., Lal, R., Lewanski, C., Navani, N., Nicholson, A., Nicolson, M. and Summers, Y. (2016). PD-L1 testing for lung cancer in the UK: recognizing the challenges for implementation. *Histopathology*, 69(2), pp.177-186.
- Darby, S., Hill, D., Auvinen, A., Barros-Dios, J., Baysson, H., Bochicchio, F., Deo, H., Falk, R., Forastiere, F., Hakama, M., Heid, I., Kreienbrock, L., Kreuzer, M., Lagarde, F., Mäkeläinen, I., Muirhead, C., Oberaigner, W., Pershagen, G., Ruano-Ravina, A., Ruosteenoja, E., Rosario, A., Tirmarche, M., Tomáscaron;ek, L., Whitley, E., Wichmann, H. and Doll, R. (2004). Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*, 330(7485), p.223.
- Davies, J., Patel, M., Gridelli, C., de Marinis, F., Waterkamp, D. and McCusker, M. (2017). Real-world treatment patterns for patients receiving second-line and third-line treatment for advanced non-small cell lung cancer: A systematic review of recently published studies. *PLOS ONE*, 12(4), p.e0175679.
- Detterbeck, F., Boffa, D., Kim, A. and Tanoue, L. (2017). The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest*, 151(1), pp.193-203.
- Dey, P. and Ghosh, R. (2018). Fine-needle aspiration cytology of non-small cell lung carcinoma: A paradigm shift. *Diagnostic Cytopathology*, 47(4), pp.351-358.
- D'Incecco, A., Andreozzi, M., Ludovini, V., Rossi, E., Capodanno, A., Landi, L., Tibaldi, C., Minuti, G., Salvini, J., Coppi, E., Chella, A., Fontanini, G., Filice, M., Tornillo, L., Incensati, R., Sani, S., Crinò, L., Terracciano, L. and Cappuzzo, F. (2014). PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *British Journal of Cancer*, 112(1), pp.95-102.

- Doll, R. and Hill, A. (1950). Smoking and Carcinoma of the Lung. *BMJ*, 2(4682), pp.739-748.
- Doll, R. and Peto, R. (1976). Mortality in relation to smoking: 20 years' observations on male British doctors. *BMJ*, 2(6051), pp.1525-1536.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. and Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine*, 5(12), pp.1365-1369.
- Dong, H., Strome, S., Salomao, D., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D., Roche, P., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V., Celis, E. and Chen, L. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*, 8(8), pp.793-800.
- Dong, Z., Liu, Y., Jiang, T., Hou, L., Wu, F., Gao, G., Li, X., Zhao, C., Wang, Y., Yang, S., Mao, S., Liu, Q., Li, Y., Xu, C., Wu, C., Ren, S., Zhou, C., Zhang, J. and Hirsch, F., 2020. Cell Block as a Surrogate for Programmed Death-Ligand 1 Staining Testing in Patients of Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Cancer*, 11(3), pp.551-558.
- Dovedi, S., Adlard, A., Lipowska-Bhalla, G., McKenna, C., Jones, S., Cheadle, E., Stratford, I., Poon, E., Morrow, M., Stewart, R., Jones, H., Wilkinson, R., Honeychurch, J. and Illidge, T. (2014). Acquired Resistance to Fractionated Radiotherapy Can Be Overcome by Concurrent PD-L1 Blockade. *Cancer Research*, 74(19), pp.5458-5468.
- Drake, C., Jaffee, E. and Pardoll, D. (2006). Mechanisms of Immune Evasion by Tumors. *Advances in Immunology*, pp.51-81.
- Driver, B., Miller, R., Miller, T., Deavers, M., Gorman, B., Mody, D., Ge, Y., Barrios, R., Bernicker, E., Kim, M. and Cagle, P. (2017). Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Expression in Either Tumor Cells or Tumor-Infiltrating Immune Cells Correlates With Solid and High-Grade Lung Adenocarcinomas. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 141(11), pp.1529-1532.
- Dunnill, M. and Gatter, K. (1986). Cellular heterogeneity in lung cancer. *Histopathology*, 10(5), pp.461-475.
- Ebbert, J., Yang, P., Vachon, C., Vierkant, R., Cerhan, J., Folsom, A. and Sellers, T. (2003). Lung Cancer Risk Reduction After Smoking Cessation: Observations From a Prospective Cohort of Women. *Journal of Clinical Oncology*, 21(5), pp.921-926.
- Eberhardt, W., Mitchell, A., Crowley, J., Kondo, H., Kim, Y., Turrisi, A., Goldstraw, P. and Rami-Porta, R. (2015). The IASLC Lung Cancer Staging Project. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(11), pp.1515-1522.
- Edlund, K., Madjar, K., Mattsson, J., Djureinovic, D., Lindskog, C., Brunnström, H., Koyi, H., Brandén, E., Jirstrom, K., Pontén, F., Rahnenführer, J., Micke, P. and Hengstler, J. (2019). Prognostic Impact of Tumor Cell Programmed Death Ligand 1 Expression and Immune Cell Infiltration in NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(4), pp.628-640.
- Engel, K., Moore, H. (2011). Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Preanalytical Variables and Immunohistochemistry*, 135(5), pp. 537-43.

- Eppihimer, M., Gunn, J., Freeman, G., Greenfield, E., Chernova, T., Erickson, J. and Leonard, J. (2002). Expression and Regulation of the PD-L1 Immunoinhibitory Molecule on Microvascular Endothelial Cells. *Microcirculation*, 9(2), pp.133-145.
- Esteban-Rodríguez, I., Ruiz Bravo-Burguillos, E., Rosas, R., Losantos, I., Rodríguez-Antolín, C. and de Castro, J., 2020. Expresión proteica de PD-L1 y datos clínico-patológicos en una cohorte de 53 pacientes con carcinoma de pulmón de célula no pequeña (CPCNP) operados. Concordancia entre clones (22C3 y 28-8) y entre observadores. Correlación y valor pronóstico de datos clínico-patológicos. *Revista Española de Patología*, 53(1), pp.10-18.
- Fehrenbacher, L., Spira, A., Ballinger, M., Kowanetz, M., Vansteenkiste, J., Mazieres, J., Park, K., Smith, D., Artal-Cortes, A., Lewanski, C., Braiteh, F., Waterkamp, D., He, P., Zou, W., Chen, D., Yi, J., Sandler, A. and Rittmeyer, A. (2016). Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *The Lancet*, 387(10030), pp.1837-1846.
- Fehrenbacher, L., von Pawel, J., Park, K., Rittmeyer, A., Gandara, D., Ponce Aix, S., Han, J., Gadgeel, S., Hida, T., Cortinovis, D., Cobo, M., Kowalski, D., De Marinis, F., Gandhi, M., Danner, B., Matheny, C., Kowanetz, M., He, P., Felizzi, F., Patel, H., Sandler, A., Ballinger, M. and Barlesi, F. (2018). Updated Efficacy Analysis Including Secondary Population Results for OAK: A Randomized Phase III Study of Atezolizumab versus Docetaxel in Patients with Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 13(8), pp.1156-1170.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D. and Bray, F. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), pp.E359-E386.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J., Comber, H., Forman, D. and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49(6), pp.1374-1403.
- Fischer, A., Schwartz, M., Moriarty, A., Wilbur, D., Souers, R., Fatheree, L., Booth, C., Clayton, A., Kurtyz, D., Padmanabhan, V. and Crothers, B. (2014). Immunohistochemistry Practices of Cytopathology Laboratories: A Survey of Participants in the College of American Pathologists Nongynecologic Cytopathology Education Program. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138(9), pp.1167-1172.
- Frampton, J. (2013). Crizotinib: A Review of Its Use in the Treatment of Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive, Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Drugs*, 73(18), pp.2031-2051.
- Francisci, S., Minicozzi, P., Pierannunzio, D., Ardanaz, E., Eberle, A., Grimsrud, T., Knijn, A., Pastorino, U., Salmerón, D., Trama, A., Sant, M., Hackl, M., Zielonke, N., Oberaigner, W., Van Eycken, E., Henau, K., Valerianova, Z., Dimitrova, N., Sekerija, M., Zvolný, M., Dušek, L., Storm, H., Engholm, G., Mägi, M., Aareleid, T., Malila, N., Seppä, K., Velten, M., Troussard, X., Bouvier, V., Launoy, G., Guizard, A., Faivre, J., Bouvier, A., Arveux, P., Maynadié, M., Woronoff, A., Robaszkievicz, M., Baldi, I., Monnereau, A., Tretarre, B., Bossard, N., Belot, A., Colonna, M., Molinié, F., Bara, S., Schwartz, C., Lapôtre-Ledoux, B., Grosclaude, P., Meyer, M., Stabenow, R., Luttmann, S., Eberle, A., Brenner, H., Nennecke, A., Engel, J., Schubert-Fritschle, G., Kieschke, J., Heidrich, J., Holleczeck, B., Katalinic, A., Jónasson, J., Tryggvadóttir, L.,

- Comber, H., Mazzoleni, G., Bulatko, A., Buzzoni, C., Giacomini, A., Suter Sardo, A., Mancuso, P., Ferretti, S., Crocetti, E., Caldarella, A., Gatta, G., Sant, M., Amash, H., Amati, C., Baili, P., Berrino, F., Bonfarnuzzo, S., Botta, L., Di Salvo, F., Foschi, R., Margutti, C., Meneghini, E., Minicozzi, P., Trama, A., Serraino, D., Dal Maso, L., De Angelis, R., Caldora, M., Capocaccia, R., Carrani, E., Francisci, S., Mallone, S., Pierannunzio, D., Roazzi, P., Rossi, S., Santaquilani, M., Tavilla, A., Pannoizzo, F., Busco, S., Bonelli, L., Vercelli, M., Gennaro, V., Ricci, P., Autelitano, M., Randi, G., Ponz De Leon, M., Marchesi, C., Cirilli, C., Fusco, M., Vitale, M., Usala, M., Traina, A., Staiti, R., Vitale, F., Ravazzolo, B., Michiara, M., Tumino, R., Giorgi Rossi, P., Di Felice, E., Falcini, F., Iannelli, A., Sechi, O., Cesaraccio, R., Piffer, S., Madeddu, A., Tisano, F., Maspero, S., Fanetti, A., Zanetti, R., Rosso, S., Candela, P., Scuderi, T., Stracci, F., Bianconi, F., Tagliabue, G., Contiero, P., Dei Tos, A., Guzzinati, S., Pildava, S., Smailyte, G., Calleja, N., Agius, D., Johannesen, T., Rachtan, J., Gózdź, S., Mezyk, R., Blaszczyk, J., Bebenek, M., Bielska-Lasota, M., Forjaz de Lacerda, G., Bento, M., Castro, C., Miranda, A., Mayer-da-Silva, A., Nicula, F., Coza, D., Safaei Diba, C., Primic-Zakelj, M., Almar, E., Ramírez, C., Errezola, M., Bidaurrazaga, J., Torrella-Ramos, A., Díaz García, J., Jimenez-Chillaron, R., Marcos-Gragera, R., Izquierdo Font, A., Sanchez, M., Chang, D., Navarro, C., Chirlaque, M., Moreno-Iribas, C., Ardanaz, E., Galceran, J., Carulla, M., Lambe, M., Khan, S., Mousavi, M., Bouchardy, C., Usel, M., Ess, S., Frick, H., Lorez, M., Ess, S., Herrmann, C., Bordoni, A., Spitale, A., Konzelmann, I., Aarts, M., Damhuis, R., Coleman, M., Allemani, C., Rachtan, B., Verne, J., Easey, N., Lawrence, G., Moran, T., Rashbass, J., Roche, M., Wilkinson, J., Gavin, A., Donnelly, C., Brewster, D., Huws, D., White, C. and Otter, R. (2015). Survival patterns in lung and pleural cancer in Europe 1999–2007: Results from the EURO CARE-5 study. *European Journal of Cancer*, 51(15), pp.2242-2253.
- Francisco, L., Sage, P. and Sharpe, A. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*, 236(1), pp.219-242.
- Freeman, G., Long, A., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M., Horton, H., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M., Carreno, B., Collins, M., Wood, C. and Honjo, T. (2000). Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(7), pp.1027-1034.
- Gailey, M., Stence, A., Jensen, C. and Ma, D. (2014). Multiplatform comparison of molecular oncology tests performed on cytology specimens and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Cancer Cytopathology*, 123(1), pp.30-39.
- Garon, E., Rizvi, N., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A., Eder, J., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M., Felip, E., Lee, J., Hellmann, M., Hamid, O., Goldman, J., Soria, J., Dolled-Filhart, M., Rutledge, R., Zhang, J., Luceford, J., Rangwala, R., Lubiniecki, G., Roach, C., Emancipator, K. and Gandhi, L. (2015). Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 372(21), pp.2018-2028.
- Gao, Y., Yang, J., Cai, Y., Fu, S., Zhang, N., Fu, X. and Li, L. (2018). IFN- $\gamma$ -mediated inhibition of lung cancer correlates with PD-L1 expression and is regulated by PI3K-AKT signaling. *International Journal of Cancer*, 143(4), pp.931-943.
- Garcia-Diaz, A., Shin, D., Moreno, B., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G., Zaretsky, J., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., Parisi, G., Saus, C., Torrejon, D., Graeber, T., Comin-Anduix, B., Hu-Lieskovan, S., Damschroder, R., Lo, R. and Ribas, A.

