

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Neurologischen Institut (Edinger Institut)
Direktor: Prof. Dr. Karlheinz Plate

**Charakterisierung des zellulären Mikromilieus in humanen
Hirnmetastasen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Bastian Leon Roller

aus Seeheim-Jugenheim

Frankfurt am Main, 2021

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Neurologischen Institut (Edinger Institut)
Direktor: Prof. Dr. Karlheinz Plate

**Charakterisierung des zellulären Mikromilieus in humanen
Hirnmetastasen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Bastian Leon Roller

aus Seeheim-Jugenheim

Frankfurt am Main, 2021

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	PD Dr. Patrick Nikolaus Harter
2. Korreferent/in:	Prof. Dr. Emmanouil Fokas
Tag der mündlichen Prüfung:	28.09.2022

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	Epidemiologie und Ätiologie	5
1.2	Symptome	6
1.3	Diagnostik	6
1.4	Therapie	7
1.4.1	Strahlentherapie	7
1.4.2	Resektion	8
1.4.3	Systemische Therapie	9
1.5	Hintergrund der Dissertation	13
1.5.1	Tumormikromilieu/Tumorstroma	13
1.5.2	Allgemeine Bestandteile des Tumormikromilieus/Tumorstromas	13
1.5.3	Bestandteile und Rolle des Tumormikromilieus/Tumorstromas in Hirnmetastasen	14
1.5.3.1	Neurovaskuläre Einheit	16
1.5.3.2	Endothelzellen	17
1.5.3.3	Perizyten	18
1.5.3.4	Astrozyten	19
1.5.3.5	Mikroglia	20
1.5.3.6	Cancer-associated fibroblasts	21
1.5.4	Aktueller Stand der Forschung zum Tumormikromilieu in Hirnmetastasen	23
1.5.5	Ausschluss von Hirnmetastasen-Patienten aus klinischen Studien	25
1.5.6	Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung	26
1.6	Fragestellungen und Hypothesen der Arbeit	27
2	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Gewebeproben, Gewebeverarbeitung, Ethik, Kohorte, klinische Daten	28
2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	31
2.3	Erstellung Tissue Micro Array	32
2.4	Immunhistochemie	34
2.4.1	Einzelfärbung	34
2.4.2	Doppelfärbung	36
2.5	Verwendete Primärantikörper für die Immunhistochemie	36
2.6	Whole Slide Scanning	39
2.7	Histologische Auswertungen der immunhistochemischen Färbungen	40
2.7.1	Manuelle Auswertung	40
2.7.1.1	PD-L1	40
2.7.1.2	MHC I, MHC II und CD74	41
2.7.1.3	PDGFRb und CD31-Doppelfärbung	41
2.7.1.4	GFAP	41
2.7.1.5	FAP	42
2.7.1.6	Typ des Infiltrationsmusters von CD8-positiven Zellen	42
2.7.1.7	Bestimmung des NSCLC-Subtyps	43
2.7.2	Semi-automatisierte Auswertung	43
2.7.2.1	Multiplex Auswertung	44
2.7.2.2	Area Quantification	46
2.8	Aufnahme der histologischen Bilder	48
2.9	Statistische Auswertung/Erstellung der Grafiken	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Übersicht Hirnmetastasen-Kohorte	49
3.2	Herkunft des Tumorstromas in Hirnmetastasen	50
3.3	Zusammensetzung des Tumormikromilieus/Tumorstromas in Hirnmetastasen	59
3.4	Stromale Marker in Abhängigkeit von Durchmesser und Immunzellinfiltration der Hirnmetastase	67
3.5	Einfluss des Tumormikromilieus auf das Patientenüberleben	70
3.6	Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung	75

3.6.1	Charakterisierung der Kohorte und des Tumormikromilieus	75
3.6.2	Überlebensanalysen	85
3.6.3	Weitere klinische und biologische Vergleiche	86
3.6.3.1	Subtyp und EGFR-Mutationsstatus in der Subkohorte NSCLC	88
4	DISKUSSION	89
4.1	Beteiligung von perivaskulären Zellen an der Tumorstromabildung	89
4.2	Das Tumormikromilieu in Hirnmetastasen unterschiedlicher Entitäten.....	92
4.3	Einfluss von Tumormikromilieu/Tumorstroma auf das Überleben von Patienten mit Hirnmetastasen.....	97
4.4	Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung.....	100
4.4.1	Biologische Unterschiede zwischen der Gruppe Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung und im Rahmen der bekannten Tumorerkrankung.....	101
4.4.2	Klinische Unterschiede zwischen der Gruppe Hirnmetastasen als Erstmanifestation der Tumorerkrankung und bei bekannter Tumorerkrankung	104
5	LIMITATIONEN	105
6	ZUSAMMENFASSENDEN FAZIT	108
7	AUSBLICK	109
8	ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY	111
8.1	Zusammenfassung	111
8.2	Summary.....	113
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	115
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS APPENDIX	117
11	TABELLENVERZEICHNIS	117
12	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	117
13	LITERATURVERZEICHNIS	120
14	APPENDIX	128
15	SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG.....	134
16	DANKSAGUNG.....	135
17	LEBENS LAUF.....	136

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Hirnmetastasen (HM) sind eine schwerwiegende Komplikation der meisten soliden Tumorerkrankungen. Sie sind zugleich die häufigsten intrakraniellen Tumore und treten damit häufiger auf als hirneigene Tumore.¹ Die Inzidenz von Hirnmetastasen und das Überleben von Patienten mit Hirnmetastasen schwankt abhängig von den erhobenen Daten in der Literatur stark. Dies liegt hauptsächlich an den unterschiedlichen Zusammensetzungen der untersuchten Patienten, der starken Diskrepanz zwischen den untersuchten Zeiträumen und weiteren Faktoren wie die Etablierung zielgerichteter Therapien und damit verbessertem Gesamtüberleben. So zeigte sich in einer Studie mit epidemiologischen Daten aus der amerikanischen Datenbank „Surveillance, Epidemiology, and End Results“ (SEER) von Hirnmetastasen-Patienten aus dem Umkreis von Detroit im Zeitraum von 1973 bis 2001 (Vereinigte Staaten von Amerika) eine Inzidenz für Hirnmetastasen von 19,9% für Patienten mit Lungenkarzinom, 6,9% für Patienten mit malignem Melanom, 6,5% für Patienten mit Nierenzellkarzinom, 5,1% für Patienten mit Mammakarzinom und 1,8% für Patienten mit Kolonkarzinom.² Eine vergleichbare Studie die epidemiologische Daten zu Tumorpatienten aus der SEER-Datenbank zwischen 2010-2013 untersuchte, stellte bei Diagnose der Tumorerkrankung eine Inzidenz für Hirnmetastasen von 15,8% für Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC), 14,4% für Patienten mit Adenokarzinom der Lunge, 12,8% für Patienten mit nicht näher einzuordnendem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC), 0,4% für Patienten mit Mammakarzinom, 1,5% für Patienten mit Nierenzellkarzinom und 0,7% für Patienten mit malignem Melanom fest. Das mediane Überleben zeigte sich in dieser Kohorte heterogen und stark abhängig von der Entität. So erreichten Patienten mit Mammakarzinom-Hirnmetastasen ein medianes Überleben von 10 Monaten, jedoch Patienten mit Adenokarzinom der Lunge oder SCLC von lediglich 6 Monaten.³ Eine vergleichbare Studie mit einer großen Kohorte von Hirnmetastasen-Patienten, die im Zeitraum von 1990 bis 2011 an der medizinischen Universität Wien behandelt wurden, zeigte

vergleichbare Überlebensdaten mit einem medianen Überleben von 8 Monaten mit Mammakarzinom und 7 Monaten mit Lungenkarzinom.⁴

Neben den soliden Hirnmetastasen ist die Entwicklung einer Meningeosis neoplastica (Aussaat der Tumorzellen in das Liquorkompartiment) eine seltene Variante der Metastasierung in das zentrale Nervensystem. Unbehandelt führt diese innerhalb von 4-6 Wochen zum Tode. Bei Behandlung kann das mediane Überleben von Patienten mit einer Meningeosis neoplastica zwischen 4 bis 6 Monaten erreichen.⁵

1.2 Symptome

Häufig fallen Patienten mit Hirnmetastasen klinisch durch neurologische Symptome auf. Diese können sehr unterschiedlich sein und sind von der Lage der Hirnmetastase abhängig. So kommt es bei supratentoriellen Metastasen häufig zu epileptischen Anfällen, Paresen, Sprachstörungen, Sehstörungen, Sensibilitätsstörungen oder Verhaltensänderungen. Bei Metastasen im Kleinhirn oder Hirnstamm kann es zu Hirndrucksymptomatik mit Kopfschmerzen oder Übelkeit, Schwindel, Ataxie, Gangstörungen oder Hirnstammsyndromen kommen.^{6,7} Außerdem können Hirnmetastasen je nach Lage auch zu einer Liquorzirkulationsstörung und/oder als weitere Folge zu einem erhöhten Hirndruck führen. Bei fehlender Therapie kann ein erhöhter Hirndruck rasch durch eine Einklemmung des Hirnstamms letal verlaufen.¹ Beim Auftreten einer Meningeosis neoplastica kann es aufgrund der Dissemination im Liquorsystem zu Paresen, Querschnittssymptomatik, Hirnnervenausfällen oder Schmerzen kommen.⁵

1.3 Diagnostik

Der Goldstandard in der Diagnostik von Hirnmetastasen sind bildgebende Verfahren wie die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT). Insgesamt ist die MRT aufgrund der besseren Weichteildifferenzierung insbesondere nach Kontrastmittelgabe dem

CT überlegen.⁸ Bei diagnostischer Unsicherheit mit beispielsweise unauffälliger Staging-Untersuchung des restlichen Körpers ohne Hinweis auf einen Primarius ist eine stereotaktische Biopsie mit folgender neuropathologischer Analyse das Mittel der Wahl zur Sicherung der Diagnose.⁹ Zusätzlich kann bei Verdacht auf eine Meningeosis neoplastica eine Lumbalpunktion zur Untersuchung des Liquors ergänzt werden.

1.4 Therapie

Die Therapie von Hirnmetastasen basiert auf den drei großen Säulen der gängigen Tumorthherapie: Bestrahlung, chirurgische Resektion und Systemtherapie. Jedoch spielte die Systemtherapie vor Entwicklung zielgerichteter Therapien aufgrund der vorhandenen Blut-Hirn-Schranke, die von den gängigen Chemotherapeutika nicht effektiv überwunden werden kann, eine untergeordnete Rolle.^{10,11} Somit kam lange Zeit insbesondere die Bestrahlung und die chirurgische Resektion als spezifische Therapieoption von Hirnmetastasen in Frage. Im folgenden Abschnitt sollen die gängigen Therapiestrategien genauer vorgestellt werden.

1.4.1 Strahlentherapie

Bei einer Strahlentherapie wird zwischen einer Ganzhirnbestrahlung, konventionellen Bestrahlung einzelner Metastasen oder einer stereotaktischen Radiochirurgie unterschieden. Abhängig von Anzahl der Hirnmetastasen, Größe der Hirnmetastasen, Begleiterkrankungen und klinischem Zustand wird die jeweilige Form gewählt. Jedoch rückt die Ganzhirnbestrahlung bei multiplen Metastasen aufgrund der teilweise starken kognitiven Einschränkungen der Patienten im klinischen Verlauf immer mehr in den Hintergrund. So zeigte sich in einer randomisierten Phase III-Studie mit 151 Patienten mit Hirnmetastasen eines NSCLC, die keine Resektion oder Radiochirurgie erhalten konnten und entweder „best supportive care“ (BSC) oder Ganzhirnbestrahlung mit BSC erhielten, kein signifikanter Unterschied bezüglich dem medianen Überleben und dem primären Endpunkt „quality-adjusted life years“.¹² Im Gegensatz dazu

konnten in einer japanischen Studie auch Patienten mit 5 bis 10 Hirnmetastasen erfolgreich ohne Zunahme der Nebenwirkungen im Vergleich zu Patienten mit 2-4 Metastasen eine stereotaktische Radiochirurgie erhalten.¹³ Jedoch konnte auch durch Modifikation der Ganzhirnbestrahlung mit Aussparung des Hippocampus im Bestrahlungsfeld und/oder zusätzlicher medikamentöser Therapie mit Memantin (nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist) eine verbesserte kognitive Funktion nach Ganzhirnbestrahlung erreicht werden.^{14,15}

1.4.2 Resektion

Eine Resektion von Hirnmetastasen kann beispielsweise zur Abwendung oder Stabilisierung neurologischer Symptome als auch Verlängerung des Überlebens oder als kurativer Therapieansatz bei solitärer Hirnmetastase (keine weiteren extrakraniellen Metastasen) erfolgen. Aufgrund der Gefahr eines Verschlusshydrocephalus oder einer Hirnstammkompression sollten infratentorielle Metastasen primär reseziert werden.¹⁶ Außerdem zeigte sich in einer neurochirurgischen Studie aus Japan, dass in der japanischen Kohorte sogar eine alleinige chirurgische Resektion cerebellärer Metastasen einen Vorteil im medianen Überleben (20,5 Monate) im Vergleich zur alleinigen Ganzhirnbestrahlung (6,5 Monate) oder Radiochirurgie (9,1 Monate) erbrachte. Lediglich die Kombination von Resektion und Strahlentherapie erzielte ein besseres medianes Überleben im Vergleich zur alleinigen Resektion (35,5 Monate).⁷ Auch bei Vorliegen von multiplen Hirnmetastasen kann eine Resektion von einer oder mehrerer Hirnmetastasen sinnvoll sein. So zeigte sich auch bei Resektion multipler Hirnmetastasen keine erhöhte Mortalität und ein Vorteil für das Gesamtüberleben.¹⁷ In einer anderen, retrospektiven Studie zeigte sich ein kürzeres medianes Überleben nach Resektion bei Patienten mit mehr als 4 Metastasen (7,8 Monate gegen 5,3 Monate). Außerdem zeigte sich ein besseres medianes Überleben nach Resektion aller vorliegender Läsionen (10,6 Monate) im Vergleich zu Patienten mit noch zurückbleibenden Hirnmetastasen (5,8 Monate).¹⁸

1.4.3 Systemische Therapie

Wie bereits erwähnt, kam der systemischen Chemotherapie eine lange Zeit aufgrund der erwarteten reduzierten Penetration der Blut-Hirn-Schranke zumeist eine untergeordnete Rolle im Gesamtkontext von Hirnmetastasen zu. Es wurde davon ausgegangen, dass die meisten hydrophilen, negativ-geladenen oder protein-gebundenen Chemotherapeutika die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können.¹⁹ Weiterhin tragen auch aktive Transporter (wie beispielsweise das Multidrug-Resistance Protein 1) der Blut-Hirn-Schranke oder der Tumorzellen selber zur verringerten Penetration bzw. Wirkung von klassischen Chemotherapeutika bei.²⁰ Jedoch konnte trotz dieser Problematik auch in Hirnmetastasen unterschiedlicher Entitäten eine Wirkung von systemischen Chemotherapien festgestellt werden.¹⁹ Beispielsweise zeigte sich in einer Phase III-Studie mit Hirnmetastasen-Patienten eines NSCLC eine intrakranielle „Objective Response Rate“ (ORR) von 27% für Patienten mit alleiniger Chemotherapie mit Cisplatin und Vinorelbine. Im Vergleichsarm mit Cisplatin, Vinorelbin und Ganzhirnbestrahlung konnte eine intrakranielle ORR von 34% erreicht werden.²¹ Ein weiterer wichtiger Faktor für die Effektivität einer systemischen Chemotherapie in Hirnmetastasen ist die generelle Chemosensitivität der Tumorerkrankung. Die Chemosensitivität unterscheidet sich jedoch zwischen den unterschiedlichen Entitäten stark. So zeigt sich bei SCLC eine Ansprechrate von 30-80%, bei Mammakarzinom von 30-50%, bei NSCLC 15-30% und bei malignem Melanom lediglich von 10-15%.²²

Die Entdeckung von unterschiedlichen Treibermutationen in Karzinomen brachte die gezielte Tumorthherapie von Patienten einen großen Schritt nach vorne. So finden sich bei ca. 15% kaukasischer Patienten mit NSCLC eine „epidermal growth factor receptor“-Mutation (EGFR) und bei asiatischen Patienten sogar bis zu 50%.^{23,24} Dabei machen Deletionen in Exon 19 und L858R-Punktmutationen in Exon 21 ca. 80% aller EGFR-Mutationen im NSCLC aus.²⁵ Weitere, interessante Ziele für zumeist systemisch nutzbare Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) im NSCLC sind unter anderem die „Anaplastic Lymphoma Kinase“ (ALK), das Proto-Onkogen ROS1 und in seltenen Fällen auch „human epidermal growth factor receptor 2“-Amplifikationen/Mutationen (HER2 oder auch ERBB2 genannt)

oder BRAF-Mutationen.²⁶ Dabei treten BRAF-Mutationen bei etwa 3% der NSCLC-Patienten auf, wobei V600E mit 50% die häufigste Mutation darstellt.²⁷ Die BRAFV600E-Mutation konnte auch in NSCLC-Patienten bereits mit Dabrafenib (einem BRAF-Inhibitor zugelassenen für die Therapie von malignen Melanomen mit BRAFV600-Mutationen) zielgerichtet behandelt werden und damit eine ORR in vorbehandelten Patienten von 33% erreichen.²⁸

EGFR-Inhibitoren der ersten Generation zeigten unter der Standarddosierung (150mg/Tag) eine limitierte Penetration der Blut-Hirn-Schranke. Mit einer wöchentlichen Pulstherapie mit 1500mg konnte in NSCLC-Patienten mit Hirnmetastasen ein medianes Gesamtüberleben von 12 Monaten und eine mediane Zeit bis zum Tumorprogress im zentralen Nervensystem (ZNS) von 2,7 Monaten erreicht werden.²⁹ Osimertinib (AZD9291) ist ein vielversprechender EGFR-Inhibitor der dritten Generation der eine bessere Blut-Hirn-Schranken-Penetranz im Vergleich zu anderen EGFR-Inhibitoren im präklinischen Maus- und Affenmodellen aufweist.³⁰ Außerdem kann Osimertinib auch die häufige über den Behandlungsverlauf unter EGFR-Inhibitoren der ersten und zweiten Generation entwickelte EGFR-Resistenzmutation T790M überwinden.³¹ So konnte auch in einer Subanalyse einer randomisierten Phase III-Studie (ARUA3) mit NSCLC-Patienten, die bereits unter Therapie mit einem EGFR-Inhibitor der ersten Generation Progress zeigten und in die auch Patienten mit asymptomatische Hirnmetastasen eingeschlossen wurden, ein signifikanter Vorteil im medianen progressionsfreien Überleben der Patienten mit Hirnmetastasen und Osimertinib-Therapie (11,7 Monate) gegen die Vergleichsgruppe mit platinhaltiger Chemotherapie und Pemetrexed (5,6 Monate) gezeigt werden. Auch bezüglich der ORR zeichnete sich ein klarer Vorteil in der Osimertinib-Gruppe (70%) im Vergleich zur Chemotherapie-Gruppe (31%) ab.³²

Auch für Mammakarzinom-Hirnmetastasen gibt es beispielsweise mit dem HER2-Inhibitor Neratinib eine ZNS-wirksame zielgerichtete Therapie, die jedoch in einer einarmigen Phase II-Studie mit lediglich 40 Patientinnen eine ORR von 8% und ein medianes Gesamtüberleben von 8,7 Monaten zeigte.³³ Im Gegensatz dazu ergab eine einarmige Phase II-Studie in metastasierten Mammakarzinom-

Patienten, die eine Therapie mit Lapatinib, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, der sowohl EGFR als auch HER2 als Target hat, in Kombination mit Capecitabin (zytostatisches Chemotherapeutikum) eine intrakranielle Ansprechrate von 65,9%.³⁴

In Hirnmetastasen von malignen Melanomen zeigen sich gehäuft BRAFV600-Mutationen.³⁵ Auch für die meisten BRAFV600-Mutationen gibt es bereits in Hirnmetastasen von malignen Melanomen getestete Inhibitoren wie Vemurafenib oder Dabrafenib. So ergab sich in einer retrospektiven Analyse für Vemurafenib eine intrakranielle ORR von 50% mit einem medianen Gesamtüberleben von 7,5 Monaten³⁶ und für Dabrafenib zeigte sich in einer multizentrischen Phase II-Studie eine intrakranielle Tumorkontrolle von über 80% mit einem medianen Gesamtüberleben von 31-33 Wochen.³⁷

Systemische Therapiestrategien bei Patienten mit Hirnmetastasen werden meist an den genetischen Veränderungen des Primarius festgemacht. Jedoch konnte vor wenigen Jahren in einer Studie, die passende Paare von Primärtumoren und Hirnmetastasen genetisch untersuchte, gezeigt werden, dass sich diese teilweise genetisch voneinander unterscheiden und Hirnmetastasen klinisch relevante Mutationen vorweisen können, die im Primarius nicht vorlagen.³⁸ Dies bestätigt die Wichtigkeit einer genauen genetischen und histologischen Aufarbeitung von Hirnmetastasen, um möglicherweise therapiebare Mutationen zu finden.

Auch für die Behandlung von Hirnmetastasen werden die bereits erfolgreich in unterschiedlichen Entitäten eingesetzten Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) immer wichtiger. Diese wirken nicht wie die meisten Systemtherapien über direkten Einfluss auf die Tumorzellen, sondern über das Tumormikromilieu. Dies wird erreicht, indem sie entzündungshemmende Membranrezeptoren und deren Liganden – zu erwähnen sind hier die Proteine „programmed cell death protein 1“ (PD-1), „programmed death-ligand 1“ (PD-L1) und „cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4“ (CTLA-4) - auf den Immunzellen oder Tumorzellen inhibieren und dadurch die Immunantwort des eigenen Körpers gegen die Tumorzellen steigern.^{39,40}

So konnte bereits in einer Phase II-Studie gezeigt werden, dass Patienten mit NSCLC und Hirnmetastasen auf Pembrolizumab (Antikörper gegen PD-1) intrakraniell ansprechen (intrakranielle Antwortrate von 29,7%).⁴¹ Somit ist die intrakranielle Ansprechrate vergleichbar mit der extrakraniellen Ansprechrate auf Pembrolizumab.⁴² Jedoch zeigte sich das Ansprechen nur bei Patienten mit einer PD-L1-Expression von größer gleich 1%. Patienten mit einer Expression von unter 1% zeigten kein intrakranielles Ansprechen auf Pembrolizumab. Die PD-L1-Expression wurde in dieser Studie jedoch für die meisten Patienten aus dem Primarius oder extrakraniellen Metastasen und nicht aus den Hirnmetastasen bestimmt, weshalb die Verbindung zwischen Therapieansprechen in Abhängigkeit der PD-L1-Expression von intrakraniellen Metastasen weiterhin nicht eindeutig ist. Dabei ist zu erwähnen, dass es bei 14% der Patienten zu einem therapiebedingten schwerwiegenden unerwünschten Ereignis wie beispielsweise einer Lungen- oder Darmentzündung kam.⁴¹ Auch in Patienten mit Hirnmetastasen eines malignen Melanoms konnte in einer randomisierten Phase II-Studie ein intrakranielles Ansprechen des ICIs Nivolumab (Antikörper gegen PD-1) nachgewiesen werden (intrakranielles Ansprechen von 20%). In der Kombination von Nivolumab und dem ICI Ipilimumab (Antikörper gegen CTLA-4) konnte sogar eine intrakranielle Ansprechrate von 46% erreicht werden. Interessanterweise zeigte sich eine weitere Kohorte mit neurologisch symptomatischen Patienten und/oder leptomeningealem Befall lediglich eine Ansprechrate von 6%. Dabei kam es zu einem hohen Maß an therapiebedingten schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen (50% bis 97% je nach Kohorte).⁴³

Insgesamt ist die endgültige Wahl der spezifischen Therapieform jedoch stark von der Entität des Primarius, dem genetischen Profil des Primarius und der Hirnmetastase als auch weiteren Begleitfaktoren wie dem klinischen Zustand des Patienten, der Ausdehnung der Tumorerkrankung, der Prognose des Patienten und den Zielen/Wünschen des Patienten abhängig und kann damit nicht für alle Patienten verallgemeinert werden. Die Behandlung von Hirnmetastasen erfordert eine hohe Kompetenz der behandelnden Ärzte und Ärztinnen. Somit braucht es zur optimalen Therapiefindung für den einzelnen Patienten ein interdisziplinäres Team aus Neuroonkologen, Neurochirurgen, Radiochirurgen, Strahlentherapeuten und Neuropathologen/Pathologen. Jedoch muss je nach

Entität des Primarius und extrakraniellern Tumorstatus enge Rücksprache mit der sonst behandelnden Fachrichtung (Pneumologie, Hämatonkologie, Gynäkologie, Dermatologie, etc.) erfolgen.

1.5 Hintergrund der Dissertation

1.5.1 Tumormikromilieu/Tumorstroma

Bereits 1889 wurde von Stephen Paget dem Tumormikromilieu eine wichtige Rolle im Prozess der Metastasierung im Rahmen der „Seed-and-Soil-Theorie“ zugesprochen. So metastasiert eine Tumorzelle über den Blutstrom, jedoch benötigt sie zusätzlich ein geeignetes Mikromilieu im Zielorgan um eine Metastase auszubilden.⁴⁴ Das Tumormikromilieu beinhaltet alle nicht-malignen Zellen als auch Bestandteile der extrazellulären Matrix, die die Tumorzellen umgeben.⁴⁵⁻⁴⁷ Aufgrund der nun bereits in mehreren Entitäten erfolgreich eingesetzten Immuncheckpoint-Inhibitoren, die ihre antitumoröse Wirkung über das Tumormikromilieu erreichen, steigt die wissenschaftliche Bedeutsamkeit des Tumormikromilieus immer weiter.

1.5.2 Allgemeine Bestandteile des Tumormikromilieus/Tumorstromas

Dabei ist insbesondere die Zellzusammensetzung des Tumormikromilieus interessant, um den Prozess der Metastasierung besser zu verstehen und neue Therapieansätze zur Behandlung von Tumorerkrankungen zu entwickeln. Zum Tumormikromilieu gehören je nach Tumorentität und Lokalisation des Tumors neben den Tumorzellen auch Zellen des Immunsystems wie T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen, dendritische Zellen oder Makrophagen (im Gehirn auch Mikroglia). Außerdem liegen meistens auch veränderte Fibroblasten, die sogenannten „Cancer-associated fibroblasts“ (CAFs), als auch Adipozyten und Gefäß-assoziierte Zellen wie Endothelzellen oder Perizyten vor.⁴⁸ Weiterhin gibt es zellarme Bereiche mit reichlich extrazellulärer Matrix die hauptsächlich aus den Grundsubstanzen Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen bestehen und

sich dem physiologischen Bindegewebe von Organen ähnelt.⁴⁹ Zusätzlich findet man im physiologischen Bindegewebe als auch Tumorstroma noch weitere Bestandteile wie Kollagenfasern, retikuläre und elastische Fasern und Adhäsionsproteinen. Im Bindegewebe von Tumoren können Tumorzellen verschiedene Proteasen wie die Matrix-Metalloproteinase ausschütten, um sich damit besser durch das Tumorstroma bewegen zu können.^{46,49} Die Begriffe Tumormikromilieu als auch Tumorstroma werden in der gängigen Literatur zu Karzinomen meist als Synonyme verwendet, wobei Tumorstroma meist die eher bindegewebsreichen und zellarmen Bereiche des Tumormikromilieus beschreibt. Für eine schematische Darstellung des Tumormikromilieus in Hirnmetastasen siehe Abbildung 2.

1.5.3 Bestandteile und Rolle des Tumormikromilieus/Tumorstromas in Hirnmetastasen

Umso interessanter erscheint das Tumormikromilieu in Hirnmetastasen. Die physiologische Zellzusammensetzung des Gehirns unterscheidet sich stark zu anderen Organen mit gehäuftem Auftreten von Metastasen wie Leber, Lunge oder Knochen. So finden sich im physiologischen Gehirn hauptsächlich Zellen ektodermalen Ursprungs wie Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen) und Nervenzellen. Stroma-bildende Zellen wie Fibroblasten sind physiologisch im Gehirnparenchym nicht zu finden. Lediglich im Bereich der neurovaskulären Einheiten finden sich im Gehirn mesenchymale Zellen wie Perizyten oder Endothelzellen. Die einzige Ausnahme sind die im Gehirn weit verbreiteten Mikroglia, die ortsständigen Makrophagen des Gehirns, die auch mesenchymalen Ursprungs sind und auch außerhalb der perivaskulären Einheiten vorliegen.⁵⁰

Trotz dieser Besonderheit im Vergleich zu anderen Organen zeigt sich in Hirnmetastasen mitunter ein eigenes bindegewebiges Stroma, das sich histologisch stark vom physiologischen zerebralem Mikromilieu unterscheidet (Abbildung 1).^{51,52} Interessanterweise konnten erst kürzlich perivaskulär liegende so genannte „fibroblast-like cells“ im Gehirn von Mäusen als auch Menschen nachgewiesen werden, welche im Gehirn als perivaskuläre Fibroblasten agieren

(Abbildung 2).^{53,54} Diese PDGFR α -positiven Zellen finden sich innerhalb der neurovaskulären Einheit zwischen Endothelzellen und den Astrozyten-Endfüßchen. Sie sind im Gegensatz zu Perizyten und vaskulären glatten Muskelzellen lediglich locker mit der neurovaskulären Einheit verbunden. Weiterhin kodierten die spezifischen RNA-Transkripte dieser Zellen hauptsächlich Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Kollagene (u.a. auch Kollagen I) oder Kollagen-modifizierende Enzyme wie die Lysyloxidase. Bezüglich der RNA-Transkripte zeigte sich eine hohe Ähnlichkeit mit Fibroblasten aus der Lunge.⁵³ Möglicherweise kommt aufgrund dieser Eigenschaften den „fibroblast-like cells“ des Gehirns eine zentrale Rolle bei der Entwicklung eines Stromas in Hirnmetastasen zu. Weiterhin ist zu erwähnen, dass im ZNS-Parenchym keine klassischen Lymphgefäße vorliegen, von denen mesenchymale Zellen in die Hirnmetastase einwandern könnten.^{50,55}

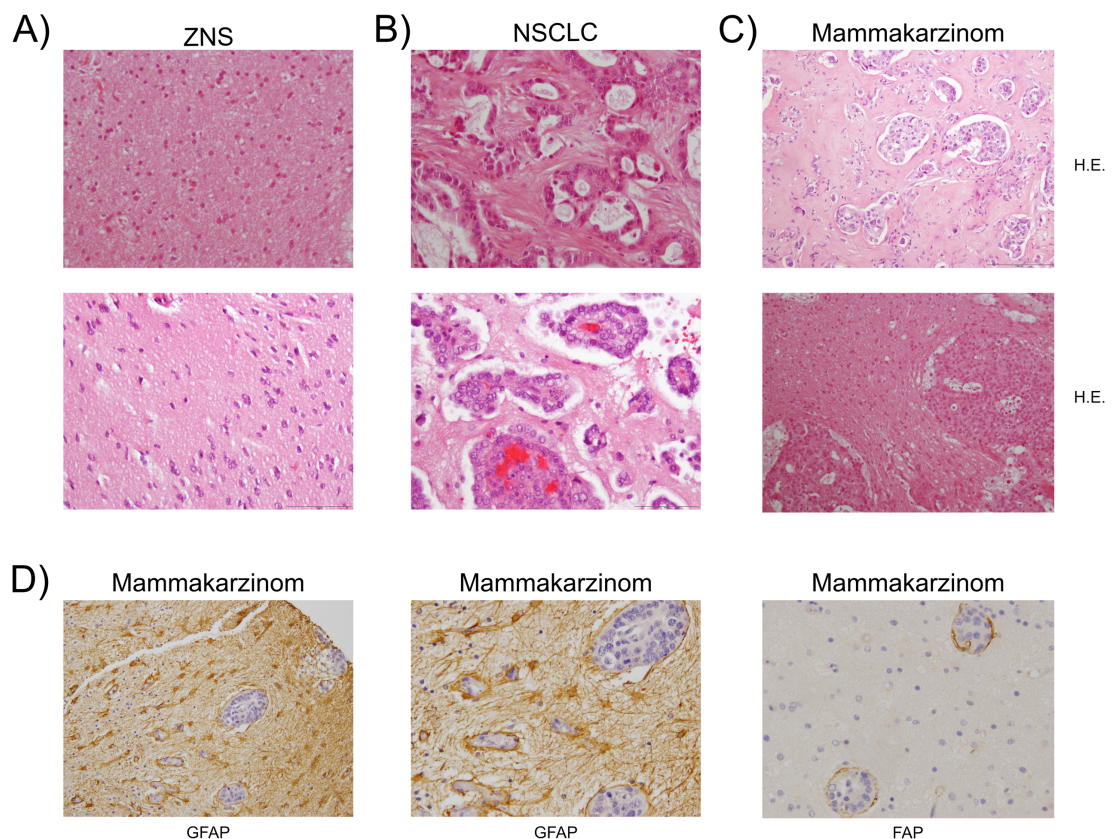


Abbildung 1: Repräsentative Schnitte zur Darstellung von physiologischem ZNS-Gewebe und Hirnmetastasen

(A) H.E.-Färbung von physiologischem ZNS-Gewebe (Vergrößerung 200x, beide Bilder). (B) Hirnmetastase eines NSCLC mit bereits etabliertem Bindegewebe mit grober, faseriger Struktur

(oberes Bild, Vergrößerung 200x) und Infiltrationszone mit ZNS-Mikroumgebung mit feiner, fibrillärer Struktur (unteres Bild, Vergrößerung 200x). (C) Hirnmetastase eines Mammakarzinoms mit bereits etabliertem Bindegewebe mit grober, faseriger Struktur (oberes Bild, Vergrößerung 100x) und Infiltrationszone mit ZNS-Mikroumgebung mit feiner, fibrillärer Struktur (unteres Bild, Vergrößerung 100x). (D) Repräsentative IHC-Schnitte einer Mammakarzinom-Hirnmetastase in der ZNS-Infiltrationszone mit GFAP-Färbung (linkes und mittleres Bild, Vergrößerung 100x und 200x) und FAP-Färbung (rechtes Bild, Vergrößerung 200x).

1.5.3.1 Neurovaskuläre Einheit

Die neurovaskuläre Einheit des Gehirns bildet die Blut-Hirn-Schranke aus und ist damit eine einzigartige Struktur im Vergleich zu den meisten anderen Organen mit häufigen Metastasen der gängigen Tumorerkrankungen wie Leber, Lunge oder Knochen. Zur neurovaskulären Einheit gehören neben Endothelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen und Perizyten auch Astrozyten-Endfüßchen, Neuronen und Mikroglia (Abbildung 2).⁵⁶ Die neurovaskuläre Einheit steht insbesondere während der Etablierung einer Hirnmetastase in engem Kontakt mit den Tumorzellen und spielt damit eine wichtige Rolle in der Ausbildung von soliden Hirnmetastasen. Im folgenden Abschnitt sollen die wichtigsten Zelltypen der neurovaskulären Einheit mit ihrer physiologischen Rolle als auch ihre Rollen in Hirnmetastasen kurz beschrieben werden:

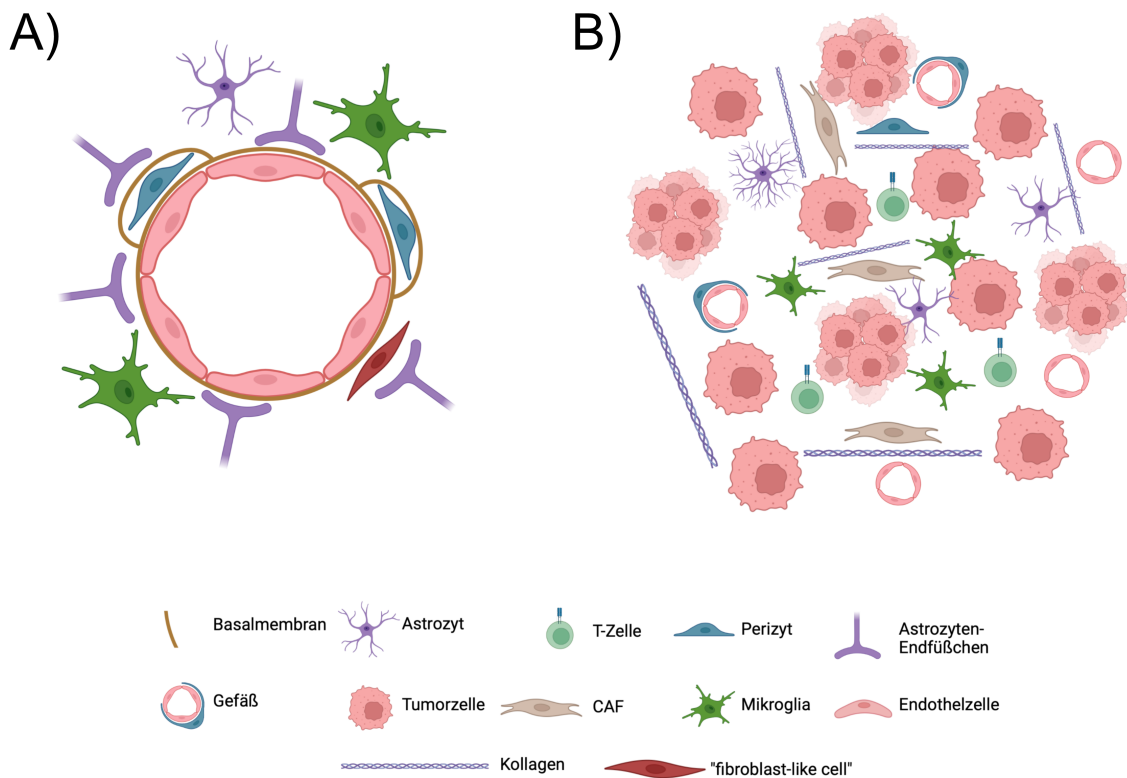


Abbildung 2: Schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit und des Tumormikromilieus von Hirnmetastasen

(A) Schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit mit den beteiligten Zelltypen. (B) Schematische Darstellung des Tumormikromilieus von Hirnmetastasen. Die Legende zur Erläuterung der unterschiedlichen Zelltypen findet sich unterhalb der Darstellungen. Created with BioRender.com.

