



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

(Direktor: Prof. Dr. Wilko Weichert)

Klinische Relevanz der molekularen Klassifikation der *Asian Cancer Research Group (ACRG)* im Magenkarzinom

Bianca Farina Grosser

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizinischen Wissenschaft genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Angela Krackhardt

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Gisela Keller
2. apl. Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen
3. Priv.-Doz. Dr. Michael Quante

Die Dissertation wurde am 27.02.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.08.2020 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1. Zusammenfassung und Summary	1
1.1. Zusammenfassung	1
1.2. Summary	3
2. Einleitung	5
2.1. Epidemiologie des Magenkarzinoms	5
2.2. Risikofaktoren des Magenkarzinoms	5
2.3. Familiäres Risiko und hereditäre Syndrome	6
2.4. Diagnostik	6
2.5. Klassifikationen des Magenkarzinoms	7
2.5.1. UICC-TNM-Klassifikation, UICC-Stadien und Siewert-Klassifikation	7
2.5.2. WHO-Klassifikation	7
2.5.3. Laurén-Klassifikation	8
2.6. Therapie des Magenkarzinoms	8
2.6.1. Chirurgische Therapie	8
2.6.2. Chemotherapie	9
2.7. Molekulare Klassifikationen	10
2.7.1. TCGA-Klassifikation (Bass et al., 2014)	10
2.7.2. ACRG-Klassifikation (Cristescu et al., 2015)	10
2.8. Subgruppen der molekularen Klassifikationen	12
2.8.1. Epstein-Barr-Virus positive (EBV ⁺)-Tumoren	12
2.8.2. Mikrosatelliteninstabilität	12
2.8.3. Epitheliale-mesenchymale Transition	13
2.8.3.1. E-Cadherin	14
2.8.3.2. Vimentin	14
2.8.3.3. ZEB1	15
2.8.4. Tumorsuppressorprotein p53 (TP53) und assoziierte Gene	16
2.8.4.1. <i>CDKN1A</i>	16
2.8.4.2. <i>MDM2</i>	17
2.9. Zielsetzung	18
3. Material und Methoden	20
3.1. Patienten und Tumormaterial	20
3.1.1. Patientencharakteristika	20
3.1.2. Neoadjuvante Chemotherapie und chirurgische Therapie	20
3.1.3. Beurteilung des Therapieansprechens	21
3.1.4. Definition des Gesamt- und rezidivfreien Überlebens	21
3.2. Zelllinien	22
3.3. Material	22
3.3.1. Geräte	22

3.3.2.	Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	22
3.3.3.	Puffer und Lösungen	23
3.3.4.	Kommerzielle Kits	24
3.3.5.	Genexpressionsassays	24
3.3.6.	Software	25
3.4.	Methoden	25
3.4.1.	RNA-Isolation	25
3.4.2.	DNA-Isolation	25
3.4.3.	Verdau genomischer DNA in prätherapeutischen Biopsien	25
3.4.4.	Reverse Transkription	26
3.4.5.	Quantitative real-time PCR (qPCR)	27
3.4.6.	Bestimmung der Mikrosatelliteninstabilität (MSI)	29
3.4.7.	Bestimmung des EBV-Status	31
3.4.8.	Herstellung der Tissue Microarrays (TMAs)	32
3.4.9.	Immunhistochemie	32
3.4.10.	Statistische Analysen	33
4.	Ergebnisse	34
4.1.	Zusammensetzung des Patientenkollektivs für die mRNA basierten Analysen	34
4.2.	Expressionsanalysen der EMT- und <i>TP53</i> -assoziierten Gene	36
4.2.1.	Assayetablierung	36
4.2.1.1.	Assayauswahl	36
4.2.1.2.	Assaytest auf Spezifität für cDNA	36
4.2.1.3.	Amplifikation von cDNA aus FFPE-Gewebe	37
4.2.1.4.	Effizienzermittlung	37
4.2.2.	Verteilung der Genexpressionsdaten	38
4.2.3.	Korrelation der Genexpression	38
4.2.4.	Assoziation mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika und dem Therapieansprechen	39
4.2.4.1.	EMT-assoziierte Gene (<i>CDH1</i> , <i>VIM</i> , <i>ZEB1</i>)	39
4.2.4.2.	<i>TP53</i> -assoziierte Gene (<i>CDKN1A</i> , <i>MDM2</i>)	43
4.2.5.	Assoziation mit dem Gesamtüberleben der Patienten	44
4.2.5.1.	EMT-assoziierte Gene (<i>CDH1</i> , <i>VIM</i> , <i>ZEB1</i>)	45
4.2.5.2.	<i>TP53</i> -assoziierte Gene (<i>CDKN1A</i> , <i>MDM2</i>)	46
4.3.	EMT-Klassifikation	47
4.3.1.	<i>CDH1/VIM</i> - und <i>CDH1/ZEB1</i> -Quotient	47
4.3.2.	Gewichteter Mittelwert der EMT-assoziierten Gene (EMT-Score)	50
4.3.3.	75%-Quantil der <i>CDH1</i> - und <i>ZEB1</i> -Expression	51
4.3.3.1.	Assoziation mit dem Gesamtüberleben der Patienten	53
4.3.3.2.	Assoziation mit klinischen Charakteristika und dem Chemotherapieansprechen	54
4.3.4.	Genexpressionsveränderung der Biopsie zum korrespondierenden Resektat	55
4.4.	Genexpressionsanalysen auf Proteinebene mittels Immunhistochemie	57
4.4.1.	Assoziation der immunhistochemischen Analysen mit der Genexpression auf mRNA-Ebene	57
4.4.2.	Vergleich der p53- und E-Cadherin Proteinexpression mit NGS-basierten Mutations-	