- (2017). Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*, 19(6), pp.1189-1201.
- Gettinger, S., Rizvi, N., Chow, L., Borghaei, H., Brahmer, J., Ready, N., Gerber, D., Shepherd, F., Antonia, S., Goldman, J., Juergens, R., Laurie, S., Nathan, F., Shen, Y., Harbison, C. and Hellmann, M. (2016). Nivolumab Monotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 34(25), pp.2980-2987
- Gibb, H., Lees, P., Pinsky, P. and Rooney, B. (2000). Lung cancer among workers in chromium chemical production. *American Journal of Industrial Medicine*, 38(5), pp.606-606.
- Giancchetti, E., Delfino, D. and Fierabracci, A. (2013). Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 12(11), pp.1091-1100.
- Gniadek, T., Li, Q., Tully, E., Chatterjee, S., Nimmagadda, S. and Gabrielson, E. (2017). Heterogeneous expression of PD-L1 in pulmonary squamous cell carcinoma and adenocarcinoma: implications for assessment by small biopsy. *Modern Pathology*, 30(4), pp.530-538.
- Gray, J. (2003). Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors. *Cancer Cell*, 4(1), pp.4-6.
- Gray, J., Villegas, A., Daniel, D., Vicente, D., Murakami, S., Hui, R., Kurata, T., Chiappori, A., Lee, K., Cho, B., Planchard, D., Paz-Ares, L., Faivre-Finn, C., Vansteenkiste, J., Spigel, D., Wadsworth, C., Taboada, M., Dennis, P., Ozguroglu, M., Antonia, S. (2019). Three-year overall survival update from the PACIFIC trial. *Journal of Clinical Oncology*. 37 (suppl; abstr 8526).
- Griesinger, F., Eberhardt, W., Früh, M., Gautschi, O., Hilbe, W., Hoffmann, H., Huber, R., Pirker, R., Pöttgen, C., Pritzkeleit, R., Reck, M., Reinmuth, N., Sebastian, M., Ukena, D., Waller, C., Wolf, J., Wolf, M., Wörman, B. (2018) DGHO-Empfehlung zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen: Leitlinie ICD10: C34.-Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC). [www.onkopedia.com](http://www.onkopedia.com). Zugegriffen: 17.09. 2019.
- Grimrud, T., Berge, S., Haldersen, T. and Andersen, A. (2002). Exposure to Different Forms of Nickel and Risk of Lung Cancer. *American Journal of Epidemiology*, 156(12), pp.1123-1132.
- Go, H., Kim, D., Kim, D., Keam, B., Kim, T., Lee, S., Heo, D., Bang, Y. and Chung, D. (2013). Clinicopathologic Analysis of ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer and Proposal of a Diagnostic Algorithm. *Journal of Thoracic Oncology*, 8(11), pp.1445-1450.
- Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W., Nicholson, A., Groome, P., Mitchell, A., Bolejack, V., Goldstraw, P., Rami-Porta, R., Asamura, H., Ball, D., Beer, D., Beyruti, R., Bolejack, V., Chansky, K., Crowley, J., Detterbeck, F., Erich Eberhardt, W., Edwards, J., Galateau-Sallé, F., Giroux, D., Gleeson, F., Groome, P., Huang, J., Kennedy, C., Kim, J., Kim, Y., Kingsbury, L., Kondo, H., Krasnik, M., Kubota, K., Lerut, A., Lyons, G., Marino, M., Marom, E., van Meerbeeck, J., Mitchell, A., Nakano, T., Nicholson, A., Nowak, A., Peake, M., Rice, T., Rosenzweig, K., Ruffini, E., Rusch, V., Saijo, N., Van Schil, P., Sculier, J., Shemanski, L., Stratton, K., Suzuki, K., Tachimori, Y., Thomas, C., Travis, W., Tsao, M., Turrisi, A., Vansteenkiste, J., Watanabe, H., Wu, Y., Baas, P., Erasmus, J.,

- Hasegawa, S., Inai, K., Kernstine, K., Kindler, H., Krug, L., Nackaerts, K., Pass, H., Rice, D., Falkson, C., Filosso, P., Giaccone, G., Kondo, K., Lucchi, M., Okumura, M., Blackstone, E., Abad Cavaco, F., Ansótegui Barrera, E., Abal Arca, J., Parente Lamelas, I., Arnau Obrer, A., Guijarro Jorge, R., Ball, D., Bascom, G., Blanco Orozco, A., González Castro, M., Blum, M., Chimondeguy, D., Cvijanovic, V., Defranchi, S., de Olaiz Navarro, B., Escobar Campuzano, I., Macía Vidueira, I., Fernández Araujo, E., Andreo García, F., Fong, K., Francisco Corral, G., Cerezo González, S., Freixinet Gilart, J., García Arangüena, L., García Barajas, S., Girard, P., Goksel, T., González Budiño, M., González Casaurrán, G., Gullón Blanco, J., Hernández Hernández, J., Hernández Rodríguez, H., Herrero Collantes, J., Iglesias Heras, M., Izquierdo Elena, J., Jakobsen, E., Kostas, S., León Atance, P., Núñez Ares, A., Liao, M., Losanovsky, M., Lyons, G., Magaroles, R., De Esteban Júlvez, L., Mariñán Gorospe, M., McCaughan, B., Kennedy, C., Melchor Íñiguez, R., Miravet Sorribes, L., Naranjo Gozalo, S., Álvarez de Arriba, C., Núñez Delgado, M., Padilla Alarcón, J., Peñalver Cuesta, J., Park, J., Pass, H., Pavón Fernández, M., Rosenberg, M., Ruffini, E., Rusch, V., Sánchez de Cos Escuín, J., Saura Vinueza, A., Serra Mitjans, M., Strand, T., Subotic, D., Swisher, S., Terra, R., Thomas, C., Tournoy, K., Van Schil, P., Velasquez, M., Wu, Y. and Yokoi, K. (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(1), pp.39-51.
- Gosney, J., Boothman, A., Ratcliffe, M. and Kerr, K., 2020. Cytology for PD-L1 testing: A systematic review. *Lung Cancer*, 141, pp.101-106.
- Grillo, F., Pigozzi, S., Ceriolo, P., Calamaro, P., Fiocca, R. and Mastracci, L. (2015). Factors affecting immunoreactivity in long-term storage of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Histochemistry and Cell Biology*, 144(1), pp.93-99.
- Haiman, C., Stram, D., Wilkens, L., Pike, M., Kolonel, L., Henderson, B. and Marchand, L. (2006). Ethnic and Racial Differences in the Smoking-Related Risk of Lung Cancer. *Obstetrics & Gynecology*, 107(4), p.951.
- Haragan, A., Field, J., Davies, M., Escriu, C., Gruver, A. and Gosney, J. (2019). Heterogeneity of PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Implications for specimen sampling in predicting treatment response. *Lung Cancer*, 134, pp.79-84.
- Harris, J., Thun, M., Mondul, A. and Calle, E. (2004). Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8. *BMJ*, 328(7431), pp.72-0.
- Hasanovic, A., Rekhtman, N., Sigel, C. and Moreira, A. (2011). Advances in Fine Needle Aspiration Cytology for the Diagnosis of Pulmonary Carcinoma. *Pathology Research International*, 2011, pp.1-7.
- Hegmann, K., Fraser, A., Keaney, R., Moser, S., Nilasena, D., Sedlars, M., Higham-Gren, L. and Lyon, J. (1993). The Effect of Age at Smoking Initiation on Lung Cancer Risk. *Epidemiology*, 4(5), pp.444-448.
- Hendry, S., Byrne, D., Christie, M., Steinfort, D., Irving, L., Wagner, C., Ellwood, T., Cooper, W. and Fox, S., 2020. Adequate tumour cellularity is essential for accurate PD -L1 immunohistochemistry assessment on cytology cell-block specimens. *Cytopathology*, 31(2), pp.90-95.
- Herbst, R., Heymach, J. and Lippman, S. (2008). Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(13), pp.1367-1380.

- Herbst, R., Baas, P., Kim, D., Felip, E., Pérez-Gracia, J., Han, J., Molina, J., Kim, J., Arvis, C., Ahn, M., Majem, M., Fidler, M., de Castro, G., Garrido, M., Lubiniecki, G., Shentu, Y., Im, E., Dolled-Filhart, M. and Garon, E. (2016). Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *The Lancet*, 387(10027), pp.1540-1550.
- Hernandez, A., Brandler, T., Zhou, F., Moreira, A., Schatz-Siemers, N. and Simsir, A. (2018). Assessment of Programmed Death–Ligand 1 (PD-L1) Immunohistochemical Expression on Cytology Specimens in Non–Small Cell Lung Carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 151(4), pp.403-415.
- Heymann, J., Bulman, W., Swinarski, D., Pagan, C., Crapanzano, J., Haghighi, M., Fazlollahi, L., Stoopler, M., Sonett, J., Sacher, A., Shu, C., Rizvi, N. and Saqi, A. (2017). PD-L1 expression in non-small cell lung carcinoma: Comparison among cytology, small biopsy, and surgical resection specimens. *Cancer Cytopathology*, 125(12), pp.896-907.
- Hirsch, F., McElhinny, A., Stanforth, D., Ranger-Moore, J., Jansson, M., Kulangara, K., Richardson, W., Towne, P., Hanks, D., Vennapusa, B., Mistry, A., Kalamegham, R., Averbuch, S., Novotny, J., Rubin, E., Emancipator, K., McCaffery, I., Williams, J., Walker, J., Longshore, J., Tsao, M. and Kerr, K. (2017). PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(2), pp.208-222.
- Hoffmann, D., Hoffmann, I. and El-Bayoumy, K. (2001). The Less Harmful Cigarette: A Controversial Issue. A Tribute to Ernst L. Wynder. *Chemical Research in Toxicology*, 14(7), pp.767-790.
- Horn, L., Spigel, D., Vokes, E., Holgado, E., Ready, N., Steins, M., Poddubskaya, E., Borghaei, H., Felip, E., Paz-Ares, L., Pluzanski, A., Reckamp, K., Burgio, M., Kohlhäufel, M., Waterhouse, D., Barlesi, F., Antonia, S., Arrieta, O., Fayette, J., Crinò, L., Rizvi, N., Reck, M., Hellmann, M., Geese, W., Li, A., Blackwood-Chirchir, A., Healey, D., Brahmer, J. and Eberhardt, W. (2017). Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer: Two-Year Outcomes From Two Randomized, Open-Label, Phase III Trials (CheckMate 017 and CheckMate 057). *Journal of Clinical Oncology*, 35(35), pp.3924-3933.
- Hubbard, R., Venn, A., Lewis, S. and Britton, J. (2000). Lung Cancer and Cryptogenic Fibrosing Alveolitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(1), pp.5-8.
- Ilie, M., Long-Mira, E., Bence, C., Butori, C., Lassalle, S., Bouhlef, L., Fazzalari, L., Zahaf, K., Lalvée, S., Washetine, K., Mouroux, J., Vénissac, N., Poudenx, M., Otto, J., Sabourin, J., Marquette, C., Hofman, V. and Hofman, P. (2015). Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Annals of Oncology*, 27(1), pp.147-153.
- Ilie, M., Juco, J., Huang, L., Hofman, V., Khambata-Ford, S. and Hofman, P. (2018). Use of the 22C3 anti-programmed death-ligand 1 antibody to determine programmed death-ligand 1 expression in cytology samples obtained from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Cytopathology*, 126(4), pp.264-274.