1.5.3.2 Endothelzellen

Endothelzellen sind mesodermalen Ursprungs und bilden die Wände der Gefäße. Die Endothelzellen im Gehirn zeichnen sich insbesondere aufgrund ihrer physikalischen Barriere durch ihre enge Verbindung mittels Zonula occludens, dem speziellen Transporter-Besatz für die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Blut und Efflux-Transportern im Vergleich zu Endothelzellen anderer Organe aus.⁵⁶ Endothelzellen spielen auch eine wichtige Rolle im Tumormikromilieu von Hirnmetastasen. So konnte bereits in Mausversuchen gezeigt werden, dass CD31-positive Endothelzellen des Gehirns Exosomen (Vesikel, die sowohl Proteine als auch DNA oder RNA enthalten können) von unterschiedlichen Tumorzelllinien aufnehmen können und dadurch auf eine Metastasierung des Tumors vorbereitet werden.⁵⁷ Während und nach der Extravasation in das Gehirn

interagieren Tumorzellen mit Endothelzellen durch verschiedene Integrine (wie beispielsweise intercellular adhesion molecule-1 und lymphocyte function associated antigen-1)⁵⁸ als auch Gap Junctions mittels Connexin 43 und Connexin 23.⁵⁹ Diese Interaktionen führen möglicherweise durch verbesserter Extravasation, Ausschüttung von Wachstumssignalen und Schutz der Tumorzellen vor unterschiedlichen Stressoren durch Endothelzellen zu einem verstärktem Tumorwachstum.⁵⁸⁻⁶⁰ Weiterhin können Endothelzellen durch verschiedene ABC-Transporter wie beispielsweise dem Multi-Drug-Resistance Protein 1 Tumorzellen vor Chemotherapeutika schützen.²⁰

1.5.3.3 Perizyten

Zerebrale Perizyten entspringen aus der Neuralleiste⁶¹ und sind innerhalb der Basalmembran zwischen Endothelzellen und Astrozyten-Endfüßchen lokalisiert.⁶² Häufige genutzte Marker zur Untersuchung von zerebralen Perizyten sind beispielsweise „platelet-derived growth factor receptor type beta“ (PDGFRb), „Neural/gliial antigen 2“ (NG2) oder CD13.⁶³ Zerebrale Perizyten unterscheiden sich bezüglich des Transkriptoms von Perizyten in anderen Geweben. So konnte bereits in Mäusen gezeigt werden, dass in zerebralen Perizyten vermehrt Transkripte für ABC- oder ATP-Transporter im Vergleich zu Perizyten aus der Lunge vorliegen.⁵³ Weiterhin nehmen Perizyten im Gehirn eine wichtige Rolle in der Regulation des zerebralen Blutflusses als auch der Entwicklung und Stabilität von Gefäßen ein.⁶² Zusätzlich haben zerebrale Perizyten in Mäusen Einfluss auf die Entwicklung von Narbengewebe durch Produktion von extrazellulärer Matrix nach Verletzungen im ZNS.⁶⁴ Das im Gehirn die höchste Dichte an Perizyten im Vergleich zu anderen Geweben vorliegt, unterstreicht die wichtigen physiologischen Funktionen von zerebralen Perizyten.⁶⁵ Jedoch haben zerebrale Perizyten auch einen Einfluss auf die Entwicklung von Hirnmetastasen. So konnte in einem in vitro-Versuch mit isolierten zerebralen Perizyten aus Mäusen die Proliferationsrate als auch die Adhäsion von murinen und humanen Mammakarzinomzelllinien in vitro erhöht werden. Dies wurde über den von Perizyten sezernierten Wachstumsfaktor „Insulin-like growth factor 2“ (IGF2) vermittelt.⁶⁶ Weiterhin gibt es Hinweise

darauf, dass zerebrale Perizyten eine wichtige Rolle in der Formierung des Bindegewebes in humanen Hirnmetastasen einnehmen.⁵²

Aufgrund der fördernden Eigenschaften auf das Tumorwachstum wurde bereits probiert Perizyten durch verschieden Antikörper zu inhibieren. Ein interessantes Ziel ist dabei PDGFRb. PDGFRb ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase die zumeist von Perizyten und auch Fibroblasten exprimiert wird und physiologisch zur Ausbildung von Gefäßen und Perizyten beiträgt.^{67,68} Weiterhin ist zu erwähnen, dass PDGFRb auch von einem Astrozyten-Subtyp exprimiert werden kann.^{69,70} Jedoch konnte gezeigt werden, dass PDGFRb auch einen Einfluss auf die zerebrale Metastasierung in Mammakarzinomzelllinien in einem Mausmodell hatte. Außerdem war eine hohe PDGFRb-Expression im Tumorstroma von Mammakarzinomen-Primärtumoren ein prognostischer Faktor für die Entwicklung von Hirnmetastasen.⁶⁹ Die Inhibition von PDGF-Rezeptoren durch den etablierten Proteinkinaseinhibitor Imatinib in einem Cervixkarzinom-Mausmodell erbrachte eine Reduzierung des Tumorwachstums.⁷¹

1.5.3.4 Astrozyten

Astrozyten stehen mit ihren Endfüßchen in engem Kontakt mit den restlichen Zellen der neurovaskulären Einheit als auch der Basalmembran. Astrozyten haben einen großen Einfluss auf die Regulation der Wasserhomöostase über die in den Endfüßchen vorhandenen Aquaporin-4-Proteine.⁵⁶ Außerdem beeinflussen Astrozyten den Ionenhaushalt um Neurone über die extrazelluläre Regulation von Kalium. Weiterhin haben Astrozyten Einfluss auf die synaptische Funktion von Neuronen durch Regulation von Neurotransmittern über beispielsweise Glutamat-Transporter als auch auf den Metabolismus von Neuronen durch beispielsweise direkte Nährstoffübertragung.⁷² Zusätzlich spielen reaktive Astrozyten aufgrund der Produktion von extrazellulärer Matrix eine wichtige Rolle bei traumatischen ZNS-Verletzungen.^{73,74} So konnte in einem Rattenmodell mit mechanischer Rückenmarksverletzung nachgewiesen werden, dass Astrozyten neben Lamininen (Glykoproteine der Basalmembran) auch Kollagen IV im Rahmen der glialen Narbe exprimieren können.⁷⁴ Auch in Hirnmetastasen spielen Astrozyten eine wichtige Rolle. So konnte bereits in

in vitro-Versuchen gezeigt werden, dass Maus-Astrozyten humane Tumorzellen eines Lungenkarzinoms als auch Mammakarzinoms mittels Gap Junctions vor Chemotherapeutika schützen. Dies wird über eine durch Astrozyten gesteigerte Expression von Überlebensgenen wie BCL2L1 oder TWIST1 in den Tumorzellen erreicht.⁷⁵ In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass Astrozyten mit Tumorzelllinien von verschiedenen Karzinomen über Connexin 43 interagieren. Über Connexin 43 kommt es zu einem cGAMP-Transfer von Tumorzellen in Astrozyten, die daraufhin inflammatorische Zytokine wie den „tumor necrosis factor“ (TNF) produzieren und damit wiederum in Tumorzellen zur Aktivierung der STAT1- und NF- κ B-Signalwege führen, die ein vermehrtes Wachstum als auch Resistenz gegenüber Chemotherapeutika als Folge haben. Die Interaktion zwischen Astrozyten und Tumorzellen konnte durch Blockade der Connexin 43 Gap Junctions mittels der Stoffe Tonabersat (Gap Junction-Modulator) und Meclofenaminsäure (Anti-inflammatorisches Medikament mit Einfluss auf Connexin 43) eingeschränkt werden.⁷⁶

1.5.3.5 Mikrogliia

Mikrogliia sind Teil des angeborenen Immunsystems und neben aus dem Knochenmark einwandernden Makrophagen die häufigsten Gewebsmakrophagen des Gehirns. Sie entstammen aus Vorläuferzellen des Dottersacks und wandern während der frühen Embryonalzeit in das Gehirn ein.⁷⁷ Im physiologischen Gehirn haben sie eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort, Wundheilung und auch als antigenpräsentierende Zellen.^{56,78} Die Rolle von Mikrogliia in Hirnmetastasen ist bislang nicht eindeutig geklärt. Einerseits gibt es Hinweise darauf, dass Mikrogliia einen negativen Einfluss auf das Wachstum von Hirnmetastasen haben. So konnte in einem in vitro-Versuch gezeigt werden, dass murine Mikrogliazellen sowohl humane als auch murine Tumorzelllinien lysieren können.⁷⁹ Andererseits konnte Pukrop et al zeigen, dass Mikrogliia die Invasion und Kolonisation von Mammakarzinomzellen im Hirngewebe steigern. Dies wird möglicherweise über den Wnt-Signalweg erreicht.⁸⁰

1.5.3.6 Cancer-associated fibroblasts

Eine immer wichtigere Rolle in der Tumorgenese innerhalb des Tumormikromilieus von Karzinomen nehmen die CAFs ein. Diese unterscheiden sich von physiologischen Fibroblasten aufgrund ihrer Fähigkeit zur Proliferation, Exprimierung von speziellen Membranproteinen – hier ist insbesondere das „Fibroblast activation protein“ (FAP) zu erwähnen, das sich als spezifisches Erkennungsmerkmal für CAFs herausgestellt hat - und der Ausschüttung von Chemokinen und Wachstumsfaktoren.^{81,82} So konnte für die im Tumorstroma von unterschiedlichen Primärtumoren vorliegenden CAFs eine fördernde Wirkung auf die Metastasierung, Angiogenese und das Tumorwachstum nachgewiesen werden.^{83,84} So kommt es durch die parakrine Ausschüttung vom Chemokin „stromal cell-derived factor 1“ (SDF-1 oder auch CXCL12) durch humane CAFs zu einer vermehrten Rekrutierung von CD31-positiven Endothelzellen und gesteigertem Tumorwachstum in Mammakarzinomzelllinien in vivo als auch in vitro.⁸⁴ Auch im Primarius von Kolonkarzinomen konnte ein negativer Einfluss auf die Prognose von einer bestimmten Expression von stromalen Markern (unter anderem auch FAP) als auch von bestimmten genetischen Profilen der CAFs nachgewiesen werden. Insbesondere scheint dies über eine erhöhte Expression vom Zytokin „Transforming Growth Factor beta“ (TGF β) in den CAFs vermittelt zu werden.⁸⁵ Außerdem tragen CAFs auch zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei. Dies konnte mit isolierten CAFs-Subtypen aus chemosensitiven und chemoresistenten Mammakarzinomen in Kokultur-Experimenten mit Tumorzellen nachgewiesen werden. Dieser Effekt wird durch die Sezernierung von Interleukin 6 und 8 erreicht und konnte durch neutralisierende Antikörper gegen die beiden Interleukine aufgehoben werden.⁸⁶ Weiterhin können CAFs durch ihre modulatorischen Eigenschaften zu einer Immunevasion des Tumors führen. So zeigte sich in einem Mausmodell mit Kolonkarzinomzellen eine verminderte Infiltration von CD8-positiven Zellen bei Zugabe von CAFs im anwachsenden Tumor. Dies wurde durch von CAFs ausgeschüttetem Interleukin 6 vermittelt. Dieser Effekt konnte durch Interleukin 6-Blockade via Antikörper verhindert werden.⁸⁷ Weiterhin haben CAFs auch einen wichtigen Einfluss auf die Organisation und Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix und damit einen indirekten Einfluss auf

Tumorwachstum und Metastasierung.⁸⁸ De Kruijff et al konnte bereits in Mammakarzinomen nachweisen, dass die extrazelluläre Matrix einen wichtigen Einfluss auf das Überleben von Tumorpatienten haben kann. So zeigten Patienten mit einem Stroma-reichen Tumor ein schlechteres Gesamtüberleben als Patienten mit einem Stroma-armen Tumor.⁸⁹

Aufgrund der vielfältigen Einflüsse von CAFs auf das Tumorwachstum wurde bereits versucht diese durch zielgerichtete Therapien zu hemmen. So kamen bereits Antikörper gegen FAP sowohl in vitro als auch in vivo und im Menschen zum Einsatz. In einer Phase II-Studie, wurde Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom der FAP-Antikörper Sibrotuzumab verabreicht, der jedoch nur zu einer unzureichenden Wirkung bezüglich einer Tumorremission führte.⁹⁰ Im Gegensatz dazu konnte in einer aktuelleren in vitro-Arbeit eine Reduzierung der Invasivität von Tumorzellen über die Inhibition von FAP mittels Antikörper als auch „small interfering RNA“ (siRNA) erzielt werden.⁹¹

Auch in den Hirnmetastasen von unterschiedlichen Entitäten wie Lungenkarzinomen als auch Mammakarzinomen konnten bereits CAFs nachgewiesen werden.⁹² Tew et al konnten bereits mehrere CAFs-Zelllinien aus Hirnmetastasen von Mammakarzinomen und Lungenkarzinomen erstellen und charakterisieren. In den Gen-Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass die isolierten Zelllinien typische CAFs-Marker wie FAP, TGF β , PDGFR β und unterschiedliche Kollagene wie Kollagen I exprimieren. Interessanterweise zeigten die unterschiedlichen CAFs-Zelllinien große Ähnlichkeit zwischen den unterschiedlichen Entitäten. Außerdem zeigten sich keine Ähnlichkeiten in der Gen-Expression von den untersuchten Zelllinien mit glialen Zellen, was gegen gliale Zellen als Ursprungszellen der CAFs im Gehirn spricht. Im Gesamtbild wurde aufgrund des Gen-Expressionsprofils davon ausgegangen, dass die zerebralen CAFs von mesenchymalen Zellen des Gehirns ausgehen. Interessanterweise reduzierten die CAFs-Zelllinien aus Hirnmetastasen in vivo das Tumorwachstum einer primären SCLC-Zelllinie, die aus einer Hirnmetastase isoliert wurde.⁹³ Im Gegensatz dazu konnte Choi et al zeigen, dass CAFs die Zelladhäsion von Mammakarzinomzelllinien an humanen Endothelzellen des Gehirns steigern. Außerdem konnte in denselben 3D in vitro-Versuchen eine

gesteigerte Migration als auch Kolonisation nachgewiesen werden. Dies wird unter anderem mit der Hochregulation von Integrinen der Tumorzellen durch CAFs erklärt. Dabei ist zu erwähnen, dass für diese Studie CAFs aus dem Primarius von Mammakarzinomen und nicht Hirnmetastasen genutzt wurden.⁹⁴ Somit ist die genaue Einfluss von CAFs auf das Wachstum von Hirnmetastasen und den Einfluss auf das Überleben von Hirnmetastasen-Patienten bislang nicht eindeutig geklärt.

1.5.4 Aktueller Stand der Forschung zum Tumormikromilieu in Hirnmetastasen

Trotz der bereits ausführlichen Untersuchungen der unterschiedlichen Zelltypen sowohl in den Primarien als auch in Hirnmetastasen bleiben weiterhin die genauen Einflüsse der unterschiedlichen Zellen des Tumormikromilieus auf die Ausbildung von Hirnmetastasen unklar. Insbesondere existieren unterschiedliche Daten darüber, wie sich das Tumormikromilieu/Tumorstroma in dem einzigartigen physiologischen Mikromilieu des Gehirns bildet und vor allem welche Zelltypen daran beteiligt sind.

Außerdem stellt sich die Frage, ob unterschiedliche Zusammensetzungen des Tumormikromilieus/Tumorstromas in Hirnmetastasen eine prognostische Relevanz für Patienten haben. Harter et al konnte in einer gemischten Hirnmetastasen-Kohorte bestehend aus unterschiedlichen Entitäten zeigen, dass „tumor-infiltrating lymphocytes“ (TILs) keinen Einfluss auf die Prognose von Patienten mit Hirnmetastasen haben. Interessanterweise fanden sich in kleineren Hirnmetastasen mehr TILs als in größeren Hirnmetastasen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Hirnmetastasen kein PD-L1 exprimiert. Jedoch ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen PD-L1-Expression und FOXP3-positiven Lymphozyten, was ein Hinweis auf ein immunhemmendes Tumormikromilieu ergibt.⁹⁵ Auch Berghoff et al untersuchte in einer Hirnmetastasen-Kohorte mit Melanom-Patienten TILs und die PD-L1-Expression. Dort zeigte sich ebenso kein Einfluss von den untersuchten TILs oder der PD-L1-Expression auf das Überleben der Patienten nach Diagnose der Hirnmetastase. Weiterhin konnte eine signifikante Korrelation und

topographische Nähe von unterschiedlichen TILs mit der PD-L1-Expression festgestellt werden. Berghoff et al bewerteten eine erhöhte PD-L1-Expression in Hirnmetastasen mit begleitenden TILs als immunaktives Tumormikromilieu.⁹⁶

Einige weitere Studien untersuchten die biologischen Unterschiede zwischen gepaartem Primärtumor und Hirnmetastase von Patienten. Fukumura et al verglichen dabei das Tumormikromilieu von unterschiedlichen Primärtumoren mit den gepaarten Hirnmetastasen derselben Patienten. Dabei zeigte sich mittels der über verschiedene Computeralgorithmen (basierend auf den erhobenen mRNA-Sequenzierungsdaten) berechneten Stromalen Zellbestandteile als auch Immunzellzusammensetzung sowohl ein verminderter Anteil von Stromazellen als auch Immunzellen in der Hirnmetastase im Vergleich zum Primärtumor. Dies zeigte sich sowohl in der Gesamtkohorte als auch in den Subkohorten der Lungenkarzinome, Mammakarzinome und Nierenzellkarzinome. Interessanterweise zeigte sich in dieser Studie ein Überlebensvorteil für Patienten mit erhöhtem T-Zell-Nachweis in der Hirnmetastase.⁹⁷ Auch Kudo et al konnte ebenso in einer genetischen als auch immunhistochemischen Analyse von gepaarten Primärtumoren und Hirnmetastasen von NSCLC-Patienten ein immunsuppressives Mikromilieu in den Hirnmetastasen feststellen. So zeigte sich in NSCLC-Metastasen eine verminderte Anzahl von TILs im Vergleich zum Primärtumor.⁹⁸ Brastianos et al verglich gepaarte Primärtumore und Hirnmetastasen in Bezug auf genetische Veränderungen. Dabei konnte in 53% der untersuchten Hirnmetastasen (n=46/86) eine klinisch relevante genetische Alteration (Mutationen, Amplifikation oder biallelische Inaktivierung) festgestellt werden, die im Primärtumor nicht vorlag.³⁸

Jedoch wurde neben den Immunzellen innerhalb des Tumormikromilieus und genetischen Veränderungen der Tumore auch Augenmerk auf andere biologische Eigenschaften von Hirnmetastasen gelegt. Berghoff et al untersuchte in einer Studie die Proliferationsrate und Gefäßdichte in Hirnmetastasen. Dabei zeigte sich die höchste Gefäßdichte der untersuchten Entitäten in den Hirnmetastasen von Nierenzellkarzinomen und die niedrigste gemessene Gefäßdichte in Melanomen. Im Gegensatz dazu fand sich die höchste Proliferationsrate in Hirnmetastasen von Patienten mit Kolonkarzinomen und die

niedrigste in Nierenzellkarzinomen. Weiterhin zeigte sich sowohl in der Gesamtkohorte als auch in den Subkohorten der NSCLC und Nierenzellkarzinome ein signifikanter Überlebensnachteil für Patienten mit erhöhter Proliferationsrate in der Hirnmetastase.⁹⁹

Somit konnte bereits durch mehrere Publikationen festgestellt werden, dass in Hirnmetastasen im Vergleich zu den Primärtumoren ein immunhemmendes Tumormikromilieu vorliegt. Außerdem konnten Unterschiede bezüglich der Gefäßdichte als auch Proliferationsrate zwischen den unterschiedlichen Entitäten festgestellt werden. Jedoch konzentrierte sich die Hirnmetastasen-Forschung der letzten Jahre insbesondere auf die Unterschiede bezüglich Treibermutationen und der Immunzellzusammensetzung zwischen Primärtumor und Hirnmetastase. Der Einfluss von anderen Zelltypen des Tumormikromilieus von Hirnmetastasen wie beispielsweise CAFs auf das Überleben von Hirnmetastasen-Patienten oder den Einfluss auf das restliche Tumormikromilieu ist weiterhin nicht eindeutig geklärt.

1.5.5 Ausschluss von Hirnmetastasen-Patienten aus klinischen Studien

In der Vergangenheit wurden Patienten mit Hirnmetastasen aus unterschiedlichen Gründen gehäuft aus Studien für Systemtherapien (insbesondere Immuncheckpoint-Therapien) ausgeschlossen. Ein weiterer zu bedenkender Punkt ist der Ausschluss von Patienten mit symptomatischen Hirnmetastasen, dies ist in über 99% der klinischen Studien zu Hirnmetastasen der Fall.^{100,101} Ein Grund für den Ausschluss von Hirnmetastasen-Patienten ist die Testung von experimentellen Medikamenten mit unklarer ZNS-Penetranz. So kann ein Medikament aufgrund fehlender Wirkung im ZNS aufgrund der Blut-Hirn-Schranke zu einem schlechteren progressionsfreien Überleben als auch Gesamtüberleben führen als in Patienten ohne Hirnmetastasen. Auch die Angst vor Nebenwirkungen im ZNS war zu Beginn im Falle der Immuncheckpoint-Inhibitoren ein Faktor für den Ausschluss von Hirnmetastasen-Patienten.¹⁰⁰ Auch die schlechte Lebenserwartung von Patienten mit Hirnmetastasen war ein Grund, der zum Ausschluss dieser Gruppe von klinischen Studien führte.¹⁰² Dies ist

einerseits fatal für die Evolution der Therapien für Hirnmetastasen und andererseits vor dem Aspekt, dass Patienten mit symptomatischen Hirnmetastasen ein kürzeres Gesamtüberleben aufweisen als Patienten mit asymptomatischen Hirnmetastasen.¹⁰³

1.5.6 Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung

Weiterhin ist zu erwähnen, dass bei einem Teil der Patienten mit symptomatischer Hirnmetastase erst die fortgeschrittene Tumorerkrankung aufgrund der neurologischen Symptomatik entdeckt wird. Es konnte bereits in zwei retrospektiven Studien von Füreder et al und Agazzi et al gezeigt werden, dass ein Großteil dieser Patienten überproportional häufig im Vergleich zur Gesamtkohorte aus Lungenkarzinom-Patienten (59,8% bis 67,1%) besteht. Im Gegensatz dazu machten Patienten mit anderen Entitäten einen wesentlich kleineren Teil der Gesamtkohorte von Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung aus (0,9% bzw. 1,6% Mammakarzinom-Patienten, 5,7% bzw. 2,5% Melanom-Patienten, 2,0% bzw. 2,5% Kolonkarzinom-Patienten und 4,6% bzw. 3,3% Nierenzellkarzinom-Patienten).^{104,105} Weiterhin ist zu erwähnen, dass es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der Hirnmetastasen und der Lokalisation der Hirnmetastasen zwischen Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung und Patienten mit bekannter Tumorerkrankung und Hirnmetastasen gab. Allerdings fanden sich in Patienten mit Hirnmetastase und bekannter Tumorerkrankung signifikant häufiger extrakranielle Metastasen.^{104,105} Außerdem zeigten sich in Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation häufiger mindestens 3 cm große Hirnmetastasen (50,1% gegen 30,5%) als auch ein besseres medianes Gesamtüberleben nach Diagnose der Hirnmetastase (8 Monate gegen 6 Monate).¹⁰⁴ Dabei ist zu vermerken, dass Überlebensanalyse in der Gesamtkohorte von Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung durchgeführt wurden und deswegen mehrere unterschiedliche Entitäten beinhaltet.

In den soeben beschriebenen Arbeiten bezogen sich die retrospektiven Auswertungen auf klinische Daten. Aufgrund des unterschiedlichen zeitlichen Auftretens der Hirnmetastasen im Laufe der Tumorerkrankung und den bereits beschriebenen klinischen Unterschieden zwischen den beiden Gruppen stellt sich jedoch die Frage, ob sich die Hirnmetastasen dieser beiden Gruppen möglicherweise auch von ihrer Zusammensetzung des Tumormikromilieus/Tumorstromas unterscheiden. Jedoch fehlen durchgreifende Untersuchungen bezüglich möglicher biologischer Unterschiede in den Hirnmetastasen dieser beiden Patientengruppen insbesondere vor dem Hintergrund des Vergleichs einer meist therapienaiven Gruppe gegen eine Langzeit-therapierte Gruppe mit neu aufgetretenen Hirnmetastasen.

1.6 Fragestellungen und Hypothesen der Arbeit

Aufbauend auf der vorbestehenden Literatur zum Tumormikromilieu in Hirnmetastasen wurden mehrere Fragestellungen und Hypothesen formuliert:

Hypothese 1: Aufgrund des physiologischen Mangels von Fibroblasten und bindegewebigen Stroma im Gehirn, ist bislang unklar, welche Zellen das bindegewebige Stroma in Hirnmetastasen bilden. Es wird davon ausgegangen, dass perivaskuläre Zellen an der Stromabildung in Hirnmetastasen beteiligt sind.
„Perivaskuläre mesenchymale Zellen bilden das Stroma von Hirnmetastasen.“

Hypothese 2: Es gibt bereits Hinweise darauf, dass sich Hirnmetastasen von unterschiedlichen Entitäten von ihren biologischen Eigenschaften unterscheiden.
„Die Komposition des Tumormikromilieus bzw. Tumorstromas von Hirnmetastasen ist abhängig von der Tumorentität und somit vom Primärtumor.“

Hypothese 3: Das Tumormikromilieu hat Einfluss auf das Überleben in den meisten Primärtumoren. Ob dies auch für das Tumormikromilieu zutrifft, ist bislang nicht eindeutig geklärt.

„Bestimmte Eigenschaften oder Bestandteile des Tumormikromilieus von Hirnmetastasen haben einen negativen Einfluss auf das Überleben von Patienten mit Hirnmetastasen.

Insbesondere CAFs haben einen negativen Einfluss auf das Überleben von Hirnmetastasen-Patienten.“

Hypothese 4: Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung unterscheiden sich von einigen klinischen Parametern zu Patienten mit Hirnmetastase im Verlauf der bekannten Tumorerkrankung. Ob sich diese beiden Gruppen auch von ihrer Zusammensetzung des Tumormikromilieus unterscheiden, ist bislang nicht eindeutig geklärt.

„Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung zeigen im Vergleich zu Patienten mit Hirnmetastase im Verlauf der bekannten Tumorerkrankung eine signifikant unterschiedliche Komposition des Tumormikromilieus.“

2 Material und Methoden

Um die genannten Hypothesen zu überprüfen, wurden immunhistochemische Färbungen für verschiedene zelluläre als auch stromale Marker angefertigt. Dabei wurden sowohl manuelle als auch semi-automatisierte Auswertungen mittels einer Analysesoftware durchgeführt. Des Weiteren wurden die immunhistochemischen Ergebnisse untereinander als auch mit klinischen Daten verglichen.

2.1 Gewebeproben, Gewebeverarbeitung, Ethik, Kohorte, klinische Daten

Es wurde Formalin-fixiertes in Paraffin-eingebettetes Gewebe von archivierten Hirnmetastasen analysiert, welche auf „tissue micro arrays“ (TMA) zusammengefasst und weiter prozessiert wurden. Die Paraffinblöcke für die TMA-Erstellung wurden von 2005 bis 2018 gesammelt. Alle Blöcke wurden bei Raumtemperatur gelagert. Alle Proben wurden aus der UCT-Tumorbank der

Goethe-Universität Frankfurt am Main entnommen. Die Genehmigung für die Studie wurde von der Ethikkommission des UCT Frankfurt der Goethe-Universität Frankfurt am Main erteilt (Projektnummer: GS 4/09; SNO-07-2018). Insgesamt wurden in dieser Kohorte 338 Gewebeproben von Hirnmetastasen, die von 244 Patienten stammten und auf insgesamt 7 TMAs verteilt waren, untersucht, wovon 94 an einem NSCLC, 48 an einem Mammakarzinom, 20 an einem Kolonkarzinom, 19 an einem malignen Melanom, 16 an einem SCLC, 13 an einem Nierenzellkarzinom, 6 an nicht weiter spezifizierbaren Karzinomen (NOS) und 28 an selteneren Tumoren wie Ovariakarzinomen oder Magenkarzinomen litten (folgend als „andere Karzinome“ benannt). Retrospektiv wurden sowohl Überlebensdaten von 244 Patienten vom Zeitpunkt der Hirnmetastasen-Operation als auch von 223 Patienten ab dem Zeitpunkt der Diagnose des Primarius gesammelt. Außerdem wurden klinische Daten wie unter anderem Größe und Anzahl der Hirnmetastasen, neoadjuvante und adjuvante Therapien, weitere Metastasierungen, Lokalisation des Primarius und der Hirnmetastase und Patientenalter gesammelt. Einige der Daten lagen nur bei ausgewählten Patienten vor. Die Größe der operierten Hirnmetastase wurde aus den neuroradiologischen Befunden von präoperativen MRT-Bildgebungen der Patienten entnommen. Die Befunde wurden von den hausinternen neuroradiologischen Ärzten und Ärztinnen angefertigt. Es wurde lediglich der größte radiologisch bestimmte Durchmesser der operierten Hirnmetastasen in Millimeter für die weiteren Analysen genutzt. Auch die Lokalisation der operierten Hirnmetastase im ZNS und die weitere Anzahl an Hirnmetastasen wurde aus den neuroradiologischen Befunden oder neurochirurgischen OP-Berichten übernommen. Die Lokalisation des Primarius wurde entweder aus der Tumordokumentationsübersicht oder aus den radiologischen Befunden der CT-Thorax/Abdomen-Untersuchungen übernommen. Weiterhin wurden sowohl der EGFR-Mutationsstatus als auch die Information zu erhaltenen Vortherapien aus UCT-Datenbank oder Tumordokumentationsübersicht verwendet. Eine Übersicht über klinische Daten der untersuchten Kohorte findet sich in Tabelle 1.

Entität	Geschlecht (m/w)	Alter (Jahre)	Größe der HM (mm)	Anzahl HM	Überleben ab HM-OP (Tage)	Überleben ab Diagnose Primarius (Tage)	HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung	Tage zwischen HM-OP und Diagnose Primarius (Tage)
Andere Karzinome (n=28)	m: 16 (57,1%) w: 12 (42,9%)	33-80 Median 59	18-50 Median 32 n=7/28	1-4 Median 1,5 n=8/28	7-938 Median 174 n=28/28	8-3340 Median 829 n=28/28	Ja: 3 (10,7%) Nein: 25 (89,3%) n=28/28	0-3340 Median 503,5 n=28/28
Karzinom „NOS“ (n=6)	m: 1 (16,7%) w: 5 (83,3%)	49-71 Median 60,5	15-46 Median 33 n=5/6	1-2 Median 1 n=5/6	0-175 Median 33 n=6/6	0-175 Median 79,5 n=4/6	Ja: 4 (100%) Nein: 0 (0%) n=4/6	0 Median 0 n=4/6
Kolonkarzinom (n=20)	m: 11 (55%) w: 9 (45%)	34-75 Median 65,5	26-48 Median 37,5 n=6/20	1-16 Median 1 n=7/20	4-1342 Median 94 n=20/20	4-3402 Median 1302 n=19/20	Ja: 3 (15,8%) Nein: 16 (84,2%) n=19/20	0-3220 Median 954 n=19/20
NSCLC (n=94)	m: 52 (55,3%) w: 42 (44,7%)	13-80 Median 62	7-96 Median 36,5 n=48/94	1-10 Median 1 n=44/94	0-3051 Median 249 n=94/94	0-3140 Median 495 n=91/94	Ja: 52 (56,5%) Nein: 40 (43,5%) n=92/94	0-3120 Median 0 n=91/94
SCLC (n=16)	m: 8 (50%) w: 8 (50%)	43-73 Median 60,5	33-72 Median 57 n=13/16	1-13 Median 1 n=10/16	0-653 Median 98 n=16/16	17-1350 Median 381 n=16/16	Ja: 10 (62,5%) Nein: 6 (37,5%) n=16/16	0-1248 Median 0 n=16/16

Mamma- karzinom (n=48)	m: 0 (0%) w: 48 (100%)	33-78 Median 58,5	23-76 Median 38 n=18/48	1-20 Median 2 n=22/48	0-3071 Median 476 n=48/48	69-6816 Median 1613 n=43/48	Ja: 1 (2,3%) Nein: 42 (97,7%) n=43/48	0-6509 Median 1188 n=43/48
Melanom (n=19)	m: 7 (36,8%) w: 12 (63,2%)	42-81 Median 60	24-58 Median 37,5 n=8/19	1-20 Median 1 n=10/19	4-3059 Median 187 n=19/19	187-6697 Median 1242,5 n=14/19	Ja: 2 (14,3%) Nein: 12 (85,7%) n=14/19	0-6300 Median 993 n=14/19
Nierenzell- karzinom (n=13)	m: 12 (92,3%) w: 1 (7,7%)	45-75 Median 58	20-45 Median 30 n=7/13	1-3 Median 1 n=9/13	0-2261 Median 921 n=13/13	0-15479 Median 2646,5 n=8/13	Ja: 2 (22,2%) Nein: 7 (77,8%) n=9/13	0-13218 Median 1552 n=8/13
Gesamt- kohorte (n=244)	m: 107 (43,9%) w: 137 (56,1%)	13-81 Median 61	7-96 Median 37 n=112/244	1-20 Median 1 n=115/244	0-3071 Median 229 n=244/244	0-15479 Median 850 n=223/244	Ja: 77 (34,2%) Nein: 148 (65,8%) n=225/244	0-13218 Median 476 n=223/244

Tabelle 1: Klinische Daten der Hirnmetastasen-Kohorte

Klinische Daten der Hirnmetastasen-Kohorte aufgliedert nach den einzelnen Entitäten. Es ist sowohl die Verteilung der einzelnen Werte (Minimum und Maximum) als auch der Median angegeben. Prozentangaben sind auf eine Nachkommastelle gerundet. Abkürzungen: m = männlich; w = weiblich; HM = Hirnmetastase; „NOS“ = not otherwise specified; NSCLC = nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; SCLC = kleinzelliges Lungenkarzinom

2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Erstellung der TMAs wurden vorerst von allen vorliegenden Tumorblöcken der Patienten H.E.-Färbungen angefertigt. Für die Anfertigung der H.E.-Färbung

wurden 3 µm dicke Schnitte von in Formalin-fixiertem und Paraffin eingebettetem Gewebe genutzt. Für die 3 µm dicken Gewebeschnitte wurden die erstellten TMA-Blöcke entweder mit dem Leica-Mikrotom Jung SM2000R oder SM 2000R zugeschnitten (Leica Biosystems, Wetzlar, Hessen, Germany) und auf geschliffene Superfrost-Objektträger überführt (Modell: J1800AMNZ, Menzel Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika). Daraufhin wurden die erstellten Gewebeschnitte über Nacht bei 37 Grad im Inkubator getrocknet (Heraeus Function Line, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika). Als nächstes folgte die Deparaffinierung der Schnitte. Nach ausreichender Trocknung wurden die Schnitte mindestens zweimal für 10 Minuten in Xylol inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten (100%, 96% und 70%) rehydriert und danach mehrmals in destilliertem Wasser gewaschen. Als nächster Schritt erfolgte für 5 Minuten eine Inkubation in Hämalaunlösung mit anschließendem Spülen für mehrere Minuten mit fließendem Leitungswasser (zum Erreichen des benötigten PH-Wertes von 3). Danach erfolgt eine Inkubation für 2 Minuten in der Eosin-Lösung mit darauffolgendem mehrfachem Waschen mit destilliertem Wasser. Daraufhin folgt eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkohol- und Xylolreihe (analog zur Rehydrierung, jedoch in umgekehrter Reihenfolge). Im Anschluss wurden die Schnitte mit Deckglas (Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland) und Eindeckmittel (Eukitt, ORSAtec GmbH, Bobingen, Deutschland) eingedeckt. Für das Beispiel einer H.E.-Färbung siehe Abbildung 1.

2.3 Erstellung Tissue Micro Array

Um die große Kohorte von Hirnmetastasen-Patienten effektiv und vergleichbar mit immunhistochemischen Färbungen zu untersuchen, wurden die in diesem Abschnitt beschriebenen TMAs erstellt. TMAs ermöglichen viele unterschiedliche Patienten (bis zu 60) auf lediglich einem histologischen Schnitt zu untersuchen (siehe Abbildung 3).

Für die Erstellung der Hirnmetastasen-TMAs wurden Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Gewebeschnitte aller vorliegender Tumorblöcke der oben genannten Patienten durchgeführt. Daraufhin wurde das Gewebe auf eine ausreichende Gewebequalität mit vitalen Tumoranteilen für immunhistochemische Färbungen gescreent. Weiterhin wurde darauf geachtet Gewebeanteile mit Nekrosen, Artefakten oder vermehrt eingebluteten Arealen nicht für die TMA-Erstellung zu verwenden. Bei verwertbaren Blöcken wurden sowohl einzelne als auch mehrere ca. 2 mm große Biopsiestanzen aus dem Tumorkern entnommen und diese in vorgefertigte und vorgebohrte Wachsblöcke überführt (Abbildung 3). Es wurden zwei unterschiedliche Varianten angefertigt. Einerseits Blöcke mit einem Fassungsvermögen von 40 Stanzen (5x8 Löcher), als auch Blöcke mit einem Fassungsvermögen von 60 Stanzen (6x10 Löcher). Nach dem Überführen der Proben wurde der mit Proben befüllte Wachsblock zurechtgeschnitten und dann in eine Ausgießform überführt. Daraufhin wurde der TMA-Block auf der Ausgießstation Tissue-Tek TEC (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) mit Paraffin ausgegossen. Zur Orientierung innerhalb des TMAs erhielt jeder TMA eine einzigartige Markierung (mit Muskelgewebe), die eine sichere Zuweisung und Feststellung der Patientenproben ermöglicht. Zusätzlich wurde für jeden TMA eine Legende erstellt, um die anonymisierten Zuordnungen des Patientengewebes zu den jeweiligen Stellen auf dem TMA zu gewährleisten und im Nachhinein die TMAs auswerten zu können. Für die vorliegende Dissertation wurden bereits vorliegende Hirnmetastasen-TMAs des Edinger-Instituts verwendet (4 Stück) als auch neue TMAs nach dem o.g. Ablauf erstellt, um die Patientenkohorte zu erweitern (3 Stück).

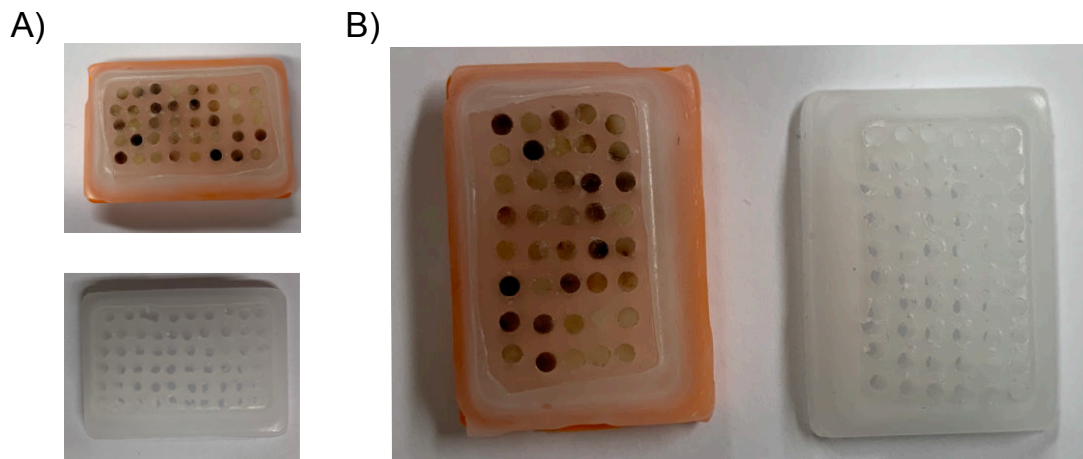


Abbildung 3: Repräsentative Fotos eines TMA und seiner Vorstufe

(A, B) Beispielfotos von einem der benutzten Hirnmetastasen-TMA mit 40 Proben (5 Reihen mit je 8 Proben). Im Vergleich dazu ein vorgebohrter Paraffin-Block mit einer Kapazität von 60 Proben. Da zusätzlich zu repetitiven Stanzen von einem Patienten auch mindestens 2 Stanzen von Muskelgewebe zur Orientierung auf den TMA verwendet werden, können je nach TMA-Größe meist 30-5 einzigartige Patienten pro Schnitt untersucht werden.

2.4 Immunhistochemie

Um die aufgestellten Hypothesen zu überprüfen, wurden sowohl immunhistochemische Einzel- als auch Doppelfärbungen durchgeführt. Die genaue Durchführung dieser Färbungen wird nun in den folgenden Absätzen erklärt.

2.4.1 Einzelfärbung

Die Immunhistochemie (IHC) wurde mit allen Antikörpern auf 3 µm dicken Gewebeschnitten und nach Standard-Protokoll auf dem automatischen IHC-Färbesystem Leica Bond-III (Leica Biosystems, Wetzlar, Hessen, Germany) durchgeführt. Die Vorbereitung der Gewebeschnitte erfolgte analog dem Punkt „2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung“. Die Gewebeproben wurden mit Unterstützung von Frau Tatjana Starzetz und Frau Maika Dunst (Medizinisch-technische Assistentinnen des Edinger-Instituts) zugeschnitten. Danach wurden die Schnitte in den Leica Bond-III zur weiteren Färbung überführt. Dort wurden die Schnitte

zuerst mit der Bond Dewax Solution (basierend auf Lösungsmittelbasis) und Alkohol entparaffiniert und rehydriert. An nächster Stelle kommt es zu mehreren Waschschritten mit der Bond Wash Solution, bestehend aus einer Tris-gepufferten Salzlösung, Tensid und 3,5% ProClin 950. Waschschrritte mit der beschriebenen Lösung wurden nach jeden Färbungsschritt automatisch durchgeführt. Danach wurde eine hitze-induzierte Epitoprückgewinnung (HIER) mit entweder dem Bond Epitop Retrieval Solution 1 (Citratpuffer, pH 5,9-6,1 bei 25 Grad) oder Solution 2 (EDTA-Puffer, pH 8,9-9,1 bei 25 Grad) für 15-30 Minuten je nach genutztem Antikörper durchgeführt. Der jeweilig genutzte Puffer für die benutzten Antikörper sind unter „2.5 verwendete Primärantikörper für die Immunhistochemie“ aufgeführt. Daraufhin wurden die Schnitte für 5 Minuten mit Wasserstoffperoxid inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken. Nach Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität wird der zuvor ausgewählte und in Bond Primary Antibody Diluent (bestehend aus Tris-gepufferte Salzlösung, Tensid, Proteinstabilisator und 0,35% Proclin 950) verdünnte Primärantikörper für 15-30 Minuten auf dem Schnitt inkubiert. Gefolgt wird dies vom Post Primary-Antikörper (Kaninchen-anti-Maus-IgG mit 10% Tiereserum) und Polymer-Inkubations-Substrat (Anti-Kaninchen-Poly-HRP-IgG) für jeweils 8 Minuten. Danach wird die erfolgreiche Bindung des Primärantikörpers mit dem Substratchromogen 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung Hydrat (DAB) als braunes Präzipitat sichtbar gemacht. Nach Sichtbarmachung der Antikörperbindung als braunes Präzipitat wurde eine Gegenfärbung mit Hematoxylin (<0,1% Hämatoxylin) durchgeführt und zum Schluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkohol- und Xylolreihe dehydriert und die Schnitte mit Deckgläsern (Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland) und Eindeckmittel (Eukitt, ORSAtec GmbH, Bobingen, Deutschland) eingedeckt. Für repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen siehe Abbildung 9.

Alle Substrate oder speziellen Kits, für die kein expliziter Hersteller genannt wurde, sind Teil des Bond Polymer Refine Detection Kits (Leica Biosystems, Wetzlar, Hessen, Germany). Alle oben aufgeführten Bond Kits wurden von Leica Biosystems (Wetzlar, Hessen, Germany) bestellt und sind auf das automatische Färbesystem Leica-Bond III abgestimmt.

2.4.2 Doppelfärbung

Für die durchgeführten Doppelfärbungen wurden zuerst die Schnitte identisch zum Ablauf unter „2.4.1 Einzelfärbung“ bearbeitet. Jedoch wurde nach erfolgreichem Abschluss der ersten Färbung mit erfolgreicher Sichtbarmachung des ersten gewählten Primärantikörpers durch DAB als braunes Präzipitat erneut gewaschen und ein weiterer Primärantikörper zur Inkubation auf dem Schnitt aufgetragen. Auch die Färbung des zweiten verwendeten Primärantikörpers wurde analog dem unter „2.4.1 Einzelfärbung“ beschriebenen Vorgang ausgeführt, jedoch wurde die Bindung des zweiten Primärantikörpers als rotes Präzipitat mit Hilfe des Bond Polymer Refine Red Detection Kits (Leica Biosystems, Wetzlar, Hessen, Germany) dargestellt. Daraufhin folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und die identische Rehydrierung und Eindeckung analog der oben beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Bei der durchgeführten Doppelfärbung wurde darauf geachtet, dass die beiden Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies stammen (z.B. Maus und Kaninchen), um Kreuzreaktionen und dadurch falsch-positive Ergebnisse zu verhindern.

2.5 Verwendete Primärantikörper für die Immunhistochemie

Im folgenden Abschnitt folgt eine Aufzählung der genutzten Primärantikörper für die Immunhistochemie mit Informationen über Klon, Art des Antikörpers, Dauer der hitze-induzierte Epitoprückgewinnung (HIER), genutzter Puffer für die HIER, verwendete Verdünnung und dem Hersteller. Außerdem folgt im Text als auch in Tabelle 2 ein Überblick über die verwendeten Antikörper mit den erwarteten Zielzellen und dem Ziel der Auswertungen.

Um die Infiltration von zytotoxischen T-Zellen in Hirnmetastasen zu bestimmen, wurde ein Antikörper gegen CD8 genutzt.

PD-L1, MHC I, MHC II („major histocompatibility complex antigen“ I und II) und CD74 wurden zur Bestimmung des Immunphänotyps von Tumorzellen angefärbt.

MHC I findet sich auf kernhaltigen Zellen und spielt eine Rolle in der Antigenpräsentation für zytotoxische T-Zellen. MHC II findet sich größtenteils auf antigenpräsentierenden Zellen, die mit CD4-positiven T-Zellen interagieren. Jedoch kann man MHC II auch auf Tumorzellen finden, weswegen dies einen Einfluss auf das Tumormikromilieu haben könnte.¹⁰⁶ CD74 ist ein Chaperon, das einen wichtigen Einfluss auf die Antigenpräsentation über MHC II hat. Außerdem liegen bereits mehrere Studien vor die CD74 als prognostischen Faktor für ein besseres Überleben von Tumorpatienten wertete.^{106,107} Das Oberflächenprotein PD-L1 findet sich neben physiologischen Zellen auch auf Tumorzellen und agiert mit PD-1. Die erfolgreiche Bindung mit dem Rezeptor PD-1, der auf T-Zellen lokalisiert ist, führt zu einer Inhibition der T-Zellantwort und damit zu einer Immunevasion des Tumors.⁴⁰

Ein Antikörper gegen FAP wurde als spezifischer CAFs-Marker verwendet. PDGFRb wurde zur Färbung von perivaskulären Perizyten als auch stromalen Zellen genutzt. CD31 wurde zur Bestimmung der Gefäßdichte der Hirnmetastasen genutzt und um die morphologische Nähe der perivaskulären Perizyten zu CD31-positiven Gefäßen in einer Doppelfärbung sicherzustellen. GFAP wurde genutzt, um astrozytäre Gliazellen darzustellen. Ein Antikörper gegen COL1A1 wurde verwendet, um sowohl Stroma-produzierende Zellen als auch Kollagen I-haltiges Tumorstroma anzufärben. Napsin A und P40 wurden zur Subtypenbestimmung von NSCLC gefärbt. Ki-67 wurde zur Bestimmung der Proliferationsrate der Hirnmetastasen genutzt.

Die folgenden Primärantikörper wurden für die immunhistochemischen Färbungen verwendet:

CD8 (Klon C8/144B, monoklonaler Mausantikörper, HIER für 20 Minuten, EDTA-Puffer, Verdünnung 1:100, Dako, Glostrup, Dänemark), **CD74** (Klon LN2, monoklonaler Mausantikörper, HIER für 20 Minuten, EDTA-Puffer, Verdünnung 1:100, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich), **PD-L1** (Klon E1L3N, monoklonaler Kaninchenantikörper, HIER für 20 Minuten, EDTA-Puffer, Verdünnung 1:200, Cell Signaling Technology, Boston, MA, Vereinigte Staaten von Amerika), **MHC I** (Klon EMR8-5, monoklonaler Mausantikörper, HIER für 20 Minuten, Citrat-Puffer, Verdünnung 1:5000, Dako, Glostrup, Dänemark), **MHC II**

(Klon CR3/43, monoklonaler Mausantikörper, HIER für 30 Minuten, EDTA-Puffer, Verdünnung 1:1000, Dako, Glostrup, Dänemark), **FAP** (Klon EPR20021, monoklonaler Kaninchenantikörper, HIER für 20 Minuten, EDTA-Puffer, Verdünnung 1:250, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich), **PDGFRb** (Klon 28E1, monoklonaler Kaninchenantikörper, HIER für 20 Minuten, EDTA-Puffer, Verdünnung 1:100, Cell Signaling Technology, Boston, MA, Vereinigte Staaten von Amerika), **CD31** (Klon JC70A, monoklonaler Mausantikörper, HIER für 20 Minuten, Citrat-Puffer, Verdünnung 1:500, Dako, Glostrup, Dänemark), **COL1A1** (Klon E8I9Z, monoklonaler Kaninchenantikörper, HIER für 20 Minuten, Citrat-Puffer, Verdünnung 1:500, Cell Signaling Technology, Boston, MA, Vereinigte Staaten von Amerika), **Napsin A** (EP205, monoklonaler Kaninchenantikörper, HIER für 20 Minuten, Citrat-Puffer, Verdünnung: 1:1000, Cell Marque Corporation, Rocklin, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika), **P40** (Klon ZR8, monoklonaler Kaninchenantikörper, HIER für 20 Minuten, EDTA-Puffer, Verdünnung 1:200, Bio SB Inc., Santa Barbara, Californien, Vereinigte Staaten von Amerika), **GFAP** (Polyklonaler Kaninchenantikörper, HIER für 10 Minuten, EDTA-Puffer, Verdünnung 1:14000, Dako, Glostrup, Dänemark) und **Ki-67** (Klon MIB-1, monoklonaler Mausantikörper, HIER für 20 Minuten, EDTA-Puffer, Verdünnung 1:200, Dako, Glostrup, Dänemark).

