

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Allgemeine Pathologie
und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München
(Klinikum rechts der Isar)

**Prognostische Bedeutung des EGF-Rezeptor-Signalweges
und Tumor-infiltrierender Lymphozyten
beim Magenkarzinom**

Lea Vanessa Reuter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. B. Luber
2. Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler

Die Dissertation wurde am 07.01.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.02.2014 angenommen.

*Für
meine
Familie*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1 Einleitung	3
1.1 Das Magenkarzinom.....	3
1.1.1 Klassifikation der Magenkarzinome.....	5
1.1.2 Therapeutische Strategien.....	7
1.2 Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalkaskaden.....	8
1.2.1 Die Familie der Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren.....	9
1.2.2 Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor und seine Liganden.....	10
1.2.3 Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor und maligne Erkrankungen.....	12
1.3 β -Catenin.....	14
1.3.1 Aufbau und Funktionen.....	14
1.3.2 Die Rolle von β -Catenin im Wnt-Signalweg.....	14
1.4 Der Proliferationsmarker MIB1.....	15
1.4.1 Prognostische Bedeutung von Proliferationsmarkern.....	15
1.4.2 Ki-67.....	16
1.4.3 MIB1.....	16
1.5 Immunzellen und der CD3-Rezeptor.....	17
1.5.1 Tumor-infiltrierende Lymphozyten.....	17
1.5.2 Der CD3-Rezeptor.....	18
1.6 Zusammenhang zwischen den untersuchten Markern.....	19
1.7 Fragestellung.....	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material.....	21
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Workflow.....	24
2.2.2 Tissue Micro Arrays.....	25
2.2.3 Immunhistochemische Färbungen.....	25
2.2.4 Auswertung am Lichtmikroskop.....	26
2.2.5 Auswertung mittels Definiens-Computer-Software.....	28
2.2.6 Statistische Auswertungen.....	29
3 Ergebnisse	31
3.1 Gesamtkollektiv und Kollektive einzelner untersuchter Färbungen.....	31
3.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	38
3.2.1 Kreuztabellen.....	43
3.2.2 Korrelationen.....	45
3.2.3 Kaplan-Meier-Kurven.....	47

3.2.4 Uni- und multivariate Cox-Regressionen.....	59
4 Diskussion.....	62
4.1 Bedeutende Prognosefaktoren.....	62
4.2 Kritische Bewertung der verwendeten Materialien und Methoden.....	66
4.2.1 Immunhistochemische Färbungen	66
4.2.2 Tissue Micro Arrays.....	67
4.2.3 Definiens-Computer-Software.....	69
4.3 Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor und seine aktivierte Form (Y1068).	70
4.4 Der β -Catenin-Nachweis.....	77
4.5 Der MIB1-Nachweis.....	80
4.6 Tumor-infiltrierende Lymphozyten.....	84
5 Zusammenfassung	88
6 Literaturverzeichnis.....	90
7 Abbildungsverzeichnis.....	101
8 Tabellenverzeichnis.....	103
9 Anhang.....	104
9.1 Färbeprotokolle der untersuchten Antikörperfärbungen.....	104
10 Danksagungen.....	106

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDH1	<i>Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1</i>
CK	Casein-Kinase
cm	Zentimeter, 10^{-2} m
d.h.	das heißt
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
Dsh	<i>Dishevelled</i> , ein Phospho-Protein
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ErbB	<i>Erythroblastosis homologue B</i>
FAP-Syndrom	<i>Familial Adenomatous Polyposis Coli Syndrome</i>
Fc-Teil	konstanter Teil von Immunglobulinen
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
fmol	Femtomol, 10^{-15} mol
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
Fz-Family	<i>Frizzled-Family</i> , Gruppe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren
Fz-Receptor	<i>Frizzled-Receptor</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor binding protein 2</i>
GSK	<i>Glycogen Synthase Kinase</i>
HER	<i>Human EGFR-related Receptor</i>
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
Ki-67	Name eines monoklonalen Antikörpers gerichtet gegen ein Kernantigen
LRP	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein</i>
MALT	<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i>
mg	Milligramm, 10^{-3} g
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIB1	<i>Molecular Immunology Borstel 1</i>
mm	Millimeter, 10^{-3} m
µm	Mikrometer, 10^{-6} m
p53	ein Tumorsuppressor-Gen
PC	<i>Personal Computer</i>

pEGFR	<i>phosphorylated Epidermal Growth Factor Receptor</i>
PI	<i>Proliferationsindex</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
RTK	<i>Rezeptor-Tyrosinkinase</i>
Sos	<i>Son of Sevenless</i>
Tab.	<i>Tabelle</i>
TCF	<i>T-Cell-Factor</i>
TCR	<i>T-Cell-Receptor</i>
TGF-α	<i>Transforming Growth Factor-α, Transformierender Wachstumsfaktor-α</i>
TIF-Format	<i>Tagged Image File-Format</i>
TMA	<i>Tissue Micro Array</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TNM	<i>Tumor, (Lymph) Node, Metastasis</i>
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Wnt	<i>ein Ligand, Signalprotein im Wnt-Signalweg; zusammengesetzt aus Wg für <i>wingless</i> und Int für <i>integration site</i></i>

Weitere Abkürzungen finden sich direkt im Text erklärt.

1 Einleitung

1.1 Das Magenkarzinom

Weltweit erkranken jährlich fast eine Million Menschen an einem Magenkarzinom (Jemal et al., 2011). Die interkontinentalen und geschlechtsspezifischen Unterschiede variieren dabei stark (Jemal et al., 2011). In Nordamerika beträgt die Inzidenz für Frauen 3,4 pro 100.000, wohingegen für Männer in Asien diese bei 26,9 pro 100.000 liegt (Kamangar et al., 2006). Die altersstandardisierte Inzidenz in entwickelten Ländern beträgt aktuell 16,7 pro 100.000 Personen (Jemal et al., 2011). Die altersstandardisierte Mortalität beläuft sich derzeit auf 10,4 pro 100.000 Einwohner jährlich (Jemal et al., 2011). Insgesamt stellen Malignome des Magens in entwickelten Ländern die vierthäufigste Krebserkrankung dar (Ferlay et al., 2010). Die Prognosen der Patienten sind auch in Deutschland nach primär als kurativ anzusehender Operation mit einer durchschnittlichen Fünf-Jahres-Überlebensrate um 30% weiterhin sehr schlecht (Galizia et al., 2007).

Die international stark schwankenden Patientenzahlen sind vermutlich sowohl auf genetische Einflüsse wie auch auf regional differierende Umweltfaktoren, insbesondere Ernährungsgewohnheiten, zurückzuführen (Parkin, 2004; Armstrong and Doll, 1975). Vor allem für Patienten mit sehr frühem Erkrankungsalter scheint das Vorliegen einer genetischen Prädisposition von Bedeutung zu sein. Das mittlere Erkrankungsalter der Frauen in westlichen Ländern lässt sich bei etwa 75 Jahren festlegen. Männer erkranken durchschnittlich um das 70-ste Lebensjahr (Hausmann et al., 2010). Etwa bei 10% aller Patienten kann eine familiäre Häufung von Magenkarzinomen gefunden werden (Keller et al., 2005).

Eine der Ursachen für das insgesamt schlechte Gesamtüberleben der Patienten stellt die häufig verzögerte Diagnosestellung in westlichen Ländern dar. Oft werden Magenkarzinome erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, da tumortypische Frühsymptome fehlen. Spätsymptome, wie Müdigkeit, Leistungsknick, Völlegefühl und Übelkeit, äußern sich sehr unspezifisch und führen den Patienten oft spät zum Arzt (Sutter et al., 2004).

Eine differenziertere Betrachtung des allgemeinen Rückganges der Erkrankungshäufigkeit innerhalb der letzten 30 Jahre lässt erkennen, dass sich dieser vor allem auf Magenkarzinome vom intestinalen Subtyp mit Lokalisation im distalen Abschnitt des Magens beschränkt. Dem gegenüber steht eine relative Zunahme niedrig differenzierter Karzinome in proximalen Abschnitten des Magens (Mattioli et al., 2007). Die Ursachen dieser Verschiebung sind derzeit noch nicht vollständig geklärt. Jedoch wird vor allem der Therapie des für eine Gastritis Typ B verantwortlich gemachten Bakteriums *Helicobacter pylori* eine große Bedeutung beigemessen.

Dieses gram-negative Bakterium wurde 1983 als ursächlich für chronische Gastritiden beschrieben. Als säureinstabiler Mikroorganismus nutzt es eine ökologische Nische zwischen dem schützenden gastralen Schleim und der Magenschleimhautoberfläche (Warren, 1983). Dort übt es einen zytopathogenen Effekt auf die Schleimhautzellen aus. Toxische Radikale aus eingewanderten Granulozyten führen zusätzlich zu erhöhter Zellregeneration und -proliferation. In Studien konnte gezeigt werden, dass eine überstandene bzw. akute Infektion mit *Helicobacter pylori* das Risiko an einem außerhalb der Kardia lokalisierten Magenkarzinom zu erkranken um ein Mehrfaches erhöht (Helicobacter and Cancer Collaborative Group, 2001).

Neben dem Bakterium *Helicobacter pylori* gelten als exogene Risikofaktoren vor allem ein übermäßiger Genuss von Alkohol und Nikotin, aber auch andere alimentäre Faktoren wie der Konsum nitrathaltiger, geräucherter oder gesalzener Speisen (Kamangar et al., 2006; Trédaniel et al., 1997). Die in der Nahrung enthaltenen Nitrat- und Nitritsalze werden durch Magenbakterien in kanzerogene Nitrosamine umgewandelt. Nitrosamine sind ebenso in mit Bakterien oder Pilzen verunreinigten Nahrungsmitteln zu finden. Auch durch zu geringen Verzehr von frischem Obst und Gemüse kann das Risiko an einem Magenkarzinom zu erkranken steigen (Crew and Neugut, 2006). Insbesondere bei Rauchern wurde dieser Einfluss beobachtet (Nouraie et al., 2005).

Von den exogenen Einflüssen abzugrenzen sind endogene Faktoren, wie die chronisch-atrophische Gastritis Typ A, eine perniziöse Anämie, eine Achlorhydrie und rezidivierende *Ulcera ventriculi*, die das Risiko deutlich erhöhen. Nach Teilresektionen des Magens, insbesondere Billroth-II-Operationen, sowie beim *Morbus Ménétrier* oder adenomatösen Veränderungen werden Magenkarzinome gehäuft beobachtet. Adenome im Bereich des Magens werden als Präkanzerosen angesehen. Sie werden zunehmend in höherem Lebensalter beobachtet. Es werden tubuläre von villösen und seltenen gastralen Adenomen unterschieden. Ein Übergang in ein Karzinom findet sich bei tubulären Formen in 2-5%. Diese spielen daher als präkanzeröse Läsionen eine untergeordnete Rolle. Villöse Adenome stellen sich meist als große Polypen dar und zeigen in etwa der Hälfte der Fälle eine maligne Entartung. Ein noch höheres Entartungspotential weisen die sehr selten vorkommenden gastral differenzierten Adenome auf (Borchard, 2004).

Adenokarzinome stellen mit einem Anteil von über 95% aller malignen Erkrankungen des Magens die weitaus häufigste Entität dar (Mattioli et al., 2007). Darüber hinaus werden im Bereich des Magens seltene von der Magenschleimhaut ausgehende MALT-Lymphome, die größtenteils zu den niedrig malignen *Non-Hodgkin*-Lymphomen gezählt werden, und einige weitere Malignome, wie Plattenepithelkarzinome und Sarkome, beobachtet. In der hier vorliegenden Arbeit wurden ausnahmslos Adenokarzinome untersucht.

Adenokarzinome sind teils gehäuft in Familien mit genetischen Prädispositionen zu finden. Syndrome, die in diesem Zusammenhang zu nennen sind, sind beispielsweise das *Hereditary Diffuse-Type Gastric Cancer Syndrome*, bei welchem sich Mutationen des *CDH1*-Genes, kodierend für E-Cadherin, finden, das *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome*, bei dem Keimzellmutationen in Reparaturgenen gefunden werden, das *Li-Fraumeni-Syndrom*, mit Nachweis von Keimzellmutationen des Tumorsuppressor-Genes *p53* sowie das *Familial Adenomatous Polyposis Coli Syndrome (FAP-Syndrom)*, das zu multiplen Adenomen auch im Magen führt und durch Veränderungen des (*Adenomatous Polyposis Coli*-) *APC*-Genes gekennzeichnet ist. Darüber hinaus sind weitere Syndrome, wie das Peutz-Jeghers-Syndrom und die Juvenile Polyposis bekannt, die beide autosomal-dominant vererbt werden (Keller et al., 2005).

Für die Entwicklung eines Magenkarzinoms sind nicht einzelne sondern multiple genetische und epigenetische Veränderungen Voraussetzung. Diese führen zu molekularen Strukturveränderungen von Onko- und Tumorsuppressor-Genen, Zell-Zyklus-Regulations-Molekülen, Zell-Adhäsionsmolekülen und DNA-Reparatur-Genen (Tahara, 1995). Folgen sind diverse Einflüsse auf Zellfunktionen wie die Zelladhäsion, Signaltransduktion, Zelldifferenzierung, Zellentwicklung, Gentranskription und die Reparatur von DNA-Schäden (Keller et al., 2005). Beispielsweise zu nennen ist der Verlust der Heterozygotität (*Loss of Heterozygosity*) bzw. Mutationen des *APC*-Genes, wie sie gehäuft beim oben erwähnten *FAP-Syndrom* zu finden sind. Das Genprodukt bindet an das multifunktionelle Protein β -Catenin, dessen Konzentration in gesunden Zellen streng kontrolliert und auf einem geringen Niveau gehalten wird. Erhöhte Konzentrationen in den Zellkernen führen über Zwischenschritte zur Veränderung der Gen-Expression. Sie werden in unterschiedlicher Häufigkeit in Magenkarzinomen nachgewiesen. Ein Beispiel für Protoonkogene sind Gene, die für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren kodieren. Allen voran zu nennen sind der *Epidermal Growth Factor* (EGF; Epidermaler Wachstumsfaktor), der *Transforming Growth Factor- α* (TGF- α ; Transformierender Wachstumsfaktor- α) sowie einer der zugehörigen Rezeptoren, der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR; Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) (Keller et al., 2005).

1.1.1 Klassifikation der Magenkarzinome

Zur Einteilung der Magenkarzinome werden verschiedene, sich teils ergänzende Klassifizierungssysteme verwendet. Eine erste Einschätzung eines derartigen Tumors erfolgt meist bereits bei der als nach heutigem Standard obligatorisch einzustufenden Ösophago-gastro-duodenalen Spiegelung durch den Gastroenterologen. Bei dieser Untersuchung können bereits erste Angaben zur Lokalisation, Größe und Wuchsform des Tumors gemacht werden. Die Tumore werden unterteilt in Karzinome des Antrum- und Pylorusbereiches (distales

Magendrittel), wo über 50% der Magenkarzinome zu finden sind, des Fundus- und Korpusbereiches (mittleres Magendrittel), in dem 20%-30% lokalisiert sind und des Kardiabereiches (proximales Magendrittel), in dem 10%-20% dieser Tumore gefunden werden. Diese makroskopische Einordnung ist sowohl für Entscheidungen über mögliche Therapiestrategien als auch für die jeweilige Prognose der Patienten von Bedeutung. Bei Diagnosestellung liegen bei über 80% der Patienten solitäre Karzinome vor. In 10%-20% werden multizentrische Tumorherde diagnostiziert (Ruf et al., 2001).

Eine weitere makroskopische Einteilung kann meist ebenfalls im Rahmen einer endoskopischen Untersuchung mit Hilfe der Borrmann-Klassifikation erfolgen. An Hand der Beurteilung des Tumorwachstums werden vier verschiedene Wuchsformen (I: polypenartiges Wachstum, II: schüsselförmiges ulzeriertes Wachstum, scharf begrenzt, III: ulzeriertes Wachstum, unscharf begrenzt, IV: diffus infiltrierendes Wachstum) unterschieden (Siewert et al., 2006).

Eine weitere histologische Einteilung existiert bereits seit 1965 und hat bis *dato* nicht an Aktualität verloren (Laurén, 1965). Diese Klassifikation nach Laurén unterscheidet drei Typen. Dazu zählen der intestinale Typ mit klar abzugrenzendem Wachstum und insgesamt besserer Prognose, der diffuse Typ mit meist infiltrativem Wachstum und schlechterer Prognose und Mischtypkarzinome, die klinisch wie Karzinome vom diffusen Typ einzustufen sind. Karzinome vom intestinalen Typ gelten als höher differenziert und werden auch als tubulär wachsende Karzinome beschrieben. Zellen diffuser Karzinome zeigen oft eine intrazelluläre Ansammlung von Muzintröpfchen, durch die ihr Zellkern so an den Rand gedrückt wird, dass sie als Siegelringzellen bezeichnet werden. Interessanterweise werden gehäuft bei jüngeren Patienten Adenokarzinome vom diffusen Typ beobachtet. Insgesamt sind verhältnismäßig mehr Frauen von diesem Subtyp betroffen (Borchard, 2004).

Weltweit ist die von der *Union for International Cancer Control* (UICC) zuletzt im Jahre 2009 aktualisierte und 2010 in deutscher Sprache erschienene UICC-Stadieneinteilung am weitesten verbreitet. Unter Einbezug der Tumortiefenausdehnung (T), des Lymphknotenstatus (N) und der Fernmetastasierung (M) werden verschiedene Stadien unterschieden, die mit der Prognose der Patienten assoziiert sind (UICC, 2009). Für prognostische Aussagen sind im klinischen Alltag zusätzlich der Resektionsstatus (R) und das *Tumor-Grading* (G) von Bedeutung und für therapeutische Vorgehensweisen entscheidend.

1.1.2 Therapeutische Strategien

Für die kurative Therapie des Magenkarzinoms ist ein adäquates onkologisch-chirurgisches Vorgehen unabdingbar (Lee et al., 2008). Eine operative Therapie umfasst die Resektion des Primärtumors unter Einhaltung eines weitreichenden Sicherheitsabstandes. Der entsprechende Sicherheitsabstand beträgt 5 cm bei Karzinomen vom intestinalen Typ und 10 cm nach proximal bei Karzinomen vom diffusen Typ nach Laurén bei einer Messung *in situ* sowie eine systematische Lymphadenektomie. Die Ausdehnung der Lymphknotenresektion (D1- bzw. D2-Resektion) bei totaler bzw. partieller Gastrektomie ist bislang noch umstritten. Eine weitreichende D2-Resektion gilt in Japan beispielsweise als Standard, wohingegen in westlichen Ländern keine einheitlichen Empfehlungen existieren (Bonenkamp et al., 1999). Die Indikationsstellung zur totalen oder subtotalen Gastrektomie richtet sich nach der Tumorlokalisation, der histomorphologischen Klassifizierung und der individuellen Risikobeurteilung. Eine totale Gastrektomie ist in der Regel bei Karzinomen des diffusen Typs nach Laurén aller Lokalisationen, mit Ausnahme von Frühkarzinomen im distalen Magendrittel, sowie bei Tumoren des intestinalen Typs mit Lokalisationen im oberen und mittleren Magendrittel erforderlich. Sofern eine R0-Resektion, kein verbleibender Resttumor und tumorfreie Resektionsränder, erzielt werden können, ist eine sich anschließende *adjuvante* Therapie nicht als zwingend erforderlich anzusehen. Cunningham und sein Team konnten jedoch zeigen, dass Patienten mit resektablen Magenkarzinomen auch von einer perioperativen Chemotherapie, im Sinne eines verlängerten progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens, profitieren (Cunningham et al., 2006). Kann bei einer Tumorresektion keine R0-Situation erreicht werden, ist es in einigen Fällen möglich, diese durch eine Nachresektion zu erzielen. Eine R2-Resektion, entsprechend einem makroskopischen Resttumor, gilt als primär palliative Situation und erfordert, nach heutigem Stand, wie auch eine nicht nachresezierbare R1-Situation zur "vollständigen Heilung" eine *adjuvante* Therapie in Form einer Chemo- oder Radiotherapie bzw. einer zusätzlichen Immuntherapie (Galizia et al., 2007). *Adjuvante* Therapieschemata bestehen vor allem aus der intravenösen Verabreichung von Folinsäure und 5-Fluorouracil. Alternativ findet die Kombination dieser beiden Medikamente mit Platinderivaten, wie Cisplatin oder Paclitaxel, Anwendung. Beide Verfahren können mit einer Radiotherapie kombiniert werden (Preiß et al., 2012). Seit 1989 werden *neoadjuvante*, d.h. präoperativ verabreichte Chemotherapien im Rahmen unterschiedlicher Studien eingesetzt, um die Prognose von Patienten mit Magenkarzinomen zu verbessern. Nur etwa 30% der Patienten profitieren jedoch von dieser Therapie (Keller et al., 2005). Etabliert sind für die *neoadjuvante* Therapie das CF-Schema, bestehend aus Cisplatin und 5-Fluorouracil, sowie das ECF-Schema, bei dem zusätzlich Epirubicin zum Einsatz kommt (Preiß et al., 2012). Darüber hinaus gewinnen

zielgerichtete molekulare therapeutische Verfahren immer mehr an Bedeutung. Therapien mit Antikörpern (AKn), gerichtet gegen Zellproteine, beispielsweise aus der Familie des EGFRs, finden derzeit in klinischen Studien Anwendung. Trastuzumab, ein monoklonaler AK gegen den humanen EGFR2 (HER2), der in der Therapie HER2-positiver Mammakarzinome als Standard etabliert ist, wurde bereits auf seine Einsatzmöglichkeit als *First-line-Therapy* für fortgeschrittene Magenkarzinome untersucht und gilt als Therapieoption für Patienten mit HER2-positiven Karzinomen (Bang et al., 2010). Der EGFR selber war der erste Wachstumsfaktor-Rezeptor, der als Zielmolekül für die Krebstherapie vorgeschlagen worden ist. 20 Jahre nach Beginn der Entwicklung von Medikamenten, gerichtet gegen den EGFR, sind vier verschiedene EGFR-Antagonisten erhältlich, die zur Therapie metastasierter epithelialer Tumore eingesetzt werden. Jeweils zwei werden monoklonalen Anti-EGFR-AKn bzw. kleinmolekularen Tyrosinkinase-Inhibitoren zugeordnet (Ciardiello and Tortora, 2008). Vertreter monoklonaler AK sind Cetuximab und Panitumumab, die an die extrazelluläre Domäne des inaktivierten EGFRs binden. Sie konkurrieren mit den Liganden um die Rezeptorbindung und reduzieren so die Liganden-induzierte EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität. Kleinmolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie Erlotinib und Gefitinib, binden reversibel an eine intrazelluläre katalytische Domäne der EGFR-Tyrosinkinase. Dadurch werden die Autophosphorylierung sowie die nachgeschalteten Signalwege unterbrochen. Zusätzlich befinden sich viele kleinmolekulare EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren in klinischer Erprobung (Ciardiello and Tortora, 2008; Grünwald and Hidalgo, 2003). Einen anderen ergänzenden Ansatzpunkt stellt die Therapie mit Bevacizumab, einem gegen den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) gerichteten AK, der die Gefäßneubildung hemmt, dar. In einer Phase III-Studie konnte bislang jedoch nur für das progressionsfreie Überleben und nicht für das Gesamtüberleben der Patienten eine Prognoseverbesserung aufgezeigt werden (Kang et al., 2010). Darüber hinaus wird ein trifunktionaler AK namens Catumaxomab untersucht. Dessen Wirkung erfolgt durch Bindung an das Oberflächenantigen *Epidermal Cell Adhesion Molecule* auf Karzinomzellen, an CD3-Antigene speziell auf T-Zellen und an den Fc-Teil auf akzessorischen Zellen, wie Makrophagen und Natürlichen Killerzellen. Es kommt durch die Aktivierung des Immunsystems zu einer Elimination von Tumorzellen aus der Bauchhöhle und nachfolgend zur Verringerung der Punktionshäufigkeit, der durch die peritonealen Tumorzellen bedingten Aszites (Lordick et al., 2008).

1.2 Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalkaskaden

Die Aufrechterhaltung eines zellulären Gleichgewichts, die Homöostase vielzelliger Organismen, hängt entscheidend von der Integration einer Vielzahl intra- und extrazellulärer Signale, denen jede einzelne Zelle während ihres Lebens ausgesetzt ist, ab. Eine Fülle löslicher Faktoren

reguliert den Aktivitätsstatus von Rezeptoren, die an komplexe Signaltransduktionsnetzwerke gekoppelt sind und in ihrer Summe die biologische Antwort jeder einzelnen Zelle des Organismus entscheidend mitbestimmen (Prenzel et al., 2001). Sie bilden die Voraussetzung für Zellmotilität, Proliferations- und Differenzierungsvorgänge sowie für das Überleben aller Zelltypen. Bereits geringfügige Fehler innerhalb der komplexen Signalnetzwerke können gravierende Folgen, wie eine übermäßige Zellproliferation bis zur Entstehung von malignen Neoplasien nach sich ziehen. Eine zentrale Rolle innerhalb dieser Signalnetzwerke nehmen die seit einiger Zeit in den Mittelpunkt vieler Untersuchungen gerückten Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKn) ein (Seedorf, 1995). Es handelt sich hierbei um transmembranäre Moleküle, die über extrazelluläre Liganden aktiviert werden und über Auto-Phosphorylierung intrazellulärer Aminosäurereste (Tyrosinreste) mit sich anschließender Phosphorylierung von *Target-Proteins* zur Integration und Diversifizierung von extrazellulären Signalen beitragen (Van der Geer and Hunter, 1994). Sie werden in verschiedene Subklassen eingeteilt, die sich an Hand charakteristischer Strukturmerkmale, insbesondere in extrazellulären Molekülabschnitten, unterscheiden (Ullrich and Schlessinger, 1990). Eine zentrale Rolle innerhalb dieser Subklassen nimmt die Familie der EGFRen ein.

1.2.1 Die Familie der Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren

Der EGFR, der auf Grund seiner Homologie zum *Avian Erythroblastosis Virus* seine Bezeichnung erhalten hat, gehört zur Familie der ErbB-RTKn, der Typ-1-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Citri and Yarden, 2006; Downward et al., 1984; Frykberg et al., 1983). Diese RTK besitzen sowohl innerhalb der Entwicklung normaler Zellen wie auch bei einer Vielzahl pathophysiologischer Prozesse eine Schlüsselrolle. Die Familie beinhaltet vier eng miteinander verwandte Typ I Transmembranrezeptoren: den ErbB1/EGFR, HER2 (ErbB2/neu), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4) (Riese and Stern, 1998). HER3 und HER4 sind häufig in Kombination mit dem EGFR an der Bildung von Heterodimeren und damit der Aktivierung des Rezeptors beteiligt. HER2 ist ein viel untersuchter Rezeptor, der bereits in der Mammakarzinomforschung und -therapie enorme Bedeutung gewonnen hat. Er wird in 10% der Magenkarzinome überexprimiert (Mason and Gullick, 1995). Der EGFR war das erste Signalprotein an der Zelloberfläche und Protoonkogenprodukt, das durch molekulargenetische Methoden charakterisiert wurde (Ullrich et al., 1984). Das zugehörige Gen ist auf Chromosom 7p12 lokalisiert. Der Rezeptor wird in vielen epithelialen Zellen sowie sich davon ableitenden Karzinomen, aber auch in nicht-epithelialen Geweben, wie glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Nervenzellen, exprimiert (Gamboa-Dominguez et al., 2004).

1.2.2 Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor und seine Liganden

Der EGFR ist ein glykosyliertes, 170 kDa schweres Protein bestehend aus einer Polypeptidkette von 1186 Aminosäuren. Als transmembranäres Molekül setzt er sich aus einem extrazellulären Abschnitt mit Ligandenbindungsdomäne, einem lipophilen transmembranären Bereich sowie einer intrazellulären hoch konservierten Region zusammen (Holbro et al., 2003). Dieser intrazelluläre Abschnitt des Rezeptors, der sich im C-terminalen Bereich des Moleküls befindet, nimmt eine wesentliche signalvermittelnde Funktion ein. Darüber hinaus werden ihm wichtige Aufgaben wie die Mitwirkung bei der Rezeptorinternalisierung, der Herunterregulation des Rezeptors und der Endozytose zugeschrieben (Bishayee et al., 1999; Sorkin et al., 1996).

Die extrazelluläre Domäne wird in vier Subdomänen (I, II, III und IV) unterteilt (Bishayee, 2000; Ullrich and Schlessinger, 1990). Die Subdomänen I und III bestehen aus Leucin-reichen Regionen und fungieren als Ligandenbindungsstellen. Die beiden anderen enthalten Cystein-reiche Domänen (Ogiso et al., 2002). Die Subdomänen I, II und III bilden eine Ligandenbindungstasche. Der "Prototyp" der ErbB-Rezeptoren ist in seiner monomeren Zustandsform durch eine Interaktion der Domäne II mit der Domäne IV autoinhibiert. Dies wird erreicht, indem die Subdomänen I und III durch die Interaktion der beiden erstgenannten Subdomänen in einem Abstand zueinander gehalten werden, der eine gleichzeitige Ligandenbindung an beide Subdomänen verhindert. In der Liganden-gebundenen Form nähern sich die Subdomänen I und III an. Es resultiert eine größere Distanz zwischen den Subdomänen II und IV, was die Zugänglichkeit mit der korrespondierenden Subdomäne II des Dimerisierungspartners verstärkt (Citri and Yarden, 2006). Die Dimerisierung kann, wie bereits erwähnt, in Form eines Homodimeres mit einem zweiten aktivierten EGFR oder als Heterodimer mit einem weiteren aktivierten Mitglied der EGFR-Familie geschehen (Pagès et al., 2005). Auf Grund der intrinsischen Tyrosinkinase-Aktivität folgt eine Transphosphorylierung der Rezeptoren (Buhrow et al., 1983; Cohen et al., 1982). Diese beschränkt sich auf die carboxyterminalen Abschnitte, die mehrere Tyrosinreste enthalten (Olayioye et al., 2000).

Die Vielfalt der Liganden, die zu einer derartigen Rezeptor-Aktivierung führen können, ist groß. Einige dieser Moleküle, wie der EGF, Amphiregulin und der TNF- α , binden gezielt an den EGFR. Andere wie beispielsweise der Heparin-bindende EGF-ähnliche Wachstumsfaktor binden in Abhängigkeit von ihrer Rezeptor-Affinität und Spezifität sowohl an den EGFR als auch an den HER4 (siehe Abb.1, S. 11) (Fiske et al., 2009; Strachan et al., 2001). Vorläufermoleküle von Liganden befinden sich zunächst in der Zellmembran verankert und werden durch Proteolyse freigesetzt (Massagué and Pandiella, 1993). Gemeinsam ist allen an den EGFR-bindenden Liganden eine EGF-Domäne mit sechs Cystein-Resten, angeordnet in Form von drei intramolekularen Disulfidbrücken, die an der Rezeptorbindung mitwirken (Prenzel et al., 2001).

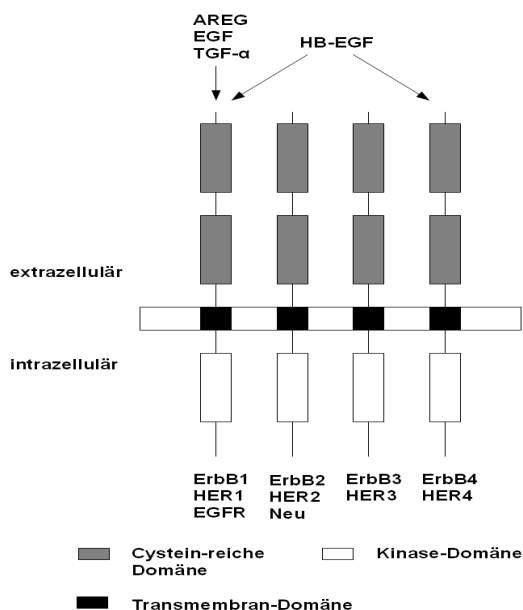


Abbildung 1: Mitglieder der Familie humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptoren und beispielhaft einige zugehörige Liganden: AREG: Amphiregulin, EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor, HB-EGF: Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor, TGF- α : Transformierender Wachstumsfaktor- α , ErbB1-4, HER1-4, EGFR, Neu: Mitglieder der ErbB-Rezeptor-Familie/EGFR-Familie; modifiziert nach Harris et al., 2003.

Einige der erwähnten Tyrosinreste/Autophosphorylierungs-Stellen sind bereits identifiziert. Darunter befinden sich die Regionen Y992, Y1068, Y1086, Y1148 und Y1173 (Okutani et al., 1994; Margolis et al., 1989). Die phosphorylierten Proteinabschnitte dienen als "Andockstellen" für Signal- und Adapterproteine. Über nachgeschaltete Adaptermoleküle bzw. Enzyme kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Signal-Transduktions-Kaskaden (Zandi et al., 2007). Eine besondere Stellung innerhalb der dargestellten Signalwege nimmt der RAS-RAF-MEK-ERK-*Pathway* ein (Prenzel et al., 2001). Weitere gut charakterisierte Signalwege sind der PI3K-AKT- und der PLC γ -PKC-Signalweg (Holbro et al., 2003). Über diese führt eine Rezeptoraktivierung zu Zell-Migration, Gen-Transkription und -Expression, Zellzyklusprogression, Proliferation und einem individuellen Phänotyp jeder einzelnen Zelle. Buday und Downward veröffentlichten bereits 1993 Ergebnisse von Untersuchungen, in denen sie zeigten, dass die Regulation von RAS über die Proteine Grb2 und Sos mittels Aktivierung des EGFRs respektive der Rezeptor-Auto-Phosphorylierung unter anderem am korrespondierenden Tyrosinrest Y1068 reguliert wird (Buday and Downward, 1993). Okutani und seine Mitarbeiter konnten für die Tyrosine Y1068 und Y1086 nachweisen, dass sie als direkte Bindungspartner für das Molekül Grb2 dienen und so eine Schlüsselposition im oben genannten RAS-Signalweg einnehmen (Okutani et al., 1994).

Entgegen der Rezeptoraktivierung erfolgt eine Rezeptorinaktivierung über eine Dephosphorylierung durch Phosphotyrosin-Phosphatasen, wie die *Density-enhanced-Phosphatase*, die den EGFR und andere Rezeptor-Tyrosinkinasen dephosphoryliert. Ebenso existiert eine *Protein Tyrosine Phosphatase 1B*, die weitere Kinasen in Endosomen dephosphoryliert und inaktiviert (Citri and Yarden, 2006). Eine Rezeptor-Internalisierung mit anschließender Degradation des aktivierten Rezeptors in den Lysomen der Zelle scheint der bedeutendste, irreversible Weg der Rezeptorinaktivierung zu sein (Zandi et al., 2007). Das Vorliegen eines derartigen Mechanismus wurde von Baulida und Mitarbeitern in ihren Untersuchungen bereits nachgewiesen (Baulida et al., 1996).

1.2.3 Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor und maligne Erkrankungen

Eine Störung innerhalb des streng kontrollierten Systems der Liganden-Rezeptor-Interaktionen und nachgeschalteter Signalwege ist häufig mit hyperproliferativen Erkrankungen, wie Krebs assoziiert (Normanno et al., 2006; Arteaga, 2002). Die Mechanismen, durch die dieses System aus dem Gleichgewicht geraten kann, sind zahlreich und oft spezifisch für verschiedene Tumore. Sie schließen unter anderem eine erhöhte Produktion von Liganden, eine verstärkte Expression und/oder Amplifikation des *EGFR*-Genes ein. Darüber hinaus finden sich aktivierende Mutationen innerhalb der Rezeptoren, die zu konstitutiv aktivierten Rezeptorformen führen. Auch können eine zu geringe Herunterregulierung von Liganden-gebundenen Rezeptoren sowie ein *Crosstalk* zwischen heterologen Rezeptorsystemen Ursachen neoplastischer Transformationen sein (siehe Abb. 2, S. 13). Eine Heterodimerisierung zwischen dem EGFR und ErbB2 hemmt beispielsweise die Herunterregulierung des EGFRs und verlängert so das durch Wachstumsfaktoren ausgelöste Signal (Zandi et al., 2007).

Teils wird einer kombinierten Überexpression von Liganden und Rezeptoren die Annahme eines autokrinen oder parakrinen Aktivierungsmechanismus zu Grunde gelegt (Holbro et al., 2003). Dies führt zu einer gesteigerten Zellproliferation und einer schlechteren Prognose für die Patienten verglichen mit einer EGFR-Expression ohne Ko-Expression dieses Liganden (Umekita et al., 2000).

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Gehalt an EGFRen bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches, der Gallenblase, der Ovarien oder auch des Ösophagus zu einer schlechteren Prognose der Patienten führt (Nicholson et al., 2001).

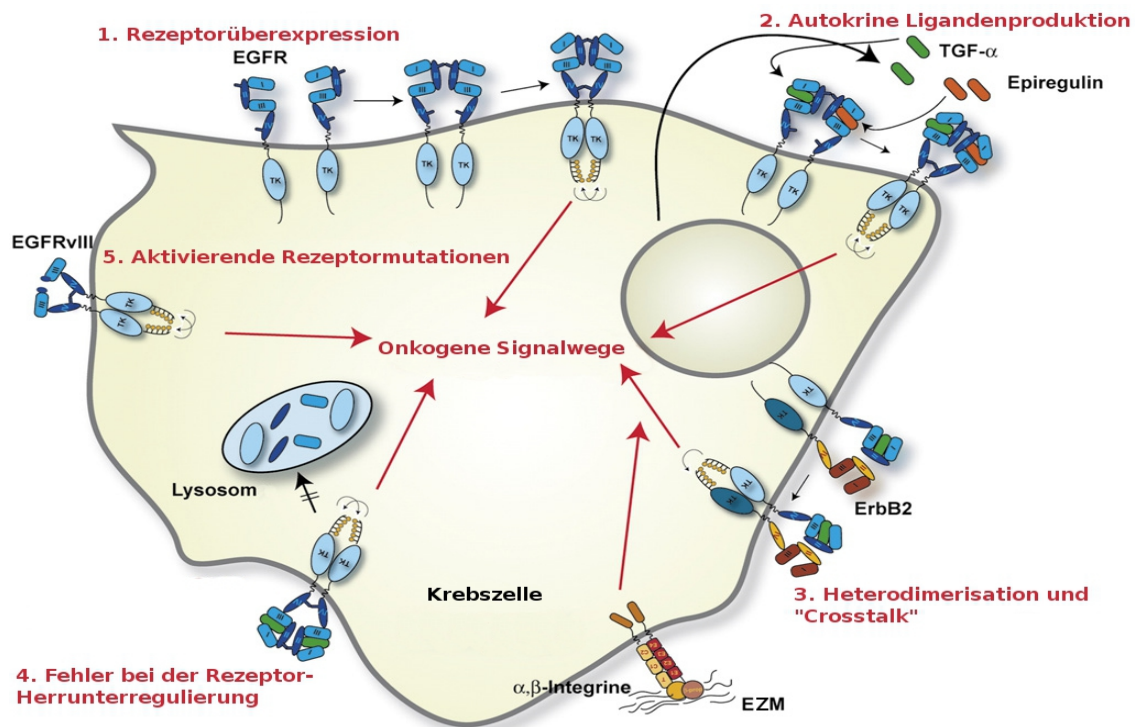


Abbildung 2: Mechanismen, die zur Aktivierung onkogener Signalwege führen: EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor, EGFR: Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, ErbB2: Mitglied der ErbB-Rezeptor-Familie/EGFR-Familie, TGF- α : Transformierender Wachstumsfaktor- α , EZM: Extrazelluläre Matrix; modifiziert nach Zandi et al., 2007.

In Mammakarzinomen, Nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinomen und in multiformen Glioblastomen führen Amplifikationen gehäuft zur Überexpression des Rezeptors (Bhargava et al., 2005; Suzuki et al., 2005; Schlessinger, 2002). Ebenso können eine gesteigerte Aktivität des *EGFR*-Promotors sowie eine Fehlregulation auf Ebene der Translation oder Posttranslation Ursache maligner Erkrankungen sein. Suzuki und Mitarbeiter konnten in kultivierten menschlichen intestinalen Stammzellen nachweisen, dass der EGFR-Signalweg für die Aktivierung der Proliferation und die Suppression der Apoptose unabdingbar ist (Suzuki et al., 2010).

Mutationen im *EGFR*-Gen können in drei Hauptgruppen unterteilt werden. Dazu zählen diejenigen, die zu Veränderungen im extrazellulären Abschnitt des Rezeptors führen, derartige, die Strukturänderungen in intrazellulären Bereichen zur Folge haben und solche, die speziell Veränderungen innerhalb der intrazellulär gelegenen Tyrosinkinase-Domäne hervorrufen. In multiplen Glioblastomen wurden Veränderungen in extrazellulären Bereichen des EGFRs nachgewiesen. Häufig zeigten sich dabei große Deletionen in spezifischen *Exons*, die für einen Teil oder die ganze extrazelluläre Region kodieren (Frederick et al., 2000). All diese Beispiele unterschiedlicher Tumorentitäten verdeutlichen die Bedeutung des EGFRs, seiner Überexpression und nachgeschalteten Signalkaskaden bezüglich maligner Erkrankungen. Hinsichtlich der Bedeutung für Magenkarzinome leistet die vorliegende Untersuchung einen Beitrag.

1.3 β -Catenin

1.3.1 Aufbau und Funktionen

β -Catenin ist ein 97 kDa großes Protein, dem verschiedene Funktionen in der Zelle zugeordnet werden können. Es besteht aus einer Zentralregion, die sich aus zwölf *Armadillo-Repeats* (Armadillo-Wiederholungssequenzen-R1-12) zusammensetzt. Es wird von einem amino- und einem carboxyterminalen Ende flankiert. Derartige Proteine binden an das transmembranäre Protein E-Cadherin und sind über α -Catenin an der Anordnung der Aktin-Filamente des Zytoskelettes beteiligt (Brembeck et al., 2006; Gates and Peifer, 2005). Über diesen Zell-Zell-Adhäsions-verstärkenden Mechanismus übt es eine tumorsupprimierende Wirkung aus. Die Assoziation mit Cadherinen schützt β -Catenin vor dem Abbau (Moon et al., 2004).

Ein zweiter zytosolischer *Pool* ist in den Wnt-Signalweg integriert (Huang and He, 2008). In diesem Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist β -Catenin als Transkriptions-Kofaktor für die Gen-Expression mit verantwortlich (Clevers, 2006; Logan and Nusse, 2004).