- Inamura, K., Takeuchi, K., Togashi, Y., Nomura, K., Ninomiya, H., Okui, M., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Soda, M., Lim Choi, Y., Niki, T., Mano, H. and Ishikawa, Y. (2008). EML4-ALK Fusion Is Linked to Histological Characteristics in a Subset of Lung Cancers. *Journal of Thoracic Oncology*, 3(1), pp.13-17.
- Inamura, K., Yokouchi, Y., Sakakibara, R., Kobayashi, M., Subat, S., Ninomiya, H., Nagano, H., Nomura, K., Okumura, S. and Ishikawa, Y. (2016). Relationship of tumor PD-L1 expression with EGFR wild-type status and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 46(10), pp.935-941.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal*, 11(11), pp.3887-3895.
- Jain, D., Sukumar, S., Mohan, A. and Iyer, V. (2018). Programmed death-ligand 1 immunoexpression in matched biopsy and liquid-based cytology samples of advanced stage non-small cell lung carcinomas. *Cytopathology*, 29(6), pp.550-557.
- Janerich, D., Thompson, W., Varela, L., Greenwald, P., Chorost, S., Tucci, C., Zaman, M., Melamed, M., Kiely, M. and McKneally, M. (1990). Lung Cancer and Exposure to Tobacco Smoke in the Household. *New England Journal of Medicine*, 323(10), pp.632-636.
- Kadota, K., Nitadori, J., Woo, K., Sima, C., Finley, D., Rusch, V., Adusumilli, P. and Travis, W. (2014). Comprehensive Pathological Analyses in Lung Squamous Cell Carcinoma: Single Cell Invasion, Nuclear Diameter, and Tumor Budding Are Independent Prognostic Factors for Worse Outcomes. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(8), pp.1126-1139.
- Karachaliou, N., Gonzalez-Cao, M., Crespo, G., Drozdowskyj, A., Aldeguer, E., Gimenez-Capitan, A., Teixido, C., Molina-Vila, M., Viteri, S., De Los Llanos Gil, M., Algarra, S., Perez-Ruiz, E., Marquez-Rodas, I., Rodriguez-Abreu, D., Blanco, R., Puertolas, T., Royo, M. and Rosell, R. (2018). Interferon gamma, an important marker of response to immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer and melanoma patients. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 10, p.175883401774974.
- Keir, M., Liang, S., Guleria, I., Latchman, Y., Qipo, A., Albacker, L., Koulmanda, M., Freeman, G., Sayegh, M. and Sharpe, A. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(4), pp.883-895.
- Keir, M., Butte, M., Freeman, G. and Sharpe, A. (2008). PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology*, 26(1), pp.677-704.
- Kelley, M. and McCrory, D. (2003). Prevention of Lung Cancer\*. *Chest*, 123(1), pp.50S-59S.
- Kim, M., Koh, J., Kim, S., Go, H., Jeon, Y. and Chung, D. (2015). Clinicopathological analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in pulmonary squamous cell carcinoma: Comparison with tumor-infiltrating T cells and the status of oncogenic drivers. *Lung Cancer*, 88(1), pp.24-33.
- Kim, H., Cha, Y., Hong, M., Gandhi, M., Levinson, S., Jung, I., Lee, J., Lee, C., Cho, B., Ha, S. and Shim, H. (2017). Concordance of programmed death-ligand 1 expression



- between primary and metastatic non-small cell lung cancer by immunohistochemistry and RNA *in situ* hybridization. *Oncotarget*, 8(50).
- Kitazono, S., Fujiwara, Y., Tsuta, K., Utsumi, H., Kanda, S., Horinouchi, H., Nokihara, H., Yamamoto, N., Sasada, S., Watanabe, S., Asamura, H., Tamura, T. and Ohe, Y. (2015). Reliability of Small Biopsy Samples Compared With Resected Specimens for the Determination of Programmed Death-Ligand 1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, 16(5), pp.385-390.
- Krawczyk, P., Jarosz, B., Kucharczyk, T., Grenda, A., Reszka, K., Pankowski, J., Wojas-Krawczyk, K., Nicoś, M., Szumiło, J., Trojanowski, T. and Milanowski, J. (2017). Immunohistochemical assays incorporating SP142 and 22C3 monoclonal antibodies for detection of PD-L1 expression in NSCLC patients with known status of *EGFR* and *ALK* genes. *Oncotarget*, 8(38).
- Kreyberg, L. (1955). Lung Cancer and Tobacco Smoking in Norway. *British Journal of Cancer*, 9(4), pp.495-510.
- Konishi, J., Yamazaki, K., Azuma, M., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H. and Nishimura, M. (2004). B7-H1 Expression on Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Its Relationship with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their PD-1 Expression. *Clinical Cancer Research*, 10(15), pp.5094-5100.
- Kuempers, C., van der Linde, L., Reischl, M., Vogel, W., Stellmacher, F., Reck, M., Heigener, D., Rabe, K., Kirfel, J., Perner, S. and Welker, L. (2019). Comparison of PD-L1 expression between paired cytologic and histologic specimens from non-small cell lung cancer patients. *Virchows Archiv*.
- Kythreotou, A., Siddique, A., Mauri, F., Bower, M. and Pinato, D. (2017). PD-L1. *Journal of Clinical Pathology*, 71(3), pp.189-194.
- Lacour, M., Hiltbrunner, S., Lee, S., Soltermann, A., Rushing, E., Soldini, D., Weder, W. and Curioni-Fontecedro, A. (2019). Adjuvant Chemotherapy Increases Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Expression in Non-small Cell Lung Cancer Recurrence. *Clinical Lung Cancer*, 20(5), pp.391-396.
- Lafuente-Sanchis, A., Zúñiga, Á., Estors, M., Martínez-Hernández, N., Cremades, A., Cuenca, M. and Galbis, J. (2017). Association of PD-1, PD-L1, and CTLA-4 Gene Expression and Clinicopathologic Characteristics in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, 18(2), pp.e109-e116.
- Latchman, Y., Wood, C., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A., Brown, J., Nunes, R., Greenfield, E., Bourque, K., Boussiotis, V., Carter, L., Carreno, B., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A. and Freeman, G. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, 2(3), pp.261-268.
- Lee, S., Jang, B., Lee, S., Yang, Y., Suh, S., Park, Y., Oh, S., Shin, J., Yao, S., Chen, L. and Choi, I. (2006). Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN- $\gamma$ -induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Letters*, 580(3), pp.755-762.
- Li, C., Huang, C., Mok, T., Zhuang, W., Xu, H., Miao, Q., Fan, X., Zhu, W., Huang, Y., Lin, X., Jiang, K., Hu, D., Chen, X., Huang, P. and Lin, G. (2017). Comparison of 22C3 PD-L1 Expression between Surgically Resected Specimens and Paired Tissue

- Microarrays in Non–Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(10), pp.1536-1543.
- Lissowska, J., Bardin-Mikolajczak, A., Fletcher, T., Zaridze, D., Szeszenia-Dabrowska, N., Rudnai, P., Fabianova, E., Cassidy, A., Mates, D., Holcatova, I., Vitova, V., Janout, V., Mannetje, A., Brennan, P. and Boffetta, P. (2005). Lung Cancer and Indoor Pollution from Heating and Cooking with Solid Fuels. *American Journal of Epidemiology*, 162(4), pp.326-333.
- Liu, J., Hamrouni, A., Wolowiec, D., Coiteux, V., Kuliczowski, K., Hetuin, D., Saudemont, A. and Quesnel, B. (2007). Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*, 110(1), pp.296-304.
- Lloyd, I., Zhou, W., Witt, B. and Chadwick, B. (2019). Characterization of PD-L1 Immunohistochemical Expression in Cell Blocks With Different Specimen Fixation and Processing Methods. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 27(2), pp.107-113.
- Lubin, J., Boice, J., Edling, C., Hornung, R., Howe, G., Kunz, E., Kusiak, R., Morrison, H., Radford, E., Samet, J., Tirmarche, M., Woodward, A., Yao, S. and Pierce, D. (1995). Lung Cancer in Radon-Exposed Miners and Estimation of Risk From Indoor Exposure. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 87(11), pp.817-827.
- Mahoney, K., Freeman, G. and McDermott, D. (2015a). The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. *Clinical Therapeutics*, 37(4), pp.764-782.
- Mahoney, K., Sun, H., Liao, X., Hua, P., Callea, M., Greenfield, E., Hodi, F., Sharpe, A., Signoretti, S., Rodig, S. and Freeman, G. (2015b). PD-L1 Antibodies to Its Cytoplasmic Domain Most Clearly Delineate Cell Membranes in Immunohistochemical Staining of Tumor Cells. *Cancer Immunology Research*, 3(12), pp.1308-1315.
- Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., Boffetta, P., Levi, F., La Vecchia, C. and Negri, E. (2019). European cancer mortality predictions for the year 2019 with focus on breast cancer. *Annals of Oncology*, 30(5), pp.781-787.
- Mancuso, T. (1980). Mortality study of beryllium industry workers occupational lung cancer. *Environmental Research*, 21(1), pp.48-55.
- Mansfield, A., Aubry, M., Moser, J., Harrington, S., Dronca, R., Park, S. and Dong, H. (2016). Temporal and spatial discordance of programmed cell death-ligand 1 expression and lymphocyte tumor infiltration between paired primary lesions and brain metastases in lung cancer. *Annals of Oncology*, 27(10), pp.1953-1958
- Marchetti, A., Felicioni, L., Malatesta, S., Grazia Sciarrotta, M., Guetti, L., Chella, A., Viola, P., Pullara, C., Mucilli, F. and Buttitta, F. (2011). Clinical Features and Outcome of Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer Harboring BRAF Mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 29(26), pp.3574-3579.
- Marusyk, A. and Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1805(1), pp.105-117.
- Masuda, N., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Monden, M. and Okubo, K. (1999). Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of

- molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Research*, 27(22), pp.4436-4443.
- Mattson, M., Pollack, E. and Cullen, J. (1987). What are the odds that smoking will kill you?. *American Journal of Public Health*, 77(4), pp.425-431.
- Mazanet, M. and Hughes, C. (2002). B7-H1 Is Expressed by Human Endothelial Cells and Suppresses T Cell Cytokine Synthesis. *The Journal of Immunology*, 169(7), pp.3581-3588.
- McLaughlin, J., Han, G., Schalper, K., Carvajal-Hausdorf, D., Pelekanou, V., Rehman, J., Velcheti, V., Herbst, R., LoRusso, P. and Rimm, D. (2016). Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncology*, 2(1), p.46.
- Merlo, L., Pepper, J., Reid, B. and Maley, C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer*, 6(12), pp.924-935.
- Michels, S. and Wolf, J. (2016). Stratified Treatment in Lung Cancer. *Oncology Research and Treatment*, 39(12), pp.760-766.
- Michor, F., Iwasa, Y. and Nowak, M. (2004). Dynamics of cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 4(3), pp.197-205.
- Mimura, K., Teh, J., Okayama, H., Shiraishi, K., Kua, L., Koh, V., Smoot, D., Ashktorab, H., Oike, T., Suzuki, Y., Fazreen, Z., Asuncion, B., Shabbir, A., Yong, W., So, J., Soong, R. and Kono, K. (2017). PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Science*, 109(1), pp.43-53.
- Mineura, K., Hamaji, M., Yoshizawa, A., Nakajima, N., Kayawake, H., Tanaka, S., Yamada, Y., Yutaka, Y., Nakajima, D., Ohsumi, A., Menju, T., Chen-Yoshikawa, T. and Date, H., 2020. Diagnostic yield of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration to assess tumor-programmed cell death ligand-1 expression in mediastinal lymph nodes metastasized from non-small cell lung cancer. *Surgery Today*.
- Moriki, T., Takahashi, T., Ueta, S., Mitani, M. and Ichien, M. (2004). Hormone receptor status and HER2/neu overexpression determined by automated immunostainer on routinely fixed cytologic specimens from breast carcinoma: Correlation with histologic sections determinations and diagnostic pitfalls. *Diagnostic Cytopathology*, 30(4), pp.251-256.
- Mountain, C. (1997). Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*, 111(6), pp.1710-1717.
- Mu, C., Huang, J., Chen, Y., Chen, C. and Zhang, X. (2010). High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Medical Oncology*, 28(3), pp.682-688.
- Munari, E., Zamboni, G., Marconi, M., Sommaggio, M., Brunelli, M., Martignoni, G., Netto, G., Moretta, F., Mingari, M., Salgarello, M., Terzi, A., Picece, V., Pomari, C., Lunardi, G., Cavazza, A., Rossi, G., Moretta, L. and Bogina, G. (2017). PD-L1 expression heterogeneity in non-small cell lung cancer: evaluation of small biopsies reliability. *Oncotarget*, 8(52).