analysen.....	57
4.4.3. Zusammensetzung des Patientenkollektivs für die Genexpressionsanalysen auf Proteinebene	59
4.4.4. Häufigkeiten bzw. Verteilung der Proteinexpressionen.....	61
4.4.4.1. p53	61
4.4.4.2. E-Cadherin	62
4.4.4.3. Vimentin	62
4.4.4.4. ZEB1	63
4.4.5. Korrelation der Proteinexpressionen.....	63
4.4.6. Assoziation der Proteinexpressionsanalysen mit Patientencharakteristika	64
4.4.6.1. p53	64
4.4.6.2. E-Cadherin	65
4.4.7. Assoziation der p53-Expression mit dem Chemotherapieansprechen	66
4.4.8. Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben	66
4.4.8.1. Überlebensanalysen in Resektaten und prätherapeutischen Biopsien.....	66
4.4.8.2. Subgruppenanalysen	68
4.4.9. Assoziation der EMT-assoziierten Proteine mit dem Gesamtüberleben.....	71
4.4.9.1. E-Cadherin	71
4.4.9.2. Vimentin	72
4.4.9.3. ZEB1	73
4.5. ACRG-Klassifikation	74
4.5.1. Einteilung der EMT-Typen auf mRNA-Ebene	75
4.5.1.1. Verteilung und Häufigkeiten der Subtypen.....	75
4.5.1.2. Assoziation der ACRG-Klassifikation mit dem Überleben.....	76
4.5.1.3. Assoziation der ACRG-Klassifikation mit Patientencharakteristika und dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie	78
4.5.2. Einteilung der EMT-Subgruppe nach der E-Cadherin Proteinexpression.....	80
4.5.2.1. Verteilung und Häufigkeit der Subtypen.....	80
4.5.2.2. Assoziation der ACRG-Klassifikation mit dem Überleben.....	81
4.6. Modifizierte ACRG-Klassifikationen.....	82
4.6.1. Verteilung und Häufigkeiten der Subgruppen der modifizierten ACRG-Klassifikationen	82
4.6.2. Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikationen mit dem Gesamtüberleben.....	83
4.6.3. Subgruppenanalysen nach Lokalisation und cT-Stadium	85
4.6.5. Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit Patientencharakteristika und dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie	85
4.7. p53 und MSI	87
4.7.1. p53 und Assoziation mit dem MSI- und EBV ⁺ -Status	87
4.7.2. Überleben der Patienten in Abhängigkeit des MSI- und p53-Status.....	89
5. Diskussion.....	91
5.1. Prognostische und klinische Relevanz der ACRG-Klassifikation	91
5.1.1. EMT-Subgruppe und deren klinische Relevanz.....	95
5.1.1.1. E-Cadherin	96
5.1.1.2. Vimentin und ZEB1	97
5.1.2. p53-Status.....	98
5.1.2.1. MSI und p53.....	100
5.1.2.2. <i>CDKN1A</i> und <i>MDM2</i>	101