1.3.2 Die Rolle von β -Catenin im Wnt-Signalweg

Kommt es über Bindung eines Wnt-Liganden an seinen Rezeptor zur Aktivierung des Wnt-Signalweges agieren zwei Oberflächen-Rezeptoren. Einer ist Mitglied der *Fz-Family* der Serpentin-Proteine, der andere ein *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 6* (LRP6) oder das eng verwandte LRP5 (He, 2003; Zorn, 2001). Der Bindung an den *Fz-Receptor* schließt sich eine Aktivierung des Phospho-Proteins *Dishevelled* (Dsh) an. Dsh rekrutiert Axin und einen Komplex aus den Proteinen APC, CK1 (Casein-Kinase 1) und GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*), welche zusammen mit Axin als Degradationskomplex bezeichnet werden, an die Zellmembran, wo es direkt an den zytoplasmatischen Abschnitt von LRP5/6 bindet. Der sich anschließende vermehrte Abbau von Axin sowie eine verstärkte Inhibition der GSK3 durch die Aktivität des Phospho-Proteins Dsh führen in der Zelle zu einem geringeren Gehalt an phosphoryliertem β -Catenin (Mao et al., 2001). Dadurch stabilisiertes β -Catenin gelangt über direkte Interaktion mit Kern-Poren-Komplexen in den Zellkern, akkumuliert dort und bindet an den TCF (*T-Cell-Factor/Lymphoid Enhancer Factor-LEF*) aus der Familie der DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren, um so die Gen-Expression unterschiedlicher Proteine zu verstärken. Zu diesen gehören unter anderem die Protoonkogene *c-myc*, *Cyclin D1* und *WISP-1* (He et al., 1998). Einem Import von β -Catenin in den Zellkern kann durch Retentions-Faktoren wie Axin und E-Cadherin entgegengewirkt werden (Städeli et al., 2006).

Ohne Ligandenbindung an den *Fz-Receptor* wird der Gehalt an zytosolischem β -Catenin gering

gehalten. Dies geschieht durch phosphorylierungsabhängige Ubiquitinierung und Degradation innerhalb eines sogenannten „Degradations-Komplexes“ (Rubinfeld et al., 1996; Liu et al., 2002). Dieser, besteht aus dem *Scaffolding-Protein* Axin, APC sowie den Serin-/Threonin-Kinasen CK1 und GSK3. Es kommt nach Assoziation von freiem β -Catenin an den Komplex durch die sequentiell aktiven Kinasen zur Phosphorylierung von N-terminalen Serin-/Threonin-Resten (Huang and He, 2008). Phosphoryliertes β -Catenin wird durch β -Treb, einer E3-Ubiquitin-Ligase-Untereinheit, erkannt, daran anschließend ubiquitiniert und in Proteasomen abgebaut (He, 2003; Polakis, 2002; Aberle et al., 1997). Liegen Mutationen in Bereichen der Phosphorylierungsstellen vor, können daraus Störungen der Degradation resultieren. Mutationen solcher Art wurden bereits in Melanomzellen nachgewiesen (Rubinfeld et al., 1997).

Häufig untersuchte Mutationen innerhalb des Signalweges sind vererbte und sporadische Mutationen des APC-Gen-Produkts, die die Degradation von β -Catenin reduzieren und so die Aktivierung von Zielgenen wie dem Protoonkogen *Cyclin D1* und Onkogen *c-myc* beeinflussen (Van de Wetering et al., 2002). Diese wurden gehäuft in Karzinomen des Kolons gefunden (Logan and Nusse, 2004; Seidensticker and Behrens, 2000). Es gibt Hinweise darauf, dass die *Integrin-linked Kinase*, eine Kinase, die durch *Integrin-Signalling* reguliert wird, die GSK3 inhibieren und damit β -Catenin stabilisieren kann (Moon et al., 2004; Tan et al., 2001). Darüber hinaus stellt die Aktivierung des Proteins p53 eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der Degradation von β -Catenin dar (Levina et al., 2004). Für die Kontrolle des Zellwachstums ist, wie in Kapitel 1.6 beschrieben, auch eine Assoziation von β -Catenin mit dem EGFR und dessen anschließende Phosphorylierung von Bedeutung (siehe S. 19) (Hoschuetzky et al., 1994).

1.4 Der Proliferationsmarker MIB1

1.4.1 Prognostische Bedeutung von Proliferationsmarkern

Unbestritten ist, dass die erhöhte Zell-Proliferation in einem wesentlichen Anteil zur Tumorexpanion und Metastasierung maligner Erkrankungen beiträgt. Ihr liegt nicht nur ein rasches Zellwachstum und eine erhöhte Zellteilung zu Grunde, sondern ihr wird auch eine beträchtliche prognostische Aussagekraft bei unterschiedlichen Malignomen zugeschrieben. Ein Beispiel stellen Mammakarzinome dar, bei denen 3H-Thymidine-Färbeindizes, die der Bestimmung der Proliferationsraten dienen, eng mit dem Überleben der Patientinnen korrelieren (Wijsman et al., 1992).

In den 70-er Jahren wurden erstmalig mit der Zellproliferation in Zusammenhang stehende, menschliche Kernantigene beschrieben, auf die Miyachi und seine Mitarbeiter bzw. Klein und

seine Forschergruppe bei der Untersuchung von Seren zur Identifikation von Auto-AKs von an Leukämie bzw. *Lupus erythematoses* erkrankten Patienten stießen (Gerdes et al., 1983).

1.4.2 Ki-67

Im Jahr 1983 gelang Gerdes und seinen Mitarbeitern, ursprünglich auf der Suche nach einem monoklonalen AK gegen Kernantigene von Sternberg-Reed- und Hodgkin-Zellen, die Herstellung eines monoklonalen AKs, genannt Ki-67, gegen eines der beschriebenen Kernantigene. Dieser AK erwies sich als geeignet zum Nachweis sich in Proliferation befindender Zellen. Die Silbe „Ki“ leitet sich von der Stadt Kiel, in der die Entdeckung gemacht wurde, ab. Die Zahl „67“ beschreibt den 67. *Well* („Napf“ einer Mikrotiterplatte) einer 96-*Well*-Klonierungsplatte. Der AK gehört zur Subklasse IG-1 und ist spezifisch gegen ein nukleäres Antigen (pKi-67) gerichtet. Dieses wird nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus, den M-, S-, G1- und G2-Phasen, jedoch nicht in der G0-Phase, das heißt in ruhenden, nicht proliferierenden Zellen exprimiert (Igarashi et al., 1999).

Das pKi-67- Antigen, ein Protein ohne Histone mit einem Molekulargewicht von 345 und 395 kDa, umgibt alle Chromosomen während der Mitose (Cattoretti et al., 1992). Es akkumuliert in nukleären *Foci* während der G1-Phase (Typ I Verteilung) und ist in der späten G1-, S- und G2-Phase (Typ II Verteilung) des Zellzyklus im Bereich der Nukleoli lokalisiert. Obwohl diesem Protein bislang noch keine eindeutige Funktion zugeordnet werden konnte, deuten immunhistochemische und FISH-Untersuchungen auf eine Assoziation dieses Antigens mit Zentromeren in der G1-Phase hin (Bridger et al., 1998).

1.4.3 MIB1

Ein Nachteil des oben erwähnten, ursprünglichen Ki-67-AKs besteht darin, dass er nur bei Gefrierschnitten angewendet werden kann, was die Verwendung in der Routinediagnostik und an Paraffin-Schnitten wesentlich einschränkt (Müller et al., 1996). Seit einiger Zeit findet daher überwiegend ein AK namens MIB1 (*Molecular Immunology Borstel 1*), der rekombinante Anteile des Ki-67-Antigens erkennt und von Cattoretti und Mitarbeitern entwickelt wurde, Anwendung (Key et al., 1993). Seine Spezifität bezüglich des Ki-67 Antigens konnte immunhistochemisch und mittels *Western-Blot* nachgewiesen werden (Cattoretti et al., 1992). Nach Erwärmung in der Mikrowelle kann der AK auch bei in Formalin fixierten und in Paraffin eingebettetem Material eingesetzt werden (Müller et al., 1996; Shi et al., 1991). Er ist von verschiedenen Anbietern gewerblich erhältlich und hat den originalen Ki-67-AK weitestgehend ersetzt.

Die Studienlage beschreibt eine unterschiedliche Wertigkeit dieses Proliferationsmarkers für

verschiedene Tumorentitäten. In dieser Arbeit wird seine prognostische Wertigkeit bezüglich dem Gesamtüberleben der Kollektivpatienten immunhistochemisch untersucht und in Beziehung zur Expression von proliferationsbegünstigenden Proteinen, wie dem EGFR und seiner aktivierten Form, dem pEGFR dargestellt und erläutert.

1.5 Immunzellen und der CD3-Rezeptor

1.5.1 Tumor-infiltrierende Lymphozyten

Der Fokus vieler Bemühungen um ein besseres Verständnis von Tumorentstehung, Progression und Metastasierung lag lange Zeit auf den molekularen Ereignissen innerhalb der Tumorzellen selbst. In neuester Zeit rückt jedoch zunehmend ein ganz anderer Aspekt in den Vordergrund zahlreicher Untersuchungen. Viele Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit dem Thema der Tumorimmunologie, insbesondere der sogenannten *Immunosurveillance*, der Krebs-Immunüberwachung (Lee et al., 2008). Das Tumorstadium und die -progression werden nicht nur durch die Tumorbiologie an sich beeinflusst sondern auch durch Abwehrmechanismen des Wirtes. Diese Immunabwehr besteht aus einem komplexen Netzwerk humoraler und zellulärer Komponenten, die mit den Tumorzellen und dem umgebenden *Stroma* interagieren. Auf zellulärer Ebene sind darunter die Dendritischen Zellen, Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten zu nennen (Rauser et al., 2010). In Tumorgeweben unterschiedlicher Entitäten nachweisbare Immunzellen, einschließlich verschiedener Lymphozyten, insbesondere Natürliche Killerzellen wurden bereits auf ihre prognostische Wertigkeit hin untersucht (Ishigami et al., 2000). Von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten wird angenommen, dass sie eine Manifestationsform der spezifischen Immunreaktionen gegen Krebszellen darstellen (Rauser et al., 2010). In der hier vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich T-Lymphozyten untersucht. Das "T" im Namen steht für den Thymus, in dem die T-Zellen während ihrer Entwicklung ausreifen. Diese Zellen werden, wie alle Blutzellen, im Knochenmark produziert, wandern in den Thymus, wo MHC-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche ausgebildet werden, die der späteren Antigenerkennung dienen. Diese Proteinstrukturen, die in der Zellmembran eingelagert zu finden sind, werden auch als T-Zell-Rezeptoren (*T-Cell-Receptors*, TCR) bezeichnet. Jeder TCR peripherer T-Zellen ist an ein CD3-Rezeptormolekül gebunden. Der CD3-Rezeptor leitet nach Stimulierung der Zelle das entsprechende Signal in das Zellinnere (siehe Abb. 3, S. 18).

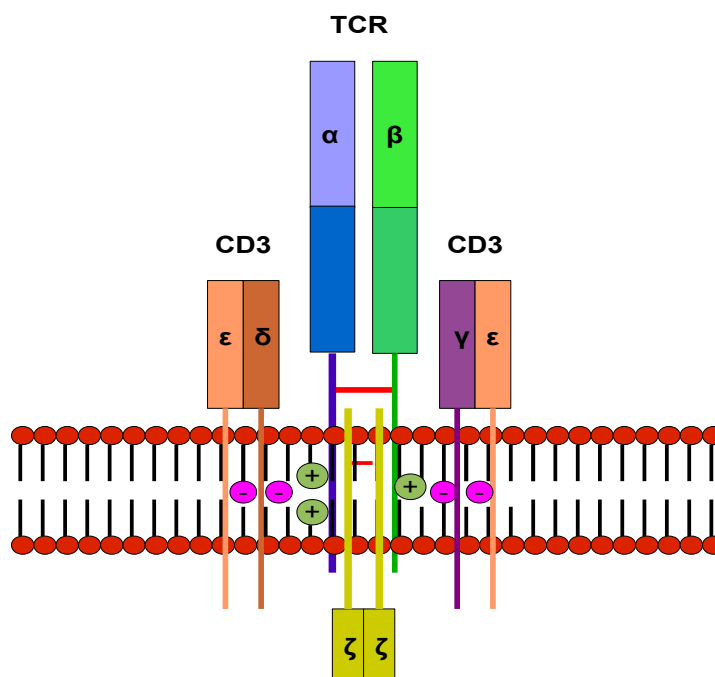


Abbildung 3: Aufbau des T-Zell-Rezeptors mit Darstellung der CD3-Rezeptoren: CD3: entsprechender Rezeptor, TCR: *T-Cell-Receptor*/T-Zell-Rezeptor, + bedeutet positive Ladung der Moleküle, - bedeutet negative Ladung der Moleküle; modifiziert nach <http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/mhc.htm> (Figure 10).

1.5.2 Der CD3-Rezeptor

Aufgebaut ist der CD3-Rezeptor, der auch als CD3-Antigen bezeichnet wird, aus vier Polypeptidketten. Beim Menschen setzt er sich aus einer γ -, einer δ - und zwei ϵ -Ketten zusammen. Die vier Ketten entsprechen Transmembranproteinen, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören. Diese sind eng mit dem TCR verbunden. Nur in Verbindung mit dem CD3-Rezeptor erfolgt nach Kontakt der T-Zelle mit einem Antigen-beladenen MHC-Molekül eine Signaltransduktion, die dann zur eigentlichen T-Zell-Aktivierung führt (Pezzutto et al., 2006).

Da nach Ausreifung im Thymus der CD3-Rezeptor fester Bestandteil der T-Lymphozyten ist, ermöglicht ein immunhistochemischer Nachweis dieses Antigens die Bestimmung der Gesamtzahl sowohl der T-Gedächtnis-Zellen, als auch der T-Effektorzellen, die in T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und T-Suppressorzellen unterteilt werden.

Durch AK-Färbungen, die gegen den CD3-Rezeptor gerichtet sind, lassen sich Lymphozyten, die aus dem Blut in das einen Tumor umgebende *Stroma* "ausgewandert" sind, nachweisen.

Diese Tatsache wird in der vorliegenden Arbeit genutzt, um semiquantitativ die Lymphozyteninfiltration, sogenannte Tumor-infiltrierende Lymphozyten, in den Gewebeproben

der Kollektivpatienten nachzuweisen und diese hinsichtlich ihrer prognostischen Wertigkeit zu untersuchen.

1.6 Zusammenhang zwischen den untersuchten Markern

Vier der in dieser Arbeit immunhistochemisch nachgewiesenen Proteine bzw. deren Überexpression stehen wie in voranstehenden Abschnitten beschrieben in engem Zusammenhang mit der Zellzyklusprogression, der Tumorzellproliferation und Metastasierung von malignen Erkrankungen. Die folgende Abbildung verdeutlicht dies.

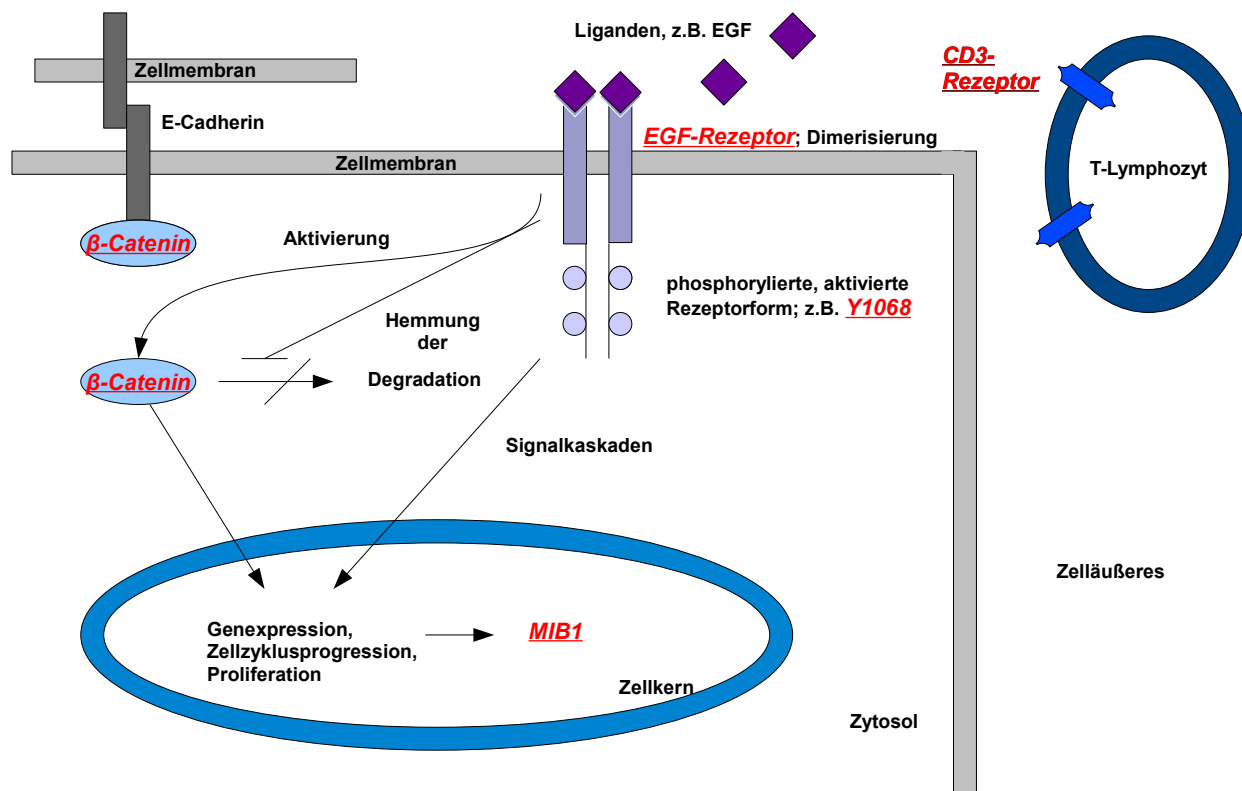


Abbildung 4: Zusammenhang zwischen dem EGFR, der aktivierten Form pEGFR (Y1068), β-Catenin, MIB1 und CD3-positiven Lymphozyten: CD3: entsprechender Rezeptor; EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor, MIB1: Proliferationsmarker.

Den Zusammenhang von EGFRen und der Lokalisation von β-Catenin wurde von Lee und Kollegen an Karzinomzellen des Mundbereiches untersucht. Sie zeigten, dass eine Überexpression oder verstärkte Aktivierung des EGFRs zu einer Erhöhung des nukleären β-Catenin-Gehaltes und einer Reduktion der Anzahl des an E-Cadherin gebundenen β-Catenins führt (Lee et al., 2010). Die Assoziation von E-Cadherin mit β-Catenin ist wichtiger Bestandteil der Zell-Adhäsions-Komplexe und eine Reduktion dieser korreliert mit einer schlechteren Prognose der Patienten (Brembeck et al., 2006). Gelangt β-Catenin vermehrt in den Zellkern

führt es über Bindung an den TCF zu einer gesteigerten Gen-Expression unterschiedlicher Proteine (siehe Kap. 1.3.2, S. 14). Eine Aktivierung des EGFRs, in dieser Arbeit durch den Nachweis der phosphorylierten Rezeptorform Y1068 repräsentiert, führt, wie in Kapitel 1.2.2 erläutert, über weitere unterschiedliche Signalwege zu erhöhter Zellproliferation (siehe S. 10). Der MIB1-Nachweis ermöglicht eine Quantifizierung der sich in Proliferation befindenden Zellen.

Als eine Art Gegenspieler zu den erwähnten Mechanismen, die die Tumorprogression fördern, steht das Immunsystem des Patienten, das der Entstehung bzw. Ausbreitung maligner Erkrankungen entgegenwirkt. Berücksichtigt wurde diese Tatsache mit dem Nachweis von CD3-positiven Lymphozyten im Tumorstroma und eine gemeinsame Interpretation.

1.7 Fragestellung

Magenkarzinome weisen genetische Alterationen auf, die zur Stimulation tumorrelevanter Signalwege führen können. Zu den charakteristischen Veränderungen des Magenkarzinoms zählt die Überexpression des EGFRs. Der EGFR ist ein zentraler Regulator der Zellproliferation, der Apoptose, der Zellmotilität und der Differenzierung. Er stellt auf Grund seiner tumorspezifischen Überexpression beim Magenkarzinom eine ideale Zielstruktur für eine selektive Tumorintervention dar. Im Rahmen dieses Projektes sollte die prognostische Bedeutung der EGFR-Signalkaskade in Zusammenschau mit der Expression von β -Catenin, des Proliferationsmarkers MIB1 sowie dem Nachweis von T-Lymphozyten in Gewebeproben von Magenkarzinomen untersucht werden.

Das Ziel der Arbeit ist, mittels immunhistochemischer Analysen auf *Tissue Micro Arrays* (TMAs) sowie deren statistischer Aufarbeitung in Zusammenschau mit klinischen Endpunkten, insbesondere dem Überleben der Patienten, prognoserelevante Aussagen herauszuarbeiten. Die Expression der Biomarker sollte unter Einbezug von bildanalytischen Verfahren evaluiert werden.

Kenntnisse über den Beitrag der EGFR-Signalkaskade zur Überlebensfähigkeit von Tumorpatienten sind prognostisch und therapeutisch hoch relevant. Systematische Daten zur EGFR-Signalkaskade mittels quantitativer Immunhistochemie (IHC) an statistisch aussagekräftigen Patientenkollektiven beim primär chirurgisch resezierten Magenkarzinom gab es bislang in Zusammenschau mit der Expression oben genannter Marker noch nicht. Die kombinierte Auswertung mit dem Nachweis Tumor-infiltrierender Lymphozyten sollte zur Darstellung kommen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Für die in dieser Arbeit diskutierten Fragestellungen wurden an Hand von anonymisierten Archivierungsdaten Operationspräparate von insgesamt 2130 Patienten mit resezierten Magenkarzinomen aus dem Archiv des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München ausgewählt. Diese Präparate, die zeitnah zum Operationszeitpunkt für die Diagnostik aufbereitet und in Paraffin eingebettet wurden sowie die für die Diagnostik routinemäßig gefärbten Hämatoxylin-Eosin-Schnitte und Färbungen, die der erweiterten Diagnostik dienten, stammten aus den Jahren 1991 bis 2007. In die endgültigen Auswertungen wurden Materialien aus dem Zeitraum 1991 bis 2005 eingeschlossen. Ausreichende Mengen an Tumorgewebe vorausgesetzt, wurden die den Paraffinblöcken zugehörigen Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte einzeln unter dem Lichtmikroskop bei einer bis zu 200-fachen Vergrößerung auf das Vorliegen von Magenkarzinomzellen untersucht und so die primäre Diagnose gesichert. Eine Eignung hinsichtlich nachfolgender Kriterien vorausgesetzt, wurden zwei voneinander getrennte Kollektive gebildet. Eines enthält die Tumorgewebe von vortherapierten Patienten und eines die Gewebeschnitte von Patienten mit primär resezierten Karzinomen. Nur knapp 11% der ursprünglich rekrutierten Gewebe von Magenkarzinomen, bei denen die Patienten präoperativ keine *neoadjuvante* Therapie erhielten, wiesen alle Kriterien auf, um in die hier vorliegende Arbeit eingeschlossen zu werden. Einschlusskriterien waren eine primäre Resektion, das Vorliegen ausreichender Mengen an Tumormaterialien und Angaben zu TNM-R- und G-Kriterien sowie von *Follow-up*-Daten. Insgesamt wiesen Gewebeproben von 230 Patienten diese Voraussetzungen auf. Die Daten über das *Follow-up* der Patienten wurden dem Helmholtz-Zentrum freundlicherweise von der II. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar zur Verfügung gestellt. Die Zuordnung der Daten zu den Gewebeproben erfolgte anonymisiert. Die Angaben zu den TNM-R- und G-Kriterien sowie der Laurénklassen der Karzinome wurden für beide Kollektive zugehörigen anonymisierten Pathologieberichten in unveränderter Form entnommen. Die Berichte stammten ebenfalls aus dem Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München. Die Daten wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und mittels zugehöriger Archivierungsnummern verschlüsselt. Zur späteren Zuordnung der Gewebeproben auf den TMAs erfolgte eine Zuordnung neuer Fallnummern. Einige der Pathologieberichte enthielten keine Angaben über Laurénklassen bzw. vereinzelt unvollständige UICC-Kriterien. Diesbezüglich fehlende Angaben wurden nachträglich nicht ergänzt, um hier ebenfalls mögliche Fehler zu vermeiden. Karzinome ohne zugewiesene Laurénklasse wurden

als "nicht klassifiziert" vermerkt und in die Berechnungen eingeschlossen.

Ein zusätzliches Einschlusskriterium war eine postoperative Nachbeobachtungszeit von mehr als 28 Tagen, um operationsbedingte Todesursachen weitestgehend auszuschließen. Der Nachbeobachtungszeitraum der Kollektivpatienten erstreckt sich von minimal einem bis 120 Monaten postoperativ. Es wurden nur Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation ein Mindestalter von 32 Jahren erreicht hatten, in die Untersuchungen eingeschlossen. Hintergrund dessen ist die Annahme von unterschiedlichen biologischen Tumoreigenschaften mit verstärkten genetischen Einflüssen bei Patienten, die in sehr jungen Jahren an einem Magenkarzinom erkranken und die zur Beeinflussung der Prognose beitragen können. Grundlage dafür ist eine im Jahr 2005 veröffentlichte Studie, in der Einflüsse des Patientenalters auf das Überleben untersucht wurden. Darin wurde gezeigt, dass bei jüngeren Patienten mit einem Alter von bis zu 40 Jahren, deutlich häufiger diffuse und geringer differenzierte Karzinome auftreten sowie dass eine signifikante Assoziation zu einer familiären Häufung mit einer höheren Anzahl an Frauen im Vergleich zu Männern besteht. Das Team beobachtete einen Anstieg des Sterberisikos von 5,6% pro Jahr (Bani-Hani, 2005).

Alle Auswertungen der immunohistochemischen Färbungen erfolgten unter Verwendung der verschlüsselten Daten, so dass Kenntnisse über zugehörige Patientendaten während der Auswertungen ausgeschlossen wurden.

Auf Grund der Operationsjahrgänge wurde für die Zuordnung der Krankheitsstadien die TNM-Klassifikation aus dem Jahr 2002 verwendet. Zum Vergleich enthält Tabelle 1 sowohl die UICC-Stadien der Klassifikation aus dem Jahr 2002 als auch die aktuelle Version aus dem Jahr 2009 (siehe Tab.1, S. 23). Für die Auswertungen wurden die Tumorstadien 2A und 2B zu Stadium 2 zusammengefasst.

Ein dem hier untersuchten Patientenkollektiv vergleichbares Kollektiv mit *neoadjuvant* therapierten Magenkarzinomen steht einschließlich Tabellen über Patientendaten für weitere Studien zur Verfügung.

Tabelle 1: Übersicht über die TNM-Klassifikation 6. und 7. Auflage im Vergleich (UICC, 2009)

UICC-Kriterien 2002/6. Auflage		UICC-Kriterien 2009/7. Auflage	
Kategorie	Kriterien	Kategorie	Kriterien
pTX	Primärtumor nicht beurteilbar	pTX	Primärtumor nicht beurteilbar
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor	pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der <i>Lamina propria</i>	pTis	Intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der <i>Lamina propria</i> , hochgradige Dysplasie
pT1	Tumor infiltriert <i>Muscularis propria</i> oder <i>Submucosa</i>	pT1a	Tumor infiltriert <i>Lamina propria</i> oder <i>Muscularis mucosae</i>
		pT1b	Tumor infiltriert <i>Submucosa</i>
pT2	Tumor infiltriert <i>Muscularis propria</i> oder <i>Subserosa</i>	pT2	Tumor infiltriert <i>Muscularis propria</i>
pT2a	Tumor infiltriert <i>Muscularis propria</i>	pT2a	
pT2b	Tumor infiltriert <i>Subserosa</i>	pT2b	
pT3	Tumor penetriert <i>Serosa</i> , wächst aber nicht in Nachbarorgane (Milz, Leber, Kolon,...) ein	pT3	Tumor infiltriert <i>Subserosa</i>
pT4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen	pT4	Tumor perforiert <i>Serosa</i> oder infiltriert benachbarte Strukturen
		pT4a	Tumor perforiert <i>Serosa</i>
		pT4b	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen
pNX	Regionäre Lymphknoten sind nicht beurteilbar	pNX	Regionäre Lymphknoten sind nicht beurteilbar
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen (mindestens 12 Lymphknoten untersucht)	pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen (untersucht üblicherweise 16 Lymphknoten)
pN1	Metastasen in 1-6 regionären Lymphknoten	pN1	Metastasen in 1-2 regionären Lymphknoten
pN2	Metastasen in 7-15 regionären Lymphknoten	pN2	Metastasen in 3-6 regionären Lymphknoten
pN3	Metastasen in mehr als 15 regionären Lymphknoten	pN3	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
		pN3a	Metastasen in 7-15 regionären Lymphknoten
		pN3b	Metastasen in 16 oder mehr regionären Lymphknoten
pM0	Keine Fernmetastasen	pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Befall anderer Lymphknoten oder Fernmetastasen vorhanden	pM1	Fernmetastasen inklusive peritoneale Metastasen, positive Peritonealzytologie und Befall von <i>Omentum</i> soweit keine kontinuierliche Ausbreitung
TNM-Stadien (UICC 2002): O: Tis/N0M0; IA: T1N0M0; IB: T1N1M0/T2a,bN0M0; II: T1N2M0/T2a,bN1M0/T3N0M0; IIIA: T2a,bN2M0/T3N1M0/T4N0M0; IIIB: T3N2M0; IV: T4N1-3M0/T1-3N3M0/TxNxM1			
TNM-Stadien (UICC 2009): O: Tis; IA: T1N0M0; IB: T1N1M0/T2N0M0; IIA: T1N2M0/T2N1M0/T3N0M0; IIB: T1N3M0/T2N2M0/T3N1M0/T4aN0M0; IIIA: T2N3M0/T3N2M0/T4aN1M0; IIIB: T3N3M0/T4aN2M0/T4bN0,N1M0; IIIC: T4aN3M0/T4bN2,N3/M0; IV: jedes T, jedes N M1			

2.2 Methoden

2.2.1 Workflow

Folgende Arbeitsschritte folgten aufeinander:

1. **Rekrutierung der Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte und Paraffinblöcke** von 2130 Magenkarzinomen aus der Routinediagnostik des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München
2. **Beurteilung der Hämatoxylin-Eosin-Schnitte und Markierung der ausgewählten zugehörigen Tumor-Areale** auf den für die Untersuchungen ausgewählten Paraffinblöcken
3. **Erhalt von drei Kollektiven:**
 - nicht verwendbare Materialien
 - Materialien von vortherapierten Patienten
 - primäre Magenkarzinome
4. **Gewinnung von je drei Stenzen aus den Tumorblöcken der primären Magenkarzinome und Herstellung von TMAs:**
 - Hämatoxylin-Eosin-Färbungen
 - EGFR-Färbungen
 - pEGFR-Färbungen (Y1068)
 - β -Catenin-Färbungen
 - MIB1-Färbungen
 - CD3-Färbungen
5. **Auswertungen:**
 - Hämatoxylin-Eosin-Färbungen: Orientierung auf den Gewebeschnitten
 - EGFR-Färbungen: am Lichtmikroskop
 - pEGFR-Färbungen: am Lichtmikroskop und bei positivem *Score* zusätzlich mit der Definiens-Computer-*Software*
 - β -Catenin-Färbungen: am Lichtmikroskop
 - MIB1-Färbungen: mit der Definiens-Computer-*Software*
 - CD3-Färbungen: am Lichtmikroskop und mit der Definiens-Computer-*Software*

Die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten TMA-*Slides* dienten der Reevaluation der Gewebe. Alle immunhistochemischen Färbungen wurden an konsekutiven Gewebeschnitten angefertigt. So konnte gewährleistet werden, dass jeweils ein möglichst einheitlicher und damit vergleichbarer Gewebeanschnitt jedes Tumors zur Auswertung zur Verfügung stand.

2.2.2 Tissue Micro Arrays

Für die Herstellung der TMAs wurden mit Hilfe eines Stanzgerätes (Firma AlphaMetrix, Rödermarkt), in Anlehnung an die Veröffentlichung von Kononen und Mitarbeitern, Gewebeproben aus tumorrepräsentativen Arealen der aus der Routinediagnostik stammenden Paraffinblöcke (Donor-Blöcke) entnommen (Kononen et al., 1998). Der Durchmesser der einzelnen Stanzen beträgt 1 mm. Die entnommenen Gewebeproben wurden nebeneinander in vorgefertigte Akzeptor-Paraffinblöcke eingebracht. Jeder dieser Rezeptor-Blöcke enthält Tumormaterialien von jeweils 28 verschiedenen Magenkarzinomen, vertreten durch je drei Gewebezylinder pro Tumor. Insgesamt wurden 16 dieser Paraffinblöcke hergestellt, da zur internen Kontrolle zusätzliche Untersuchungen mit weiteren Magenkarzinomen durchgeführt wurden. Lagen von einem Magenkarzinom mehrere Tumorproben respektive mehrere Paraffinblöcke vor, so wurden die jeweiligen Gewebestanden aus verschiedenen Blöcken entnommen um repräsentativere Stichproben, möglichst aus dem Zentrum des jeweiligen Karzinoms zu erfassen. Darüber hinaus dienten Gewebestanden aus gesunder Magenschleimhaut, angeordnet in Form von *Walls*, der späteren Orientierung auf den im nächsten Schritt von den Akzeptor-Blöcken angefertigten Gewebeschnitten. Die gesunde Magenschleimhaut ist als ein wichtiges *Tool* bei der internen Qualitätskontrolle der Färbungen im Sinne einer Negativkontrolle der AK-Färbungen zu betrachten.

2.2.3 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten an Gewebeschnitten der neu erstellten Paraffinblöcke. Diese wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotomes (HM 350 SV, Firma MICROM INTERNATIONAL, Walldorf) als konsekutiv aufeinanderfolgende Gewebeschnitte einer Dicke von 4 µm angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Jeweils ein Gewebeschnitt wurde zur morphologischen Orientierung nach Entparaffinierung mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Folgende Schritte wurden nacheinander durchgeführt:

1. 2 x 10 Minuten in Xylol (in Küvetten)
2. Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe (Isopropanol 100%, 90%, 70%)
3. kurz in destilliertes Wasser zur Vermeidung von Schlierenbildung

4. 1 Minute Hämatoxylin (nach Mayer von Roth, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
5. 5 Minuten unter fließendes Wasser
6. 1 Minute in Eosin
7. Spülen mit Prilwasser
8. aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100% Isopropanol/Xylol)
9. Eindeckeln mit Eukitt (Firma Medite, Burgdorf)
10. bei 60 °C eine Nacht in den Brutschrank

Von den Schnitten wurden Färbungen mit entsprechenden AKn teils semimaschinell, teils voll maschinell in der Ventana-Färbe-Maschine/Discovery, ebenfalls nach Entparaffinisierung angefertigt (siehe Kap. 9.1, S. 104). Die maschinelle Färbung garantiert bei Minimierung von Verdünnungsfehlern, Temperatur- und Zeiteinflüssen sowie strikter Einhaltung der Standards eine gleichbleibende Qualität der Färbungen für alle *Slides*. In der folgenden Tabelle finden sich Angaben über verwendete AK, Verdünnungsverhältnisse und Hersteller (siehe Tab. 2).

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Antikörper gegen	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
EGFR	1. AK monoklonal; 2. AK universal Kaninchen/Maus	1:400	DAKO, Hamburg Deutschland
pEGFR (Y1068)	Maus-monoklonaler AK	1:400	Cell Signaling Technology, Leiden Niederlande
β-Catenin	monoklonaler AK	1:500	BD Trunsdution Laboratories Biosciences, San Jose Kalifornien (USA)
MIB1 (Ki-67)	monoklonaler AK	1:100	DAKO, Glostrup Dänemark
CD3	monoklonaler AK	1:200	Thermo Scientific, Fremont Kalifornien (USA)

2.2.4 Auswertung am Lichtmikroskop

Für die immunhistochemischen Färbungen des EGFRs, seiner phosphorylierten Form, pEGFR (Y1068), von β-Catenin und CD3-positiven T-Lymphozyten erfolgten semiquantitative Auswertungen am Lichtmikroskop mit einer bis zu 200-fachen Vergrößerung.

In die mikroskopischen Beurteilungen mit anschließender Zuordnung zu entsprechenden *Scores* wurden alle auf den TMAs vorliegenden Gewebestanden der jeweiligen Karzinome eingeschlossen. Die Anzahl der ausgewerteten, bereits erwähnten Gewebezylinder, belief sich pro Magenkarzinom und Färbung auf ein bis drei Stück. Der Grund dafür, dass nicht von jedem

Tumor pro Färbung drei Gewebeproben zur Verfügung standen liegt in der verwendeten Technik. In einigen Fällen kam es zum "Abschwemmen" der Gewebe vom Objektträger. Bei einigen Karzinomen reichten auf Grund der konsekutiven Gewebeschnitte die Materialien nicht für alle Färbungen. Bei der Beurteilung der Auswertungen wurden im Falle von großer intratumoraler Heterogenität der Expressionsmuster der Marker Mittelwerte aus den für jede Stanze erhobenen Scores gebildet. Den nachfolgenden Tabellen können zugehörige Kriterien der Auswertungen der Färbungen entnommen werden (siehe Tab. 3-6, S. 27-28). Es wurden hinsichtlich der Anti-EGFR-Färbungen Karzinome mit mehr als 10% gefärbter Tumorzellen als positiv bewertet. Positiv klassifizierte Karzinome wurden, je nach Intensität, weiter unterteilt in schwach, mäßig und stark positiv und entsprechenden Scores 1 bis 3 zugewiesen. Bei der AK-Färbung, gerichtet gegen die phosphorylierte Rezeptorform (Y1068) wurden zwei Scores, im Sinne von negativen und positiven Karzinomen, unterschieden. Für die β -Catenin-Färbung erfolgte eine Score-Zuteilung entsprechend der prozentualen Membranfärbungen der Tumorzellen. Für die Beurteilung der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten gelten Kriterien wie sie in Tabelle 6 vermerkt sind (siehe S. 28).

Tabelle 3: Einteilung der EGFR-Scores

Score	Kriterien der Einteilung
0/negativ	Keine beobachtete Färbung oder membranständige Färbung von weniger als 10% der neoplastischen Zellen
1/positiv	Schwache vollständige oder unvollständige membranständige Färbung von mehr als 10% der Zellen
2/positiv	Mäßige vollständige oder unvollständige membranständige Färbung von mehr als 10% der Zellen
3/positiv	Starke vollständige oder unvollständige membranständige Färbung von mehr als 10% der Zellen

Tabelle 4: Einteilung der pEGFR-(Y1068)-Scores

Score	Kriterien der Einteilung
0/negativ	Kein Nachweis von Anti-pEGFR-(Y1068)-gefärbten Tumorzellen
1/positiv	Nachweis von Anti-pEGFR-(Y1068)-gefärbten Tumorzellen

Tabelle 5: Einteilung der β -Catenin-Scores

Score	Kriterien der Einteilung
0/negativ	Membranständige Färbung von weniger als 10% der neoplastischen Zellen
1/positiv	Membranständige Färbung von >10% und <30% der neoplastischen Zellen
2/positiv	Membranständige Färbung von >30% und <50% der neoplastischen Zellen
3/positiv	Membranständige Färbung von >50% der neoplastischen Zellen

Tabelle 6: Einteilung der Scores der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten

Score	Kriterien der Einteilung
0/negativ	Keine gefärbten (CD3-positiven-) T-Lymphozyten nachweisbar
1/positiv	Ganz vereinzelt gefärbte (CD3-positiv-) T-Lymphozyten nachweisbar
2/positiv	> 1% der Zellen (CD3-positiv-) T-Lymphozyten
3/positiv	> 10% der Zellen (CD3-positiv-) T-Lymphozyten

2.2.5 Auswertung mittels Definiens-Computer-Software

Für die Auswertungen der pEGFR-, der CD3- sowie der MIB1-Färbungen wurde zusätzlich zur Score-Zuweisung am Lichtmikroskop ein Computer-Software-Programm (Definiens Developer XD, Firma Definiens AG, München) verwendet. Die zugehörigen Bildanalysen basieren auf teils festen Regelsätzen, teils auf vom Anwender individuell gestaltbaren Berechnungskriterien. Die Lizenz zur Verwendung des Programmes wurde von der pathologischen Abteilung des Helmholtz-Zentrums München erworben. Um mit diesem Programm die immunhistochemisch gefärbten TMAs bearbeiten zu können, wurden die angefertigten Objektträger einzeln bei 20-facher Vergrößerung mittels eines digitalen Scanners (Mirax-Scanners; Firma Zeiss, Oberkochen) eingescannt und in TIF-Format exportiert. Die Weiterbearbeitung erfolgte an einem handelsüblichen PC. Die eingescannten Slides, entsprechend zweidimensionalen Bildern, wurden in folgender Weise weiterbearbeitet: nach Aufrufen des jeweiligen Slides aus den gespeicherten Datensätzen wurden durch "Umfahrung mit der Computermouse auf dem Bildschirm" die jeweilig zusammengehörenden Gewebestanzten ausgewählt und durch Abgleichen mit der entsprechenden "Anordnungsskizze der Array-Belegung" der zugehörigen Fallnummer zugewiesen und separat gespeichert. Die neu gespeicherten Bilder wurden einzeln aufgerufen und analog dem vorhergehenden Bearbeitungsschritt markiert. Jeder der ein bis drei Gewebestanzten des jeweiligen Karzinomes wurde eine Stanzennummer zugeteilt. Die dabei erhaltenen Bildausschnitte wurden erneut gespeichert. Im Anschluss konnte für jede der Stanzen mittels des Computeprogrammes das erfasste Gewebe in "Nicht-Tumorgewebe" und "Tumorgewebe", entsprechend "Regions of Interest (ROIs)", unterteilt werden. Dies geschah ebenfalls durch "Umfahrung und Markierung mit der Computermouse". Die ROIs sind Grundlage aller weiteren Berechnungen. Die beschriebenen "Auswerteschritte" mussten für jede Färbung einzeln erfolgen. Der Grund liegt darin, dass zwar durch Verwendung konsekutiv angefertigter Schnitte von den TMAs sehr gut zwischen den Färbungen vergleichbare Gewebeschnitte zur Verfügung standen, jedoch eine vollständige Deckung selbstverständlich nicht möglich ist.

Entsprechende Regelsätze zur weiteren Bearbeitung wurden im Vorfeld von Mitarbeitern des Instituts, spezialisiert auf die bildanalytische Auswertung von Gewebeproben, erstellt. Diese

Regelsätze wurden entwickelt um Zellen mit bestimmten Kriterien, beispielsweise an Hand von Färbereigenschaften oder subzellulären Verteilungsmustern zu detektieren und zu quantifizieren. Die Berechnungen erfolgen schrittweise. Im ersten Schritt werden die Bilder entsprechend eines bestimmten Algorithmus, bei dem Gruppen von *Pixeln* als Objekte wiedererkannt werden, segmentiert. Weiter werden die Objekte basierend auf Farbeintensität, Morphologie, Anordnung der Zellen zueinander und spezieller Färbemerkmale klassifiziert. Flächen mit unterschiedlichen Färbereigenschaften, insbesondere Intensität und Farbabstufungen, Formen, Lokalisationen der Zellen zueinander oder subzelluläre Verteilungsmuster werden erkannt, quantifiziert und qualifiziert und mit Hilfe programminterner Berechnungsverfahren ausgewertet.

Für die Auswertungen der pEGFR-Färbungen wurden die Farbeintensität der Immun-Proteinkomplexe und die zugehörigen relativen Flächen berücksichtigt. Gemessen wurden die durch Protein-AK-Komplexe gefärbten Flächen der als Tumorflächen deklarierten ROIs. Die ROIs wurden unterteilt in Tumorareale in denen Tumorzellen mit gefärbten Anteilen vertreten waren und denjenigen in denen keine AK-Färbungen nachweisbar waren. Der Grund dieser Unterscheidung liegt in der Heterogenität der pEGFR-Expression. So konnten intratumorale Unterschiede der Proteinexpression berücksichtigt werden. Tumorflächen mit AK-Färbung werden als positive Tumorflächen bezeichnet, diejenigen ohne entsprechende Färbung als negativ. Durch Addition der Flächen ergibt sich die jeweilige Gesamttumorfläche.