- Munari, E., Zamboni, G., Lunardi, G., Marconi, M., Sommaggio, M., Brunelli, M., Martignoni, G., Netto, G., Hoque, M., Moretta, F., Mingari, M., Pegoraro, M., Mariotti, F., Vacca, P., Moretta, L. and Bogina, G. (2018a). PD-L1 expression comparison between primary and relapsed non-small cell lung carcinoma using whole sections and clone SP263. *Oncotarget*, 9(54). pp.30465-30471
- Munari, E., Zamboni, G., Lunardi, G., Marchionni, L., Marconi, M., Sommaggio, M., Brunelli, M., Martignoni, G., Netto, G., Hoque, M., Moretta, F., Mingari, M., Pegoraro, M., Inno, A., Paiano, S., Terzi, A., Cavazza, A., Rossi, G., Mariotti, F., Vacca, P., Moretta, L. and Bogina, G. (2018b). PD-L1 Expression Heterogeneity in Non-Small Cell Lung Cancer: Defining Criteria for Harmonization between Biopsy Specimens and Whole Sections. *Journal of Thoracic Oncology*, 13(8), pp.1113-1120.
- Munari, E., Zamboni, G., Sighele, G., Marconi, M., Sommaggio, M., Lunardi, G., Rossi, G., Cavazza, A., Moretta, F., Gilioli, E., Caliò, A., Netto, G., Hoque, M., Martignoni, G., Brunelli, M., Vacca, P., Moretta, L. and Bogina, G. (2019). Expression of programmed cell death ligand 1 in non-small cell lung cancer: Comparison between cytologic smears, core biopsies, and whole sections using the SP263 assay. *Cancer Cytopathology*, 127(1), pp.52-61.
- Nallasamy, P., Chava, S., Verma, S., Mishra, S., Gorantla, S., Coulter, D., Byrareddy, S., Batra, S., Gupta, S. and Challagundla, K. (2017). PD-L1, inflammation, non-coding RNAs, and neuroblastoma: Immuno-oncology perspective. *Seminars in Cancer Biology*, 52, pp.53-65.
- Nakamura, S., Hayashi, K., Imaoka, Y., Kitamura, Y., Akazawa, Y., Tabata, K., Groen, R., Tsuchiya, T., Yamasaki, N., Nagayasu, T. and Fukuoka, J. (2017). Intratumoral heterogeneity of programmed cell death ligand-1 expression is common in lung cancer. *PLOS ONE*, 12(10), p.e0186192.
- Nawrot, T., Plusquin, M., Hogervorst, J., Roels, H., Celis, H., Thijs, L., Vangronsveld, J., Van Hecke, E. and Staessen, J. (2006). Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *The Lancet Oncology*, 7(2), pp.119-126.
- Neuman, T., London, M., Kania-Almog, J., Litvin, A., Zohar, Y., Fridel, L., Sandbank, J., Barshak, I. and Vainer, G. (2016). A Harmonization Study for the Use of 22C3 PD-L1 Immunohistochemical Staining on Ventana's Platform. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(11), pp.1863-1868.
- Nicholson, A., Chansky, K., Crowley, J., Beyruti, R., Kubota, K., Turrisi, A., Eberhardt, W., van Meerbeeck, J., Rami-Porta, R., Goldstraw, P., Rami-Porta, R., Asamura, H., Ball, D., Beer, D., Beyruti, R., Bolejack, V., Chansky, K., Crowley, J., Detterbeck, F., Erich Eberhardt, W., Edwards, J., Galateau-Sallé, F., Giroux, D., Gleeson, F., Groome, P., Huang, J., Kennedy, C., Kim, J., Kim, Y., Kingsbury, L., Kondo, H., Krasnik, M., Kubota, K., Lerut, T., Lyons, G., Marino, M., Marom, E., van Meerbeeck, J., Mitchell, A., Nakano, T., Nicholson, A., Nowak, A., Peake, M., Rice, T., Rosenzweig, K., Ruffini, E., Rusch, V., Saijo, N., Van Schil, P., Sculier, J., Shemanski, L., Stratton, K., Suzuki, K., Tachimori, Y., Thomas, C., Travis, W., Tsao, M., Turrisi, A., Vansteenkiste, J., Watanabe, H., Wu, Y., Baas, P., Erasmus, J., Hasegawa, S., Inai, K., Kernstine, K., Kindler, H., Krug, L., Nackaerts, K., Pass, H., Rice, D., Falkson, C., Filosso, P., Giaccone, G., Kondo, K., Lucchi, M., Okumura, M., Blackstone, E., Cavaco, F., Barrera, E., Arca, J., Lamelas, I., Obrer, A., Jorge, R., Ball, D., Bascom, G., Blanco Orozco, A., González Castro, M., Blum, M., Chimondeguy, D., Cvijanovic,

- V., Defranchi, S., de Olaiz Navarro, B., Escobar Campuzano, I., Vidueira, I., Araujo, E., García, F., Fong, K., Corral, G., González, S., Gilart, J., Arangüena, L., Barajas, S., Girard, P., Goksel, T., González Budiño, M., González Casaurrán, G., Gullón Blanco, J., Hernández Hernández, J., Rodríguez, H., Collantes, J., Heras, M., Izquierdo Elena, J., Jakobsen, E., Kostas, S., Atance, P., Ares, A., Liao, M., Losanovscky, M., Lyons, G., Magaroles, R., De Esteban Júlvez, L., Gorospe, M., McCaughan, B., Kennedy, C., Melchor Íñiguez, R., Miravet Sorribes, L., Naranjo Gozalo, S., de Arriba, C., Núñez Delgado, M., Alarcón, J., Peñalver Cuesta, J., Park, J., Pass, H., Pavón Fernández, M., Rosenberg, M., Rusch, V., de Cos Escuín, J., Vinuesa, A., Serra Mitjans, M., Strand, T., Subotic, D., Swisher, S., Terra, R., Thomas, C., Tournoy, K., Van Schil, P., Velasquez, M., Wu, Y. and Yokoi, K. (2016). The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the Clinical and Pathologic Staging of Small Cell Lung Cancer in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(3), pp.300-311.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. and Honjo, T. (1999). Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity*, 11(2), pp.141-151.
- Noll, B., Wang, W., Gong, Y., Zhao, J., Kalhor, N., Prieto, V., Staerckel, G. and Roy-Chowdhuri, S. (2018). Programmed death ligand 1 testing in non-small cell lung carcinoma cytology cell block and aspirate smear preparations. *Cancer Cytopathology*, 126(5), pp.342-352.
- Noone, A., Cronin, K., Altekruse, S., Howlander, N., Lewis, D., Petkov, V. and Penberthy, L. (2016). Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992–2013. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 26(4), pp.632-641.
- Novello, S., Barlesi, F., Califano, R., Cufer, T., Ekman, S., Levra, M., Kerr, K., Popat, S., Reck, M., Senan, S., Simo, G., Vansteenkiste, J. and Peters, S. (2016). Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*, 27(suppl\_5), pp.v1-v27.
- Okita, R., Maeda, A., Shimizu, K., Nojima, Y., Saisho, S. and Nakata, M. (2017). PD-L1 overexpression is partially regulated by EGFR/HER2 signaling and associated with poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(7), pp.865-876.
- Ota, K., Azuma, K., Kawahara, A., Hattori, S., Iwama, E., Tanizaki, J., Harada, T., Matsumoto, K., Takayama, K., Takamori, S., Kage, M., Hoshino, T., Nakanishi, Y. and Okamoto, I. (2015). Induction of PD-L1 Expression by the EML4-ALK Oncoprotein and Downstream Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(17), pp.4014-4021.
- Paik, P., Arcila, M., Fara, M., Sima, C., Miller, V., Kris, M., Ladanyi, M. and Riely, G. (2011). Clinical Characteristics of Patients With Lung Adenocarcinomas Harboring BRAF Mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), pp.2046-2051.
- Pai-Scherf, L., Blumenthal, G., Li, H., Subramaniam, S., Mishra-Kalyani, P., He, K., Zhao, H., Yu, J., Paciga, M., Goldberg, K., McKee, A., Keegan, P. and Pazdur, R. (2017). FDA Approval Summary: Pembrolizumab for Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: First-Line Therapy and Beyond. *The Oncologist*, 22(11), pp.1392-1399.

- Pan, Z., Ye, F., Wu, X., An, H., Wu, J. (2015). Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand1 (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Journal of Thoracic Disease*, 7(3), pp. 462-70.
- Pardoll, D. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), pp.252-264.
- Park, C., Bissell, M. and Barcellos-Hoff, M. (2000). The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Molecular Medicine Today*, 6(8), pp.324-329.
- Parkin, D., Pisani, P., Lopez, A. and Masuyer, E. (1994). At least one in seven cases of cancer is caused by smoking. Global estimates for 1985. *International Journal of Cancer*, 59(4), pp.494-504.
- Parkin, D., Bray, F. and Devesa, S. (2001). Cancer burden in the year 2000. The global picture. *European Journal of Cancer*, 37, pp.4-66.
- Parkin, D., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. (2005). Global Cancer Statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(2), pp.74-108.
- Paulsen, E., Kilvaer, T., Rakae, M., Richardsen, E., Hald, S., Andersen, S., Busund, L., Bremnes, R. and Donnem, T. (2017). CTLA-4 expression in the non-small cell lung cancer patient tumor microenvironment: diverging prognostic impact in primary tumors and lymph node metastases. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(11), pp.1449-1461.
- Peto, R. (2000). Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ*, 321(7257), pp.323-329.
- Polyak, K., Haviv, I. and Campbell, I. (2009). Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends in Genetics*, 25(1), pp.30-38.
- Pope III, C., Burnett, R., Thun, M., Calle, E., Krewski, D., Ito, K. and Thurston, G. (2002). Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-term Exposure to Fine Particulate Air Pollution. *Journal of the American Medical Association*, 287(9), p.1132.
- Postmus, P., Kerr, K., Oudkerk, M., Senan, S., Waller, D., Vansteenkiste, J., Escriu, C. and Peters, S. (2017). Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*, 28(suppl\_4), pp.iv1-iv21.
- Pratilas, C., Hanrahan, A., Halilovic, E., Persaud, Y., Soh, J., Chitale, D., Shigematsu, H., Yamamoto, H., Sawai, A., Janakiraman, M., Taylor, B., Pao, W., Toyooka, S., Ladanyi, M., Gazdar, A., Rosen, N. and Solit, D. (2008). Genetic Predictors of MEK Dependence in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, 68(22), pp.9375-9383.
- Puri, S. and Shafique, M., 2020. Combination checkpoint inhibitors for treatment of non-small-cell lung cancer: an update on dual anti-CTLA-4 and anti-PD-1/PD-L1 therapies. *Drugs in Context*, 9, pp.1-11.

- Rami-Porta, R., Bolejack, V., Crowley, J., Ball, D., Kim, J., Lyons, G., Rice, T., Suzuki, K., Thomas, C., Travis, W. and Wu, Y. (2015). 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*, 10(7), pp.990-1003.
- Ratcliffe, M., Sharpe, A., Midha, A., Barker, C., Scott, M., Scorer, P., Al-Masri, H., Rebelatto, M. and Walker, J. (2017). Agreement between Programmed Cell Death Ligand-1 Diagnostic Assays across Multiple Protein Expression Cutoffs in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(14), pp.3585-3591.
- Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A., Hui, R., Csőszi, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., O'Brien, M., Rao, S., Hotta, K., Leiby, M., Lubiniecki, G., Shentu, Y., Rangwala, R. and Brahmer, J. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(19), pp.1823-1833.
- Rehman, J., Han, G., Carvajal-Hausdorf, D., Wasserman, B., Pelekanou, V., Mani, N., McLaughlin, J., Schalper, K. and Rimm, D. (2016). Quantitative and pathologist-read comparison of the heterogeneity of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer. *Modern Pathology*, 30(3), pp.340-349.
- Rimm, D., Han, G., Taube, J., Yi, E., Bridge, J., Flieder, D., Homer, R., West, W., Wu, H., Roden, A., Fujimoto, J., Yu, H., Anders, R., Kowalewski, A., Rivard, C., Rehman, J., Batenchuk, C., Burns, V., Hirsch, F. and Wistuba, I. (2017). A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncology*, 3(8), p.1051.
- Ritprajak, P. and Azuma, M. (2015). Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 51(3), pp.221-228.
- Rittmeyer, A., Barlesi, F., Waterkamp, D., Park, K., Ciardiello, F., von Pawel, J., Gadgeel, S., Hida, T., Kowalski, D., Dols, M., Cortinovis, D., Leach, J., Polikoff, J., Barrios, C., Kabbinavar, F., Frontera, O., De Marinis, F., Turna, H., Lee, J., Ballinger, M., Kowanetz, M., He, P., Chen, D., Sandler, A. and Gandara, D. (2017). 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*, 389(10066), pp.255-265.
- Rizvi, N., Hellmann, M., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T., Miller, M., Rekhtman, N., Moreira, A., Ibrahim, F., Bruggeman, C., Gasmı, B., Zappasodi, R., Maeda, Y., Sander, C., Garon, E., Merghoub, T., Wolchok, J., Schumacher, T. and Chan, T. (2015a). Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 348(6230), pp.124-128.
- Rizvi, N., Mazières, J., Planchard, D., Stinchcombe, T., Dy, G., Antonia, S., Horn, L., Lena, H., Minenza, E., Menecier, B., Otterson, G., Campos, L., Gandara, D., Levy, B., Nair, S., Zalcman, G., Wolf, J., Souquet, P., Baldini, E., Cappuzzo, F., Chouaid, C., Dowlati, A., Sanborn, R., Lopez-Chavez, A., Grohe, C., Huber, R., Harbison, C., Baudelet, C., Lestini, B. and Ramalingam, S. (2015b). Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *The Lancet Oncology*, 16(3), pp.257-265.