Antikörper	Zielzellen	Ziel der Auswertung	Methode der Auswertung
CD8	Zytotoxische T-Zellen	Infiltration von zytotoxischen T-Zellen	Semi-automatisierte Auswertung (Multiplex)
CD74	Immunzellen/Tumorzellen	Tumorzellen	Manuelle Auswertung mittels H-Score
PD-L1	Tumorzellen, Antigenpräsentierende Zellen	Tumorzellen	Manuelle Auswertung mittels 12er-Score
MHC I	Kernhaltige Zellen	Tumorzellen	Manuelle Auswertung mittels H-Score
MHC II	Antigenpräsentierende Zellen, Tumorzellen	Tumorzellen	Manuelle Auswertung mittels H-Score
FAP	CAFs	CAFs	Semi-automatisierte und manuelle Auswertung (Area)
PDGFRb	Perizyten/CAFs	Perizyten, CAFs	Manuelle Auswertung (positiv/negativ)

CD31	Endothelzellen	Endothelzellen (Gefäßdichte)	Semi-automatisierte Auswertung (Area)
COL1A1	Stroma-bildende Zellen, Kollagen I im Tumorstroma	Quantifikation des Tumorstromas, CAFs	Semi-automatisierte Auswertung (Area)
Napsin A	Tumorzellen	Tumorzellen zur Subtypenbestimmung in NSCLC	Manuelle Auswertung (positiv/negativ)
P40	Tumorzellen	Tumorzellen zur Subtypenbestimmung in NSCLC	Manuelle Auswertung (positiv/negativ)
GFAP	Astrozytäre Gliazellen	Astrozytäre Gliazellen	Manuelle Auswertung (positiv/negativ)
Ki-67	Proliferierende Zellen	Proliferationsrate der Tumore	Semi-automatisierte Auswertung (Multiplex)

Tabelle 2: Übersicht über die genutzten Antikörper und deren Zielzellen

Übersicht über die genutzten Antikörper, zu erwartende Ziele der Antikörper und Ziel der Auswertung. Für weitere Details über die genutzten Antikörper siehe auch „2.5 verwendete Primärantikörper für die Immunhistochemie“.

2.6 Whole Slide Scanning

Für die semi-automatisierte Auswertung wurden Whole Slide Scans der untersuchten TMAs benötigt.

Whole Slide Scanning zur weiteren semi-automatisierten Auswertung wurde mit dem Zeiss Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden die gefärbten TMAs auf vorgefertigte Rahmen befestigt und damit in den dafür vorgesehenen Halterungen im Axio Scan.Z1 verankert. Danach wurden mit dem Programm Zen 2.3 (Blue edition, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) die optimalen Einstellungen für den Scanvorgang ausgewählt. So wurde einerseits die Einstellung für die Gewebeerkenkung der Schnitte, als auch die Genauigkeit der Grob- und Feinjustierung mit Hilfe des 5x-Objektiv (Grobjustierung) und des 20x-Objektiv (Feinjustierung) angepasst. Vor dem Einscannen wurde jeder Schnitt händisch auf nicht erkannte Gewebeanteile. Zum endgültigen Scannen wurde das 20x Plan-Apochromat-Objektiv (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) verwendet. Als Kamera wurde die festverbaute Hitachi HV-F202SCL (Hitachi,

Chiyoda, Japan) genutzt. Die eingescannten Schnitte wurden als „dzi“-Dateien zur weiteren Bearbeitung auf einem externen Datenträger gespeichert. Nach jeder Scaneinheit wurde ein Qualitätscheck (Belichtung, Schärfe des Scans) durchgeführt, um eine ausreichende Scanqualität für die semi-automatisierte Auswertung sicherzustellen.

2.7 Histologische Auswertungen der immunhistochemischen Färbungen

2.7.1 Manuelle Auswertung

Für alle händischen Auswertungen wurde entweder das BX51 oder BX41 (Olympus, Shinjuku, Japan) als Mikroskop mit einer maximalen Vergrößerung von 400x verwendet.

2.7.1.1 PD-L1

Für PD-L1 wurde der bereits etablierte semi-quantitative „12er-Score“ verwendet.¹⁰⁸ Dafür wird für jeden Schnitt abhängig vom prozentualen Anteil der positiven Zellen ein Wert zwischen 0-4 vergeben (Anzahl positiver Zellen 0-1% -> Score 0, 1-10% -> Score 1, 11-25% -> Score 2, 26-50% -> Score 3 und >50% -> Score 4). Dieser Wert wurde dann mit der Intensität der Färbung (Schwache Intensität -> 1, mittlere Intensität -> 2, starke Intensität -> 3) multipliziert. Daraus ergibt sich die Möglichkeit von 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 12 als Score-Zuweisungen. Zusätzlich wurde zur Darstellung von PD-L1-positiven und -negativen Tumoren eine Dichotomisierung durchgeführt. So wurden Tumore mit einem PD-L1-Score von >0 als positiv und Tumore mit einem PD-L1-Score von =0 als negativ für PD-L1 gewertet.

2.7.1.2 MHC I, MHC II und CD74

Für MHC I, MHC II und CD74 wurde der semi-quantitative IHC H-Score verwendet.¹⁰⁷ Dabei kann ein Höchstscore von 300 Punkten erzielt werden. Dieser berechnet sich aus Färbeintensität als auch dem prozentualen Anteil der positiven Zellen (0-100%). So wird der prozentuale Anteil der positiven Zellen mit der Intensitätsstufe (keine Färbung -> 0, schwach -> 1, mittel -> 2, stark -> 3) multipliziert und falls sich mehrere Intensitätsstufen pro Schnitt zeigen, untereinander addiert. Beispiel: 20% der Zellen haben eine schwache Färbung (20x1), 50% haben eine starke Färbung (50x3) und 30% der Zellen zeigen gar keine Färbung. Somit ergibt sich ein H-Score von $(50 \times 3) + (20 \times 1) + (30 \times 0) = 170$.

2.7.1.3 PDGFRb und CD31-Doppelfärbung

Zur Darstellung von perivaskulären Perizyten wurde mit PDGFRb und CD31 eine immunhistochemische Doppelfärbung durchgeführt. Damit konnte die PDGFRb-Expression in Abhängigkeit der CD31-Expression ausgewertet werden. Folgend wird PDGFRb mit Nähe zu CD31-positiven Endothelzellen als vaskuläres PDGFRb beschrieben. Tumore mit einer PDGFRb-Expression in morphologischer Nähe zu CD31-positiven Gefäßen wurden als positiv für vaskuläres PDGFRb gewertet. Tumore ohne jeglichen PDGFRb-Besatz an den Gefäßen wurden als negativ bewertet. Im Weiteren wurde PDGFRb mit Kontakt zu CD31-positiven Zellen als vaskuläres PDGFRb gewertet. Außerdem wurden Tumore mit PDGFRb-Expression im Tumorstroma ohne morphologische Nähe zu CD31-positiven Gefäßen als stromale PDGFRb-positive Tumore gewertet. PDGFRb-Expression ohne räumliche Nähe zu CD31-positiven Zellen wird folgend als stromales PDGFRb geführt.

2.7.1.4 GFAP

Zusätzlich wurden alle Tumore auf eine Expression des Intermediärfilaments der astrozytären Gliazellen - „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) - innerhalb des soliden Tumors gescreent. Infiltrationszonen mit angrenzendem Hirnparenchym

wurden für diese Auswertung nicht gewertet. Tumore mit GFAP-Expression innerhalb des Tumors/Tumorstromas wurden als „positiv“ für GFAP gewertet. Tumore ohne GFAP-Expression als „negativ“ für GFAP.

2.7.1.5 FAP

Für die manuelle FAP-Auswertung wurden alle Tumore auf eine FAP-Expression manuell untersucht. Tumore ohne FAP-Expression im Stroma wurden als „negativ“ und Tumore mit FAP-Expression als „positiv“ bewertet. Zusätzlich wurde neben der manuellen Auswertung auch eine semi-automatisierte Quantifizierung durchgeführt (siehe dafür auch „2.7.2 semi-automatisierte Auswertung“).

2.7.1.6 Typ des Infiltrationsmusters von CD8-positiven Zellen

Zur genaueren Einteilung des Infiltrationsmusters von CD8-positiven Zellen in den Hirnmetastasen wurde jeder einzelne Core der TMAs gescreent. Es wurden vorab drei unterschiedliche Muster festgestellt und festgelegt. Diese lauteten: Diffuse Infiltration (keine Infiltration in vorhandenem Stroma, dafür Infiltration zwischen den einzelnen Tumorzellen), stromale/perivaskuläre Infiltration (Infiltration um Gefäße oder im Tumorstroma, also den zellarmen Bereichen des Tumors) und dem Muster, bei dem sowohl eine diffuse als auch perivaskuläre/stromale Infiltration der CD8-positiven Zellen vorlag (Abbildung 4).

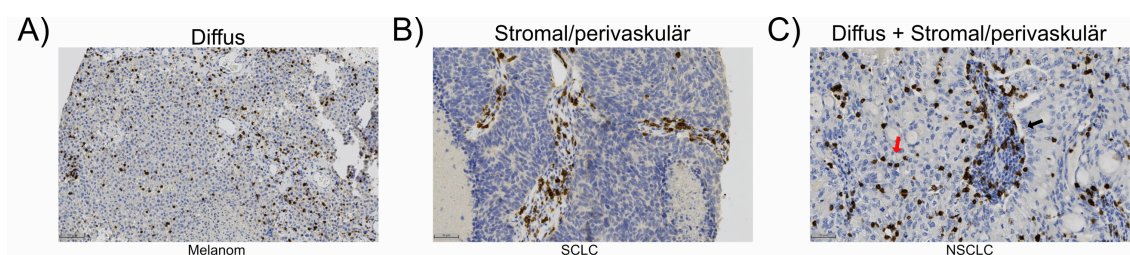


Abbildung 4: Typ der Immzellinfiltration basierend auf CD8-positiven Zellen

(A) Diffuse Infiltration in einem Melanom (Vergrößerung 50x), (B) Stromal/perivaskuläre Infiltration in einem SCLC (Vergrößerung 100x), (C) Diffuse und Stromal/perivaskuläre Infiltration in einem NSCLC (Vergrößerung 100x), der rote Pfeil markiert Immzellen mit diffuser Infiltration und der schwarze Pfeil ein Gefäß mit perivaskulären Infiltraten.

2.7.1.7 Bestimmung des NSCLC-Subtyps

Zur genaueren Subtypisierung der Lungenkarzinome wurde sowohl Napsin A als auch P40 als Einzelfärbung gefärbt (Abbildung 5). Bei alleiniger Positivität für Napsin A wurde der Tumor als Adenokarzinom gewertet. Bei alleiniger Positivität für P40 wurde der Tumor als Plattenepithelkarzinom gewertet. Tumore, die sowohl für Napsin A als auch P40 negativ oder positiv waren, wurden als „not otherwise specified“ (NOS) gewertet. Napsin A und P40 wurden bereits erfolgreich zur Subtypenbestimmung von Lungenkarzinomen verwendet.¹⁰⁹

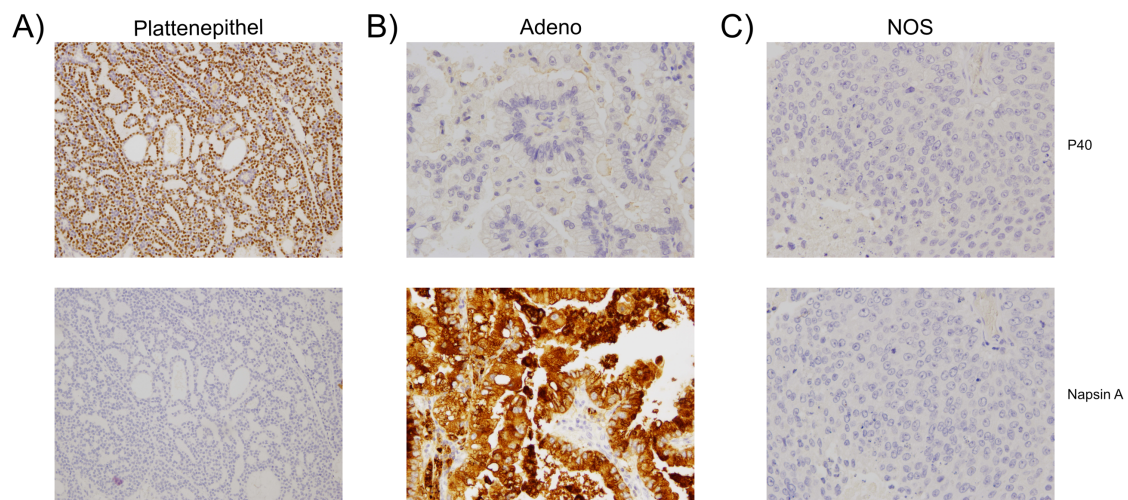


Abbildung 5: Repräsentative Schnitte zur Bestimmung des histologischen Subtyps von NSCLC

(A, B, C) Repräsentative Schnitte von NSCLC-Hirnetastasen aufgeteilt auf die Subtypen Plattenepithel (A, Vergrößerung 100x), Adeno (B, Vergrößerung 200x) und NOS (C, Vergrößerung 200x). Die obere Bildreihe zeigt die beschriebene P40-Färbung und die untere Bildreihe die Napsin A-Färbung. Für den Subtyp Plattenepithel zeigt sich eine positive Färbung für P40, jedoch nicht für Napsin A. Für den Subtyp Adeno zeigt sich eine positive Färbung für Napsin A, jedoch nicht für P40. Für den Subtyp NOS zeigten sich beide Färbungen negativ.

2.7.2 Semi-automatisierte Auswertung

Für die semi-automatisierte Quantifizierung wurde das Programm Halo Next-Generation Image Analysis Software (aktuelle Version 3.2.1851.207, Indica Labs, Albuquerque, New Mexico, Vereinigte Staaten von Amerika) verwendet. Das Programm wurde auf leistungsstarken Computern mit Windows 8 oder

Windows 10 verwendet. Zur weiteren Auswertungen wurden die zuvor eingescannten angefärbten TMAs als „.czi-Datei“ in Halo hochgeladen. Daraufhin wurde mit im Programm implementierten Werkzeugen sowohl die Tumorareale als auch Stromaareale händisch markiert. Außerdem wurden händisch durch die Werkzeuge unter anderem Tumornekrosen, größere Gefäße mit Blutfüllung, angrenzendes Hirnparenchym und Artefakte ausgeschlossen, damit diese nicht die semi-automatisierte Auswertung beeinträchtigen und/oder verfälschen. Je nach geplanter Auswertung und genutzter Färbung können über das Programm zwei unterschiedliche Auswertungsstrategien für lichtmikroskopische Schnitte ausgewählt werden:

1. Multiplex Auswertung, die es ermöglicht positive Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl für IHC-Färbungen auf einem Schnitt auswerten zu können
2. Area Quantification, die es ermöglicht positive Areale im Vergleich zum insgesamt ausgewerteten Areal für bestimmte IHC-Färbungen auswerten zu können, dies ist insbesondere für Stroma-Färbungen sinnvoll.

Die zuvor beschriebene Markierung der Gewebeschnitte ist für beide Auswertungsstrategien identisch, kann jedoch an die gewünschte Auswertung angepasst werden. Jedoch ist die weitere Herangehensweise bezüglich der möglichen Einstellungen und Auswertungen je nach genutztem Programm unterschiedlich.

2.7.2.1 Multiplex Auswertung

Für die Multiplex Auswertung wurde mit Hilfe des Halo User-Guides für Multiplex Auswertungen die Einstellungen für die weitere Auswertung basierend auf dem vom Hersteller vorbestehenden Algorithmus weiter angepasst. So wurde zuerst die Zellkernererkennung der Schnitte eingestellt. Dafür können unterschiedliche Variablen angepasst werden wie Größe der Zellkerne, Form der Zellkerne, Art der Färbung, die zur Erkennung der Zellkerne verwendet wird (in diesem Fall Hämatoxylin und ggf. die gewählte IHC-Färbung bei nukleärer Expression), Schwellenwert der Färbung, der benötigt wird um den Zellkern als Zellkern zu werten. Zur Optimierung der o.g. Einstellung ermöglicht das Programm eine Echtzeit-Auswertung, in der man Änderungen in Echtzeit überprüfen kann.

Nach erfolgter Zellkernererkennung wurde die Erkennung der für die auf dem Schnitt angewendete Färbung eingestellt. Dafür konnten erneut unterschiedliche Variablen wie Färbung, die zur Erkennung der positiven Zellen verwendet werden soll (in diesem Fall die durchgeführte IHC-Färbung mit braunem Präzipitat), Schwellenwert der Intensität, der benötigt wird um eine Zelle als positiv zu erkennen und Typ der Färbung (Membran, Cytoplasma, Nukleus). Nach Einstellung dieser Parameter konnten die Auswertungen durch das Programm in den vorher eingezeichneten Arealen durchgeführt werden. Die erhaltenen Ergebnisse wurden als Word-Datei exportiert. Diese enthielten unter anderem die Gesamtzellzahl, die Anzahl positiver Zellen, den prozentualen Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl (in %), durchschnittliche Kerngröße oder durchschnittliche Zellgröße. Es wurden sowohl die Rohwerte als auch der bereits errechnete prozentuale Anteil der positiven Zellen an den Gesamtzellen für die weiteren Analysen und Statistik verwendet. Mit der Multiplex Quantification wurden folgende Färbungen ausgewertet: CD8, Ki67. Für die Bestimmung der Proliferationsrate wurden lediglich Tumorzellen ausgewertet und Stromaareale durch die o.g. Werkzeuge ausgeschlossen.

Nach erfolgter Etablierung der spezifischen Auswertealgorithmen für die unterschiedlichen Färbungen wurden mehrere Tumore ausgewertet und diese Ergebnisse mit händischer Auswertung durch erfahrene Neuropathologen und Neuropathologinnen. (PD Dr. Patrick N. Harter und Dr. med. Katharina Filipski) verglichen. Repräsentative Bilder mit Auswertungsoverlay der Multiplex Auswertung finden sich in Abbildung 6. Eine Übersicht über einige der Einstellungsmodifikation und nähere Erklärungen finden sich in Tabelle 8 (Appendix).

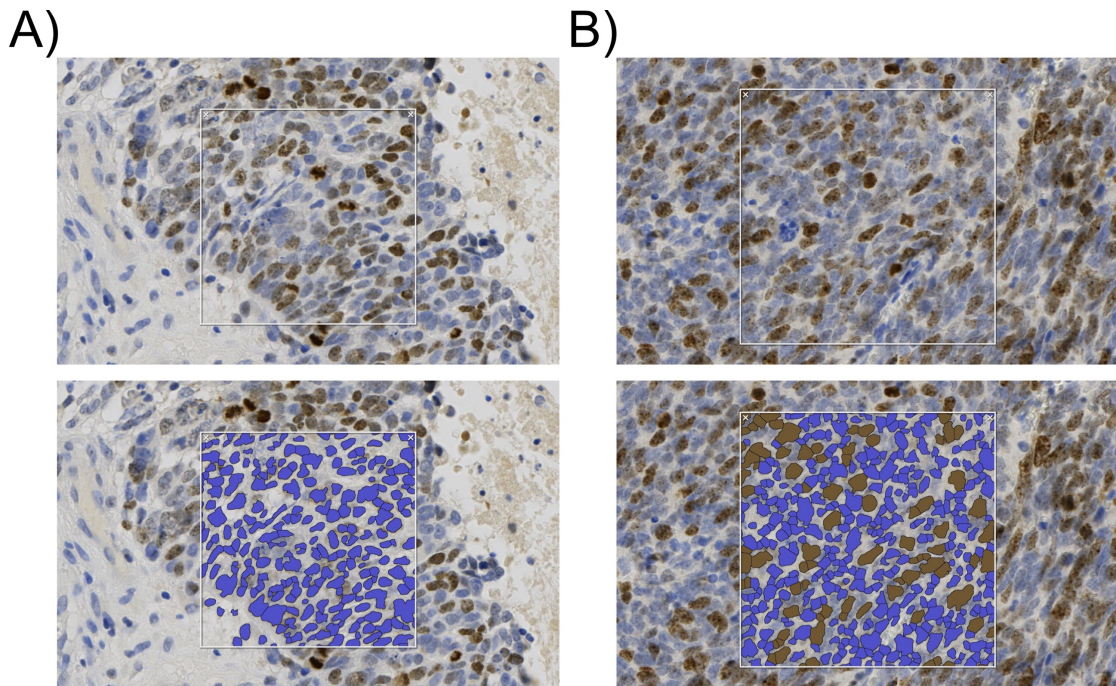


Abbildung 6: Darstellung des Auswertungsoverlays in Halo für eine Färbung mit Ki-67

(A, B) Repräsentative Bilder einer Hirnmetastase angefärbt für Ki-67 und aufgenommen mit dem Halo Snapshot-Tool nach Whole Slide Scanning. Der weiße Kasten auf allen Bildern stellt das Overlay des Real Time Tuning-Werkzeugs dar. (A) Es ist einerseits keine Echtzeiterkennung eingeschaltet (oben) und andererseits wird innerhalb des Real Time Tuning-Werkzeugs die Zellkernerkennung dargestellt (unten). (B) Es ist erneut das Real Time Tuning-Werkzeug ohne aktueller Echtzeiterkennung (Bild oben) und nach Anzeige der Echtzeiterkennung mit Zellkernerkennung und Darstellung der positiven Zellkerne für die genutzte Färbung angezeigt (Bild unten). Mit Hilfe des Real Time Tuning-Werkzeugs können Änderungen in der Zellerkennung und Anpassung der Färbeererkennung in Echtzeit angezeigt werden und damit die Einstellungen in Echtzeit optimiert werden.

2.7.2.2 Area Quantification

Die Einstellungen der Area Quantification wurden mit Hilfe des Halo User-Guides für Area Quantification angepasst. Auch in diesem Analyseprogramm können unterschiedliche Spezifikationen eingestellt werden. Zuerst wird mit der Zuweisung der auf dem Gewebeschnitt vorhandenen Färbungen begonnen. So wurde einerseits die Hämatoxylin-Färbung als auch das braune Präzipitat als Färbungen eingestellt (Hämatoxylin markiert die Zellkerne, braune Präzipitat markiert den für diesen Schnitt genutzten Primärantikörper). Daraufhin wurde für

beide Färbungen der Schwellenwert festgelegt, ab dem das Programm Areale mit entsprechender Intensität für die Färbungen als positiv wertete. Mit Optimierung dieser Einstellung kann beispielsweise verhindert werden, dass schwach angefärbte Hintergrund-Artefakte als positives Areal für eine Färbung gewertet werden. Auch für diese Auswertung können nach der erfolgten Analyse die Ergebnisse als Word-Datei gespeichert werden. Diese enthält sowohl die Rohwerte wie beispielsweise Fläche, die von Hämatoxylin gefärbt wurde, als auch die bereits errechneten Prozentsätze der positiven Areale der Färbungen von der insgesamt ausgewerteten Fläche. Sowohl die Rohwerte als auch bereits errechneten Prozentsätze wurden für die weitere statistische Auswertung verwendet. Auch für dieses Analyseprogramm wurden vor endgültiger Auswertung beispielhaft einige Schnitte durch erfahrene Neuropathologen händisch bezüglich der gefärbten Bereiche ausgewertet und mit den vorläufigen Ergebnissen der semi-automatisierten Auswertung verglichen. Mit der Area Quantification wurden folgende Färbungen ausgewertet: FAP, COL1A1, CD31. CD31 wurde für die semi-automatisierte Auswertung als Einzelfärbung durchgeführt und ausgewertet. Repräsentative Bilder mit dem Auswertungsoverlay der Area Quantification finden sich in Abbildung 7. Eine Übersicht über eine Auswahl der Einstellungsmodifikation und nähere Erklärungen finden sich in Tabelle 9 (Appendix).

A)

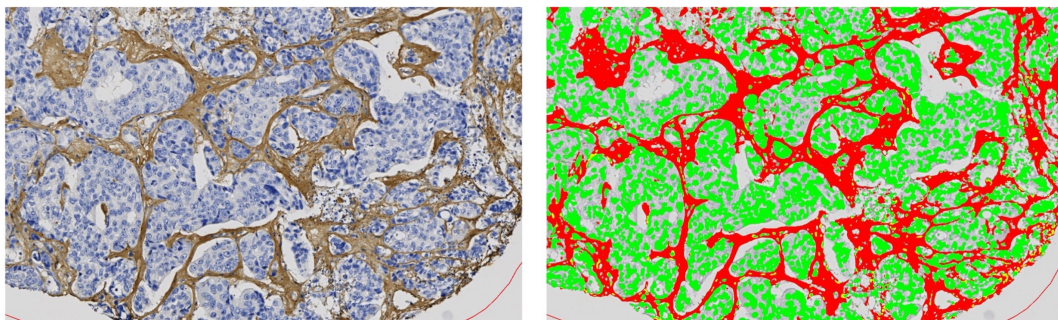


Abbildung 7: Repräsentatives Bild einer Hirnmetastase mit Kollagen I-Färbung zur Darstellung der Area Quantification-Analyse

(A) Das linke Bild zeigt die Originalfärbung mit Kollagen I. Auf dem rechten Bild ist das Auswertungsergebnis nach Analyse des Schnitts zu erkennen (rot = positive Fläche für Kollagen I, grün = positive Fläche für Hämatoxylin).

2.8 Aufnahme der histologischen Bilder

Die in dieser Dissertation verwendeten histologischen Bilder wurden entweder mit der auf dem BX41-Mikroskop installierten DP72-Kamera (Olympus, Shinjuku, Japan) oder mit dem Snapshot-Werkzeug des Analyseprogramms Halo von den zuvor eingescannten Gewebeschnitten aufgenommen.

2.9 Statistische Auswertung/Erstellung der Grafiken

Die statistischen Auswertungen und Grafiken wurden mit dem Statistikprogramm JMP (Version 16.1.0, SAS Institute, Cary, North Carolina, Vereinigte Staaten von Amerika) durchgeführt bzw. erstellt. Zusätzlich wurde zur weiteren Bearbeitung der Grafiken das Zeichenprogramm Affinity Designer (Version 1.8.6, Serif, Nottingham, Vereinigtes Königreich) genutzt. Abbildung 2 wurde mittels BioRender.com erstellt.

Es wurden je nach Skalenniveau der nicht-parametrische Wilcoxon, die nicht-parametrische Spearman-Korrelation oder das Likelihood-Verhältnis χ^2 als auch des Pearson χ^2 berechnet. Bei multiplen Testen mit nicht-parametrischen Vergleichen wurde mittels Dunn-Methode für multiples Testen korrigiert. Überlebensdaten wurden anhand von Kaplan-Meier-Analysen und Wilcoxon sowie Log-Rang-Tests untersucht. Die jeweilig genutzte statistische Berechnung ist in der Beschreibung der jeweiligen Graphen aufgeführt. Für die meisten Überlebensanalysen wurde die Überlebenszeit ab der Hirnmetastasen-Operation bis zum letzten Kontakt oder dem Todesdatum der Patienten genutzt (innerhalb der Kaplan-Meier-Kurven als „Überleben“ angegeben). Für einige wenige Überlebensanalysen wurde der Zeitraum der Primärdiagnose bis zum letzten Kontakt oder Todesdatum genutzt. Dies ist jedoch sowohl unter den Kaplan-Meier-Kurven beschrieben als auch innerhalb der Kaplan-Meier-Kurve als „Überleben ab Primärdiagnose“ angegeben. Insbesondere in der Gruppe von Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung können diese beiden Überlebensdaten nahezu identisch sein, da sowohl die Primärdiagnose als auch Hirnmetastasen-Operation zeitlich sehr nah beieinander lagen.

Für alle angewendeten statistischen Tests wurde das Signifikanz-Niveau auf $p < 0,05$ festgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht Hirnmetastasen-Kohorte

Im folgenden Abschnitt soll eine Übersicht über die Zusammensetzung der untersuchten Hirnmetastasen-Kohorte gegeben werden. NSCLC (38,5%, n=94), Mammakarzinome (19,7%, n=48) und Kolonkarzinome (8,2%, n=20) waren die häufigsten Vertreter von Hirnmetastasen in der vorliegenden Kohorte. Die kleinste Kohorte waren die Nierenzellkarzinome (5,3%) und die Karzinome „NOS“ (2,5%) (Abbildung 8). Bei den Gruppen von Karzinomen „NOS“, Mammakarzinomen und Melanomen zeigte sich ein Überwiegen des weiblichen Geschlechts. In der vorliegenden Kohorte waren lediglich Frauen von einem Mammakarzinom betroffen. Dafür waren insbesondere mehr Männer von einem Nierenzellkarzinom betroffen. In der Gesamtkohorte waren 43,9% Männer und 56,1% Frauen vertreten. Das höchste mediane Alter von Patienten zeigte sich in der Gruppe der Kolonkarzinome mit 65,5 Jahren und das jüngste mediane Alter in der Nierenzellkarzinom-Kohorte mit 58 Jahren. Das mediane Alter der Gesamtkohorte betrug 61 Jahre. Patienten mit SCLC hatten bei HM-Operation die größten HM im Durchmesser (Median 57 mm). Das mediane Überleben der Gesamtkohorte betrug 229 Tage nach Hirnmetastasen-OP. Dabei zeigten die Karzinome „NOS“ das schlechteste mediane Überleben mit 33 Tagen und die Nierenzellkarzinome das beste mediane Überleben mit 921 Tagen (für weitere klinische Informationen über die HM-Kohorte siehe Tabelle 1).

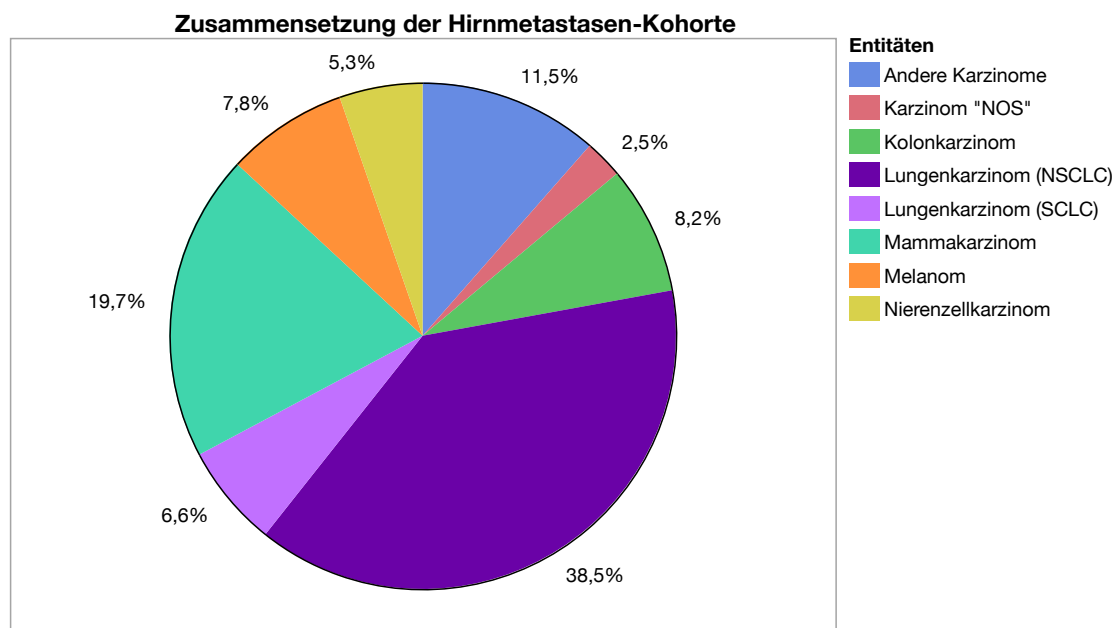


Abbildung 8: Verteilung der unterschiedlichen Entitäten innerhalb der Hirnmetastasen-Kohorte

Tortendiagramm zur Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Entitäten innerhalb der Hirnmetastasen-Kohorte. Die größten Subkohorten stellen die NSCLC (38,5%) und die Mammakarzinome (19,7%) dar. Siehe auch Tabelle 1 für weitere Informationen zur Hirnmetastasen-Kohorte.

3.2 Herkunft des Tumorstromas in Hirnmetastasen

Um die erste Hypothese bezüglich der Herkunft des bindegewebigen Stromas in Hirnmetastasen zu überprüfen, wurden auf den Hirnmetastasen-TMAs mehrere IHC-Färbungen durchgeführt. So wurde einerseits ein typischer extrazellulärer Matrix-Bestandteil, in diesem Fall Kollagen I, gefärbt. Es ist bekannt, dass Kollagen I eines der Hauptbestandteile des physiologischen Bindegewebes als auch Tumorstroma ist.¹¹⁰ Auf der anderen Seite wurden FAP und PDGFRb gefärbt, um sowohl CAFs als auch „Perizyten-ähnliche Zellen“ in den Hirnmetastasen nachzuweisen. Für PDGFRb wurde zwischen stromalen und vaskulärem PDGFRb unterschieden. Dabei ist vaskuläres PDGFRb auf CD31-positive Gefäße beschränkt und stromales PDGFRb fand sich losgelöst von CD31-positiven Zellen im Tumorstroma der Hirnmetastasen (siehe Material und Methoden 2.7.1.3 „PDGFRb und CD31-Doppelfärbung“). Außerdem wurde zum

Vergleich das typische Intermediärfilament von astrozytären Gliazellen GFAP angefärbt (Abbildung 9 mit repräsentativen Schnitten der Färbungen). Alle Analysen wurden zur Überprüfung, ob es sich um einen generellen Zusammenhang der Stromabildung über Entitäten hinweg handelt oder es Unterschiede zwischen der Herkunft des Tumorstromas in den unterschiedlichen Entitäten gibt, sowohl in der Gesamtkohorte als auch den größten Subkohorten der Lungenkarzinome und Mammakarzinome durchgeführt.

Im non-parametrischen Wilcoxon-Test zeigte sich eine signifikant positive Assoziation zwischen der Kollagen I-Expression mit einer positiven FAP- und positiven stromalen PDGFRb-Expression in der Gesamtkohorte, als auch in den Subkohorten der NSCLC und Mammakarzinome (Abbildung 10 A+C und 11 A+C). Das vaskulär exprimierte PDGFRb zeigte lediglich eine signifikant positive Assoziation mit Kollagen I in der Gesamtkohorte, jedoch nicht in den Subkohorten (Abbildung 10 B und 11 B). Es zeigte sich keine Assoziation zwischen der GFAP-Expression und Kollagen I-Expression in Hirnmetastasen (Abbildung 10 D und 11 D).

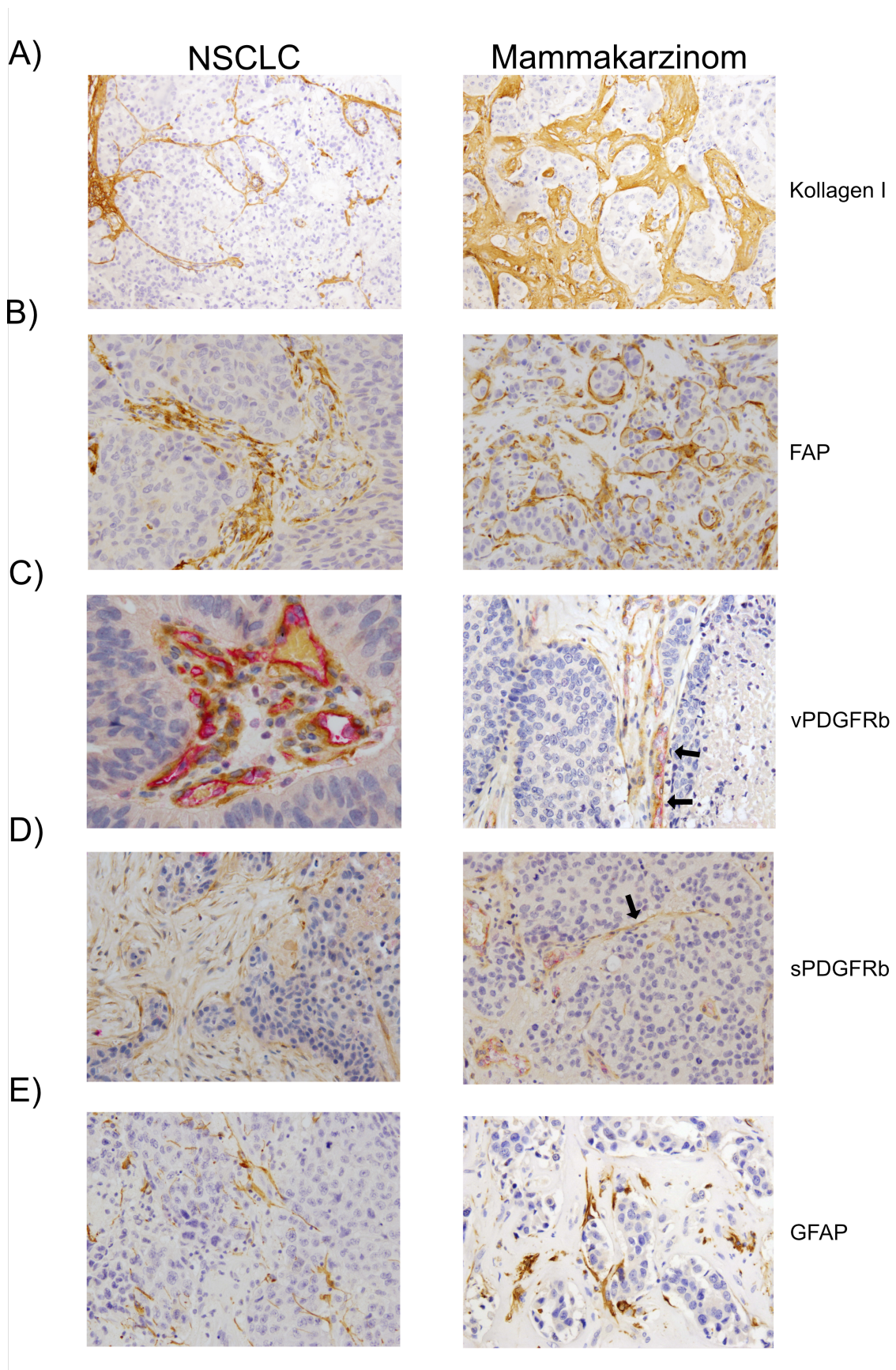


Abbildung 9: Repräsentative Bilder der unterschiedlichen stromalen Färbungen

(A, B, C, D, E) Repräsentative Bilder der unterschiedlichen stromalen Färbungen in der Hirnmetastase eines NSCLC und eines Mammakarzinoms für Kollagen I (A, Vergrößerung 100x), FAP (B, Vergrößerung 200x), vaskuläres PDGFRb (C, Vergrößerung 200x, schwarze Pfeile markieren die Nähe von vaskulärem PDGFRb zu den rot angefärbten CD31-positiven Gefäßen), stromales PDGFRb (D, Vergrößerung 200x, schwarzer Pfeil markiert PDGFRb-Expression ohne räumliche Nähe zu CD31) und GFAP (E, Vergrößerung 200x). Bei (C) und (D) handelt es sich um dieselbe Doppelfärbung mit PDGFRb und CD31.

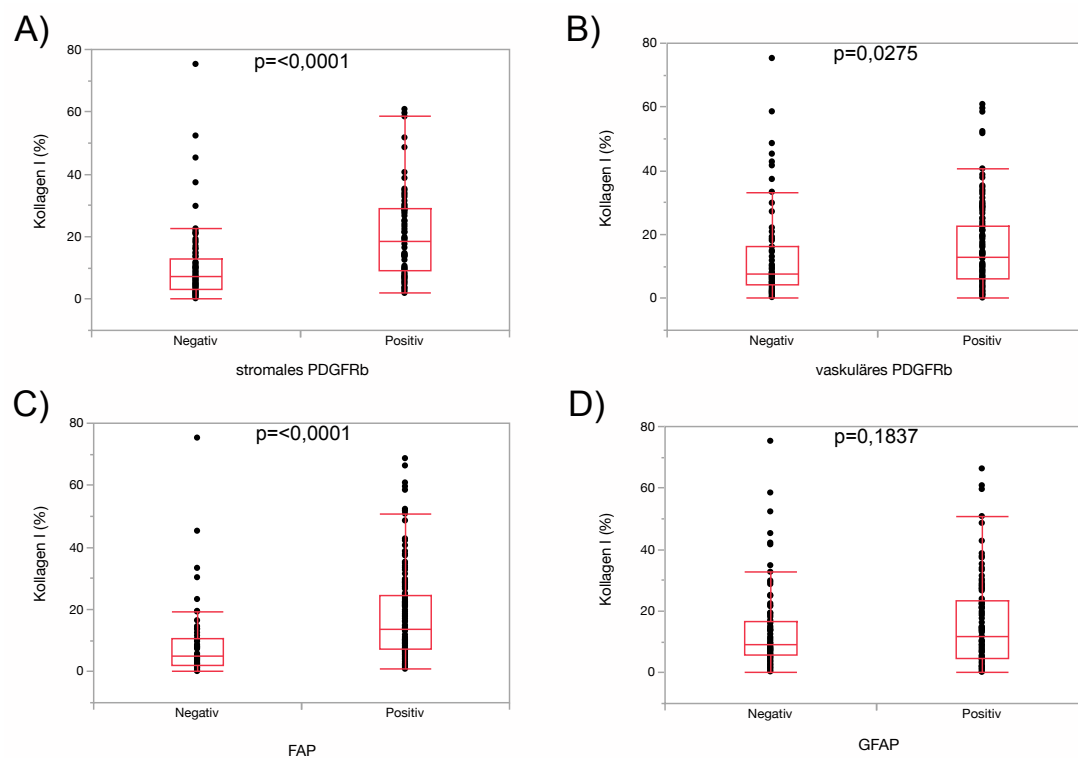


Abbildung 10: Assoziation zwischen Kollagen I und weiteren stromalen Färbungen in der Gesamtkohorte

Assoziation der Kollagen I-Expression mit den Färbungen stromales PDGFRb (A, n=186), vaskuläres PDGFRb (B, n=193), FAP (C, n=203) und GFAP (D, n=201) in der Gesamtkohorte. P-Werte des non-parametrischen Wilcoxon-Tests sind innerhalb der Graphen abgebildet.

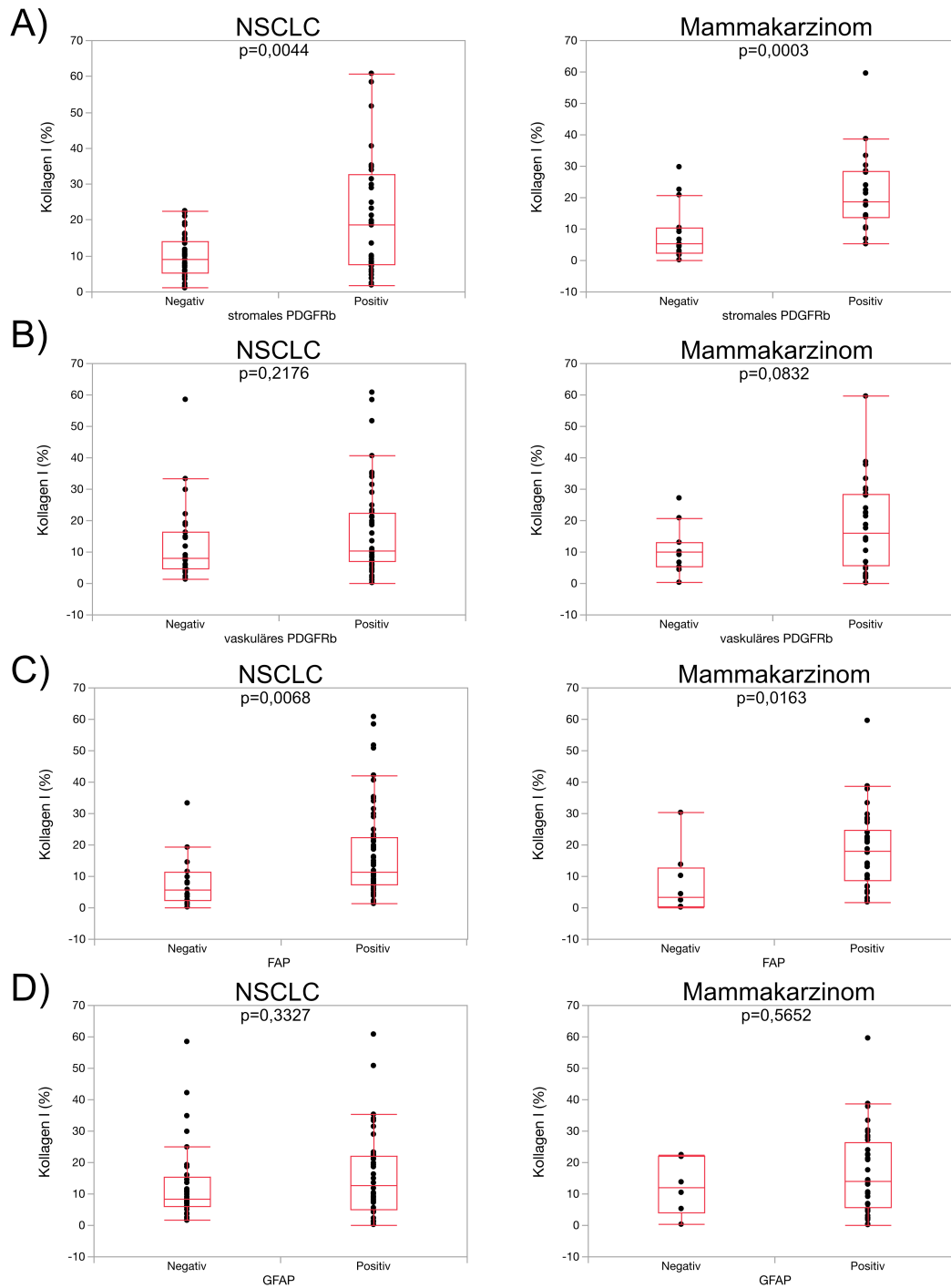


Abbildung 11: Assoziation zwischen Kollagen I und weiteren stromalen Färbungen in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom

Assoziation der Kollagen I-Expression mit den Färbungen stromales PDGFRb (A, NSCLC n=74, Mammakarzinom n=36), vaskuläres PDGFRb (B, NSCLC n=76, Mammakarzinom n=39), FAP (C, NSCLC n=79, Mammakarzinom n=42) und GFAP (D, NSCLC n=77, Mammakarzinom n=42) in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom. P-Werte des non-parametrischen Wilcoxon-Tests sind innerhalb der Graphen abgebildet.