Bei der Beurteilung der MIB1-Färbungen wurden relative Zellkernflächen/-zahlen (Prozentwerte) entsprechend der Flächen/Anzahl von Zellkernen mit MIB1-positiver Färbung zur Fläche/Anzahl aller Zellkernflächen/-zahlen in den markierten ROIs berechnet. Für diese Verhältniswerte/Prozentwerte werden im Folgenden die Bezeichnungen Proliferationsindex (PI) und -rate synonym verwendet.

Die computerunterstützte Auswertung der CD3-Färbungen berücksichtigt die Anzahl der gefärbten T-Lymphozyten pro ausgewerteter Bildeinheit (*Pixel*). Es werden relative Ergebnisse mit stetigen Werten berechnet.

2.2.6 Statistische Auswertungen

Die Datensammlungen mit Patientendaten, darunter Angaben zu Alter, Geschlecht, UICC-Kriterien der Karzinome, wurden mittels Excel-Tabellen und Word Dokumenten erstellt (Firma Microsoft, Redmond, Washington). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem *Software* Programm SPSS für Windows, Version 18.0. (SPSS Inc., Chicago, IL). Die Lizenz für dieses Computerprogramm wurde über das IT-Zentrum der Technischen Universität München erworben.

Es wurden die in dieser Arbeit dargestellten Berechnungen sowohl für das Gesamtkollektiv als auch für einzelne Laurénklassen und Subkollektive, bestehend aus Patientengruppen einzelner Primärtumorausbreitungen, Lymphknoten-, Metastasierungs- und UICC-Stadien sowie getrennt nach dem jeweiligen Resektionsstatus und dem *Tumor-Grading*, angefertigt. Kreuztabellen sowie Kaplan-Meier-Kurven wurden zusätzlich für das Kollektivpaar, bestehend aus intestinalen bzw. nicht-intestinalen Magenkarzinomen, erstellt.

Erhobene Daten für quantitative Werte wurden einer detaillierten deskriptiven Analyse unterzogen. Qualitative Parameter wurden mit absoluten und relativen Häufigkeiten, mit entsprechenden Minima und Maxima, Mittelwerten, Medianen sowie einzelnen Perzentilen dargestellt. Zur Berechnung von Korrelationen, wie sie in Kapitel 3.2.2 dargestellt werden, wurde der Spearman- bzw. Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet (siehe S. 45). Die Überprüfung auf Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen Variablen, dargestellt in Kreuztabellen wurde mit dem Chi-Quadrat- (χ^2) -Test nach Pearson durchgeführt. Cox-Regressionen mit Einflussgrößen, wie in Kapitel 3.2.4 notiert, sind dort unter Angaben der *Hazard-Ratios*, der Konfidenzintervalle und Signifikanzen abgebildet (siehe S. 59-61). Die multivariaten Cox-Regressionen erfolgten mit vorwärts und rückwärts schrittweiser Variablenselektion. Angegeben werden jeweils die zugehörigen p-Werte. Als signifikant wurden Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner 0,05 festgelegt.

Darüber hinaus wurden für die Dateninterpretation Kaplan-Meier-Kurven verwendet. Diese statistische Methode wird auch als Überlebenszeitanalyse bezeichnet. Sie dient in der vorliegenden Arbeit vor allem zur graphischen Darstellung des Überlebens der Kollektivpatienten nach Resektion des jeweiligen Magenkarzinoms in Abhängigkeit bestimmter Variablen, wie beispielsweise der Expression der untersuchten immunhistochemischen Marker. Für den Vergleich zwischen den verschiedenen Überlebensgruppen wurde der *Log Rank Test* mit einem statistischen Signifikanzniveau von 0,05 verwendet.

Die Ausführungen beschränken sich auf Grund der Fülle der Ergebnisse auf relevante Teilergebnisse der Gesamtberechnungen. Die Abweichungen der Fallzahlen zwischen den einzelnen Kollektiven, entsprechend der untersuchten Marker, sind begründet in der fehlenden Auswertbarkeit einzelner Gewebestanden (siehe Kap. 2.2.4, S. 26).

3 Ergebnisse

3.1 Gesamtkollektiv und Kollektive einzelner untersuchter Färbungen

In der hier vorliegenden Arbeit wurden in die Auswertungen Tumorpräparate von Karzinomresektionen mit Operationszeitpunkten aus dem Zeitraum 1991 bis 2005 eingeschlossen. Das Kollektiv umfasst Karzinome mit Lokalisationen aller Bereiche des Magens mit Ausnahme von Adenokarzinomen des ösophagogastralen Überganges. Zur genauen Lokalisation der Tumore, mit Haupttumormasse im Antrum-, Korpus- oder- Fundusbereich, liegen keine Angaben vor. Eingeschlossen wurden Untersuchungsmaterialien von 230 Magenkarzinomen aller vier Stadien dieser Tumorerkrankung (siehe Abb. 5). Das Balkendiagramm der Abbildung 5 verdeutlicht die relative Zunahme der Fallzahlen von diffusen Magenkarzinomen in den Tumorstadien 3 und 4 bei einer relativen Abnahme der intestinalen Karzinome verglichen mit den Stadien 1 und 2.

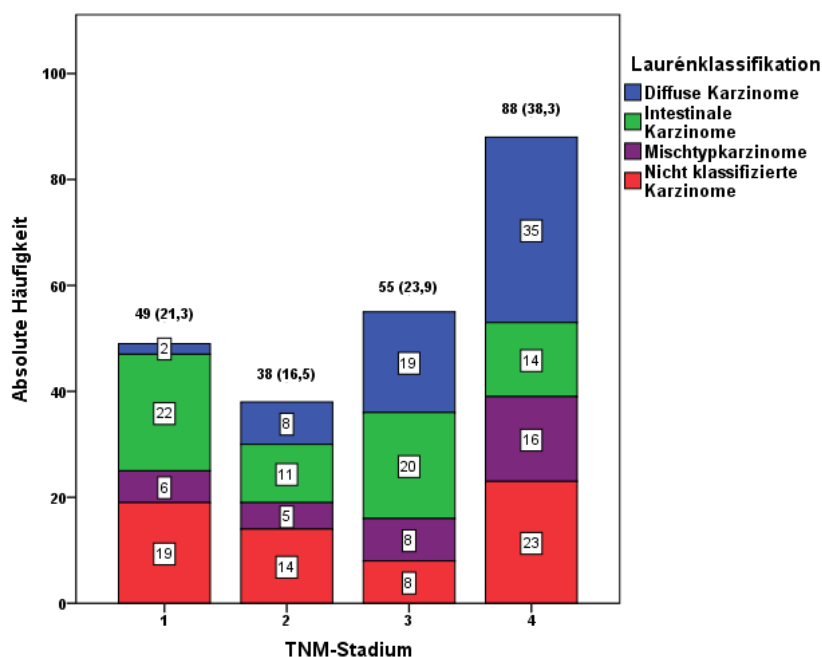


Abbildung 5: Verteilung der TNM-Stadien innerhalb des Gesamtkollektives mit Angaben zur Laurénklassifikation: Dargestellt sind die absoluten Fallzahlen mit Prozentanteilen in Klammern (%); gesamt: n=230.

Die prozentuale Verteilung der Laurénklassen im Gesamtkollektiv stellt sich wie folgt dar: Anteil der Karzinome vom intestinalen Typ 29,1%, vom diffusen Typ nach Laurén 27,8%, Mischtypkarzinome 15,2% sowie Magenkarzinome, die keiner Laurénklasse zugeordnet werden konnten entsprechend 27,8% (siehe Tab. 7, S. 33).

Die Geschlechterverteilung ist in Tabelle 7 vermerkt (siehe S. 33). Von den 230 Patienten sind 146 Männer und 84 Frauen. Das Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der jeweiligen Operation zwischen 32,0 und 84,8 Jahren mit einem mittleren Alter von 64,5 Jahren und einem Median bei 66,0 Jahren. Geschlechter-getrennt betrachtet ergeben sich für das mittlere Alter der Frauen 65,9 Jahre (Median 69,1 Jahre) und für das der Männer 63,7 Jahre (Median 64,7 Jahre). Abbildung 6 zeigt die Altersverteilung des Patientenkollektives.

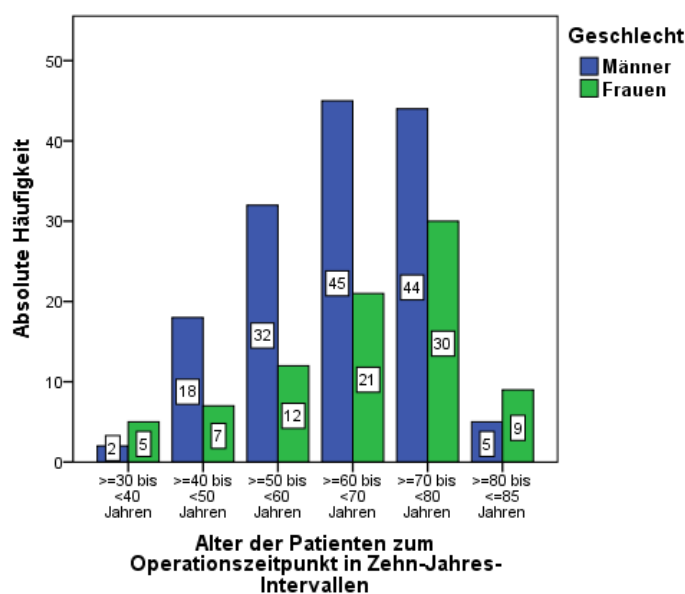


Abbildung 6: Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Operation: Einteilung in 10-Jahres Intervalle (Ausnahme: Intervall >80 Jahren beinhaltet einen Zeitraum von fünf Jahren); gesamt: n=230.

Einige Autoren trennen ihre Patientenkollektive in Altersgruppen mit jüngeren Patienten bis etwa zum 70sten und Patienten über dem 70sten Lebensjahr. Hintergrund dafür ist ein geringeres Gesamtüberleben älterer Patienten. Beispielsweise zeigten Dittmar und Kollegen, dass sich die medianen Überlebenszeiten jüngerer und älterer Patienten, mit einem längeren Überleben jüngerer Patienten, signifikant unterscheiden (Dittmar et al., 2012). Für das hier vorliegende Gesamtkollektiv konnte durch univariate Cox-Regression ein Einfluss des Alters auf das Überleben gezeigt werden (siehe Tab. 18, S. 60). Andererseits bestehen bei Berechnung von Kaplan-Meier-Kurven sowohl für das Kollektiv von Dittmar und Kollegen als auch für das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv keine signifikanten Unterschiede beider Patientengruppen (Berechnungen nicht dargestellt) (Dittmar et al., 2012). Bei nachfolgenden Auswertungen wurde daher nicht zwischen verschiedenen Altersgruppen unterschieden. Weitere Angaben zu den einzelnen Patientenkollektiven können Tabelle 7 entnommen werden (siehe Tab. 7, S. 33).

Tabelle 7: Patientenkollektiv

Charakteristika	Gesamtkollektiv	EGFR	pEGFR	pEGFR-Definiens	β-Catenin	MIB1	CD3
Gesamtfallzahl	230 (100)	195 (100)	150 (100)	49 (100)	199 (100)	182 (100)	167 (100)
Alter (Jahre)							
Median	66,0	67,0	67,7	69,0	66,6	68,1	69,0
Range	32,0-84,8	32,0-84,8	32,0-84,8	42,2-81,0	32,0-84,8	32,0-84,8	32,0-84,8
Geschlecht							
männlich	146 (63,5)	127 (65,1)	103 (68,7)	31 (63,3)	131 (65,8)	123 (67,6)	113 (67,7)
weiblich	84 (36,5)	68 (34,9)	47 (31,3)	18 (36,7)	68 (34,2)	59 (32,4)	54 (32,3)
Tumorstadium							
pT1	23 (10,0)	15 (7,7)	12 (8,0)	3 (6,1)	14 (7,0)	13 (7,1)	12 (7,2)
pT2	91 (39,6)	76 (39,0)	64 (42,7)	22 (44,9)	81 (40,7)	77 (42,3)	69 (41,3)
pT3	98 (42,6)	89 (45,6)	61 (40,7)	22 (44,9)	88 (44,2)	80 (44,0)	74 (44,3)
pT4	18 (7,8)	15 (7,7)	13 (8,7)	2 (4,1)	16 (8,0)	12 (6,6)	12 (7,2)
Lymphknotenmetastasen							
pN0	58 (25,2)	48 (24,5)	36 (24,0)	12 (24,5)	47 (23,6)	44 (24,2)	42 (25,1)
pN+	171 (74,3)	146 (75,0)	114 (76,0)	37 (75,5)	152 (76,4)	138 (75,8)	125 (74,9)
fehlend	1 (0,5)	1 (0,5)					
Fernmetastasen							
M0	164 (71,3)	136 (69,7)	106 (70,7)	40 (81,6)	141 (70,9)	132 (72,5)	123 (73,7)
M+	66 (28,7)	59 (30,3)	44 (29,3)	9 (18,4)	58 (29,1)	50 (27,5)	44 (26,3)
Residualtumor							
R0	130 (56,5)	106 (54,4)	86 (57,3)	30 (61,2)	110 (55,3)	102 (56,0)	96 (57,5)
R+	79 (34,3)	71 (36,4)	46 (30,7)	15 (30,6)	69 (34,7)	63 (34,6)	57 (34,1)
fehlend	21 (9,1)	18 (9,2)	18 (12,0)	4 (8,2)	20 (10,1)	17 (9,3)	14 (8,4)
Grading							
G1	2 (0,9)	1 (0,5)	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (0,5)	1 (0,5)	1 (0,6)
G2	39 (17,0)	36 (18,5)	32 (21,3)	11 (22,4)	36 (18,1)	33 (18,1)	33 (19,8)
G3	185 (80,4)	154 (79,0)	114 (76,0)	38 (77,6)	158 (79,4)	144 (79,1)	129 (77,2)
fehlend	4 (1,7)	4 (2,0)	3 (2,0)		4 (2,0)	4 (2,2)	4 (2,4)
UICC-Klassifikation							
I	49 (21,3)	38 (19,5)	31 (20,7)	8 (16,3)	36 (18,1)	37 (20,3)	33 (19,8)
II	38 (16,5)	33 (16,9)	23 (15,3)	12 (24,5)	36 (18,1)	34 (18,7)	30 (18,0)
III	55 (23,9)	47 (24,1)	37 (24,7)	17 (34,7)	48 (24,1)	42 (23,1)	45 (26,9)
IV	88 (38,3)	77 (39,5)	59 (39,3)	12 (24,5)	79 (39,7)	69 (37,9)	59 (35,3)
Laurénklassifikation							
Intestinale Karzinome	67 (29,1)	61 (31,3)	54 (36,0)	16 (32,7)	60 (30,2)	58 (31,9)	58 (34,7)
Diffuse Karzinome	64 (27,8)	49 (25,1)	31 (20,7)	17 (34,7)	49 (24,6)	41 (22,5)	34 (20,4)
Mischtypkarzinome	35 (15,2)	28 (14,4)	21 (14,0)	4 (8,2)	32 (16,1)	29 (15,9)	26 (15,6)
Nicht klassifizierte Karzinome	64 (27,8)	57 (29,2)	44 (29,3)	12 (24,5)	58 (29,1)	54 (29,7)	49 (29,3)
Laurénklassifikation							
Intestinale Karzinome	67 (29,1)	61 (31,3)	54 (36,0)	16 (32,7)	60 (30,2)	58 (31,9)	58 (34,7)
Nicht-intestinale Karzinome	163 (70,9)	134 (68,7)	96 (64,0)	33 (67,3)	139 (69,8)	124 (68,1)	109 (65,3)

Um die Aussagekraft des untersuchten Kollektives bezüglich der Prognose zu verifizieren wurden Überlebenskurven unter Berücksichtigung der UICC-Kriterien angefertigt und im Folgenden dargestellt. Berücksichtigt wurden die einzelnen Parameter der erweiterten TNM-R- und G-Klassifikation, wie die Primärtumorausdehnung (pT), die Lymphknotenmetastasierung (pN), die Fernmetastasierung (M), der Resektionsstatus (R) und die Tumordifferenzierung (G). Zusätzlich ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der Kollektivpatienten in Abhängigkeit des TNM-Stadiums über die Zeit nach der Operation dargestellt (siehe Abb. 7-12, S. 34-37).

Wie aus der folgenden Kaplan-Meier-Kurve ersichtlich ist, weisen Kollektivpatienten mit einem Primärtumorstadium pT1 über einen Zeitraum von fünf Jahren eine durchschnittliche Überlebenswahrscheinlichkeit von ca 80% auf (siehe Abb. 7). Die entsprechende Wahrscheinlichkeit der Patienten mit einem Primärtumorstadium pT2 liegt für den selben Zeitraum bei nur noch 50%. Patienten mit pT3- und pT4-klassifizierten Tumoren zeigen durchschnittlich eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von unter 20% (siehe Abb. 7).

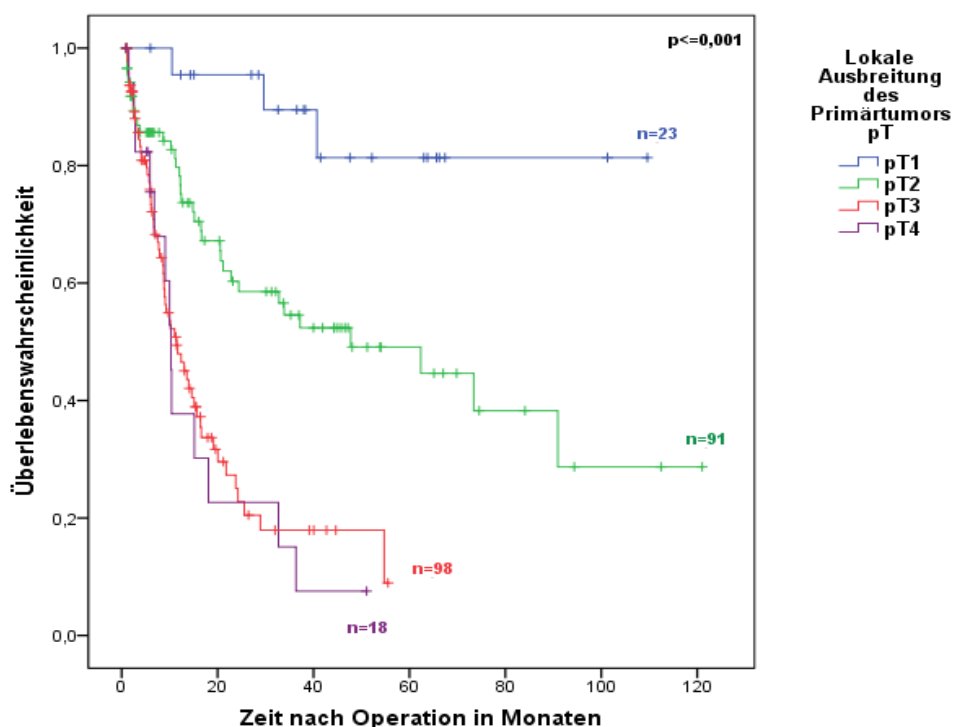


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der Primärtumorausdehnung: Durchschnittlich bessere Prognose der Patienten mit geringerer Primärtumorausdehnung; gesamt: n=230.

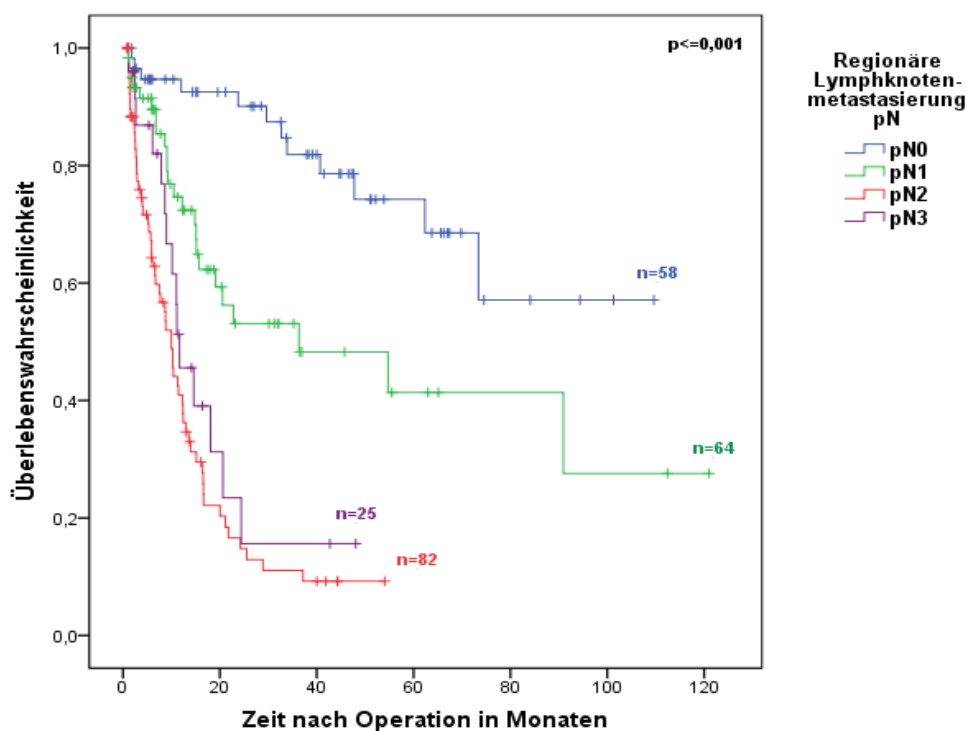


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der Lymphknotenmetastasierung: Durchschnittlich bessere Prognose der Patienten mit weniger Lymphknotenmetastasen; gesamt: n=229.

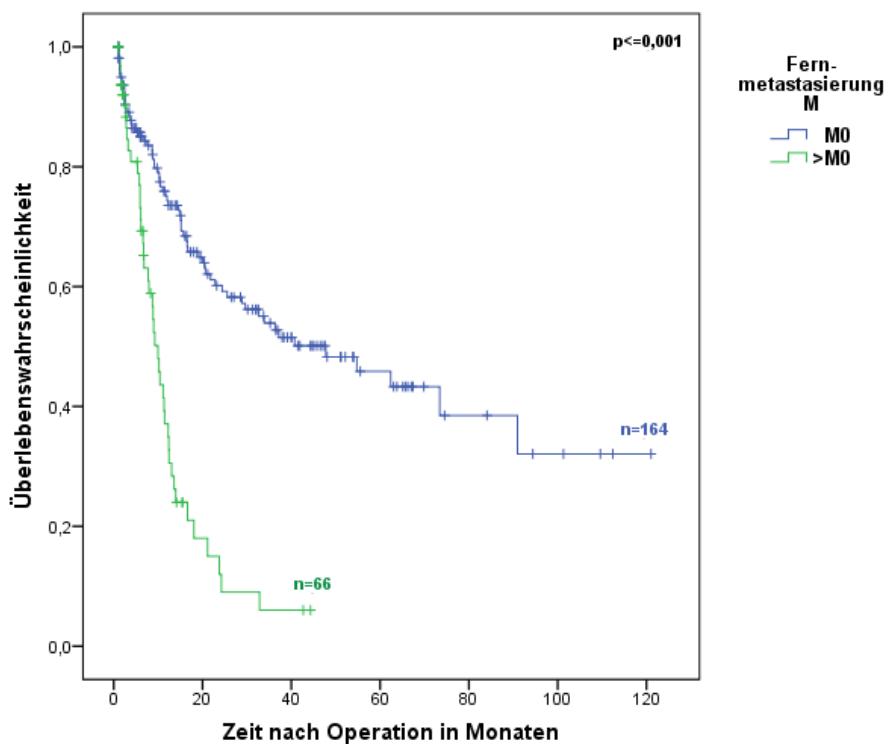


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der Fernmetastasierung: Durchschnittlich bessere Prognose der Patienten ohne Fernmetastasen; gesamt: n=230.

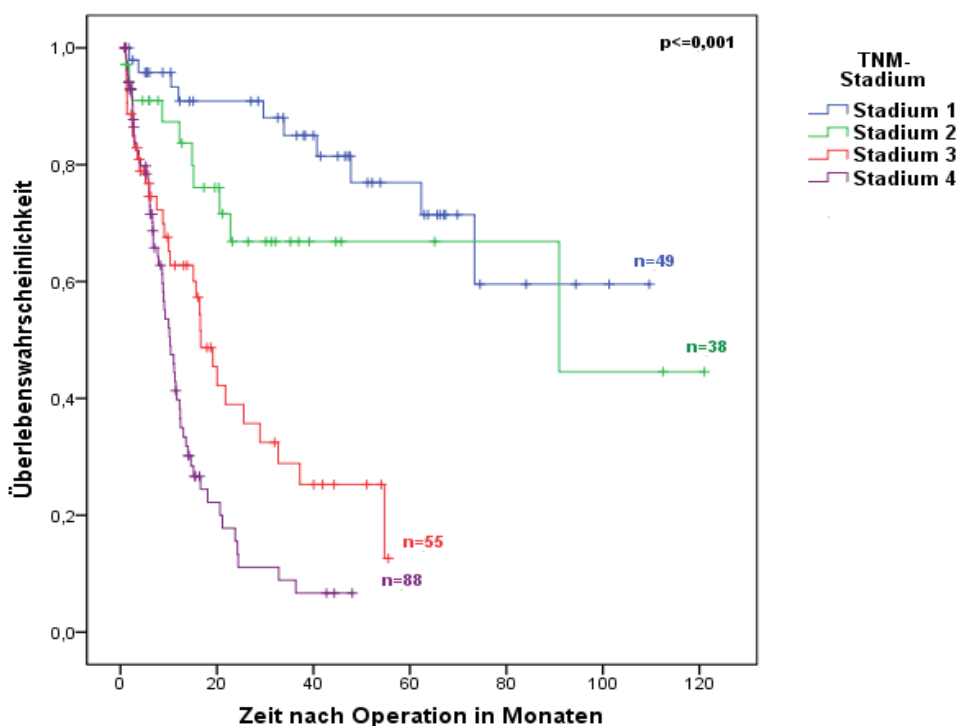


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit des TNM-Stadiums: Durchschnittlich bessere Prognose der Patienten mit niedrigerem TNM-Stadium; gesamt: n=230.

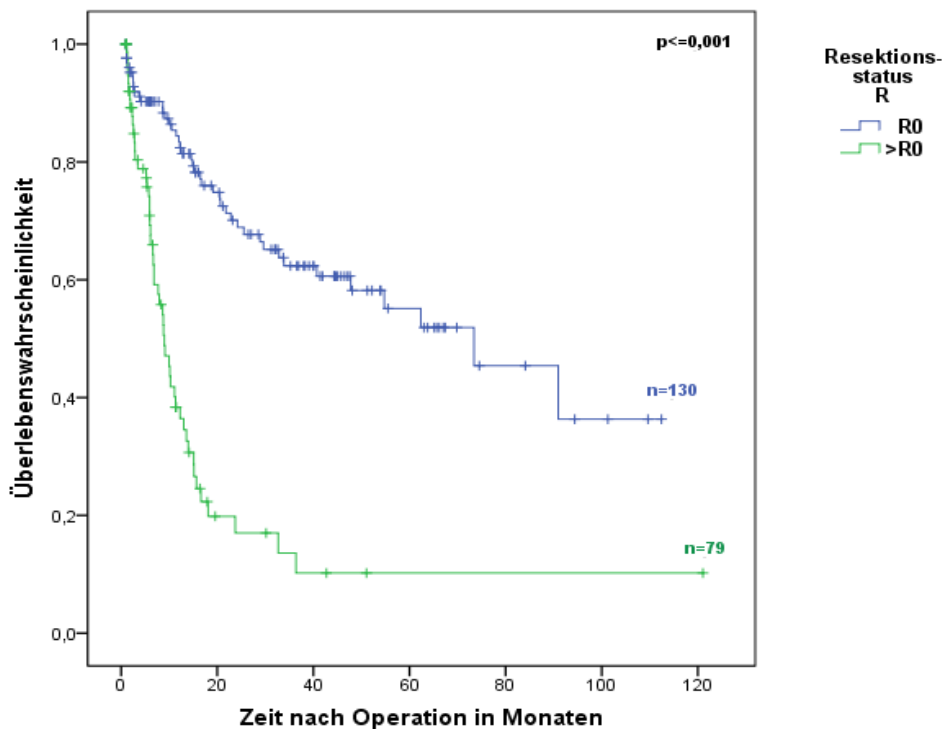


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit des Resektionsstatus: Durchschnittlich bessere Prognose der Patienten mit vollständig resezierten Tumoren; gesamt: n=209.

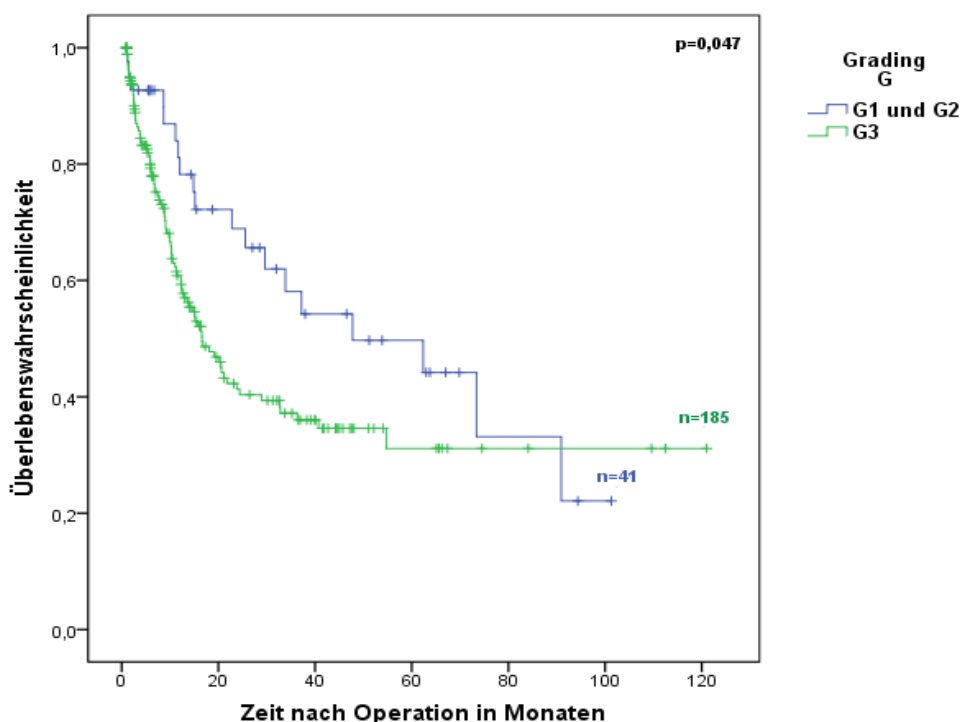


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit des Grading: Durchschnittlich bessere Prognose der Patienten mit höher differenzierten Tumoren; gesamt: n=226.

Kollektivpatienten ohne pathologisch nachgewiesene Lymphknotenmetastasen (pN0) zum Zeitpunkt der Operation haben mit 70% eine deutlich höhere Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit Lymphknotenmetastasen (pN1-pN3), deren durchschnittliche Überlebensrate sich mit Zunahme der Anzahl positiver Lymphknoten von etwa 40% (pN1) auf unter 20% (pN2 und pN3) verringert (siehe Abb. 8, S. 35).

Ohne bekannte Fernmetastasierung (M0) zum Zeitpunkt der Operation leben nach einem Zeitraum von fünf Jahren noch etwa 45% der Patienten. Demgegenüber zeigt der Kurvenverlauf eine sehr geringe Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit einem Nachweis von Fernmetastasen (M>0) (siehe Abb. 9, S. 35).

Zusammengefasst lässt Abbildung 10 eine deutlich bessere Prognose für Patienten mit niedrigeren Tumorstadien erkennen. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten für die ersten fünf postoperativen Jahre liegen in den Stadien 1 und 2 bei etwa 75% und 65%. In den weiter fortgeschrittenen Stadien 3 und 4 sinken diese auf unter 20% (siehe Abb. 10, S. 36).

Dem Operationserfolg, im Sinne einer tumorfreien Resektion, wird ebenso wie der histopathologischen TNM-Klassifikation eine große Bedeutung für das Langzeitüberleben von Patienten mit einem Magenkarzinom beigemessen. Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, liegt die

Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit R0-resezierten Karzinomen bei über 50%. Wurde keine resttumorfreie Resektion erzielt, so liegt die durchschnittliche Überlebensrate bei annähernd 16% (siehe Abb. 11, S. 36).

Der Einfluss des *Tumor-Gradings* (G) auf die Prognose der Patienten ist statistisch mit einem p-Wert von 0,047 der entsprechenden Kaplan-Meier-Kurve gegeben. Es fällt die verhältnismäßig geringere Signifikanz dieses Kriteriums im Vergleich zu den beschriebenen TNM- und R-Kriterien auf (siehe Abb. 12, S. 37).

Aus den oben dargestellten Kaplan-Meier-Kurven, alle hoch signifikant, ist erkennbar, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit statistisch entscheidend vom Tumorstadium zum Diagnosezeitpunkt und dem Resektionsstatus abhängt. Die Kurvenverläufe sind vergleichbar mit denjenigen, die in anerkannten Veröffentlichungen zu finden sind (Warneke et al., 2011). Da diese Stadienzuordnung bislang als der prognostisch härteste Marker, unabhängig von der Laurénklassifikation der Magenkarzinome gilt, kann das hier vorliegende Kollektiv hinsichtlich dieser Prognosefaktoren als repräsentative Stichprobe eines fiktiven Gesamtkollektives aller Magenkarzinompatienten angesehen werden und so als solide Basis für die folgenden Auswertungen der durchgeführten AK-Färbungen dienen.

3.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

In die jeweiligen Auswertungen der AK-Färbungen konnten Gewebeproben von bis zu 199 Patienten eingeschlossen werden. Die Alters- sowie Geschlechterverteilung, die Fallzahlen der TNM-, G,- und R-Kriterien ebenso wie diejenigen der Laurénklassen sind unter den Kollektiven vergleichbar und werden daher an dieser Stelle nicht im Detail erläutert (siehe Tab. 7, S. 33). Die Ergebnisdarstellungen erfolgen für die entsprechenden statistischen Verfahren jeweils in der Reihenfolge der EGFR-, pEGFR-, β -Catenin-, MIB1- und CD3-Färbungen. Graphische Darstellungen in Form von Kaplan-Meier-Kurven unter Einschluss von zwei, drei bzw. vier lichtmikroskopisch ausgewerteten Färbungen schließen sich an die Darstellungen der Überlebenskurven unter Berücksichtigung der einzelnen Färbungen an.

Die folgenden Abbildungen zeigen beispielhaft Ausschnitte der immunhistochemischen AK-Färbungen (siehe Abb. 13-22, S. 39-40).

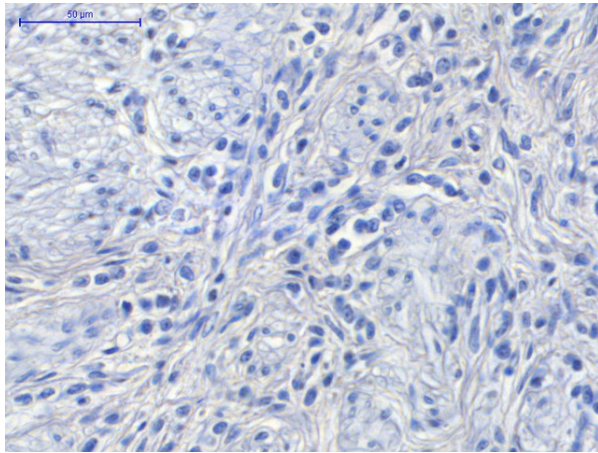


Abbildung 13: EGFR-Färbung: Score 0.

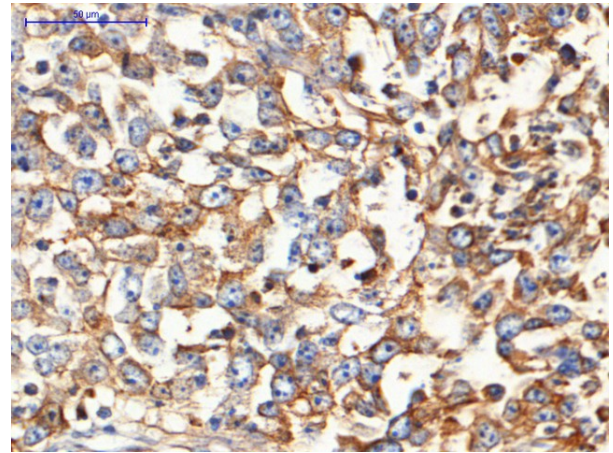


Abbildung 14: EGFR-Färbung: Score 3.

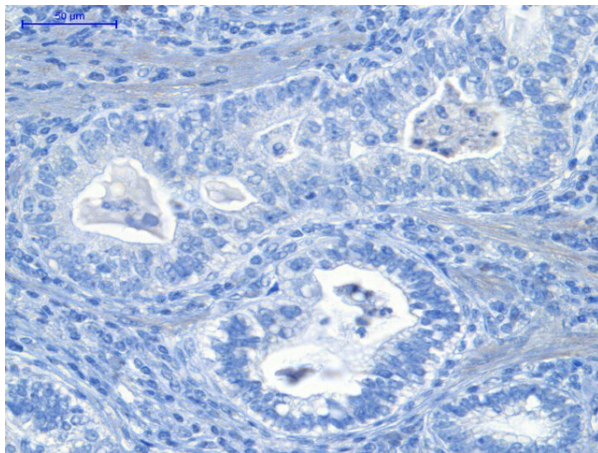


Abbildung 15: pEGFR-Färbung: Score 0.

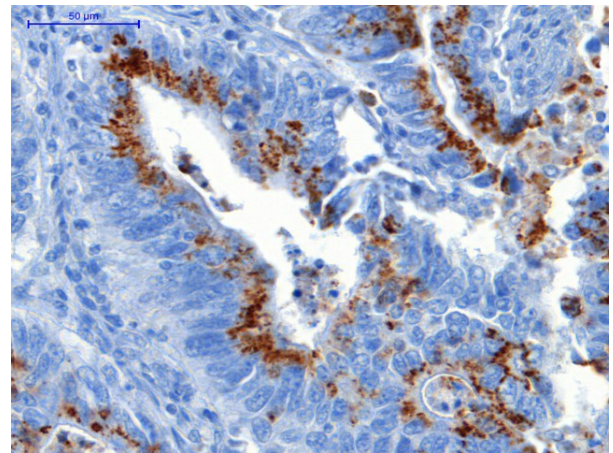


Abbildung 16: pEGFR-Färbung: Score 1.

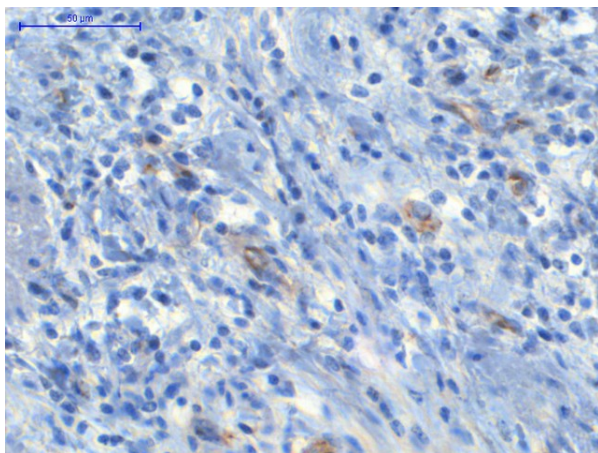


Abbildung 17: β-Catenin-Färbung: Score 0.

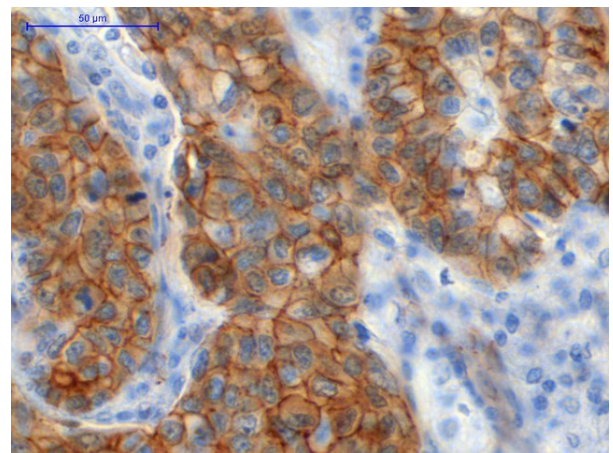


Abbildung 18: β-Catenin-Färbung: Score 3.

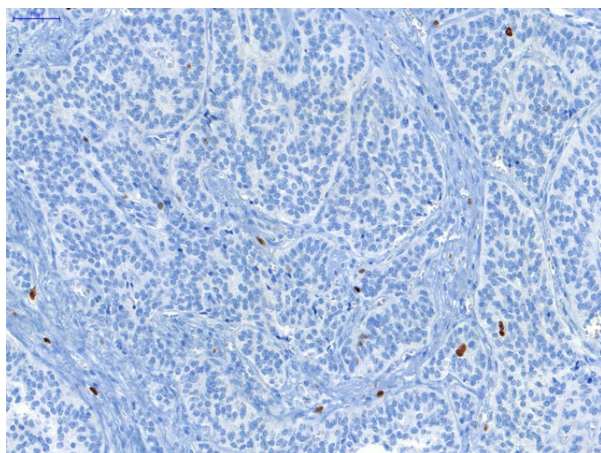


Abbildung 19: MIB1-Färbung: sehr niedriger PI.

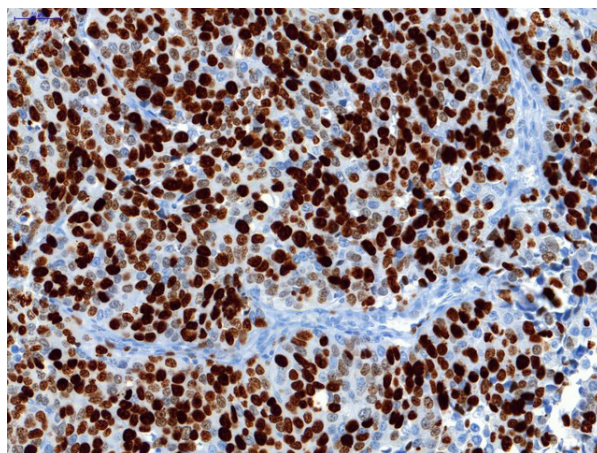


Abbildung 20: MIB1-Färbung: sehr hoher PI.