- Rizvi, H., Sanchez-Vega, F., La, K., Chatila, W., Jonsson, P., Halpenny, D., Plodkowski, A., Long, N., Sauter, J., Rekhtman, N., Hollmann, T., Schalper, K., Gainor, J., Shen, R., Ni, A., Arbour, K., Merghoub, T., Wolchok, J., Snyder, A., Chaft, J., Kris, M., Rudin, C., Socci, N., Berger, M., Taylor, B., Zehir, A., Solit, D., Arcila, M., Ladanyi, M., Riely, G., Schultz, N. and Hellmann, M. (2018). Molecular Determinants of Response to Anti-Programmed Cell Death (PD)-1 and Anti-Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Profiled With Targeted Next-Generation Sequencing. *Journal of Clinical Oncology*, 36(7), pp.633-641.
- Rodig, N., Ryan, T., Allen, J., Pang, H., Grabie, N., Chernova, T., Greenfield, E., Liang, S., Sharpe, A., Lichtman, A. and Freeman, G. (2003). Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis. *European Journal of Immunology*, 33(11), pp.3117-3126.
- Rojkó, L., Reiniger, L., Téglási, V., Fábíán, K., Pipek, O., Vágvölgyi, A., Agócs, L., Fillinger, J., Kajdácsi, Z., Tímár, J., Döme, B., Szállási, Z. and Moldvay, J. (2018). Chemotherapy treatment is associated with altered PD-L1 expression in lung cancer patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144(7), pp.1219-1226.
- Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., Majem, M., Lopez-Vivanco, G., Isla, D., Provencio, M., Insa, A., Massuti, B., Gonzalez-Larriba, J., Paz-Ares, L., Bover, I., Garcia-Campelo, R., Moreno, M., Catot, S., Rolfo, C., Reguart, N., Palmero, R., Sánchez, J., Bastus, R., Mayo, C., Bertran-Alamillo, J., Molina, M., Sanchez, J. and Taron, M. (2009). Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(10), pp.958-967.
- Russell-Goldman, E., Kravets, S., Dahlberg, S., Sholl, L. and Vivero, M. (2018). Cytologic-histologic correlation of programmed death-ligand 1 immunohistochemistry in lung carcinomas. *Cancer Cytopathology*, 126(4), pp.253-263.
- Sakakibara, R., Inamura, K., Tambo, Y., Ninomiya, H., Kitazono, S., Yanagitani, N., Horiike, A., Ohyanagi, F., Matsuura, Y., Nakao, M., Mun, M., Okumura, S., Inase, N., Nishio, M., Motoi, N. and Ishikawa, Y. (2017). EBUS-TBNA as a Promising Method for the Evaluation of Tumor PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, 18(5), pp.527-534.e1.
- Sakata, K., Midthun, D., Mullon, J., Kern, R., Nelson, D., Edell, E., Schiavo, D., Jett, J. and Aubry, M. (2018). Comparison of Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemical Staining Between Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration and Resected Lung Cancer Specimens. *Chest*, 154(4), pp.827-837.
- Sato, Y., Fujimoto, D., Uehara, K., Kawachi, H., Nagata, K., Nakagawa, A., Otsuka, K., Sakanoue, I., Hamakawa, H., Takahashi, Y., Imai, Y. and Tomii, K. (2018). Reduced Tumour Proportion Scores for Programmed Cell Death Ligand 1 in Stored Paraffin Tissue Sections. *Anticancer Research*, 38(3), pp.1401-1405.
- Scheel, A., Dietel, M., Heukamp, L., Jöhrens, K., Kirchner, T., Reu, S., Rüschoff, J., Schildhaus, H., Schirmacher, P., Tiemann, M., Warth, A., Weichert, W., Fischer, R., Wolf, J. and Buettner, R. (2016). Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. *Modern Pathology*, 29(10), pp.1165-1172.



- Schiwitz, A., Schildhaus, H., Zwerger, B., Rüschoff, J., Reinhardt, C., Leha, A., Andreas, S. and Rittmeyer, A. (2019). Monitoring efficacy of checkpoint inhibitor therapy in patients with non-small-cell lung cancer. *Immunotherapy*, 11(9), pp.769-782.
- Schmidt, L., Kümmel, A., Görlich, D., Mohr, M., Bröckling, S., Mikesch, J., Grünewald, I., Marra, A., Schultheis, A., Wardelmann, E., Müller-Tidow, C., Spieker, T., Schliemann, C., Berdel, W., Wiewrodt, R. and Hartmann, W. (2015). PD-1 and PD-L1 Expression in NSCLC Indicate a Favorable Prognosis in Defined Subgroups. *PLOS ONE*, 10(8), p.e0136023.
- Shah, P., Singh, S., Bower, M., Livni, N., Padley, S. and Nicholson, A. (2006). The Role of Transbronchial Fine Needle Aspiration in an Integrated Care Pathway for the Assessment of Patients with Suspected Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 1(4), pp.324-327.
- Shaw, A., Yeap, B., Mino-Kenudson, M., Digumarthy, S., Costa, D., Heist, R., Solomon, B., Stubbs, H., Admane, S., McDermott, U., Settleman, J., Kobayashi, S., Mark, E., Rodig, S., Chirieac, L., Kwak, E., Lynch, T. and Iafrate, A. (2009). Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK. *Journal of Clinical Oncology*, 27, pp.4247-4253.
- Shea, M., Costa, D. and Rangachari, D. (2015). Management of advanced non-small cell lung cancers with known mutations or rearrangements: latest evidence and treatment approaches. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 10(2), pp.113-129.
- Shen, M., Xu, L., Yang, L., Tsai, Y., Keng, P., Chen, Y., Lee, S. and Chen, Y. (2017). Radiation alters PD-L1/NKG2D ligand levels in lung cancer cells and leads to immune escape from NK cell cytotoxicity via IL-6-MEK/Erk signaling pathway. *Oncotarget*, 8(46), pp.80506-80520.
- Sheng, J., Fang, W., Yu, J., Chen, N., Zhan, J., Ma, Y., Yang, Y., Huang, Y., Zhao, H. and Zhang, L. (2016). Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*, 6(1), pp.20090.
- Shimaji, M., Shimizu, S., Sato, K., Suda, K., Kobayashi, Y., Tomizawa, K., Takemoto, T. and Mitsudomi, T. (2016). Clinical and pathologic features of lung cancer expressing programmed cell death ligand 1 (PD-L1). *Lung Cancer*, 98, pp.69-75.
- Siegel, R., Ward, E., Brawley, O. and Jemal, A. (2011). Cancer statistics, 2011. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), pp.212-236.
- Siegel, R., Miller, K. and Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), pp.7-34.
- Siegel, R., Miller, K. and Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), pp.7-30.
- Skov, B., Høgdall, E., Clementsen, P., Krasnik, M., Larsen, K., Sørensen, J., Skov, T. and Møller, A. (2014). The prevalence of EGFR mutations in non-small cell lung cancer in an unselected Caucasian population. *APMIS*, 123(2), pp.108-115.
- Skov, B. and Skov, T. (2017). Paired Comparison of PD-L1 Expression on Cytologic and Histologic Specimens From Malignancies in the Lung Assessed With PD-L1 IHC 28-

- 8pharmDx and PD-L1 IHC DAKO 22C3. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 25(7), pp.453-459.
- Skov, B., Rørvig, S., Jensen, T. and Skov, T. (2019). The prevalence of programmed death ligand-1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer in an unselected, consecutive population. *Modern Pathology*.
- Smith, C., Perfetti, T., Rumble, M., Rodgman, A. and Doolittle, D. (2000a). "IARC Group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology*, 38(4), pp.371-383.
- Smith, C., Perfetti, T., Mullens, M., Rodgman, A. and Doolittle, D. (2000b). "IARC Group 2B Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology*, 38(9), pp.825-848.
- Smith, A., Wang, H., Zerbo, A., Beaudoin, S., Ofiara, L., Fiset, P., Benedetti, A. and Gonzalez, A., 2020. Programmed Death Ligand 1 Testing of Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration Samples Acquired For the Diagnosis and Staging of Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Bronchology & Interventional Pulmonology*, 27(8), pp.50-57.
- Song, S., Lee, J., Koh, J., Kim, S., Chung, D. and Jeon, Y., 2020. Utility of PD-L1 immunocytochemistry using body-fluid cell blocks in patients with non-small-cell lung cancer. *Diagnostic Cytopathology*, 48(4), pp.291-299.
- Spiro, S., Gould, M. and Colice, G. (2007). Initial Evaluation of the Patient With Lung Cancer: Symptoms, Signs, Laboratory Tests, and Paraneoplastic Syndromes. *Chest*, 132(3), pp.149S-160S.
- Spitz, M., Wei, Q., Dong, Q., Amos, C. and Wu, X. (2003). Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12(8):689-98.
- Steenland, K., Mannetje, A., Boffetta, P., Stayner, L., Attfield, M., Chen, J., Dosemeci, M., DeKlerk, N., Hnizdo, E., Koskela, R. and Checkoway, H. (2001). Cancer Causes and Control, 12(9), pp.773-784. Skillrud, D., Offord, K. and Miller, R. (1986). Higher Risk of Lung Cancer in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annals of Internal Medicine*, 105(4), p.503-507.
- Soda, M., Choi, Y., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y. and Mano, H. (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448(7153), pp.561-566.
- Sun, J., Zhou, W., Choi, Y., Choi, S., Kim, S., Wang, Z., Dolled-Filhart, M., Emancipator, K., Wu, D., Weiner, R., Frisman, D., Kim, H., Choi, Y., Shim, Y. and Kim, J. (2016). Prognostic Significance of PD-L1 in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: A Large Cohort Study of Surgically Resected Cases. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(7), pp.1003-1011.
- Sughayer, M., Alnaimy, F., Alsughayer, A. and Qamhia, N. (2018). Comparison of 22C3 PharmDx and SP263 Assays to Test PD-L1 Expression in NSCLC. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 27(9), pp.663-666.

- Sznol, M. and Chen, L. (2013). Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(5), pp.1021-1034.
- Tammemagi, C., Neslund-Dudas, C., Simoff, M. and Kvale, P. (2004). Smoking and Lung Cancer Survival. *Chest*, 125(1), pp.27-37.
- Tang, Y., Fang, W., Zhang, Y., Hong, S., Kang, S., Yan, Y., Chen, N., Zhan, J., He, X., Qin, T., Li, G., Tang, W., Peng, P. and Zhang, L. (2015). The association between PD-L1 and EGFR status and the prognostic value of PD-L1 in advanced non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. *Oncotarget*, 6(16), pp.14209-14219.
- Taube, J., Klein, A., Brahmer, J., Xu, H., Pan, X., Kim, J., Chen, L., Pardoll, D., Topalian, S. and Anders, R. (2014). Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Clinical Cancer Research*, 20(19), pp.5064-5074.
- Tokito, T., Azuma, K., Kawahara, A., Ishii, H., Yamada, K., Matsuo, N., Kinoshita, T., Mizukami, N., Ono, H., Kage, M. and Hoshino, T. (2016). Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8+ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy. *European Journal of Cancer*, 55, pp.7-14.
- Torous, V., Rangachari, D., Gallant, B., Shea, M., Costa, D. and VanderLaan, P. (2018). PD-L1 testing using the clone DAKO 22C3 kit for selection of patients with non-small cell lung cancer to receive immune checkpoint inhibitor therapy: are cytology cell blocks a viable option?. *Journal of the American Society of Cytopathology*, 7(3), pp.133-141.
- Torre, L., Bray, F., Siegel, R., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), pp.87-108.
- Travis, W., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A., Geisinger, K., Yatabe, Y., Beer, D., Powell, C., Riely, G., Van Schil, P., Garg, K., Austin, J., Asamura, H., Rusch, V., Hirsch, F., Scagliotti, G., Mitsudomi, T., Huber, R., Ishikawa, Y., Jett, J., Sanchez-Cespedes, M., Sculier, J., Takahashi, T., Tsuboi, M., Vansteenkiste, J., Wistuba, I., Yang, P., Aberle, D., Brambilla, C., Flieder, D., Franklin, W., Gazdar, A., Gould, M., Hasleton, P., Henderson, D., Johnson, B., Johnson, D., Kerr, K., Kuriyama, K., Lee, J., Miller, V., Petersen, I., Roggli, V., Rosell, R., Saijo, N., Thunnissen, E., Tsao, M. and Yankelewitz, D. (2011). International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(2), pp.244-285.
- Travis, W., Brambilla, E., Burke, A., Marx, A., Nicholson, A. (2015a). WHO Classification of tumors of the lung, pleura, thymus and heart (4<sup>th</sup> edition). IARC Press, Lyon, pp. 9-148
- Travis, W., Brambilla, E., Nicholson, A., Yatabe, Y., Austin, J., Beasley, M., Chirieac, L., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D., Geisinger, K., Hirsch, F., Ishikawa, Y., Kerr, K., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C., Tsao, M. and Wistuba, I. (2015b). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9), pp.1243-1260.