Zusätzlich zeigte sich in den nicht-parametrischen Spearman-p-Berechnungen eine signifikant positive Korrelation zwischen der mittels semi-automatisierter Auswertung quantifizierten FAP-Expression und der Kollagen I-Expression in Hirnmetastasen (Abbildung 12). Auch für die mittels semi-automatisierter Auswertung ermittelte FAP-Expression zeigte sich sowohl mit vaskulärem und stromalem PDGFRb als auch mit GFAP eine positive Assoziation in der Gesamtkohorte (Abbildung 13). Jedoch zeigte sich nur für vaskuläres und stromales PDGFRb und nicht für GFAP in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom eine positive Assoziation mit FAP (Abbildung 13). Weiterhin konnte eine positive Assoziation zwischen vaskulärem und stromalen PDGFRb sowohl in der Gesamtkohorte als auch in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom festgestellt werden (Abbildung 14 A). Eine Übersicht über die signifikanten Korrelationen bzw. Assoziationen der stromalen Färbungen findet sich in Tabelle 3.

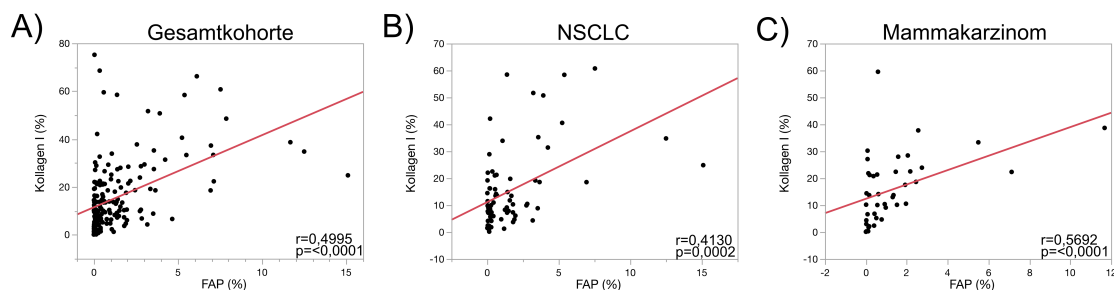


Abbildung 12: Korrelationsanalyse zwischen der Kollagen I- und FAP-Expression

(A, B, C) Korrelationsanalyse der Kollagen I-Expression mit der stetigen FAP-Expression in der Gesamtkohorte (A, n=179) als auch in den Subkohorten NSCLC (B, n=75) und Mammakarzinom (C, n=42). Die Korrelationskoeffizienten und P-Werte wurden durch den nicht-parametrischen Spearman-p berechnet. Die Ergebnisse sind innerhalb der Graphen aufgeführt.

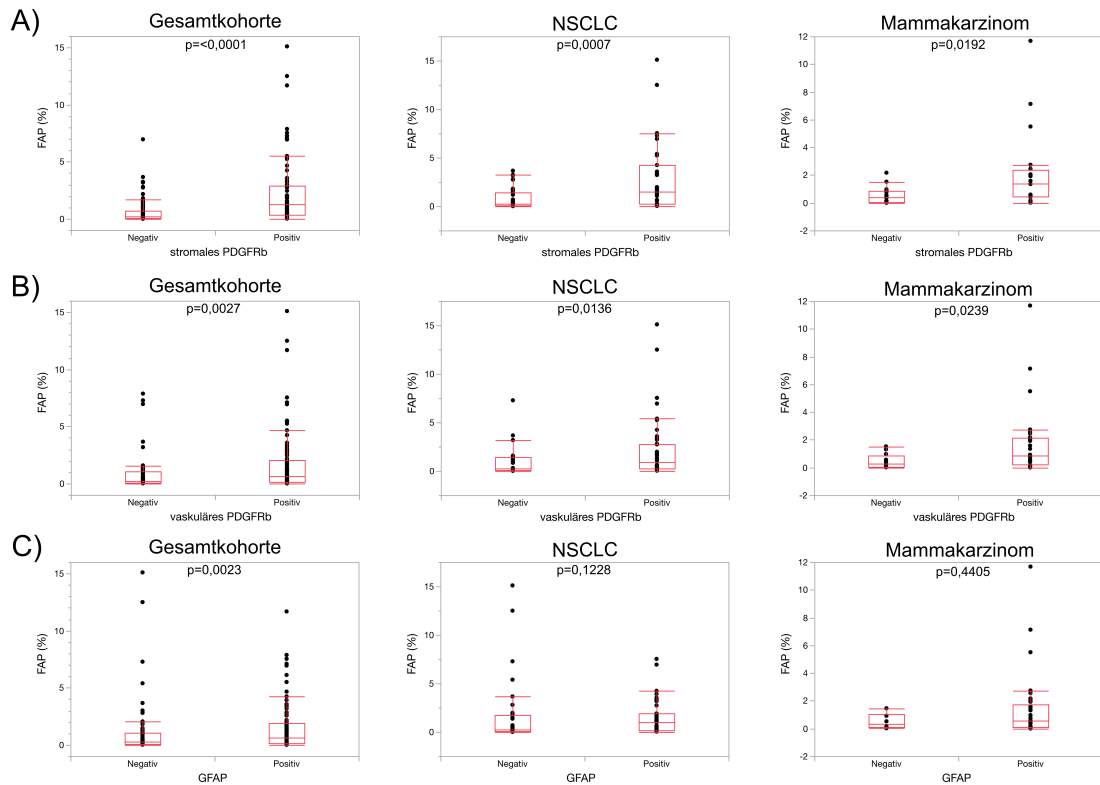


Abbildung 13: Assoziation zwischen FAP und den stromalen Färbungen sPDGFRb, vPDGFRb und GFAP

(A, B, C) Assoziation der stetigen FAP-Expression mit den stromalen Färbungen wie stromales PDGFRb (A, Gesamtkohorte $n=170$, NSCLC $n=73$, Mammakarzinom $n=36$), vaskuläres PDGFRb (B, Gesamtkohorte $n=175$, NSCLC $n=75$, Mammakarzinom $n=40$) und GFAP (C, Gesamtkohorte $n=183$, NSCLC $n=75$, Mammakarzinom $n=43$) in der Gesamtkohorte als auch in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom. P-Werte des non-parametrischen Wilcoxon-Tests sind innerhalb der Graphen abgebildet.

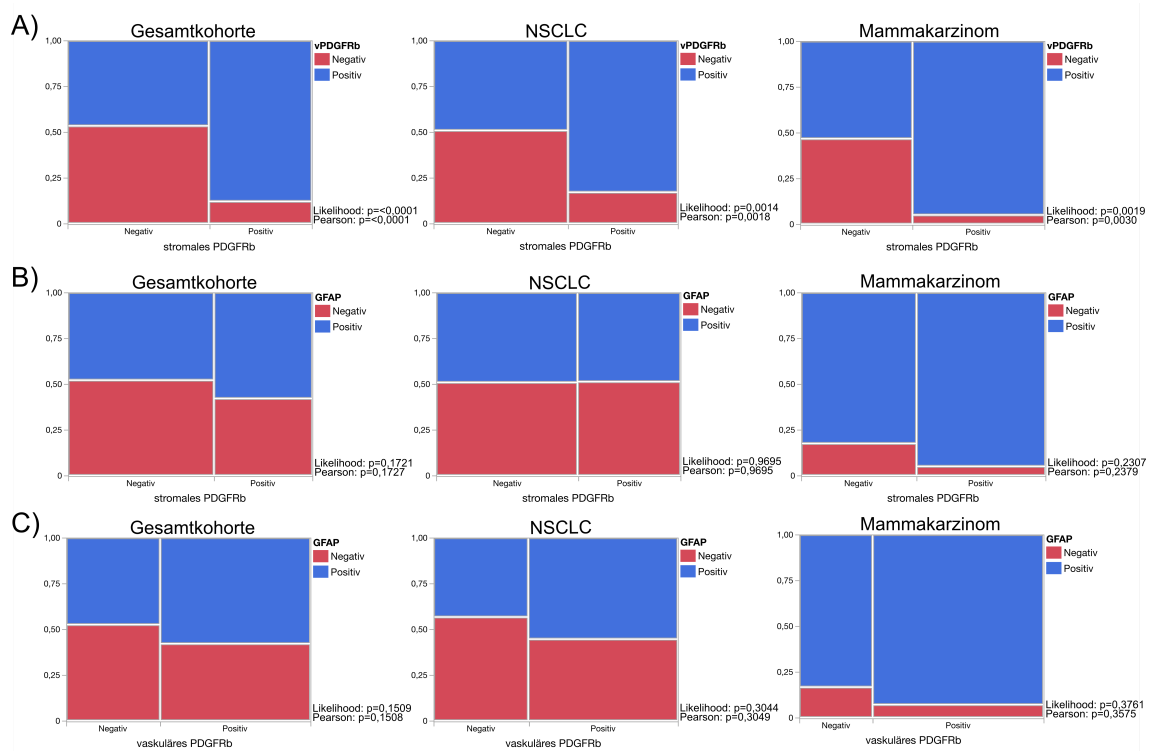


Abbildung 14: Kontingenzzanalysen zwischen sPDGFRb, vPDGFRb und GFAP

(A, B) Kontingenzzanalyse zur Überprüfung der Assoziationen zwischen stromalem PDGFRb mit vaskulärem PDGFRb (A, Gesamtkohorte $n=193$, NSCLC $n=78$, Mammakarzinom $n=37$) und GFAP (B, Gesamtkohorte $n=189$, NSCLC $n=74$, Mammakarzinom $n=36$) in der Gesamtkohorte als auch den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom. (C) Kontingenzzanalyse zur Überprüfung der Assoziationen zwischen vaskulärem PDGFRb und GFAP in der Gesamtkohorte als auch den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom (Gesamtkohorte $n=197$, NSCLC $n=77$, Mammakarzinom $n=40$). P-Werte des Likelihood-Verhältnis χ^2 als auch des Pearson χ^2 sind jeweils neben dem Graphen angegeben.

Stromale Färbungen	Kollagen I	FAP	sPDGFRb	vPDGFRb	GFAP
Kollagen I		NSCLC: r=0,4130 p=0,0002 Mamma: r=0,5692 p=<0,0001	NSCLC: p=0,0044 Mamma: p=0,0003	-	-
FAP	GK: r=0,4995 p=<0,0001		NSCLC: p=0,0007 Mamma: p=0,0192	NSCLC: p=0,0136 Mamma: p=0,0239	-
sPDGFRb	GK: p=<0,0001	GK: p=<0,0001		NSCLC: p=0,0014 Mamma: p=0,0019	-
vPDGFRb	GK: p=0,0275	GK: p=0,0027	GK: p=<0,0001		-
GFAP	-	GK: p=0,0023	-	-	

Tabelle 3: Korrelationen und Assoziationen zwischen den unterschiedlichen stromalen Färbungen

Übersichtstabelle mit den signifikanten Ergebnissen der Korrelations- und Assoziationsanalysen der stromalen Färbungen in der Gesamtkohorte als auch in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom (Ergebnisse aus den Abbildung 10-14). Es sind lediglich signifikante Assoziationen bzw. Korrelationen aufgeführt. GK = Gesamtkohorte, Mamma = Mammakarzinom.

3.3 Zusammensetzung des Tumormikromilieus/Tumorstromas in Hirnmetastasen

Zur Überprüfung der zweiten Hypothese bezüglich der Komposition des Tumormikromilieus bzw. Tumorstromas wurden zusätzlich zu den oben aufgeführten Stromafärbungen (PDGFRb, FAP, Kollagen I, GFAP) noch weitere Färbungen zur Charakterisierung durchgeführt. Einerseits wurde Ki-67 zur Bestimmung der Proliferationsrate als auch CD31 als Einzelfärbung zur Bestimmung der Gefäßdichte angefärbt. Außerdem wurde CD8 zum Nachweis von infiltrierenden zytotoxischen T-Zellen genutzt. Zusätzlich wurde zur Darstellung des Immunprofils der Hirnmetastasen sowohl PD-L1 als auch die für die Antigenpräsentation relevanten MHC-Klassen I und II (auch bekannt als „human leukocyte antigen“ – HLA-Klasse I und II) angefärbt. Weiterhin wurde das bereits in der Literatur als prognostischer Marker für Hirnmetastasen beschriebene Protein CD74 gefärbt, das eine wichtige Funktion in der Antigenpräsentation über HLA-Klasse II ausübt.¹⁰⁷

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben eine zu erwartende starke Heterogenität zwischen den unterschiedlichen Entitäten. Die Subkohorte der SCLC sticht insbesondere mit einer hohen Proliferationsrate (Median 38,4%) jedoch insgesamt mit der zweitniedrigsten medianen Kollagen I-Expression hervor (Median 2,62%, Abbildung 15 A). Außerdem zeigte auch in der Subkohorten der Kolonkarzinomen eine hohe Proliferationsrate (Median 44,7%). So zeigten sich insbesondere für die Subkohorte der Kolonkarzinome als auch SCLC ein signifikanter Unterschied zu anderen Entitäten bezüglich der Proliferationsrate. Bezüglich der Kollagen I-Expression zeigten sich die Nierenzellkarzinome führend mit einer signifikant erhöhten Expression von Kollagen I im Vergleich zu SCLC (für die mittels Dunn-Methode für multiples Testen korrigierten signifikanten Unterschiede zwischen den Entitäten siehe Tabelle 4). Außerdem konnte lediglich für die Nierenzellkarzinome nach Korrektur für multiples Testen ein signifikanter Unterschied bezüglich der Gefäßdichte im Vergleich zu einigen anderen Entitäten festgestellt werden (Abbildung 15 B und Tabelle 4). Bezüglich der FAP-Expression zeigte sich nach nicht-parametrischem multiplem Testen mittels Dunn-Methode kein signifikanter

Unterschied zwischen den einzelnen Entitäten (Abbildung 15 B). Wobei sich die niedrigste mediane FAP-Expression in den Nierenzellkarzinomen (Median 0,07%) und die höchste mediane FAP-Expression in den Kolonkarzinomen (Median 0,945%) zeigte. Auch die SCLC zeigten eine ähnlich geringe mediane FAP-Expression in Hirnmetastasen (Median 0,14%, Abbildung 15 B). Die FAP-Expression in Melanomen konnte aufgrund technischer Einschränkungen mit unzureichender Qualität nicht hinreichend mit der semi-automatisierten Auswertung ausgewertet werden (u.a. falsch-positive Färbung von Melanin). Bezüglich der Infiltration von zytotoxischen T-Zellen zeigte sich ebenso eine ausgeprägte Heterogenität in der vorliegenden Kohorte. Die stärkste mediane Infiltration zeigten sowohl die NSCLCs (Median 1,63%) und Melanome (1,677%) als auch Nierenzellkarzinome (5,311%), wobei sich auch innerhalb der Entitäten eine starke Heterogenität zeigte. So kam es zum Beispiel in Lungenkarzinom Fällen zu CD8-positiven Infiltraten von fast 15% und in Melanomen und Nierenzellkarzinomen mit fast 30% infiltrierenden CD8-positiven Zellen. Im Gegensatz dazu fanden sich auch in den genannten Subkohorten Hirnmetastasen ohne jegliche Infiltration von CD8-positiven Zellen. In Kolonkarzinomen (0,438%) und SCLC (0,69%) konnte die niedrigste mediane Infiltration mit CD8-positiven Zellen festgestellt werden. (Abbildung 15 B). Nach multiplem Testen zeigten sich bezüglich der Immunzellinfiltration signifikante Unterschiede zwischen den Nierenzellkarzinomen und beispielsweise Kolonkarzinomen, Mammakarzinomen und SCLC. Außerdem zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Mammakarzinomen und NSCLC bezüglich CD8-positiver Zellen (siehe Abbildung 15 B und Tabelle 4 für alle signifikanten Unterschiede zwischen den Entitäten).

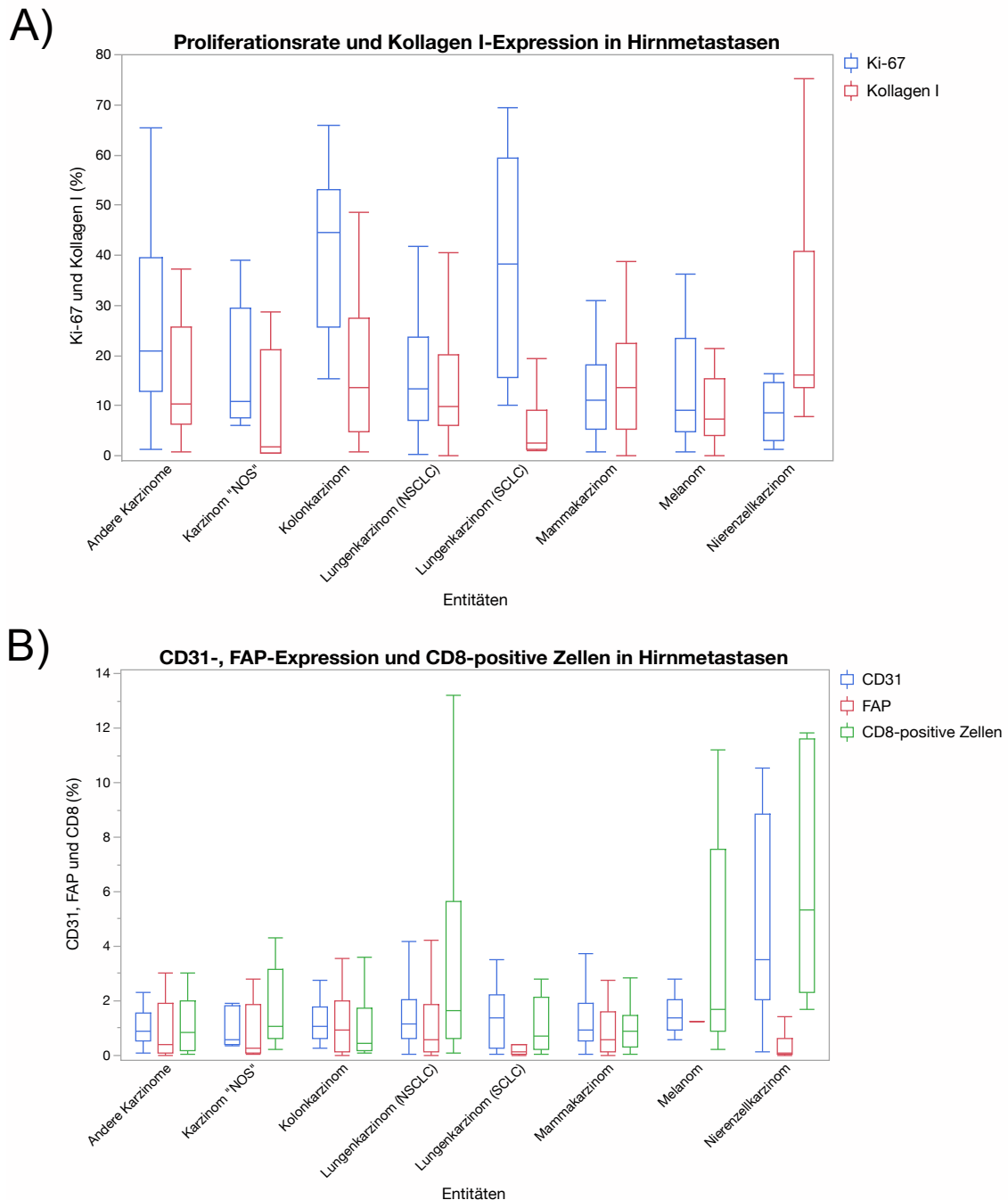


Abbildung 15: Box-Plot zur Charakterisierung des Tumormikromilieus in den unterschiedlichen Hirnmetastasen-Entitäten

(A) Box-Plot mit Darstellung der Proliferationsrate (Andere Karzinome n=26, NOS n=5, Kolonkarzinom n=19, NSCLC n=88, SCLC n=14, Mammakarzinom n=44, Melanom n=19, Nierenzellkarzinom n=13) und Kollagen I-Expression (Andere Karzinome n=24, NOS n=5, Kolonkarzinom n=15, NSCLC n=82, SCLC n=12, Mammakarzinom n=43, Melanom n=18, Nierenzellkarzinom n=12) der unterschiedlichen Hirnmetastasen-Entitäten. Durch den Zwischenstrich innerhalb der Boxen wird der Median angezeigt. Signifikante Unterschiede nach nicht-parametrischen Vergleichen korrigiert für multiples Testen mittels Dunn-Methode zwischen den unterschiedlichen Entitäten sind in Tabelle 4 (im blau hinterlegten Bereich) aufgeführt. (B)

Box-Plot mit Darstellung der CD31- (Andere Karzinome n=23, NOS n=5, Kolonkarzinom n=17, NSCLC n=70, SCLC n=9, Mammakarzinom n=43, Melanom n=11, Nierenzellkarzinom n=12), FAP-Expression (Andere Karzinome n=25, NOS n=5, Kolonkarzinom n=16, NSCLC n=80, SCLC n=13, Mammakarzinom n=46, Melanom n=1, Nierenzellkarzinom n=9) und infiltrierender CD8-positiven Zellen (Andere Karzinome n=25, NOS n=5, Kolonkarzinom n=17, NSCLC n=83, SCLC n=13, Mammakarzinom n=46, Melanom n=18, Nierenzellkarzinom n=10) der unterschiedlichen Hirnmetastasen-Entitäten. Durch den Zwischenstrich innerhalb der Boxen wird der Median angezeigt. Für die CD31- und FAP-Expression wurde eine Area Quantification-Analyse durchgeführt und die CD8-positiven Zellen wurden per Multiplex-Auswertung bestimmt. Signifikante Unterschiede nach nicht-parametrischen Vergleichen korrigiert für multiples Testen mittels Dunn-Methode zwischen den Entitäten werden in Tabelle 4 (im Grau hinterlegten Bereich der Tabelle) aufgeführt.

Entität	Andere Karzinome	Karzinom „NOS“	Kolonkarzinom	NSCLC	SCLC	Mammakarzinom	Melanom	Nierenzellkarzinom
Andere Karzinome								CD31: p=0,0039 CD8: p=0,0022
Karzinom „NOS“								
Kolonkarzinom								CD8: p=0,0013
NSCLC			Ki-67: p<0,0001			CD8: p=0,0135		CD31: p=0,0198
SCLC				Ki-67: p=0,0096				CD8: p=0,0120
Mammakarzinom			Ki-67: p<0,0001		Ki-67: p=0,0010			CD31: p=0,0051 CD8: p=0,0008

Melanom			Ki-67: p=0,0002		Ki-67: p=0,0209			
Nierenzellkarzinom	Ki-67: p=0,0476		Ki-67: p=<0,0001		Ki-67: p=0,0014 Kol I: p=0,0048			

Tabelle 4: Darstellung der signifikanten Unterschiede zwischen Hirnmetastasen unterschiedlicher Entitäten bezüglich des Tumormikromilieus

Übersicht über die signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Entitäten bezüglich der Proliferationsrate, CD8-infiltrierender Zellen, Kollagen I-, FAP und CD31-Expression in Hirnmetastasen. Signifikante Werte für Ki-67 und Kollagen I sind im blau hinterlegten Bereich abgebildet (linker Teil der Tabelle). Signifikante Werte für FAP, CD31 und CD8 sind im grau hinterlegten Bereich abgebildet (rechter Teil der Tabelle). Ergebnisse aus Abbildung 15. Es sind lediglich die für multiples Testen korrigierten signifikanten P-Werte der nicht-parametrischen Vergleiche für alle Paare mittels Dunn-Methode innerhalb der Tabelle aufgeführt.

Nierenzellkarzinome und Melanome zeigten durchschnittlich die höchsten Mittelwerte für eine Expression von MHC I. Die geringste Expression konnte bei SCLC festgestellt werden (Abbildung 16 A). Melanome, Nierenzellkarzinome und NSCLC zeigten die höchsten Mittelwerte für die MHC II-Expression (Abbildung 16 B). Jedoch zeigten sich nach den für multiples Testen korrigierten nicht-parametrischen Vergleichen mittel Dunn-Methode keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Entitäten. Bezüglich der CD74-Expression konnte eine signifikant erhöhte Expression in NSCLC im Vergleich zu SCLC festgestellt werden (Abbildung 16 C). Auch bezüglich der PD-L1-Expression zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Entitäten nach multiplem Testen (Abbildung 16 D). Jedoch waren 20,2% der NSCLC (17/84) als auch 21% der Melanome (4/19) positiv für PD-L1 (PD-L1 Score von >0). Im Gegensatz dazu waren nur 4,3% der Mammakarzinome (2/46) und 0% der Kolonkarzinome (0/19) positiv für PD-L1 (Abbildung 16 D und Appendix Abbildung 6). Weiterhin zeigten lediglich Hirnmetastasen von NSCLC den höchsten Score von 12.

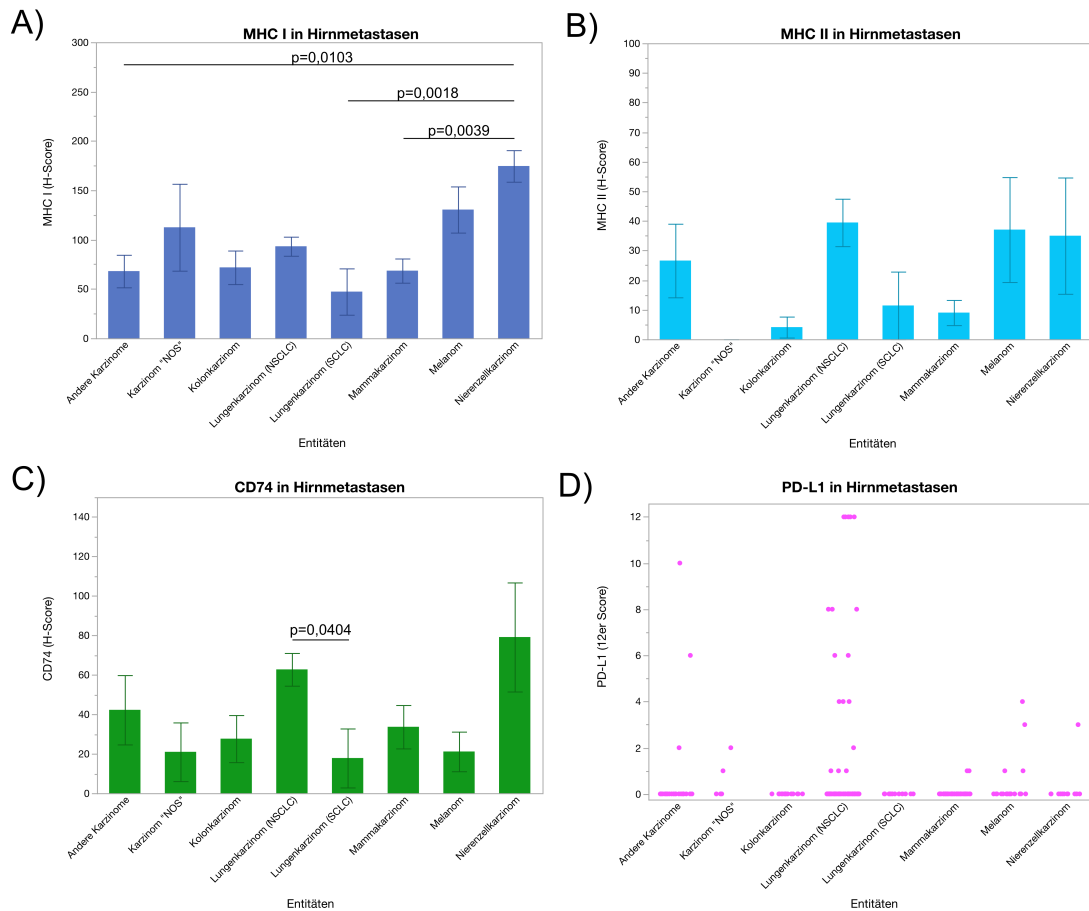


Abbildung 16: Balkendiagramme zur Darstellung des Immunphänotyps der Hirnmetastasen-Entitäten

(A, B, C) Balkendiagramme mit Darstellung des Mittelwertes und des Standardfehlers für MHC I (A, Andere Karzinome n=21, NOS n=4, Kolonkarzinom n=16, NSCLC n=72, SCLC n=13, Mammakarzinom n=38, Melanom n=11, Nierenzellkarzinom n=13), MHC II (B, Andere Karzinome n=25, NOS n=5, Kolonkarzinom n=17, NSCLC n=84, SCLC n=14, Mammakarzinom n=46, Melanom n=17, Nierenzellkarzinom n=11) und CD74 (C, Andere Karzinome n=18, NOS n=5, Kolonkarzinom n=15, NSCLC n=78, SCLC n=14, Mammakarzinom n=38, Melanom n=18, Nierenzellkarzinom n=12) in der Hirnmetastasen-Kohorte. (D) Streudiagramm zur Darstellung der PD-L1-Expression in der Hirnmetastasen-Kohorte (Andere Karzinome n=24, NOS n=5, Kolonkarzinom n=19, NSCLC n=84, SCLC n=13, Mammakarzinom n=46, Melanom n=19, Nierenzellkarzinom n=12). Die für multiples Testen korrigierten signifikanten P-Werte der nicht-parametrischen Vergleiche für alle Paare mittels Dunn-Methode sind innerhalb der Graphen aufgeführt.

In Bezug auf den Typ der Immunzellinfiltration (diffus, Stromal/perivaskulär, diffus + Stromal/perivaskulär) zeigten sich zumeist Ähnlichkeiten zwischen den

Entitäten. Jedoch zeigten sowohl die Nierenzellkarzinome als auch Melanome ein zumeist diffuses Infiltrationsmuster im Vergleich zu Kolonkarzinomen, die vordergründig ein stromales/perivaskuläres Infiltrationsmuster aufwiesen (Abbildung 17). In einer erweiterten Analyse zur Überprüfung ob ggf. die Art der Immunzellinfiltration von anderen Parametern abhängig ist, zeigte sich, dass insbesondere eine stromale/perivaskuläre Immunzellinfiltration in der Gesamtkohorte mit einer erhöhten Kollagen I-Expression assoziiert ist (Abbildung 18 A). In der Subkohorte NSCLC zeigte sich lediglich ein starker Trend für diesen Effekt (Diffus gegen Stromale/perivaskuläre Immunzellinfiltration $p=0,0554$, Abbildung 18 B). Im Gegensatz dazu, konnte eine verminderte Anzahl von CD8-positiven Zellen im stromalen/perivaskulären Infiltrationsmuster im Vergleich zum diffusen oder gemischten Infiltrationsmuster nach multiplen Testen mittels Dunn-Methode nachgewiesen werden. Dies zeigte sich sowohl in der Gesamtkohorte als auch der Subkohorte NSCLC (Abbildung 19). Weiterhin ist zu erwähnen, dass sich eine signifikant schwache Korrelation zwischen der Gefäßdichte und CD8-positiven Zellen in der vorliegenden Kohorte ergab (Abbildung 20).

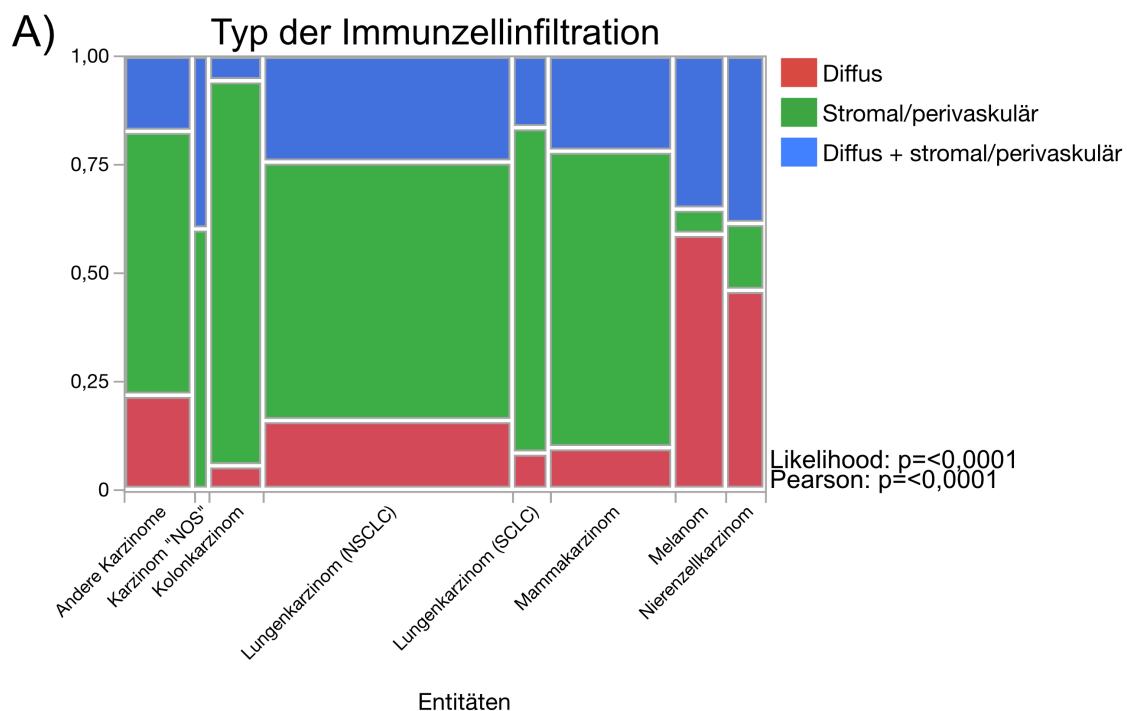


Abbildung 17: Kontingenzanalyse zur Darstellung des Typs der Immunzellinfiltration in den unterschiedlichen Hirnmetastasen-Entitäten

(A) Kontingenztabelle mit Darstellung des Typs der Immunzellinfiltration je nach Entität der Hirnmetastase (Andere Karzinome n=23, NOS n=5, Kolonkarzinom n=18, NSCLC n=82, SCLC n=12, Mammakarzinom n=41, Melanom n=17, Nierenzellkarzinom n=13). P-Werte des Likelihood-Verhältnis χ^2 als auch des Pearson χ^2 sind jeweils neben dem Graphen angegeben.

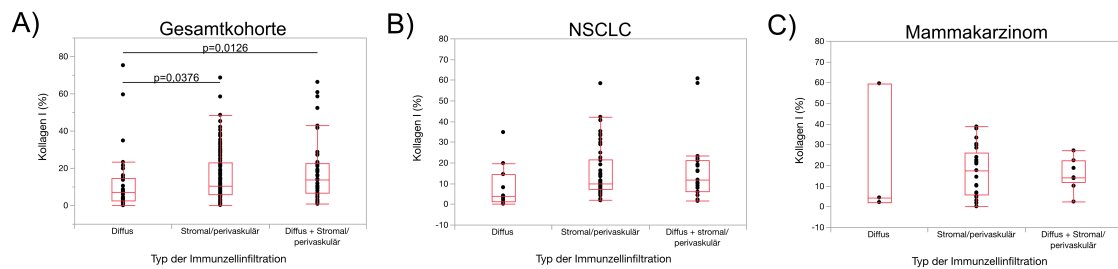


Abbildung 18: Assoziation zwischen Typ der Immunzellinfiltration und Kollagen I

(A, B, C) Einfaktorielle Analyse zur Untersuchung der Assoziation zwischen dem Typ der Immunzellinfiltration und der Kollagen I-Expression in der Gesamtkohorte (A, n=192) und den Subkohorten NSCLC (B, n=76) und Mammakarzinom (C, n=37). Die für multiples Testen korrigierten signifikanten P-Werte der nicht-parametrischen Vergleiche für alle Paare mittels Dunn-Methode sind innerhalb der Graphen aufgeführt.

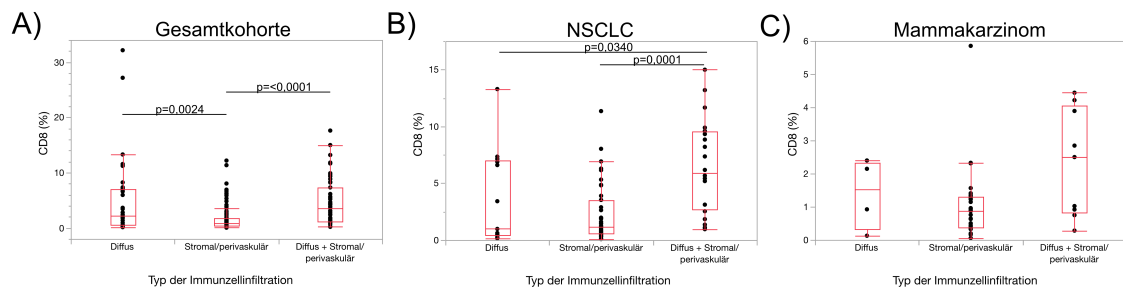


Abbildung 19: Assoziation zwischen Typ der Immunzellinfiltration und CD8-positiven Zellen

(A, B, C) Einfaktorielle Analyse zur Untersuchung der Assoziation zwischen dem Typ der Immunzellinfiltration und der Infiltration mit CD8-positiven Zellen in der Gesamtkohorte (A, n=205) und den Subkohorten NSCLC (B, n=80) und Mammakarzinom (C, n=41). Die für multiples Testen korrigierten signifikanten P-Werte der nicht-parametrischen Vergleiche für alle Paare mittels Dunn-Methode sind innerhalb der Graphen aufgeführt.

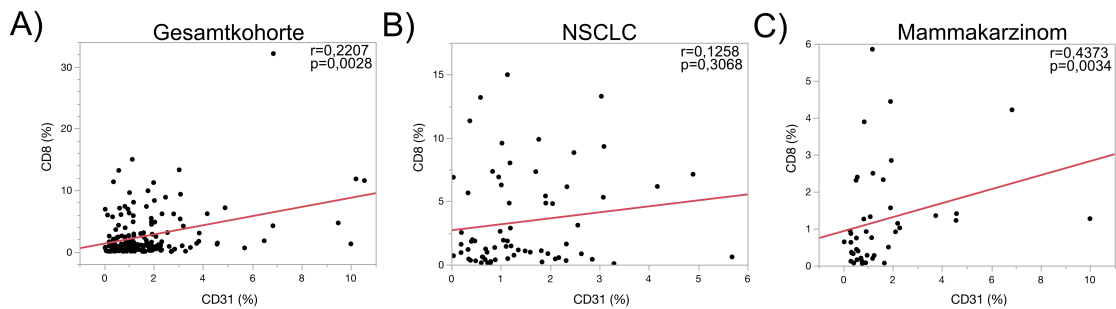


Abbildung 20: Korrelation zwischen der Gefäßdichte und CD8-positiven Zellen

(A, B, C) Korrelationsanalyse der Gefäßdichte mit CD8-positiven Zellen in der Gesamtkohorte (A, n=181), der Subkohorte NSCLC (B, n=68) und der Subkohorte Mammakarzinom (C, n=48). Die Korrelationskoeffizienten und P-Werte wurden durch den nicht-parametrischen Spearman-p berechnet. Die Ergebnisse sind innerhalb der Graphen aufgeführt.

3.4 Stromale Marker in Abhängigkeit von Durchmesser und Immuzellinfiltration der Hirnmetastase

In der Korrelationsanalyse nach Spearman fand sich ein signifikant negativer Zusammenhang zwischen der Größe der operierten Hirnmetastase und der Expression von Kollagen I, FAP als auch der Infiltration mit CD8-positiven Zellen (Abbildung 21) in der Gesamtkohorte. Dies zeigte sich auch für FAP und CD8 in der Subkohorte NSCLC (Abbildung 22). Interessanterweise zeigte sich ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der Infiltration mit CD8-positiven Zellen und der Expression von Kollagen I und FAP (Abbildung 23). Dies zeigte sich auch in der Subkohorte NSCLC sowohl für Kollagen I als auch FAP (Abbildung 24 A+B). In der Subkohorte der Mammakarzinome zeigte sich lediglich eine signifikant positive Korrelation zwischen Kollagen I und CD8, jedoch nicht zwischen FAP und CD8 (Abbildung 24 C+D).

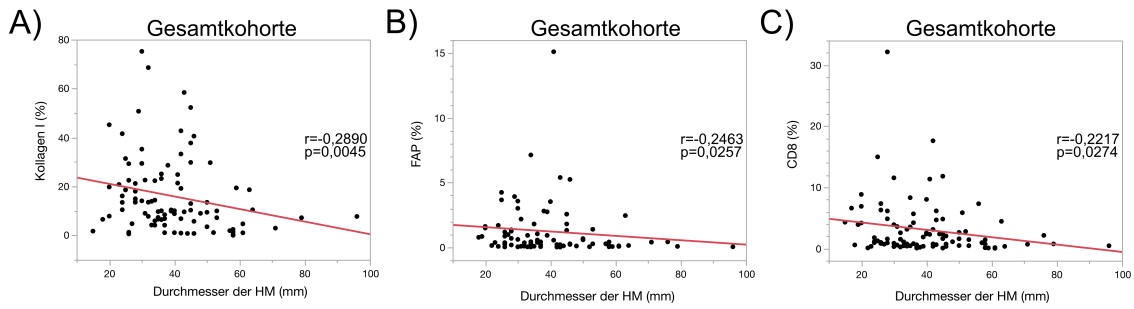


Abbildung 21: Korrelation zwischen dem Durchmesser der Hirnmetastase und stromalen Färbungen in der Gesamtkohorte

(A, B, C) Korrelationsanalyse des Durchmessers der operierten Hirnmetastase mit der Kollagen I-Expression (A, n=95), FAP-Expression (B, n=82) und CD8-positiven Zellen (C, n=99) in der Gesamtkohorte. Die Korrelationskoeffizienten und P-Werte wurden durch den nicht-parametrischen Spearman-p berechnet. Die Ergebnisse sind innerhalb der Graphen aufgeführt.

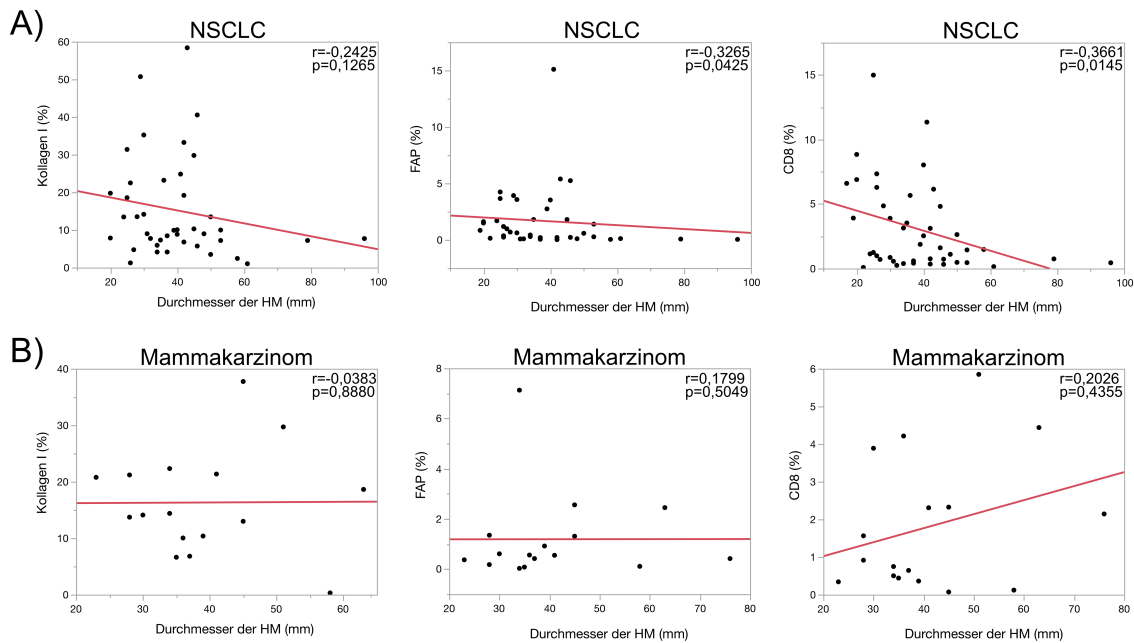


Abbildung 22: Korrelation zwischen dem Durchmesser der Hirnmetastase und stromalen Färbungen in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom

(A, B) Korrelationsanalyse zwischen dem Durchmesser der Kollagen I-Expression, FAP-Expression und CD8-infiltrierender Zellen mit dem Durchmesser der operierten Hirnmetastase in den Subkohorten NSCLC (A, Kollagen I n=41, FAP n=39, CD8 n=44) und Mammakarzinom (B, Kollagen I n=16, FAP n=16, CD8 n=17). Die Korrelationskoeffizienten und P-Werte wurden durch den nicht-parametrischen Spearman-p berechnet. Die Ergebnisse sind innerhalb der Graphen aufgeführt.