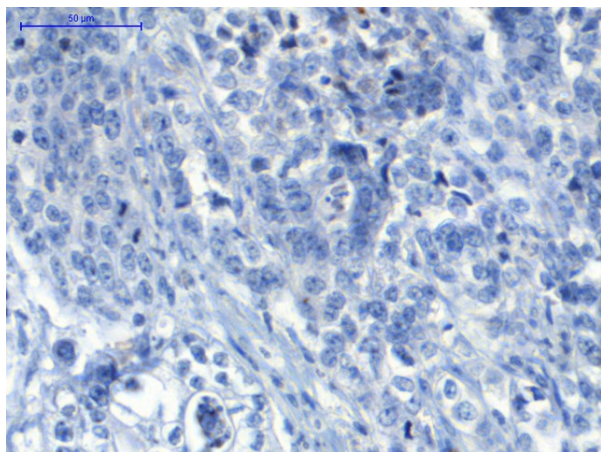


Abbildung 21: CD3-Färbung: Score 0.

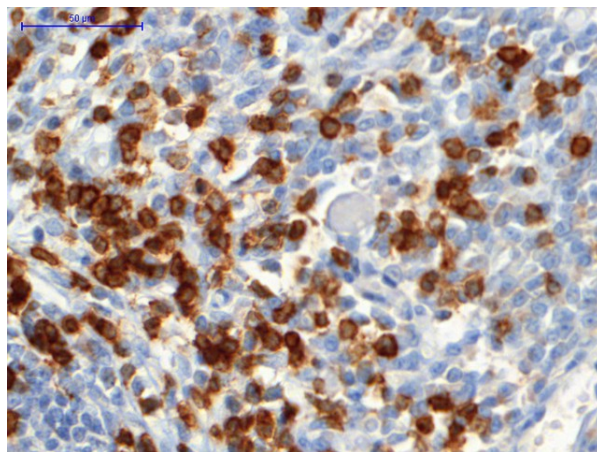


Abbildung 22: CD3-Färbung: Score 3.

Die Häufigkeitsverteilung der semiquantitativen Scores und kontinuierlichen Messwerte der Definiens-Auswertungen können Tabelle 8 und 9 entnommen werden (siehe S. 41-42).

Die Tabelle 8 lässt erkennen, dass über 60% der untersuchten Karzinome als negativ für eine EGFR-AK-Färbung eingestuft wurden (siehe S. 41). Die zugewiesenen Farbe-Scores 1 bis 3 sind mit jeweils etwa 11% bzw. 13% aller ausgewerteten Karzinome annähernd gleichmäßig im Patientenkollektiv verteilt. 60% der pEGFR-Färbungen zeigen keine bzw. nur eine sehr geringe Expression der phosphorylierten Rezeptorform. Für den immunhistochemischen Nachweis von β -Catenin ergab sich in 80% der Fälle ein Score 2 oder 3. Auffällig ist, dass über 96% der intestinalen Karzinome positiv für einen β -Catenin-Nachweis sind. Ein Verteilungsmuster mit Überwiegen der Scores 1 und 2 sind für die CD3-Färbungen zu verzeichnen. Weniger als 10% der Tumorgewebe (7,8%) enthalten keine oder eine sehr geringe Zahl an CD3-positiven Lymphozyten und wurden als CD3-negativ eingestuft. Etwa 2% zeigen eine hohe Anzahl an

CD3-positiven Immunzellen und wurden mit Score 3 bewertet.

Tabelle 8: Verteilung der lichtmikroskopisch ermittelten Färbe-Scores

Laurénklassifikation	alle	Diffuse Karzinome	Intestinale Karzinome	Mischttypkarzinome	Nicht klassifizierte Karzinome
Scores					
EGFR					
0/negativ	124 (63,6)	37 (75,5)	29 (47,5)	18 (64,3)	40 (70,2)
1	22	5	8	3	6
2	22	2	11	3	6
3	27	5	13	4	5
1-3/positiv	71 (36,4)	12 (24,5)	32 (52,5)	10 (35,7)	17 (29,8)
gesamt	195 (100)	49 (100)	61 (100)	28 (100)	57 (100)
pEGFR					
0/negativ	90 (60,0)	11 (35,5)	34 (63,0)	13 (61,9)	32 (72,7)
1/positiv	60 (40,0)	20 (64,5)	20 (37,0)	8 (38,1)	12 (27,3)
gesamt	150 (100)	31 (100)	54 (100)	21 (100)	44 (100)
β-Catenin					
0/negativ	16 (8,0)	5 (10,2)	2 (3,3)	3 (9,4)	6 (10,3)
1	21	9	0	6	6
2	77	22	18	16	21
3	85	13	40	7	25
1-3/positiv	183 (92,0)	44 (89,8)	58 (96,7)	29 (90,6)	52 (89,7)
gesamt	199 (100)	49 (100)	60 (100)	32 (100)	58 (100)
CD3					
0/negativ	13 (7,8)	2 (5,9)	2 (3,4)	3 (11,5)	6 (12,2)
1	80	23	22	12	23
2	71	9	33	10	19
3	3	0	1	1	1
1-3/positiv	154 (92,2)	32 (94,1)	56 (96,6)	23 (88,5)	43 (88,8)
gesamt	167 (100)	34 (100)	58 (100)	26 (100)	49 (100)

Anmerkung: lichtmikroskopische Auswertungen der EGFR-, pEGFR-, β-Catenin- und CD3-Färbungen: angegeben sind die Anzahl der Patienten mit Prozentanteil am jeweiligen Kollektiv in Klammern (%).

Die bei der visuellen Mikroskopauswertung als positiv für die phosphorylierte EGFR-Form (Y1068) bewerteten Karzinome wurden mit der im Kapitel "Material und Methoden" beschriebenen Computer-Software ausgewertet (siehe Kap 2.2.5, S. 28). Dabei konnten 49 der insgesamt 60 als positiv eingestuft Karzinome in die sich anschließenden Berechnungen integriert werden (siehe Tab. 7, S. 33). Der Anteil der diffusen Karzinome beträgt in diesem Subkollektiv 34,7%. Derjenige der intestinalen Karzinome liegt bei 32,7%, der der Mischtypkarzinome bei 8,2% und die Anzahl der nach Laurén nicht klassifizierten Karzinome beläuft sich auf 24,5%. Auffällig ist ein relativ geringerer Mittelwert von weit unter 5% der beiden

Flächenverhältnisse (AK-gefärbte Fläche zur positiven Tumorfläche bzw. zur Gesamtumorfläche) der Mischtypkarzinome verglichen mit Tumoren der übrigen Laurénklassen (siehe Tab. 9).

Tabelle 9: Messwerte der pEGFR-, MIB1- und CD3-Färbungen: Definiens-Computerauswertung

Laurénklassifikation	alle	Diffuse Karzinome	Intestinale Karzinome	Mischtypkarzinome	Nicht klassifizierte Karzinome
pEGFR-Färbeintensität					
Minimum	0,2085	0,2767	0,2478	0,2651	0,2085
Maximum	0,8145	0,7392	0,8145	0,4841	0,5814
Mittelwert	0,3991	0,4526	0,3614	0,3785	0,3804
25. Perzentile	0,3178	0,3301	0,2632	0,2785	0,3102
Median	0,3408	0,3839	0,3323	0,3824	0,3807
75. Perzentile	0,4439	0,5987	0,3941	0,4746	0,4347
pEGFR-Gefärbte Fläche/positive Tumorfläche					
Minimum	0,0041	0,0042	0,0049	0,0130	0,0126
Maximum	0,2634	0,2634	0,2279	0,0503	0,2047
Mittelwert	0,0760	0,0861	0,0715	0,0309	0,0827
25. Perzentile	0,333	0,0423	0,0214	0,0151	0,0355
Median	0,0589	0,0647	0,0625	0,0301	0,0618
75. Perzentile	0,1019	0,0982	0,1097	0,0475	0,1305
pEGFR-Gefärbte Fläche/Gesamtumorfläche					
Minimum	0,0007	0,0042	0,0007	0,0100	0,0025
Maximum	0,2320	0,2320	0,2263	0,0469	0,1914
Mittelwert	0,0676	0,0808	0,0600	0,0273	0,0727
25. Perzentile	0,0206	0,0420	0,0146	0,0126	0,0119
Median	0,0556	0,0647	0,0418	0,0262	0,0591
75. Perzentile	0,0895	0,0895	0,0944	0,0432	0,1292
Proliferationsindex/MIB1					
Minimum	0,0044	0,0256	0,0505	0,0317	0,0044
Maximum	0,9259	0,8198	0,9214	0,9259	0,9115
Mittelwert	0,4615	0,3760	0,4985	0,4563	0,4895
25. Perzentile	0,2743	0,2013	0,2652	0,2808	0,3160
Median	0,4744	0,3631	0,5066	0,4745	0,4994
75. Perzentile	0,6465	0,5098	0,7179	0,5891	0,6897
CD3-Messwerte					
Minimum	0,0200	0,1000	0,1600	0,0500	0,0200
Maximum	18,3400	9,9100	18,2200	17,9100	18,3400
Mittelwert	2,6106	1,5412	3,1384	2,6846	2,6886
25. Perzentile	0,7500	0,4575	0,9400	0,8550	0,6550
Median	1,5300	1,0800	2,2450	1,4650	1,7000
75. Perzentile	3,5000	1,7900	4,9000	3,5350	3,2900

Demgegenüber steht ein vergleichbarer Mittelwert der Färbeintensität der Mischtypkarzinome mit denjenigen der diffusen und nicht klassifizierbaren Karzinome und einer durchschnittlich niedrigeren Intensität der intestinalen Karzinome (siehe Tab. 9, S. 42).

Für die MIB1-Färbungen erfolgten die Auswertungen ebenfalls mit der *Computer-Software*. Maßzahlen zu den ermittelten Messwerten können Tabelle 9 entnommen werden (siehe S. 42).

Für entsprechende Auswertungen der CD3-AK-Färbungen mittels *Definiens-Software*-Programm wurden ebenfalls stetige Werte verwendet. Sie geben die durchschnittliche Anzahl der gefärbten Kerne pro definierter Tumorfläche an. Da es noch keine etablierten Grenzwerte zur Auswertung gibt, wurden diese, wie für die beiden vorherigen, für das vorliegende Kollektiv eigens unter Verwendung von Histogrammen festgesetzt. Die gemessenen Werte haben eine Spannweite von 18,32. Das Minimum liegt bei 0,02, das Maximum bei 18,34. Der Mittelwert lag bei 2,61 und der Median bei 1,53.

3.2.1 Kreuztabellen

Zur Einschätzung der Zusammenhänge zwischen der immunhistochemisch detektierten Proteinexpressionen untersuchter Marker in den Geweben und klinisch-pathologischen Kriterien dient Tabelle 10 (siehe S. 44). In dieser nachstehenden Kreuztabelle sind unter Berücksichtigung zusammengefasster Färbe-Scores der jeweiligen Proteinexpressionen die zugehörigen Signifikanzen angegeben. Detailliertere Analysen mit Unterteilung der als positiv klassifizierten Karzinome in einzelne Score-Gruppen (0 bis maximal 3) erbrachten nur vereinzelt aussagekräftige und signifikante Ergebnisse (Berechnungen nicht dargestellt). Wie der Tabelle zu entnehmen ist, bestehen statistische Abhängigkeiten zwischen den Laurénklassen und dem immunhistochemischen Nachweis des EGFRs, seiner phosphorylierten Form (Y1068) bzw. dem Nachweis CD3-positiver T-Lymphozyten im Tumorgewebe mittels *Definiens-Software*. Weitere Zusammenhänge konnten jeweils zwischen der UICC-Klassifikation, dem Lymphknotenstatus sowie dem Residualtumorstatus mit den Auswertungen der CD3-Färbungen verzeichnet werden. Statistisch bestehen Zusammenhänge zwischen der Fernmetastasierung der Karzinome und den Ergebnissen der lichtmikroskopischen Auswertung der CD3-AK-Färbungen. Durch Verwendung der *Definiens-Software* gelang es eine statistische Abhängigkeit zwischen der Tumorausbreitung und der CD3-Färbung aufzuzeigen. Für den Residualtumorstatus existiert statistisch ein Zusammenhang sowohl mit der EGFR-Expression als auch mit dem MIB1-Nachweis in den untersuchten Geweben (siehe Tab. 10, S. 44).

Tabelle 10: Kreuztabelle

Charakteristika	EGFR (n=195)			pEGFR (n=150)			β-Catenin (n=199)			MIB1 (n=182)			CD3 (n=167)			CD3-Definiens (n=167)		
	negativ	positiv	p-Wert	negativ	positiv	p-Wert	negativ	positiv	p-Wert	<=Mittelwert	>Mittelwert	p-Wert	negativ	positiv	p-Wert	<=4,0	>4,0	p-Wert
Alter (Jahre)			0,163			0,505			0,983			0,553			0,756			0,054
<= Median	67	31		47	28		8	92		45	46		7	76		72	11	
> Median	57	40		43	32		8	91		41	50		6	78		63	21	
Operationjahr			0,138			0,504			0,998			0,013			0,931			0,734
<= Median	73	34		50	30		9	103		56	45		7	81		72	16	
> Median	51	37		40	30		7	80		30	51		6	73		63	16	
Geschlecht			0,583			0,250			0,770			0,780			0,623			0,784
männlich	79	48		65	38		10	121		59	64		8	105		92	21	
weiblich	45	23		25	22		6	62		27	32		5	49		43	11	
Tumorstadium			0,968			0,641			0,850			0,101			0,013			0,011
pT1/2	58	33		47	29		8	87		37	53		2	79		59	22	
pT3/4	66	38		43	31		8	96		49	43		11	75		76	10	
Lymphknotenmetastasen			0,056			0,876			0,892			0,675			0,030			0,007
pN0	25	23		22	14		4	43		22	22		0	42		28	14	
pN+	99	48		68	46		12	140		64	74		13	112		107	18	
Fernmetastasen			0,760			0,341			0,847			0,124			0,019			0,126
M0	81	55		61	45		11	130		67	65		6	117		96	27	
M+	43	16		29	15		5	53		19	31		7	37		39	5	
Residualtumor			0,011			0,583			0,219			0,046			0,002			<0,001
R0	61	45		51	35		7	103		42	60		2	94		68	28	
R+	54	17		25	21		8	61		36	27		9	48		55	2	
Grading			0,191			0,831			0,051			0,291			0,710			0,083
G1/2	20	17		19	14		0	37		19	15		2	32		24	10	
G3	101	53		68	46		15	143		66	78		10	119		108	21	
UICC-Klassifikation			0,792			0,405			0,909			0,867			0,003			0,005
I/II	46	25		30	24		6	66		33	38		0	63		44	19	
III/IV	78	46		60	36		10	117		53	58		13	91		91	13	
Laurétklassifikation			0,012			0,012			0,457			0,131			0,313			0,010
Intestinal	29	32		34	20		2	58		24	34		2	56		40	18	
Diffus	37	12		11	20		5	44		26	15		2	32		33	1	
Mischtyp	18	10		13	8		3	29		13	16		3	23		22	4	
Nicht klassifiziert	40	17		32	12		6	52		23	31		6	43		40	9	
Laurétklassifikation			0,002			0,579			0,109			0,278			0,127			0,004
Intestinal	29	32		34	20		2	58		24	34		2	56		40	18	
Nicht-Intestinal	95	39		56	40		14	125		62	62		11	98		95	14	

3.2.2 Korrelationen

Die folgende Übersichtstabelle zeigt ausgewählte Ergebnisse durchgeführter Korrelationen mit klinisch-pathologischen Merkmalen sowie dem Gesamtüberleben der Kollektivpatienten.

Tabelle 11: Korrelationen der Expressionslevel mit klinisch-pathologischen Merkmalen

Kriterium korreliert mit	EGFR	pEGFR	β-Catenin	MIB1	CD3	CD3-Definiens
pT	0,617	0,758	0,020	0,038	0,017	0,001
pN	0,539	0,403	0,086	0,427	0,067	0,031
M	0,132	0,345	0,635	0,341	0,031	0,010
G	0,193	0,862	<0,001	0,301	0,231	0,167
R	0,014	0,752	0,005	0,033	<0,001	<0,001
UICC-Klassifikation	0,243	0,269	0,108	0,652	0,009	0,004
Gesamtüberleben	0,155	0,531	0,206	0,349	0,122	0,470

Anmerkung: der Korrelationskoeffizient für R mit EGFR entspricht **-0,185**; für pT mit β-Catenin **-0,165**; für G mit β-Catenin **-0,268**; für R mit β-Catenin **-0,210**; für T mit MIB1 **-0,154**; für R mit MIB1 **-0,166**; für pT mit CD3 **-0,184**; für M mit CD3 **-0,167**; für R mit CD3 **-0,300**; für UICC-Stadien mit CD3 **-0,201**; für pT mit CD3-Definiens **-0,252**; für pN mit CD3-Definiens **-0,167**; für M mit CD3-Definiens **-0,199**; für R mit CD3-Definiens **-0,291** und für UICC-Stadien mit CD3-Definiens **-0,225**; die in der Tabelle angegebenen Zahlen entsprechen den p-Werten.

Tabelle 12: Korrelation der Expressionslevel untereinander

Kriterium korreliert mit	EGFR	pEGFR	β-Catenin	MIB1	CD3	CD3-Definiens
EGFR	/	0,251	0,003	0,842	0,296	0,168
pEGFR	0,251	/	0,664	0,003	0,755	0,186
β-Catenin	0,003	0,664	/	0,084	0,244	0,719
MIB1	0,842	0,003	0,084	/	0,004	0,001
CD3	0,296	0,775	0,224	0,004	/	<0,001
CD3-Definiens	0,168	0,186	0,719	0,001	<0,001	/

Anmerkung: der Korrelationskoeffizient für EGFR mit β-Catenin entspricht **0,219**; für pEGFR (Y1068) mit MIB1 **-0,254**; für MIB1 mit CD3 **0,221**; für MIB1 mit CD3-Definiens **0,268** und für CD3 mit CD3-Definiens **0,808**; die in der Tabelle angegebenen Zahlen entsprechen den zugehörigen p-Werten.

Die Expressionslevel der EGFR-Färbungen korrelieren negativ mit dem Resektionsstatus der Karzinome. Weitere negative Korrelationen wurden für β-Catenin mit dem Resektionsstatus und dem *Tumor-Grading* verzeichnet. Für den PI (MIB1-Nachweis) besteht eine negative Korrelation ebenfalls mit dem Resektionsstatus der Karzinome. Darüber hinaus finden sich für die Auswertungen der CD3-Färbungen am Lichtmikroskop und mittels Definiens-Software negative Korrelationsverläufe mit der Primärtumorausbreitung, der Fernmetastasierung, dem Resektionsstatus und den UICC-Stadien der Magenkarzinome sowie für die mittels Computer-

Software berechneten Messergebnisse zusätzlich mit dem Lymphknotenstatus. Keine signifikanten Korrelationen konnten mit dem Gesamtüberleben der Kollektivpatienten und für Berechnungen innerhalb von Subkollektiven verzeichnet werden (siehe Tab. 11, S. 45).

Korrelationen der untersuchten Proteinexpressionen der AK-Färbungen untereinander sind in Tabelle 12 dargestellt (siehe S. 45). Positive Korrelationen konnten verzeichnet werden zwischen den Auswertungen der EGFR- und β -Catenin-Färbungen, den MIB1- und CD3-Messwerten sowie den beiden Auswerteverfahren der CD3-AK-Färbungen zueinander. Negative Korrelationen bestehen zwischen den *Score*-Zuteilungen der pEGFR-Färbung und den Ergebnissen der MIB1-Färbung.

Weitere Korrelationen wurden für die immunhistochemischen pEGFR- und CD3-Färbungen erstellt. Tabelle 13 zeigt zum Vergleich der verschiedenen Messwerte, die mittels der *Definiens-Software* für die pEGFR-Färbungen berechnet wurden, Ergebnisse durchgeführter Korrelationen.

Tabelle 13: Korrelationen der Messwerte der pEGFR-(Y1068)-Computerauswertungen untereinander

Kriterium	korreliert mit	Korrelationskoeffizient	Signifikanz (zweiseitig)	Fallzahl (n)
Färbeintensität	Gefärbte Fläche/positive Tumorfläche	-0,058	0,690	49
	Gefärbte Fläche/Gesamttumorfläche	0,002	0,990	49
	Überlebenszeit	-0,037	0,800	49
Gefärbte Fläche/positive Tumorfläche	Färbeintensität	-0,058	0,690	49
	Gefärbte Fläche/Gesamttumorfläche	0,978	<0,001	49
	Überlebenszeit	0,035	0,812	49
Gefärbte Fläche/Gesamttumorfläche	Färbeintensität	0,002	0,990	49
	Gefärbte Fläche/positive Tumorfläche	0,978	<0,001	49
	Überlebenszeit	0,059	0,686	49

Zwischen der Intensität der pEGFR-Färbungen der Gewebeschnitte und den Verhältnissen der AK-gefärbten Flächen zur gemessenen positiven Tumorfläche bzw. Gesamttumorfläche konnten keine signifikanten Korrelationen verzeichnet werden. Keiner der untersuchten Parameter korrelierte signifikant mit dem Überleben der Kollektivpatienten. Zwischen den beiden Verhältniswerten (gefärbte Fläche zur positiven Tumorfläche bzw. zur Gesamttumorfläche) besteht eine signifikante Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,978.

Für vergleichende Interpretationen der Messdaten zwischen den lichtmikroskopisch ermittelten Daten und den computerunterstützten Berechnungen zugehöriger CD3-Färbeintensitäten dient Tabelle 14. Die Korrelationen der visuell am Mikroskop ermittelten CD3-Scores mit den Messwerten der computerunterstützten Auswertung zeigen hoch signifikante Ergebnisse, die auch innerhalb der einzelnen Laurénklassen darstellbar sind.

Tabelle 14: Korrelation der CD3-Mikroskopauswertung mit der zugehörigen CD3-Definiens-Computerauswertung

Kollektiv	Korrelationskoeffizient (Spearman)	Signifikanz (zweiseitig)	Fallzahl (n)
Gesamtes Kollektiv	0,808	p< 0,001	167
Diffuse Karzinome	0,677	p< 0,001	34
Intestinale Karzinome	0,818	p< 0,001	58
Mischttypkarzinome	0,836	p< 0,001	26
Nicht klassifizierte Karzinome	0,807	p< 0,001	49

3.2.3 Kaplan-Meier-Kurven

Wesentlicher Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit ist die Erarbeitung der prognostischen Bedeutung unterschiedlicher Proteine und ihrer Expressionslevel in Magenkarzinomen bezüglich dem Gesamtüberleben der Kollektivpatienten. Geeignete graphische Darstellungsmöglichkeiten bieten diesbezüglich Kaplan-Meier-Kurven. Für das Gesamtkollektiv aller in die Untersuchung eingeschlossener Patienten und kleinerer Kollektive, getrennt nach den Laurénklassen und einzelnen sowie zusammengefassten UICC-Kriterien, wurden Kaplan-Meier-Kurven berechnet. Ausgewählte Kurvenverläufe finden sich im Folgenden abgebildet.

An Hand der nachfolgenden Abbildung kann unter Einbezug aller Kollektivpatienten kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Ausprägung der EGFR-AK-Färbungen und dem Gesamtüberleben der Patienten erkannt werden (siehe Abb. 23, S. 48). Auch ist keinerlei Tendenz hinsichtlich eines signifikant längeren oder kürzeren Überlebens von Patientengruppen mit hohem oder niedrigem Expressionslevel erkennbar.

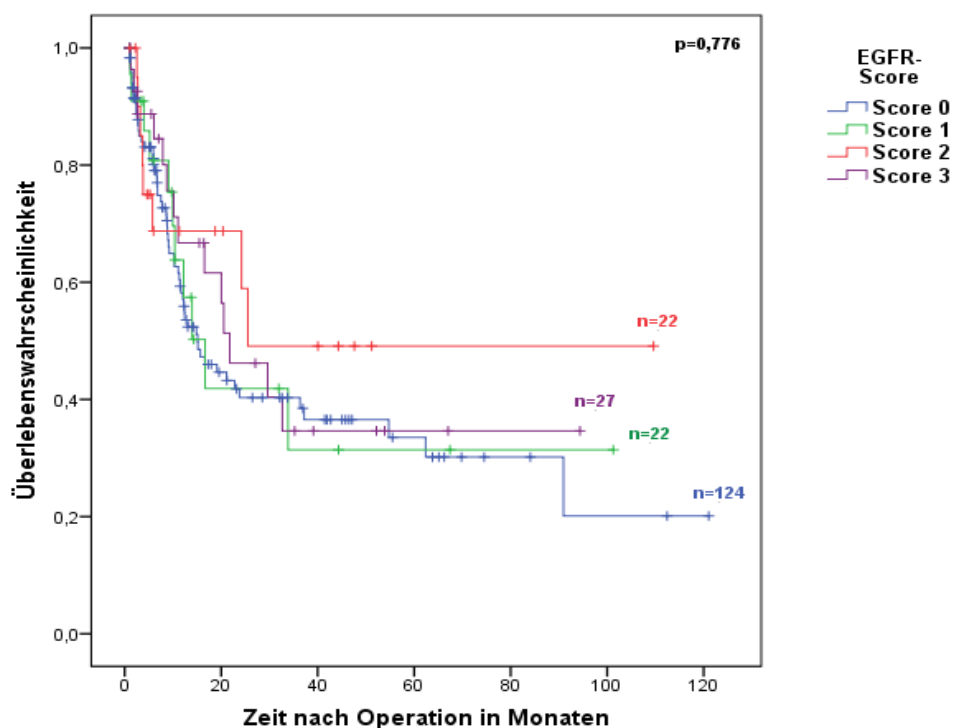


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom EGFR-Score: Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=195.

Innerhalb der Patientengruppe mit mäßig differenzierten Magenkarzinomen (n=36) bestehen signifikante Unterschiede bezüglich des Gesamtüberleben zwischen Patienten ohne und mit immunhistochemisch nachgewiesener EGFR-Expression (siehe Abb. 24, S. 49). Für Kollektivpatienten mit positivem EGF-Rezeptor-Status, die innerhalb der ersten zwei post-operativen Jahre eine sehr gute Prognose haben, zeichnet sich ein durchschnittlich längeres Überleben ab.

Für das Subkollektiv der Patienten mit einem Lymphknotenstatus N3 besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den EGFR-Score-Gruppen hinsichtlich des Überlebens, der bei graphischer Darstellung jedoch nicht zu einem schlüssigen Ergebnis führt (p=0,021; Berechnungen nicht dargestellt).

In wie weit der immunhistochemische Nachweis der pEGFR-Expression der Tumorzellen hinsichtlich der Prognose der Patienten eine Aussage zulässt zeigt Abbildung 25 (siehe S. 49).

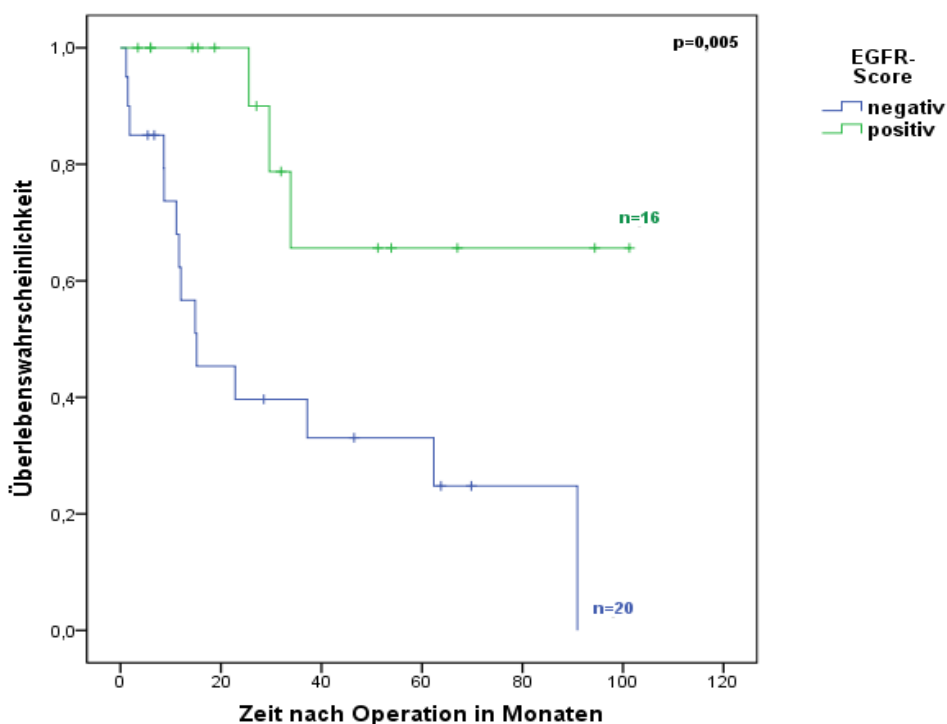


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom EGFR-Score innerhalb der Patientengruppe mit mäßig differenzierten Magenkarzinomen (G2): Signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=36.

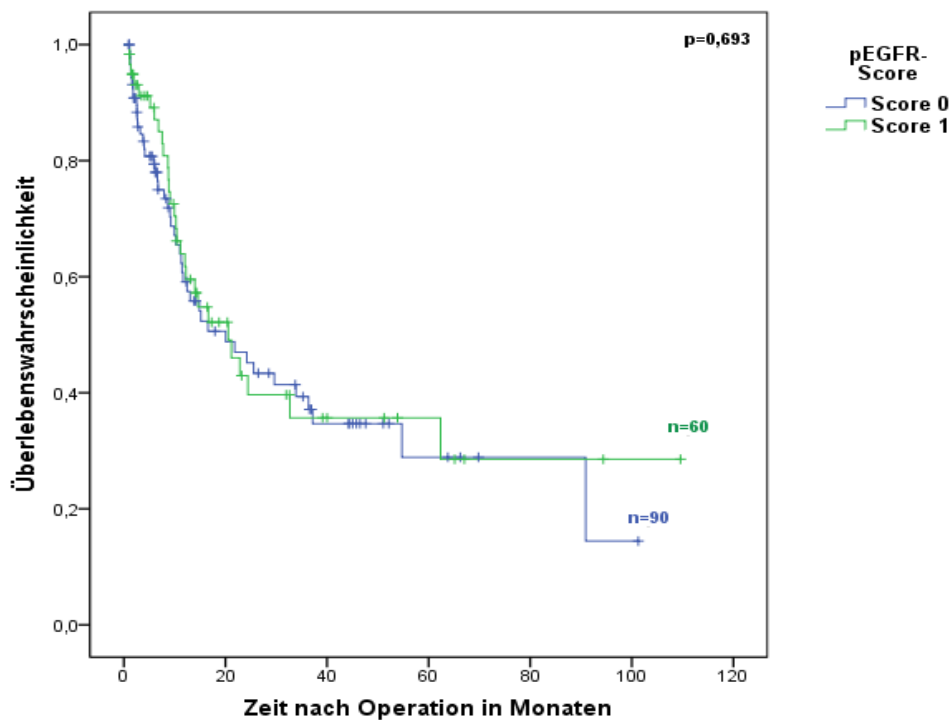


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom pEGFR-Score: Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=150.

In der dargestellten Abbildung ist ein nahezu deckender Kurvenverlauf der beiden Färbeausprägungen erkennbar. Innerhalb des Gesamtkollektives ist somit keine Unterscheidung der beiden Gruppen bezüglich der Prognose möglich (siehe Abb. 25, S. 49).

Für die Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeiten der Kollektivpatienten unter Verwendung der beschriebenen Messdaten der pEGFR-Expression mittels *Definiens-Software* wurden die gemessenen kontinuierlichen Werte zu Gruppenwerten zusammengefasst. Dazu wurden *Cut-Points* festgelegt. Diese entsprechen der 25., 50. und 75. Perzentile der ermittelten Messwerte. Die Vergleichsgruppen enthalten die Messergebnisse unterhalb bis einschließlich des *Cut-Points* bzw. oberhalb des genannten *Cut-Points*. Für die Berechnungen der Kaplan-Meier-Kurven mit drei Vergleichsgruppen wurden Messwerte unterhalb der 25., zwischen der 25. und 75. Perzentile und oberhalb der 75. Perzentile verglichen. Dabei konnten keine statistisch aussagekräftigen Ergebnisse verzeichnet werden. Die Verwendung weiterer *Cut-Points* mit zugehörigen Berechnungen erbrachten ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse (Berechnungen nicht dargestellt). Kaplan-Meier-Kurven-Berechnungen für Patientengruppen getrennt nach ihrer Laurénklasse zeigten vereinzelt signifikante Ergebnisse, werden jedoch auf Grund der sehr kleinen und damit kaum aussagekräftigen Fallzahlen nicht weiter berücksichtigt.

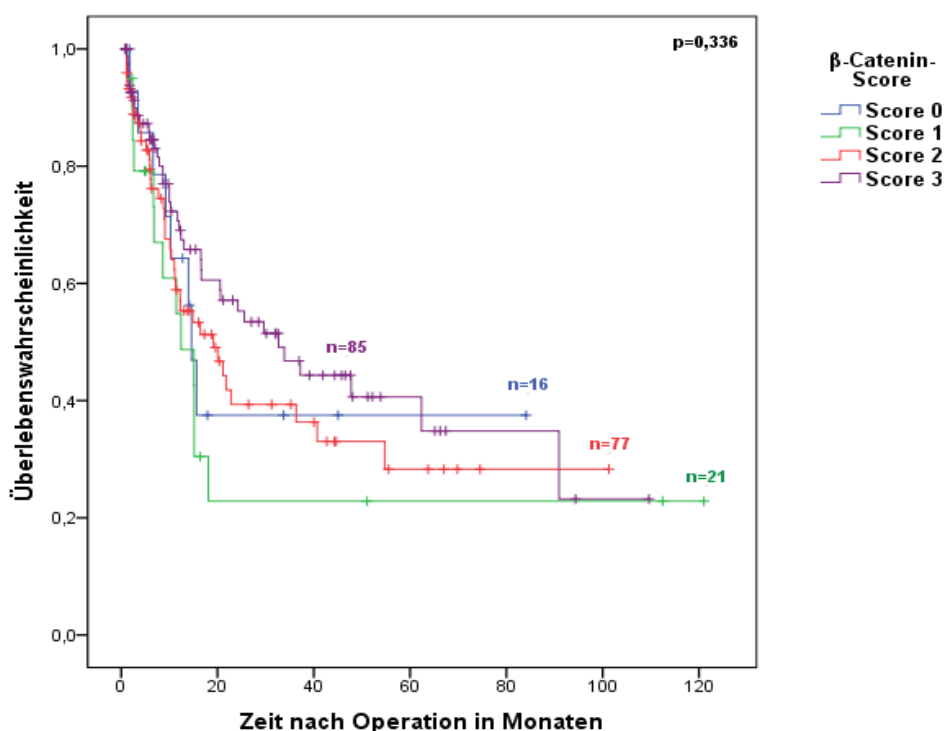


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom β -Catenin-Score: Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=199.

Die *Score*-Zuteilung der β -Catenin-Expression erbrachte durch Berechnung zugehöriger Kaplan-Meier-Kurven die in Abbildung 26 dargestellten Kurvenverläufe (siehe S. 50). Diese zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens der Patientengruppen. Innerhalb der Gruppe mit G2-differenzierten Karzinomen ist statistisch eine signifikante Trennung des Kollektives hinsichtlich der Überlebenszeiträume an Hand zugewiesener Färbe-Scores möglich. Die Kurvenverläufe zeigen jedoch Überschneidungen, so dass diesbezüglich keine prognostische Aussage möglich ist (Berechnungen nicht dargestellt).

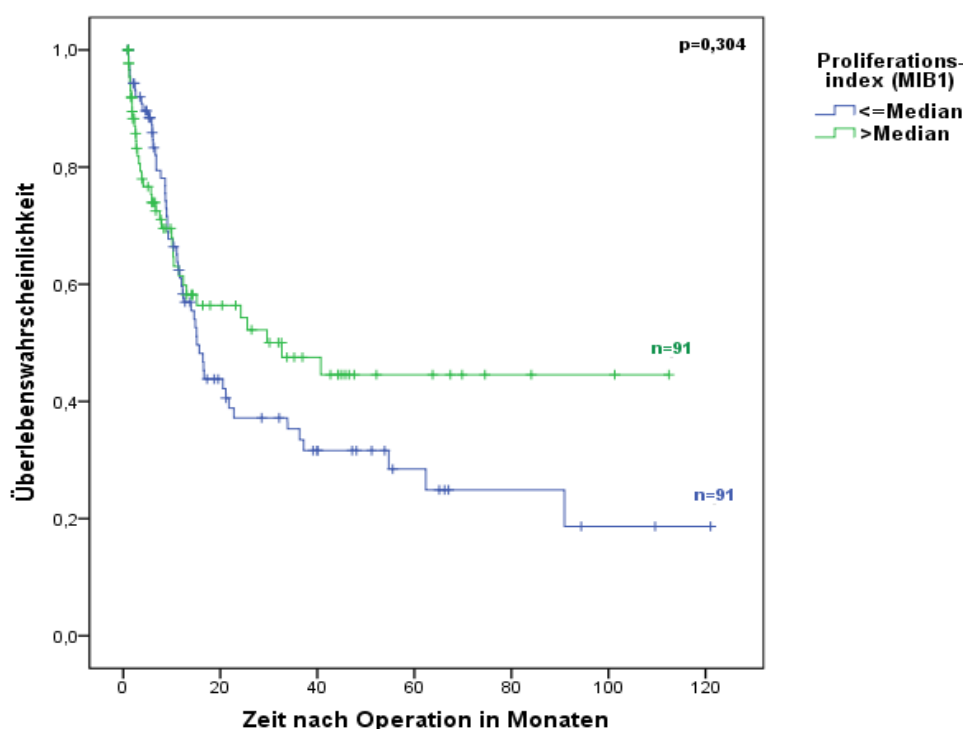


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom Proliferationsindex: Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; *Cut-Point* bei 0,4743 (entspricht dem medianen Messwert); gesamt: n=182.

Exemplarisch zeigt Abbildung 27 die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Kurven-Berechnungen für die Auswertung der MIB1-Färbungen mittels *Computer-Software*. Der zugehörige *Cut-Point* entspricht dem Median der Messdaten. Es ist über den gesamten Zeitraum keine signifikante Trennung des Patientenkollektives bezüglich der Prognose möglich. Bei Betrachtung der Kurvenverläufe fällt auf, dass diejenigen Kollektivpatienten mit Messwerten oberhalb des Median ab dem postoperativen Zeitraum von etwa 1,5 Jahren eine deutlich höhere Überlebenswahrscheinlichkeit haben, als diejenigen unterhalb dieses Grenzwertes. Ab diesem Zeitraum ist eine Trennung der Patienten in zwei Prognosegruppen mit einem p-Wert von 0,017 möglich. Diejenigen Patienten, in deren Karzinomen zum Zeitpunkt der Operation eine höhere

Proliferationsrate gemessen wurde, weisen eine bessere Prognose auf. Die Verwendung zahlreicher anderer *Cut-Points*, entsprechend der Maßzahlen von Tabelle 9 führten darüber hinaus zu keinen statistisch signifikanten Ergebnissen (siehe Tab. 9, S. 42).

Prognostische Aussagen bezüglich des Gesamtüberlebens der Kollektivpatienten sind durch den Nachweis Tumor-infiltrierender Lymphozyten gelungen. Sowohl die Auswertung am Lichtmikroskop, wie sie in Kapitel "Material und Methoden" beschrieben ist, als auch die computerunterstützte Messmethode zeigt hoch signifikante Ergebnisse (siehe Kap. 2.2.4 bzw. 2.2.5, S. 26-29 und Abb. 28-30, S. 52-53). Patienten mit einer höheren Anzahl an nachgewiesenen CD3-positiven Lymphozyten im Tumorstroma haben eine bessere Prognose, als diejenigen mit geringerem Nachweis. Mit der lichtmikroskopischen Auswertung gelang keine signifikante Trennung der CD3-Score-Gruppen 1 und 2 bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeiten der Kollektivpatienten. Unter Einsatz der Definiens-Software konnte dies ermöglicht werden. Zwei gut voneinander abgrenzbare prognostische Gruppen sind erkennbar bei Trennung des Patientenkollektives mittels einem *Cut-Point* der Messdaten bei 4,0 (siehe Abb. 29, S. 53). Eine weitere Aufteilung gelingt unter Hinzunahme eines zweiten Grenzwertes bei 0,5 und ermöglicht so differenziertere Aussagen (siehe Abb. 30, S. 53).

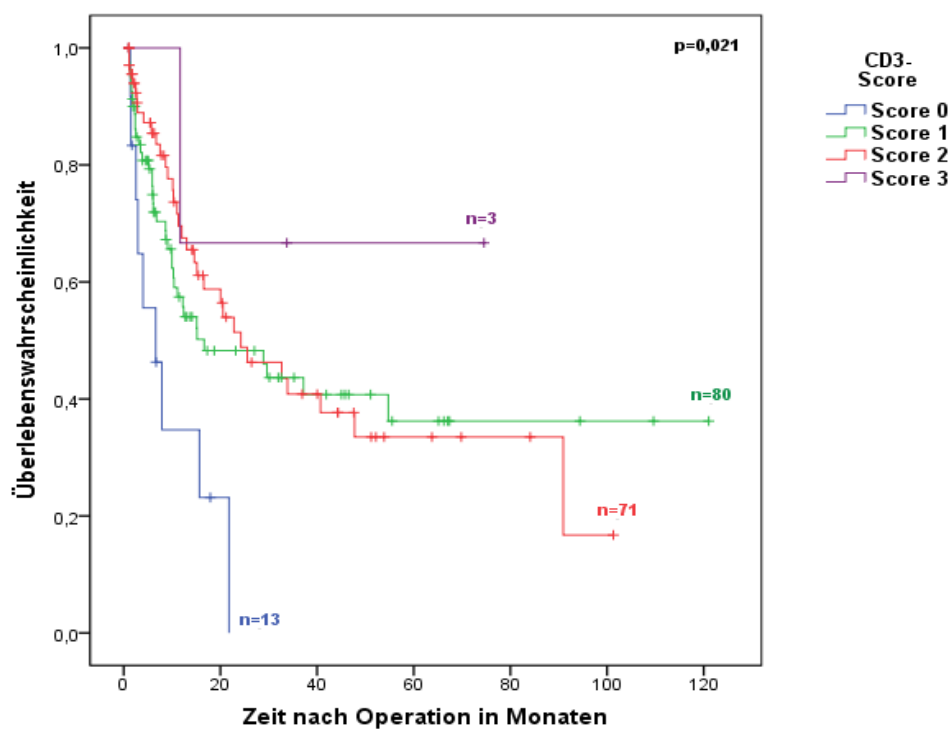


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom CD3-Score: Signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=167.