5.1.3. Limitationen	102
5.2. Fazit und Ausblick.....	103
Literaturverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Anhang	V
Publikationen	VI
Danksagungen.....	VII

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
5-JÜ	5-Jahres-Überleben
A	
A.	Arterie
ACRG	<i>Asian Cancer Research Group</i>
AEG	Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
Amp	Amplifikation
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ARID1A	<i>AT-Rich Interaction Domain 1A</i>
B	
B2M	<i>Beta-2-Mikroglobulin</i>
BCOR	<i>BCL6 Corepressor</i>
bp	Basenpaar
BRCA1	<i>Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein</i>
C	
CA	<i>Complete absence</i> (kompletter Verlust der TP53-Expression)
CagA	<i>Cytotoxin-associated gene A</i>
CagPAI	<i>cag pathogenicity island</i>
Cap	Capecitabin
CBD	<i>p300-P/CAF binding domain</i>
CDH1	<i>E-Cadherin</i>
CDK4, 6	<i>Cyclin-Dependent Kinase 4, 6</i>
CDKN1A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDX2	<i>Caudal Type Homeobox 2</i>
Chr	Chromosom
CID	<i>CtBP interaction domain</i>
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CIN	Chromosomale Instabilität
Cis	Cisplatin
CNRQ	<i>Calibrated Normalized Relative Quantity</i>
COX2	<i>Cytochrome C Oxidase Subunit 2</i>
Cq	<i>quantitative Cycle</i>
Cripto-1	<i>Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1</i>
cT	klinisches T-Stadium
CTx	neoadjuvante Chemotherapie
D	
DMSO	Dimethylsulfoxid
DFS	<i>Disease free survival</i>
DANN	<i>Desoxyribonucleinacid</i>
dNTPs	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
Doc	Docetaxel

E

e	epithelial
E2F	<i>Retinoblastoma-associated Protein</i>
EBV(+)	Epstein-Barr-Virus ^(positiv)
ECF	Epirubicin, Cisplatin, 5-FU
ECX	Epirubicin, Cisplatin, Capecitabin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EGFR</i>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Epitheliale-mesenchymale-Transition
Epi	Epirubicin
<i>ERBB2</i>	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
EtOH	Ethanol

F

5-FU	5-Fluoruracil
FAM	6-Carboxyfluorescein
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FFPE-Gewebe	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLOT	5-FU, Leucovorin, Oxaliplatin, Docetaxel
FS	First-Strand

G

G	Grading
G1-Phase	Gap 1-Phase Zellzyklus
G2-Phase	Gap 2-Phase Zellzyklus
gDNA	genomische DNA

H

h	Stunde
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
<i>HER2</i>	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HEX	Hexachloro-fluorescein
<i>HIF</i>	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HNPCC	Hereditäre Non-Polyposis Kolorektales Karzinom
HR	Hazard Ratio
<i>HSP90</i>	<i>Heat Shock Protein 90</i>

I

i	intermediär
IPO8	<i>Importin 8</i>

K

KI	Konfidenzintervall
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>

M

m	mesenchymal
MANANs	<i>Mutation-Associated-Neoantigens</i>
<i>MDM2</i>	<i>Mouse Double Minute 2, Human Homolog Of, P53-Binding Protein</i>
<i>MET</i>	<i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i>

MET	mesenchymale-epitheliale-Transition
MetOH	Methanol
mi-RNA	microRNA
MLH1	MutL Homolog 1
mM	Millimolar
MMR	Mismatch Repair
mRNA	<i>messenger Ribonucleinacid</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-L	Mikrosatellitenstabilität-low
MSI-H	Mikrosatellitenstabilität-high
M-Status	Fernmetastasen-Status
MYC	<i>V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Onco-gene Homolog</i>
N	
n	Fallzahl
NFkb	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-Status	Lymphknotenstatus
O	
OE	<i>Overexpression</i> (Überexpression der TP53 Immunhistochemie)
opt.	optimal
OS	<i>Overall Survival</i>
Ox	Oxaliplatin
P	
Pac	Paclitaxel
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>PDL1, 2</i>	<i>Programmed Cell Death Ligand 1, 2</i>
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
<i>PPIA</i>	<i>Peptidylprolyl Isomerase A</i>
pT	pathologisches T-Stadium
Q	
q(rt)-PCR	<i>quantitative (real-time) PCR</i>
R	
Ref.	Referenz
<i>RHOA</i>	<i>Ras Homolog Family Member A</i>
ROX	Carboxyrhodamine
R-Status	Resektionsstatus
RT	Raumtemperatur
S	
sec	Sekunde
<i>SHR</i>	<i>Stratogene Human Reference Total RNA</i>
SID	<i>Smad interaction domain</i>
<i>Slug</i>	<i>Snail Family Transcriptional Repressor 2</i>
<i>SMAD4</i>	SMAD Family Member 4
<i>Snail</i>	<i>Snail Family Transcriptional Repressor 1</i>
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus

T

TBE-Puffer
TCF-8
TCGA
TGF- β
TMA
TP53
TP53⁺
TP53⁻

TRG
TRIS
Twist

U

UICC
ÜN
uT

V

V
VagA
VEGFR-2

VIM

W

WHO
WNT
WT

X

XP

Y

ypT

Z

ZEB1, -2

Tris-Borat-EDTA-Puffer
Transcription Factor 8, ZEB1
The Cancer Genome Atlas
Transforming Growth Factor Beta 1
Tissue Microarray
Tumorsuppressor Protein 53
TP53-Wildtyp in der Immunhistochemie
TP53-Funktionsverlust in der Immunhistochemie
Tumorregressionsgrad
Trishydroxymethylaminomethan
Twist Family BHLH Transcription Factor 1

Union International Contre le Cancer
über Nacht
sonographisches T-Stadium

Volt
Vacuolating cytoxin
Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
Vimentin

World-Health-Organization
Wnt Family Member 1
Wildtyp-Expressionsmuster von TP53

Capecitabine, Cisplatin

pathologisches T-Stadium nach neoadjuvanter Chemotherapie

Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1, 2

1. Zusammenfassung und Summary

1.1. Zusammenfassung

Das Magenkarzinom stellt eine heterogene Tumorentität mit schlechter Prognose dar. Durch die Entwicklung der Hochdurchsatztechnologien in den letzten Jahren kam es zur Identifikation verschiedener molekularer Klassifikationen, die Subgruppen mit bestimmten klinisch-pathologischen, prognostischen und therapierelevanten Charakteristika definieren. Eine dieser Klassifikationen wurde von der *Asian Cancer Research Group* (ACRG) veröffentlicht. Sie beinhaltet folgende vier molekulare Subtypen: Magenkarzinome mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI), mit epithelialer-mesenchymaler-Transition (EMT) und Tumoren mit oder ohne *TP53*-Funktionsverlust. Die klinische, prädiktive und prognostische Relevanz der ACRG-Klassifikation ist jedoch vor allem im Kontext neoadjuvanter Chemotherapie weitgehend ungeklärt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war demnach die Bestimmung der klinischen Relevanz der ACRG-Klassifikation in einem westlichen Kollektiv an Magenkarzinomen ohne und nach neoadjuvanter Chemotherapie.

Die molekularen Subgruppen der ACRG-Klassifikation wurden zum einen auf mRNA-Ebene, in Anlehnung an die Arbeit von Cristescu et al. (2015), und zum anderen auf Proteinebene mit dem Ziel einer routinemäßigen Anwendbarkeit analysiert. Die Patientenkollektive beinhalteten insgesamt 758 Magenkarzinome und Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs (AEG II/III) (291 Patienten ohne Chemotherapie, 327 Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie und 140 prätherapeutische Biopsien vor neoadjuvanter Chemotherapie).

Der MSI-Status wurde mittels multiplex PCR bestimmt und die p53-Aktivität immunhistochemisch, unter Anwendung eines dreistufigen Klassifikationsschemas, ermittelt. EBV⁺-Tumoren wurden mittels PCR identifiziert und positive Fälle durch in-situ Hybridisierung bestätigt.

Die EMT-Subgruppe wurde zunächst mRNA-basiert mittels qPCR der Gene *CDH1*, *VIM* und *ZEB1* bestimmt. Auf Proteinebene wurde eine immunhistochemisch aberrante E-Cadherin Expression als Surrogat für Tumoren mit EMT verwendet. Die *CDKN1A* und *MDM2* Expression wurde mittels qPCR analysiert.