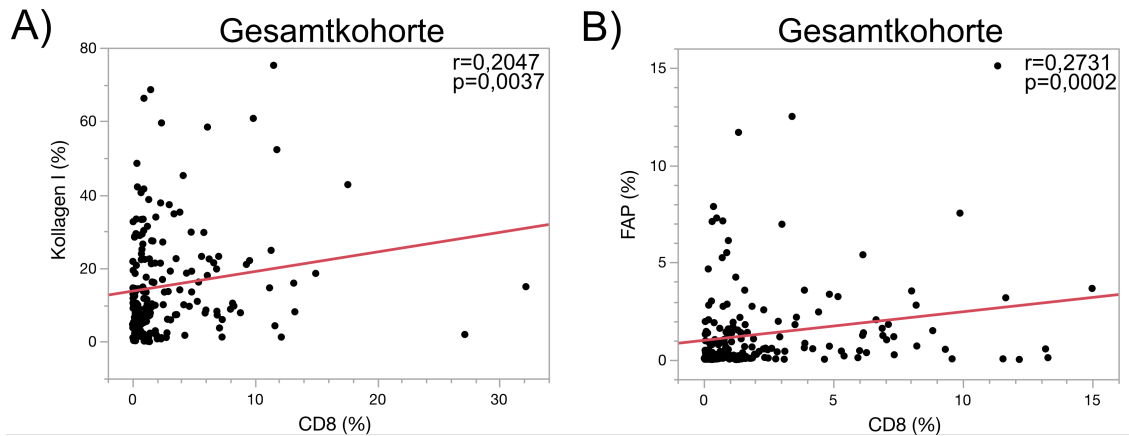


Abbildung 23: Korrelation zwischen CD8-positiven Zellen und Kollagen I als auch FAP in der Gesamtkohorte

(A, B) Korrelationsanalyse zwischen CD8-positiven Zellen und der Kollagen I-Expression (A, n=199) als auch FAP-Expression (B, n=186) in der Gesamtkohorte. Die Korrelationskoeffizienten und P-Werte wurden durch den nicht-parametrischen Spearman-p berechnet. Die Ergebnisse sind innerhalb der Graphen aufgeführt.

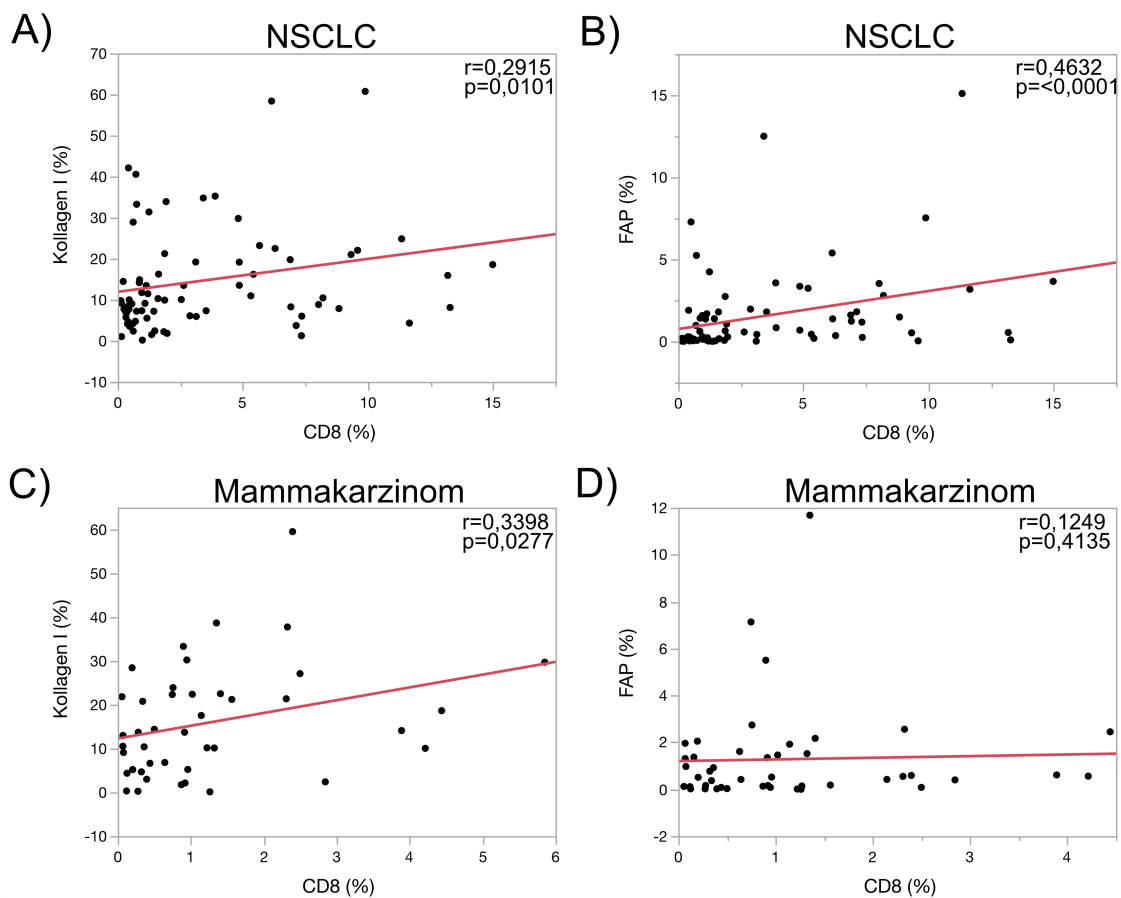


Abbildung 24: Korrelation zwischen CD8-positiven Zellen und Kollagen I und FAP in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom

(A, B, C, D) Korrelationsanalyse zwischen CD8-positiven Zellen und der Kollagen I-Expression (A, n=77; C, n=42) als auch FAP-Expression (B, n=77; D, n=45) in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom. Die Korrelationskoeffizienten und P-Werte wurden durch den nicht-parametrischen Spearman-p berechnet. Die Ergebnisse sind innerhalb der Graphen aufgeführt.

3.5 Einfluss des Tumormikromilieus auf das Patientenüberleben

Um die Hypothese bezüglich des Einflusses des Tumormikromilieus auf das Überleben von Hirnmetastasen-Patienten zu überprüfen, wurden die oben erhobenen Expressionsdaten mit der Lebensdauer der Patienten verglichen. Falls nicht speziell in der Abbildungsbeschreibung erwähnt, wurde das Überleben ab der Hirnmetastasen-OP bis zum letzten Kontakt des Patienten verwendet. Für die meisten Untersuchungen wurden die Patienten anhand einer medianen Aufteilung bezüglich der Expression des untersuchten Biomarkers zwei Gruppen zugewiesen („hoch und niedrig“). Weiterhin wurden die Gruppen teilweise nach positiver oder negativer Expression für einen Marker aufgeteilt.

In der vorliegenden Kohorte zeigte sich für Patienten mit einer hohen Proliferationsrate des Tumors ein schlechteres Überleben im Vergleich zu einer niedrigen Proliferationsrate. Auch in der Subkohorte der NSCLC jedoch nicht für die Mammakarzinome zeigte sich dieser Zusammenhang (Abbildung 25 A). Sowohl die Kollagen I- als auch FAP-Expression hatte in der Gesamtkohorte als auch den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben nach Hirnmetastasen-OP (Abbildung 25 B+C). Jedoch ergab sich ein positiver Einfluss einer hohen FAP-Expression auf das Überleben von Patienten mit Kolonkarzinomen (Abbildung 26). Außerdem ist die Expression von vaskulärem PDGFRb in Hirnmetastasen von NSCLC mit einem schlechteren Überleben vergesellschaftet (Abbildung 27 A, Mitte). Bezüglich der weiteren stromalen Marker wie vaskulärem PDGFRb, stromalem PDGFRb oder GFAP zeigten sich sowohl in der Gesamtkohorte als auch in den Subkohorten keine Auffälligkeiten (Abbildung 27 A+B+C). Auch die zur Einschätzung des Immunphänotyps verwendeten Marker PD-L1, MHC I, MHC II und CD74 zeigten keine Einflüsse auf das Überleben der Hirnmetastasen-Patienten (Abbildung 28). Weiterführend hatten sowohl CD8-infiltrierende Zellen als auch das

Infiltrationsmuster der CD8-infiltrierenden Zellen keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten (Abbildung 29).

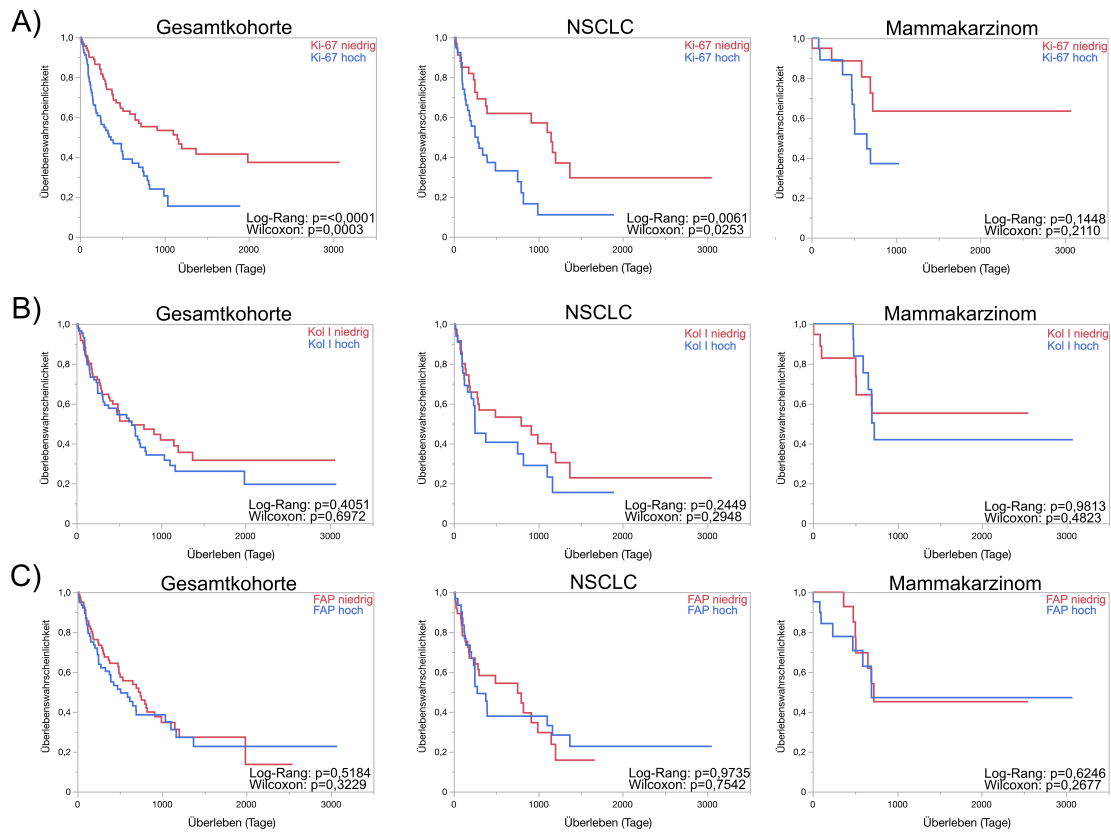


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit von Proliferationsrate, Kollagen I- und FAP-Expression

(A, B, C) Kaplan-Meier-Kurven mit Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit für die Gesamtkohorte als auch die größten Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom in Abhängigkeit von Proliferationsrate (A, Gesamtkohorte $n=228$, NSCLC $n=88$, Mammakarzinom $n=44$), Kollagen I-Expression (B, Gesamtkohorte $n=211$, NSCLC $n=82$, Mammakarzinom $n=43$) und FAP-Expression (C, Gesamtkohorte $n=195$, NSCLC $n=80$, Mammakarzinom $n=46$). Gruppeneinteilung zu niedrig oder hoch ist anhand einer medianen Aufteilung erfolgt. P-Werte des Wilcoxon- als auch Log-Rank-Tests sind innerhalb der Graphen angegeben.

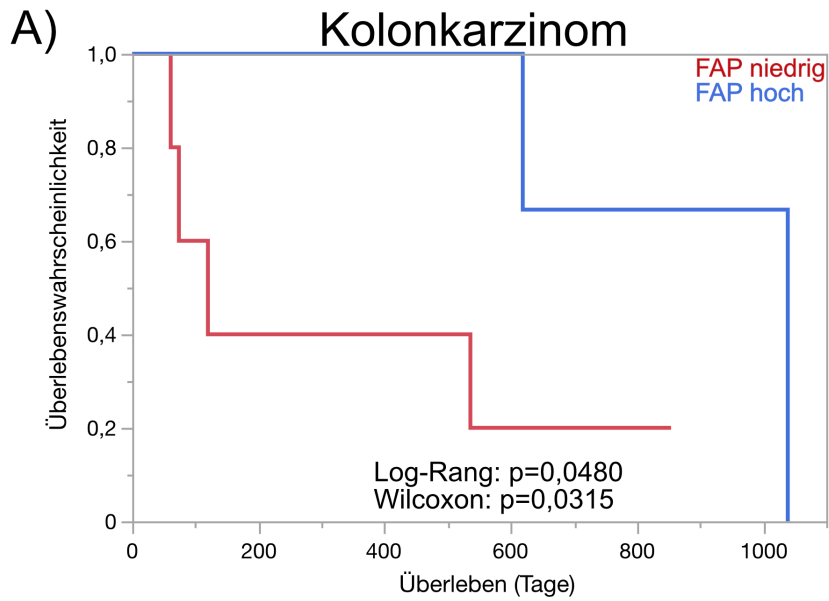


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der FAP-Expression in der Subkohorte Kolonkarzinom

(A) Kaplan-Meier-Kurve mit Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit für die Subkohorte Kolonkarzinom in Abhängigkeit der FAP-Expression ($n=16$). Gruppeneinteilung zu niedrig oder hoch ist anhand einer medianen Aufteilung erfolgt. P-Werte des Wilcoxon- als auch Log-Rank-Tests sind innerhalb des Graphen angegeben.

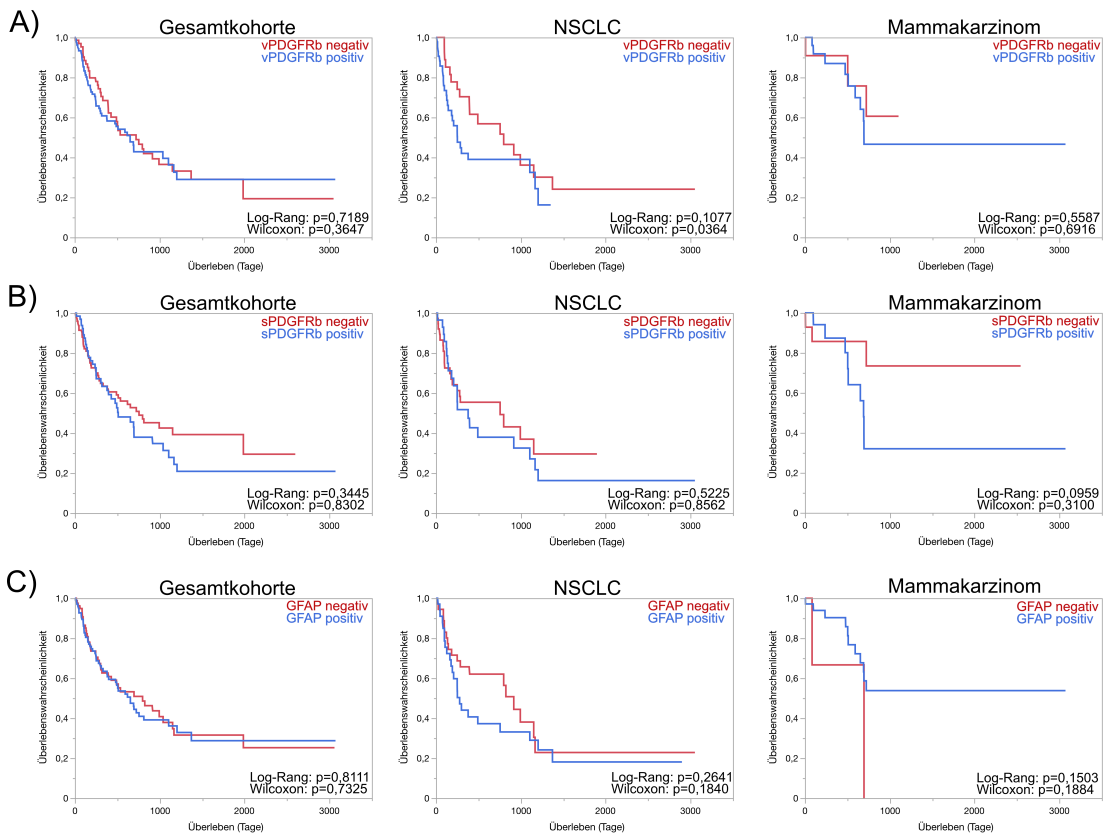


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit von vPDGFRb-, sPDGFRb und GFAP-Expression

(A, B, C) Kaplan-Meier-Kurven mit Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit für die Gesamtkohorte als auch die größten Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom in Abhängigkeit der vaskulären PDGFRb-Expression (A, Gesamtkohorte n=208, NSCLC n=84, Mammakarzinom n=41), der stromalen PDGFRb-Expression (B, Gesamtkohorte n=197, NSCLC n=79, Mammakarzinom n=37) und der GFAP-Expression (C, Gesamtkohorte n=215, NSCLC n=82, Mammakarzinom n=43). P-Werte des Wilcoxon- als auch Log-Rank-Tests sind innerhalb der Graphen angegeben.

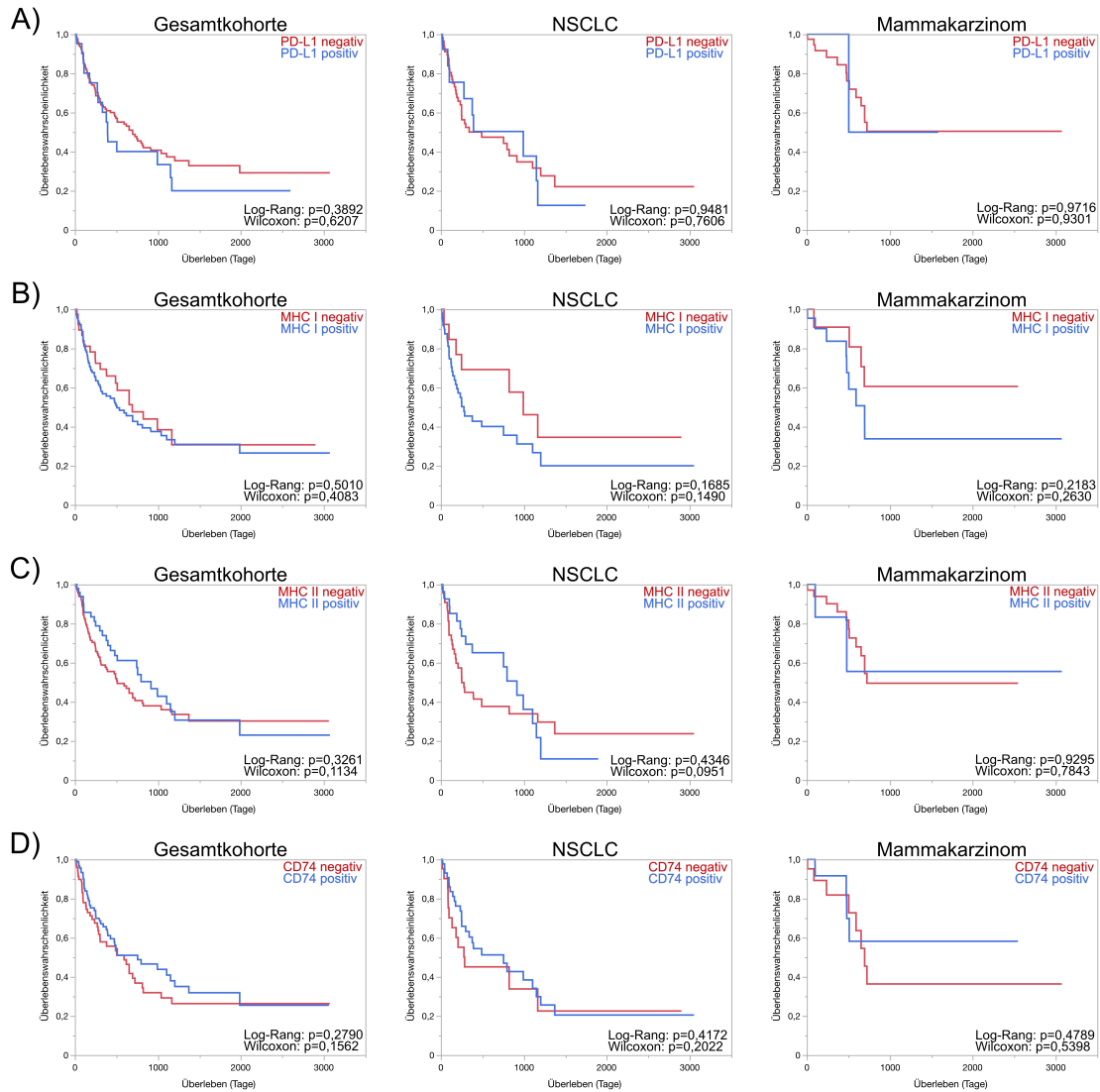


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit von PD-L1, MHC I, MHC II und CD74-Expression

(A, B, C, D) Kaplan-Meier-Kurven mit Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit für die Gesamtkohorte als auch die größten Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom in Abhängigkeit der PD-L1-Expression (A, Gesamtkohorte n=212, NSCLC n=84, Mammakarzinom n=46), der MHC I-Expression (B, Gesamtkohorte n=188, NSCLC n=72, Mammakarzinom n=38), der MHC II-Expression (C, Gesamtkohorte n=209, NSCLC n=84, Mammakarzinom n=46) und der CD74-Expression (D, Gesamtkohorte n=198, NSCLC n=78, Mammakarzinom n=38). P-Werte des Wilcoxon- als auch Log-Rank-Tests sind innerhalb der Graphen angegeben.

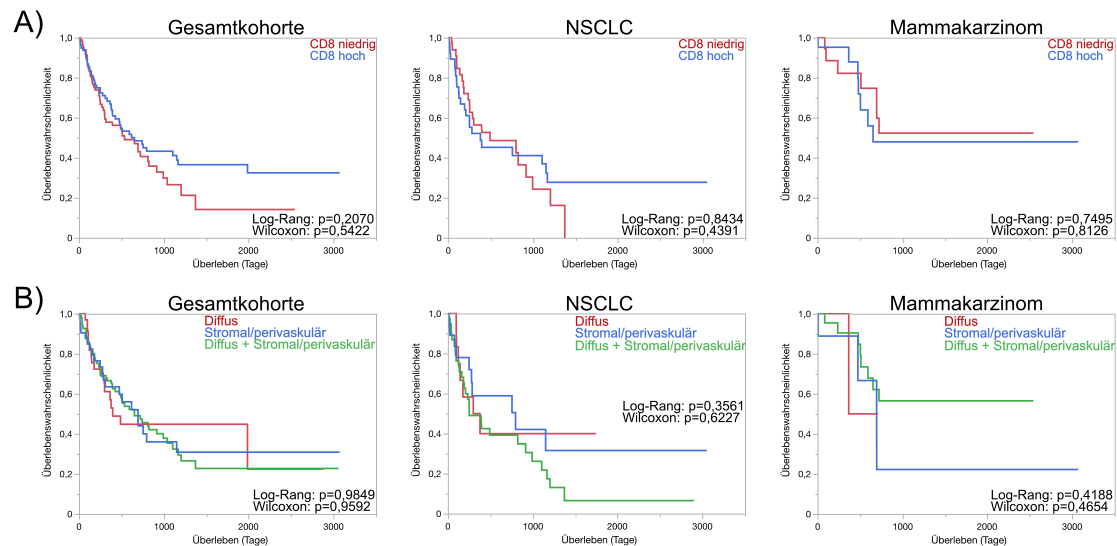


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit von CD8-positiven Zellen und dem Typ der Immunzellinfiltration

(A, B) Kaplan-Meier-Kurven mit Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit für die Gesamtkohorte als auch die größten Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom in Abhängigkeit der Infiltration von CD8-positiven Zellen (A, Gesamtkohorte n=227, NSCLC n=83, Mammakarzinom n=46) und des Infiltrationsmuster der CD8-positiven Zellen (B, Gesamtkohorte n=211, NSCLC n=82, Mammakarzinom n=41). P-Werte des Wilcoxon- als auch Log-Rank-Tests sind innerhalb der Graphen angegeben.

3.6 Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung

3.6.1 Charakterisierung der Kohorte und des Tumormikromilieus

Zur Untersuchung, ob sich das Tumormikromilieu in der Subkohorte von Patienten, bei denen die Hirnmetastase zur Erstmanifestation der Tumorerkrankung führte und der Vergleichskohorte mit bei Auftreten der Hirnmetastase bereits seit längerem bekannter Tumorerkrankung, unterscheiden, wurden die Auswertungen der bereits genutzten IHC-Färbungen zur Überprüfung von Hypothese 1 bis 3 genutzt, um diese zwischen den unterschiedlichen Kohorten zu vergleichen.

In der Gesamtkohorte zeigte sich ein Anteil von Patienten mit 34,2%, bei denen die Hirnmetastase zur Erstmanifestation der Tumorerkrankung führte (Abbildung

30 A). In der vorliegenden Kohorte von Patienten mit operierten Hirnmetastasen waren 57% der NSCLC-Patienten mit ihrer Hirnmetastasen klinisch aufgefallen. Ähnliche Werte zeigten sich auch für SCLC (62,5%) und Karzinom „NOS“ (100%) (Abbildung 30 B).

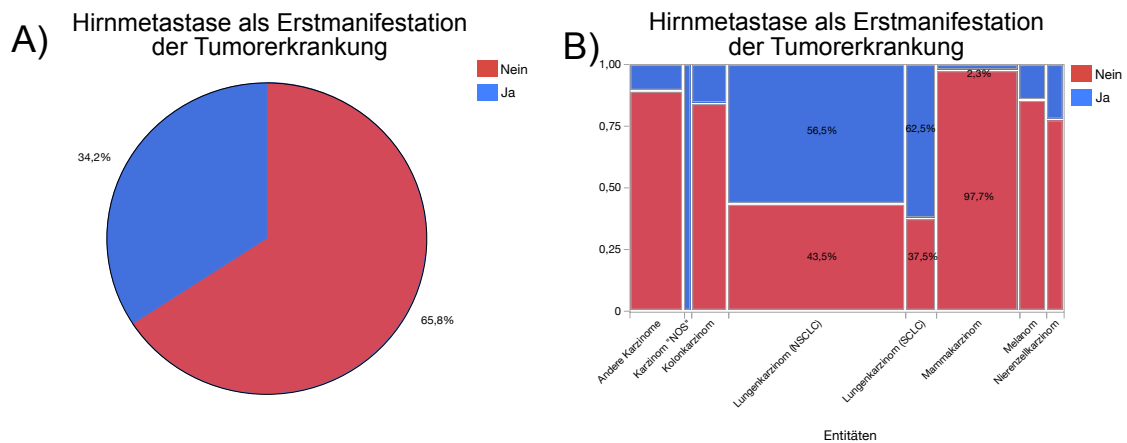


Abbildung 30: Verteilung von Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung in der Gesamtkohorte und den unterschiedlichen Entitäten

(A) Tortendiagramm zur Darstellung des prozentualen Anteils der Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung in der Gesamtkohorte (n=225). (B) Übersicht über den jeweiligen Anteil der Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung in den unterschiedlichen Entitäten. Beispielhaft sind die prozentualen Anteile für NSCLC, SCLC und Mammakarzinome aufgeführt. Die prozentualen Anteile der anderen Entitäten und Fallzahlen lauteten (Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein): Andere Karzinome 10,7%/89,3% n=28, Karzinom „NOS“ 100%/0% n=4, Kolonkarzinom 15,8%/84,2% n=19, NSCLC n=92, SCLC n=16, Mammakarzinom n=43, Melanom 14,3%/85,7% n=14, Nierenzellkarzinom 22,2%/77,8% n=9.

Zur Überprüfung des Tumormikromilieus zwischen den beiden Kohorten wurden alle Analysen sowohl in der Gesamtkohorte (n=225) und der kombinierten Subkohorte bestehend aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ (n=112) als auch der alleinigen Subkohorte NSCLC (n=92) untersucht. Dies soll zeigen, ob es sich bei möglichen Unterschieden lediglich um Entitäten spezifische Veränderungen handelt oder diese auch über Entitäten hinweg bestehen. Klinische Daten wie z.B. Alters-, medianes Überleben, Geschlechtsverteilung

und Größe der Hirnmetastasen in den beiden Gruppen sind in den Tabellen 5 bis 7 für die drei überprüften Kohorten aufgeführt.

In der Gesamtkohorte zeigte sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Geschlechterverteilung (Abbildung 31 A). In der kombinierten Kohorte der NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ und der alleinigen NSCLC-Subkohorte zeigten sich in der Gruppe der Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung signifikant kleinere Metastasen (Abbildung 32 A und 33 B). Zusätzlich zeigte sich in der Subkohorte der NSCLC ein Altersunterschied zwischen den beiden Kohorten (jüngere Patienten in der Kohorte mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung, Abbildung 33 A). In allen drei Kohorten zeigte sich ein signifikanter Unterschied bezüglich des Überlebens nach Primärdiagnose und des Abstands zwischen Primärdiagnose und Hirnmetastasen-Operation (Abbildung 31 B+C, 32 B+C und 33 C+D).

Gesamtkohorte	Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung	
	NEIN	JA
Geschlecht (m/w)	m: 55 (37,2%) w: 93 (62,8%)	m: 55 (55,8%) w: 34 (44,2%)
Alter (Jahre)	33-81 Median 62	35-80 Median 60
Größe der HM (mm)	7-96 Median 39	15-72 Median 37,5
Anzahl der HM	1-20 Median 1	1-13 Median 1

Überleben nach HM-OP (Tage)	0-3059 Median 259,5	0-3051 Median 177
Überleben nach Diagnose Primarius (Tage)	179-15479 Median 1315,5	0-2921 Median 177
Tage zwischen HM-OP und Primariusdiagnose (Tage)	92-13218 Median 854	0-55 Median 0

Tabelle 5: Klinische Eigenschaften von Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der Gesamtkohorte

Übersicht klinischer Daten von Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung „Ja“ und „Nein“ in der Gesamtkohorte (n=225). Es ist sowohl die Verteilung der einzelnen Werte (Minimum und Maximum) als auch der Median angegeben. Prozente sind auf eine Nachkommastelle gerundet. In der Gruppe der Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung kam es in seltenen Fällen zu einer Verzögerung der Hirnmetastasen-Operation, weshalb es zu einer Diskrepanz in Tagen zwischen HM-OP und Primariusdiagnose kam (Verteilung 0-55 Tage, Median 0). Trotzdem war in diesen Patienten die HM die Erstmanifestation der Tumorerkrankung.

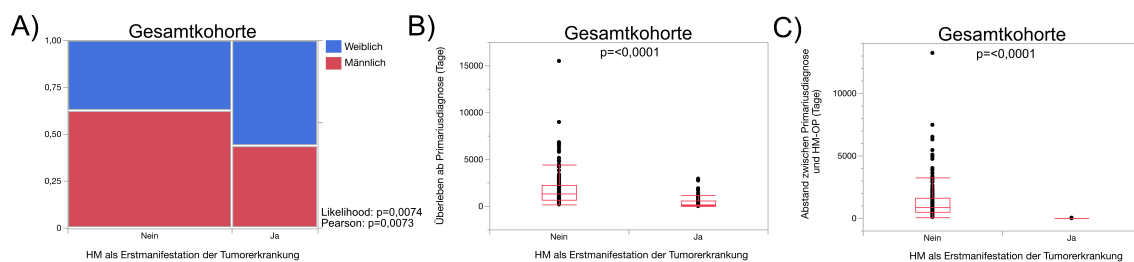


Abbildung 31: Klinische Unterschiede zwischen Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der Gesamtkohorte

(A) Kontingenztabelle zur Darstellung der Geschlechterverteilung in den beiden Gruppen Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung „Ja“ und „Nein“ (n=225). P-Werte des Likelihood-Verhältnis χ^2 als auch des Pearson χ^2 sind neben dem Graphen angegeben. (B, C) Einfaktorielle Analyse bezüglich des Überlebens ab Primariusdiagnose (B, n=223) und dem zeitlichen Abstand zwischen Primariusdiagnose und Hirnmetastasen-OP (C, n=223). P-Werte des non-parametrischen Wilcoxon-Tests sind innerhalb der Graphen abgebildet.

NSCLC + SCLC + NOS	Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung	
	NEIN	JA
Geschlecht (m/w)	m: 23 (50%) w: 23 (50%)	m: 36 (54,6%) w: 30 (45,4%)
Alter (Jahre)	43-80 Median 64	35-80 Median 61
Größe der HM (mm)	7-96 Median 42	15-72 Median 36,5
Anzahl der HM	1-6 Median 1	1-13 Median 1
Überleben nach HM-OP (Tage)	0-1351 Median 215,5	0-3051 Median 180
Überleben nach Diagnose Primarius (Tage)	273-3140 Median 857	0-2921 Median 180
Tage zwischen HM-OP und Primariusdiagnose (Tage)	201-3102 Median 643	0-55 Median 0

Tabelle 6: Klinische Eigenschaften von Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der kombinierten Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“

Übersicht klinischer Daten von Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung „Ja“ und „Nein“ in der kombinierten Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ (n=112). Es ist sowohl die Verteilung der einzelnen Werte (Minimum und Maximum) als auch der Median angegeben. Prozente sind auf eine Nachkommastelle gerundet. In der Gruppe der Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung kam es in seltenen Fällen zu einer Verzögerung der Hirnmetastasen-Operation, weshalb es zu einer Diskrepanz in Tagen zwischen HM-OP und Primariusdiagnose kam (Verteilung 0-55 Tage, Median 0). Trotzdem war in diesen Patienten die HM die Erstmanifestation der Tumorerkrankung.

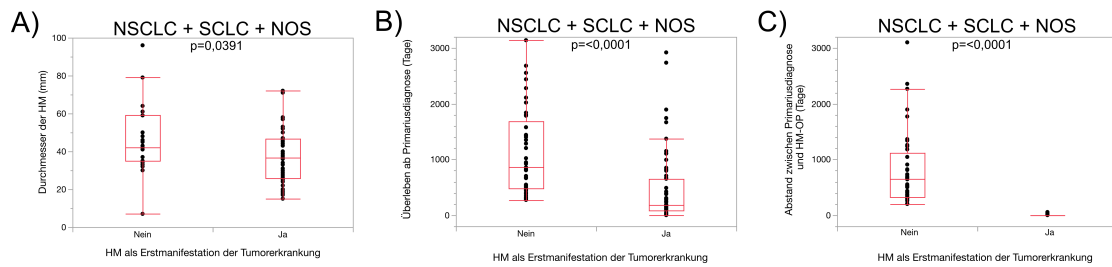


Abbildung 32: Klinische Unterschiede zwischen Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der kombinierten Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“

(A, B, C) Einfaktorielle Analyse bezüglich der Hirnmetastasen-Größe (A, n=63), des Überlebens ab Primärdiagnose (B, n=101) und dem zeitlichen Abstand zwischen Primärdiagnose und Hirnmetastasen-OP (C, n=101). P-Werte des non-parametrischen Wilcoxon-Tests sind innerhalb der Graphen abgebildet.

NSCLC	Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung	
	NEIN	JA
Geschlecht (m/w)	m: 21 (53%) w: 19 (47%)	m: 29 (55,8%) w: 23 (44,2%)
Alter (Jahre)	45-80 Median 64,5	35-80 Median 61
Größe der HM (mm)	7-96 Median 42	17-58 Median 30
Anzahl der HM	1-6 Median 2	1-10 Median 1
Überleben nach HM-OP (Tage)	0-1351 Median 236,5	0-3051 Median 249

Überleben nach Diagnose Primarius (Tage)	273-3140 Median 857	0-2921 Median 249
Tage zwischen HM-OP und Primariusdiagnose (Tage)	201-3102 Median 553	0-55 Median 0

Tabelle 7: Klinische Eigenschaften von Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der Subkohorte NSCLC

Übersicht klinischer Daten von Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung „Ja“ und „Nein“ in der Subkohorte NSCLC (n=92). Es ist sowohl die Verteilung der einzelnen Werte (Minimum und Maximum) als auch der Median angegeben. Prozenste sind auf eine Nachkommastelle gerundet. In der Gruppe der Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung kam es in seltenen Fällen zu einer Verzögerung der Hirnmetastasen-Operation, weshalb es zu einer Diskrepanz in Tagen zwischen HM-OP und Primariusdiagnose kam (Verteilung 0-55 Tage, Median 0). Trotzdem war in diesen Patienten die HM die Erstmanifestation der Tumorerkrankung.

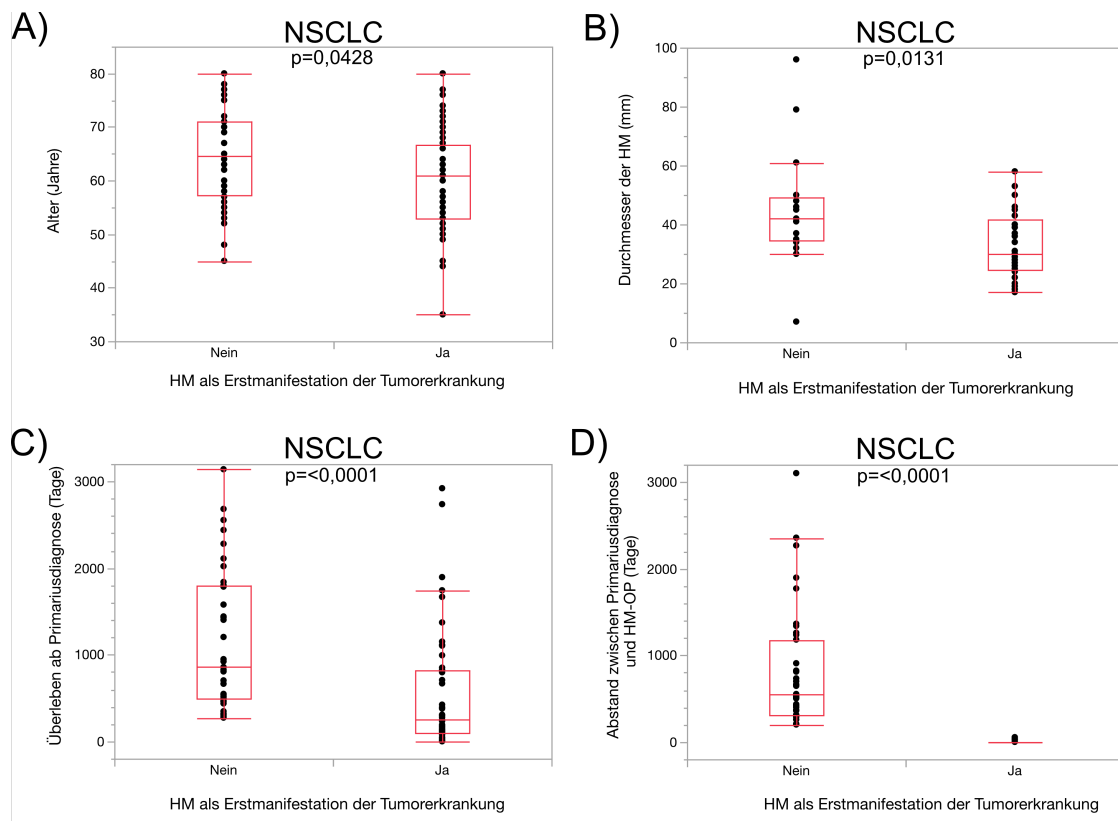


Abbildung 33: Klinische Unterschiede zwischen Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der Subkohorte NSCLC

(A, B, C, D) Signifikante Unterschiede bezüglich des Alters der Patienten zum Zeitpunkt der Hirnmetastasen-OP (A, n=92), der Hirnmetastasen-Größe (B, n=46), des Überlebens ab Primärdiagnose (C, n=91) und dem zeitlichen Abstand zwischen Primärdiagnose und Hirnmetastasen-OP (C, n=91). P-Werte des non-parametrischen Wilcoxon-Tests sind innerhalb der Graphen abgebildet.

Bezüglich der Gefäßdichte, der Kollagen I-Expression, FAP-Expression und der Proliferationsrate ergaben sich zwischen den Gruppen HM als Erstmanifesation der Tumorerkrankung und Hirnmetastase bei bekannter Tumorerkrankung keine signifikanten Unterschiede sowohl in der Gesamtkohorte als auch den untersuchten Subkohorten (Abbildung 34 und 35). Weiterhin zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der stromalen Marker sPDGFRb (Abbildung 36 A), vPDGFRb (Abbildung 36 B) und GFAP (Abbildung 36 C).

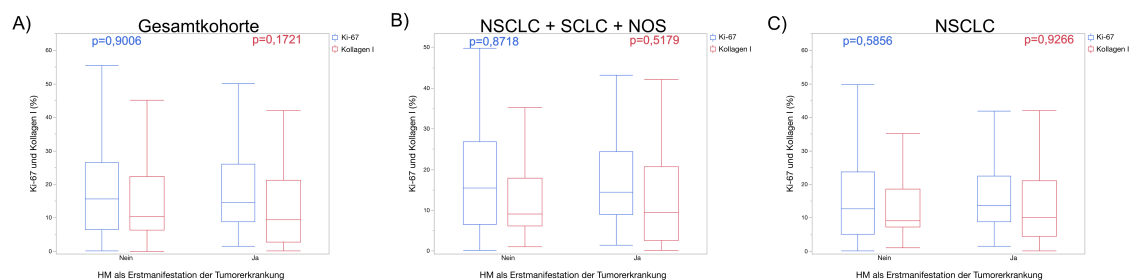


Abbildung 34: Vergleich der Proliferationsrate und Kollagen I-Expression zwischen HM als Erstmanifesation Ja/Nein

(A, B, C) Box-Plots mit Darstellung der Proliferationsrate und Kollagen I-Expression der Gesamtkohorte (A, n=211 für Ki-67, n=196 für Kollagen I), der kombinierten Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ (B, n=104 für Ki-67, n=96 für Kollagen I) und für die Subkohorte NSCLC (C, n=86 für Ki-67, n=80 für Kollagen I). Durch den Zwischenstrich innerhalb der Box ist der Median dargestellt. P-Werte des nicht-parametrischen Wilcoxon-Tests sind innerhalb der Graphen aufgeführt (blau für Ki-67 und rot für Kollagen I).

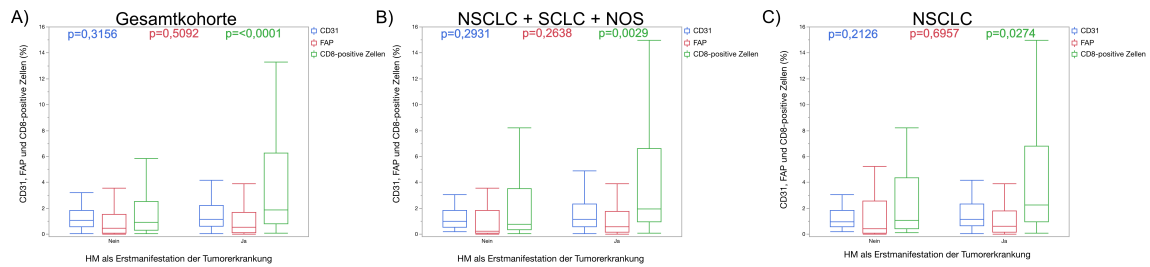


Abbildung 35: Vergleich der Gefäßdichte, FAP-Expression und CD8-positiver Zellen zwischen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein

(A, B, C) Box-Plots mit Darstellung der CD31-, FAP-Expression und Infiltration mit CD8-positiven Zellen in der Gesamtkohorte (A, n=171 für CD31, n=182 für FAP, n=201 für CD8), der kombinierten Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ (B, n=81 für CD31, n=94 für FAP, n=98 für CD8) und für die Subkohorte NSCLC (C, n=68 für CD31, n=78 für FAP, n=81 für CD8). Durch den Zwischenstrich innerhalb der Box ist der Median dargestellt. P-Werte des nicht-parametrischen Wilcoxon-Tests sind innerhalb der Graphen aufgeführt (Blau für CD31, Rot für FAP und Grün für CD8).