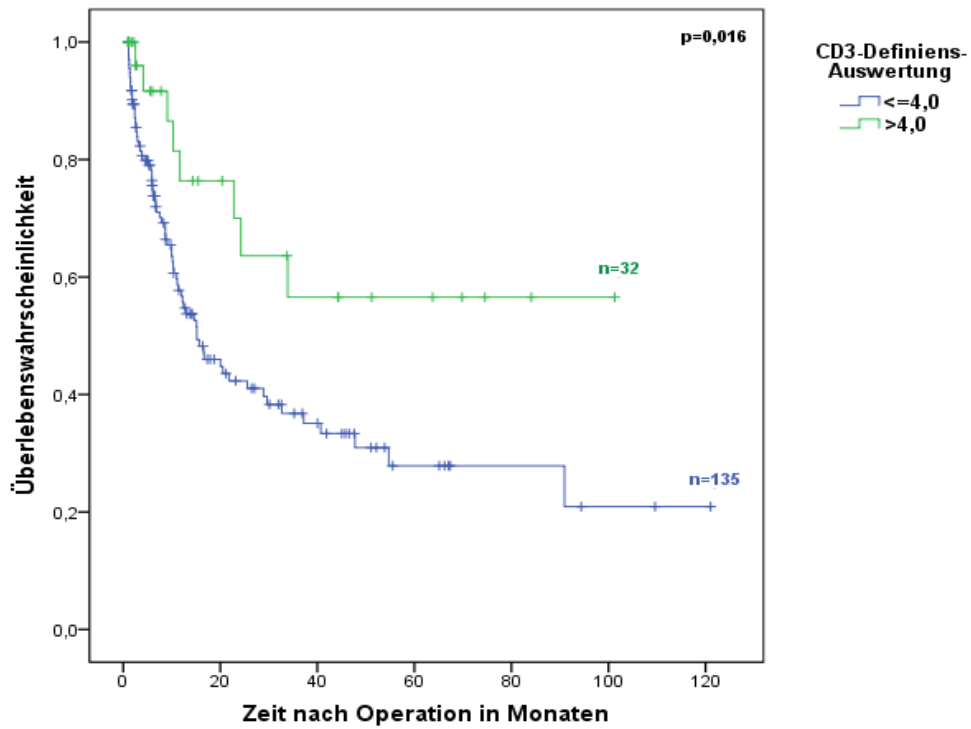


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der Messwerte der CD3-Definiens-Auswertung: Signifikante Trennung in Prognosegruppen; *Cut-Point* bei 4,0; gesamt: n=167.

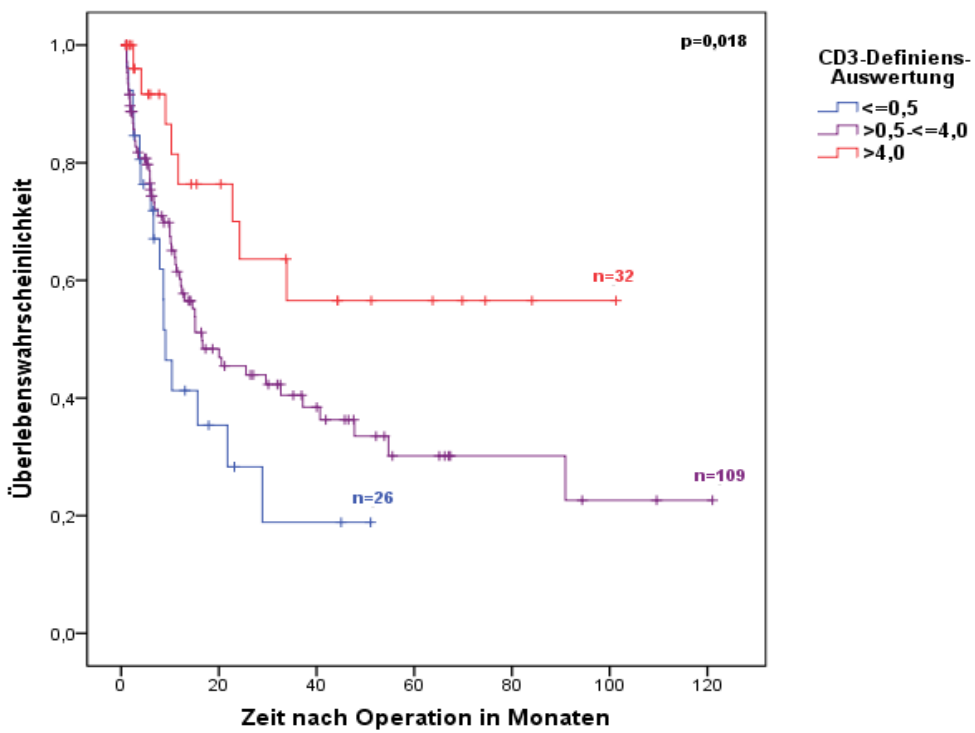


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der Messwerte der CD3-Definiens-Auswertung: Signifikante Trennung in Prognosegruppen; *Cut-Points* bei 0,5 und 4,0; gesamt: n=167.

Die Verwendung von Mittelwerten oder Perzentilen als *Cut-Points* für eine Einteilung des Kollektives in Gruppen stellte sich als nicht aussagekräftig heraus. Weitere Berechnungen wurden mit den in den Abbildungen 29 und 30 verwendeten *Cut-Points* für Patientengruppen bestimmter Laurénklassen durchgeführt. Im Patientenkollektiv mit Mischtypkarzinomen konnten hierbei signifikante Unterschiede der Überlebenskurven gezeigt werden. Patienten, bei denen ein höherer Nachweis Tumor-infiltrierender Lymphozyten gelang, haben statistisch eine bessere Prognose gegenüber denjenigen mit geringerer Anzahl an CD3-positiven Immunzellen (Berechnungen nicht dargestellt). Für Subkollektive von diffusen und intestinalen Karzinomen konnten diese Beobachtungen nicht gemacht werden.

Folgende Darstellungen umfassen nicht, wie vorangestellte Abbildungen, Expressionslevel einzelner Proteine sondern berücksichtigen die prognostische Bedeutung der Kombination von Expressions-Scores verschiedener Marker. Sie umfassen die am Lichtmikroskop ermittelten Färbe-Scores. Die Ergebnispräsentation beginnt mit der Auswertung der Daten unter Einschluss der EGFR-Färbung und seiner aktivierten Form (Y1068). Daran anschließend finden sich Ergebnisse von Kaplan-Meier-Kurven-Berechnungen unter zusätzlicher Berücksichtigung der β -Catenin-Expression sowie der β -Catenin-Expression und dem Nachweis CD3-positiver Lymphozyten im Tumorgewebe. Kaplan-Meier-Kurven-Berechnungen wurden für Patientengruppen mit mindestens zehn Patienten erstellt. Jeder Patient wurde pro Auswertung nur einer Patientengruppe zugeordnet. Erneut werden nur ausgewählte Berechnungen abgebildet.

Tabelle 15: Kombinierte Auswertung der EGFR- und pEGFR-Färbungen

Positiv für	Anzahl (n)	Positiv für	Anzahl (n)
Keine dieser Färbungen	57	pEGFR	29
EGFR	31	EGFR, pEGFR	27
	gesamt: 144		

Anmerkung: angegeben sind die Fallzahlen der Patientengruppen mit zusammengefassten Expressions-Scores; berücksichtigt wurden Magenkarzinome mit als positiv bzw. negativ für die entsprechenden Färbungen klassifizierten Tumore; die Karzinome sind für die jeweils anderen Färbungen als negativ klassifiziert worden.

Die zu Tabelle 15 gehörenden Kaplan-Meier-Kurven, unter Berücksichtigung aller vier dort notierten Patientengruppen, zeigen Kurvenverläufe mit bester Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten, deren Karzinome für beide Proteine eine positive Expression aufweisen (Berechnungen nicht dargestellt). Für Patienten mit einem positiven Nachweis für eine der beiden Proteine besteht durchschnittlich die schlechteste Prognose. Fasst man die beiden Patientengruppen mit Expression eines der beiden Proteine zusammen, ergeben sich die in Abbildung 31 dargestellten Kurvenverläufe. Tendenzen zu einem längeren Überleben der Patienten mit Karzinomen, die ein positives Färbeverhalten für den EGFR und für seine aktivierte Form zeigen, sind deutlich (siehe Abb. 31. S. 55).

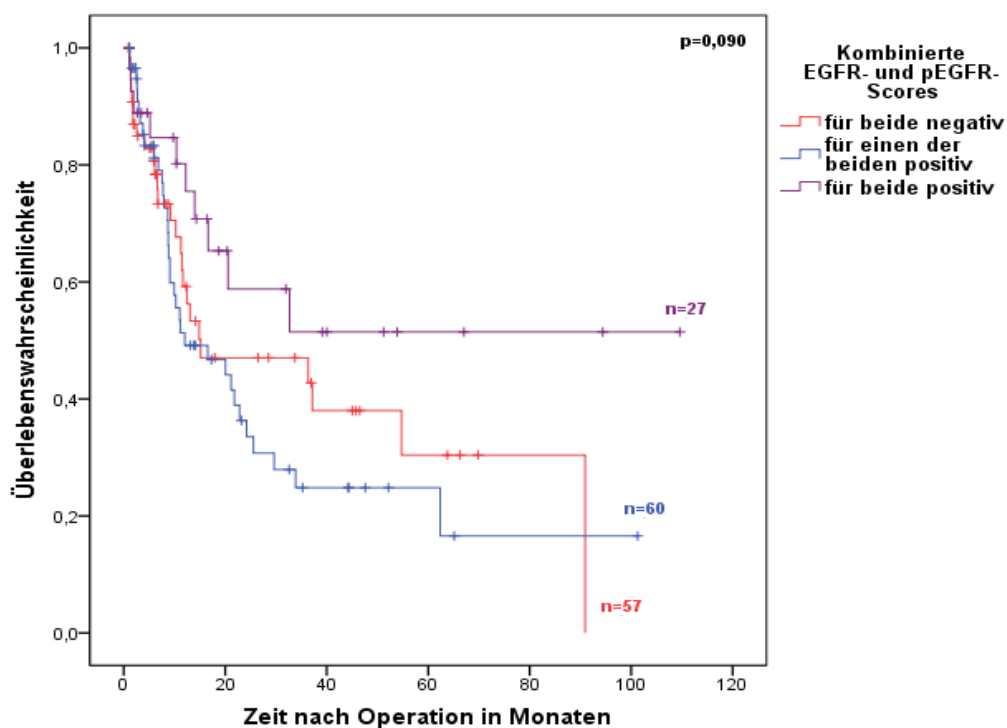


Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten EGFR- und pEGFR-Scores: Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=144.

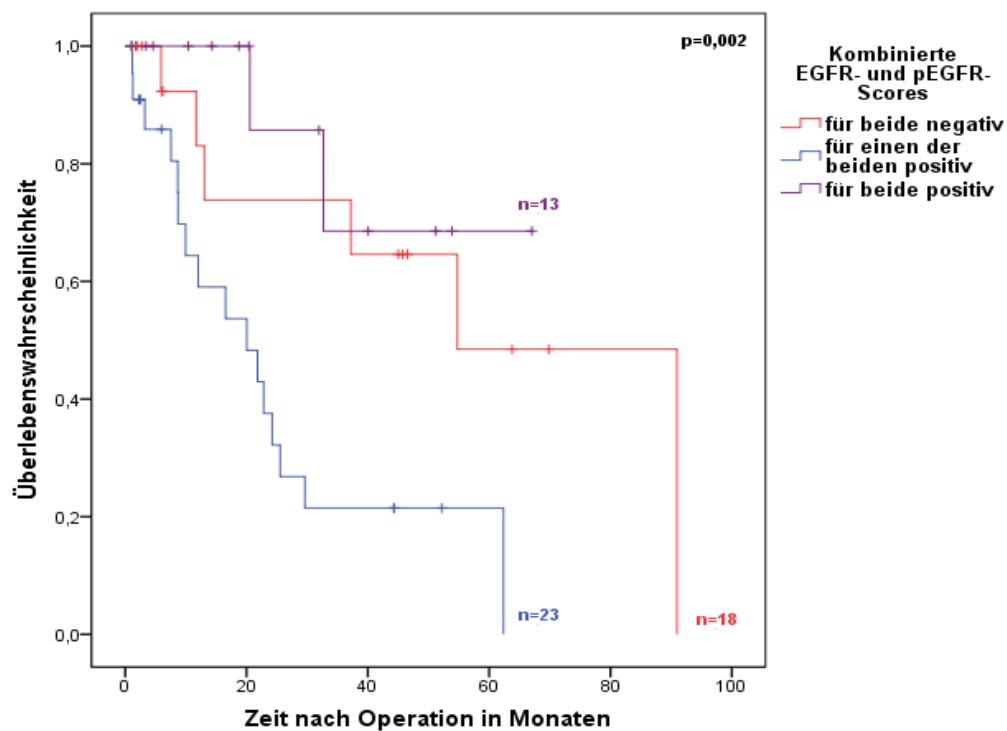


Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten EGFR- und pEGFR-Scores innerhalb des Kollektives der intestinalen Karzinome: Signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=54.

Extrahiert man aus diesem Gesamtkollektiv die Patienten mit intestinalen Magenkarzinomen nach Laurén, so erhält man ähnliche Kurvenverläufe mit statistisch signifikant trennbaren Prognosegruppen (siehe Abb. 32, S. 55). Für die Patientengruppen der anderen beiden Laurénklassen und des Kollektives der nach Laurén nicht klassifizierten Karzinome ließen sich keine signifikanten Ergebnisse verzeichnen.

Bei Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der beiden oben genannten Proteine und zusätzlicher Berücksichtigung der β -Catenin-Färbung erhält man nachfolgende Tabelle und Abbildungen (siehe Tab. 16 und Abb. 33-36, S. 57-58).

Tabelle 16: Kombinierte Auswertung der EGFR-, pEGFR- und β -Catenin-Färbungen

Positiv für	Anzahl (n)	Positiv für	Anzahl (n)
Keine dieser Färbungen	6	EGFR, pEGFR	1
EGFR	0	EGFR, β -Catenin	31
pEGFR	3	pEGFR, β -Catenin	24
β -Catenin	50	EGFR, pEGFR, β -Catenin	25
	gesamt: 140		

Anmerkung: angegeben sind die Fallzahlen der Patientengruppen mit zusammengefassten Expressions-Scores; berücksichtigt wurden Magenkarzinome mit als positiv bzw. negativ für die entsprechenden Färbungen klassifizierten Tumore; die Karzinome sind für die jeweils anderen Färbungen als negativ klassifiziert worden.

Es ist trotz nicht-signifikantem globalem p-Wert der in Abbildung 33 dargestellten Kurvenverläufe eine deutlich höhere Überlebenswahrscheinlichkeit der Kollektivpatienten mit Magenkarzinomen, die zusätzlich zu β -Catenin sowohl den EGFR als auch seine phosphorylierte Rezeptorform (Y1068) exprimieren, erkennbar (siehe S. 57). Dies scheint unabhängig von der β -Catenin-Expression zu sein. Die Abbildungen 34 bis 36 zeigen entsprechende Kaplan-Meier-Kurven im Vergleich zu Patienten, deren Karzinome eine β -Catenin-Expression aber nicht die gleichzeitige Expression des EGFRs und seiner phosphorylierten Form aufweisen (siehe S. 57-58). Auch hierbei wird deutlich, dass der Nachweis einer Expression des EGFRs oder seiner phosphorylierten Form alleine, unabhängig von der β -Catenin-Expression, zu einer schlechteren Prognose der Kollektivpatienten führt.

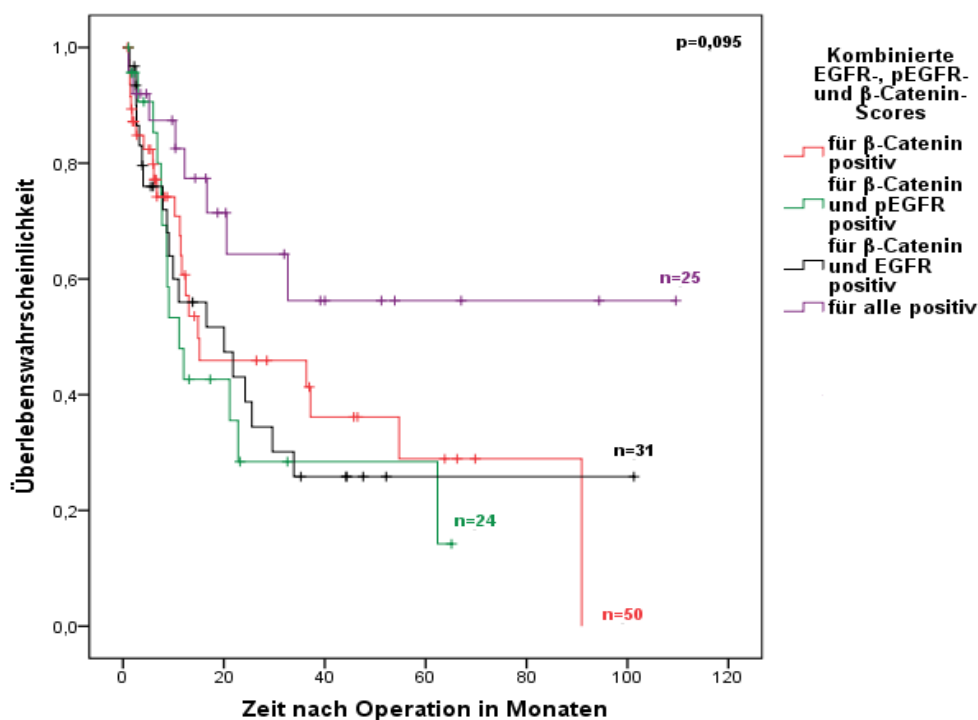


Abbildung 33: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten EGFR-, pEGFR- und β-Catenin-Scores: Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=130.

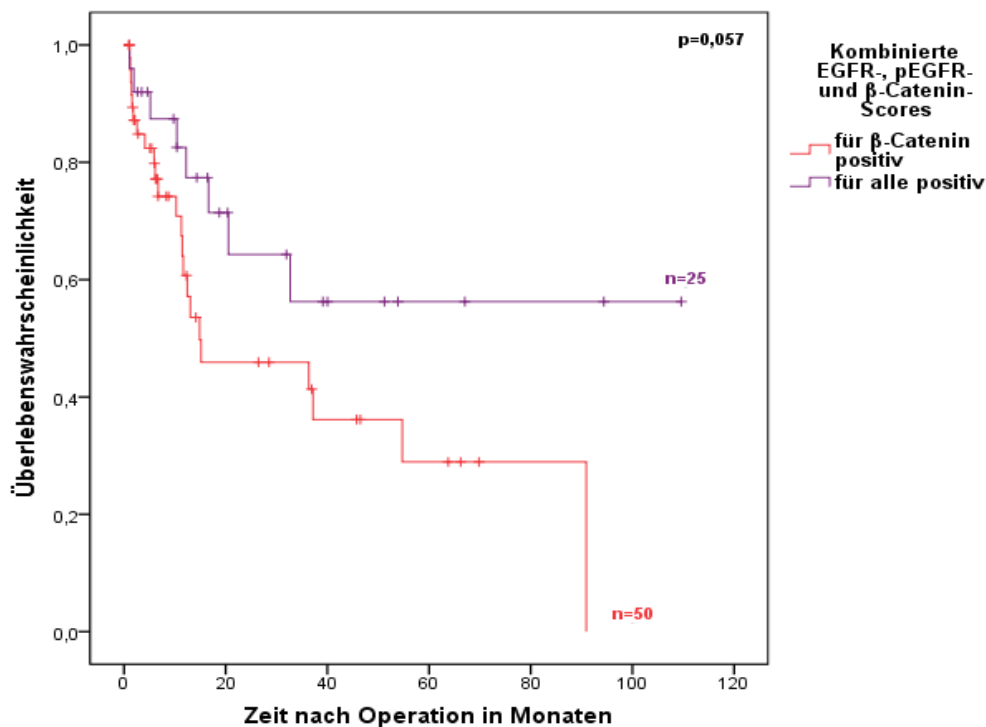


Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten EGFR-, pEGFR- und β-Catenin-Scores: Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; zwei ausgewählte Score-Gruppen; gesamt: n=75.

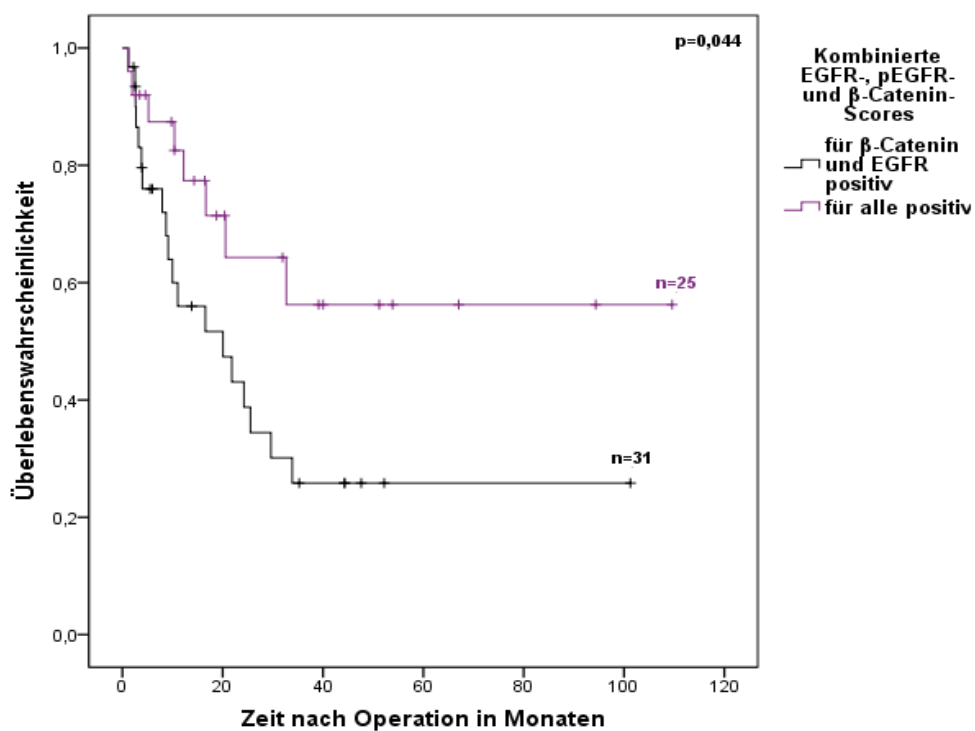


Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten EGFR-, pEGFR- und β -Catenin-Scores: Signifikante Trennung in Prognosegruppen; zwei ausgewählte Score-Gruppen; gesamt: n=56.

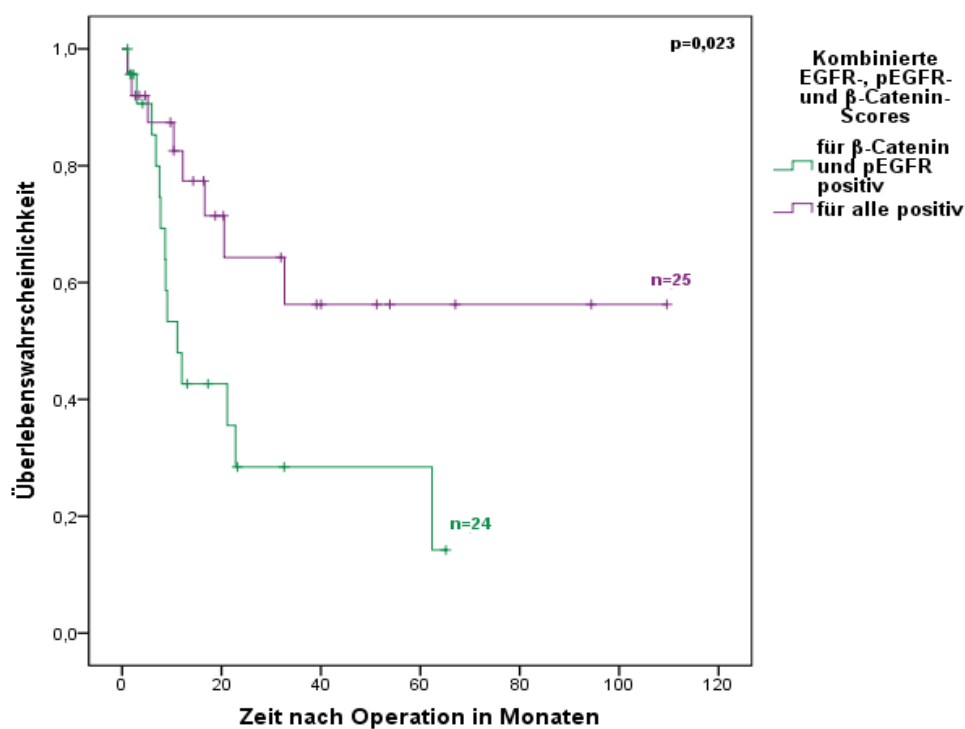


Abbildung 36: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten EGFR-, pEGFR- und β -Catenin-Scores: Signifikante Trennung in Prognosegruppen; zwei ausgewählte Score-Gruppen; gesamt: n=49.

Kombiniert man die Ergebnisse der Score-Zuteilungen aller vier am Lichtmikroskop ausgewerteten Färbungen erhält man die in Tabelle 17 notierte Verteilung der Patienten.

Tabelle 17: Kombinierte Auswertung der EGFR-, pEGFR-, β -Catenin- und CD3-Färbungen

Positiv für	Anzahl (n)	Positiv für	Anzahl (n)
Keine dieser Färbungen	3	pEGFR, β -Catenin	1
EGFR	0	pEGFR, CD3	3
pEGFR	0	β -Catenin, CD3	38
β -Catenin	8	EGFR, pEGFR, β -Catenin	0
CD3	3	EGFR, pEGFR, CD3	1
EGFR, pEGFR	0	EGFR, β -Catenin, CD3	27
EGFR, β -Catenin	3	pEGFR, β -Catenin, CD3	20
EGFR, CD3	0	EGFR, pEGFR, β -Catenin, CD3	25
	gesamt: 132		

Anmerkung: angegeben sind die Fallzahlen der Patientengruppen mit zusammengefassten Expressions-Scores; berücksichtigt wurden Magenkarzinome mit als positiv bzw. negativ für die entsprechenden Färbungen klassifizierten Tumore; die Karzinome sind für die jeweils anderen Färbungen als negativ klassifiziert worden.

Die aus Tabelle 17 ersichtlichen Patientengruppen wurden analog den vorherigen Kaplan-Meier-Kurven ab einer Fallzahl von zehn Patienten berücksichtigt. Da über 92% der Magenkarzinome aus dem Gesamtkollektive positiv für einen CD3-Nachweis sind, ergaben sich keine wesentlichen Änderungen der Kurvenverläufe im Vergleich zu Patientenkollektiven wie sie in Tabelle 16 beschrieben sind (siehe Tab. 16, S. 56). Auf eine graphische Ergebnisdarstellung wurde daher verzichtet (globaler p-Wert für das Kollektiv unter Einschluss der CD3-Färbungen $p=0,200$; für das Patientenkollektiv mit intestinalen Karzinomen $p\leq 0,001$).

3.2.4 Uni- und multivariate Cox-Regressionen

Zur Einschätzung des jeweiligen Einflusses untersuchter Variablen auf das Überleben der Kollektivpatienten dient nachfolgende Tabelle sowie die Abbildung 37 (siehe Tab. 18, S. 60 und Abb. 37, S. 61). Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse univariater Cox-Regressions-Analysen. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation, die Tumordinfiltrationstiefe, der Lymphknotenstatus, die Fernmetastasierung, das sich aus den einzelnen Kriterien ergebene UICC-Stadium, der Resektionsstatus, das *Tumor-Grading*, die CD3-Score-Zuweisung und der PI erwiesen sich dabei als signifikante Einflussgrößen auf das Überleben der Patienten. Zu erwähnen ist, dass für die Berechnungen unter Einschluss des *Gradings* die G1- und G2-klassifizierten Karzinome auf Grund der geringen Anzahl der G1-Tumore zusammengefasst wurden.

Zu erkennen ist, dass das Sterberisiko von Kollektivpatienten mit Fernmetastasen zum Operationszeitpunkt im Vergleich zu Patienten ohne Fernmetastasennachweis zu diesem Zeitpunkt um fast 247% erhöht ist, was einer *Hazard-Ratio* von 3,466 entspricht (siehe Tab. 18). Deutlich erkennbar sind auch die Einflüsse der Tumordinfiltrationstiefe und des Fehlens bzw. des Nachweises von Lymphknotenmetastasen auf das Überleben der Patienten. Unterstrichen werden diese Ergebnisse durch die in Tabelle 18 notierte *Hazard-Ratio* entsprechender Berechnung unter Berücksichtigung der UICC-Stadien von fast 2,26.

Tabelle 18: Univariate Cox-Regressionen

Faktor	HR	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
Alter bei Operation	1,019	1,002-1,036	0,030
Geschlecht	0,845	0,575-1,242	0,392
pT	2,183	1,726-2,761	<0,001
pN	2,021	1,669-2,447	<0,001
M	3,466	2,315-5,190	<0,001
R	2,337	1,797-3,041	<0,001
G (1/2vs3)	1,649	1,001-2,718	0,049
UICC-Klassifikation	2,256	1,834-2,776	<0,001
Laurénklassifikation	0,978	0,828-1,156	0,797
EGFR	0,920	0,767-1,105	0,372
pEGFR	0,910	0,570-1,453	0,693
β-Catenin	0,863	0,703-1,060	0,161
CD3	0,659	0,481-0,904	0,009
Proliferationsindex	0,374	0,153-0,914	0,031
CD3-Definiens	0,939	0,857-1,029	0,176
pEGFR-Färbeintensität	0,065	0,002-1,759	0,104
pEGFR-Gefärbte Fläche/ positive Tumorfläche	202,375	0,118-345985,6	0,162
pEGFR-Gefärbte Fläche/ Gesamttumorfläche	103,056	0,034-312961,6	0,257

Neben den klinischen Parametern konnten durch univariate Regressions-Analysen statistisch signifikante Ergebnisse für den lichtmikroskopischen Nachweis CD3-positiver Lymphozyten und den computerunterstützten Nachweis von MIB1-positiven Tumorzellen (PI) in den untersuchten Gewebeproben aufgezeigt werden. Die *Hazard-Ratio* der univariaten Analyse der lichtmikroskopischen CD3-Auswertung von 0,659 lässt auf einen positiven Effekt Tumordinfiltrierender Lymphozyten auf das Überleben der Patienten schließen. Durch multivariate Analysen konnte gezeigt werden, dass der MIB1-Nachweis in Zusammenschau mit der Tumordinfiltrationstiefe und der Fernmetastasierung eine zusätzliche Aussage hinsichtlich des

Gesamtüberlebens der Kollektivpatienten ermöglicht (siehe Abb. 37). Für die Berechnung der unten notierten zugehörigen Kaplan-Meier-Kurve wurden die Koeffizienten 0,72591 für pT sowie 1,17503 für M und -1,12437 für MIB1 verwendet. Eingefügte *Cut-Points* dienen ausschließlich der Kurvendarstellung.

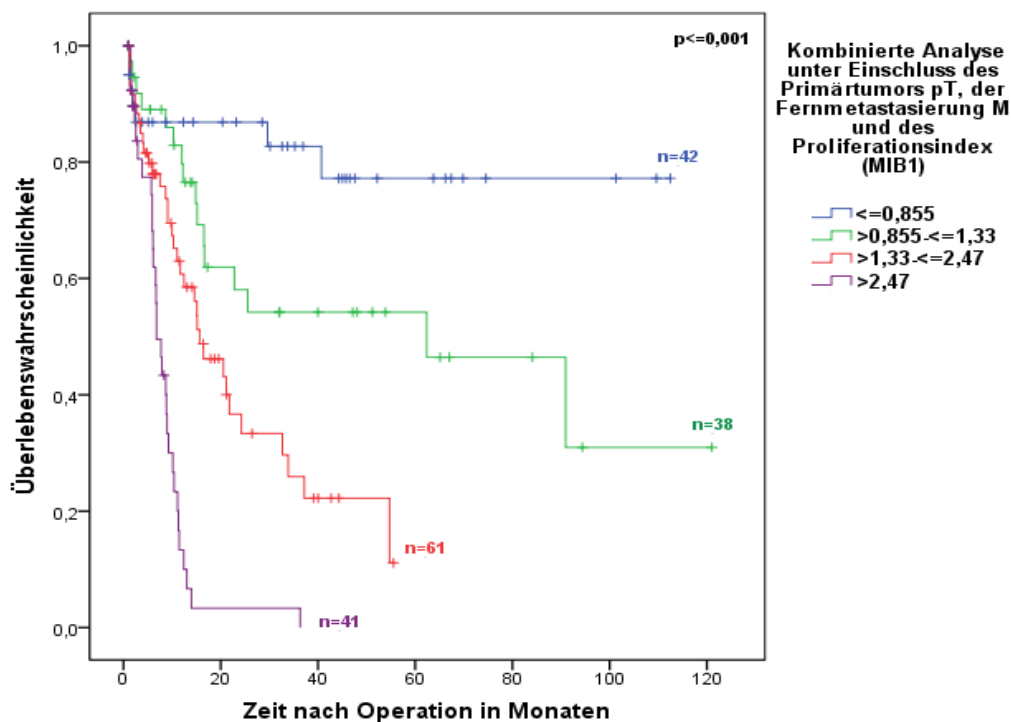


Abbildung 37: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten Auswertung der Cox-Analyse unter Einschluss der Primärtumorausbreitung pT, der Fernmetastasierung M und des Proliferationsindex (MIB1): Signifikante Trennung in Prognosegruppen; *Cut-Points* bei 0,855, bei 1,33 und bei 2,47; gesamt: n=182.

Es wurden zahlreiche weitere multivariate Cox-Regressionen berechnet, in die sowohl die klinischen als auch die immunhistochemisch ermittelten Daten eingeschlossen wurden. Hierbei zeigte sich, dass neben der bereits erwähnten hoch signifikanten multivariaten Analyse, trotz eingehender Berechnungen, keine weiteren prognostischen Aussagen möglich sind.

4 Diskussion

4.1 Bedeutende Prognosefaktoren

Magenkarzinome zählen weiterhin zu den häufigsten malignen Erkrankungen (Jemal et al., 2011). Sie haben besonders bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien eine schlechte Prognose und führen häufig zum Tod (Jemal et al., 2011). Die härtesten Prognosefaktoren stellen bislang die lokale Tumorausdehnung, die Lymphknoten- sowie die Fernmetastasierung dar (siehe Tab. 1, S. 23) (Kodera et al., 2002). Verdeutlicht wird dies durch zahlreiche Studien und die Tatsache der ständigen Reevaluierung der einzelnen Kriterien dieses Klassifikationssystems (Du et al., 2012; Kwon, 2011). Die zuletzt von der UICC veröffentlichte Version der TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung für Magenkarzinome stammt aus dem Jahr 2009 und entspricht der 7. Auflage. Vergleiche mit der 6. Auflage zeigen, dass eine Aufteilung der T1-Kategorie in eine T1A- und eine T1B-Kategorie vorgenommen wurde. Die Kategorien T2A und T2B wurden getrennt in T2 für Karzinome mit Infiltration der *Muscularis propria* und T3 mit Infiltration der *Subserosa*. Die ursprüngliche T3-Kategorie wurde zu T4A und es kam die Kategorie T4B hinzu. Auch die Kriterien für die Zuweisung des Lymphknotenstatus wurden präzisiert (UICC, 2009). Aus diesem Grund ist in Bezug auf die vorliegende Arbeit kritisch anzumerken, dass auf Grund der Operationsjahrgänge und damit der Zeitpunkte der Erstellung der Erstbefunde, der in dem hier untersuchten Patientenkollektiv verwendeten Tumormaterialien, die 6. Auflage der TNM-Klassifikation verwendet wurde. Für die Auswertungen wurden die Stadien 2A und 2B zusammengefasst. Dies dient der vereinfachten Darstellung und kann als berechtigt angesehen werden, da in dieser Arbeit nicht die Reevaluation der TNM-Klassifikation im Vordergrund stand, sondern der Schwerpunkt auf der Evaluierung der prognostischen Bedeutung untersuchter Proteinexpressionen lag. Da jedoch das Patientenkollektiv neu zusammengestellt wurde, galt es in einem der ersten Schritte zu zeigen, dass in dem untersuchten Kollektiv die prognostische Abhängigkeit von der TNM-Klassifikation Bestand hat. Wie die folgenden Ausführungen zeigen ist dies gelungen.

Sowohl für die Tumordinfiltrationstiefe als auch die Lymphknoten- und Fernmetastasierung der Magenkarzinome konnte an Hand von Kaplan-Meier-Kurven gezeigt werden, dass diese wichtige Einflussgrößen für das Überleben der Patienten darstellen (siehe Abb. 7-9, S. 34-35). Mit Ausbreitung des Tumors sinken die medianen Überlebenszeiten der Patienten deutlich. Ergebnisse univariater Cox-Regressionen unterstreichen diese Tatsache. Dabei konnten mit p-Werten <0,001 die einzelnen Kriterien der TNM-Klassifikation als wichtige Einflussvariablen bestätigt werden (siehe Tab.18, S. 60). Differenziertere Aussagen bezüglich der Prognose sind aus dem vorliegenden Datensatz jedoch nicht möglich. Beispielsweise kann das Verhältnis

tumorbefallener zu nicht tumorbefallenen resezierten Lymphknoten nicht berücksichtigt werden. Dass dies jedoch ein weiteres prognostisches Kriterium sein kann, zeigen Untersuchungen an über 10.000 Magenkarzinomen von koreanischen Patienten. Darin erwies sich bei bestätigtem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen das Verhältnis der tumorbefallenen zur Gesamtzahl der während der Gastrektomie resezierten Lymphknoten als ein prognostischer Marker (Kim et al., 1998). Eine große prognostische Bedeutung wurde von Adachi und Mitarbeitern auch der Anzahl der positiven Lymphknoten im Level II zugesprochen, was hier bei vorliegender Datenlage ebenfalls nicht beurteilt werden kann (Adachi et al., 2000). Mit der Zahl der befallenen Lymphknoten in engem Zusammenhang steht die Radikalität der Lymphknotenresektion bei der Entfernung des Primärtumors. Veröffentlichte Daten zeigen, dass eine radikale Lymphknotenresektion, entsprechend einer Entfernung von 26 oder mehr Lymphknoten, ein unabhängiger prognostischer Faktor für Patienten mit Tumorstadien 2 und 3A ist (Allgayer et al., 1997). Eine ausgedehnte Lymphknotenresektion, die die Lymphknoten-Kompartimente I und II einschließt, korrelierte mit einem signifikant höherem Gesamtüberleben (Allgayer et al., 1997; Siewert et al., 1993). Es gibt jedoch in Expertenkreisen widersprüchliche Meinungen über das Ausmaß der notwendigen Lymphknotenresektion. Eine Forschergruppe um Bonenkamp veröffentlichte 1999 Daten einer Studie mit 996 Patienten. Sie verglichen die postoperative Morbidität, Mortalität, das Langzeitüberleben und das Rezidivrisiko zwischen holländischen Patientengruppen mit D1- und D2-Lymphknotenresektionen. Es zeichnete sich im Durchschnitt eine höhere postoperative Sterblichkeit und ein längerer Krankenhausaufenthalt der Patienten mit D2-Resektion bei vergleichbarem Langzeitüberleben ab (Kodera et al., 2002; Bonenkamp et al., 1999).

Dass die Gesamtheit der TNM-Kriterien, die sich in den UICC-Stadien widerspiegeln, für das Gesamtüberleben der Patienten von wesentlicher Bedeutung ist, zeigt auch eine ältere Studie aus Deutschland. Hervorzuhebendes Ergebnis dieser angesprochenen "Deutschen Magenkarzinom Studie 1992" ist die Abhängigkeit der durchschnittlichen postoperativen Überlebenszeit vom UICC-Stadium. Patienten im Stadium 2 überlebten in dieser Studie im Mittel 40,8 Monate. In Stadium 3A zeichnete sich eine durchschnittliche Überlebenszeit von 18,9 Monaten und im Stadium 3B von 13,8 Monaten sowie im Stadium 4 von nur 8,4 Monaten ab (Roder et al., 1993). Vergleicht man diese Angaben mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten durchschnittlichen Nachbeobachtungszeiten des Gesamtkollektives, so erhält man sehr ähnliche Zeiträume mit 40,6 Monaten für das Stadium 1, 25,2 für Stadium 2, 15,6 für Stadium 3 und zehn Monaten für das Stadium 4. Da die Studie aus dem Jahr 1992 als "für Deutschland repräsentativ gilt", kann diesbezüglich auch für das hier vorliegende Kollektiv von einem repräsentativen Patientenkollektiv ausgegangen werden. Mit Fortschreiten der Tumore bzgl. des Tumorstadiums verkürzt sich das Gesamtüberleben erheblich (Siewert et al., 1998).

Neben dem jeweiligen UICC-Stadium ist für die Prognose des einzelnen Patienten die möglichst vollständige Resektion des Tumors von großer Bedeutung. Kann eine vollständige Tumorsektion erreicht werden, verbessert sich das Langzeitüberleben der Patienten erheblich. In der hier vorliegenden Untersuchung wird dies durch Berechnung von Kaplan-Meier-Kurven verdeutlicht. Kollektivpatienten mit resttumorfreier Operation weisen ein medianes Überleben von über fünf Jahren auf, wohingegen sich das mediane Überleben der Patienten, bei denen eine vollständige Tumorsektion nicht möglich war, auf weniger als zwei Jahre beläuft (siehe Abb. 11, S. 36). In der univariaten Cox-Regression zeigte sich der Resektionsstatus als prognostische Einflussvariable (siehe Tab.18, S. 60). Unterstrichen wird diese Aussage auch durch Veröffentlichungen, beispielsweise von Mattioli, der ebenfalls die Bedeutung einer vollständigen Exzision des Tumors für das Überleben der Patienten betont (Mattioli et al., 2007). Igarashi trifft in einer Veröffentlichung die Aussage, dass die Prognose der Patienten mit Magenkarzinomen jedoch hauptsächlich vom gesamten Krankheitsstadium abhängt (Igarashi et al., 1999). Nicht ab zu streiten ist auch die Tatsache, dass der Operationserfolg und damit die Ergebnisse der Gastrektomie bzw. Teilgastrektomie von der Erfahrung des jeweiligen Chirurgen abhängt, so dass auch dieser als "prognostischer Faktor" angesehen werden kann. Bei dem hier vorliegenden Patientenkollektiv kann jedoch von hoch standardisierten Operationsverfahren mit weitestgehend einheitlichen Operationstechniken ausgegangen werden, da alle verwendeten Präparate aus der chirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums rechts der Isar in München stammen, deren Operateure über eine langjährige Erfahrung auf dem Gebiet der onkologischen Chirurgie verfügen. Angaben der jeweiligen Operationstechnik, d.h. ob eine totale oder subtotale Gastrektomie bzw. welches Rekonstruktionsverfahren bei der Karzinomoperation zum Einsatz kam, wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt.