- Trichopoulos, D., Kalandidi, A., Sparros, L. and Macmahon, B. (1981). Lung cancer and passive smoking. *International Journal of Cancer*, 27(1), pp.1-4.
- Tsao, A., Tang, X., Sabloff, B., Xiao, L., Shigematsu, H., Roth, J., Spitz, M., Hong, W., Gazdar, A. and Wistuba, I. (2006). Clinicopathologic Characteristics of the EGFR Gene Mutation in Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 1(3), pp.231-239.
- Tsao, M., Kerr, K., Dacic, S., Yatabe, Y., Hirsch, F.. (2017) IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry Testing in Lung Cancer. 1st Ed. Aurora, CO: International Association for the Study of Lung Cancer. North Fort Myers, FL: Editorial Rx Press, ISBN: 978-0-9832958-7-7.
- Tsao, M., Kerr, K., Kockx, M., Beasley, M., Borczuk, A., Botling, J., Bubendorf, L., Chirieac, L., Chen, G., Chou, T., Chung, J., Dacic, S., Lantuejoul, S., Mino-Kenudson, M., Moreira, A., Nicholson, A., Noguchi, M., Pelosi, G., Poleri, C., Russell, P., Sauter, J., Thunnissen, E., Wistuba, I., Yu, H., Wynes, M., Pintilie, M., Yatabe, Y. and Hirsch, F. (2018). PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *Journal of Thoracic Oncology*, 13(9), pp.1302-1311.
- Tseng, S., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J., Pai, S., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D. and Tsuchiya, H. (2001). B7-Dc, a New Dendritic Cell Molecule with Potent Costimulatory Properties for T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(7), pp.839-846.
- Tumeh, P., Harview, C., Yearley, J., Shintaku, I., Taylor, E., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., West, A., Carmona, M., Kivork, C., Seja, E., Cherry, G., Gutierrez, A., Grogan, T., Mateus, C., Tomasic, G., Glaspy, J., Emerson, R., Robins, H., Pierce, R., Elashoff, D., Robert, C. and Ribas, A. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515(7528), pp.568-571.
- Udall, M., Rizzo, M., Kenny, J., Doherty, J., Dahm, S., Robbins, P. and Faulkner, E. (2018). PD-L1 diagnostic tests: a systematic literature review of scoring algorithms and test-validation metrics. *Diagnostic Pathology*, 13(1), p.12.
- Uruga, H., Bozkurtlar, E., Huynh, T., Muzikansky, A., Goto, Y., Gomez-Caraballo, M., Hata, A., Gainor, J., Mark, E., Engelman, J., Lanuti, M. and Mino-Kenudson, M. (2017). Programmed Cell Death Ligand (PD-L1) Expression in Stage II and III Lung Adenocarcinomas and Nodal Metastases. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(3), pp.458-466.
- van den Broek, L. and van de Vijver, M. (2000). Assessment of Problems in Diagnostic and Research Immunohistochemistry Associated With Epitope Instability in Stored Paraffin Sections. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 8(4), pp.316-321.
- Velcheti, V., Schalper, K., Carvajal, D., Anagnostou, V., Syrigos, K., Sznol, M., Herbst, R., Gettinger, S., Chen, L. and Rimm, D. (2013). Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Laboratory Investigation*, 94(1), pp.107-116.
- Vigliar, E., Malapelle, U., Iaccarino, A., Acanfora, G., Pisapia, P., Clery, E., De Luca, C., Bellevicine, C. and Troncone, G. (2019). PD-L1 expression on routine samples of non-

- small cell lung cancer: results and critical issues from a 1-year experience of a centralised laboratory. *Journal of Clinical Pathology*, 72(6), pp.412-417.
- Villaruz, L., Socinski, M., Abberbock, S., Berry, L., Johnson, B., Kwiatkowski, D., Iafrate, A., Varella-Garcia, M., Franklin, W., Camidge, D., Sequist, L., Haura, E., Ladanyi, M., Kurland, B., Kugler, K., Minna, J., Bunn, P. and Kris, M. (2014). Clinicopathologic features and outcomes of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations in the Lung Cancer Mutation Consortium. *Cancer*, 121(3), pp.448-456.
- Wang, J., Yoshida, T., Nakaki, F., Hiai, H., Okazaki, T. and Honjo, T. (2005). Establishment of NOD-Pdcd1<sup>-/-</sup> mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(33), pp.11823-11828.
- Wang, A., Wang, H., Liu, Y., Zhao, M., Zhang, H., Lu, Z., Fang, Y., Chen, X. and Liu, G. (2015). The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: A meta-analysis. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 41(4), pp.450-456.
- Wang, X., Teng, F., Kong, L. and Yu, Y. (2016). PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Oncotargets and Therapy*, Volume 9, pp.5023-5039.
- Wang, H., Agulnik, J., Kasymjanova, G., Wang, A., Jiménez, P., Cohen, V., Small, D., Pepe, C., Sakr, L., Fiset, P., Auger, M., Camilleri-Broet, S., Alam El Din, M., Chong, G., van Kempen, L. and Spatz, A. (2018). Cytology cell blocks are suitable for immunohistochemical testing for PD-L1 in lung cancer. *Annals of Oncology*, 29(6), pp.1417-1422.
- Weichert, W., Kossakowski, C., Harms, A., Schirmacher, P., Muley, T., Dienemann, H. and Warth, A. (2015). Proposal of a prognostically relevant grading scheme for pulmonary squamous cell carcinoma. *European Respiratory Journal*, 47(3), pp.938-946.
- Wiencke, J. and Kelsey, K. (2002). Teen smoking, field cancerization, and a "critical period" hypothesis for lung cancer susceptibility. *Environmental Health Perspectives*, 110(6), pp.555-558.
- Wu, A., Fontham, E., Reynolds, P., Greenberg, R., Buffler, P., Liff, J., Boyd, P., Henderson, B. and Correa, P. (1995). Previous lung disease and risk of lung cancer among lifetime nonsmoking women in the United States. *American Journal of Epidemiology*, 141(11), p.1023-1032.
- Xu, C., Fillmore, C., Koyama, S., Wu, H., Zhao, Y., Chen, Z., Herter-Sprue, G., Akbay, E., Tchaicha, J., Altabef, A., Reibel, J., Walton, Z., Ji, H., Watanabe, H., Jänne, P., Castrillon, D., Rustgi, A., Bass, A., Freeman, G., Padera, R., Dranoff, G., Hammerman, P., Kim, C. and Wong, K. (2014). Loss of Lkb1 and Pten Leads to Lung Squamous Cell Carcinoma with Elevated PD-L1 Expression. *Cancer Cell*, 25(5), pp.590-604.
- Xu, H., Bratton, L., Nead, M., Russell, D. and Zhou, Z. (2018). Comparison of programmed death-ligand 1 (PD-L1) immunostain for nonsmall cell lung carcinoma between paired cytological and surgical specimens. *CytoJournal*, 15(1), p.29.
- Yang, C., Lin, M., Chang, Y., Wu, C. and Yang, P. (2014). Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its

- correlation with driver mutations and clinical outcomes. *European Journal of Cancer*, 50(7), pp.1361-1369.
- Ye, L., Leslie, C., Jacques, A., Mesbah Ardakani, N., Amanuel, B. and Millward, M. (2018). Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer in a Western Australian population and correlation with clinicopathologic features. *Modern Pathology*, 32(4), pp.524-531.
- Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M. and Saito, T. (2012). Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(6), pp.1201-1217.
- Zhang, J., Gao, J., Li, Y., Nie, J., Dai, L., Hu, W., Chen, X., Han, J., Ma, X., Tian, G., Wu, D., Shen, L. and Fang, J. (2015). Circulating PD-L1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L1 expression and the clinical characteristics. *Thoracic Cancer*, 6(4), pp.534-538.
- Zhang, M., Li, G., Wang, Y., Wang, Y., Zhao, S., Haihong, P., Zhao, H. and Wang, Y. (2017). PD-L1 expression in lung cancer and its correlation with driver mutations: a meta-analysis. *Scientific Reports*, 7(1), p.10255.
- Zhong, X., Tumang, J., Gao, W., Bai, C. and Rothstein, T. (2007). PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for VH11/VH12 and phosphatidylcholine binding. *European Journal of Immunology*, 37(9), pp.2405-2410.
- Zhou, Z., Zhan, P., Song, Y. (2015). PD-L1 over-expression and survival in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Translational lung cancer research*, 4(2), pp.203-208.
- Zhou, C., Tang, J., Sun, H., Zheng, X., Li, Z., Sun, T., Li, J., Wang, S., Zhou, X., Sun, H., Cheng, Z., Zhang, H. and Ma, H. (2017). PD-L1 expression as poor prognostic factor in patients with non-squamous non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 8(35), pp. 58457-58468.
- Zell, J., Ou, S., Ziogas, A. and Anton-Culver, H. (2005). Epidemiology of Bronchioloalveolar Carcinoma: Improvement in Survival After Release of the 1999 WHO Classification of Lung Tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 23(33), pp.8396-8405.

## 8 Anhang

**Tabelle 15: Übersicht der Rohdaten.** Aufgelistet sind die Eigenschaften der untersuchten Proben und die erhobenen PD-L1-Ergebnisse von drei Bewertern (1-3). Typ = Tumortyp, Ort = Tumormanifestation, pT = postoperatives Tumorstadium (pT1a-4), Grad = Tumordifferenzierungsgrad (G1-4), Probe = Probenmaterial, m/w/d = Frau/Mann/Drittes Geschlecht, PD-L1 = *programmed cell death-ligand 1*, ADC = Adenokarzinom, SQC = Plattenepithelkarzinom, P = Primärtumor, M = Metastase, FNP = Feinnadelpunktion

Untersuchungsgut									PD-L1-Expression					
Nr.	Jahr	Typ	Ort	pT	Grad	Probe	m/w/d	Alter	Zytologie			Histologie		
									1	2	3	1	2	3
1	2015	ADCa	P	1c	2	Imprint	m	63,71	0	0	0	0	0	0
2	2015	ADCa	P	4	2	Imprint	m	63,75	0	0	0	0	0	0
3	2017	ADCa	P	1c	3	Imprint	w	76,25	0	1	0	1	0	0
4	2013	SQCa	M			Imprint	w	56,28	0	0	0	0	0	0
5	2017	ADCa	M			Imprint	w	78,54	0	0	0	0	0	0
6	2017	ADCa	P	1b	2	Imprint	m	72,55	0	0	0	0	0	0
7	2015	ADCa	P	1b	2	Imprint	m	74,78	0	0	0	0	0	0
8	2016	SQCa	P	1c	2	Imprint	w	82,62	0	1	5	10	20	20
9	2016	SQCa	P	3	2	Imprint	m	74,07	10	5	20	30	50	50
10	2017	ADCa	M			FNP	m	82,42	0	0	0	0	0	0
11	2015	ADCa	M			Imprint	m	59,62	0	1	0	0	0	0
12	2016	ADCa	P	1c	2	Imprint	m	68,47	0	0	0	0	0	0
13	2016	ADCa	P	2a	2	Imprint	m	79,63	0	0	0	0	0	0
14	2015	ADCa	P	3	3	Imprint	m	74,08	0	0	0	30	30	0
15	2015	ADCa	P	1a	3	Imprint	m	56,74	0	0	0	0	0	0
16	2016	ADCa	P	1c	2	Imprint	m	58,51	0	0	0	0	0	0
17	2015	ADCa	M			Imprint	w	69,25	0	0	0	0	0	0
18	2015	ADCa	M			Imprint	w	61,59	0	0	0	0	0	0
19	2016	ADCa	P	3	2	Imprint	m	70,51	0	0	0	0	0	0
20	2016	ADCa	P	1a	2	Imprint	m	70,42	0	0	0	0	0	0
21	2017	SQCa	P	2a	3	Imprint	w	62,32	40	60	60	0	0	0
22	2014	SQCa	P	2a	2	Imprint	w	61,92	0	0	0	0	0	0
23	2015	ADCa	P	1c	3	Imprint	m	72,02	0	0	0	0	0	0
24	2015	ADCa	P	1b	3	Imprint	w	58,24	0	0	0	0	0	0
25	2015	ADCa	M			Imprint	w	90,72	0	0	0	0	0	0
26	2014	SQCa	P	2a	3	Imprint	w	74,74	60	5	40	1	0	0
27	2013	SQCa	P	1a	2	Imprint	m	71,46	0	0	0	0	0	0
28	2017	ADCa	P	3	2	Imprint	m	75,97	0	0	0	0	0	0
29	2016	SQCa	P	1c	3	Imprint	w	53,12	0	0	5	50	50	40
30	2015	ADCa	P	2a	3	Imprint	m	59,83	0	0	0	0	0	0
31	2014	SQCa	P	2a	3	Imprint	w	78,68	1	10	0	0	0	0
32	2014	SQCa	P	2a	2	FNP	w	66,36	0	0	0	10	10	30
33	2017	SQCa	P	2a	2	Imprint	m	70,62	0	0	5	0	0	0
34	2014	SQCa	P	3	2	FNP	w	82,16	0	0	0	0	0	0
35	2016	ADCa	P	1c	2	FNP	m	74,05	0	0	0	0	0	0
36	2016	SQCa	P	1a	3	Imprint	w	70,16	0	5	0	0	1	0
37	2015	ADCa	P	1c	3	Imprint	w	71,08	10	30	20	50	60	60
38	2016	ADCa	M			Imprint	w	59,19	0	0	0	90	90	90
39	2015	SQCa	P	2a	3	FNP	m	59,01	0	0	0	0	0	0
40	2017	ADCa	P	1a	2	Imprint	m	36,24	0	1	0	0	0	0
41	2016	ADCa	P	1c	3	Imprint	w	63,48	0	1	0	0	0	0
42	2014	SQCa	P	2a	3	Imprint	m	66,49	0	0	0	0	0	0
43	2015	SQCa	P	2b	3	Imprint	w	61,25	1	0	0	0	0	0