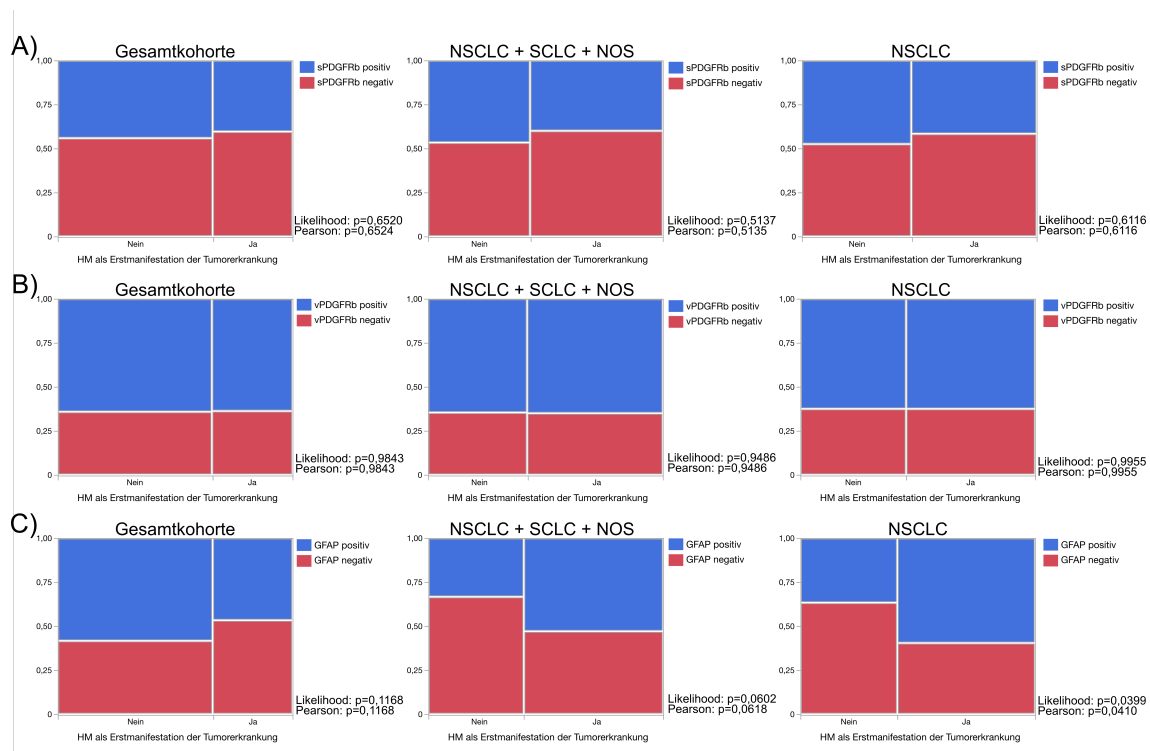


Abbildung 36: Kontingenztabelle bezüglich der Expression von sPDGFRb, vPDGFRb und GFAP zwischen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein

(A, B, C) Kontingenztabelle zur Darstellung der stromalen PDGFRb-Expression (A, n=183 für Gesamtkohorte, n=94 für NSCLC + SCLC + NOS, n=77 für NSCLC), vaskulärer PDGFRb-Expression (B, n=193 für Gesamtkohorte, n=99 für NSCLC + SCLC + NOS, n=82 für NSCLC) und GFAP-Expression (C, n=198 für Gesamtkohorte, n=96 für NSCLC + SCLC + NOS, n=80 für NSCLC).

NSCLC) zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung „Ja“ und „Nein“ in der Gesamtkohorte, der kombinierten Subkohorte NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“. P-Werte des Likelihood-Verhältnis χ^2 als auch des Pearson χ^2 sind jeweils neben dem Graphen angegeben.

Auch in der Betrachtung der immunologischen Schnittstellen ergaben sich sowohl für die Expression von CD74, MHC I und MHC II keine Unterschiede zwischen den Gruppen in allen untersuchten Kohorten (Abbildung 37). Jedoch zeigte sich eine vermehrte Infiltration mit CD8-positiven Zellen und eine erhöhte PD-L1-Expression auf Tumorzellen in der Gruppe HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung über alle untersuchten Kohorten hinweg (Abbildung 35 und 38).

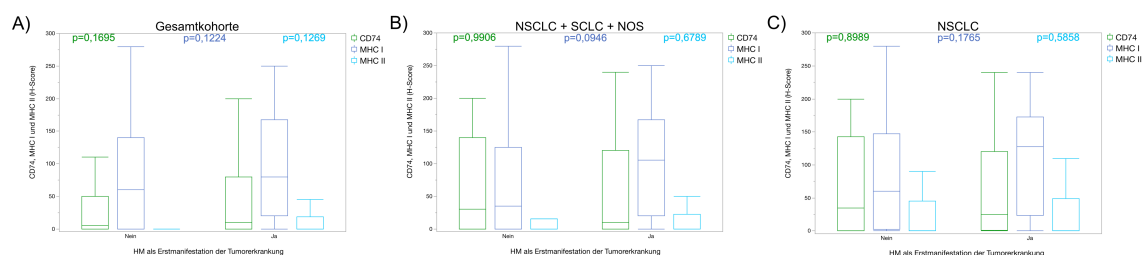


Abbildung 37: Vergleich bezüglich der Expression von CD74, MHC I und MHC II zwischen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein

(A, B, C) Box-Plots mit Darstellung der CD74-, MHC I- und MHC II-Expression in der Gesamtkohorte (A, n=184 für CD74, n=173 für MHC I, n=203 für MHC II), der kombinierte Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ (B, n=94 für CD74, n=86 für MHC I, n=100 für MHC II) und für die Subkohorte NSCLC (C, n=76 für CD74, n=70 für MHC I, n=82 für MHC II) zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung „Ja“ und „Nein“. P-Werte des nicht-parametrischen Wilcoxon-Tests sind innerhalb der Graphen aufgeführt (Grün für CD74, Blau für MHC I und Türkis für MHC II).

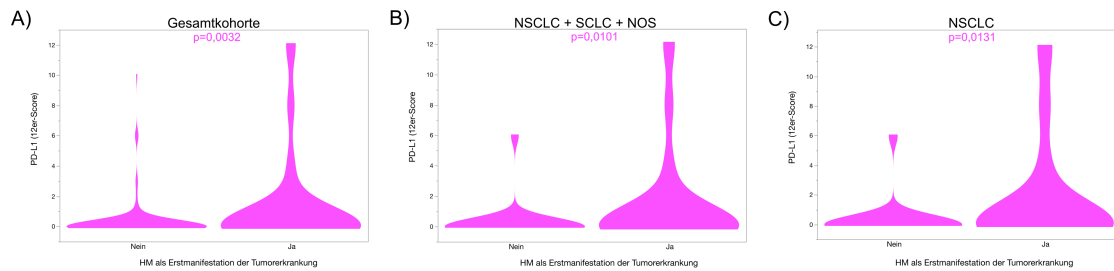


Abbildung 38: Vergleich bezüglich der Expression von PD-L1 zwischen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein

(A, B, C) Violinen-Plots mit Darstellung der PD-L1-Expression in der Gesamtkohorte (A, n=204), der kombinierte Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ (B, n=99) und für die Subkohorte NSCLC (C, n=82). P-Werte des nicht-parametrischen Wilcoxon-Tests sind innerhalb der Graphen aufgeführt.

3.6.2 Überlebensanalysen

Bei Betrachtung der Überlebenswahrscheinlichkeit zeigte sich in der Gesamtkohorte ein signifikant kürzeres Überleben in der Gruppe mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung (Abbildung 39). Dies konnte in den untersuchten Subkohorten nicht gezeigt werden (Abbildung 39). Wenn man das Überleben nach Primärdiagnose betrachtet, zeigt sich ein signifikanter Überlebensnachteil für die Gruppe mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung über alle Kohorten hinweg (Abbildung 40).

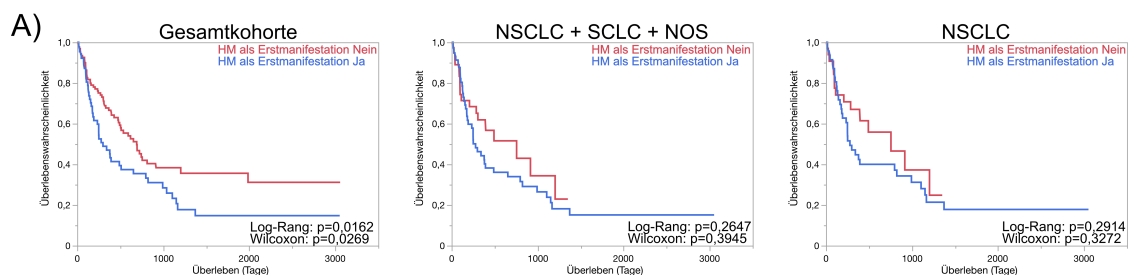


Abbildung 39: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit der Zuweisung HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein

(A) Kaplan-Meier-Kurven mit Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit für die Gesamtkohorte (n=225) als auch die kombinierte Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ (n=112) und der Subkohorte NSCLC (n=92) in Abhängigkeit der Gruppenaufteilung Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein. P-Werte des Wilcoxon- als auch Log-Rank-Tests sind innerhalb der Graphen angegeben.

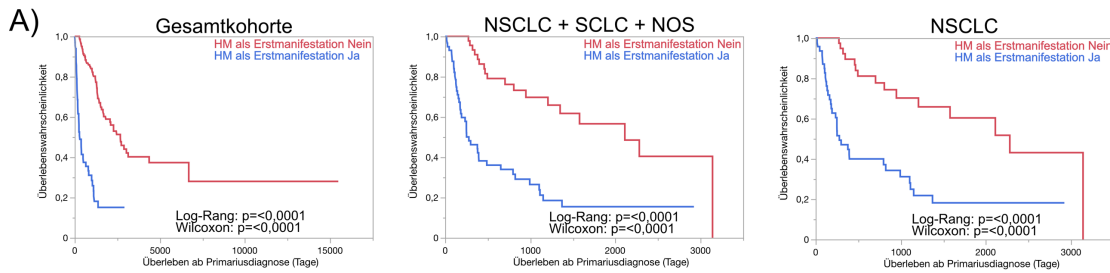


Abbildung 40: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit der Zuweisung HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein mit Überleben ab Primariusdiagnose

(A) Kaplan-Meier-Kurven mit Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit ab dem Zeitpunkt der Primariusdiagnose für die Gesamtkohorte (n=223) als auch die kombinierte Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ (n=111) und der Subkohorte NSCLC (n=91) in Abhängigkeit der Gruppenaufteilung Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein. P-Werte des Wilcoxon- als auch Log-Rank-Tests sind innerhalb der Graphen angegeben.

3.6.3 Weitere klinische und biologische Vergleiche

Weiterhin wurde überprüft, ob sich die beiden Patientengruppen auch in klinischen oder anderen biologischen Faktoren unterscheiden. So konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der erhaltenen Vortherapien nachgewiesen werden. Patienten mit bereits vorher bekannter Tumorerkrankung erhielten in den aller meisten Fällen bereits eine systemische Chemotherapie, unter deren Verlauf sich trotzdem eine Hirnmetastase ausbildete. Die Gruppe mit Erstmanifestation der Tumorerkrankung durch die Hirnmetastase hatte zu einem sehr großen Anteil bis zur Resektion der Hirnmetastase keine Chemotherapie erhalten (Abbildung 41). Einzelne Ausnahmen sind Patienten mit einem in der Vergangenheit vorliegendem Zweitmalignom. In der Gruppe mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung zeigte sich in der kombinierten Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ eine signifikant erhöhte Anzahl an infratentoriellen Metastasen (Abbildung 42). Für die anderen beiden untersuchten Kohorten konnte dies nicht gezeigt werden, wobei für die Subkohorte NSCLC ein eindeutiger Trend nachgewiesen werden konnte (Abbildung 42). Auch für den CD8-Infiltrationstyp (diffus, stromal/perivaskulär oder diffus und stromal/perivaskulär) ergaben sich keine signifikanten

Unterscheide zwischen den Gruppen in allen untersuchten Kohorten (Abbildung 43).

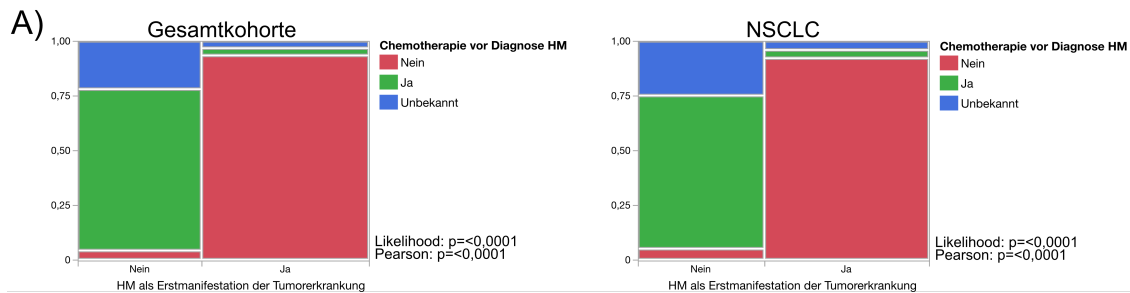


Abbildung 41: Vergleich bezüglich der Vortherapien zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein

(A) Kontingenztabelle zur Darstellung der vor Diagnose der Hirnmetastase erhaltenen Chemotherapie (Ja, Nein, Unbekannt) in der Gesamtkohorte (n=108) als auch der Subkohorte NSCLC (n=92) zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung „Ja“ und „Nein“. Die berücksichtigten Patienten der Gesamtkohorte als auch der kombinierten Kohorte NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ war für diese Analyse identisch, weshalb auf den Graph für die kombinierte Kohorte verzichtet wurde. P-Werte des Likelihood-Verhältnis χ^2 als auch des Pearson χ^2 sind jeweils neben dem Graphen angegeben.

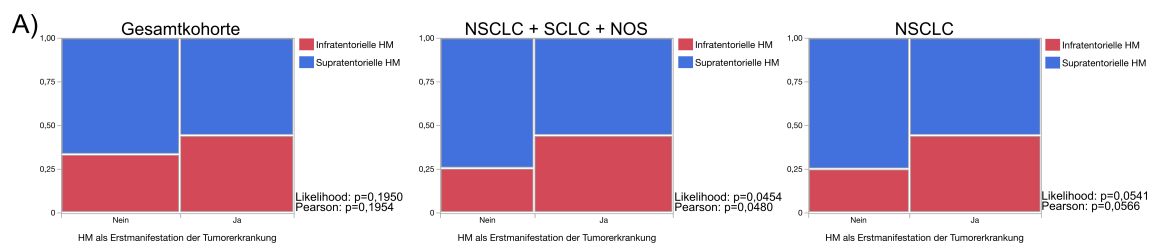


Abbildung 42: Vergleich bezüglich der Lokalisation der HM zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein

(A) Kontingenztabelle zur Darstellung der Lage der operierten Hirnmetastase (supratentoriell/infratentoriell) in der Gesamtkohorte (n=129) als auch der kombinierten Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ (n=106) und der Subkohorte NSCLC (n=92) zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung „Ja“ und „Nein“. P-Werte des Likelihood-Verhältnis χ^2 als auch des Pearson χ^2 sind jeweils neben dem Graphen angegeben.

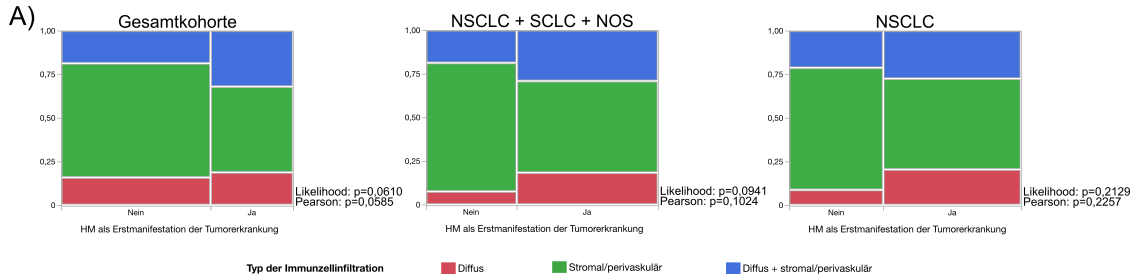


Abbildung 43: Vergleich bezüglich des Typs der Immunzellinfiltration zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein

(A) Kontingenztabelle zur Darstellung des CD8-Infiltrationstyp in der Gesamtkohorte ($n=194$) als auch der kombinierten Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ ($n=97$) und der Subkohorte NSCLC ($n=81$) zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung „Ja“ und „Nein“. P-Werte des Likelihood-Verhältnis χ^2 als auch des Pearson χ^2 sind jeweils neben dem Graphen angegeben.

3.6.3.1 Subtyp und EGFR-Mutationsstatus in der Subkohorte NSCLC

Die Information über den EGFR-Status lagen nur für die Subkohorte der NSCLC vor, weshalb die Analyse nur mit dieser Kohorte durchgeführt wurde. Bezüglich des NSCLC-Subtyps (Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom, NOS) gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 44 A). Es konnte auch kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Verhältnis der EGFR-Mutationen zwischen den Gruppen gefunden werden (Abbildung 44 B).

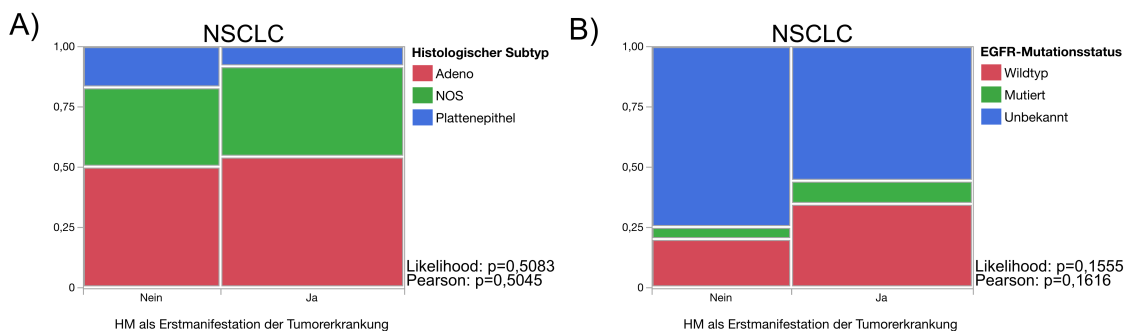


Abbildung 44: Vergleich bezüglich des histologischen Subtyps und des EGFR-Mutationsstatus zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der Subkohorte NSCLC

(A, B) Kontingenztabelle zur Darstellung des histologischen Subtyps (A, $n=84$) und des EGFR-Mutationsstatus (B, $n=92$) in der Subkohorte NSCLC zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung „Ja“ und „Nein“. P-Werte des Likelihood-Verhältnis χ^2 als auch des Pearson χ^2 sind jeweils neben dem Graphen angegeben.

4 Diskussion

Hirnmetastasen sind eine schwerwiegende Komplikation der häufigsten Tumorerkrankungen wie der Lungenkarzinome, der Mammakarzinome und der Kolonkarzinome. Die mediane Überlebenszeit nach Metastasierung in das ZNS beträgt trotz leitliniengerechter Therapie meist nur wenige Monate. Die Lebensqualität von Patienten mit Hirnmetastasen ist aufgrund neurologischer Symptome häufig stark eingeschränkt. Neue zielgerichtete Therapie zeigten bereits erfolgreich eine Wirkung in Hirnmetastasen. Immer interessanter werden dabei zielgerichtete Therapien, die wie Immuncheckpoint-Inhibitoren über das Tumormikromilieu wirken. Weiterhin wurde dem Tumormikromilieu, insbesondere den Stroma-produzierenden Zellen, in den Primären von Karzinomen bereits in unterschiedlichen Entitäten ein zumeist positiver Einfluss auf das Tumorwachstum als auch die Metastasierung zugewiesen. Die Entstehung von Hirnmetastasen ist ein komplexer und immer noch nicht ins Detail verstandener Prozess.

So entwickelt ein Großteil der Patienten mit Karzinomen trotz leitliniengerechter Therapie im weiteren Verlauf Hirnmetastasen. Bei anderen Patienten kommt es erst durch eine symptomatische Hirnmetastase zur Erstmanifestation der Tumorerkrankung.

Im Folgenden sollen, die unter Punkt 1.6 genannten Hypothesen diskutiert werden.

4.1 Beteiligung von perivaskulären Zellen an der Tumorstromabildung

Hypothese 1: „Perivaskuläre mesenchymale Zellen bilden das Stroma von Hirnmetastasen.“

Die zugrundeliegenden Mechanismen, die zur Entstehung und Etablierung von Hirnmetastasen führt, sind noch immer schlecht verstanden. Es wird angenommen, dass Tumorzellen über den Blutfluss Anschluss an das Gehirn

erhalten. Kienast et al konnten in einem Hirnmetastasen-Mausmodell mit zirkulierenden Tumorzellen und Echtzeitbildgebung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie über ein kraniales Fenster die notwendigen Schritte bis zur Ausbildung einer Hirnmetastase genauer untersuchen. So kommt es vorerst zu einem Flusstopp der Tumorzelle in den Gefäßverzweigungen von Kapillaren. Danach folgt die aktive Extravasation mit folgendem Wachstum zu einer Mikrometastase im perivaskulären Raum. Der entscheidende Schritt zur Ausbildung einer Makrometastase und dauerhaften Etablierung war die räumliche Verbindung von mehreren Mikrometastasen und folgenden vaskulären Veränderungen, die sich je nach untersuchter Entität voneinander unterschieden. Melanomzellen zeigten ein kooperatives Wachstum an bestehenden Gefäßen und Lungenkarzinomzellen induzierten hauptsächlich eine Angiogenese zur Bildung von neuen Blutgefäßen. Eine VEGF-Inhibition kurz nach Verabreichung der zirkulierenden Tumorzellen konnte in dem beschriebenen Mausmodell die Formation von Makrometastasen erfolgreich verhindern. Außerdem konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass ruhende Tumorzellen im Bereich der perivaskulären Nische des Gehirns für mehrere Wochen bis Monate überleben können.¹¹¹

Im Gegensatz dazu ist die Interaktion zwischen Tumorzellen und perivaskulären Zellen nach Extravasation in das Gehirnparenchym und die Entwicklung des Tumorstromas in Hirnmetastasen weiterhin wenig untersucht. Es ist bereits bekannt, dass Perizyten einen wichtigen Einfluss auf die Narbenbildung im ZNS nach Verletzungen haben.⁶⁴ Auch Téglási et al untersuchten bereits in einer wissenschaftlichen Arbeit von 2019 die Herkunft des Tumorstromas und Funktion von Perizyten in Hirnmetastasen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass perivaskuläre Perizyten an der Infiltrationszone von Hirnmetastasen sich von Gefäßen lösen und in den Tumor infiltrieren. Gleichzeitig konnte eine starke Korrelation zwischen PDGFRb-positiven Zellen und der Kollagen-Expression in den untersuchten Hirnmetastasen festgestellt werden.⁵² Auch die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten unterstützen diese These. So konnte eine signifikante Assoziation zwischen der stromalen PDGFRb und der Kollagen I-Expression in der Gesamtkohorte von Hirnmetastasen als auch den größten Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom nachgewiesen werden (Abbildung 10 und 11). Für vaskuläres PDGFRb zeigte sich diese Assoziation lediglich in der

Gesamtkohorte und nicht in den Subkohorten (Abbildung 10 D und 11 B). Im Gegensatz dazu zeigte sich keine Assoziation zwischen GFAP-positiven Zellen innerhalb der Hirnmetastasen und der Kollagen I-Expression (Abbildung 10 D und 11 D). Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund zu vermerken, dass in Hirnmetastasen von Mammakarzinomen bereits PDGFRb-positive Astrozyten nachgewiesen werden konnten und auch Astrozyten extrazelluläre Matrix produzieren können.^{70,73,74}

Interessanterweise zeigte auch die FAP-Expression eine mittlere bis starke Korrelation mit Kollagen I in der Gesamtkohorte als auch in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom (Abbildung 12). Ob es sich dabei um einen anderen Zelltyp oder eine Ko-Expression in demselben Zelltyp handelt, verbleibt vorerst unklar. Vandlandewijck et al konnte jedoch innerhalb der perivaskulären Räume der physiologischen Hirngefäße von Mäusen eine Fibroblasten-ähnliche Zellpopulation nachweisen, die sich von den sonst beschriebenen Perizyten molekular unterscheidet. Diese Zellen zeigten zusätzlich in Transkriptomanalysen hauptsächlich RNA-Transkripte aus dem Bereich der extrazellulären Matrix (insbesondere der Kollagene), Adhäsionsproteine und der Migration.⁵³ Somit scheinen diese Zellen theoretisch die biologische Funktion zu besitzen, an der Stromabildung von Hirnmetastasen mitzuwirken. Passend dazu beschreibt eine im Jahre 2021 veröffentlichte Arbeit von Dorrier et al, dass die Narbenbildung im ZNS hauptsächlich durch Fibroblasten und nicht wie in Vorpublikationen angenommen durch Perizyten bedingt ist. Dieser Unterschied wird durch eine zuvor nicht spezifische Unterscheidung der beiden Zelltypen erklärt, da sowohl Perizyten als auch Fibroblasten PDGFRb exprimieren können.¹¹²

Zuletzt ist zu beachten, dass - analog den zirkulierenden Tumorzellen – auch Stroma-produzierende Zellen bzw. mesenchymale Vorläuferzellen über den Blutstrom zirkulieren könnten und sich zusammen mit Tumorzellen als Metastase absetzen. Arina et al konnte jedoch in einem Mausmodell mit unterschiedlichen Karzinomzelllinien nachweisen, dass CAFs nicht von zirkulierenden Vorläuferzellen entspringen, sondern meist aus lokalen ruhenden Zellen, teilweise auch mit vaskulärem Ursprung, entstehen.¹¹³

Zusammenfassend erscheint es als sehr wahrscheinlich, dass das Tumorstroma von Hirnmetastasen durch perivaskuläre Zellen erstellt wird, die im Laufe des Wachstums der Hirnmetastase in das Tumormikromilieu des Tumors integriert werden. Diese Zellen ähneln sowohl Perizyten als auch Fibroblasten und exprimieren Marker für beide Zelltypen. Ob es sich dabei um denselben Zelltyp oder unterschiedliche Unterarten handelt, kann vorerst nicht eindeutig geklärt werden. Die vorliegenden Daten unterstreichen jedoch, dass das Tumorstroma eher nicht von glialen Zellen exprimiert wird. Die nachgewiesene FAP-Expression in den vorliegenden Hirnmetastasen weist zusätzlich darauf hin, dass es sich bereits um CAFs handelt und nicht mehr um physiologische Fibroblasten. Weiterhin ist davon auszugehen, dass es sich bei den beschriebenen Zellbeteiligungen um einen generellen Aspekt vom Tumorstroma in Hirnmetastasen handelt, da er sich unabhängig von der Entität der Hirnmetastase zeigte.

Limitierend ist in diesem Fall der fehlende Schritt in die Funktionalität und Biologie der Stromabildung in Hirnmetastasen. Es wurden lediglich Assoziationen untersucht, jedoch nicht die direkte biologische Folge, dass diese Zellen auch Bestandteile des Tumorstromas wie Kollagen produzieren. So werden in Zukunft weitere Versuche benötigt den genauen Ursprungs-Zelltyp der Stromabildung in Hirnmetastasen festzustellen. Dies erscheint insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass eine genaue Einordnung dieses Zelltyps die Möglichkeit für zielgerichtete Therapie ergibt. Durch Inhibition der Stroma-produzierenden Zellen könnte ggf. die Entwicklung zu Makrometastase verhindert werden. Dies scheint insbesondere in der Kombination mit Angiogenese-Inhibitoren interessant.

4.2 Das Tumormikromilieu in Hirnmetastasen unterschiedlicher Entitäten

Hypothese 2: „Die Komposition des Tumormikromilieus bzw. Tumorstromas von Hirnmetastasen ist abhängig von der Tumorentität und somit vom Primärtumor.“

Da viele unterschiedliche Entitäten in das ZNS metastasieren und ein bindegewebiges Stroma ausbilden, ergibt sich die Frage, ob sich die Zusammensetzung des Tumormikromilieus zwischen den Entitäten unterscheidet. Harter et al konnte in einer vorangehenden Arbeit das Tumormikromilieu bezüglich des Immunprofils von Hirnmetastasen genauer charakterisieren. So konnte die höchste Immunzellinfiltration durch CD3-positive und CD8-positive Zellen in Nierenzellkarzinomen, Melanomen und NSCLC im Vergleich zu beispielsweise Mammakarzinomen, Kolonkarzinomen oder SCLC festgestellt werden.⁹⁵ Weiterhin ist bekannt, dass Hirnmetastasen von NSCLC-Patienten eine niedrigere T-Zellinfiltration als die gepaarten Primärtumore derselben Patienten haben. Dies konnte sowohl auf immunhistochemischer als auch genetischer Ebene von Kudo et al nachgewiesen werden.⁹⁸ Auch Song et al konnte ähnliche Ergebnisse in Form eines immunsuppressiven Tumormikromilieus in den Hirnmetastasen von NSCLC-Patienten im Vergleich zum gepaarten Primärtumor basierend auf genetischen Untersuchungen erzielen.¹¹⁴ Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten zeigen die höchste Immunzellinfiltration in den Hirnmetastasen von NSCLC, Melanomen und Nierenzellkarzinomen (Abbildung 15 B). Dies zeigt sich passend zu den Daten von Harter et al, jedoch ist zu vermerken, dass ein Teil der in Harter et al untersuchten Patienten, sich nun in der von dieser Arbeit untersuchten Kohorte wiederfindet. Die bereits bestehende Kohorte wurde jedoch insbesondere um NSCLC und Mammakarzinom-Patienten erweitert und mittels semi-automatisierter Zellzählung analysiert.

Auch wenn das Tumormikromilieu von NSCLC-Hirnmetastasen im Vergleich zum Primärtumor in der Literatur als eher immunsuppressiv beschrieben wird, scheinen NSCLC-Hirnmetastasen im Vergleich zu Hirnmetastasen von anderen Entitäten wie Kolonkarzinomen, Mammakarzinomen oder SCLC eine erhöhte Immunzellinfiltration und gesteigerte Antigenpräsentation zu haben (Abbildung 15 und 16). Passend zu dem immunsuppressiven Tumormikromilieu von Hirnmetastasen zeigte mit 86,1% ein Großteil der Hirnmetastasen (n=193/222) eine negative Expression für PD-L1. Jedoch zeigte sich ein höherer Anteil an PD-L1-positiven Tumoren in NSCLC (20,2%) und Melanomen (21%) im Vergleich zu

den anderen Entitäten (Abbildung 16 D und Appendix Abbildung 6). Somit scheinen trotz insgesamt immunsuppressivem Tumormikromilieu auch einige Hirnmetastasen über eine bestehende und möglicherweise inhibierte Immunantwort zu verfügen. Dafür spricht, dass ICIs bereits erfolgreich in Hirnmetastasen von NSCLC als auch Melanomen eingesetzt werden konnten. Jedoch hatten ICIs in diesen Studien nicht in allen untersuchten Patienten eine Wirkung.^{41,43} Dies verdeutlicht die große Heterogenität bezüglich des Tumormikromilieus auch innerhalb der jeweiligen Entitäten, die sich auch in den vorliegenden Daten dieser Arbeit wiederfindet.

Auch bezüglich des sonstigen Tumormikromilieus zeigte sich eine große Heterogenität zwischen und innerhalb der unterschiedlichen Entitäten. Interessanterweise zeigten sich bezüglich der Gefäßdichte keine signifikanten Unterschiede bis auf die Nierenzellkarzinomen, die mit einer stark erhöhten Gefäßdichte im Vergleich zu allen anderen Entitäten hervorstechen (Abbildung 15 B und Tabelle 4). Auch Berghoff et al konnte vergleichbare Daten in einer großen Hirnmetastasen-Kohorte mit unterschiedlichen Entitäten erzielen. So zeigte sich auch dort die höchste Gefäßdichte in Nierenzellkarzinomen. Die anderen untersuchten Entitäten zeigten analog zu dieser Arbeit keine größeren Unterschiede untereinander.⁹⁹ Somit scheinen die unterschiedlichen Vaskularisierungsmethoden von Melanomen und NSCLC (kooperatives Wachstum und aktive Angiogenese), die Kienast et al in ihrer Studie nachweisen konnte, zumindest keinen Einfluss auf die Gefäßdichte von soliden, ausgebildeten Metastasen zu haben.¹¹¹ Ob die unterschiedlichen Vaskularisierungsmethoden möglicherweise zu einem Unterschied in der Gefäßdichte in den frühen Phasen der Hirnmetastasen-Bildung haben, kann mit der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden, da für diese Arbeit bereits etablierte Hirnmetastasen untersucht wurden.

Es konnte in allen Hirnmetastasen-Entitäten eine FAP-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 15 B). Es zeigten sich jedoch auch FAP-negative Tumore innerhalb der unterschiedlichen Entitäten. Die niedrigste mediane FAP-Expression konnte in Nierenzellkarzinomen als auch in SCLC nachgewiesen werden (Abbildung 15 B). Jedoch fanden sich nach Korrektur für multiples Testen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der FAP-Expression zwischen

den unterschiedlichen Entitäten (Tabelle 4). Im Gegensatz dazu zeigte sich in Nierenzellkarzinomen eine stark erhöhte mediane Expression von Kollagen I im Vergleich zu den anderen Entitäten (Abbildung 15 A). Insgesamt zeigte sich über die restlichen Entitäten eine ähnliche Kollagen I-Expression, obwohl im SCLC die niedrigste mediane Expression nachgewiesen werden konnte (Abbildung 15 A). Jedoch zeigte sich lediglich zwischen SCLC und den Nierenzellkarzinomen ein signifikanter Unterschied bezüglich der Kollagen I-Expression. Interessanterweise zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der Kollagen I-Expression und FAP-Expression mit CD8-positiven Zellen in der Gesamtkohorte als auch teilweise in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom (Abbildung 23 und 24). Dorrier et al untersuchte die fibröse Narbenbildung im ZNS im Rahmen eines Mausmodells im Rahmen der Immunzellinfiltration aufgrund einer von außen induzierten autoimmunen Enzephalomyelitis, die Ähnlichkeiten mit einer Immunzellinfiltration im Rahmen einer Multiplen Sklerose hat. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Narbenbildung im ZNS zumindest in diesem Versuchsaufbau eher eine Folge der Immunzellinfiltration ist.¹¹² So könnte auch in Hirnmetastasen gegebenenfalls eine gesteigerte Bildung von Tumorstroma durch infiltrierende Immunzellen ausgelöst werden, da das Tumorstroma sich vom biologischen Aufbau mit kollagenreichen und zellarmen Anteilen stark mit dem Narbengewebe in entzündlichen Erkrankungen des ZNS ähnelt.^{112,115} Gegen diese Vermutung spricht, dass sich eine erhöhte Infiltration von CD8-positiven Zellen im diffusen Infiltrationstyp im Vergleich zum stromalen/perivaskulären Infiltrationstyp in den untersuchten Hirnmetastasen nachweisen lies (Abbildung 19). Das sich beim stromalen/perivaskulären Infiltrationstyp weniger Immunzellen finden, könnte auch eine Folge von immunsuppressiven CAFs sein, die im Tumorstroma vorliegen. So konnte Yang et al in einem Mausmodell mit hepatischen Tumorzellen und unterschiedlichen CAF-Subtypen eine verminderte Infiltration von CD8-positiven Zellen in Tumoren mit FAP-positiven CAFs im Vergleich zu Tumoren mit FAP-negativen CAFs nachweisen.¹¹⁶ Jedoch ist dabei zu bedenken, dass sich in der vorliegenden Arbeit eine positive Korrelation zwischen der FAP-Expression und der Infiltration mit CD8-positiven Zellen zeigte (Abbildung 23 und 24).

Zusätzlich zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Gefäßdichte und der Infiltration von CD8-positiven Zellen in Hirnmetastasen (Abbildung 20). Es ist bekannt, dass Gefäße eine wichtige Rolle im Prozess der Infiltration von Immunzellen in Tumore einnehmen. Insbesondere abnormale Tumorgefäße können über immunsuppressive Folgen einen negativen Einfluss auf die Immunzellinfiltration haben.¹¹⁷ Jedoch erscheinen in Hirnmetastasen Gefäße ein wichtiger Faktor für die Immunzellinfiltration zu sein. Insbesondere erscheint die Rolle von Blutgefäßen im Gehirn umso wichtiger, wenn man bedenkt, dass keine klassischen, lymphatischen Gefäße im Gehirnparenchym zu finden sind.^{50,55} So konnte gezeigt werden, dass Lymphgefäße einen wichtigen Einfluss auf die Immunzellinfiltration in Tumore haben.¹¹⁸ Neue Untersuchungen geben jedoch Hinweise auf ein glymphatisches System innerhalb des ZNS. Dabei handelt es sich um ein Transportsystem, das innerhalb der perivaskulären Räume von Arterien vorliegt und hauptsächlich von Astrozyten beeinflusst wird um metabolischen Abfall aus dem Hirnparenchym zu entsorgen womit Ähnlichkeiten zu einem Lymphsystem bestehen.^{119,120} Interessanterweise vermutet Toh et al aufgrund einer durchgeführten MRT-Studie einen Zusammenhang zwischen einem vermehrten perifokalem Hirnödem bei Hirnmetastasen und einer glymphatischen Dysfunktion.¹²¹ Weitere Einflüsse des glymphatischen Systems auf die Entwicklung oder Immunzellinfiltration von Hirnmetastasen sind bislang jedoch nicht eindeutig beschrieben.

Bezüglich der Proliferationsrate der unterschiedlichen Hirnmetastasen zeigte sich die höchste Proliferationsrate in den SCLC als auch den Kolonkarzinomen. Im Gegensatz dazu zeigte sich die niedrigste Proliferationsrate in den Nierenzellkarzinomen (Abbildung 15 A und Tabelle 4). Auch Berghoff et al konnte die höchste Proliferationsrate von Hirnmetastasen in SCLC und Kolonkarzinomen und die niedrigste in Nierenzellkarzinomen feststellen.⁹⁹

Zusammenfassend zeigte sich - passend zur aufgestellten Hypothese - eine Heterogenität bezüglich des Tumormikromilieus zwischen den einzelnen Entitäten in Hirnmetastasen. Insbesondere zeigten sich Unterschiede bezüglich der Gefäßdichte als auch Proliferationsrate. Andererseits scheint es für einige Bestandteile des Tumormikromilieus wie CAFs keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Entitäten zu geben. Jedoch hatte in dieser Arbeit

Bestandteile des Tumorstromas große Auswirkungen auf die Immuzellinfiltration und ggf. sogar auf den Typ der Immuzellinfiltration. Weiterhin zeigen sich einige Hirnmetastasen mit einer erhöhten Infiltration von Immuzellen und möglicher Immunkomprimierung durch PD-L1.

4.3 Einfluss von Tumormikromilieu/Tumorstroma auf das Überleben von Patienten mit Hirnmetastasen

Hypothese 3: „Bestimmte Eigenschaften oder Bestandteile des Tumormikromilieus von Hirnmetastasen haben einen negativen Einfluss auf das Überleben von Patienten mit Hirnmetastasen. Insbesondere CAFs haben einen negativen Einfluss auf das Überleben von Hirnmetastasen-Patienten.“

Wie bereits beschrieben, ist bekannt, dass Bestandteile des Tumormikromilieus bzw. des Tumorstromas in den Primärtumoren von beispielsweise Lungenkarzinomen, Kolonkarzinomen oder Mammakarzinomen einen negativen Einfluss auf das Überleben von Patienten hat. Ob das Tumormikromilieu von Hirnmetastasen Einfluss auf das Überleben von Patienten hat, ist bislang nicht ausführlich untersucht. In einigen Studien konnten jedoch klinische oder molekularbiologische Faktoren, die einen wichtigen Einfluss auf das Überleben von Patienten hatte, erarbeitet werden. So haben insbesondere der Karnofsky-Index, die Anzahl an Hirnmetastasen als auch Mutationen mit möglichen klinischen Therapieoptionen einen wichtigen Einfluss auf das Überleben von Hirnmetastasen-Patienten.^{122,123}

In dieser Arbeit konnte für eine hohe Proliferationsrate ein negativer Einfluss auf das Gesamtüberleben nach Hirnmetastasen-Operation in der Gesamtkohorte als auch der Subkohorte der NSCLC gezeigt werden. In der Subkohorte der Mammakarzinome konnte kein Einfluss der Proliferationsrate auf das Überleben festgestellt werden (Abbildung 25). Auch Berghoff et al konnte diesen Effekt in einer großen Hirnmetastasen-Kohorte für die Gesamtkohorte als auch die Subkohorte der NSCLC zeigen.⁹⁹ Somit unterstreicht diese Arbeit, die mögliche Relevanz der Proliferationsrate in Hirnmetastasen für die Einschätzung der

Prognose der Patienten. Umso interessanter erscheint die Ki-67-Proliferationsrate in Bezug auf mögliche Therapieansätze. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibition von Ki-67 in vitro und in vivo sich negativ auf das Tumorwachstum von Nierenzellkarzinom-Zelllinien auswirken kann.¹²⁴

Die Expression von Kollagen I und FAP hatte keinen Einfluss auf das Überleben von Patienten in der Gesamtkohorte als auch den Subkohorten der NSCLC und Mammakarzinome (Abbildung 25). Möglicherweise spielt das Tumorstroma und CAFs nach Etablierung der soliden Hirnmetastase eine untergeordnete Rolle im Tumormikromilieu. Zusätzlich spricht dafür, dass es auch Tumorentitäten gibt, die trotz Ausbildung geringer Mengen Tumorstroma im ZNS zu einer soliden Metastase führen können (wie Melanome und SCLC). Jedoch zeigte eine erhöhte FAP-Expression in Kolonkarzinomen ein verbessertes Überleben (Abbildung 26). Zwar wurde lange davon ausgegangen, dass Tumorstroma und stromale Zellen meist supportiv auf den Tumorprogress einwirken. Jedoch legen neuere Daten nahe, dass das Tumorstroma auch einen negativen Einfluss auf das Tumorwachstum in einigen Entitäten haben kann.^{86,125} Auch isolierte CAFs aus Hirnmetastasen hatten in vivo einen negativen Einfluss auf das Tumorwachstum einer primären SCLC-Zelllinie, die aus einer Hirnmetastase isoliert wurde.⁹³ Umso wichtiger erscheint dafür die Einordnung der Subtypen der unterschiedlichen Stromazellen, da bekannt ist, dass meist bestimmte Subtypen für die supportive Wirkung auf den Tumor verantwortlich sind.^{85,116} Dabei ist zu erwähnen, dass es sich lediglich um 20 Patienten mit Hirnmetastasen von Kolonkarzinomen handelt. Außerdem wurden lediglich Einzelfärbungen für FAP bzw. PDGFRb als Marker für CAFs durchgeführt, was keine weiteren Aussagen über mögliche Subtypen zulässt, weshalb weitere Untersuchungen zur genaueren Einordnung und den Effekten auf das Tumorwachstum von möglichen CAF-Subtypen in Hirnmetastasen nötig sind.

Auch für vaskuläres und stromales PDGFRb zeigten sich in der Gesamtkohorte und den Subkohorten kein eindeutiger Einfluss auf das Überleben der Patienten (Abbildung 27). Jedoch zeigte sich für Patienten mit Expression von vaskulärem PDGFRb in den Hirnmetastasen von NSCLC-Patienten ein schlechteres Überleben im Vergleich zu Patienten ohne Expression von vaskulärem PDGFRb (Abbildung 27 A, Mitte). Es ist bekannt, dass PDGFRb einen wichtigen Einfluss

auf die Gefäßstabilisierung hat.¹²⁶ Wie bereits erwähnt führen destabilisierte Gefäße – wie sie auch im Tumor vorliegen - zu einer geringeren Immunzellinfiltration im Vergleich zu stabilisierten, gesunden Gefäßen.¹¹⁷ Jedoch zeigten sich in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Immunzellinfiltration zwischen Hirnmetastasen mit Expression von vaskulärem PDGFRb im Vergleich zu Hirnmetastasen ohne Expression von vaskulärem PDGFRb (Appendix Abbildung 1). Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass durch Perizyten stabilisierte Gefäße zu einem verstärktem Tumorwachstum führen könnten.¹²⁷ Weiterhin konnte Kim et al zeigen, dass eine Normalisierung von Tumorgefäßen zu einer verbesserten Penetration von Chemotherapeutika in die Tumore von einem Mausmodell mit Pankreaskarzinom- und Melanom-Zelllinien führte.¹²⁸ Somit können Perizyten sowohl negativen als auch positiven Einfluss auf das Tumorwachstum haben. Eine genauere Analyse der möglichen Subtypen von Perizyten und biologischen Funktionen in Hirnmetastasen ist zur genaueren Charakterisierung notwendig.