Einen ganz anderen Aspekt stellt die Laurénklassifikation dar. In der 1993 veröffentlichten, bereits erwähnten, "Deutschen Magenkarzinom Studie 1992" konnte keine prognostische Abhängigkeit von der Laurénklassifikation gezeigt werden (Roder et al., 1993). Lee und Mitarbeiter veröffentlichten etwa zehn Jahre danach Daten einer Studie, in der sie die prognostische Aussagekraft der Laurénklassifikation bei primär resezierten Magenkarzinomen von 807 Patienten untersuchten. Diese zeigte sich dabei nicht als ein unabhängiger prognostischer Faktor bezüglich der Gesamtüberlebenszeit und des rezidivfreien Überlebens der Patienten (Lee et al., 2003). Kim und Mitarbeiter hingegen erzielten in ihren Untersuchungen in univariaten Analysen Ergebnisse, die eine prognostische Bedeutung der Laurénklassifikation anzeigen. Ihre Daten lassen eine bessere Prognose für Patienten mit Magenkarzinomen vom intestinalen Subtyp verglichen mit denjenigen vom Mischtyp und denjenigen vom diffusen Subtyp erkennen (Kim et al., 1998). Im Jahr 2011 wurden Ergebnisse publiziert, die zeigen,

dass diffuse Karzinome gehäuft Siegelringzellen mit aggressiverem Tumorwachstum und dadurch bedingt schlechterer Prognose aufweisen (Hass et al., 2011). Die für das vorliegende Patientenkollektiv erstellten Überlebenskurven zeigen, dass sich das mediane Überleben der Patienten mit intestinalen Karzinomen von denjenigen mit diffusen Magenkarzinomen deutlich unterscheidet. Für Patienten mit intestinalen Magenkarzinomen konnte ein medianes Überleben von annähernd fünf Jahren verzeichnet werden, wohingegen für diejenigen Patienten mit diffusen Karzinomen das mediane Überleben bei weniger als zwei Jahren lag. Kaplan-Meier-Kurven-Berechnungen unter Einschluss der beiden genannten Subtypen sowie zusätzlich von nicht klassifizierten Karzinomen und Mischtypkarzinomen sind mit einem p-Wert von 0,059 knapp nicht signifikant (Berechnungen nicht dargestellt). Auch die Tatsache des gehäuften Auftretens von diffusen Magenkarzinomen im Stadium 4 lässt einen Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose dieser Patienten erahnen, da, wie bereits erörtert, ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit einer deutlich verringerten postoperativen Überlebenszeit assoziiert ist (siehe Abb. 5, S. 31). In uni- und multivariaten Regressionsanalysen zeigte sich die Laurénklassifikation jedoch nicht als unabhängiges prognostisches Kriterium. Insgesamt kann daher kein eindeutiger prognostischer Vorteil für eine der Laurénklassen genannt werden.

Als mögliches Prognosekriterium wird auch das Patientenalter gehäuft diskutiert. In einer Studie von Dittmar und Kollegen unterschied sich das mediane Überleben von Patienten bis zum 75. Lebensjahr signifikant von demjenigen der Patienten mit einem Alter von 75 Jahren oder darüber. Für ältere Patienten zeigte sich ein geringeres medianes Überleben. Nach einem Zeitraum von etwa zehn Jahren bestand kein wesentlicher Überlebensvorteil für jüngere Patienten. Sie beobachteten eine größere Anzahl an Tumorrezidiven in dieser Vergleichsgruppe (Dittmar et al., 2012). Für das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv verdeutlichen Berechnungen von univariaten Cox-Regressionen statistisch ebenfalls den Einfluss des Patientenalters auf das Überleben. Die zugehörige *Hazard-Ratio* beläuft sich auf 1,019, so dass sich pro Lebensjahr das Risiko zu sterben um etwa 2% erhöht (siehe Tab.18, S. 60). Kaplan-Meier-Kurven-Berechnungen mit Unterteilung der Patienten in Altersgruppen von Zehn-Jahres-Intervallen erbrachten keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Eine Tendenz zu längerem Gesamtüberleben für jüngere Patienten ist jedoch vorhanden (Berechnungen nicht dargestellt).

Die Geschlechterverteilung innerhalb des Patientenkollektives, mit annähernd doppelt so vielen Männern wie Frauen, stimmt mit großen Datensammlungen überein (Ferlay et al., 2010).

Für das vorliegende Kollektiv bestehen weder bei Berechnung von Kaplan-Meier-Überlebenskurven noch von Regressionsanalysen signifikante Unterschiede hinsichtlich dem Gesamtüberleben der beiden Geschlechter (Berechnungen nicht dargestellt; entsprechende Regressionsanalyse siehe Tab. 18, S. 60).

Darüber hinaus sind ganz unterschiedliche die Prognose mit bestimmende Faktoren bekannt, die an dieser Stelle nur vereinzelt erwähnt werden können. Ein Beispiel bietet eine erst kürzlich veröffentlichte Studie, in der gezeigt wurde, dass sich für Patienten mit einem Magenkarzinom im Stadium 1 das Vorhandensein einer Lymph- und/oder Blutgefäßinvasion bzw. perineuralen Infiltration des Karzinoms negativ auf die Prognose auswirkt (Du et al., 2012). Auch die in der Einleitung erwähnte Borrmann-Klassifikation oder verschiedene Tumormarker, wie das Carcino-Embryonale Antigen (CEA), *Carbohydrate-Antigen-19-9* und *Carbohydrate-Antigen-72-4*, die im Serum der Patienten nachzuweisen sind, Adhäsionsmoleküle und Veränderungen von Tumorsuppressor-Genen, wie *p53*, werden auf ihre prognostische Wertigkeit in Studien untersucht (siehe auch S. 5). Die Bedeutung des gemeinsamen Nachweises von nicht aktivierten EGFRen, aktivierter EGFR-Formen, β -Catenin, MIB1 und CD3-positiver Lymphozyten im Tumorstroma, wie sie in der vorliegenden Arbeit Gegenstand der Untersuchungen sind, ist wenig erforscht. Ein Klassifikationssystem für Magenkarzinome, das diese Kriterien mit berücksichtigt, existiert bislang nicht.

4.2 Kritische Bewertung der verwendeten Materialien und Methoden

4.2.1 Immunhistochemische Färbungen

Unter dem Begriff der IHC, auch bezeichnet als Immun- oder AK-Färbung, werden Methoden zusammengefasst, bei denen Antigene mit Hilfe von AKn sichtbar gemacht werden können. Sie ermöglicht sowohl den Nachweis von Proteinen in bestimmten Geweben als auch deren Lokalisation innerhalb der angefärbten Zellen, einschließlich der Zuordnung zu Zellkompartimenten. Für diese Art der Färbungen werden fixierte, meist in Paraffin eingebettete Gewebe, verwendet. Mit ihrem weiten Anwendungsspektrum stellt die IHC ein sowohl aus der Routinediagnostik sowie aus der modernen Forschung nicht mehr wegzudenkendes *Tool* dar. In der Histopathologie dient sie in der Regel der Identifikation und Klassifikation von Tumorzellen mit bestimmter Proteinexpression. So leistet sie heute trotz zahlreicher neuer Untersuchungstechniken einen entscheidenden Beitrag zur Differenzierung von sich morphologisch gleichenden Tumoren, die sich aber in ihrem Wachstums- und Metastasierungsverhalten deutlich voneinander unterscheiden können. In einem Zeitalter, in dem effektive, aber auch teure Tests entwickelt und in der Forschung angewandt werden, bleibt die IHC eine weit verbreitete Technik beim klinischen *Setting* (Mattioli et al., 2007). So dient der Nachweis oder das Fehlen von Zielmolekülen durch immunhistochemische Verfahren bereits bei einigen Tumorentitäten, insbesondere bei Mammakarzinomen, als Grundlage für mögliche Therapieentscheidungen. In Anbetracht dieser Tatsachen wurde der immunhistochemische

Nachweis der Proteine als Verfahren für die vorliegenden Untersuchungen gewählt. In die Überlegungen fand ebenfalls Einzug, dass unter Verwendung der IHC bei Erhalt relevanter Ergebnisse einem Einsatz in der Routinediagnostik kein großes Hindernis im Wege steht, da eine breite Anwendung ohne viel Aufwand möglich ist. Hierzu wurden ausschließlich etablierte AK verwendet. Durch den hohen Standard der in dieser Arbeit verwendeten Färbetechniken mittels Ventana-Färbemaschine, etablierter AK und strikter Einhaltung der Färbeprotokolle ist ein qualitativ hochwertiges Färbeergebnis erzielt worden. Interne Kontrollen durch gleichzeitige Färbung von Gewebestanzungen gesunder Magenschleimhaut auf den Objektträgern sichern im Sinne von Negativkontrollen die Färbequalität und bieten die Möglichkeit der gleichzeitigen quantitativen Beurteilung der spezifischen Antigen-AK-Färbung in Normalgeweben.

4.2.2 Tissue Micro Arrays

TMA's erlauben eine Visualisierung zahlreicher Zielmoleküle, wie DNA, RNA oder Proteine, an aufeinanderfolgenden Gewebeschnitten innerhalb eines vertretbaren Zeitrahmens. Diese Technik bietet die Möglichkeit unter Verwendung sehr kleiner Gewebestanzungen viele Proben des selben Tumors auf unterschiedlichste Zielmoleküle zu untersuchen. Der dadurch erreichbare große Umfang an Untersuchungen ermöglicht Rückschlüsse auf das Vorliegen spezifischer DNA, RNA oder Proteine in unterschiedlichen Stadien verschiedener Erkrankungen. Bedeutung kann dies sowohl für die Diagnosestellung als auch die Prognose und Therapie maligner Erkrankungen haben (Koynova et al., 2005; Van Dekken et al., 2005; Kim et al., 2004; Porter, 2001; Kononen et al., 1998).

Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten TMA's wurde eine sorgfältige Auswahl der Tumorgewebe getroffen. Ein großer Zeitaufwand ermöglichte die endgültige Auswahl von 230 repräsentativen primär resezierten Karzinomen aus einem ursprünglichen Kollektiv von über 2000 Magenkarzinomen. Kriterien, wie ausreichend Tumorgewebe in repräsentativen Tumorabschnitten, eine Resektion des Tumors ohne vorhergehende Chemotherapie und Vorliegen von *Follow-up*-Daten waren Voraussetzung (siehe Kap. 2.1, S. 21). Die Anfertigung von Paraffinblöcken mit drei Stenzen pro Tumor von jeweils 28 Magenkarzinomen war Ausgangspunkt für die sich anschließende Herstellung konsekutiver Gewebeschnitte dieser Blöcke mit wenigen Mikrometern Dicke. Ein großer Vorteil dieses Vorgehens ist der Erhalt vergleichbarer Gewebeschnitte ohne wesentlichen Gewebeverlust. Ein Kernunterschied der TMA-Technik zur "herkömmlichen IHC" mit einer einzigen Gewebeprobe des zu untersuchenden Tumors pro Objektträger, ist die Tatsache, dass ein deutlich kleinerer Gewebeausschnitt für die visuelle Auswertung zur Verfügung steht. Nachteilig ist dabei, dass nach Anfertigung der Schnitte keine Beurteilung des Gesamttumors mehr erfolgen kann. Aus welcher Region des

Tumors die Gewebezylinder entnommen werden, muss daher im Vorhinein genau festgelegt sein, um eine Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen. Rückschlüsse an Hand der TMAs auf die Tumorlokalisierung, insbesondere, ob die Tumorgewebe der Tumordinvasionsfront oder -randbereichen entnommen wurden, sind nur schwer möglich. Ein großer Vorteil der TMAs mit vergleichend kleinen Gewebezylindern ergibt sich aus dem geringen Gewebeschaden der bei dessen Entnahme entsteht. Ein nahezu unversehrter Gewebekblock steht somit für zusätzliche und ergänzende Untersuchungen zur Verfügung. Der Tatsache, dass der Durchmesser der jeweiligen Gewebestanze dabei weniger als ein Millimeter im Durchmesser beträgt und somit nur einen kleinen Ausschnitt des Gesamtkarzinomes repräsentiert, wird mit Verwendung von jeweils drei Gewebezylindern pro Karzinom Rechnung getragen. Beim Blick in die Literatur finden sich bezüglich der Anzahl der Gewebestanden zur Gewährleistung repräsentativer Tumorschnitte unterschiedliche Angaben. Eine Veröffentlichung von Forschungsergebnissen bezüglich der notwendigen Anzahl und Größe von Gewebestanden auf TMAs für immunhistochemische Untersuchungen erschien 2001. An fibroblastischen Tumoren beschreibt Hoos keinen wesentlichen Nachteil für die Verwendung von TMAs mit einem Durchmesser von 0,6 mm pro Stanze. Seine Forschergruppe untersuchte die Expression unterschiedlicher Proteine. Dazu zählen unter anderem der immunhistochemische Nachweis von Ki-67 an größeren Gewebeschnitten sowie an TMAs mit jeweils zwei und drei Gewebestanden pro Tumor. Die Übereinstimmung der Färbekategorien dreier tumorspezifischer Gewebestanden der TMAs mit denjenigen der Gesamtschnitte betrug zwischen 96% und 98%. Die Anzahl der nicht auswertbaren Gewebeproben war bei drei Stanzen geringer als bei zwei, was durch eine kleinere Ausfallquote durch beispielsweise Abschwemmen der Gewebeproben vom Objektträger während des Färbeprozesses erklärbar ist. Auch die Korrelation der Färbeausprägungen der TMAs mit phänotypischen Merkmalen und klinischem *Outcome* unterschied sich nicht wesentlich von denjenigen der Auswertung der gesamten Tumorschnitte (Hoos et al., 2001). Eine Verwendung von in Formalin eingebetteten Tumorgeweben für TMAs sei über eine weite Zeitspanne von bis zu 40 Jahren möglich (Kallioniemi et al., 2001). Da die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Gewebeproben aus den Jahren 1991 bis 2005 stammen, gilt auch dies als wichtige Voraussetzung. Insgesamt ist anzumerken, dass ein immunhistochemischer Nachweis von verschiedenen Proteinen in Tumorzellen auf TMAs und die Korrelation mit klinisch-pathologischen Merkmalen in der Forschung ein zunehmend häufiger angewendetes Verfahren ist, das in die Routinediagnostik jedoch noch wenig Einzug gefunden hat.

4.2.3 Definiens-Computer-Software

Die Bearbeitung der immunhistochemischen Färbungen mittels des von Definiens entwickelten Computerprogrammes bietet die Möglichkeit einer objektiven und jederzeit reproduzierbaren Auswertung verschiedenster AK-Färbungen. Durch *Scannen* der *Slides* sind diese am Computerbildschirm wiederholt aufrufbar. Eingezeichnete ROIs sind für jeden neuen Betrachter nachvollziehbar. Sind die *Slides* einmal gespeichert, so ist eine Auswertung mittels unterschiedlicher Regelsätze in einem vertretbaren Zeitrahmen möglich. Die im Vorfeld erstellten Regelsätze zur Bestimmung der Färbeintensitäten, der Anzahl der gefärbten Zellen einer bestimmten Entität unter Einschluss bestimmter Teilkompartimente sowie gefärbter Flächen bietet bei zusätzlicher nahezu stufenloser Vergrößerung der Bilder dem Betrachter die Möglichkeit individuelle Fragestellungen zu erfassen und direkt am Bildschirm zu diskutieren. Bei unterschiedlichen Färbequalitäten der immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte ist eine Anpassung des für die Berechnungen festgesetzten Schwellenwertes zur Erfassung der ausgewählten Objekte möglich und reduziert so die Anzahl der falsch positiv oder falsch negativ klassifizierten Objekte. Bei Auswertung von drei Gewebestanzen, wie in der vorliegenden Arbeit, errechnet das Computerprogramm Werte sowohl für die einzelnen Stansen, als auch Gesamtwerte für den jeweiligen Fall, so dass der Heterogenität der Tumore Rechnung getragen wird. Bei der seit Jahrzehnten praktizierten lichtmikroskopischen Auswertung ergeben sich auch bei festgelegten Kriterien unvermeidliche interindividuelle Unterschiede in der Zuordnung der Färbe-Scores zwischen einzelnen Betrachtern. Diese werden bei der computerunterstützten Analyse vermieden. Auch eine stufenlose Auswertung von Färbeintensitäten und weiteren Kriterien ist mit dem menschlichen Auge nicht zu leisten. So kann bei der verwendeten Technik mittels computerunterstützter Bildanalyse von einem sehr präzisen, jederzeit reproduzierbaren *Tool* ausgegangen werden. Insgesamt sehen wir die verwendete computerunterstützte Bildanalyse als ein ergänzendes Verfahren zur lichtmikroskopischen Auswertung. Ob präzisere Aussagen bezüglich dem Überleben der Patienten in Abhängigkeit der Expression der untersuchten Marker, pEGFR (Y1068), MIB1 und dem CD3-Antigen, möglich sind, wird in den einzelnen Unterkapiteln dargestellt. In der Zukunft wird sich zeigen in wie weit derartige computerunterstützte Auswertungen sich nicht nur in der Forschung, sondern auch in der Routinediagnostik etablieren können.

4.3 Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor und seine aktivierte Form (Y1068)

Nicholson und Mitarbeiter veröffentlichten 2001 einen Artikel mit einer Zusammenfassung von Veröffentlichungen aus den Jahren 1985 bis 2000 des "European Journal of Cancer", die die Beziehung zwischen der EGFR-Expression in Tumorgewebe und der Prognose von Patienten diskutierten. Darin konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung der EGFR-Expression ein harter prognostischer Faktor für Tumore des Kopf-Hals-Bereiches, der Ovarien, der Zervix, der Blase und des Ösophagus ist. Bei 70% der einbezogenen Studien korrelierten erhöhte Rezeptorspiegel mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten. 30% der Studien jedoch zeigten keinen Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben der Karzinompatienten (Nicholson et al., 2001). Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung der Expression von EGFRen in Magenkarzinomen finden sich, wie im Folgenden beispielhaft dargestellt, in der Literatur widersprüchliche Aussagen.

Da der gemessene EGFRen-Gehalt in den Tumoren von Studie zu Studie variiert und zahlreiche Methoden sowie verschiedene EGFR-AK zur Bestimmung dessen zur Verfügung stehen, ist ein Vergleich dieser nur mit Rücksicht auf das individuelle Studiendesign möglich. Darüber hinaus finden sich keine klaren Grenzen für eine Überexpression des Rezeptors. Der in der vorliegenden Studie erhaltene Prozentsatz an EGFR-positiven Tumoren beträgt 36,4% aller Magenkarzinome (siehe Tab. 8, S. 41). Die Grenze zwischen als negativ und positiv klassifizierten Karzinomen wurde bei 10% gefärbter Tumorzellen pro untersuchtem Karzinomgewebe festgesetzt. Song und Mitarbeiter sprechen von einer EGFR-Überexpression in durchschnittlich 25,4% der Adenokarzinome in ihrem Kollektiv (Song et al., 2004). Koullias berichtet von einem EGFR-Nachweis in 38% der von ihnen untersuchten Magenkarzinome, was mit unseren Ergebnissen vergleichbar ist (Koullias et al., 1996). In 44% der Tumore ihres Patientenkollektives konnte von Lieto und seinen Mitarbeitern eine verstärkte Expression des Rezeptors nachgewiesen werden (Lieto et al., 2007). Von klinischer Bedeutung ist besonders der Nachweis einer Überexpression des Rezeptors, denn eine Blockade des EGFR-Signalweges in Tumorzellen scheint nur dann sinnvoll, wenn dadurch ein relevanter Einfluss auf die Tumorprogression ausgeübt wird. Hervorzuheben ist an dieser Stelle auch, dass beispielsweise Lieto in seinen Untersuchungen eine Nachweisgrenze von 1% der EGFR-exprimierenden Tumorzellen als *Cut-Point* für eine positive Expression verwendete, wohingegen der Grenzwert in unseren Untersuchungen, wie auch in anderen Studien, bei 10% der Tumorzellen festgelegt wurde (Lieto et al., 2007). In einem 2004 erschienenen Fachartikel veröffentlichte Gamboa-Dominguez mit ihrem Team Untersuchungsdaten über die EGFR-Expression von 89 Magenadenokarzinomen mexikanischer Patienten (Gamboa-Dominguez et

al., 2004). Sie verwendeten zum Nachweis der Proteine ebenfalls immunhistochemische Färbungen an in Paraffin eingebetteten Geweben und korrelierten diese mit klinischen Merkmalen und dem Überleben der Patienten. Ähnlich der hier vorliegenden Studie wurden die Expressionsstärken in Scores von 0 bis 3 eingeteilt. Die Grenze für eine Positivität lag dabei bei über 10% der Tumorzellen. Ebenfalls mittels IHC und zusätzlich mit *Western-Blotting*-Analysen konnten vor längerer Zeit Yasui und seine Mitarbeiter eine erhöhte Expression an EGFRen in Magenkarzinomzellen nachweisen, die mit dem Stadium der Erkrankung deutlich zunahm. Sie beschrieben einen EGFR-Nachweis in 3,8% der Tumorzellen von Frühkarzinomen im Gegensatz zu einer Expression von 33,8% in fortgeschrittenen Karzinomen (Yasui et al., 1988). Bezüglich der fortgeschrittenen Karzinome konnte diese Aussage in der vorliegenden Arbeit mit einem Anteil von 37,1%, entsprechend Stadium 3 und 4 bzw. 36,5% der Karzinome mit T3- und T4-Ausbreitung, bestätigt werden. Dem entgegen wiesen wir jedoch auch in Karzinomen der Stadien 1 und 2 bei 35,2% der untersuchten Tumore bzw. bei 36,3% der Tumore mit T1- und T2-Ausbreitung Zellen mit vermehrter EGFR-Expression nach (siehe Tab. 10, S. 44). Yasui berichtete zusätzlich von einem durchschnittlich kürzeren Überleben der Patienten, in deren Tumore gleichzeitig eine erhöhte Expression des EGFRs und eines seiner Liganden, dem EGF, nachgewiesen wurden, im Vergleich zu denjenigen, deren Tumore diese nicht überexprimierten (Yasui et al., 1988). Der Einfluss von EGFR-Liganden wurde in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt.

Ein weiterer Aspekt ist die Inhomogenität der EGFR-Expression in Magenkarzinomen, die durch Zellpopulationen mit hohen und niedrigen Expressionsleveln im selben Karzinom zum Ausdruck kommt. Diesbezüglich bestand in dem hier untersuchten Patientenkollektiv keine statistische Abhängigkeit von der Laurénklasse oder anderen klinisch-pathologischen Kriterien (Berechnungen nicht dargestellt). Der Tatsache der Inhomogenität wurde dadurch Rechnung getragen, dass je Karzinom drei Tumorstanzen auf den TMAs vertreten sind. Bei Vorliegen unterschiedlicher Scores zwischen den Gewebestanzten wurde das durchschnittliche Färbefeld als Resultat in die Auswertungen eingeschlossen, um so eine repräsentative EGFR-Expression des Gesamttumors zu gewährleisten. Gamboa-Dominguez und ihr Team beobachteten in der bereits erwähnten Studie einen hohen Anteil an Tumoren mit intratumoralen Bereichen entsprechend EGFR-Scores von 0 bis 3. Die Bedeutung dieser Heterogenität konnte jedoch weder in der Studie von Gamboa-Dominguez noch in der hier vorliegenden Untersuchung geklärt werden und bleibt zu untersuchen (Gamboa-Dominguez et al., 2004).

Beziehungen der EGFR-Expression zu klinisch-pathologischen Merkmalen konnten für das vorliegende Patientenkollektiv nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass für die Zuweisung von zwei EGFR-Scores, entsprechend negativ und positiv klassifizierter Karzinome, statistisch

eine Abhängigkeit vom Resektionsstatus und der Laurénklasse besteht (siehe Tab. 10, S. 44). Nicht-intestinale Karzinome sowie nicht vollständig resezierte Magenkarzinome zeigen verhältnismäßig häufiger keine EGFR-Expression als Karzinome vom intestinalen Typ bzw. resttumorfrei resezierte Karzinome. Es besteht darüber hinaus für den Resektionsstatus eine negative Korrelation mit der EGFR-Expression, was zum Ausdruck kommen lässt, dass ein höherer EGFR-Gehalt der Karzinomzellen mit einer besseren Resezierbarkeit assoziiert ist (siehe Tab. 11, S. 45). Interessanterweise machte diese Beobachtung auch das Team um Gamboa-Dominguez (Gamboa-Dominguez et al., 2004). Eine sichere Interpretation ist jedoch schwierig und konnte weder 2004 noch heute erfolgen. Für weitere klinisch-pathologische Merkmale, wie die Tumorgröße, den Lymphknotenstatus, die Fernmetastasierung, das TNM-Stadium sowie den Differenzierungsgrad und die Laurénklassifikation der Karzinome konnte keine statistisch signifikante Korrelation verzeichnet werden. Veröffentlichungen anderer Studien präsentieren ebenfalls Ergebnisse ohne Nachweis einer Korrelation zwischen der EGFR-Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen. Darunter zu finden sind die genannten Merkmale sowie die Metastasierung der Karzinome in die Leber, die *Serosainvasion* und die peritoneale Ausbreitung (Hirono et al., 1995). Über diese drei genannten Kriterien ermöglichen unsere Kollektivdaten jedoch keine Aussage, da entsprechende Grunddaten nicht zur Verfügung stehen. Die Untersuchungen von Gamboa-Dominguez und ihrem Team konnten zusätzlich zum Resektionsstatus Korrelationen zwischen der EGFR-Expression und der Fernmetastasierung bzw. dem klinischen Stadium aufzeigen (Gamboa-Dominguez et al., 2004). In einer anderen, bereits mehrere Jahre zuvor veröffentlichten Untersuchung, stellte Koullias für die Ausdehnung des Primärtumors und den Lymphknotenstatus keinen Zusammenhang mit der EGFR-Expression fest (Koullias et al., 1996). Lieto und Mitarbeiter notierten hingegen innerhalb ihres Patientenkollektives eine lineare Beziehung der Anzahl der Lymphknotenmetastasen mit der EGFR-Expression (Lieto et al., 2007). Studienergebnisse von Song und Kollegen zeigten, dass eine EGFR-Überexpression mit geringer differenzierten Magenkarzinomen assoziiert sei. In 32,7% der schlecht differenzierten Tumore fanden sie eine EGFR-Überexpression. Nur etwa 20% der mäßig differenzierten Tumore und 12,5% der gut differenzierten Tumore wiesen eine derartige Proteinexpression auf (Song et al., 2004). Ebenfalls von einem Zusammenhang der EGFR-Expression mit geringerer Differenzierung der Karzinome spricht Koullias in einer seiner Veröffentlichungen (Koullias et al., 1996).

Einer der Schwerpunkte der hier vorliegenden Untersuchungen liegt auf der prognostischen Evaluation der EGFR-Expression bzw. ihres Einflusses auf das Gesamtüberleben der Patienten. Dabei konnte in der vorliegenden Studie an Hand von Kaplan-Meier-Kurven weder für das Gesamtkollektiv, inklusive aller Laurénklassen, noch für Patientengruppen einzelner Laurénklassen ein eindeutiger Überlebensvor- oder -nachteil in Abhängigkeit der

EGFR-Expression verzeichnet werden (siehe auch Abb. 23, S. 48; weitere Berechnungen nicht dargestellt). In kleineren Untergruppen sind statistisch signifikante Ergebnisse erzielt worden, die bei genauer Betrachtung der zugehörigen Kurven jedoch nur vereinzelt zu schlüssigen Ergebnissen führen. Lediglich für Kollektivpatienten mit mäßig differenzierten Magenkarzinomen besteht eine statistisch signifikante Tendenz zu längerem postoperativen Überleben bei erhöhter EGFR-Expression (siehe Abb. 24, S. 49). Ein damit übereinstimmendes Ergebnis konnte auch bei intensiver Literaturrecherche nicht gefunden werden. Bei der Durchsicht themenbezogener Veröffentlichungen begegnet man zahlreichen Studien, die sich mit dem Einfluss der EGFR-Expression von Tumorzellen auf die postoperative Überlebenszeit der Patienten beschäftigten. In der bereits mehrfach erwähnten Veröffentlichung von Gamboa-Dominguez waren die EGFR-Scores 0 und 1 im Vergleich zu den Scores 2 und 3 signifikant mit einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert (Gamboa-Dominguez et al., 2004). In einer multivariaten Analyse zeigten sie, dass der Nachweis von EGFR-positiven Zellen in der *Muscularis* oder der *Subserosa*, Fernmetastasen und ein Resttumor signifikant mit einer geringeren Überlebenszeit assoziiert sind (Gamboa-Dominguez et al., 2004). In univariaten Analysen korrelierte die Prognose mit dem EGFR-Reaktivitäts-Score sowie mit Fernmetastasen, jedoch nicht mit der Histopathologie und dem perigastrischen Lymphknotenstatus (Gamboa-Dominguez et al., 2004). All diese Ergebnisse wurden ohne Kollektivtrennung nach Laurénklassen erzielt. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass der EGFR-Reaktivitäts-Score in Adenokarzinomen des Magens ein unabhängiger prognostischer Faktor sei (Gamboa-Dominguez et al., 2004). In der im Jahr 2007 veröffentlichten Studie von Lieto und Kollegen korrelierte eine erhöhte EGFR-Expression mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten. Sie gaben an, dass die EGFR-Expression prognostisch aussagekräftiger als die TNM-Klassifikation sei (Lieto et al., 2007). Diese Ergebnisse konnten mittels des vorliegenden Patientenkollektives nicht bestätigt werden. Sowohl in uni- als auch in multivariaten Cox-Regressionsanalysen zeigte sich die EGFR-Expression nicht als unabhängiger prognostischer Faktor (siehe auch Tab. 18, S. 60). Ein wesentlicher Unterschied ihrer Studie zu unseren Untersuchungsmethoden ist, wie bereits erwähnt, die Verwendung eines *Cut-Points* für eine Rezeptor-Positivität bei 1% der Tumorzellen (Lieto et al., 2007). Ob eine signifikante Aussage bei Verschiebung des *Cut-Point*-Wertes von 10% auf 1% in dem hier untersuchten Patientenkollektiv möglich ist, wurde nicht geprüft. Kritisch der Studie von Lieto anzumerken ist die Selektivität des Patientenkollektives durch den Ausschluss von Patienten, bei denen das Bakterium *Helicobacter pylori* nachgewiesen wurde. Da die Infektion mit diesem Bakterium ein weit verbreitetes Phänomen darstellt und dessen Ursächlichkeit an der Entstehung von Magen-Adenokarzinomen nicht vollständig geklärt ist, bleibt es fragwürdig, ob ein Ausschluss dieser Patientengruppe eine repräsentative Stichprobe aus dem "fiktiven Gesamtkollektiv aller

Patienten mit Adenokarzinomen des Magens" noch gewährleistet oder als Subkollektiv angesehen werden muss (siehe Kap. 1.1, S. 3). Sie konnten unter den für den EGFR-negativen Adenokarzinomen eine signifikant höhere Anzahl an R0-resezierten Tumoren aufzeigen. Hervorzuheben ist die Tatsache, dass sie keinen Unterschied zwischen der Häufigkeit der EGFR-Expression von randständigen Tumorzellen und Zellen im Zentrum des Tumors feststellen konnten (Lieto et al., 2007). Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen der erwähnten Studie von Gamboa-Dominguez und ihrem Team. Sie wiesen für die EGFR-Positivität an der Invasionsfront der Tumore die deutlichste Korrelation mit dem Überleben der Patienten nach (Gamboa-Dominguez et al., 2004). Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Gewebestanden möglichst aus dem Tumorzentrum entnommen. Daher ist an dieser Stelle kritisch anzumerken, dass eine derartige Unterscheidung hier keine Berücksichtigung finden kann. In weiteren Studien bleibt daher zu prüfen, ob im vorliegenden Patientenkollektiv ein solcher Unterschied besteht. Eine andere Studie an über 700 Magenkarzinomen einer Forschergruppe um Song zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Patientengruppen mit und ohne erhöhtem EGFR-Nachweis in den Tumoren bezüglich des krankheitsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens. Sie konnten lediglich eine Assoziation zwischen einer vermehrten EGFR-Expression und geringer differenzierten Tumoren verglichen mit besser differenzierten Karzinomen und stärkerer neuronaler Invasion der Tumore aufzeigen (Song et al., 2004). In einer Studie mit 63 resezierten Magenkarzinomen wurde von Garcia und seiner Forschungsgruppe der Gehalt an membranständigen EGFRen mittels "*Radioligand-binding-Assays*" ermittelt. Sie konnten eine große Spanne des EGFR-Gehaltes der Tumorzellen aufzeigen (1-1,239 fmol/mg Protein). Dies bestätigt die oben erwähnte breite Heterogenität der Expression. Eine signifikante Korrelation zwischen dem Proteingehalt und Tumorcharakteristika konnten sie nicht nachweisen. Ein erhöhter Gehalt an EGFRen war jedoch signifikant assoziiert mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten (Garcia et al., 2003).

Ein weiterer Aspekt, der in dieser Arbeit Berücksichtigung fand, ist neben der Expression des EGFRs auch der Nachweis der am Tyrosinrest Y1068 phosphorylierten und damit aktivierten Rezeptorform. Dieser wurde ebenfalls hinsichtlich der Beziehung zu klinisch-pathologischen Parametern ausgewertet. Es zeigte sich, dass etwa 60% aller Magenkarzinome keine pEGFR-Überexpression aufweisen (siehe Tab. 8, S. 41). In Kreuztabellen veranschaulicht konnte gezeigt werden, dass statistisch eine Abhängigkeit der Expression von der Laurénklasse besteht. Diffuse Magenkarzinome weisen als einzige der untersuchten histomorphologischen Gruppen mehr positive als negative Fälle für diese Färbung auf (p-Wert 0,012) (siehe Tab. 10, S. 44). Korrelationen mit anderen klinisch-pathologischen Parametern bestehen innerhalb des Patientenkollektives nicht. Verzeichnet wurde jedoch eine negative Korrelation der aktivierten Rezeptorform mit dem Proliferationsmarker MIB1 (siehe Tab. 12, S. 45). Wie eine

vermehrte Expression der aktivierten Rezeptorform in Zusammenhang mit einer geringeren Zellproliferation steht, konnte nicht geklärt werden. Für das Gesamtkollektiv und zahlreiche Subkollektive ist eine Trennung von Prognosegruppen an Hand der pEGFR-Expression nicht möglich (siehe auch Abb. 25, S. 49). Nur in einzelnen Teilkollektiven konnten statistisch signifikante Ergebnisse erzielt werden. So zeigt sich innerhalb der Patientengruppe mit dem Lymphknotenstatus N3 ein durchschnittlich längeres Gesamtüberleben für Patienten mit positivem Rezeptornachweis. Eine ähnliche Tendenz konnte für Patienten mit diffusen Magenkarzinomen mit einem Lymphknotenstatus größer N1 oder Fernmetastasen notiert werden. Ein gegensätzliches Ergebnis mit schlechterer Prognose bei positivem Rezeptornachweis ließ sich im Subkollektiv der Patienten mit diffusen Karzinomen im Stadium 3 verzeichnen (Berechnungen nicht dargestellt). Da die Fallzahlen in den einzelnen Teilkollektiven jedoch sehr gering sind, die Nachbeobachtungszeiträume mit häufig weniger als zwei Jahren relativ kurz sind und bislang keine plausiblen Erklärungen für diese Ergebnisse gefunden werden konnten, gehen wir derzeit von zufällig erhaltenen, rein statistisch bestehenden Abhängigkeiten aus. Ob relevante Einflüsse der pEGFR-Expression auf das Langzeitüberleben der Patienten tatsächlich bestehen bleibt in Studien mit größeren Fallzahlen zu untersuchen. Bei einer weiterführenden Analyse der für die pEGFR-Färbung als positiv klassifizierten Karzinome mittels Computer-*Software* ließen sich weder durch Messung der gefärbten Flächen noch durch Bestimmung der Färbeintensitäten eindeutige Prognosegruppen darstellen. Die Fallzahl der in diesen Abschnitt der Untersuchungen eingeschlossenen Karzinome beschränkt sich auf 49. Korrelationen der Messdaten haben gezeigt, dass keine direkte Korrelation zwischen den lichtmikroskopisch zugewiesenen semiquantitativen Färbe-Scores und der Analyse der Färbeintensität bzw. der gefärbten Tumorflächen gemessen mittels Computer-*Software* besteht (Berechnungen nicht dargestellt). Hoch signifikante Korrelationen zwischen den ermittelten relativen Flächen (gefärbte Fläche zur Gesamttumorfläche bzw. zur Tumorfläche, die für die pEGFR-Färbung positive Bereiche enthält) haben gezeigt, dass es nur eine geringe Rolle spielt, welche der beiden Messdaten für Berechnungen verwendet werden (siehe auch Tab. 13, S. 46). Eine prognostische Bedeutung für den Nachweis der aktivierten Rezeptorform konnte auch für diese Art der Auswertung nicht verzeichnet werden. Dass jedoch die Möglichkeit einer prognostischen Wertigkeit des Nachweises einer oder mehrerer Phosphorylierungsformen des EGFRs bestehen könnte, deuten unterschiedliche Studien an. Der Hintergrund ist dabei, dass eine Rezeptoraktivierung mittels Liganden zur Phosphorylierung unterschiedlicher intrazellulärer Rezeptorabschnitte führt (siehe Kap.1.2, S. 8). So konnten Forschergruppen nachweisen, dass eine gemeinsame Expression des EGFRs mit seinen Liganden zusätzlich Aussagen hinsichtlich des Überlebens von Karzinompatienten zulässt. Espinoza und Mitarbeiter führten Untersuchungen an Magenkarzinomen mit nachgewiesener TGF- α -EGFR-Expression durch.

Sie evaluierten diese hinsichtlich eines gleichzeitigen Auftretens von Mutationen im *p53*-Gen. 26% der eingeschlossenen Karzinome wiesen eine derartige Ko-Expression auf. Statistisch zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Ko-Expression von TGF- α mit dem EGFR und einer Mutation im oben genannten Tumorsuppressor-Gen (Espinoza et al., 2004). Tahara und Kollegen untersuchten das Vorliegen von EGF in 210 Magenkarzinomen mittels IHC. Sie fanden in den analysierten Gewebeproben von Frühkarzinomen keine EGF-Expression. Allerdings exprimierten 21,1% der fortgeschrittenen Karzinome diesen Wachstumsfaktor. Patienten mit hoher EGF-Expression hatten eine schlechtere Prognose als diejenigen ohne EGF-Expression. Sie schlussfolgerten, dass der Gehalt an EGF als biologischer Marker für die Malignität eines Tumors dienen könnte (Tahara et al., 1986).

Bezüglich des gleichzeitigen Vorliegens der EGFR-Expression und dem Nachweis seiner Aktivierung in den untersuchten Magenkarzinomen konnte gezeigt werden, dass über 66% der für den EGFR negativ klassifizierten Karzinome auch für die phosphorylierte Form als negativ eingestuft wurden. Dagegen sind nur etwa 53% der Karzinome mit nachgewiesener EGFR-Überexpression pEGFR-negativ (siehe auch Tab. 15, S. 54). Interessanterweise wiesen Patienten, deren Tumore für beide Rezeptorformen als positiv bewertet wurden, das durchschnittlich längste Überleben auf (siehe Abb.31, S. 55). Eine abschließende Erklärung des Phänomens einer besseren Prognose bei gleichzeitig erhöhtem Gehalt an EGFRn und der aktivierten Rezeptorform in den Tumorzellen konnte nicht gefunden werden. Eine mögliche Erklärung liegt in der Komplexität des Zusammenspiels unterschiedlicher Aktivierungsformen bzw. Phosphorylierungsstellen. Eine isolierte Betrachtung des EGFRs ohne Rücksicht auf weitere Faktoren scheint somit schwierig. Zahlreiche Einflüsse auf die signalvermittelnde Wirkung dieses Rezeptors finden sich in der Literatur beschrieben. Veränderungen der ErbB-Rezeptoren und ihrer Expression in unterschiedlichsten Karzinomen wurden aufgedeckt. Darunter Gen-Amplifikationen, Protein-Struktur-Veränderungen und somatische Veränderungen (Henson and Gibson, 2006). Diese können bei immunhistochemischen Färbungen nur bedingt durch spezifische AK berücksichtigt werden. Nicholson vermutete, dass die wahre prognostische Wertigkeit der EGFR-Expression in vielen Studien unterschätzt wird, da häufig nur der Gesamtgehalt der EGFR-Expression gemessen wird und nicht der Anteil an der aktivierten Form. Auch gibt es noch keine standardisierten Mess- und Interpretationsverfahren. Es muss erwähnt werden, dass der fehlende Nachweis von EGFR-positiven Tumorzellen einen Patienten nicht für ein mögliches Ansprechen auf eine Anti-EGFR-Therapie ausschließt (Nicholson et al., 2001). Auch aus dem Bereich der Klinik sind Beispiele bekannt, die dazu veranlassen, die alleinige Expression des EGFRs oder einer seiner aktivierten Formen als direkten Prognosefaktor als kritisch anzusehen. Beispielsweise zeigte sich in Studien mit Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom erkrankt waren, dass der immunhistochemische

Nachweis des EGFRs in den Tumorzellen keine optimale Methode darstellt, Patienten, die auf eine Anti-EGFR-AK-Therapie ansprechen, zu identifizieren und somit prognostische Aussagen zu machen (Ciardiello and Tortora, 2008).

4.4 Der β -Catenin-Nachweis

Der Wnt-/ β -Catenin-Signalweg ist ebenso wie die Signalwege, in die der EGFR integriert ist, mit der Entwicklung und Progression menschlicher Tumore assoziiert. Eine Deregulation des zellulären β -Catenin-Gehaltes wird für unterschiedliche Karzinome, unter anderem für Kolonkarzinome und Melanome, diskutiert (Rimm et al., 1999; Samowitz et al., 1999). In den meisten Studien wird ein reduzierter β -Catenin-Gehalt in den Tumorzellen mit einem kürzeren Überleben der Patienten in Verbindung gebracht. Dabei steht diese Beobachtung jedoch häufig in Zusammenhang mit E-Cadherin (Osterheld et al., 2002; Zheng et al., 1999; Krishnadath et al., 1997). Eine Ausnahme davon scheinen Blasenkarzinome zu machen, bei denen eine Assoziation zu durchschnittlich längerem Überleben nachgewiesen werden konnte (Shimazui et al., 1996). Eine "aberrante" Verteilung dieses Proteins in Magenkarzinomzellen im Vergleich zu gesunder Magenschleimhaut findet sich mehrfach beschrieben. Dessen Konsequenzen und prognostische Auswirkungen sind noch nicht endgültig geklärt. In einer Studie an 38 Magenkarzinomen konnten Cheng und seine Forschergruppe eine Assoziation zwischen der Wnt-2-Expression und einer zytoplasmatischen bzw. nukleären β -Catenin-Akkumulation aufzeigen. Diese trat in der überwiegenden Zahl der untersuchten Karzinome auf, unabhängig ob es sich um diffuse oder intestinale Magenkarzinome handelte. Sie verzeichneten eine positive Korrelation dieser beiden Marker mit einem erhöhten Auftreten von Lymphknotenmetastasen und einer ausgedehnteren Tumordinvasionstiefe. Auch konnten sie deutlich geringere Mengen an membranständigem β -Catenin in Karzinomen als in Präkanzerosen notieren (Cheng et al., 2005). Wie bereits in der Einleitung aufgeführt, finden sich in den Zellen zwei unterschiedliche β -Catenin-Pools (siehe Kap. 1.3, S. 14). Mit den in unseren Untersuchungen verwendeten monoklonalen AKn lassen sich membranständige β -Catenin-Proteine nachweisen. In sechs von 199 Fällen zeigten sich bei Durchsicht der TMAs auch nukleäre Färbungen, die nicht mit einer bestimmten Laurénklasse oder einem bestimmten Tumorstadium assoziiert zu sein scheinen. Unter Annahme einer spezifischen Färbung wurden diese Fälle extra vermerkt. In den weiteren Auswertungen wurde jedoch allein die Membranfärbung berücksichtigt.