Untersuchungsgut									PD-L1-Expression					
Nr.	Jahr	Typ	Ort	pT	Grad	Probe	m/w/d	Alter	Zytologie			Histologie		
									1	2	3	1	2	3
44	2015	ADCa	P	1a	1	Imprint	w	72,84	0	0	0	0	0	0
45	2014	SQCa	P	1a	3	Imprint	m	59,42	5	0	0	0	0	0
46	2015	ADCa	P	4	3	FNP	w	55,26	0	0	0	0	0	0
47	2016	ADCa	P	1c	2	Imprint	m	70,29	0	0	0	0	0	0
48	2016	SQCa	P	1c	2	FNP	w	69,46	0	0	0	10	1	5
49	2015	ADCa	M			Imprint	w	54,41	0	0	0	0	0	0
50	2014	SQCa	P	1c	3	Imprint	m	67,82	5	1	5	0	0	0
51	2015	SQCa	P	1b	2	Imprint	w	52,47	1	1	1	0	0	0
52	2015	SQCa	P	1a	2	Imprint	w	52,47	0	0	0	0	0	0
53	2015	ADCa	P	1c	3	Imprint	m	65,17	0	0	0	5	5	5
54	2017	ADCa	M			Imprint	w	56,71	0	0	0	30	20	20
55	2016	SQCa	P	1c	3	Imprint	w	72,12	0	1	10	0	0	0
56	2015	SQCa	P	1b	2	Imprint	m	71,95	0	0	0	0	0	0
57	2016	SQCa	P	1b	3	Imprint	w	63,29	0	0	0	0	0	0
58	2015	ADCa	P	1b	2	Imprint	w	60,52	0	0	0	0	0	0
59	2017	SQCa	P	1b	2	Imprint	w	71,85	60	80	80	0	0	0
60	2016	ADCa	P	1b	2	Imprint	m	60,77	0	0	0	0	0	0
61	2016	ADCa	M			Imprint	w	64,22	0	0	0	0	0	0
62	2016	ADCa	P	1b	3	Imprint	w	64,22	0	0	0	0	0	0
63	2015	ADCa	P	1c	3	Imprint	m	66,84	0	0	0	0	0	0
64	2016	SQCa	P	3	3	Imprint	w	75,9	1	1	5	0	0	0
65	2016	ADCa	P	2a	2	FNP	w	55,77	0	0	0	0	0	0
66	2013	SQCa	P	3	3	Imprint	w	68,53	0	0	0	0	0	0
67	2015	SQCa	P	4	2	Imprint	m	50,56	1	0	0	0	0	0
68	2015	ADCa	P	4	3	Imprint	m	61,26	0	0	0	10	10	30
69	2017	ADCa	P	1a	1	Imprint	m	43,41	0	0	0	0	0	0
70	2016	ADCa	P	1c	3	FNP	m	72,01	0	0	0	0	0	0
71	2016	ADCa	P	1c	3	Imprint	m	72,01	0	1	0	0	0	0
72	2017	SQCa	P	1b	2	Imprint	w	76,48	0	0	0	0	0	0
73	2016	SQCa	P	1b	3	Imprint	w	57,27	1	1	0	0	0	0
74	2013	SQCa	M			Imprint	w	70,59	0	0	0	0	0	0
75	2013	SQCa	P	1c	2	Imprint	m	72,55	0	0	0	80	80	70
76	2015	ADCa	P	1b	3	Imprint	m	66,36	0	0	0	0	0	0
77	2016	ADCa	P	4	3	Imprint	w	74,59	0	0	0	0	0	0
78	2016	ADCa	P	1b	2	Imprint	w	65,8	0	0	0	0	0	0
79	2013	SQCa	P	1b	3	Imprint	w	72,53	5	1	0	0	0	0
80	2015	ADCa	P	1c	2	Imprint	m	74,8	0	0	0	0	0	0
81	2015	ADCa	P	4	3	Imprint	m	44,91	0	0	0	0	0	0
82	2016	ADCa	P	1a	3	Imprint	m	73,68	0	0	0	30	30	40
83	2017	ADCa	P	1b	2	Imprint	m	62,38	0	1	5	10	10	20
84	2013	SQCa	P	1c	3	Imprint	w	65,35	5	1	20	0	0	0
85	2015	ADCa	M			Erguß	m	79,93	0	0	0	0	0	0
86	2016	SQCa	P	1a	3	Imprint	m	75,3	0	0	0	0	0	0
87	2015	ADCa	P	1b	2	Imprint	w	76,71	1	1	0	1	0	0
88	2016	ADCa	P	1b	2	Imprint	m	67,36	0	0	0	0	0	0
89	2015	ADCa	P	2a	3	Imprint	m	70,89	0	0	0	40	40	40
90	2015	ADCa	P	1b	2	Imprint	m	55,58	0	0	0	0	0	0
91	2017	SQCa	M			Imprint	w	67,1	1	1	20	0	0	0
92	2013	SQCa	P	4	3	Imprint	m	60,58	0	10	10	0	0	0
93	2017	ADCa	P	1c	1	Imprint	w	72,24	0	0	0	0	1	0
94	2015	SQCa	P	1a	2	Imprint	m	65,61	0	0	5	0	0	0









**Tabelle 16: Materialien für die immunbiologische Anfärbung. Die Anfärbung erfolgte automatisiert mit dem Ventana Discovery Ultra (RUO DISCOVERY Universal (v.00.00.0299), DISCOVERY ULTRA). HRP = Merrettichperoxidase, DAB = Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorat, HQ = an ein Antikörper gebundenes Hapten**

<b>Material</b>	<b>Hersteller (Bestellnummer)</b>
<b>Reaktionspuffer</b>	Ventana Medical System (950-300)
<b>LCS (Liquid Coverslip)</b>	Ventana Medical System (650-010)
<b>SSC</b>	Ventana Medical System (950-110)
<b>EZ Prep</b>	Ventana Medical System (950-102)
<b>CC1 (Cell Conditioning)</b>	Ventana Medical System (950-124)
<b>OptiView DAB IHC Detection Kit</b>	Ventana Medical System (760-091) Beinhaltet: <ul style="list-style-type: none"> <li>• OptiView Peroxidase Inhibitor</li> <li>• OptiView HQ Universal Linker</li> <li>• OptiView HRP Multimer</li> <li>• OptiView H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> <li>• OptiView DAB</li> <li>• OptiView Copper</li> </ul>
<b>Amplification Kit (A&amp;B)</b>	Ventana Medical System (760-080)
<b>Prep Kit Dispenser with Prep Kit Button</b>	Ventana Medical System (786-3034)
<b>Hämatoxylin</b>	Ventana Medical System (760-2021)
<b>Bluing Reagent</b>	Ventana Medical System (760-2037)

**Tabelle 17: Protokoll zur PD-L1-Anfärbung von FFPE Präparaten.** Das Protokoll Nr. 158 beschreibt den Ablauf zur immunbiologischen Anfärbung von histologischen Schnitten mithilfe des Discovery Ultra von Ventana mit dem Antikörper DAKO 22C3 von Dako am UKSH Campus Lübeck, Institut für Pathologie. FFPE = Formal-fixiert Paraffin-eingebettet. \* ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe. Die eingesetzten Reagenzien stammen aus dem OptiView DAB IHC Detection Kit (siehe Tabelle 16, S.93).

<b>Protokoll-Nr. 158 : fPD-L1 (22C3) (19.12.2018)</b> Prozedur: RUO DISCOVERY Universal ( v0.00.0299 ) DISCOVERY ULTRA UK S-H /Campus Lübeck Institut für Pathologie, Ratzeburger Allee 160 23562 Lübeck	
Schritt-N	Protokollschritt
1	[ version 15 ]
2	Mixer aktivieren
3	Aufwärmen der Objektträger auf 37 °C
4	[ Delay refers to a time delayed start: Select time until run start ]
5	Mixer deaktivieren
6	Aufheizen des Objektträgers bis 58 °C, und für 4 Minuten inkubieren
7	Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip lang
8	Inkubieren für 8 Minuten
9	Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip lang
10	Inkubieren für 8 Minuten
11	Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip lang
12	Inkubieren für 8 Minuten
13	EZPrep Vol. ausgleichen
14	Mixer aktivieren
15	[ RECOMMENDED: Set temperature to 69°C and time to 8 minutes foreach cycle ]
16	[ Depar Cycle 1 ]
17	Erwärme Objektträger auf [72 °C] und inkubiere für [8 Minuten] (Zyklus 1)
18	Objektträger mit EZ Prep spülen
19	Coverslip auftragen
20	Inkubieren für 4 Minuten
21	EZPrep Vol. ausgleichen
22	[ Depar Cycle 2 ]
23	Inkubieren für [8 Minuten] ( Zyklus 2 )
24	Objektträger mit EZ Prep spülen
25	Coverslip auftragen
26	Inkubieren für 4 Minuten
27	EZPrep Vol. ausgleichen
28	[ Depar Cycle 3 ]
29	Inkubieren für [8 Minuten] ( Zyklus 3 )
30	Objektträger mit EZ Prep spülen
31	Deparaffinierung Vol. ausgleichen
32	Coverslip auftragen
33	Aufwärmen der Objektträger auf 37 °C
34	Objektträger mit EZ Prep spülen
35	Cell Conditioner Nr.1 lang auftragen
36	Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip lang

Schritt-N	Protokollschritt
37	Erwärme Objektträger auf [95 °C] und inkubiere für 4 Minuten ( Cell Conditioner Nr.1 )
38	Inkubieren für 4 Minuten
39	Inkubieren für 8 Minuten
40	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
41	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
42	Inkubieren für 8 Minuten
43	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
44	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
45	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
46	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
47	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
48	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
49	Objektträger-Heizung ausschalten
50	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
51	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
52	Aufwärmen der Objektträger auf 37 °C
53	Spülen mit Reaktionspuffer
54	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
55	Coverslip auftragen
56	[ Select an Inhibitor NOTE: Inhibitor CM comes packaged with Chromomap DAB ]
57	[ DISCOVERY Inhibitor is a stand alone product for use with all other HRP substrates ]
58	[ Inhibitor CM will be applied ]
59	Spülen mit Reaktionspuffer
60	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
61	Coverslip auftragen
62	Spülen mit Reaktionspuffer
63	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
64	Coverslip auftragen
65	1 Tropfen Inhibitor CM auftragen, und für [4 Minuten] inkubieren.
66	Spülen mit Reaktionspuffer
67	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
68	Coverslip auftragen
69	Spülen mit Reaktionspuffer
70	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
71	Coverslip auftragen
72	Inkubieren für 4 Minuten
73	Objektträger-Temperatur von [37 °C] auf Sehr niedrige Temperaturen ( Primär Antikörper ) erhöhen
74	1 Tropfen [ANTIBODY 8] (Antikörper), und für [20 Minuten] inkubieren.
75	Spülen mit Reaktionspuffer
76	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
77	Coverslip auftragen
78	[ Inhibitor Solution will not be applied after the primary ]

Schritt-N	Protokollschritt
79	Objektträger-Heizung ausschalten
80	Aufwärmen der Objektträger auf 37 °C
81	[ Requires DETECTION dispensers ]
82	[ These selections may be used for haptentated linking antibodies ]
83	Spülen mit Reaktionspuffer
84	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
85	Coverslip auftragen
86	Spülen mit Reaktionspuffer
87	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
88	Coverslip auftragen
89	Spülen mit Reaktionspuffer
90	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
91	Coverslip auftragen
92	Inkubieren für 4 Minuten
93	Objektträger-Temperatur von [37 °C] auf Sehr niedrige Temperaturen ( Sekundärantikörper ) erhöhen
94	1 Tropfen [Anti-Mouse HQ] (Nachweis Nr.1), und für [0 Stunden 20 Min] inkubieren.
95	Spülen mit Reaktionspuffer
96	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
97	Coverslip auftragen
98	Objektträger-Heizung ausschalten
99	Aufwärmen der Objektträger auf 37 °C
100	Spülen mit Reaktionspuffer
101	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
102	Coverslip auftragen
103	Spülen mit Reaktionspuffer
104	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
105	Coverslip auftragen
106	[ Select Multimer ]
107	1 Tropfen [Anti-HQ HRP] (Konjugat 1), und für [16 Minuten] inkubieren.
108	Spülen mit Reaktionspuffer
109	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
110	Coverslip auftragen
111	Spülen mit Reaktionspuffer
112	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
113	Coverslip auftragen
114	Spülen mit Reaktionspuffer
115	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
116	Coverslip auftragen
117	1 Tropfen H2O2 CM auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
118	1 Tropfen DAB CM auftragen, und für 8 Minuten inkubieren.
119	Spülen mit Reaktionspuffer
120	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
121	1 Tropfen Copper CM auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.

<b>Schritt- N</b>	<b>Protokollschritt</b>
122	Spülen mit Reaktionspuffer
123	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
124	Coverslip auftragen
125	Spülen mit Reaktionspuffer
126	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
127	Coverslip auftragen
128	1 Tropfen [HEMATOXYLIN II] (Gegenfärbung), und für [8 Minuten] inkubieren.
129	Spülen mit Reaktionspuffer
130	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
131	Coverslip auftragen
132	Spülen mit Reaktionspuffer
133	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
134	Coverslip auftragen
135	1 Tropfen [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung), und für [4 Minuten] inkubieren.
136	Spülen mit Reaktionspuffer
137	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
138	Coverslip auftragen
139	Spülen mit Reaktionspuffer
140	Spülen mit Reaktionspuffer



**Tabelle 18: Protokoll zur PD-L1-Anfärbung von zytologischen Präparaten.** Das Protokoll Nr. 158 beschreibt den Ablauf zur immunbiologischen Anfärbung von histologischen Schnitten mithilfe des Discovery Ultra von Ventana mit dem Antikörper DAKO 22C3 von Dako am UKSH Campus Lübeck, Institut für Pathologie. \* ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe. Die eingesetzten Reagenzien stammen aus dem OptiView DAB IHC Detection Kit (siehe Tabelle 16, S. 93).