Im Weiteren wurde der Einfluss des immunologischen Profils der Hirnmetastasen auf das Überleben der Patienten überprüft. Interessanterweise zeigte die PD-L1-Expression keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten (Abbildung 28). Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass sich für Patienten mit metastatischen Melanomen ein Überlebensvorteil aufgrund einer erhöhten PD-L1-Expression im Tumor zeigte.¹²⁹ In der kleinen Subkohorte von Melanom-Hirnmetastasen in dieser Studie zeigte sich dieser Effekt nicht (Appendix Abbildung 3).

Zusätzlich ergab sich sowohl für den Typ der Immunzellinfiltration, die Anzahl an infiltrierenden CD8-positiven Zellen und der CD74-Expression kein Einfluss auf das Überleben der Patienten (Abbildung 28 und 29). Das infiltrierende Immunzellen kein Einfluss auf das Überleben von Hirnmetastasen-Patienten haben, konnte bereits von Harter et al gezeigt werden.⁹⁵ Das CD74 ein wichtiger Faktor für die Antigenpräsentation in Tumoren ist und in Hirnmetastasen sich positiv auf das Überleben von Patienten auswirken kann, konnte ebenso von Zeiner et al nachgewiesen werden.¹⁰⁷

Dabei ist zu bemerken, dass ein großer Teil der in dieser Arbeit verwendeten Tumorproben in der Arbeit von Harter et al als auch Zeiner et al verwendet wurden. Jedoch wurden nun in dieser Arbeit insbesondere die Anzahl der Fälle in den Subkohorten Mammakarzinom und NSCLC erhöht. Außerdem konnten für diese Arbeit weniger Patienten mit malignem Melanom untersucht werden. Eine Erklärung für den fehlenden Überlebensvorteil von CD74 in der nun genutzten Hirnmetastasen-Kohorte könnte die nun unterschiedliche Zusammensetzung von Patienten sein. In der von Zeiner et al verwendeten Kohorte war der Anteil von Melanom-Patienten wesentlich höher (96 von 236 im Vergleich zu dieser Arbeit 19 von 244).

Zusammenfassend haben die meisten untersuchten Faktoren des Tumormikromilieus bzw. Tumorstroma in dieser Kohorte keinen Einfluss auf das Überleben. Insbesondere die Anzahl von CAFs als auch die Fläche von Kollagen I-positiven Stroma haben in Hirnmetastasen keinen Einfluss auf das Überleben. Lediglich in der Subkohorte der Kolonkarzinome hatte eine erhöhte FAP-Expression einen positiven Einfluss auf das Überleben ab der Hirnmetastasen-OP. Auch die vaskuläre PDGFRb-Expression scheint einen Einfluss auf das Überleben in der Subkohorte der NSCLC zu haben. Der diesem Effekt zugrundeliegende Mechanismus verbleibt vorerst unklar, wobei eine verminderte Immunzellinfiltration am ehesten nicht die Ursache ist.

4.4 Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung

Hypothese 4: „Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung zeigen im Vergleich zu Patienten mit Hirnmetastase im Verlauf der bekannten Tumorerkrankung eine signifikant unterschiedliche Komposition des Tumormikromilieus.“

Um die letzte Hypothese zu überprüfen, wurden die bereits durchgeführten IHC-Färbungen genutzt, um das Tumormikromilieu der beiden beschriebenen Gruppen genauer zu charakterisieren. Um genauer zu kontrollieren, ob es sich bei möglichen Veränderungen zwischen den Gruppen um Entitäten spezifische

Eigenschaften handelt, wurden die Untersuchungen sowohl in der Gesamtkohorte als auch in der kombinierten Subkohorte bestehend aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ und der alleinigen Subkohorte NSCLC durchgeführt. Es wurde sich für die kombinierte Subkohorte entschieden, da Patienten, bei denen die Hirnmetastase zur Erstmanifestation der Tumorerkrankung führt, diese sich überproportional häufig in den Subkohorten NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ zeigten (Abbildung 30 und Tabellen 5 bis 7). In den Untersuchungen der Gesamtkohorte sind im Gegensatz dazu auch Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung eingeschlossen, die sich auch in seltenen Fällen in den Subkohorten Mammakarzinom, Kolonkarzinom oder Melanomen zeigten. Die prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Entitäten von Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung ist in der vorliegenden Kohorte vergleichbar mit Daten aus anderen Studien.^{104,105}

4.4.1 Biologische Unterschiede zwischen der Gruppe Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung und im Rahmen der bekannten Tumorerkrankung

Es zeigte sich zwischen den beiden untersuchten Gruppen über alle untersuchten Kohorten hinweg kein Unterschied bezüglich der Proliferationsrate, der Kollagen I-Expression, FAP-Expression und der Gefäßdichte (Abbildung 34 und 35). Es ist bekannt, dass die Proliferationsrate einen Einfluss auf die Metastasierung von Tumoren hat und Tumore mit höherer Proliferationsrate mehr zur Metastasierung neigen als Tumore mit niedriger Proliferationsrate.¹²⁴ Somit könnte man davon ausgehen, dass Tumore in der Gruppe mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung eine insgesamt höhere Proliferationsrate haben, da es zu einer Hirnmetastase kommt, bevor der Patient durch extrakranielle Metastasen klinisch auffällt. Umso interessanter wäre für diese Fragestellung jedoch die Proliferationsraten der Primärtumore, die für diese Arbeit leider nicht vorlagen.

Bezüglich des Immunphänotyps der Hirnmetastasen in den beiden Gruppen zeigte sich eine signifikant erhöhte Infiltration mit CD8-positiven Zellen in der

Gruppe mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung. Dies zeigte sich über alle untersuchten Kohorten hinweg (Abbildung 35). Dabei ist zu erwähnen, dass die Anzahl der Chemotherapie-Zyklen eine signifikant negative Korrelation mit CD8-positiven Zellen zeigte (Appendix Abbildung 4). Wenn man nun beachtet, dass die allermeisten Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung keine Vortherapien erhalten hatten (Abbildung 41), könnte möglicherweise die Chemotherapie einen langfristigen Einfluss auf den Immunphänotyp von Hirnmetastasen und insbesondere die Immunzellinfiltration in Hirnmetastasen haben. Im Gegensatz dazu konnten einige Studien in NSCLC und Cervixkarzinomen einen positiven Einfluss einer kurz vor Operation durchgeführte neoadjuvanten Chemotherapie auf die Infiltration von Immunzellen nachweisen.^{130,131} Jedoch erhielten die Patienten in dieser Studie teilweise über einen langen Zeitraum mehrere Chemotherapie-Zyklen. Jedoch verbleibt es unklar zu welchem Zeitpunkt der Chemotherapie-Zyklen die Hirnmetastase bereits in den Patienten nachzuweisen war oder ob es ggf. sogar erst nach den Zyklen zu einer Metastasierung in das ZNS kam. Weitere Untersuchungen zur Immunzellinfiltration in Hirnmetastasen in Abhängigkeit einer langfristigen Chemotherapie werden benötigt

Interessanterweise zeigte sich auch eine erhöhte PD-L1-Expression in der Gruppe von Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation über alle untersuchten Kohorten hinweg (Abbildung 38). Weitere immunologische Faktoren wie die CD74-Expression, MHC I- und MHC II-Expression ergaben keine statistischen Unterschiede bezüglich der untersuchten Gruppen (Abbildung 37). Somit scheinen Patienten mit Hirnmetastasen als Erstmanifestation der Tumorerkrankung möglicherweise eine effektive Immunreaktion gegen den Tumor zu haben, die jedoch durch die Tumorzellen über den PD-L1-Mechanismus blockiert wird. Dabei ist zu beachten, dass für eine Immuncheckpoint-Therapie zumeist die PD-L1-Expression des Primarius bestimmt wird, die sich jedoch zwischen Metastasen und Primärtumor stark unterscheiden kann.^{48,132} Somit kann es dazu kommen, dass bei unzureichender Expression von PD-L1 im Primarius auf eine Immuncheckpoint-Therapie verzichtet wird, obwohl diese ggf. eine Wirkung in der Hirnmetastasen und ggf. auch auf extrakranielle Metastasen haben könnte. Ähnliche Zusammenhänge

konnten auch für Treibermutationen zwischen Primärtumor und Hirnmetastasen gezeigt werden. So kann man in Hirnmetastasen Treibermutationen finden, die im Primärtumor nicht nachzuweisen waren.³⁸

Interessanterweise zeigte sich für Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung ein schlechteres Überleben ab Hirnmetastasen-Operation in der Gesamtkohorte. In der kombinierten Subkohorte und in NSCLC zeigte sich dieser Effekt nicht (Abbildung 39). Dies ist überraschend, wenn man bedenkt, dass Füreder et al in einer vergleichbaren Kohorte mit einer univariaten Analyse einen signifikante Überlebensvorteil für Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung fand (Medianes Überleben 8 Monate gegen 6 Monate). Jedoch zeigte sich in der multivariaten Analyse für Patienten mit bekannter Tumorerkrankung nach zusätzlichem Einbezug des extrakraniellen Tumorstatus keine signifikante Assoziation mit der Überlebensprognose.¹⁰⁴ Für die vorliegende Arbeit lagen zumeist keine Informationen bezüglich weiterer extrakranieller Metastasen vor, weshalb der Einfluss auf das Überleben dieser Gruppen nicht ausreichend getestet werden konnte. Es ist jedoch bekannt, dass die Anzahl von Metastasen ein wichtiger prognostischer Faktor für das Überleben von Patienten mit Tumorerkrankungen ist.¹³³ Zusätzlich zeigte sich über alle untersuchten Kohorten hinweg ein eindrücklicher Überlebensnachteil für Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation, wenn man das Überleben ab Diagnose des Primarius betrachtet (Abbildung 40). Somit überleben diese Patienten insgesamt wesentlich kürzer ab dem Zeitpunkt, an dem die Tumorerkrankung bekannt ist. Somit ist es umso wichtiger für diese Patienten eine effektive Therapie einzusetzen.

Ein wichtiger Faktor, der möglicherweise das Tumormikromilieu beeinflussen kann, sind erhaltene Therapien vor Entwicklung der Hirnmetastase. Wie erwartet hatten die allermeisten der Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung keine Vortherapien erhalten (Abbildung 41). Einige wenige Ausnahmen in der vorliegenden Kohorte sind Patienten, die in ihrer Vorgeschichte bereits ein anderes Malignom entwickelten. Im Gegensatz dazu waren ein Großteil der Patienten mit bekannter Tumorerkrankung bereits

vorthera­piert und trotz­dem hat sich unter der ein­ge­setz­ten The­ra­pie eine Hirn­me­tas­ta­se aus­ge­bil­det.

4.4.2 Klinische Unterschiede zwischen der Gruppe Hirnmetastasen als Erstmanifestation der Tumorerkrankung und bei bekannter Tumorerkrankung

Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht bezüglich des Typs der Immunzellinfiltration (Abbildung 43). Auch in der Kohorte der NSCLC zeigte sich kein Unterschied bezüglich des histologischen Subtyps als auch dem EGFR-Mutationsstatus (Abbildung 44). Hierbei ist anzumerken, dass der EGFR-Mutationsstatus der vorliegenden Kohorte zum aller größten Teil im Primärtumor bestimmt wurde und nicht in der Hirnmetastase selbst, was wie bereits beschrieben nur eine begrenzte Aussagekraft bezüglich des Mutationsstatus in der Hirnmetastase hat. Giordana et al konnte in einer der wenigen Studien, die bereits vor einigen Jahren die Gruppen von Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung und Hirnmetastase unter bereits bekannter Tumorerkrankung immunhistochemisch auf biologische Unterschiede untersuchte, keine größeren Unterschiede bezüglich der p53- und k-ras-Expression feststellen.¹³⁴ Interessanterweise zeigten sich in der Gruppe mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung in der kombinierten Subkohorte bestehend aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“ signifikant mehr infratentorielle Hirnmetastasen (Abbildung 42). In der von Füreder et al untersuchten Kohorte zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Lokalisation der Hirnmetastasen.¹⁰⁴ Sowohl in der kombinierten Subkohorte als auch den einzelnen NSCLC-Subkohorte zeigten sich in der Gruppe mit Hirnmetastase als Erstmanifestation signifikant kleinere Hirnmetastasen als in der Vergleichsgruppe (Abbildung 32 A und 33 B). Somit könnte die erhöhte CD8-Zellzahl in der Gruppe von Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung auch im Rahmen der kleineren Metastasen bewertet werden. Denn Harter et al konnte bereits zeigen, dass die erhöhte Infiltration von CD8-positiven Zellen und erhöhte PD-L1-Expression mit kleineren Hirnmetastasen positiv korrelieren.⁹⁵ Ein identisches Ergebnis zeigte sich auch in der

vorliegenden Arbeit (Abbildung 21 C und 22). Dabei ist zu erwähnen, dass beispielsweise kleinere Melanom-Hirnmetastasen ein besseres Ansprechen auf eine ICI-Therapie haben als größere Hirnmetastasen.¹³⁵

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Patienten mit Hirnmetastasen als Erstmanifestation der Tumorerkrankung sich bezüglich der Infiltration von zytotoxischen T-Zellen als auch der PD-L1-Expression unterscheiden. Möglicherweise kommt es in dieser Gruppe von Patienten zu einer erfolgreichen Inhibition der Immunantwort des Tumors, die ggf. mit einer ICI-Therapie erfolgreich unterbunden werden könnte. Interessanterweise konnte Zhou et al in einer kleinen Kohorte mit gepaarten Primärtumoren und Hirnmetastasen von Lungenkarzinomen Unterschiede bezüglich der CD8-Infiltration und PD-L1-Expression zwischen den Paaren in Abhängigkeit des zeitlichen Auftretens voneinander finden (Diagnose der beiden Lokalisation innerhalb eines Monats und Diagnose der beiden Lokalisation über einen Monat hinaus) gegen .¹³⁶

5 Limitationen

Die durchgeführten Untersuchungen in dieser Arbeit beruhen hauptsächlich auf immunhistochemischen Daten. Damit begrenzen sich mögliche Schlüsse nur auf die Proteinexpression und nicht auf weitere Ebenen wie die Genetik, mRNA-Expression oder Epigenetik des Tumormikromilieus von Hirnmetastasen oder der Tumorzellen. Es wurden auch keine funktionelle biologische Untersuchung bezüglich der Stroma-produzierenden Zellen durchgeführt. So fehlt beispielsweise der Schritt in in vivo- und in vitro-Experimente, um zu überprüfen, welche Möglichkeiten der Stromaproduktion die untersuchten Zellen besitzen und welchen Anteil sie zum Tumorstroma letztendlich wirklich beitragen. Weiterhin wurden keine tiefergehenden Zuordnungen der untersuchten Stromazellen bezüglich des Subtyps auf genetischer Ebene oder via Doppelfärbungen durchgeführt. Somit bleibt die genaue Funktion möglicher Subtypen in Hirnmetastasen unklar.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass in dieser Arbeit lediglich resezierte Hirnmetastasen untersucht wurden. Damit ergeben sich insbesondere für die

durchgeführten Überlebensanalysen Limitation bezüglich der Übertragung auf Hirnmetastasen-Patienten ohne durchgeführte Resektion, da es auch einen großen Teil an Patienten mit Hirnmetastasen gibt, die beispielsweise eine Strahlentherapie oder systemische Therapie erhalten und nicht operiert werden.

Aufgrund der kleinen Fallzahlen für die meisten Subkohorten wurden die Überlebensanalysen lediglich in der Gesamtkohorte und den größten Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom durchgeführt. Mögliche Einflüsse des Tumormikromilieus auf andere Entitäten konnten aufgrund der kleinen Fallzahlen nicht effektiv untersucht werden. Weiterhin ist zu beachten, dass die Überlebensanalysen in der Gesamtkohorte sich aufgrund der biologisch als auch klinisch stark unterscheidenden Entitäten beeinflusst werden könnten. Aus diesem Grund wurden die Analysen auch in den größten Subkohorten bzw. kombinierten Subkohorten erneut durchgeführt.

Die für diese Arbeit untersuchten Hirnmetastasen sind bereits solide makroskopische Hirnmetastasen. Umso wichtiger für die Entstehung des Tumorstromas erscheint die Anfangsphase der zerebralen Metastasierung mit Ausbildung von Mikrometastasen. Diesen Teil der Entwicklung der Hirnmetastase konnte mit dieser Arbeit nicht abgedeckt werden.

Eine weitere Limitation ist der lange Beobachtungszeitraum der Patienten. So liegen in dieser Studie Gewebeproben von 2003 bis 2018 vor. In dieser Zeit kam es beispielsweise für Patienten mit Lungenkarzinom zu eindrucklichen Veränderungen in der Therapie mit Etablierung von TKI und dann in der nahen Vergangenheit auch der ICI-Therapie. Möglicherweise könnten diese Unterschiede in der Therapieform sowohl das Tumormikromilieu der Hirnmetastasen als auch die Überlebensanalysen beeinflussen. Jedoch zeigten sich in der Gesamtkohorte als auch der Subkohorte NSCLC keine Unterschiede bezüglich des Überlebens nach medianer Aufteilung der Patienten in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Hirnmetastasen-Operation (Appendix Abbildung 5).

In der Gruppe mit Hirnmetastasen als Erstmanifestation der Tumorerkrankung handelte es sich um Patienten mit symptomatische Hirnmetastasen, das heißt Patienten wurden mit neurologischen Symptomen vorstellig. In der

Vergleichsgruppe fielen die Hirnmetastasen möglicherweise auch während Staging-Untersuchungen auf, weshalb es sich teilweise um asymptomatische Hirnmetastasen handelte (genauere Daten lagen diesbezüglich für die meisten Patienten dieser Gruppe jedoch nicht vor). Es ist bekannt, dass Patienten mit symptomatischen Hirnmetastasen kürzer überleben als Patienten mit asymptomatischen Hirnmetastasen.¹⁰³ Somit könnte dies ebenso einen Einfluss auf die Überlebensanalysen haben. Weiterhin ist dabei zu beachten, dass diese Patienten jedoch eine Resektion der Hirnmetastase erhielten.

TMAAs könnten aufgrund des „Sampling-Bias“ ggf. veränderte Ergebnisse zum Vergleich zum ganzen Gewebeschnitt eines Tumors führen. So konnte einerseits in einer Studie gezeigt werden, dass die Ki-67-Auswertung in ganzen Gewebeschnitten besser mit klinischen Parameter korreliert als eine Ki-67-Auswertung auf TMAAs.¹³⁷ Harter et al konnte im Gegensatz dazu eine signifikant hohe Korrelation zwischen der Auswertung von TILs auf TMA-Stanzen von Hirnmetastasen und der Auswertung auf ganzen Gewebeschnitten von Hirnmetastasen zeigen. Weiterhin zeigte sich eine signifikant hohe Korrelation zwischen repetitiven Stanzen aus demselben Tumor bezüglich der TILs in Hirnmetastasen.⁹⁵ Dabei ist zu erwähnen, dass für die Anfertigung der ausgewerteten TMAAs lediglich Stanzen aus dem vitalen Tumorkern entnommen wurden. Somit sind der Tumorrand als auch mögliche Infiltrationszonen der Hirnmetastase in das Hirnparenchym durch die durchgeführten Untersuchungen nicht abgedeckt.

Weiterhin ist zu bedenken, dass im Rahmen der Immunzellanalyse lediglich zytotoxische T-Zellen untersucht wurden. Die Rolle von weiteren wichtigen Immunzellen im Tumormikromilieu von Hirnmetastasen wie Mikroglia, T-Helferzellen, B-Zellen oder natürliche Killerzellen wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Dabei könnten diese Zellen ebenso einen wichtigen Einfluss auf Hirnmetastasen haben.

6 Zusammenfassendes Fazit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es einerseits das Tumormikromilieu/Tumorstroma in Hirnmetastasen genauer zu charakterisieren und andererseits das Tumormikromilieu/Tumorstroma der wichtigen Gruppe der Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung genauer einzuordnen.

Hirnmetastasen zeigen ein eigenes bindegewebiges Tumorstroma, das sich stark von der physiologischen Mikroumgebung des Gehirns unterscheidet. Die vorliegenden Daten geben weitere Hinweise darauf, dass das Tumorstroma in Hirnmetastasen am ehesten von mesenchymalen perivaskulären Zellen des Gehirns produziert bzw. beeinflusst wird.

Weiterhin zeigte sich eine erwartete Heterogenität zwischen den untersuchten Entitäten als auch innerhalb der Entitäten bezüglich der Zusammensetzung des Tumormikromilieus. Insbesondere zeigte sich eine erhöhte Gefäßdichte in Nierenzellkarzinomen und eine erhöhte Proliferationsrate in Kolonkarzinomen und SCLC. Nierenzellkarzinome, NSCLC und Melanome zeigten die höchste Infiltration von zytotoxischen T-Zellen. Die Subkohorten NSCLC und Melanom hatten den höchsten Anteil an PD-L1-positiven Hirnmetastasen von allen anderen Entitäten.

Interessanterweise zeigte sich für Patienten mit Kolonkarzinom ein verbessertes Überleben bei erhöhter FAP-Expression. Außerdem zeigte sich für NSCLC-Patienten ein schlechteres Überleben, wenn die Hirnmetastase eine vaskuläre PDGFRb-Expression zeigte. Für die Gesamtkohorte als auch die Subkohorte NSCLC zeigte sich ein starker Einfluss der Proliferationsrate auf das Überleben. Das Tumormikromilieu bzw. Tumorstroma in Hirnmetastasen hatte sonst keine weiteren eindeutigen Einflüsse auf das Überleben der Patienten. Insbesondere zeigte sich kein Einfluss von CD8-infiltrierenden Zellen, der PD-L1-Expression oder der Expression von FAP.

Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankungen zeigten ein anderes immunologisches Profil mit erhöhter Infiltration von zytotoxischen T-Zellen als auch erhöhter PD-L1-Expression im Vergleich zu

Patienten mit Entwicklung der Hirnmetastase während der bekannten Tumorerkrankung. Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Proliferationsrate, der Zusammensetzung des Tumorstromas oder der Expression von MHC I und MHC II. Somit könnte für Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung eine Therapie mit ICIs sinnvoll sein.

7 Ausblick

Das Tumormikromilieu in Hirnmetastasen ist ein interessantes Ziel für zielgerichtete Therapien. So scheint zwar das Tumorstroma in soliden Hirnmetastasen kein Einfluss auf das Überleben von Patienten zu haben, jedoch konnte in allen Entitäten CAFs und andere Bestandteile eines bindegewebigen Tumorstromas. Möglicherweise könnten zielgerichtete Therapien des Tumorstromas die Entwicklung von soliden Hirnmetastasen verhindern und somit sowohl das Gesamtüberleben als auch die klinischen Symptome von Patienten mit Hirnmetastasen reduzieren. Weitere Forschung mit Fokus auf das Tumorstroma von Hirnmetastasen könnte möglicherweise zu einer Prävention von Hirnmetastasen durch zielgerichtete Therapien erreichen. Weiterhin bleibt die Frage offen, ob zirkulierende Tumorzellen auch ohne Unterstützung von ortsständigen Zellen eine solide Hirnmetastase mit Tumorstroma ausbilden könnten. So wäre insbesondere die Interaktion zwischen den Stroma-produzierenden Zellen und Tumorzellen während der Ausbildung einer Mikrometastase und im Verlauf Entwicklung zu einer Makrometastase interessant.

Weiterhin werden mehr Studien zur genaueren Charakterisierung des Tumormikromilieus von Hirnmetastasen benötigt. Dabei sollten insbesondere auch weitere Immunzellen wie T-Helferzellen oder B-Zellen beachtet werden, um auch andere Wege der Immunzellantwort neben zytotoxischen T-Zellen in Hirnmetastasen zu verstehen. Auch der Schritt zu Untersuchungen in früheren Stadien der Hirnmetastasen-Entwicklung erscheint zum besseren Verständnis der Entwicklung des Tumors zwingend.

Einen ausführlichen histologischen Vergleich zwischen Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung und Patienten mit bekannter Tumorerkrankung bei Manifestation der Hirnmetastase gab es bis dato

in der Literatur nicht. Die meisten Studien über Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung untersuchten lediglich diese Gruppe für sich selbst und konzentrierten sich weitgehend auf klinische Aspekte dieser Gruppe.^{104,138}

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Relevanz der genaueren Untersuchung von Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung aufgrund des unterschiedlichen Tumormikromilieus und der fatalen Lebenserwartung ab Diagnose der Tumorerkrankung im Vergleich zur Vergleichsgruppe mit bekannter Tumorerkrankung vor Diagnose der Hirnmetastase. So wäre es insbesondere interessant die biologischen Unterschiede der Primärtumore der beiden erörterten Gruppen genauer zu diskriminieren, um auch den biologischen Prozess der zu einer Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung führt, besser zu verstehen. Umso wichtiger erscheinen weitere Studien in der Gruppe von Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung, wenn man bedenkt, dass in der Vergangenheit asymptomatische Hirnmetastasen häufig und symptomatische Hirnmetastasen fast immer ein Ausschlusskriterium für klinische Therapiestudien waren.^{100,101}

Zu beachten ist, dass in der vorliegenden Kohorte lediglich Patienten untersucht wurden, die eine Resektion der Hirnmetastase erhalten hatten. Häufig erhalten Patienten mit Hirnmetastasen eine Bestrahlung, insbesondere Patienten mit multiplen Hirnmetastasen, weshalb Gewebe von einem Teil des Gesamtkollektivs nicht vorliegt. Zur Validierung der vorliegenden Unterschiede zwischen den beiden Gruppen könnten stereotaktische Biopsien von Patienten mit Hirnmetastasen, die lediglich eine Strahlentherapie oder systemische Therapie erhielten, herangezogen werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass für die Entitäten mit dem prozentual größten Anteil an Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung (NSCLC und SCLC) bislang keine flächendeckenden, etablierten Screening-Untersuchungen für Patienten vorliegen im Vergleich zu beispielsweise Mammakarzinomen (Mammographie), Kolonkarzinomen (Koloskopie) und Melanomen (Hautkrebsscreening). Jedoch zeigten sich low-

dose Computertomographie-Untersuchungen des Thorax als mögliches und effektives Screening für Lungenkarzinome, jedoch sollten laut aktuellem Stand lediglich Hochrisiko-Patienten dies erhalten.^{139,140} Die weitere Verbesserung der Screening-Untersuchungen könnte zu einer früheren Diagnose von Lungenkarzinom-Patienten führen und damit folgend auch zu einer Reduktion der Patienten, bei denen erst durch eine symptomatische Hirnmetastase die Tumorerkrankung diagnostiziert wird.

8 Zusammenfassung und Summary

8.1 Zusammenfassung

Hirnmetastasen stellen eine schwerwiegende Komplikation der häufigsten Tumorerkrankungen wie der Lungenkarzinome, der Mammakarzinome und der Kolonkarzinome dar. Die mediane Überlebenszeit nach Metastasierung in das zentrale Nervensystem beträgt trotz leitliniengerechter Therapie meist nur wenige Monate. Neue zielgerichtete Therapien zeigten bereits erfolgreich eine Wirkung in Hirnmetastasen unterschiedlicher Entitäten. Auch aus diesem Grund sind zielgerichtete Therapien, die ihre Wirkung über das Tumormikromilieu erreichen wie beispielsweise Immuncheckpoint-Inhibitoren, immer interessanter für die klinische Anwendung. Damit rückt auch das Tumormikromilieu bzw. das zellarme, bindegewebige Tumorstroma immer weiter in den Vordergrund der aktuellen onkologischen Forschung.

Auch Hirnmetastasen können ein eigenes bindegewebiges Tumorstroma innerhalb des Tumormikromilieus bilden, das sich histologisch stark von der physiologischen zerebralen Mikroumgebung unterscheidet, welche sich typischerweise aus Gliazellen, Neuronen, neurovaskulären Einheiten und Mikroglia zusammensetzt. Ortständige, Stroma-generierende Fibroblasten, wie sie z.B. im Lungen- und Brustgewebe vorkommen, können daher nicht die Ursprungszellen des Tumorstromas in Hirnmetastasen sein. Es ist bislang nicht

eindeutig geklärt, welche Zelltypen an der Formation des Tumorstromas beteiligt sind. Weiterhin ist bislang nicht dezidiert geklärt wie sich das Tumormikromilieu auf Zellebene in Hirnmetastasen zusammensetzt und ob bestimmte Zusammensetzungen einen Einfluss auf das Überleben von Patienten haben.

In dieser Arbeit wurde aus diesem Grund mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen das Tumormikromilieu in einer großen Kohorte von insgesamt 244 Hirnmetastasen-Patienten genauer charakterisiert. Fokus lag darin herauszufinden, welche Zellen an der Produktion des Tumorstromas beteiligt sind. Im Anschluss wurde mit Hilfe der klinischen Daten geprüft, ob bestimmte Zusammensetzungen oder Eigenschaften des Tumormikromilieus Einfluss auf das Überleben der Patienten haben. Weiterhin wurde mithilfe der durch Immunhistochemie erhobenen Daten untersucht, ob sich das Tumormikromilieu von Patienten, bei denen die Hirnmetastase zur Erstmanifestation der Tumorerkrankung geführt hatte, im Vergleich zu Patienten mit Hirnmetastasen unterscheidet, bei denen bereits die Tumorerkrankung bekannt war.

In den vorliegenden Daten ergab sich eine starke Assoziation zwischen der Expression von mesenchymalen Markern FAP, PDGFRb und Kollagen I, einem Hauptbestandteil von Stroma. Es zeigte sich wiederum keine eindeutige Assoziation zwischen Kollagen I und GFAP, dem Intermediärfilament der Gliazellen. Insgesamt konnte eine große Heterogenität in der Zusammensetzung des Tumormikromilieus zwischen den unterschiedlichen Entitäten festgestellt werden. So zeigten insbesondere die Hirnmetastasen von Nierenzellkarzinomen eine erhöhte Gefäßdichte. Zusätzlich zeigte sich in Nierenzellkarzinomen als auch Lungenkarzinomen eine erhöhte mediane Immunzellinfiltration von CD8-positiven Zellen im Vergleich zu anderen Entitäten. Das Tumormikromilieu hatte zumeist keinen Einfluss auf das Überleben der Hirnmetastasen-Patienten. Lediglich die Expression von vaskulärem PDGFRb hatte in NSCLC-Patienten einen negativen Einfluss auf das Überleben. Außerdem zeigten Kolonkarzinom-Patienten mit erhöhter FAP-Expression ein verbessertes Überleben nach Hirnmetastasen-OP. Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankung zeigten zur Vergleichsgruppe mit Patienten, die eine Hirnmetastase unter bekannter Tumorerkrankung entwickelten, eine signifikant

erhöhte PD-L1-Expression als auch Infiltration von zytotoxischen T-Zellen. Für weitere klinische oder biologische Parameter wie Geschlecht, Proliferationsrate oder Mutationsstatus fanden sich keine eindeutigen statistischen Unterschiede zwischen diesen beiden Patientengruppen.

Die vorliegenden Daten bekräftigten die Idee, dass das Tumorstroma von Hirnmetastasen durch mesenchymale Zellen produziert wird. So könnte eine zielgerichtete Therapie von Stroma-produzierenden Zellen ein interessanter Angriffspunkt zur Prävention einer soliden Hirnmetastasen sein. Patienten mit Hirnmetastase als Erstmanifestation der Tumorerkrankungen sollten in Zukunft vermehrt innerhalb klinischer Studien beachtet werden, da diese aufgrund des veränderten Tumormikromilieus mit erhöhter Infiltration von zytotoxischen T-Zellen als auch PD-L1-Expression von Immuntherapien stärker profitieren könnten.

8.2 Summary

Brain metastases represent a serious complication of the most common cancers such as lung carcinomas, breast carcinomas and colon carcinomas. The median survival time after metastasis to the central nervous system is usually only a few months despite guideline-based therapy. New targeted therapies already showed successful efficacy in brain metastases of different entities. For this reason, targeted therapies that achieve their effect via the tumor microenvironment, such as immune checkpoint inhibitors, are of increasing interest for clinical application. Thus, the tumor microenvironment or rather the cell-poor, connective tissue-rich tumor stroma is also increasingly coming to the forefront of current oncology research.

Brain metastases can also form their own connective tissue-rich tumor stroma within the tumor microenvironment, which is histologically very different from the physiological cerebral microenvironment, which is typically composed of glial cells, neurons, neurovascular unit and microglia. Local stroma-generating fibroblasts, such as those found in lung and breast tissue, therefore cannot be the cells of origin of tumor stroma in brain metastases. It is not yet clear which

cell types are involved in the formation of tumor stroma. Furthermore, it is still unknown how the tumor microenvironment is composed at the cellular level in brain metastases and whether certain compositions have an influence on the survival of patients.

In this study, immunohistochemical staining's were performed to characterize the tumor microenvironment in a large cohort of 244 brain metastases patients. A particular focus was initially on which cells are involved in the production of tumor stroma. Subsequently, clinical data were used to determine whether specific compositions or properties of the tumor microenvironment influence patient survival. Furthermore, using the data collected by immunohistochemistry, it was investigated whether the tumor microenvironment of patients in whom brain metastasis had led to the initial manifestation of cancer differed compared to patients in whom brain metastasis developed under the known cancer.

In the present data, there was a strong association between the expression of mesenchymal markers FAP, PDGFRb, and collagen I, a major component of tumor stroma. Again, there was no clear association between collagen I and GFAP, the intermediate filament of glial cells. Overall, a large heterogeneity in the composition of the tumor microenvironment was observed between the different entities. Brain metastases from renal cell carcinomas showed increased vascular density. In addition, renal cell carcinomas as well as lung carcinomas showed increased median immune cell infiltration with CD8-positive cells compared to the other entities. For the most part, the tumor microenvironment had no effect on the survival of brain metastasis patients. Only vascular PDGFRb expression had a negative impact on survival in NSCLC patients. Additionally, colon cancer patients with increased FAP expression showed improved survival. Patients with brain metastasis as initial manifestation of cancer showed increased PD-L1 expression as well as infiltration of cytotoxic t cells to the reference group of patients who developed brain metastasis under known cancer disease. Other clinical or biological parameters such as sex, proliferation rate, or mutation status did not show clear differences.

The present data reinforced the idea that the stroma of brain metastases is produced by mesenchymal cells. Thus, targeted therapy of stroma-producing cells could be an interesting aim to prevent the formation of solid brain metastases. Patients with brain metastasis as initial manifestation of cancer should be increasingly considered within clinical trials in the future, as they might benefit more from immunotherapies due to the altered tumor microenvironment with increased infiltration of cytotoxic t cells as well as PD-L1 expression.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Repräsentative Schnitte zur Darstellung von physiologischem ZNS-Gewebe und Hirnmetastasen	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit und des Tumormikromilieus von Hirnmetastasen	17
Abbildung 3: Repräsentative Fotos eines TMAs und seiner Vorstufe	34
Abbildung 4: Typ der Immunzellinfiltration basierend auf CD8-positiven Zellen.....	42
Abbildung 5: Repräsentative Schnitte zur Bestimmung des histologischen Subtyps von NSCLC	43
Abbildung 6: Darstellung des Auswertungsoverlays in Halo für eine Färbung mit Ki-67.	46
Abbildung 7: Repräsentatives Bild einer Hirnmetastase mit Kollagen I-Färbung zur Darstellung der Area Quantification-Analyse	47
Abbildung 8: Verteilung der unterschiedlichen Entitäten innerhalb der Hirnmetastasen-Kohorte	50
Abbildung 9: Repräsentative Bilder der unterschiedlichen stromalen Färbungen.....	52
Abbildung 10: Assoziation zwischen Kollagen I und weiteren stromalen Färbungen in der Gesamtkohorte	53
Abbildung 11: Assoziation zwischen Kollagen I und weiteren stromalen Färbungen in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom	54
Abbildung 12: Korrelationsanalyse zwischen der Kollagen I- und FAP-Expression	55
Abbildung 13: Assoziation zwischen FAP und den stromalen Färbungen sPDGFRb, vPDGFRb und GFAP	56
Abbildung 14: Kontingenzanalysen zwischen sPDGFRb, vPDGFRb und GFAP.....	57
Abbildung 15: Box-Plot zur Charakterisierung des Tumormikromilieus in den unterschiedlichen Hirnmetastasen-Entitäten	61
Abbildung 16: Balkendiagramme zur Darstellung des Immunphänotyps der Hirnmetastasen-Entitäten	64
Abbildung 17: Kontingenzanalyse zur Darstellung des Typs der Immunzellinfiltration in den unterschiedlichen Hirnmetastasen-Entitäten	65
Abbildung 18: Assoziation zwischen Typ der Immunzellinfiltration und Kollagen I.....	66
Abbildung 19: Assoziation zwischen Typ der Immunzellinfiltration und CD8-positiven Zellen	66
Abbildung 20: Korrelation zwischen der Gefäßdichte und CD8-positiven Zellen	67
Abbildung 21: Korrelation zwischen dem Durchmesser der Hirnmetastase und stromalen Färbungen in der Gesamtkohorte	68
Abbildung 22: Korrelation zwischen dem Durchmesser der Hirnmetastase und stromalen Färbungen in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom	68

Abbildung 23: Korrelation zwischen CD8-positiven Zellen und Kollagen I als auch FAP in der Gesamtkohorte.....	69
Abbildung 24: Korrelation zwischen CD8-positiven Zellen und Kollagen I und FAP in den Subkohorten NSCLC und Mammakarzinom	69
Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit von Proliferationsrate, Kollagen I- und FAP-Expression	71
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der FAP-Expression in der Subkohorte Kolonkarzinom	72
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit von vPDGFRb-, sPDGFRb und GFAP-Expression	73
Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit von PD-L1, MHC I, MHC II und CD74-Expression	74
Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit von CD8-positiven Zellen und dem Typ der Immunzellinfiltration.....	75
Abbildung 30: Verteilung von Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung in der Gesamtkohorte und den unterschiedlichen Entitäten.....	76
Abbildung 31: Klinische Unterschiede zwischen Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der Gesamtkohorte	78
Abbildung 32: Klinische Unterschiede zwischen Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der kombinierten Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“	80
Abbildung 33: Klinische Unterschiede zwischen Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der Subkohorte NSCLC	81
Abbildung 34: Vergleich der Proliferationsrate und Kollagen I-Expression zwischen HM als Erstmanifestation Ja/Nein.....	82
Abbildung 35: Vergleich der Gefäßdichte, FAP-Expression und CD8-positiver Zellen zwischen HM als Erstmanifestation Ja/Nein	83
Abbildung 36: Kontingenzanalyse bezüglich der Expression von sPDGFRb, vPDGFRb und GFAP zwischen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein.....	83
Abbildung 37: Vergleich bezüglich der Expression von CD74, MHC I und MHC II zwischen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein.....	84
Abbildung 38: Vergleich bezüglich der Expression von PD-L1 zwischen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein	85
Abbildung 39: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit der Zuweisung HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein	85
Abbildung 40: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit der Zuweisung HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein mit Überleben ab Primärdiagnose	86
Abbildung 41: Vergleich bezüglich der Vortherapien zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein	87
Abbildung 42: Vergleich bezüglich der Lokalisation der HM zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein	87
Abbildung 43: Vergleich bezüglich des Typs der Immunzellinfiltration zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein.....	88
Abbildung 44: Vergleich bezüglich des histologischen Subtyps und des EGFR-Mutationsstatus zwischen den Gruppen HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der Subkohorte NSCLC	88

10 Abbildungsverzeichnis Appendix

Appendix Abbildung 1: Einfluss von vaskulärem PDGFRb auf die Immunzellinfiltration	128
Appendix Abbildung 2: Assoziation zwischen vaskulärem PDGFRb und den erhaltenen Vortherapien in der Subkohorte NSCLC	129
Appendix Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der PD-L1-Expression in der Subkohorte Melanom	129
Appendix Abbildung 4: Korrelation zwischen Chemotherapie-Zyklen vor Hirnmetastasen-OP und CD8-positiven Zellen in der kombinierten Subkohorte	130
Appendix Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Hirnmetastasen-Operation in der Gesamtkohorte und Subkohorte NSCLC	130
Appendix Abbildung 6: Anteil negativer und positiver Hirnmetastasen für PD-L1 nach Entität.....	131

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Daten der Hirnmetastasen-Kohorte.....	31
Tabelle 2: Übersicht über die genutzten Antikörper und deren Zielzellen.....	39
Tabelle 3: Korrelations- und Assoziationen zwischen den unterschiedlichen stromalen Färbungen	58
Tabelle 4: Darstellung der signifikanten Unterschiede zwischen Hirnmetastasen unterschiedlicher Entitäten bezüglich des Tumormikromilieus	63
Tabelle 5: Klinische Eigenschaften von Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der Gesamtkohorte	78
Tabelle 6: Klinische Eigenschaften von Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der kombinierten Subkohorte aus NSCLC, SCLC und Karzinom „NOS“	79
Tabelle 7: Klinische Eigenschaften von Patienten mit HM als Erstmanifestation der Tumorerkrankung Ja/Nein in der Subkohorte NSCLC	81
Tabelle 8: Repräsentative Übersicht über die wichtigsten Einstellungen in der Halo Software für die Multiplex-Analyse	132
Tabelle 9: Repräsentative Übersicht über die wichtigsten Einstellungen in der Halo Software für die Area Quantification-Analyse	133

12 Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-binding cassette
ALK	anaplastic lymphoma kinase
BRAF	Proto-oncogene B-Raf
BSC	best supportive care
CAFs	Cancer-associated fibroblasts
cGAMP	cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate

CT	Computertomographie
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12 (Synonym: SDF-1)
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung Hydrat
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERBB2	human epidermal growth factor receptor 2
FAP	Fibroblast-activation protein
FOXP3	Forkhead-Box-Protein 3
GFAP	glial fibrillary acidic protein
ggf.	gegebenenfalls
GK	Gesamtkohorte
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HIER	Hitze-induzierte Epitoprückgewinnung
HLA	human leukocyte antigen
HM	Hirnmetastase
H.E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitor
IGF2	Insulin-like growth factor 2
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
Kol I	Kollagen I
m	männlich
MHC I, II	major histocompatibility complex antigen-I and II

mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Fallzahl
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSCLC	non-small cell lung cancer
OD	optical density
OP	Operation
ORR	objective response rate
PDGFRα	Platelet-derived growth factor receptor type alpha
PDGFRβ	Platelet-derived growth factor receptor type beta
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
r	Korrelationskoeffizient
RGB	Rot, Grün und Blau
ROS1	proto-oncogene tyrosin-protein kinase ROS
SCLC	small cell lung cancer
SDF-1	stromal cell-derived factor 1 (Synonym: CXCL12)
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results-Datenbank
siRNA	small interfering RNA
sPDGFRβ	stromales PDGFRβ
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
TGFβ	Transforming growth factor beta

TILs	tumor infiltrating lymphocytes
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TMA	tissue micro array
TNF	tumor necrosis factor
TWIST1	Twist-related protein 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
vPDGFRb	vaskuläres PDGFRb
w	weiblich
ZNS	Zentrales Nervensystem
µm	Mikrometer
.dzi	Dateiformat des Whole Slide Scanning-Systems

13 Literaturverzeichnis

1. Patchell RA. The management of brain metastases. *Cancer Treat Rev.* 2003;29(6):533-540. doi:10.1016/S0305-7372(03)00105-1
2. Barnholtz-Sloan JS, Sloan AE, Davis FG, Vigneaun FD, Lai P, Sawaya RE. Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J Clin Oncol.* 2004;22(14):2865-2872. doi:10.1200/JCO.2004.12.149
3. Cagney DN, Martin AM, Catalano PJ, et al. Incidence and prognosis of patients with brain metastases at diagnosis of systemic malignancy: A population-based study. *Neuro Oncol.* 2017;19(11):1511-1521. doi:10.1093/neuonc/nox077
4. Berghoff AS, Schur S, Füreder LM, et al. Descriptive statistical analysis of a real life cohort of 2419 patients with brain metastases of solid cancers. *ESMO Open.* 2016;1(2). doi:10.1136/esmooopen-2015-000024
5. Strik H, Prömmel P. Meningeosis neoplastica. Diagnostik und individualisierte Therapie. *Nervenarzt.* 2010;81(2):229-242. doi:10.1007/s00115-009-2927-6
6. Cacho-Díaz B, Lorenzana-Mendoza NA, Chávez-Hernandez JD, González-Aguilar A, Reyes-Soto G, Herrera-Gómez Á. Clinical manifestations and location of brain metastases as prognostic markers. *Curr Probl Cancer.* 2019;43(4):312-323. doi:10.1016/j.currproblcancer.2018.06.002
7. Yoshida S, Takahashi H. Cerebellar metastases in patients with cancer. *Surg Neurol.* 2009;71(2):184-187. doi:10.1016/j.surneu.2007.10.010
8. Schellinger PD, Meinck HM, Thron A. Diagnostic accuracy of MRI compared to CCT in patients with brain metastases. *J Neurooncol.* 1999;44(3):275-281.