Für die Prognose der Patienten mit Adenokarzinomen des Magens gelten neben den UICC-Kriterien bereits einige molekulare Faktoren als aussagekräftig. Darunter zu finden sind das ErbB2-Protein, das als Tumorsuppressor-Gen-Produkt bekannte p53-Molekül, sowie in

mehreren Studien bestätigt das mit β -Catenin assoziierte Protein E-Cadherin (Werner et al., 1998). Im Gegensatz zu E-Cadherin ist die Datenlage für β -Catenin hinsichtlich seiner prognostischen Relevanz für Patienten mit Magenkarzinomen dünn. Ein Großteil der Studien, die den Einfluss von β -Catenin auf das Überleben von Karzinompatienten untersuchten, ist für kolorektale Karzinome zu finden. In den eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass über 80% der Karzinome eine membranständige Färbung mit Scores von 2 und 3 aufweisen (siehe auch Tab. 8, S. 41). Signifikante Korrelationen konnten mit negativen Korrelationskoeffizienten für die Primärtumorausdehnung, den Resektionsstatus und das *Tumor-Grading* verzeichnet werden (siehe Tab. 11, S. 45). Dies deutet einen Einfluss des Membran-Pools von β -Catenin auf diese Parameter an. Hervorzuheben ist die Tatsache, dass über 90% der intestinalen Magenkarzinome hohe β -Catenin-Scores von 2 und 3 aufweisen, demnach eine durchschnittlich stärker ausgeprägte Färbung zeigen als Karzinome anderer Laurénklassen (siehe auch Tab. 8, S. 41). Bei Berechnung von Kaplan-Meier-Kurven an Hand der zugewiesenen β -Catenin-Scores zeichnet sich keine klare Trennung von Prognosegruppen ab. Weder für das Gesamtkollektiv, bestehend aus allen Laurénklassen, noch innerhalb der einzelnen histologischen Subgruppen oder Teilkollektive bestimmter UICC-Kriterien bestehen eindeutige Prognosegruppen (siehe auch Abb. 26, S. 50; weitere Berechnungen nicht dargestellt). Ein Team um Grabsch untersuchte ebenfalls die β -Catenin-Expression in Magenkarzinomen, dessen Beziehung zu klinisch-pathologischen Parametern und dem *Outcome* der Patienten. Das Studiendesign ist dem der hier vorliegenden Arbeit ähnlich. Sie verwendeten Materialien von 401 R0-resezierten Magenkarzinomen und evaluierten die β -Catenin-Expression mittels immunhistochemischer Färbungen. Dabei konnten sie weder für den Grad der membranständigen β -Catenin-Expression noch für die zytoplasmatische oder nukleäre Akkumulationen eine signifikante Korrelation zur Tumordifferenzierung, der Laurénklassifikation, der Primärtumorausdehnung, dem Lymphknotenstatus oder der Gefäßinfiltration der Tumore feststellen. Eine Tendenz zu einer stärkeren Membranfärbung bestand für intestinale Magenkarzinome im Vergleich zu denjenigen anderer Laurénklassen (Grabsch et al., 2001). Dieses Ergebnis konnte, wie bereits erwähnt, durch das Auftreten durchschnittlich höherer Färbescores für intestinale Karzinome in dem hier vorliegenden Kollektiv bestätigt werden. Darüber hinaus fanden sie in univariaten Analysen keinerlei signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten (Grabsch et al., 2001). Auch diese Tatsache konnte in unserem Kollektiv nachvollzogen werden. Andere Studien berichten jedoch von einer prognostischen Wertigkeit des β -Catenin-Nachweises in Magenkarzinomen. So veröffentlichten Tamaka und Kollegen Daten einer Studie an 143 Frühkarzinomen. In dieser gelang es unter anderem, in Zusammenschau mit E-Cadherin und α -Catenin, sowohl für den Lymphknotenstatus, als auch für die Lymphgefäßinvasion und den histologischen Subtyp

Assoziationen zur β -Catenin-Expression herzustellen. Sie schlugen einen fehlenden β -Catenin-Nachweis als Prädiktor für eine eventuelle Lymphknotenmetastasierung vor (Tanaka et al., 2002). In einer Studie an Adenokarzinomen des Ösophagus, einer weiteren Entität gastrointestinaler Tumore, konnten Osterheld und Mitarbeiter erstaunlicherweise zeigen, dass ein wesentlich höherer Prozentsatz an Patienten, 58% zu 26%, in deren Tumore ein vermehrter *Pool* an nukleärem β -Catenin vorlag, das erste postoperative Jahr überlebten als diejenigen ohne dessen Auftreten. Jedoch konnten auch sie keine signifikanten Korrelationen zwischen der β -Catenin-Expression und dem Tumorstadium oder der Lymphknotenmetastasierung verzeichnen (Osterheld et al., 2002).

Welche Rolle die intrazelluläre Verteilung von β -Catenin spielt und ob sich daraus prognoserelevante Schlüsse ziehen lassen bleibt weiterhin unklar. Ob bei der Interpretation der intrazellulären Verteilungsmuster von β -Catenin genetischen Veränderungen, im Sinne von Mutationen, oder der Interaktion mit weiteren Zellproteinen die größte prognostische Bedeutung zukommt, bleibt zu klären. Mit der hier vorliegenden Arbeit konnte immunhistochemisch erneut kein direkter Zusammenhang zwischen der Ausprägung der membranständigen β -Catenin-Färbung und dem Überleben der Patienten verzeichnet werden.

Darüber hinaus wurde eine kombinierte Auswertung der β -Catenin-Färbungen mit den beschriebenen EGFR- und pEGFR-Färbungen durchgeführt (siehe auch Tab. 16, S. 56 und Abb. 33-36, S. 57-58). Dass eine Beziehung zwischen der Aktivierung des EGFRs und der Lokalisation, der Stabilisierung sowie der transkriptionalen Aktivität von β -Catenin besteht, konnte unter anderem von Lee und Mitarbeitern für Karzinome des Mundraumes nachgewiesen werden. Sie zeigten, dass eine erhöhte EGFR-Expression mit einer vermehrten Kernakkumulation und einem verringerten Gehalt an membranständigem β -Catenin assoziiert ist. Umgekehrtes gilt für eine verringerte EGFR-Expression (Lee et al., 2010). Einen Einfluss des EGFRs auf β -Catenin und damit auf die Funktion von Cadherinen wurde auch von Hoschuetzky und Kollegen in *in-vitro*-Studien gefunden (Hoschuetzky et al., 1994).

Bei kombinierter Auswertung mit den in dieser Arbeit beschriebenen AK-Färbungen der EGFR-Expression und seiner aktivierten Form zeigte sich bei über 38% der β -Catenin-positiven Tumore ein Nachweis für β -Catenin bei Fehlen einer EGFR- oder pEGFR-Überexpression. Interessanterweise konnte nur in einem Fall eine positive EGFR- und pEGFR-Expression ohne gleichzeitige β -Catenin-Expression nachgewiesen werden (siehe auch Tab. 16, S. 56). Zwischen den beiden Markern, EGFR und β -Catenin, besteht eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizient von 0,219 (siehe Tab. 12, S. 45). Durch Kaplan-Meier-Kurven-Berechnungen konnte gezeigt werden, dass Patienten mit gleichzeitiger Expression aller drei Marker das durchschnittlich beste Langzeitüberleben haben (siehe Abb. 33-36, S. 57-58).

Wie dies zusammenhängt kann derzeit nicht erklärt werden. In der Literatur ließen sich keine vergleichbaren Daten finden. Weitere Untersuchungen sind daher zur Klärung dieses Phänomens notwendig.

4.5 Der MIB1-Nachweis

Von der Bestimmung der Proliferationsrate in Tumoren wurde lange Zeit angenommen, dass sie zuverlässige Aussagen bezüglich dem Krankheitsverlauf und der Prognose der erkrankten Patienten ermöglicht. Es wurden verschiedene Methoden beschrieben. Neben der Zählung der Mitosefiguren scheint die immunhistochemische Bestimmung der Wachstumsfraktion die am besten umsetzbare Methode für die Routinediagnostik zu sein (Müller et al., 1996).

Zu Beginn dieses Kapitels sei vermerkt, dass in vielen Studien, vor allem älteren Untersuchungen, der Begriff Ki-67 anstatt von MIB1 verwendet wird. Dies beruht, wie bereits eingangs erwähnt, auf der Tatsache, dass zwei unterschiedliche AK existieren, die jedoch das gleiche nukleäre Antigen in proliferierenden Zellen nachweisen (Cattoretti et al., 1992).

Im Vordergrund soll auch in diesem Abschnitt die prognostische Bedeutung des Proteinnachweises stehen. Eine kurze Erläuterung der Zusammenhänge mit klinisch-pathologischen Parametern geht der Diskussion dieser voraus.

In der vorliegenden Untersuchung konnte eine große Spannweite der Proliferationsindizes zwischen den Karzinomen verzeichnet werden. Einige der Tumore zeigen Proliferationsraten von weniger als 1% der Tumorzellen. Bei anderen findet sich eine Rate von über 92% (siehe auch Tab. 9, S. 42). Nicht nur bezüglich der unterschiedlichen Karzinome sondern auch intratumoral zeigen sich, bei Durchsicht der TMAs am Lichtmikroskop, Tumorareale mit sehr geringer Proliferationsaktivität und andere mit einem hohen Anteil an sich teilenden Zellen. Dieses Phänomen der intratumoralen Heterogenität wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben. Auch Müller und Kollegen wiesen in ihren Untersuchungen an 418 R0-resezierten Magenkarzinomen eine starke intratumorale Heterogenität nach (Müller et al., 1996). Ob diese Tatsache damit zu erklären ist, dass es sich bei den lokal erhöhten Proliferationsraten um einzelne Klone handelt, die auf Grund unbestimmter Selektionsvorteile eine erhöhte Zellteilungsrate aufweisen oder ob Unterschiede zwischen Zellen im Tumorzentrum und Tumorrandbereichen bestehen ist bislang nicht geklärt. Genauso unklar ist, ob es sich um zeitlich begrenzte kurzfristige Phänomene handelt und welchen Einfluss Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel der EGF und die durch sie aktivierten Rezeptoren auf diese Zellpopulationen haben. In der oben erwähnten Studie von Müller und Mitarbeitern wurden daher separate Proliferationsindizes für randständige Tumorareale, Zellen der Tumordinvasionsfront und je ein

maximaler PI bestimmt. Jedoch konnten sie auch dabei keine signifikanten prognostischen Aussagen in Abhängigkeit des PI herausarbeiten (Müller et al., 1996). Untersucht man das vorliegende Patientenkollektiv auf Zusammenhänge im Sinne einer positiven oder negativen Korrelation der bestimmten Proliferationsindizes mit klinisch-pathologischen Merkmalen, bestehen diese im Gesamtkollektiv für die Primärtumorgröße und den Resektionsstatus. Sie zeichnen sich in Form negativer Korrelation ab (siehe Tab. 11, S. 45). Dies impliziert die Assoziation einer kleineren Tumorgröße bzw. einer besseren Resezierbarkeit der Tumore mit hoher Proliferationsrate. Auf den ersten Blick ist dies ein widersprüchliches Ergebnis. Doch berücksichtigt man die Tatsache, dass es bei großen Tumoren häufig zu nekrotischen Zellverlusten auf Grund mangelnder Durchblutung zentraler Tumorregionen und damit möglicherweise zu einer verminderten Proliferationsrate kommt, könnte sich eine logische Abhängigkeit ergeben. Absolute Klärung kann an dieser Stelle diesbezüglich nicht erfolgen. Die Tatsache alleine eröffnet aber ein Feld weiterer interessanter Fragen und Untersuchungsmöglichkeiten. Für andere Kriterien wie den Lymphknotenstatus, die Fernmetastasierung oder auch den Differenzierungsgrad der untersuchten Magenkarzinome konnten weder für das Gesamtkollektiv noch für Subkollektive, entsprechend der einzelnen TNM-G- und R-Kriterien, Zusammenhänge mit der Proliferationsrate der Tumore aufgezeigt werden (Berechnungen nicht dargestellt). Diese Beobachtungen unterstützt eine Studie eines Teams um Porschen an Karzinomen des menschlichen Verdauungstraktes. Ergebnisse seiner Untersuchungen zeigen, dass der Ki-67-Index scheinbar unabhängig von bestimmten pathologischen Kriterien, insbesondere dem TNM-Stadium, dem *Grading* und der Tumorlokalisation sowie klinischen Merkmalen, darunter dem Patientenalter und dem Geschlecht ist (Porschen et al., 1991). Auch Müller und sein Team konnten keine Zusammenhänge zwischen dem PI und der Tumorgröße, dem Lymphknotenstatus oder der Karzinomdifferenzierung verzeichnen (Müller et al., 1996). Geteilt werden diese Beobachtungen auch von Yonemura, der unter Verwendung des Ki-67-AKs Karzinome untersuchte (Yonemura et al., 1990). Darüber hinaus bestand bei Studien zur Bestimmung des *Proliferating Cell Nuclear Antigens* an 93 Magenkarzinomen von Jain und Mitarbeitern keine Korrelation mit histologischen Variablen, Tumorstadien oder Lymphknotenmetastasen (Jain et al., 1991). Dem entgegen steht jedoch eine weitere Veröffentlichung aus dem Jahr 1991, in der eine positive Korrelation der Proliferationsrate von Tumorzellen mit der Tumorinvasionstiefe erörtert wird. Das entsprechende Team trifft sogar die Aussage, dass der Ki-67-Nachweis ein unabhängiger Risikofaktor für eine Lymphknotenmetastasierung sei (Kakeji et al., 1991). Die im Jahre 1990 veröffentlichte Studie von Yonemura und Mitarbeitern beschäftigte sich mit dem "Wachstumsanteil" der Karzinome, der sogenannten *Growth Fraction*, in Magenkarzinomen von 101 Patienten und korrelierte diese unter anderem mit histopathologischen Befunden. Sie verwendeten die mittlere Proliferationsrate von 22% der

Tumorzellen als *Cut-Point* für eine Einteilung in stark und weniger stark proliferierende Karzinome (Yonemura et al., 1990). Zu bemerken ist hier, dass der in unserer Untersuchung nachgewiesene Mittelwert in Abhängigkeit von der Laurénklasse wesentlich höher bei Werten zwischen 38% und 50% liegt (siehe auch Tab. 9, S. 42). Darüber hinaus konnten sie bei Tumoren mit gesicherter Gefäßinvasion signifikant öfter höhere Ki-67-Färbeindizes beobachten als bei Tumoren ohne Gefäßinvasion (Yonemura et al., 1990). Eine Korrelation zwischen einer Blut- sowie Lymphgefäßinvasion durch Magenkarzinome wurde bereits durch Gabbert und Mitarbeiter berichtet (Gabbert et al., 1991). Beides sind Faktoren für die ein ungünstiger Einfluss auf die Prognose der Patienten beschrieben ist. Ein anderer möglicher Einflussfaktor ist die Laurénklassifikation. Eine deutliche Tendenz zu einer erhöhten Proliferationsrate in intestinalen Magenkarzinomen konnte im Vergleich zu Karzinomen vom diffusen Wuchstyp verzeichnet werden (siehe auch Tab. 10, S. 44). Ähnliches notierte Mattioli bei seinen Untersuchungen an 47 Magenkarzinomen. Der Prozentsatz der diffusen Karzinome, für die hohe Ki-67-Färbeindizes nachgewiesen wurden, waren signifikant geringer, als diejenigen intestinaler Magenkarzinome (Mattioli et al., 2007).

Bislang nicht in der anerkannten Literatur beschrieben ist eine vergleichende gemeinsame Interpretation von Proliferationsraten in Tumorzellen mit den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen, wie dem EGFR, seiner phosphorylierten Form, β -Catenin und dem Nachweis CD3-positiver Lymphozyten im Tumorstroma. Die diesbezüglich erstellten Berechnungen zeigen größtenteils keine Abhängigkeit dieser Faktoren von der Proliferationsrate der Tumorzellen. Auch eine Annahme einer eventuell höheren Rate an nachweisbaren EGFRen bzw. aktivierten Rezeptoren, im Sinne eines verstärkten Proliferationssignales, konnte nicht gefunden werden. Interessanterweise wiesen wir jedoch für das Gesamtkollektiv eine positive Korrelation zwischen den Auswertungen des CD3-Rezeptornachweises mit den Proliferationsindizes der Karzinome nach. Für die Auswertung am Lichtmikroskop ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,221 und für die computerunterstützte Auswertung ein Koeffizient von 0,268 (siehe Tab. 12, S. 45). Die Frage, wie ein erhöhter Lymphozytennachweis im Tumorstroma mit einer gesteigerten Proliferationsrate der Tumorzellen zusammenhängen kann, bleibt zu untersuchen.

Ein weiterer sehr interessanter Aspekt ist, dass es an Hand des vorliegenden Patientenkollektives gelang in einer multivariaten Analyse zu zeigen, dass unter Einschluss der Tumordinfiltrationstiefe und der Fernmetastasierung der PI zusätzliche prognostische Wertigkeit besitzen könnte. So lassen sich, wie mittels einer Kaplan-Meier-Kurve verbildlicht, eindeutige Prognosegruppen unter Berücksichtigung dieser Kriterien abbilden (siehe Abb. 37, S. 61). Ob eine Relevanz dieses statistischen Ergebnisses für die klinische Anwendung besteht, müssen weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven klären. Bezüglich der prognostischen

Aussagekraft des MIB1-Nachweis bzw. anderer Nachweisverfahren erhöhter Proliferationsraten in Tumorzellen kann in der Literatur eine Fülle von Studien gefunden werden. Die Relevanz einer erhöhten Proliferationsrate in Karzinomen für die Überlebenszeit der Patienten wird bislang umstritten diskutiert. In einigen Fällen jedoch hat sie bereits einen Stellenwert als Prognosefaktor erhalten. Etabliert ist dieser Marker vor allem in der Diagnostik von Mamma- und Prostatakarzinomen (Pollack et al., 2004; Jansen et al., 1998). Anders sieht es bei Magenkarzinomen aus. Im Jahre 1991 konnten Porschen und seine Mitarbeiter Ergebnisse von Untersuchungen an 165 Karzinomen des Speiseröhren-Magen-Darm-Traktes veröffentlichen. Sie berichteten, dass sich in Magenkarzinomen signifikant niedrigere Ki-67-Indizes nachweisen ließen als bei Karzinomen des Ösophagus, des Kolons und des Rektums (Porschen et al., 1991). Für Magenkarzinome gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass der Nachweis von Ki-67 in den Tumorzellen mit der Prognose der Patienten in Verbindung steht. In fortgeschrittenen Karzinomen, welche eng mit einer kürzeren Überlebenszeit korrelieren, konnte unter anderem ein höherer PI als in Frühkarzinomen aufgezeigt werden (Joo et al., 2006; Igarashi et al., 1999). Kontrovers stehen diesen Aussagen diejenigen anderer Forscher gegenüber, die mittels Ki-67-Färbeindex keinen Einfluss auf die Prognose nachweisen konnten (Liu et al., 2001; Kanai et al., 1997).

Kritisch anzumerken ist bei allen der oben diskutierten Studien, dass der Nachweis von proliferierenden Zellen nur eine Momentaufnahme ist. Eine nicht unerhebliche Rolle, die bei dieser Untersuchungsmethode keine Berücksichtigung findet, spielt der Faktor "Zeit". Zellen, die eine kurze Zeitspanne benötigen, um den Zellzyklus zu beenden durchlaufen in derselben Zeit wesentlich mehr Zellteilungen als diejenigen mit einer langen Zellzyklusperiode (Müller et al., 1996). So könnten Karzinome mit einem geringen PI, jedoch kurzer Zellzykluszeit, im selben Zeitraum wesentlich mehr Zellteilungen durchlaufen und zu einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten führen. Ob unter Einbezug des Kriteriums "Zell-Zyklus-Zeit" eine präzisere prognostische Wertigkeit des MIB1-Nachweises in Magenkarzinomen erreicht werden kann, bleibt zu überprüfen. Ein weiterer kritischer Punkt ist die Tatsache der Verwendung unterschiedlicher Nachweisverfahren und Score-Einteilungen in den veröffentlichten Studien und damit die eingeschränkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Die Zuteilung der Färbeausprägungen zu bestimmten Scores respektive Proliferationsindizes erfolgt häufig mittels lichtmikroskopischer Beurteilung durch den Untersucher, welches das Risiko interindividueller Fehler birgt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde diese Fehlerquelle jedoch durch das genutzte Computerprogramm minimiert. So waren stufenlose Messungen der Färbeausprägungen mit anschließenden Berechnungen stetiger Variablen möglich und führten zu präzisen Ergebnissen. Insgesamt ist zu sagen, dass die prognostische Wertigkeit des MIB1-Nachweises in

Magenkarzinomzellen noch nicht geklärt ist. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass eine Aussage über das Langzeitüberleben der Patienten unter Berücksichtigung gewisser bekannter Prognosefaktoren, hier der Tumorausbreitung und der Fernmetastasierung, nicht vollständig ausgeschlossen werden dürfen. Die Tatsache, dass für das untersuchte Patientenkollektiv sowohl mittels uni- als auch multivariater Analysen ein prognostischer Vorteil für Patienten mit höheren Proliferationsindizes besteht, bietet eine neue Diskussionsgrundlage und gilt es in weiteren Studien zu objektivieren.

4.6 Tumor-infiltrierende Lymphozyten

Die Regulation sowie Progression des Tumorwachstums werden nicht nur, wie eingangs erwähnt, durch zellspezifische Wachstums- und andere Einflussfaktoren beeinflusst, sondern auch vom Immunsystem des Patienten. Dieses besteht aus einem komplexen System von humoralen und zellulären Komponenten, die mit den Tumorzellen und -stroma interagieren. Auf zellulärer Ebene sind dabei die dendritischen Zellen, Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten zu nennen. Aktivierte T-Lymphozyten, Gedächtnis- und zytotoxische Zellen können im Tumorstroma nachgewiesen werden und spiegeln die spezifische Immunreaktion gegen Tumorzellen wider. In zahlreichen Studien konnten Tumor-infiltrierende Lymphozyten mit unterschiedlichen CD-Molekül-Expressionen, darunter CD3, CD8 und CD45R0, in bestimmten Verhältnissen zueinander bestimmt werden. Eine Beziehung zu höheren Überlebenswahrscheinlichkeiten für Patienten mit erhöhtem T-Lymphozyten-Nachweis im Tumorstroma gelang unter anderem für kolorektale Karzinome, Ovarialkarzinome, Urothelkarzinome, Hepatozelluläre Karzinome und unter bestimmten Kriterien auch für Melanome (Gao et al., 2007; Sharma et al., 2007; Taylor et al., 2007; Galon et al., 2006; Pagès et al., 2005; Zhang et al., 2003; Clemente et al., 1996). Auch für Magenkarzinome ist der Effekt von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten seit einigen Jahren Gegenstand von Studien (Haas et al., 2009; Lee et al., 2008; Fukuda et al., 2002; Ishigami et al., 2000). An dem hier vorliegenden Patientenkollektiv wurde der Nachweis CD3-positiver Lymphozyten in Tumorgewebe mit dem Gesamtüberleben von 167 Patienten mit resezierten Magenkarzinomen in Beziehung gesetzt. Die Auswertungen der immunhistochemischen Färbungen erfolgten am Lichtmikroskop und für das selbe Kollektiv, wie bereits erwähnt, mittels einer Computer-*Software* der Firma Definiens. Durch Zuweisung semiquantitativer Scores am Mikroskop zeigte sich, dass in 92,2% der untersuchten Gewebe CD3-positive Lymphozyten nachweisbar sind (siehe Tab. 8, S. 41). 47,9% der Gewebe wurden Score 1 zugewiesen, was einem vereinzelt Lymphozytennachweis entspricht. Durch diese Methode gelang es Abhängigkeiten zwischen dem Nachweis von Lymphozyten im Tumorstroma und der Primärtumorausdehnung, dem Lymphknotenstatus, der Fernmetastasierung, dem

Resektionsstatus sowie dem TNM-Stadium aufzuzeigen (siehe Tab. 10, S. 44). Mit Hilfe der *Definiens-Software* gelang es ebenso eine statistische Abhängigkeit von der Primärtumorausdehnung, dem Lymphknotenstatus, dem Resektionsstatus sowie den TNM-Statdien aufzudecken. Der statistische Zusammenhang zwischen der Fernmetastasierung und dem Nachweis Tumor-infiltrierender Lymphozyten konnte mit einem p-Wert von 0,126 mittels *Software*-Programm jedoch nicht bestätigt werden (siehe Tab. 10, S. 44). Auffällig ist, dass intestinale Magenkarzinome verglichen mit Karzinomen der beiden anderen Laurénklassen höhere Messwerte aufweisen, wohingegen bei Karzinomen vom diffusen Typ der niedrigste mediane Messwert bzw. geringste Mittelwert erzielt wurde (siehe Tab. 9, S. 42). Ob mit Hilfe des erhöhten T-Lymphozytennachweises die durchschnittlich bessere Prognose der Patienten mit intestinalen im Vergleich zu diffusen Karzinomen erklärt werden kann, bleibt zu untersuchen.

Korrelationen der CD3-Scores mit der Tumorinvasionstiefe, der Metastasierung der Karzinome, dem Resektionsstatus und dem TNM-Stadium weisen jeweils negative Korrelationskoeffizienten auf. Ebenso besteht eine negative Korrelation zwischen den mittels *Definiens-Software* ermittelten Messwerten und der Lymphknotenmetastasierung. Diese Ergebnisse sind mit p-Werten von $<0,001$ bis 0,031 statistisch aussagekräftig (siehe Tab. 11, S. 45). Sie weisen auf eine Beziehung zwischen geringerer Tumorausdehnung bei erhöhter Zahl CD3-positiver Lymphozyten hin und deuten eine prognostische Relevanz des Immunsystems an. Die aufgezeigte Korrelation des TNM-Stadiums mit dem Nachweis CD3-positiver Lymphozyten bestätigt Ergebnisse einer Untersuchung von Lee aus dem Jahr 2008. Darüber hinaus wies sein Team eine signifikante Korrelation von T-Lymphozyten mit dem Patientenalter nach, die in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden konnte (Lee et al., 2008).

An Hand von Kaplan-Meier-Kurven konnten klare Überlebensvorteile für Patienten mit erhöhtem Nachweis CD3-positiver T-Lymphozyten im Tumorstroma aufgezeigt werden (siehe Abb. 28, S. 52). Dies trifft sowohl für das Gesamtkollektiv, unter Einschluss aller Laurénklassen, als auch für das Subkollektiv der Mischtypkarzinome zu (Berechnungen nicht dargestellt). In den Teilkollektiven der intestinalen, diffusen und nicht nach Laurén klassifizierten Karzinome gelang dieser Nachweis nicht. Mit ursächlich hierfür ist sicherlich die geringe Anzahl an Karzinomen mit CD3-Scores von 0 und 3, so dass weniger Extremwerte zur Verfügung stehen, die eine prognostische Relevanz verdeutlichen. Auch für einzelne Subkollektive, wie T4-klassifizierte Karzinome und schlecht differenzierte Tumore, fanden sich bei hoch signifikanten p-Werten deutliche Überlebensvorteile für Patienten mit mehr Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (Berechnungen nicht dargestellt). Bekräftigt wird dieses Ergebnis durch Untersuchungen von Lee und Mitarbeitern an 220 Magenkarzinomen. Sie konnten in multivariaten Analysen zeigen, dass die Dichte von CD3-, CD8- und CD45RO-Lymphozyten als unabhängiger Prädiktor der

Lymphknotenmetastasierung anzusehen ist (Lee et al., 2008). Sie teilten ihre ebenfalls mittels eines Computer-*Software*-Programms erhaltenen Messdaten in Kategorien mit hoher und niedriger Dichte ein und evaluierten diese in Zusammenschau mit klinisch-pathologischen Merkmalen (Lee et al., 2008). Das Studiendesign ist dem hier vorliegenden ähnlich. Dabei verwendeten sie jedoch nur eine Gewebestanze pro Magenkarzinom. Der Nachweis der Lymphozyten erfolgte ebenfalls auf TMAs und keiner der Patienten erhielt eine *neoadjuvante* Therapie. Auch sie führten eine Analyse in Subgruppen unterschiedlicher Tumorstadien durch. Dabei konnten sie ebenfalls Tendenzen bezüglich einer besseren Prognose bei erhöhtem T-Zell-Nachweis aufzeigen (Lee et al., 2008). In einer anderen Studie an Magenkarzinomen wurde der Einfluss von Natürlichen Killerzellen auf das Überleben der Patienten untersucht. Das entsprechende Forscherteam verzeichnete eine bessere Prognose bei höherer Infiltrationsrate (Ishigami et al., 2000). Einer Veröffentlichung von Haas und Mitarbeitern sind Ergebnisse von Untersuchungen an einem Kollektiv von Patienten mit intestinalen Magenkarzinomen im Bereich der Kardia zu entnehmen. Sie fanden insbesondere einen Überlebensvorteil für Patienten mit erhöhtem Nachweis FoxP3-positiver Lymphozyten in den Gewebeproben (Haas et al., 2009). Auf der anderen Seite gibt es Studien, die keine Unterschiede bezüglich dem Überleben in Abhängigkeit einer Lymphozyteninfiltration in Tumorgewebe von Patienten mit Magenkarzinomen fanden. So verzeichnete beispielsweise Fukuda bei Untersuchungen an 129 T3-Magenkarzinomen mittels Immunfärbung keinen prognostischen Unterschied bei hoher oder geringer Dichte Tumor-infiltrierender Lymphozyten (Fukuda et al., 2002). Kritisch ist hierbei anzumerken, dass dabei eine Einteilung in niedrigere und hohe Raten Tumor-infiltrierender Immunzellen vorgenommen wurde und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit und derjenigen von Ishigami, die Anzahl der gefärbten Lymphozyten Berücksichtigung fand (Ishigami et al., 2000). Für Adenokarzinome des Ösophagus gelang es 2010 zu zeigen, dass bei nicht metastasierten Karzinomen in den Stadien 1 bis 2A die Dichte von CD45R0-positiven Tumor-infiltrierenden Lymphozyten ein prognostischer Faktor ist. Darüber hinaus korrelierten niedrigere CD3-Werte mit einer höheren Zahl an Lymphknotenmetastasen (Rauser et al., 2010).

Die Computer-*Software* von Definiens ermöglicht eine genaue Auswertung der immunhistochemischen Färbungen. Bei *Score*-Zuteilung am Lichtmikroskop mittels prozentualer Verteilung der Zellen im Präparat, wie sie in der vorliegenden Arbeit zusätzlich und in vielen weiteren Studien verwendet wurde, sind Datenerhebungen mit genauen Zellzahlen nicht möglich. Das Computerprogramm hingegen erkennt die CD3-positiven Zellen an bestimmten Färbereigenschaften. Die ermittelten absoluten Zellzahlen können in Beziehung zu Referenzwerten, wie beispielsweise der *Pixel*-Zahl oder der Flächen, gesetzt werden und stehen so als stetige Werte nachfolgenden Auswertungen zur Verfügung. An Hand der hier vorliegenden Daten konnte gezeigt werden, dass sich der Einfluss des Lymphozytennachweises

auf die Prognose der Karzinompatienten dank des *Software*-Programms präzisieren lässt. Abbildung 30 lässt erkennen, dass über alle Laurénklassen hinweg eine klare Trennung der Kollektivpatienten in drei Prognosegruppen möglich ist (siehe Abb. 30, S. 53). Derzeit ist für eine solche Analyse jedoch noch ein erheblicher zeitlicher Aufwand nötig. Auch sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die hier getroffenen Aussagen bezüglich ihrer prognostischen Relevanz zu unterstreichen. Ob sich die verwendete Technik jedoch in der Routinediagnostik etablieren kann, wird sich in den nächsten Jahren herausstellen.

Durch univariate Regressions-Analysen gelang es die lichtmikroskopische CD3-Score-Zuteilung als prognostischen Faktor darzustellen (siehe Tab. 18, S. 60). In multivariaten Cox-Regressionen zeigte sich der Nachweis CD3-positiver Lymphozyten jedoch nicht als zusätzlicher prognostischer Marker neben den bekannten Kriterien der erweiterten TNM-Klassifikation.

Eine differenzierte Betrachtung der Tumor-infiltrierenden Lymphozytenpopulation ist mit dem hier vorliegenden Studiendesign nicht möglich. Dass jedoch sowohl das *Tumor-Microenvironment*, eingeschlossen der Zytokin-Sekretion, als auch der Einfluss intrazellulärer Signalwege in Lymphozyten eine prognostische Bedeutung haben kann, verdeutlichen Untersuchungen von Wang und seinem Forscherteam. Sie analysierten an Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, Melanomen und Nierenzellkarzinomen molekulare Veränderungen, die die Funktion Tumor-infiltrierender Lymphozyten negativ beeinflussen können und zeigten, dass das Ausmaß der Beeinflussung der Lymphozytenaktivität durch das *Tumor-Microenvironment* auch vom Tumortyp abhängt (Wang et al., 2011). Da davon ausgegangen werden kann, dass die Prognose der Patienten mit Karzinomen weitestgehend von der Aktivität der Immunzellen und nicht ausschließlich von ihrer Anzahl abhängt, eröffnet sich dadurch auch für die Magenkarzinomforschung ein Feld an weiteren Forschungsansätzen. Insgesamt zeigen auch die Veröffentlichungsdaten entsprechender Fachartikel, dass das Thema der Tumorummunologie mit Hinblick auf die Krebstherapie ein relativ neues und umfangreiches Forschungsgebiet darstellt. Das Feld der möglichen Einflüsse der Lymphozyten, insbesondere ihrer vielfältigen regulatorischen und zytotoxischen Funktionen, ist breit. Welche Bedeutung den einzelnen Lymphozytenpopulationen dabei zufällt und ob sich in naher Zukunft therapeutische Konsequenzen daraus ergeben ist noch offen. Ein kleiner Beitrag hierzu ist mit dem Nachweis eines prognostischen Einflusses CD3-positiver Lymphozyten auf das Überleben der Kollektivpatienten jedoch gelungen.

5 Zusammenfassung

Die Beurteilung der Prognose von Patienten mit Magenkarzinomen erfolgt heute weitgehend unter Verwendung des TNM-Klassifikationssystems und des Resektionsstatus. Da sich jedoch das tumorfreie Überleben bzw. Gesamtüberleben der Patienten mit den gleichen Tumorstadien stark unterscheiden können wird zunehmend nach weiteren Prognosefaktoren gesucht. Dies hat einerseits eine präzisere und individuellere Prognoseeinschätzung andererseits auch die Identifikation von Patienten zum Ziel, die von neuen *adjuvanten* Therapien profitieren würden.

In der vorliegenden retrospektiven Arbeit wurde an insgesamt 230 Adenokarzinomen des Magens erstmalig die gleichzeitige Expression des EGFRs, einer seiner aktivierten Formen (Y1068), von β -Catenin und MIB1 sowie zusätzlich eines Lymphozytenmarkers (CD3-Rezeptor) auf deren prognostische Aussagekraft hin untersucht. Der Schwerpunkt lag auf der Erarbeitung von Zusammenhängen zwischen den genannten Proteinexpressionen und klinisch-pathologisch relevanten Kriterien, wie dem TNM-Stadium sowie insbesondere dem Gesamtüberleben der Kollektivpatienten. Ein wesentliches *Tool* stellten TMAs dar. Der Nachweis der Zellproteine erfolgte immunhistochemisch. Die quantitativen Auswertungen der AK-Färbungen wurden an einem Lichtmikroskop vorgenommen und ergänzt durch Bildanalysen mittels eines neuen *Software*-Programms der Firma Definiens. Es wurde großer Wert auf eine klinisch praktikable Methode gelegt, um eine mögliche Anwendung in der Routinediagnostik zu berücksichtigen.

Wir konnten in 36,4% der Karzinome eine EGFR-Positivität und in 40,0% eine Positivität für die phosphorylierte Rezeptorform nachweisen. Es fiel auf, dass Karzinome vom intestinalen Typ nach Laurén deutlich häufiger den EGFR (52,5%) exprimierten, jedoch seltener die aktivierte Rezeptorform (37,0%), als es im Gesamtkollektiv der Fall war. Diffuse Karzinome zeigten die geringste Anzahl an EGFR-positiven (24,5%) jedoch die verhältnismäßig höchste Zahl an pEGFR-positiven Karzinomen (64,5%). Eine membranständige Färbung für das Protein β -Catenin bzw. ein Nachweis des CD3-Rezeptors auf T-Lymphozyten ließen sich, in unterschiedlicher Ausprägung, bei 92,0% bzw. 92,2% der Gewebeproben nachweisen. Im Kollektiv der intestinalen Karzinome nach Laurén waren die meisten β -Catenin-positiven Tumore zu notieren (96,7%). Dieses Kollektiv beinhaltete auch in der lichtmikroskopischen Auswertung mit 96,6% die meisten Karzinomgewebe, bei denen sich CD3-Rezeptor-positive Lymphozyten nachweisen ließen und wies die höchste mediane Dichte an T-Lymphozyten, gemessen mittels Definiens-Computerprogramm, auf.

Es zeigten sich statistische Abhängigkeiten zwischen der Laurénklassifikation und dem EGFR-, pEGFR- und CD3-Nachweis. Für die Kriterien Tumorstadium, Lymphknoten- und Fernmetastasierung, UICC-Stadium und Resektionsstatus besteht ein Zusammenhang mit dem

Nachweis CD3-positiver Lymphozyten. Für den Resektionsstatus konnte zusätzlich ein Zusammenhang mit dem MIB1-Nachweis verzeichnet werden.

Für die EGFR-Expression der untersuchten Magenkarzinome besteht eine negative Korrelation mit dem Resektionsstatus. Negativ korreliert dieser ebenfalls mit der β -Catenin-Expression, dem MIB1-Nachweis und den Ergebnissen der CD3-Lymphozyten-Messungen. Die β -Catenin-Expression korreliert zusätzlich negativ mit der Tumorausdehnung und dem *Grading* der Magenkarzinome. Signifikante negative Korrelationen wurden darüber hinaus für den Nachweis CD3-positiver T-Lymphozyten mit den einzelnen Kriterien der TNM-Klassifikation beobachtet. Keine Korrelation besteht jedoch zwischen den untersuchten Proteinexpressionen und dem Gesamtüberleben der Kollektivpatienten.

Für die jeweiligen Gesamtkollektive einzelner AK-Färbungen konnten mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven nur für den CD3-Rezeptornachweis signifikante Prognosegruppen herausgearbeitet werden. In einzelnen Subkollektiven, wie dem Patientenkollektiv mit mäßig differenzierten Karzinomen, zeigte sich die EGFR-Expression als Einflussgröße auf die Prognose. Interessant ist die Tatsache, dass eine gemeinsame Expression des EGFRs und seiner aktivierten Form unabhängig von der β -Catenin-Expression und dem Nachweis von CD3-positiven Lymphozyten zu einem deutlich längeren Gesamtüberleben der Kollektivpatienten führte, als wenn nur einer der beiden Rezeptorformen von den Tumorzellen exprimiert wird. Dies deutet an, dass das Verhältnis aktivierter zu nicht-aktivierten EGFRen die Prognose der Patienten beeinflussen könnte. Darüber hinaus ist hervorzuheben, dass erneut gezeigt werden konnte, dass das Immunsystem, hier repräsentiert durch CD3-positive Tumor-infiltrierende Lymphozyten, einen Einfluss auf das Gesamtüberleben hat. Es gelang mittels Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die lichtmikroskopische Auswertung einen prognostischen Vorteil für Patienten mit einer höheren Dichte an T-Lymphozyten im Tumorstroma aufzuzeigen. Durch Verwendung der *Definiens-Software* waren Einteilungen in zwei bzw. drei Prognosegruppen möglich. Ein klarer Vorteil der *Definiens-Software* gegenüber der lichtmikroskopischen Auswertung ergab sich hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft der ermittelten Messdaten jedoch nicht. In multivariaten Analysen erwies sich der Lymphozytennachweis nicht als zusätzlicher prognostischer Marker. Als ergänzender prognostischer Faktor, neben der Primärtumorausbreitung und der Fernmetastasierung, die zwei bedeutende Einflussgrößen auf das Überleben von Karzinompatienten darstellen, zeigte sich der Nachweis von MIB1-positiven Tumorzellen. Interessanterweise ist hierbei ein erhöhter Nachweis an MIB1-positiven Zellen mit einem längeren Gesamtüberleben der Kollektivpatienten assoziiert. Ob dies ein für das untersuchte Patientenkollektiv spezifisches Ergebnis ist müssen weitere Studien klären.

6 Literaturverzeichnis

1. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO Journal* 1997;16(13):3797-3804.
2. Adachi Y, Shiraishi N, Suematsu T, Shiromizu A, Yamaguchi K, Kitano S. Most Important Lymph Node Information in Gastric Cancer: Multivariate Prognostic Study. *Annals of Surgical Oncology* 2000;7(7):503-507.
3. Allgayer H, Heiss MM, Schildberg FW. Prognostic factors in gastric cancer. *British Journal of Surgery* 1997;84(12):1651-1664.
4. Armstrong B, Doll R. Environmental Factors And Cancer Incidence And Mortality In Different Countries, With Special Reference To Dietary Practies. *International Journal of Cancer* 1975;15(4):617-631.
5. Arteaga CL. Epidermal Growth Factor Receptor Dependence in Human Tumors: More Than Just Expression? *The Oncologist* 2002;7(Supplement 4):31-39.
6. Bang Y-J, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Lehle M, Rüschoff J, Kang Y-K. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet* 2010;376(9742):687-697.
7. Bani-Hani KE. Clinicopathological Comparison Between Young and Old Age Patients With Gastric Adenocarcinoma. *International Journal of Gastrointestinal Cancer* 2005;35(1):43-52.
8. Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G. All ErbB Receptors Other Than the Epidermal Growth Factor Receptor Are Endocytosis Impaired. *The Journal of Biological Chemistry* 1996;271(9):5251-5257.
9. Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, Chen B. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Modern Pathology* 2005;18:1027-1033.
10. Bishayee A, Beguinot L, Bishayee S. Phosphorylation of Tyrosine 992, 1068, and 1086 Is Required for Conformational Change of the Human Epidermal Growth Factor Receptor C-Terminal Tail. *Molecular Biology of the Cell* 1999;10(3):525-536.
11. Bishayee S. Role of Conformational Alteration in the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Function. *Biochemical Pharmacology* 2000;60(8):1217-1223.
12. Bonenkamp JJ, Hermans J, Sasako M, Van de Velde CJH. Extended Lymph-Node Dissection for Gastric Cancer. *The New England Journal of Medicine* 1999;340(12):908-914.
13. Borchard F. Magen und Duodneum. In: Pathologie, Böcker W, Denk, H, Heintz PU. Elsevier GmbH, München, 2004, ISBN: 3437444700, 7.Auflage:675-693.
14. Brembeck FH, Rosário M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin. *Current Opinion in Genetics & Development* 2006;16(1):51-59.
15. Bridger JM, Kill IR, Lichter P. Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. *Chromosome Research* 1998;6(1):13-24.
16. Buday L, Downward J. Epidermal Growth Factor Regulates p21ras through the Formation of a Complex of Receptor, Grb2 Adapter Protein, and Sos Nucleotide Exchange Factor. *Cell* 1993;73(3):611-620.