<b>Protokoll-Nr. 159 : fcPD-L1 (22C3) (19.12.2018)</b> Prozedur: RUO DISCOVERY Universal ( v0.00.0299 ) DISCOVERY ULTRA UK S-H /Campus Lübeck Institut für Pathologie, Ratzeburger Allee 160 23562 Lübeck	
Schritt-N	Protokollschritt
1	[ version 15 ]
2	Mixer aktivieren
3	Aufwärmen der Objektträger auf 37 °C
4	Hinzugeben von 300ul Reaktionspuffer
5	Spülen mit Reaktionspuffer
6	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
7	Coverslip auftragen
8	[ Select an Inhibitor NOTE: Inhibitor CM comes packaged with Chromomap DAB ]
9	[ DISCOVERY Inhibitor is a stand alone product for use with all other HRP substrates ]
10	[ Inhibitor CM will be applied ]
11	Spülen mit Reaktionspuffer
12	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
13	Coverslip auftragen
14	Spülen mit Reaktionspuffer
15	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
16	Coverslip auftragen
17	1 Tropfen Inhibitor CM auftragen, und für [4 Minuten] inkubieren.
18	Spülen mit Reaktionspuffer
19	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
20	Coverslip auftragen
21	Spülen mit Reaktionspuffer
22	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
23	Coverslip auftragen
24	Inkubieren für 4 Minuten
25	Objektträger-Temperatur von [37 °C] auf Sehr niedrige Temperaturen ( Primär Antikörper ) erhöhen
26	1 Tropfen [ANTIBODY 8] (Antikörper), und für [20 Minuten] inkubieren.
27	Spülen mit Reaktionspuffer
28	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
29	Coverslip auftragen
30	[ Inhibitor Solution will not be applied after the primary ]
31	Objektträger-Heizung ausschalten
32	Aufwärmen der Objektträger auf 37 °C
33	[ Requires DETECTION dispensers ]
34	[ These selections may be used for haptened linking antibodies ]

Schritt- N	Protokollschritt
35	Spülen mit Reaktionspuffer
36	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
37	Coverslip auftragen
38	Spülen mit Reaktionspuffer
39	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
40	Coverslip auftragen
41	Spülen mit Reaktionspuffer
42	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
43	Coverslip auftragen
44	Inkubieren für 4 Minuten
45	Objektträger-Temperatur von [37 °C] auf Sehr niedrige Temperaturen ( Sekundärantikörper ) erhöhen
46	1 Tropfen [Anti-Mouse HQ] (Nachweis Nr.1), und für [0 Stunden 16 Min] inkubieren.
47	Spülen mit Reaktionspuffer
48	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
49	Coverslip auftragen
50	Objektträger-Heizung ausschalten
51	Aufwärmen der Objektträger auf 37 °C
52	Spülen mit Reaktionspuffer
53	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
54	Coverslip auftragen
55	Spülen mit Reaktionspuffer
56	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
57	Coverslip auftragen
58	[ Select Multimer ]
59	1 Tropfen [Anti-HQ HRP] (Konjugat 1), und für [16 Minuten] inkubieren.
60	Spülen mit Reaktionspuffer
61	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
62	Coverslip auftragen
63	Spülen mit Reaktionspuffer
64	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
65	Coverslip auftragen
66	Spülen mit Reaktionspuffer
67	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
68	Coverslip auftragen
69	1 Tropfen H2O2 CM auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
70	1 Tropfen DAB CM auftragen, und für 8 Minuten inkubieren.
71	Spülen mit Reaktionspuffer
72	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
73	1 Tropfen Copper CM auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
74	Spülen mit Reaktionspuffer
75	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
76	Coverslip auftragen
77	77 Spülen mit Reaktionspuffer

<b>Schritt- N</b>	<b>Protokollschritt</b>
78	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
79	Coverslip auftragen
80	1 Tropfen [HEMATOXYLIN II] (Gegenfärbung), und für [8 Minuten] inkubieren.
81	Spülen mit Reaktionspuffer
82	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
83	Coverslip auftragen
84	Spülen mit Reaktionspuffer
85	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
86	Coverslip auftragen
87	1 Tropfen [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung), und für [4 Minuten] inkubieren.
88	Spülen mit Reaktionspuffer
89	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
90	Coverslip auftragen
91	Spülen mit Reaktionspuffer
92	Spülen mit Reaktionspuffer



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn  
Dr. med. Idel  
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

im Hause

per Fax vorab: 500-42014

nachrichtlich:

Frau Prof. Dr. Wollenberg  
Direktorin der Klinik für HNO

**Ethik-Kommission**

Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic  
Universität zu Lübeck  
Stellv. Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann  
Tel.: +49 451 3101 1008  
Fax: +49 451 3101 1024

ethikkommission@uni-luebeck.de

**Aktenzeichen: 16-277**

**Datum: 08. November 2016**

**Sitzung der Ethik-Kommission am 03. November 2016**

**Antragsteller: Herr Dr. Idel**

**Titel: Identifizierung und Charakterisierung von tumorspezifischen und tumorassoziierten Mutationen/Regulationsanomalien von Karzinomen der Luft- und Speisewege sowie deren Vorläuferläsionen zur Entwicklung neuer Diagnostik- und Therapieansätze. Retrospektiver Teil**

Sehr geehrter Herr Dr. Idel,  
der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.


Die Kommission hat nach der Berücksichtigung folgender **Hinweise** keine Bedenken: Im Studienprotokoll ist der Zeitraum festzulegen, aus dem die „historischen“ Proben stammen und ihre Anzahl ist zu konkretisieren. Der Anonymisierungsprozess ist genauer darzustellen. Eine geschlechterdifferente Auswertung sollte erfolgen.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden.

Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen.

Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter [www.drks.de](http://www.drks.de)). Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß

  
Prof. Dr. med. Alexander Katalinic  
Vorsitzender

Herr Prof. Dr. Katalinic (Soz.med. u. Epidemiologie, Vorsitzender)  
Hr. Prof. Dr. Gieseler (Medizinische Klinik I, Stellv. Vorsitzender)  
Hr. PD Dr. Bausch (Chirurgie)  
Hr. Prof. Dr. Borck (Medizingeschichte u. Wissenschaftsforschung)  
 Fr. Farries (Amtsgericht Eutin)  
 Fr. PD Dr. Jauch-Chara (Psychiatrie)  
Hr. PD Dr. Lauten (Kinder- u. Jugendmedizin)

Frau Martini (Caritas)  
 Hr. Prof. Dr. Moser (Neurologie)  
 Hr. Prof. Dr. Raasch (Pharmakologie)  
Hr. Prof. Dr. Rehmann-Sutter (MGWF)  
Hr. Schneider (Landgericht Lübeck)  
 Fr. Prof. em. Dr. Schrader (Plastische Chirurgie)  
 Hr. Dr. Vonthein (Med. Biometrie u. Statistik)  
Fr. Prof. Dr. Zühlke (Humangenetik)

**Abbildung 9: Votum der Ethikkommission.** Ergebnis der Sitzung der Ethikkommission vom 03.11.2016 mit dem Aktenzeichen 16-277.

## 9 Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die ein Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Lutz Welker für die gute Betreuung und enge Zusammenarbeit sowie für die stetige Unterstützung meiner fachlichen Weiterbildung. Zudem danke ich Professor Dr. Klaus F. Rabe und den Mitarbeitern des Deutschen Zentrums für Lungenforschung (DZL) für die fachlich kompetente Betreuung, Beratung und Hilfestellung in allen Belangen sowie für die Möglichkeit zur Anfertigung der Dissertation, von Publikationen und von Präsentationen.

Ferner bedanke ich mich bei allen, die zur Umsetzung der Untersuchungen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere Herrn Professor Dr. Sven Perner und Frau Dr. Christiane Kümpers für die enge Zusammenarbeit in der Planung, Auswertung und Veröffentlichung. Zudem danke ich den Mitarbeitern des Leibniz-Forschungszentrum Borstel, vor allem Herrn Oberarzt Dr. Stellmacher und Herrn Wenzel Vogel für ihren wichtigen Beitrag in der Umsetzung der Versuche.

Ich bedanke mich herzlich beim gesamten Team des zytologischen Labors Grosshansdorfs - Felicitas Herfert, Dagmar Berndt und Hatice Elmas - ohne die eine Anfertigung der Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Klaus Kaschubowski, der mich in jeglichen Lebenslagen unterstützt und so maßgeblich zur Umsetzung der Dissertation beigetragen hat.

## 10 Lebenslauf

Lea Isabell Shari van der Linde (28 Jahre)



### Ausbildung

- |                   |  |
|-------------------|--|
| 05/2018 - 02/2020 | <b>Dissertation an der Universität zu Lübeck, Sektion Medizin</b><br>Veröffentlichung der Arbeitsergebnisse: Kuempers <i>et al.</i> , 2019<br>Präsentationen: 42 <sup>nd</sup> European Congress of Cytology 2019,<br>Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie 2019 |
| 02.2017 - 05/2019 | <b>Curriculum für die zertifizierte Ausbildung auf dem Gebiet der Klinischen Zytologie in der Pneumologie</b><br>Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.   |
| 10/2013 - 05/2016 | <b>M.Sc. Biologie</b> , Carl von Ossietzky Universität Oldenburg<br>Veröffentlichung der Arbeitsergebnisse: Ströh <i>et al.</i> , 2018   |
| 10/2010 - 09/2013 | <b>B.Sc. Biowissenschaften</b> , Westfälische Wilhelms-Universität Münster   |

### Beruflicher Werdegang

- |                   |   |
|-------------------|---|
| seit 01/2020      | <b>Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf</b> : Mitarbeiterin im Forschungs- und Lehrbereich der (Zyto)Pathologie |
| 02/2018 – 12/2019 | <b>LungenClinic Grosshansdorf, Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL)</b> : MTA im Zytologischen Labor       |
| 02/2017 – 12/2017 | <b>LungenClinic Grosshansdorf</b> : MTA im Zytologischen Labor  |

## Publikationen

---

### **Malignes Mesotheliom: Vor- und Nachteile der zytologischen Untersuchung von Ergüssen**

Welker L, van der Linde LIS, Elmas H, Stellmacher F, Önal B, Rabe KF. Atemwegs- und Lungenkrankheiten, Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle GmbH & Co. KG.

[Aktueller Stand: Druckfahne eingereicht]

### **Comparison of PD-L1 expression between paired cytologic and histologic specimens from non-small cell lung cancer patients**

Kuempers C, van der Linde LIS, Reischl M, Vogel W, Stellmacher F, Reck M, Heigener D, Rabe KF, Kirfel J, Perner S, Welker L (2019). *Virchows Archiv*. Doi:10.1007/s00428-019-02632-7

### **Cytological sampling, laboratory preparation and staining method: Staining method. Önal B, ed. Techniques in cytopathology**

Elmas H, van der Linde LIS, Coskun S (2018). Ankara: Nobel Tıp Kitabevi; 2018. p.67-90. ISBN 9786057578068.

### **Beitrag der Zytologie zur Diagnostik von Thymustumoren**

van der Linde LIS, Biancosino C, Stellmacher , Rabe KF, Welker L (2017). Atemwegs- und Lungenkrankheiten, Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle GmbH & Co. KG, Aug Munich 44(8):383. ISSN 0341-3055. Doi:10.5414/ATX02307

### **Eliminating Glutamatergic Input onto Horizontal Cells Changes the Dynamic Range and Receptive Field Organization of Mouse Retinal Ganglion Cells**

Ströh S, Puller C, Swirski S, Hölzel MB, van der Linde LIS, Segelken J, Schultz K, Block C, Monyer H, Willecke K, Weiler R, Greschner M, Janssen-Bienhold U, Dedek K (2018). *J Neurosci*. 21;38(8):2015-2028. Doi:10.1523/jneurosci.0141-17.2018

## Präsentationen

---

### **PD-L1 expression in non-small cell lung carcinoma: comparison of immunocyto- and -histological results on surgical resected specimens**

van der Linde *et al.* (2019). 42<sup>nd</sup> European Congress of Cytology, Malmö, Sweden

### **PD-L1-Expression Nicht-Kleinzelliger Lungenkarzinome: Vergleich immunzyto- und -histologischer Ergebnisse thoraxchirurgisch gewonnener Proben**

van der Linde *et al.* (2019). DGP 2019 freie Vorträge, Sektion Pneumologische Onkologie Lungenkarzinom.

Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, New York Pneumologie 2019; 73(S 01). Doi:10.1055/s-0039-1678139

### **Beitrag der Zytologie zur Diagnostik von Thymustumoren**

van der Linde *et al.* (2018). DGP 2018 freie Vorträge, Sektion 13 - Thoraxchirurgie/ Pneumologie 2018; 72(S01): 11–11. Doi:10.1055/s-0037-1619146