doi:10.1023/A:1006308808769

9. Yu KKH, Patel AR, Moss NS. The Role of Stereotactic Biopsy in Brain Metastases. *Neurosurg Clin N Am.* 2020;31(4):515. doi:10.1016/J.NEC.2020.06.002
10. Abdallah SM Ben, Wong A. Brain metastases in non-small-cell lung cancer: Are tyrosine kinase inhibitors and checkpoint inhibitors now viable options? *Curr Oncol.* 2018;25(Suppl 1):S103-S114. doi:10.3747/co.25.3733
11. Bertolini F, Spallanzani A, Fontana A, Depenni R, Luppi G. Brain metastases: an overview. *CNS Oncol.* 2015;4(1):37-46. doi:10.2217/cns.14.51
12. Langley RE, Stephens RJ, Nankivell M, et al. Interim Data from the Medical Research Council QUARTZ Trial: Does Whole Brain Radiotherapy Affect the Survival and Quality of Life of Patients with Brain Metastases from Non-small Cell Lung Cancer? *Clin Oncol.* 2013;25(3):e23-e30. doi:10.1016/j.clon.2012.11.002
13. Yamamoto M, Serizawa T, Shuto T, et al. Stereotactic radiosurgery for patients with multiple brain metastases (JLGK0901): A multi-institutional prospective observational study. *Lancet Oncol.* 2014;15(4):387-395. doi:10.1016/S1470-2045(14)70061-0
14. Brown PD, Pugh S, Laack NN, et al. Memantine for the prevention of cognitive dysfunction in patients receiving whole-brain radiotherapy: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neuro Oncol.* 2013;15(10):1429-1437. doi:10.1093/neuonc/not114
15. Gondi V, Pugh SL, Tome WA, et al. Preservation of memory with conformal avoidance of the hippocampal neural stem-cell compartment during whole-brain radiotherapy for brain metastases (RTOG 0933): A phase II multi-institutional trial. *J Clin Oncol.* 2014;32(34):3810-3816. doi:10.1200/JCO.2014.57.2909
16. Weller M. (2014) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Hirnmetastasen und Meningeosis neoplastica. AWMF-Leitlinien-Registrierungsnummer 030/060. Verfügbar unter https://dgn.org/wp-content/uploads/2013/01/030-060I_S2k_Hirnmetastasen_Meningeosis_neoplastica_2015-06-archiviert-1.pdf
17. Paek SH, Audu PB, Sperling MR, Cho J, Andrews DW. Reevaluation of surgery for the treatment of brain metastases: Review of 208 patients with single or multiple brain metastases treated at one institution with modern neurosurgical techniques. *Neurosurgery.* 2005;56(5):1021-1033. doi:10.1227/01.NEU.0000158321.90608.BE
18. Schackert G, Lindner C, Petschke S, Leimert M, Kirsch M. Retrospective study of 127 surgically treated patients with multiple brain metastases: Indication, prognostic factors, and outcome. *Acta Neurochir (Wien).* 2013;155(3):379-387. doi:10.1007/s00701-012-1606-8
19. Walbert T, Gilbert MR. The role of chemotherapy in the treatment of patients with brain metastases from solid tumors. *Int J Clin Oncol.* 2009;14(4):299-306. doi:10.1007/s10147-009-0916-1
20. Gerstner ER, Fine RL. Increased permeability of the blood-brain barrier to chemotherapy in metastatic brain tumors: Establishing a treatment paradigm. *J Clin Oncol.* 2007;25(16):2306-3212. doi:10.1200/JCO.2006.10.0677
21. Robinet G, Thomas P, Breton JL, et al. Results of a phase III study of early versus delayed whole brain radiotherapy with concurrent cisplatin and vinorelbine combination in inoperable brain metastasis of non-small-cell lung cancer: Groupe Français de Pneumo-Cancérologie (GFPC) protocol 95-1. *Ann Oncol.* 2001;12(1):59-67. doi:10.1023/A:1008338312647
22. Soffietti R, Rudà R, Trevisan E. Brain metastases: Current management and new developments. *Curr Opin Oncol.* 2008;20(6):676-684. doi:10.1097/CCO.0b013e32831186fe
23. Kawada I, Soejima K. Screening of epidermal growth factor receptor mutation in lung cancer. *Respir Circ.* 2008;56(6):617-622. doi:10.1056/nejmoa0904554
24. Shi Y, Au JSK, Thongprasert S, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of

- adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol*. 2014;9(2):154-162. doi:10.1097/JTO.0000000000000033
25. Castellanos E, Feld E, Horn L. Driven by Mutations: The Predictive Value of Mutation Subtype in EGFR-Mutated Non–Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2017;12(4):612-623. doi:10.1016/j.jtho.2016.12.014
 26. Devarakonda S, Morgensztern D, Govindan R. Genomic alterations in lung adenocarcinoma. *Lancet Oncol*. 2015;16(7):e342-e351. doi:10.1016/S1470-2045(15)00077-7
 27. Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):2046-2051. doi:10.1200/JCO.2010.33.1280
 28. Planchard D, Kim TM, Mazieres J, et al. Dabrafenib in patients with BRAFV600E-positive advanced non-small-cell lung cancer: A single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(5):642-650. doi:10.1016/S1470-2045(16)00077-2
 29. Grommes C, Oxnard GR, Kris MG, et al. Pulsatile high-dose weekly erlotinib for CNS metastases from EGFR mutant non-small cell lung cancer. *Neuro Oncol*. 2011;13(12):1364-1369. doi:10.1093/neuonc/nor121
 30. Ballard P, Yates JWT, Yang Z, et al. Preclinical comparison of osimertinib with other EGFR-TKIs in EGFR-mutant NSCLC brain metastases models, and early evidence of clinical brain metastases activity. *Clin Cancer Res*. 2016;22(20):5130-5140. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0399
 31. Cross DAE, Ashton SE, Ghorghiu S, et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov*. 2014;4(9):1046-1061. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0337
 32. Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, et al. CNS efficacy of osimertinib in patients with T790M-positive advanced non–small-cell lung cancer: Data from a randomized Phase III trial (Aura3). *J Clin Oncol*. 2018;36(26):2702-2709. doi:10.1200/JCO.2018.77.9363
 33. Freedman RA, Gelman RS, Wefel JS, et al. Translational breast cancer research consortium (TBCRC) 022: A phase II trial of neratinib for patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer and brain metastases. *J Clin Oncol*. 2016;34(9):945-952. doi:10.1200/JCO.2015.63.0343
 34. Bachelot T, Romieu G, Campone M, et al. Lapatinib plus capecitabine in patients with previously untreated brain metastases from HER2-positive metastatic breast cancer (LANDSCAPE): A single-group phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2013;14(1):64-71. doi:10.1016/S1470-2045(12)70432-1
 35. Capper D, Berghoff AS, Magerle M, et al. Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases. *Acta Neuropathol*. 2012;123(2):223-233. doi:10.1007/s00401-011-0887-y
 36. Harding JJ, Catalanotti F, Munhoz RR, et al. A Retrospective Evaluation of Vemurafenib as Treatment for BRAF-Mutant Melanoma Brain Metastases. *Oncologist*. 2015;20(7):789-797. doi:10.1634/theoncologist.2014-0012
 37. Long G V., Trefzer U, Davies MA, et al. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): A multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(11):1087-1095. doi:10.1016/S1470-2045(12)70431-X
 38. Brastianos PK, Carter SL, Santagata S, et al. Genomic characterization of brain metastases reveals branched evolution and potential therapeutic targets. *Cancer Discov*. 2015;5(11):1164-1177. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0369
 39. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (80-)*. 1996;271(5256):1734-1736. doi:10.1126/science.271.5256.1734
 40. Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med*. 2016;375(18):1767-1778. doi:10.1056/nejmra1514296

41. Goldberg SB, Schalper KA, Gettinger SN, et al. Pembrolizumab for management of patients with NSCLC and brain metastases: long-term results and biomarker analysis from a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(5):655-663. doi:10.1016/S1470-2045(20)30111-X
42. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387(10027):1540-1550. doi:10.1016/S0140-6736(15)01281-7
43. Long G V., Atkinson V, Lo S, et al. Combination nivolumab and ipilimumab or nivolumab alone in melanoma brain metastases: a multicentre randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2018;19(5):672-681. doi:10.1016/S1470-2045(18)30139-6
44. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet.* 1889;133(3421):571-573. doi:10.1016/S0140-6736(00)49915-0
45. Arneth B. Tumor microenvironment. *Med.* 2020;56(1). doi:10.3390/medicina56010015
46. Spill F, Reynolds DS, Kamm RD, Zaman MH. Impact of the Physical Microenvironment on Tumor Progression and Metastasis. *Curr Opin Biotechnol.* 2016;40:41-48. doi:10.1016/j.copbio.2016.02.007
47. Dvorak HF, Weaver VM, Tlsty TD, Bergers G. Tumor microenvironment and progression. *J Surg Oncol.* 2011;103(6):468-474. doi:10.1002/jso.21709
48. Cacho-Díaz B, García-Botello DR, Wegman-Ostrosky T, Reyes-Soto G, Ortiz-Sánchez E, Herrera-Montalvo LA. Tumor microenvironment differences between primary tumor and brain metastases. *J Transl Med.* 2020;18(1):1. doi:10.1186/s12967-019-02189-8
49. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie.* 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012.
50. Paulus W, Schröder M, eds. *Neuropathologie.* 3. Auflage. Berlin: Springer-Verlag; 2012.
51. Nakanishi H, Hosoda S, Takahashi Y, Goto S, Tamura J. Alteration of tumour cell arrangement related to connective tissue stroma in metastatic brain tumours. Histological and immunohistochemical studies of 68 autopsy cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1989;414(6):485-495. doi:10.1007/BF00781705
52. Teglassi V, Csury DT, Dezso K, et al. Origin and distribution of connective tissue and pericytes impacting vascularization in brain metastases with different growth patterns. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2019;78(4):326-339. doi:10.1093/jnen/nlz007
53. Vanlandewijck M, He L, Mäe MA, et al. A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature.* 2018;554(7693):475-480. doi:10.1038/nature25739
54. Liu J, He L, Muhl L, et al. A human cell type similar to murine central nervous system perivascular fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2021;402(2). doi:10.1016/j.yexcr.2021.112576
55. Weller RO, Djuanda E, Yow HY, Carare RO. Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol.* 2009;117(1):1-14. doi:10.1007/s00401-008-0457-0
56. Daneman R, Prat A. The blood–brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(1). doi:10.1101/cshperspect.a020412
57. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 2015;527(7578):329-335. doi:10.1038/nature15756
58. Soto MS, O'Brien ER, Andreou K, et al. Disruption of tumour-host communication by downregulation of LFA-1 reduces COX-2 and e-NOS expression and inhibits brain metastasis growth. *Oncotarget.* 2016;7(32):52375-52391. doi:10.18632/oncotarget.10737
59. Stoletov K, Strnadel J, Zardouzian E, et al. Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization. *J Cell Sci.* 2013;126(4):904-913. doi:10.1242/jcs.112748
60. Wilhelm I, Fazakas C, Molnár K, Végh AG, Haskó J, Krizbai IA. Foe or friend? Janus-faces of the neurovascular unit in the formation of brain metastases. *J Cereb Blood Flow*

Metab. 2018;38(4):563-587. doi:10.1177/0271678X17732025

61. Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(6):1248-1258. doi:10.1161/ATVBAHA.107.141069
62. Brown LS, Foster CG, Courtney JM, King NE, Howells DW, Sutherland BA. Pericytes and neurovascular function in the healthy and diseased brain. *Front Cell Neurosci.* 2019;13. doi:10.3389/fncel.2019.00282
63. Smyth LCD, Rustenhoven J, Scotter EL, et al. Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells. *J Chem Neuroanat.* 2018;92:48-60. doi:10.1016/j.jchemneu.2018.06.001
64. Göritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisén J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science.* 2011;333(6039):238-242. doi:10.1126/science.1203165
65. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* 2005;7(4):452-464. doi:10.1215/S1152851705000232
66. Molnár K, Mészáros Á, Fazakas C, et al. Pericyte-secreted IGF2 promotes breast cancer brain metastasis formation. *Mol Oncol.* 2020;14(9):2040-2057. doi:10.1002/1878-0261.12752
67. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF β -receptor mutant mice. *Genes Dev.* 1994;8(16):1888-1896. doi:10.1101/gad.8.16.1888
68. Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science (80-).* 1997;277(5323):242-245. doi:10.1126/science.277.5323.242
69. Thies KA, Hammer AM, Hildreth BE, et al. Stromal Platelet-Derived Growth Factor Receptor-b Signaling Promotes Breast Cancer Metastasis in the Brain. *Cancer Res.* 2021;81(3):606-618. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-3731
70. Gril B, Palmieri D, Qian Y, et al. Pazopanib inhibits the activation of PDGFR β -expressing astrocytes in the brain metastatic microenvironment of breast cancer cells. *Am J Pathol.* 2013;182(6):2368-2379. doi:10.1016/j.ajpath.2013.02.043
71. Pietras K, Pahler J, Bergers G, Hanahan D. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med.* 2008;5(1):0123-0138. doi:10.1371/journal.pmed.0050019
72. Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science.* 2018;362(6411):181-185. doi:10.1126/science.aat0473
73. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew M V. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2016;275:305-315. doi:10.1016/j.expneurol.2015.03.020
74. Liesi P, Kauppila T. Induction of type IV collagen and other basement-membrane-associated proteins after spinal cord injury of the adult rat may participate in formation of the glial scar. *Exp Neurol.* 2002;173(1):31-45. doi:10.1006/exnr.2001.7800
75. Kim SJ, Kim JS, Park ES, et al. Astrocytes upregulate survival genes in tumor cells and induce protection from chemotherapy. *Neoplasia.* 2011;13(3):286-298. doi:10.1593/neo.11112
76. Chen Q, Boire A, Jin X, et al. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature.* 2016;533(7604):493-498. doi:10.1038/nature18268
77. Lannes N, Eppler E, Etemad S, Yotovskii P, Filgueira L. Microglia at center stage: a comprehensive review about the versatile and unique residential macrophages of the central nervous system. *Oncotarget.* 2017;8(69):114393-114413.
78. Graeber MB, Streit WJ. Microglia: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):89-105. doi:10.1007/s00401-009-0622-0
79. Brantley EC, Guo L, Zhang C, et al. Nitric oxide-mediated tumoricidal activity of murine microglial cells. *Transl Oncol.* 2010;3(6):380-388. doi:10.1593/tlo.10208
80. Pukrop T, Dehghani F, Chuang HN, et al. Microglia promote colonization of brain tissue by breast cancer cells in a Wnt-dependent way. *Glia.* 2010;58(12):1477-1489.

doi:10.1002/glia.21022

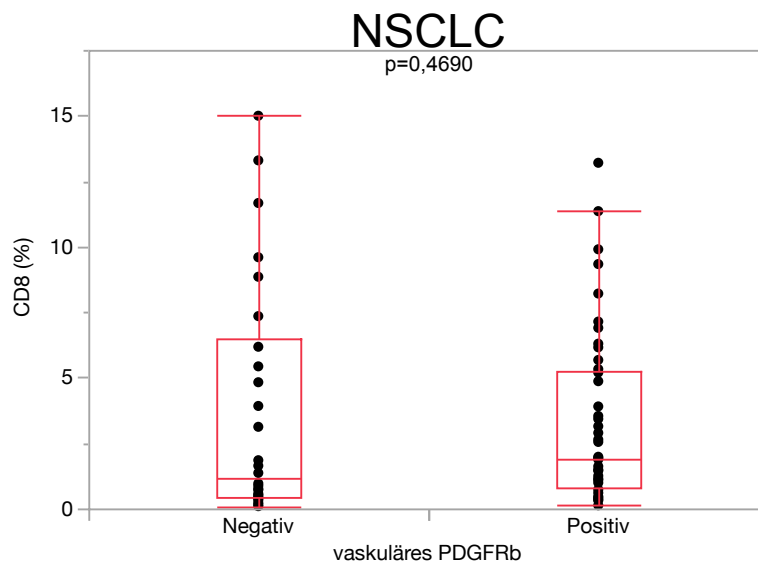
81. Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, et al. Regulation and Heteromeric Structure of the Fibroblast Activation Protein in Normal and Transformed Cells of Mesenchymal and Neuroectodermal Origin. *Cancer Res.* 1993;53(14):3327-3335.
82. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(9):582-598. doi:10.1038/nrc.2016.73
83. Zhang Y, Tang H, Cai J, et al. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer Lett.* 2011;303(1):47-55. doi:10.1016/j.canlet.2011.01.011
84. Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* 2005;121(3):335-348. doi:10.1016/j.cell.2005.02.034
85. Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A, et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2015;47(4):320-329. doi:10.1038/ng.3225
86. Su S, Chen J, Yao H, et al. CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell.* 2018;172(4):841-856.e16. doi:10.1016/j.cell.2018.01.009
87. Kato T, Noma K, Ohara T, et al. Cancer-associated fibroblasts affect intratumoral CD8 β and Foxp3 β T cells via IL6 in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res.* 2018;24(19):4820-4833. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0205
88. Xu S, Xu H, Wang W, et al. The role of collagen in cancer: From bench to bedside. *J Transl Med.* 2019;17(1):309. doi:10.1186/s12967-019-2058-1
89. De Kruijf EM, Van Nes JGH, Van De Velde CJH, et al. Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125(3):687-696. doi:10.1007/s10549-010-0855-6
90. Hofheinz RD, Al-Batran SE, Hartmann F, et al. Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: An early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Onkologie.* 2003;26(1):44-48. doi:10.1159/000069863
91. Teichgräber V, Monasterio C, Chaitanya K, et al. Specific inhibition of fibroblast activation protein (FAP)-alpha prevents tumor progression in vitro. *Adv Med Sci.* 2015;60(2):264-272. doi:10.1016/j.advms.2015.04.006
92. Duda DG, Duyverman AMMJ, Kohno M, et al. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(50):21677-21682. doi:10.1073/pnas.1016234107
93. Tew BY, Legendre C, Gooden GC, et al. Isolation and characterization of patient-derived CNS metastasis-associated stromal cell lines. *Oncogene.* 2019;38(21):4002-4014. doi:10.1038/s41388-019-0680-2
94. Choi YP, Lee JH, Gao MQ, et al. Cancer-associated fibroblast promote transmigration through endothelial brain cells in three-dimensional in vitro models. *Int J Cancer.* 2014;135(9):2024-2033. doi:10.1002/ijc.28848
95. Harter PN, Bernatz S, Scholz A, et al. Distribution and prognostic relevance of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and PD-1/PD-L1 immune checkpoints in human brain metastases. *Oncotarget.* 2015;6(38):40836-40849. doi:10.18632/oncotarget.5696
96. Berghoff AS, Ricken G, Widhalm G, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in melanoma brain metastases. *Histopathology.* 2015;66(2):289-299. doi:10.1111/his.12537
97. Fukumura K, Malgulwar PB, Fischer GM, et al. Multi-omic molecular profiling reveals potentially targetable abnormalities shared across multiple histologies of brain metastasis. *Acta Neuropathol.* 2021;141(2):303-321. doi:10.1007/s00401-020-02256-1
98. Kudo Y, Haymaker C, Zhang J, et al. Suppressed immune microenvironment and

- repertoire in brain metastases from patients with resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2019;30(9):1521-1530. doi:10.1093/annonc/mdz207
99. Berghoff AS, Ilhan-Mutlu A, Dinhof C, et al. Differential role of angiogenesis and tumour cell proliferation in brain metastases according to primary tumour type: Analysis of 639 cases. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015;41(2):e41-e55. doi:10.1111/nan.12185
 100. McCoach CE, Berge EM, Lu X, Barón AE, Ross Camidge D. A brief report of the status of central nervous system metastasis enrollment criteria for advanced non-small cell lung cancer clinical trials: A review of the clinicaltrials.gov trial registry. *J Thorac Oncol*. 2016;11(3):407-413. doi:10.1016/j.jtho.2015.10.024
 101. Wang A, Komiya T. Brain metastasis as exclusion criteria in clinical trials involving extensive-stage small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(12):3099-3104. doi:10.1007/s00432-019-03034-7
 102. Patel RR, Verma V, Miller AB, et al. Exclusion of patients with brain metastases from cancer clinical trials. *Neuro Oncol*. 2020;22(4):577-579. doi:10.1093/neuonc/noz246
 103. Steindl A, Yadavalli S, Gruber KA, et al. Neurological symptom burden impacts survival prognosis in patients with newly diagnosed non-small cell lung cancer brain metastases. *Cancer*. 2020;126(19):4341-4352. doi:10.1002/cncr.33085
 104. Füreder LM, Widhalm G, Gatterbauer B, et al. Brain metastases as first manifestation of advanced cancer: exploratory analysis of 459 patients at a tertiary care center. *Clin Exp Metastasis*. 2018;35(8):727-738. doi:10.1007/s10585-018-9947-1
 105. Agazzi S, Pampallona S, Pica A, et al. The origin of brain metastases in patients with an undiagnosed primary tumour. *Acta Neurochir (Wien)*. 2004;146(2):153-157. doi:10.1007/s00701-003-0188-x
 106. Axelrod ML, Cook RS, Johnson DB, Balko JM. Biological consequences of MHC-II expression by tumor cells in cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25(8):2392-2402. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-3200
 107. Zeiner PS, Zinke J, Kowalewski DJ, et al. CD74 regulates complexity of tumor cell HLA class II peptidome in brain metastasis and is a positive prognostic marker for patient survival. *Acta Neuropathol Commun*. 2018;6(1):18. doi:10.1186/s40478-018-0521-5
 108. Harter PN, Zinke J, Scholz A, et al. Netrin-1 expression is an independent prognostic factor for poor patient survival in brain metastases. *PLoS One*. 2014;9(3). doi:10.1371/journal.pone.0092311
 109. Nishino M, Hoang MP, Della Pelle P, et al. Napsin A/p40 antibody cocktail for subtyping non-small cell lung carcinoma on cytology and small biopsy specimens. *Cancer Cytopathol*. 2016;124(7):472-484. doi:10.1002/cncy.21707
 110. Nissen NI, Karsdal M, Willumsen N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1). doi:10.1186/s13046-019-1110-6
 111. Kienast Y, Von Baumgarten L, Fuhrmann M, et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med*. 2010;16(1):116-122. doi:10.1038/nm.2072
 112. Dorrier CE, Aran D, Haenelt EA, et al. CNS fibroblasts form a fibrotic scar in response to immune cell infiltration. *Nat Neurosci*. 2021;24(2):234-244. doi:10.1038/s41593-020-00770-9
 113. Arina A, Idel C, Hyjek EM, et al. Tumor-associated fibroblasts predominantly come from local and not circulating precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(27):7551-7556. doi:10.1073/pnas.1600363113
 114. Song SG, Kim S, Koh J, et al. Comparative analysis of the tumor immune-microenvironment of primary and brain metastases of non-small-cell lung cancer reveals organ-specific and EGFR mutation-dependent unique immune landscape. *Cancer Immunol Immunother*. 2021;70(7):2035-2048. doi:10.1007/s00262-020-02840-0
 115. Raposo C, Schwartz M. Glial scar and immune cell involvement in tissue remodeling and repair following acute CNS injuries. *Glia*. 2014;62(11):1895-1904. doi:10.1002/glia.22676

116. Yang X, Lin Y, Shi Y, et al. FAP Promotes immunosuppression by cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment via STAT3-CCL2 Signaling. *Cancer Res.* 2016;76(14):4124-4135. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2973
117. Huang Y, Kim BYS, Chan CK, Hahn SM, Weissman IL, Jiang W. Improving immune-vascular crosstalk for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(3):195-203. doi:10.1038/nri.2017.145
118. Lund AW, Wagner M, Fankhauser M, et al. Lymphatic vessels regulate immune microenvironments in human and murine melanoma. *J Clin Invest.* 2016;126(9):3389-3402. doi:10.1172/JCI79434
119. Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M. The glymphatic pathway in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2018;17(11):1016-1024. doi:10.1016/S1474-4422(18)30318-1
120. H M, Y M, M N. The Brain's Glymphatic System: Current Controversies. *Trends Neurosci.* 2020;43(7):458-466. doi:10.1016/J.TINS.2020.04.003
121. Toh CH, Siow TY, Castillo M. Peritumoral Brain Edema in Metastases May Be Related to Glymphatic Dysfunction. *Front Oncol.* 2021;11. doi:10.3389/fonc.2021.725354
122. Kavouridis VK, Harary M, Hulsbergen AFC, et al. Survival and prognostic factors in surgically treated brain metastases. *J Neurooncol.* 2019;143(2):359-367. doi:10.1007/s11060-019-03171-6
123. Johung KL, Yeh N, Desai NB, et al. Extended survival and prognostic factors for patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer and brain metastasis. *J Clin Oncol.* 2016;34(2):123-129. doi:10.1200/JCO.2015.62.0138
124. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chim Acta.* 2019;491(January):39-45. doi:10.1016/j.cca.2019.01.011
125. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, et al. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2014;25(6):735-747. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.021
126. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/Pericyte Interactions. *Circ Res.* 2005;97(6):512-523. doi:10.1161/01.RES.0000182903.16652.D7
127. Lu J, Shenoy AK. Epithelial-to-pericyte transition in cancer. *Cancers (Basel).* 2017;9(7). doi:10.3390/cancers9070077
128. Kim SJ, Jung KH, Son MK, et al. Tumor vessel normalization by the PI3K inhibitor HS-173 enhances drug delivery. *Cancer Lett.* 2017;403:339-353. doi:10.1016/j.canlet.2017.06.035
129. Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 2012;4(127). doi:10.1126/scitranslmed.3003689
130. Zhang Y, Yu M, Jing Y, et al. Baseline immunity and impact of chemotherapy on immune microenvironment in cervical cancer. *Br J Cancer.* 2021;124(2):414-424. doi:10.1038/s41416-020-01123-w
131. Gaudreau PO, Negrao M V., Mitchell KG, et al. Neoadjuvant Chemotherapy Increases Cytotoxic T Cell, Tissue Resident Memory T Cell, and B Cell Infiltration in Resectable NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2021;16(1):127-139. doi:10.1016/j.jtho.2020.09.027
132. Brueckl WM, Ficker JH, Zeitler G. Clinically relevant prognostic and predictive markers for immune-checkpoint-inhibitor (ICI) therapy in non-small cell lung cancer (NSCLC). *BMC Cancer.* 2020;20(1). doi:10.1186/s12885-020-07690-8
133. Gibson AJW, Li H, D'Silva A, et al. Impact of number versus location of metastases on survival in stage IV M1b non-small cell lung cancer. *Med Oncol.* 2018;35(9):3. doi:10.1007/s12032-018-1182-8
134. Giordana MT, Cordera S, Boghi A. Cerebral metastases as first symptom of cancer: A clinico-pathologic study. *J Neurooncol.* 2000;50(3):265-273. doi:10.1023/A:1006413001375

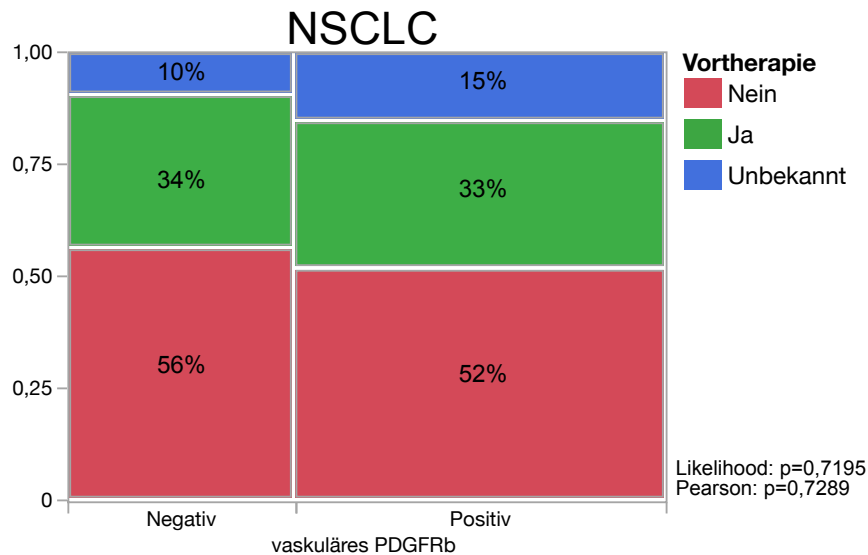
135. Margolin K, Ernstoff MS, Hamid O, et al. Ipilimumab in patients with melanoma and brain metastases: An open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(5):459-465. doi:10.1016/S1470-2045(12)70090-6
136. Zhou J, Gong Z, Jia Q, Wu Y, Yang ZZ, Zhu B. Programmed death ligand 1 expression and CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte density differences between paired primary and brain metastatic lesions in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;498(4):751-757. doi:10.1016/j.bbrc.2018.03.053
137. Dedić Plavetić N, Jakić-Razumović J, Kulić A, Sirotković-Skerlev M, Barić M, Vrbanec D. Prognostic Value of Ki-67 in Breast Carcinoma: Tissue Microarray Method Versus Whole Section Analysis- Potentials and Pitfalls. *Pathol Oncol Res.* 2015;21(2):315-324. doi:10.1007/s12253-014-9823-5
138. Jin J, Zhou X, Liang X, et al. Brain metastases as the first symptom of lung cancer: A clinical study from an Asian medical center. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139(3):403-408. doi:10.1007/s00432-012-1344-6
139. Hoffman RM, Atallah RP, Struble RD, Badgett RG. Lung Cancer Screening with Low-Dose CT: a Meta-Analysis. *J Gen Intern Med.* 2020;35(10):3015-3025. doi:10.1007/s11606-020-05951-7
140. Wood DE, Kazerooni EA, Baum SL, et al. Lung cancer screening, version 3.2018. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw.* 2018;16(4):412-441. doi:10.6004/jnccn.2018.0020

14 Appendix



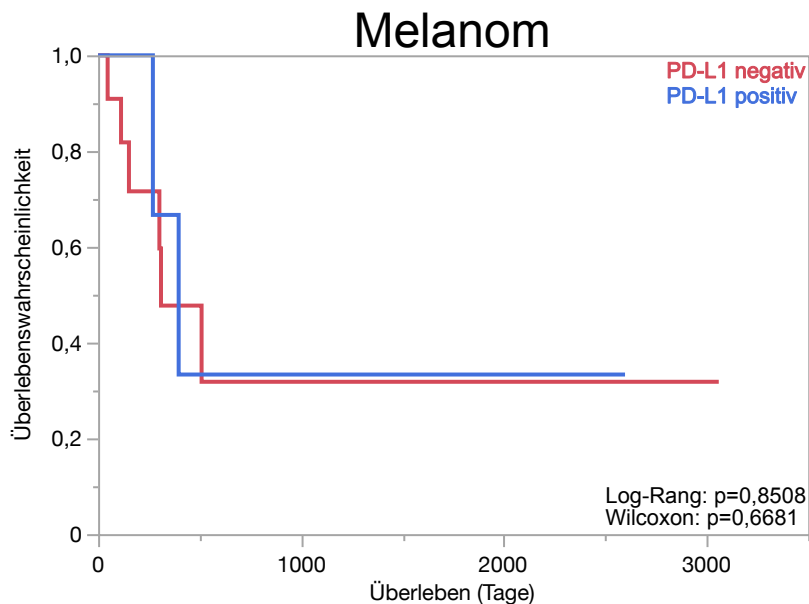
Appendix Abbildung 1: Einfluss von vaskulärem PDGFRb auf die Immunzellinfiltration

Kein Hinweis auf eine Assoziation zwischen der Expression von vaskulärem PDGFRb mit der Infiltration von CD8-positiven Zellen in der Subkohorte NSCLC (n=78). P-Werte des non-parametrischen Wilcoxon-Tests sind innerhalb des Graphen abgebildet.



Appendix Abbildung 2: Assoziation zwischen vaskulärem PDGFRb und den erhaltenen Vorthérapien in der Subkohorte NSCLC

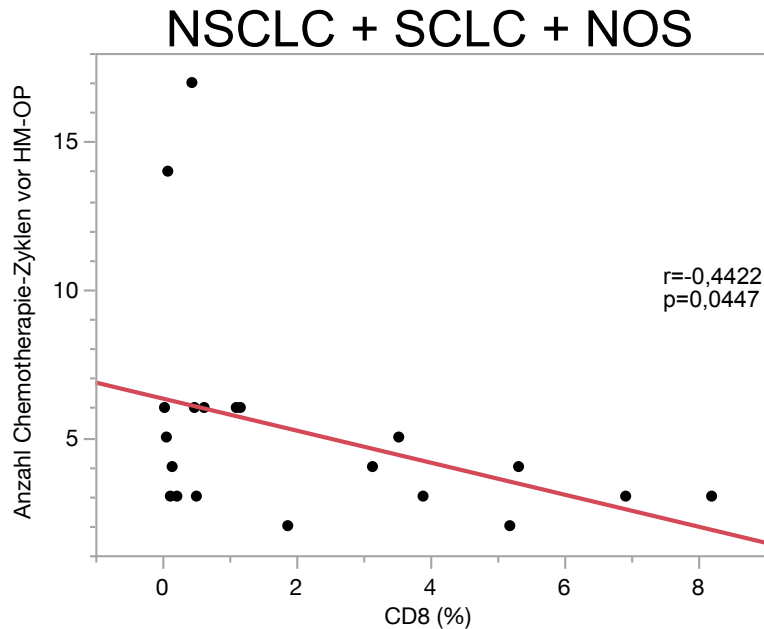
Es liegen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der prozentualen Verteilung von Patienten, die eine Vorthherapie erhalten haben, zwischen den Gruppen vaskuläres PDGFRb negativ und positiv ($n=84$) vor. P-Werte des Likelihood-Verhältnis χ^2 als auch des Pearson χ^2 sind jeweils neben dem Graphen angegeben.



Appendix Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der PD-L1-Expression in der Subkohorte Melanom

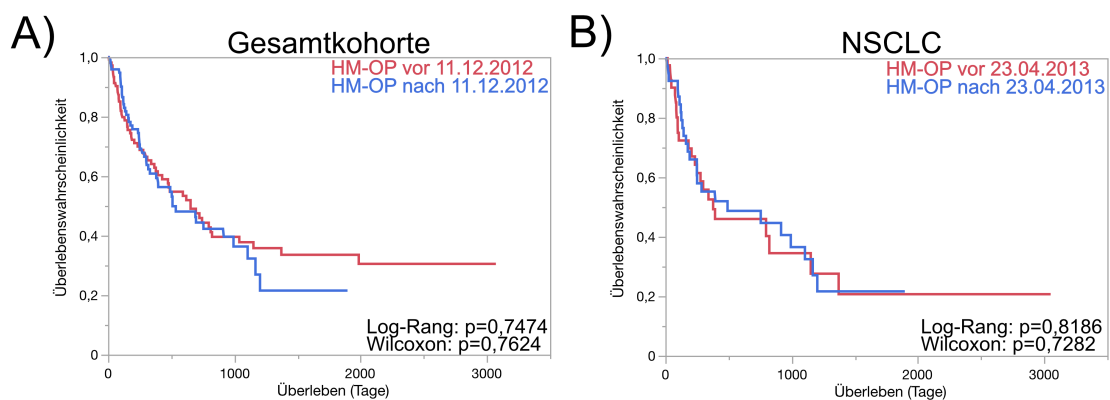
Kaplan-Meier-Kurve mit der Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit Hirnmetastasen eines Melanoms in Abhängigkeit der PD-L1-Expression ($n=19$). Es zeigt sich kein signifikanter

Überlebensunterschied. Die P-Werte des Wilcoxon- als auch Log-Rang-Tests sind innerhalb des Graphen angegeben.



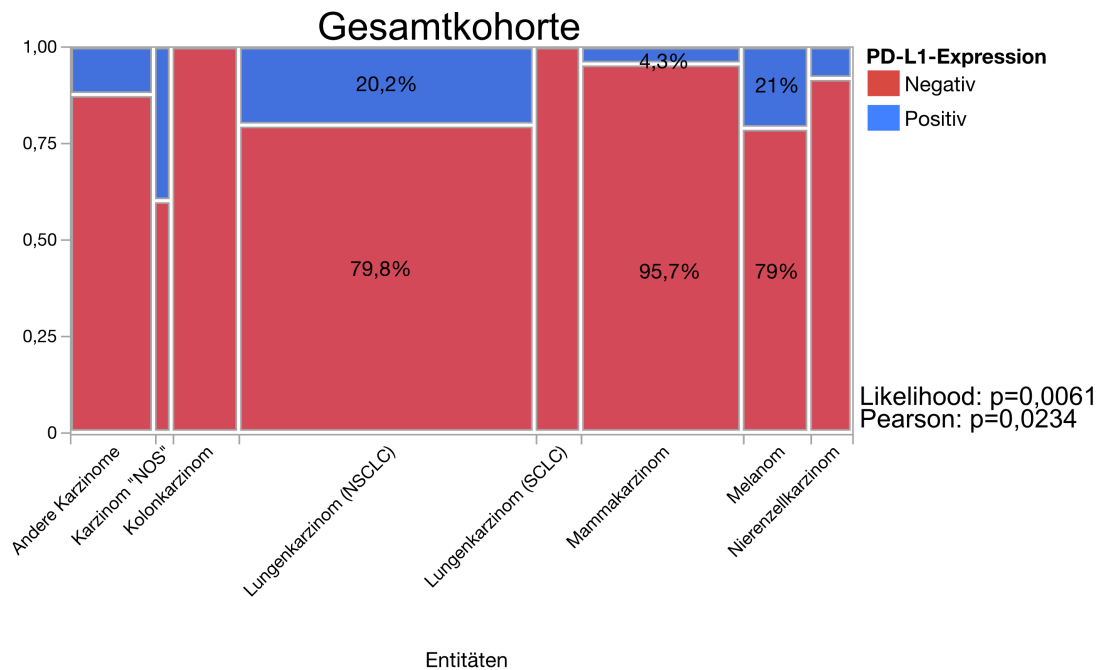
Appendix Abbildung 4: Korrelation zwischen Chemotherapie-Zyklen vor Hirnmetastasen-OP und CD8-positiven Zellen in der kombinierten Subkohorte

Korrelationsanalyse von CD8-infiltrierenden Zellen mit der Anzahl von Chemotherapie-Zyklen vor Hirnmetastasen-OP in der kombinierten Subkohorte (n=21). Es zeigt sich eine signifikante negative Korrelation zwischen den beiden Parametern. Somit könnten vorherige Chemotherapie-Zyklen einen Einfluss auf die Immunzellinfiltration in Hirnmetastasen haben. Der Korrelationskoeffizient und P-Wert wurden durch den nicht-parametrischen Spearman-p berechnet. Die Ergebnisse sind innerhalb des Graphen aufgeführt.



Appendix Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Hirnmetastasen-Operation in der Gesamtkohorte und Subkohorte NSCLC

(A, B) Kaplan-Meier-Kurven mit der Überlebenswahrscheinlichkeit für die Gesamtkohorte (A, n=244) als auch die Subkohorte NSCLC (B, n=94) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Hirnmetastasen-Operation. Gruppeneinteilung wurde Anhand der medianen Aufteilung des Zeitpunkts der Hirnmetastasen-Operation gewählt (medianer Zeitpunkt für die GK: 11.12.2021, für NSCLC: 23.04.2013). P-Werte sind innerhalb der Kurven angegeben. Es zeigten sich keine signifikanten Überlebensunterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen.



Appendix Abbildung 6: Anteil negativer und positiver Hirnmetastasen für PD-L1 nach Entität

Kontingenztafel zur Darstellung der PD-L1-positiven Hirnmetastasen innerhalb der unterschiedlichen Entitäten. Die Prozentwerte für die Entitäten NSCLC, Mammakarzinom und Melanom sind innerhalb der Tabelle angegeben. Der Anteil der PD-L1-positiven Hirnmetastasen der einzelnen Entitäten lauten: Andere Karzinome 12,5% (n=3/24), Karzinom „NOS“ 40% (n=2/5), Kolonkarzinom 0% (n=0/19), NSCLC 20,2% (n=17/84), SCLC 0% (n=0/13), Mammakarzinom 4,3% (n=2/46), Melanom 21% (n=4/19), Nierenzellkarzinom 8,3% (n=1/12) und Gesamtkohorte 13,1% (n=29/222). P-Werte des Likelihood-Verhältnis χ^2 als auch des Pearson χ^2 sind jeweils neben dem Graphen angegeben.

Halo-Einstellungen für Multiplex	Färbungen	
	CD8	Ki-67
Algorithmus	Multiplex IHC v1.2	Multiplex IHC v1.2
Nuclear Contrast Threshold (0-1)	0,52	0,5
Minimum Nuclear OD (0-1)	0,22	0,19
Nuclear Segmentation Aggressiveness (0-1)	0,2	0,841
RGB Stain Settings	0,621;0,804;1,084	0,361;0,462;0,708
Stain Nuclei Positive Threshold (0-1)	0,6	0,6

Tabelle 8: Repräsentative Übersicht über die wichtigsten Einstellungen in der Halo Software für die Multiplex-Analyse

Repräsentative Übersicht über die wichtigsten Einstellungen in der Halo Software für die Multiplex-Analyse. Über den Nuclear Contrast Threshold wird der benötigte Kontrast zur Zellerkennung eingestellt. Über den Minimum Nuclear OD wird die mindestens benötigte Intensität der Färbung eingestellt, die benötigt wird, um Zellkerne zu erkennen. Über diese Einstellung können auch schwach gefärbte Artefakte ausgeschlossen werden. Nuclear Segmentation Aggressiveness passt an, wie stark räumlich nahe Zellkerne voneinander getrennt werden. Über die RGB-Einstellungen werden die Farben der unterschiedlichen Färbungen eingestellt. Dafür wird ein „Pipetten-Werkzeug“ genutzt, das man oberhalb einer positiv gefärbten Struktur führt und damit automatisch die passenden RGB-Werte der Färbungen eingestellt werden. Der Stain Nuclei Positive Threshold stellt ein, welche OD mindestens erreicht werden muss, damit ein Zellkern als positiv für die Färbung gewertet wird. OD = optical density; RGB = Rot, Grün und Blau

Halo-Einstellungen für Area Quantification	Färbungen		
	CD31	Kollagen I	FAP
Algorithmus	Area Quantification v1.0	Area Quantification v1.0	Area Quantification v2.1.3
RGB Einstellung DAB-Stain	0,402;0,520;0,674	0,254;0,357;0,537	0,286;0,429;0,734
DAB Min OD (0-1 bzw. 0-2,5)	0,2479 – 1	0,1594 – 1	0,5546 – 2,5
RGB Einstellung Hämatoxylin	0,327;0,283;0,192	0,286;0,257;0,164	0,369;0,320;0,192
Hämatoxylin Min OD (0-1 bzw. 0-2,5)	0,1892 - 1	0,176 - 1	0,5093 – 2,5

Tabelle 9: Repräsentative Übersicht über die wichtigsten Einstellungen in der Halo Software für die Area Quantification-Analyse

Repräsentative Übersicht über die wichtigsten Einstellungen in der Halo Software für die Area Quantification-Analyse. Über die RGB-Einstellungen werden die Farben der unterschiedlichen Färbungen eingestellt. Dafür wird ein „Pipetten-Werkzeug“ genutzt, das man oberhalb einer positiven gefärbten Struktur führt und damit automatisch die passenden RGB-Werte der Färbungen eingestellt werden. Über Min OD wird die Schwelle eingestellt, ab der eine Färbung als negativ oder positiv gewertet wird. Für CD31 und Kollagen I konnte eine OD von 0-1 gewählt werden. Für FAP konnte aufgrund einer neueren Algorithmus-Version die OD zwischen 0 und 2,5 eingestellt werden. OD = optical density; RGB = Rot, Grün und Blau; DAB = 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung Hydrat

15 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Charakterisierung des zellulären Mikromilieus in humanen Hirnmetastasen

im Neurologischen Institut (Edinger-Institut) unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. Patrick Nikolaus Harter mit Unterstützung durch Dr. Katharina Filipski ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden nicht veröffentlicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

16 Danksagung

17 Lebenslauf