17. Buhrow SA, Cohen S, Garbers DL, Staros JV. Characterization of the Interaction of 5'-p-Fluorosulfonylbenzoyl Adenosine with the Epidermal Growth Factor Receptor/Protein Kinase in A431 Cell Membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 1983;258(12):7824-7827.
18. Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlueter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal Antibodies Against Recombinant Parts Of The Ki-67 Antigen (MIB 1 And MIB 3) Detect Proliferating Cells In Microwave-Processed Formalin-Fixed Paraffin Sections. *The Journal of Pathology* 1992;168(4):357-363.
19. Cheng XX, Wang Z-C, Chen XY, Sun Y, Kong QY, Liu J, Li H. Correlation of Wnt-2 expression and β -catenin intracellular accumulation in Chinese gastric cancers: relevance with tumour dissemination. *Cancer Letters* 2005;223(2):339-347.
20. Ciardiello F, Tortora G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *The New England Journal of Medicine* 2008;358(11):1160-1174.
21. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006;(7):505-516.
22. Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic Value of Tumor Infiltrating Lymphocytes in the Vertical Growth Phase of Primary Cutaneous Melanoma. *Cancer* 1996;77(7):1303-1310.
23. Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 2006;127(3):469-480.
24. Cohen S, Ushiro H, Stoscheck C, Chinkers M. A Native 170,000 Epidermal Growth Factor Receptor-Kinase Complex from Shed Plasma Membrane Vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*, 1982;257(3):1523-1531.
25. Crew K, Neugut A. Epidemiology of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* 2006;12(3):354-362.
26. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJH, Nicolson M, Scarffe JH, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ, Smith DB, Langley RE, Verma M, Weeden S, Chua YJ. Perioperative Chemotherapy versus Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Cancer. *The New England Journal of Medicine* 2006; 355(1):11-20.
27. Dittmar Y, Rauchfuss F, Goetz M, Scheuerlein H, Jandt K, Settmacher U. Impact of Clinical and Pathohistological Characteristics on the Incidence of Recurrence and Survival in Elderly Patients with Gastric Cancer. *World Journal of Surgery* 2012; 36(2):338-345.
28. Downward J, Parker P, Waterfield MD. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature* 1984;331(5985):483-485.
29. Du C, Zhou Y, Cai H, Zhao G, Fu H, Shi Y-Q. Poor Prognostic Factors in Patients With Stage I Gastric Cancer According to the Seventh Edition TNM Classification: A Comparative Analysis of Three Subgroups. *Journal of Surgical Oncology* 2012;105(3):323-328.
30. Espinoza LA, Tone LG, Neto JB, Costa RS, Wang QJ, Ballejo G. Enhanced TGF α -EGFR expression and P53 gene alterations contributes to gastric tumors aggressiveness. *Cancer Letters* 2004;212(1):33-41.
31. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* 2010;127(12):2893-2917.
32. Fiske WH, Threadgill D, Coffey RJ. ERBBs in the gastrointestinal tract: Recent progress and new perspectives. *Experimental Cell Research* 2009;315(4):583-601.

33. Frederick L, Wang X-Y, Eley G, James CD. Diversity and Frequency of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Human Glioblastomas. *Cancer Research* 2000;60(5):1383-1387.
34. Frykberg L, Palmieri S, Beug H, Graf T, Hayman MJ, Vennström B. Transforming capacities of avian erythroblastosis virus mutants deleted in the erbA or erbB oncogenes. *Cell* 1983;32(1):227-238.
35. Fukuda K, Tsujitani S, Maeta Y, Yamaguchi K, Ikeguchi M, Kaibara N. The expression of RCAS1 and tumor infiltrating lymphocytes in patients with T3 gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 2002;5:220-227.
36. Gabbert HE, Meier S, Gerharz CD, Hommel G. Incidence And Prognostic Significance Of Vascular Invasion In 529 Gastric-Cancer Patients. *International Journal of Cancer* 1991;49(2):203-207.
37. Galizia G, Lieto E, Orditura M, Castellano P, La Mura A, Imperatore V, Pinto M, Zamboli A, De Vita F, Ferraraccio F. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression is associated with a worse prognosis in gastric cancer patients undergoing curative surgery. *World Journal of Surgery* 2007;31(7):1458–1468.
38. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc P-H, Trajanoski Z, Fridman W-H, Pagès F. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* 2006;313(5795):1960-1964.
39. Gamboa-Dominguez A, Dominguez-Fonseca C, Quintanilla-Martinez L, Reyes-Gutierrez E, Green D, Angeles-Angeles A, Busch R, Hermannstädter C, Nährig J, Becker K-F, Becker I, Höfler H, Fend F, Lubber B. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in gastric adenocarcinoma from Mexican patients: a multivariate analysis using a standardized immunohistochemical detection system. *Modern Pathology* 2004;17(5):579-587.
40. Gao Q, Qiu S-J, Fan J, Zhou J, Wang X-Y, Xiao Y-S, Xu Y, Li Y-W, Tang Z-Y. Intratumoral Balance of Regulatory and Cytotoxic T Cells Is Associated With Prognosis of Hepatocellular Carcinoma After Resection. *Journal of Clinical Oncology* 2007;25(18):2586-2593.
41. Garcia I, Vizoso F, Martin A, Sanz L, Abdel-Lah O, Raigoso P, Garcia-Muñiz JL. Clinical Significance of the Epidermal Growth Factor Receptor and HER2 Receptor in Resectable Gastric Cancer. *Annals of Surgical Oncology* 2003;10(3):234–241.
42. Gates J, Peifer M. Can 1000 Reviews Be Wrong? Actin, α -Catenin, and Adherens Junctions. *Cell* 2005;123(5):769-772.
43. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production Of A Mouse Monoclonal Antibody Reactive With A Human Nuclear Antigen Associated With Cell Proliferation. *International Journal of Cancer* 1983;31(1):13-20.
44. Grabsch H, Takeno S, Noguchi T, Hommel G, Gabbert HE, Mueller W. Different patterns of β -catenin expression in gastric carcinomas: relationship with clinicopathological parameters and prognostic outcome. *Histopathology* 2001;39(2):141-149.
45. Grünwald V, Hidalgo M. Developing Inhibitors of the Epidermal Growth Factor Receptor for Cancer Treatment. *Journal of the National Cancer Institute* 2003;95(12):851-867.
46. Haas M, Dimmler A, Hohenberger W, Grabenbauer GG, Niedobitek G, Distel LV. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. *BioMedCentral Gastroenterology* 2009;9:65-74.
47. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Experimental Cell Research* 2003;284(1):2-13.

48. Hass HG, Smith U, Jäger C, Schäffer M, Wellhäußer U, Hehr T, Markmann H-U, Nehls O, Denzlinger C. Signet Ring Cell Carcinoma of the Stomach Is Significantly Associated with Poor Prognosis and Diffuse Gastric Cancer (Laurén's): Single-Center Experience of 160 Cases. *Onkologie* 2011;34(12):682-686.
49. Hausmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U. (2010) Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends, 7.Auflage; Kapitel 3.4:32-35.
50. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science* 1998;281(5382):1509-1512.
51. He X. A Wnt-Wnt Situation. *Developmental Cell* 2003;4(6):791-797.
52. Helicobacter and Cancer Collaborative Group, 2001. Gastric cancer and Helicobacter pylori: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* 2001;49(3):347-353.
53. Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy. *Cellular Signalling* 2006;18(12):2089-2097.
54. Hirono Y, Tsugawa K, Fushida S, Ninomiya I, Yonemura Y, Miyazaki I, Endou Y, Tanaka M, Sasaki T. Amplification of Epidermal Growth Factor Receptor Gene and Its Relationship to Survival in Human Gastric Cancer. *Oncology* 1995;52(3):182-188.
55. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental Cell Research* 2003;284(1):99-110.
56. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic AS, Mastorides S, Dudas ME, Leung DHY, Kuo D, Brennan MF, Lewis JJ, Cordon-Cardo C. Validation of Tissue Microarrays for Immunohistochemical Profiling of Cancer Specimens Using the Example of Human Fibroblastic Tumors. *American Journal of Pathology* 2001;158(4):1245-1251.
57. Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R. β -Catenin Mediates the Interaction of the Cadherin-Catenin Complex with Epidermal Growth Factor Receptor. *The Journal of Cell Biology* 1994;127(5):1375-1380.
58. Huang H, He X. Wnt/ β -catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Current Opinion in Cell Biology* 2008;20(2):119-125.
59. Igarashi N, Takahashi M, Ohkubo H, Omata K, Iida R, Fujimoto S. Predictive Value of Ki-67, p53 Protein, and DNA Content in the Diagnosis of Gastric Carcinoma. *Cancer* 1999;86(8):1449-1454.
60. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T. Prognostic Value of Intratumoral Natural Killer Cells in Gastric Carcinoma. *Cancer* 2000;88(3):577-583.
61. Jain S, Filipe MI, Hall PA, Waseem N, Lane DP, Levison DA. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *Journal of Clinical Pathology* 1991;44(8):655-659.
62. Jansen RLH, Hupperets PSGJ, Arends JW, Joosten-Achjanie SR, Volovics A, Schouten HC, Hillen HFP. MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *British Journal of Cancer* 1998;78(4):460-465.
63. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2011;61(2):69-90.

64. Joo YE, Chung IJ, Park YK, Koh YS, Lee JH, Park CH, Lee WS, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Expression of Cyclooxygenase-2, p53 and Ki-67 in Gastric Cancer. *Journal of Korean Medical Science* 2006;21(5):871-876.
65. Kakeji Y, Korenaga D, Tsujitani S, Haraguchi M, Maehara Y, Sugimachi K. Predictive Value of Ki-67 and Argyrophilic Nucleolar Organizer Region Staining for Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer. *Cancer Research* 1991;51(13):3503-3506.
66. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Human Molecular Genetics* 2001;10(7):657-662.
67. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24(14):2137-2150.
68. Kanai T, Konno H, Maruyama K, Baba M, Tanaka T, Maruo Y, Nishino N, Nakamura S, Baba S, Sugimura H. p53 Overexpression and Proliferative Activity Do Not Correlate with Lymph Node Metastasis in Early Gastric Cancer. *European Surgical Research* 1997;29(1):35-41.
69. Kang Y, Ohtsu A, Van Cutsem E, Rha SY, Sawaki A, Park S, Lim H, Wu J, Langer B, Shah MA. AVAGAST: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study of first-line capecitabine and cisplatin plus bevacizumab or placebo in patients with advanced gastric cancer (AGC). *ASCO Meeting Abstracts* 2010;28(18_suppl):LBA4007.
70. Keller G, Höfler H, Becker K-F. Molecular medicine of gastric adenocarcinomas. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2005;7(17):1-13.
71. Key G, Becker MH, Baron B, Duchrow M, Schlüter C, Flad HD, Gerdes J. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Laboratory Investigation* 1993;68(6):629-636.
72. Kim IJ, Kang HC, Park JG. Microarray Applications in Cancer Research. *Cancer Research and Treatment* 2004;36(4):207-213.
73. Kim JP, Lee JH, Kim SJ, Yu HJ, Yang HK. Clinicopathologic characteristics and prognostic factors in 10783 patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 1998;1(2):125-133.
74. Kodera Y, Schwarz RE, Nakao A. Extended Lymph Node Dissection in Gastric Carcinoma: Where Do We Stand after the Dutch and British Randomized Trials? *Journal of the American College of Surgeons* 2002;195(6):855-864.
75. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine* 1998;4(7):844-847.
76. Koullias GJ, Kouraklis GP, Raftopoulos IS, Davaris PS, Papadopoulos SA, Golematis BC. Increased Estrogen Receptor and Epidermal Growth Factor Receptor Gene Product Co-expression in Surgically Resected Gastric Adenocarcinomas. *Journal of Surgical Oncology* 1996;63(3):166-171.
77. Koynova DK, Tsenova VS, Jankova RS, Gurov PB, Toncheva DI. Tissue microarray analysis of EGFR and HER2 oncogene copy number alterations in squamous cell carcinoma of the larynx. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2005;131(3):199-203.
78. Krishnadath KK, Tilanus HW, Van Blankenstein M, Hop WCJ, Kremers ED, Dinjens WNM, Bosman FT. Reduced expression of the cadherin-catenin complex in oesophageal adenocarcinoma correlates with poor prognosis. *The Journal of Pathology* 1997;182(3):331-338.

79. Kwon SJ. Evaluation of the 7th UICC TNM Staging System of Gastric Cancer. *Journal of Gastric Cancer* 2011;11(2):78-85.
80. Laurén P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31-49.
81. Lee CH, Hung HW, Hung PH, Shieh YS. Epidermal growth factor receptor regulates β -Catenin location, stability, and transcriptional activity in oral cancer. *BioMedCentral Molecular Cancer* 2010;9:64-75.
82. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, Kim WH. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *British Journal of Cancer* 2008;99(10):1704-1711.
83. Lee WS, Song HS, Kim IH, Sohn SS, Kwon KY. Prognostic significance of laurén classification in curatively resected gastric cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22: Abstract 1453.
84. Levina E, Oren M, Ben-Zeev A. Downregulation of β -Catenin by p53 involves changes in the rate of β -catenin phosphorylation and Axin dynamics. *Oncogene* 2004;23(25):4444-4453.
85. Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, Castellano P, La Mura A, Pinto M, Zamboli A, DeVita F, Galizia G. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is an Independent Prognostic Indicator of Worse Outcome in Gastric Cancer Patients. *Annals of Surgical Oncology* 2007;15(1):69-79.
86. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G-H, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* 2002;108(6):837-847.
87. Liu XP, Tsushimi K, Tsushimi M, Kawauchi S, Oga A, Furuya T, Sasaki K. Expression of p21WAF1/CIP1 and p53 proteins in gastric carcinoma: its relationships with cell proliferation activity and prognosis. *Cancer Letters* 2001;170(2):183-189.
88. Logan CY, Nusse R. The Wnt Signaling Pathway In Development and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2004;20:781-810.
89. Lordick F, Ott K, Weitz J, Jäger D. The evolving role of catumaxomab in gastric cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2008;8(9):1407-1415.
90. Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Ill GHF, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-5 Binds to Axin and Regulates the Canonical Wnt Signaling Pathway. *Molecular Cell* 2001;7(4):801-809.
91. Margolis BL, Lax I, Kris R, Dombalagian M, Honegger AM, Howk R, Givol D, Ullrich A, Schlessinger J. All Autophosphorylation Sites of Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor and HER2/neu Are Located in Their Carboxyl-terminal Tails. *The Journal of Biological Chemistry* 1989;264(15):10667-10671.
92. Mason S, Gullick WJ. Type 1 growth factor receptors: an overview of recent developments. *The Breast* 1995;4(1):11-18.
93. Massagué J, Pandiella A. Membrane-Anchored Growth Factors. *Annual Review of Biochemistry* 1993; 62: 515–541.
94. Mattioli E, Vogiatzi P, Sun A, Abbadessa G, Angeloni G, D'Ugo D, Trani D, Gaughan JP, Vecchio FM, Cevenini G, Persiani R, Giordano Claudio PP. Immunohistochemical Analysis of pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, p16-INK4A, p27-KIP1, p21-WAF1, Ki-67 Expression Patterns in Gastric Cancer. *Journal of Cellular Physiology* 2007;210(1):183-191.

95. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. Wnt and β -Catenin Signalling: Diseases and Therapies. *Nature Reviews Genetics* 2004;5(9):691-709.
96. Müller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G, Gabbert HE. Immunohistochemical study on the prognostic value of MIB-1 in gastric carcinoma. *British Journal of Cancer* 1996;74(5):759-765.
97. Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer* 2001;37(Supplement 4):9-15.
98. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006;366(1):2-16.
99. Nourai M, Pietinen P, Kamangar F, Dawsey SM, Abnet CC, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR. Fruits, Vegetables, and Antioxidants and Risk of Gastric Cancer among Male Smokers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2005;14(9):2087-2092.
100. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S. Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell* 2002;110(6):775-787.
101. Okutani T, Okabayashi Y, Kido Y, Sugimoto Y, Sakaguchi K, Matuoka K, Takenawa T, Kasuga M. Grb2/Ash Binds Directly to Tyrosines 1068 and 1086 and Indirectly to Tyrosine 1148 of Activated Human Epidermal Growth Factor Receptors in Intact Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;269(49):31310-31314.
102. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal* 2000;19(13):3159-3167.
103. Osterheld M-C, Bian Y-S, Bosman FT, Benhattar J, Fontolliet C. Beta-Catenin Expression and Its Association With Prognostic Factors in Adenocarcinoma Developed in Barrett Esophagus. *American Journal of Clinical Pathology* 2002;117(3):451-456.
104. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc P-H, Trajanoski Z, Fridman W-H, Galon J. Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine* 2005;353(25):2654-2666.
105. Parkin DM. International variation. *Oncogene* 2004;23(38):6329-6340.
106. Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GR. Taschenatlas der Immunologie-Grundlagen-Labor-Klinik. Thieme Verlag, Stuttgart, 2006, ISBN: 3131153822, 2.Auflage:16.
107. Polakis P. Casein Kinase 1: A Wnt'er of Disconnect. *Current Biology* 2002;12(14):R499-R501.
108. Pollack A, DeSilvio M, Khor L-Y, Li R, Al-Saleem TI, Hammond ME, Venkatesan V, Lawton CA, Roach III M, Shipley WU, Hanks GE, Sandler HM. Ki-67 Staining Is a Strong Predictor of Distant Metastasis and Mortality for Men With Prostate Cancer Treated With Radiotherapy Plus Androgen Deprivation: Radiation Therapy Oncology Group Trial 92-02. *Journal of Clinical Oncology* 2004;22(1):2133-2140.
109. Porschen R, Kriegel A, Langen C, Classen S, Hilse M, Lohe B, Hengels KJ, Borchard F. Assessment Of Proliferative Activity In Carcinomas Of The Human Alimentary Tract By Ki-67 Immunostaining. *International Journal of Cancer* 1991;47:686-691.
110. Porter PL. Molecular markers of tumor initiation and progression. *Current Opinion in Genetics and Development* 2001;11(1):60-63.

111. Preiß J, Dornoff W, Hagmann F-G, Schmieder A (2012). Magen- und AEG-Karzinome. http://www.onkologie2012.de/solidetumoren/verdauungstrakt/magen_therapie_schemata.htm. Stand:18.08.2012.
112. Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-Related Cancer* 2001;8(1):11-31.
113. Rauser S, Langer R, Tschernitz S, Gais P, Juetting U, Feith M, Hoefler H, Walch A. High number of CD45R0+ tumour infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in non-metastasized (stage I-IIA) esophageal adenocarcinoma. *BioMedCentral Cancer* 2010;10:608-616.
114. Riese II DJ, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays* 1998;20(1):41-48.
115. Rimm DL, Caca K, Hu G, Harrison FB, Fearon ER. Frequent Nuclear/Cytoplasmic Localization of β -Catenin without Exon 3 Mutations in Malignant Melanoma. *The American Journal of Pathology* 1999;154(2):325–329.
116. Roder JD, Böttcher K, Siewert JR, Busch R, Hermanek P, Meyer HJ, and the German Gastric Carcinoma Study Group. Prognostic Factors in Gastric Carcinoma. Results of the German Gastric Carcinoma Study 1992. *Cancer* 1993;72(7):2089-2097.
117. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3 β to the APC- β -Catenin Complex and Regulation of Complex Assembly. *Science* 1996;272(5264):1023-1026.
118. Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of β -Catenin by Genetic Defects in Melanoma Cell Lines. *Science* 1997;275(5307):1790-1792.
119. Ruf G, Barke A, Hopt U, Henne K, Engelhardt R, Henß H, Schaefer HE. (2001) Tumorzentrum Ludwig Heilmeyer Comprehensive Cancer Center Freiburg. Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Magenkarzinom, 3.Auflage 2001. <http://www.krebs-webweiser.de/Medizin-Info/Leitlinien.htm>. Stand: 21.10.2009.
120. Samowitz W, Powers M, Spirio L, Nollet F, Van Roy F, Slattery M. β -Catenin Mutations Are More Frequent in Small Colorectal Adenomas Than in Larger Adenomas and Invasive Carcinomas. *Cancer Research* 1999;59(7):1442-1444.
121. Schlessinger J. Ligand-Induced, Receptor-Mediated Dimerization and Activation of EGF Receptor. *Cell* 2002;110(6):669-672.
122. Seedorf, K. Intracellular Signaling by Growth Factors. *Metabolism* 1995;44 (Supplement 4):24-32.
123. Seidensticker MJ, Behrens J. Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000;1495:168-182.
124. Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth AA, Gnjatic S, Bajori DF, Reuter VE, Herr H, Old LJ, Sato E. CD 8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:3967-3972.
125. Shi S-R, Key ME, Kalra KL. Antigen Retrieval in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues: An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating of Tissue Sections. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1991;39(6):741-748.

- 126.** Shimazui T, Schalken J, Girolodi L, Jansen CFJ, Akaza H, Koiso K, Debruyne FMJ, Bringuier PB. Prognostic Value of Cadherin-associated Molecules (α -, β -, and γ -Catenins and p120cas) in Bladder Tumors. *Cancer Research* 1996;56(18):4154-4158.
- 127.** Siewert JR, Böttcher K, Stein HJ, Roder JD, and the German Gastric Carcinoma Study Group. Relevant Prognostic Factors in Gastric Cancer Ten-Year Results of the German Gastric Cancer Study. *Annals of Surgery* 1998;228(4):449-461.
- 128.** Siewert JR, Sendler A, Bumm R. Magen und Duodenum. In: Chirurgie, Siewert JR. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2006, ISBN: 3540304500, 8.Auflage: 587.
- 129.** Siewert JR, Böttcher K, Roder JD, Busch R, Hermanek P, Meyer HJ. Prognostic relevance of systematic lymph node dissection in gastric carcinoma. *British Journal of Surgery* 1993;80(8):1015-1018.
- 130.** Song HS, Do YR, Kim IH, Sohn SS, Kwon KY. Prognostic Significance of Immunohistochemical Expression of EGFR and C-erbB-2 Oncoprotein in Curatively Resected Gastric Cancer. *Cancer Research and Treatment* 2004;36(4):240-245.
- 131.** Sorkin A, Mazzotti M, Sorkina T, Scotto L, Beguinot L. Epidermal Growth Factor Receptor Interaction with Clathrin Adaptors Is Mediated by the Tyr 974-containing Internalization. *The Journal of Biological Chemistry* 1996;271(23):13377-13384.
- 132.** Städeli R, Hoffmans R, Basler K. Transcription under the Control of Nuclear Arm/ β -Catenin. *Current Biology* 2006;16(10):R378-R385.
- 133.** Strachan L, Murison JG, Prestidge RL, Sleeman MA, Watson JD, Kumble KD. Cloning and Biological Activity of Epigen, a Novel Member of the Epidermal Growth Factor Superfamily. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276(21):18265-18271.
- 134.** Sutter AP, Zeitz M, Scherübl H. Recent Results in Understanding Molecular Pathways in the Medical Treatment of Esophageal and Gastric Cancer. *Onkologie* 2004;27(1):17-21.
- 135.** Suzuki A, Sekiya S, Gunshima E, Fujii S, Taniguchi H. EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture. *Laboratory Investigation* 2010;90(10):1425-1436.
- 136.** Suzuki S, Dobashi Y, Sakurai H, Nishikawa K, Hanawa M, Ooi A. Protein Overexpression and Gene Amplification of Epidermal Growth Factor Receptor in Nonsmall Cell Lung Carcinomas. *Cancer* 2005;103(6):1265-1273.
- 137.** Tahara E. Molecular Biology of Gastric Cancer. *World Journal of Surgery* 1995;19(4):484-490.
- 138.** Tahara E, Sumiyoshi H, Hata J, Yasui W, Taniyama K, Hayashi T, Nagae S, Sakamoto S. Human Epidermal Growth Factor In Gastric Carcinoma As A Biologic Marker Of High Malignancy. *Japanese Journal of Cancer Research* 1986;77:145-152.
- 139.** Tanaka M, Kitajima Y, Edakuni G, Sato S, Miyazaki K. Abnormal expression of E-cadherin and β -catenin may be a molecular marker of submucosal invasion and lymph node metastasis in early gastric cancer. *British Journal of Surgery* 2002;89:236-244.
- 140.** Tan C, Costello P, Sanghera J, Dominguez D, Baulida J, De Herreros AG, Dedhar S. Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses β -catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/-human colon carcinoma cells. *Oncogene* 2001;20(1):133-140.
- 141.** Taylor RC, Patel A, Panageas KS, Busam KJ, Brady MS. Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predict Sentinel Lymph Node Positivity in Patients With Cutaneous Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2007;25(7):869-875.

- 142.** Trédaniel J, Boeffetta P, Buiatti E, Saracci R, Hirsch A. Tobacco Smoking and Gastric Cancer: Review And Meta-Analysis. *International Journal of Cancer* 1997;72:565-573.
- 143.** UICC, Union for International Cancer Control December 2009. TNM Classification of Malignant Tumours- 7thed. Changes between the 6th and 7th editions. http://www.uicc.org/uicc_old/resources/tnm. Stand: 01.01.2012.
- 144.** Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, Downward J, Mayes ELV, Whittle N, Waterfield MD, Seeburg PH. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984;309(5967):418-425.
- 145.** Ullrich A, Schlessinger J. Signal Transduction by Receptors with Tyrosine Kinase Activity. *Cell* 1990;61(2):203-212.
- 146.** Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, Yoshida H. Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- α predicts worse prognosis in breast-cancer patients. *International Journal of Cancer* 2000;89(6):484-487.
- 147.** University of South Carolina. <http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/mhc.htm>. Stand: 01.01.2011.
- 148.** Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, Van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis A-P, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, Van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H. The β -Catenin/TCF-4 Complex Imposes a Crypt Progenitor Phenotype on Colorectal Cancer Cells. *Cell* 2002;111(2):241-250.
- 149.** Van Dekken H, Verhoef C, Wink J, Van Marion R, Vissers KJ, Hop WCJ, de Man RA, IJzermans JN, Van Eijck CHJ, Zondervan PE. Cell biological evaluation of liver cell carcinoma, dysplasia and adenoma by tissue micro-array analysis. *Acta Histochemica* 2005;107(3):161-171.
- 150.** Van der Geer P, Hunter T. Receptor Protein-Tyrosine Kinases And Their Signal Transduction Pathways. *Annual Reviews Cell and Developmental Biology* 1994;10:251-337.
- 151.** Wang SF, Fouquet S, Chapon M, Salmon H, Regnier F, Labroquère K, Badoual C, Damotte D, Validire P, Maubec E, Delongchamps NB, Cazes A, Gibault L, Garcette M, Dieu-Nosjean M-C, Zerbib M, Avril M-F, Prévost-Blondel A, Randriamampita C, Trautmann A, Bercovici N. Early T Cell Signalling is Reversibly Altered in PD-1+ T-Lymphocytes Infiltrating Human Tumors. *PLoS One* 2011;6(3).
- 152.** Warneke VS, Behrens H-M, Hartmann JT, Held H, Becker T, Schwarz NT, Röcken C. Cohort Study Based on the Seventh Edition of the TNM Classification for Gastric Cancer: Proposal of a New Staging System. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29(17):2364-2371.
- 153.** Warren JR. Unidentified Curved Bacilli On Gastric Epithelium In Active Chronic Gastritis. *The Lancet* 1983;321(8336):1273-1275.
- 154.** Werner M, Mueller J, Becker KF, Hoefler H. Pathomorphologie und Molekularbiologie des Magenkarzinoms. *Der Onkologe* 1998;4(4):317-323.
- 155.** Wijsman JH, Van Dierendonck JH, Keijzer R, Van De Velde CJH, Cornelisse CJ. Immunoreactivity Of Proliferating Cell Nuclear Antigen Compared With Bromodeoxyuridine Incorporation In Normal And Neoplastic Rat Tissue. *The Journal of Pathology* 1992;168:75-83.
- 156.** Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, Kameda T, Ochiai A, Ito H, Tahara E. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Human Gastric and Colonic Carcinomas. *Cancer Research* 1988;48(1):137-141.

- 157.** Yonemura Y, Ooyama S, Sugiyama K, Ninomiya I, Kamata T, Yamaguchi A, Matsumoto H, Miyazaki I. Growth Fractions in Gastric Carcinomas Determined With Monoclonal Antibody Ki-67. *Cancer* 1990;65:1130-1134.
- 158.** Zandi R, Larsen AB, Andersen P, Stockhausen M-T, Poulsen HS. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cellular Signalling* 2007;19(10):2013-2023.
- 159.** Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *The New England Journal of Medicine* 2003;348(3):203-213.
- 160.** Zheng Z, Pan J, Chu B, Wong Y-C, Cheung AL-M, Tsao S-W. Downregulation and Abnormal Expression of E-Cadherin and β -Catenin in Nasopharyngeal Carcinoma: Close Association With Advanced Disease Stage and Lymph Node Metastasis. *Human Pathology* 1999;30(4):458-466.
- 161.** Zorn AM. Wnt signalling: Antagonistic Dickkopfs. *Current Biology* 2001;11(15):R592-R595.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mitglieder der Familie humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptoren und beispielhaft einige zugehörige Liganden: AREG: Amphiregulin, EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor, HB-EGF: Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor, TGF- α : Transformierender Wachstumsfaktor- α , ErbB1-4, HER1-4, EGFR, Neu: Mitglieder der ErbB-Rezeptor-Familie/EGFR-Familie; modifiziert nach Harris et al., 2003.....	11
Abbildung 2: Mechanismen, die zur Aktivierung onkogener Signalwege führen: EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor, EGFR: Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, ErbB2: Mitglied der ErbB-Rezeptor-Familie/EGFR-Familie, TGF- α : Transformierender Wachstumsfaktor- α , EZM: Extrazelluläre Matrix; modifiziert nach Zandi et al., 2007.....	13
Abbildung 3: Aufbau des T-Zell-Rezeptors mit Darstellung der CD3-Rezeptoren: CD3: entsprechender Rezeptor, TCR: <i>T-Cell-Receptor</i> /T-Zell-Rezeptor, + bedeutet positive Ladung der Moleküle, - bedeutet negative Ladung der Moleküle; modifiziert nach http://pathmicro.med.sc/bowers/mhc.htm (Figure 10).....	18
Abbildung 4: Zusammenhang zwischen dem EGFR, der aktivierten Form pEGFR (Y1068), β -Catenin, MIB1 und CD3-positiven Lymphozyten: CD3: entsprechender Rezeptor; EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor, MIB1: Proliferationsmarker.....	19
Abbildung 5: Verteilung der TNM-Stadien innerhalb des Gesamtkollektives mit Angaben zur Laurénklassifikation: Dargestellt sind die absoluten Fallzahlen mit Prozentanteilen in Klammern (%); gesamt: n=230.....	31
Abbildung 6: Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Operation: Einteilung in 10-Jahres Intervalle (Ausnahme: Intervall >80 Jahren beinhaltet einen Zeitraum von fünf Jahren); gesamt: n=230.....	32
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der Primärtumorausdehnung: Durchschnittlich bessere Prognose der Patienten mit geringerer Primärtumorausdehnung; gesamt: n=230.....	34
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der Lymphknotenmetastasierung: Durchschnittlich bessere Prognose der Patienten mit weniger Lymphknotenmetastasen; gesamt: n=229.....	35
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der Fernmetastasierung: Durchschnittlich bessere Prognose der Patienten ohne Fernmetastasen; gesamt: n=230.....	35
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit des TNM-Stadiums: Durchschnittlich bessere Prognose der Patienten mit niedrigerem TNM-Stadium; gesamt: n=230.....	36
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit des Resektionsstatus: Durchschnittlich bessere Prognose der Patienten mit vollständig resezierten Tumoren; gesamt: n=209.....	36
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit des <i>Gradings</i> : Durchschnittlich bessere Prognose der Patienten mit höher differenzierten Tumoren; gesamt: n=226.....	37
Abbildung 13: EGFR-Färbung: <i>Score</i> 0.....	39
Abbildung 14: EGFR-Färbung: <i>Score</i> 3.....	39
Abbildung 15: pEGFR-Färbung: <i>Score</i> 0.....	39
Abbildung 16: pEGFR-Färbung: <i>Score</i> 1.....	39
Abbildung 17: β -Catenin-Färbung: <i>Score</i> 0.....	39
Abbildung 18: β -Catenin-Färbung: <i>Score</i> 3.....	39
Abbildung 19: MIB1-Färbung: sehr niedriger PI.....	40
Abbildung 20: MIB1-Färbung: sehr hoher PI.....	40
Abbildung 21: CD3-Färbung: <i>Score</i> 0.....	40
Abbildung 22: CD3-Färbung: <i>Score</i> 3.....	40
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom EGFR- <i>Score</i> : Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=195.....	48

Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom EGFR-Score innerhalb der Patientengruppe mit mäßig differenzierten Magenkarzinomen (G2): Signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=36.....	49
Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom pEGFR-Score: Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=150.....	49
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom β -Catenin-Score: Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=199.....	50
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom Proliferationsindex: Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; <i>Cut-Point</i> bei 0,4743 (entspricht dem medianen Messwert); gesamt: n=182.....	51
Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom CD3-Score: Signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=167.....	52
Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der Messwerte der CD3-Definiens-Auswertung: Signifikante Trennung in Prognosegruppen; <i>Cut-Point</i> bei 4,0; gesamt: n=167.....	53
Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der Messwerte der CD3-Definiens-Auswertung: Signifikante Trennung in Prognosegruppen; <i>Cut-Points</i> bei 0,5 und 4,0; gesamt: n=167.....	53
Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten EGFR- und pEGFR-Scores: Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=144.....	55
Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten EGFR- und pEGFR-Scores innerhalb des Kollektives der intestinalen Karzinome: Signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=54.....	55
Abbildung 33: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten EGFR-, pEGFR- und β -Catenin-Scores: Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; gesamt: n=130.....	57
Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten EGFR-, pEGFR- und β -Catenin-Scores: Keine signifikante Trennung in Prognosegruppen; zwei ausgewählte <i>Score</i> -Gruppen; gesamt: n=75.....	57
Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten EGFR-, pEGFR- und β -Catenin-Scores: Signifikante Trennung in Prognosegruppen; zwei ausgewählte <i>Score</i> -Gruppen; gesamt: n=56.....	58
Abbildung 36: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten EGFR-, pEGFR- und β -Catenin-Scores: Signifikante Trennung in Prognosegruppen; zwei ausgewählte <i>Score</i> -Gruppen; gesamt: n=49.....	58
Abbildung 37: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der kombinierten Auswertung der Cox-Analyse unter Einschluss der Primärtumorausbreitung pT, der Fernmetastasierung M und des Proliferationsindex (MIB1): Signifikante Trennung in Prognosegruppen; <i>Cut-Points</i> bei 0,855, bei 1,33 und bei 2,47; gesamt: n=182.....	61

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die TNM-Klassifikation 6. und 7. Auflage im Vergleich (UICC, 2009).....	23
Tabelle 2: Verwendete Antikörper.....	26
Tabelle 3: Einteilung der EGFR-Scores.....	27
Tabelle 4: Einteilung der pEGFR-(Y1068)-Scores.....	27
Tabelle 5: Einteilung der β -Catenin-Scores.....	27
Tabelle 6: Einteilung der Scores der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten.....	28
Tabelle 7: Patientenkollektiv.....	33
Tabelle 8: Verteilung der lichtmikroskopisch ermittelten Färbe-Scores.....	41
Tabelle 9: Messwerte der pEGFR-, MIB1- und CD3-Färbungen: Definiens-Computerauswertung.....	42
Tabelle 10: Kreuztabelle.....	44
Tabelle 11: Korrelationen der Expressionslevel mit klinisch-pathologischen Merkmalen	45
Tabelle 12: Korrelation der Expressionslevel untereinander.....	45
Tabelle 13: Korrelationen der Messwerte der pEGFR-(Y1068)-Computerauswertungen untereinander.....	46
Tabelle 14: Korrelation der CD3-Mikroskopauswertung mit der zugehörigen CD3-Definiens-Computerauswertung....	47
Tabelle 15: Kombinierte Auswertung der EGFR- und pEGFR-Färbungen	54
Tabelle 16: Kombinierte Auswertung der EGFR-, pEGFR- und β -Catenin-Färbungen.....	56
Tabelle 17: Kombinierte Auswertung der EGFR-, pEGFR-, β -Catenin- und CD3-Färbungen	59
Tabelle 18: Univariate Cox-Regressionen.....	60

9 Anhang

9.1 Färbeprotokolle der untersuchten Antikörperfärbungen

Protokoll-Nummer 998-Ventana-Färbe-Maschine/Discovery XT Färbemodul:

1. Programmschritte starten; 2. EZ Prep auswählen; 3. Aufheizen des Objektträgers bis 75 °C und für 8 Minuten inkubieren; 4. Einstellen des EZ Prep Volumens (DXT); 5. Einstellen des Entparaffinierungsvolumens (DXT); 6. Abgabe von Coverslip (DXT); 7. Inkubieren für 8 Minuten; 8. Objektträger waschen; 9. Einstellen des Entparaffinierungsvolumens (DXT); 10. Abgabe von Coverslip (DXT); 11. Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C und für 4 Minuten inkubieren; 12. SSC Wash auswählen; 13./14. EZ Prep auswählen; 15. Objektträger waschen; 16. Jet Drain (DXT); 17. Abgabe lang: Cell Conditioner Nr.1 (DXT); 18. Abgabe von Cell Cond. und Coverslip (DXT); 19. Abgabe lang: Cell Conditioner Nr.1 (DXT); 20. Abgabe von Cell Cond. und Coverslip (DXT); 21. Aufheizen des Objektträgers bis 95 °C und für 8 Minuten inkubieren; 22. Abgabe von Coverslip (DXT); 23. Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr. 1 (DXT); 24. Aufheizen des Objektträgers bis 100 °C und für 4 Minuten inkubieren; 25. Abgabe von Coverslip (DXT); 26. Abgabe von Cell Conditioner Nr. 1 (DXT); 27. Inkubieren für 4 Minuten; 28. Abgabe von Coverslip (DXT); 29. Abgabe von Cell Conditioner Nr. 1 (DXT); 30. Inkubieren für 4 Minuten; 31. Abgabe von Coverslip (DXT); 32. Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr. 1 (DXT); 33. Inkubieren für 4 Minuten; 34. Abgabe von Coverslip (DXT); 35. Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr. 1 (DXT); 36. Inkubieren für 4 Minuten; 37. Abgabe von Coverslip (DXT); 38. Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr. 1 (DXT); 39. Inkubieren für 4 Minuten; 40. Abgabe von Coverslip (DXT); 41. Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr. 1 (DXT); 42. Inkubieren für 4 Minuten; 43. Abgabe von Coverslip (DXT); 44. Objektträger-Heizung ausschalten; 45. Inkubieren für 8 Minuten; 46. Spülen mit Reaktionspuffer; 47. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; 48. Abgabe des Coverslip (DXT); 49. EZ Prep auswählen; 50. SSC Wash auswählen; 51. Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C und für 4 Minuten inkubieren; 52. Spülen mit Reaktionspuffer; 53. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; 54. Abgabe von Coverslip (DXT); 55. 1 Tropfen Inhibitor D auftragen und für 4 Minuten inkubieren; 56. Objektträger-Heizung ausschalten; 57. Spülen mit Reaktionspuffer; 58. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; 59. Abgabe von Coverslip (DXT); 60. Mischer aus; 61. Auf Knopf warten (Warteposition); 62. Mischer an; 63. Spülen mit Reaktionspuffer; 64. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; 65. Abgabe von Coverslip (DXT); 66. Mischer aus; 67. Manueller Auftrag (Titration); 68. Mischer an; 69. Inkubieren für 1 Stunde (Primärantikörper); 70. Spülen mit Reaktionspuffer; 71. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; 72. Abgabe von Coverslip (DXT); 73. Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C und für 4 Minuten inkubieren; 74. Spülen mit Reaktionspuffer; 75. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; 76. Abgabe von Coverslip (DXT); 77. 1 Tropfen (Detektion 2) (Nachweis Nr. 2) und für 32 Minuten inkubieren; 78. Spülen mit Reaktionspuffer; 79. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; 80. Abgabe von Coverslip (DXT); 81. 1 Tropfen Blocker D auftragen und für 4 Minuten inkubieren; 82. 1 Tropfen SA-HRP D auftragen und für 16 Minuten inkubieren; 83. Spülen mit Reaktionspuffer; 84. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; 85. Abgabe von Coverslip (DXT); 86. Spülen mit Reaktionspuffer; 87. Feineinstellung des

Reaktionspuffervolumens; **88.** Abgabe von Coverslip (DXT); **89.** Spülen mit Reaktionspuffer; **90.** Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; **91.** Abgabe von Coverslip (DXT); **92.** Spülen mit Reaktionspuffer; **93.** Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; **94.** 1 Tropfen DAB D und 1 Tropfen DAB H₂O₂ D auftragen, LCS auftragen und für 8 Minuten inkubieren; **95.** Spülen mit Reaktionspuffer; **96.** Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; **97.** 1 Tropfen Copper D auftragen, Coverslip auftragen und für 4 Minuten inkubieren; **98.** Spülen mit Reaktionspuffer; **99.** Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; **100.** Abgabe von Coverslip (DXT); **101.** EZ Prep auswählen; **102.** Spülen mit Reaktionspuffer; **103.** Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; **104.** Abgabe von Coverslip (DXT); **105.** Inkubieren für 4 Minuten; **106.** Objektträger-Heizung ausschalten; **107.** Mischer aus; **108.** Auf Knopf warten (Halteschritt Gegenfärbung/Säuberung); **109.** Mischer an; **110.** EZ Prep auswählen; **111.** Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C und für 4 Minuten inkubieren; **112.** Spülen mit Reaktionspuffer; **113.** Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; **114.** 1 Tropfen von Hämatoxylin (Gegenfärbung) auftragen; LCS auftragen und für 4 Minuten inkubieren; **115.** Spülen mit Reaktionspuffer; **116.** Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; **117.** Abgabe von Coverslip (DXT); **118.** Spülen mit Reaktionspuffer; **119.** Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; **120.** 1 Tropfen von Bluing Reagent (nach Gegenfärbung) auftragen; LCS auftragen und für 4 Minuten inkubieren; **121.** Spülen mit Reaktionspuffer; **122.** Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens; **123.** Abgabe von Coverslip (DXT); **124./125.** Spülen mit Reaktionspuffer (im Anschluss folgt die Gegenfärbung: Reaktionspuffer mit Pril unter fließendem Wasser abwaschen).

Für die pEGFR-Färbungen wurde in analoger Weise Protokoll-Nummer 999 verwendet.

10 Danksagungen

Besonders großer Dank richtet sich an Frau Prof. Dr. Birgit Luber und Herrn Prof. Dr. Axel Walch für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung.

Des weiteren danke ich Frau Dr. Sandra Rauser für die Kommunikation mit der II. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar und insbesondere für die Betreuung während der schriftlichen Ausführung meiner Dissertation.

Für die Erstellung der Regelsätze zur bildanalytischen Auswertung und stets freundliche Beantwortung *Software*-spezifischer Fragen danke ich Frau Dr. Annette Feuchtinger sowie für den technischen Support Herrn Dipl.-Ing. Andreas Voss.

Einen weiteren Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Gisela Keller und Herrn PD Dr. Rupert Langer für die Überlassung der Gewebeproben und anonymisierten Pathologieberichte aussprechen.

Ein Dank geht auch an die II. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar für die Überlassung der klinischen Patientendaten.

Ebenso zu Dank verpflichtet bin ich Frau Ulrike Buchholz und Frau Claudia-Mareike Pflüger für das immer freundliche Entgegenkommen und die Unterstützung bei der Erstellung der TMAs.

Ein herzliches Dankeschön richtet sich an Frau Dr. Uta Jütting für die stets kompetente und unkomplizierte Beratung bei Fragen zur statistischen Auswertung.

Abschließend danke ich meiner Familie für die wunderbare Unterstützung während meines gesamten Studiums.