Zunächst wurden die erhobenen Gen- und Proteinexpressionsdaten separat betrachtet. Hier war eine hohe E-Cadherin-Expression, sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene ein positiver unabhängiger prognostischer Faktor für Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie. In Patienten ohne CTx zeigte sich auf Proteinebene ein umgekehrter prognostischer Zusammenhang. Eine hohe *MDM2*-Expression erwies sich als negativer prognostischer Marker für Patienten ohne Chemotherapie.

Die Evaluation der p53-Proteinexpression wies eine Konkordanz von 90% mit NGS-basierten Mutationsanalysen auf, kann damit als valide Methode zur Bestimmung des *TP53*-Status betrachtet werden und wurde für die Identifikation der ACRG-Subgruppen verwendet.

Eine aberrante p53-Proteinexpression stellte für Patienten ohne Chemotherapie einen unabhängigen negativen prognostischen Faktor vor allem in distal lokalisierten Tumoren dar. Die Abhängigkeit der prognostischen Relevanz des p53 von der Tumorlokalisierung konnte ebenso im Kollektiv der prätherapeutischen Biopsien vor Chemotherapie beobachtet werden. Außerdem zeigte sich eine Assoziation des p53-Status mit den molekularen Subgruppen EBV⁺- und MSI-L/MSI-H und klinischen Charakteristika. Fälle mit p53-Wildtypexpression gingen mit dem EBV⁺- und MSI-H-Subtyp einher. Veränderte p53-Expression häufte sich in MSI-L-Tumoren. p53 wies keine Assoziation mit dem Therapieansprechen auf.

Zur Identifikation der Tumoren mit EMT wurden drei Ansätze zur Kombination der EMT-assoziierten Gene evaluiert und das 75%-Quantil der *CDH1/ZEB1*-Expression für die Klassifikation ausgewählt. Dieses zeigte prognostische Relevanz mit dem längsten Überleben der Patienten mit epithelial differenzierten Tumoren. Eine mesenchymale Differenzierung war mit geringem/keinem Therapieansprechen assoziiert.

Im Anschluss wurden die molekularen Subgruppen der ACRG-Klassifikation unter Hinzunahme des EBV⁺- und MSI-L Subtyps bestimmt. Diese gingen mit bestimmten klinisch-pathologischen Charakteristika einher, wobei besonders die Assoziation von Tumoren mit aberranter p53-Expression mit proximaler Lokalisation und von nicht intestinalen Tumoren mit der EMT-Gruppe hervorzuheben ist. In Überlebensanalysen erwiesen sich die molekularen Subgruppen auf mRNA- und Proteinebene, sowohl für Patienten ohne, als auch für jene nach neoadjuvanter Chemotherapie, als prognostisch relevant. Obwohl Patienten mit EMT- und MSI-Tumoren nach neoadjuvanter Chemotherapie vorwiegend kein Therapieansprechen aufwiesen, zeigten MSI-Tumoren die beste und EMT-Tumoren die schlechteste Prognose. Zudem hatten Patienten mit EBV⁺- und p53-Wildtyp-Tumoren eine gute, jene mit Tumoren mit aberranter p53-Expression eine schlechte Prognose. Die negative prognostische Relevanz der Tumoren mit EMT konnte auf Proteinebene jedoch nur für Patienten nach Chemotherapie nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in der hier vorliegenden Arbeit die Identifikation der klinischen und prognostischen Relevanz der ACRG-Klassifikation und modifizierter Varianten auf mRNA- und Proteinebene im Kontext perioperativer Chemotherapie in einem westlichen Kollektiv an Magenkarzinomen erfolgte. Dies stellt neue Möglichkeiten für eine bessere Prognoseabschätzung und individualisierte Therapie der molekularen Subtypen dar, die mit bestimmten genetischen Veränderungen und klinischen Charakteristika einhergehen.

1.2. Summary

Gastric carcinoma is a heterogeneous tumor entity with poor prognosis. The development of high-throughput technologies in recent years has led to the identification of different molecular classifications that define subgroups with specific clinicopathological, prognostic and therapy-relevant characteristics. One of these classifications was published by the *Asian Cancer Research Group* (ACRG). It contains the following four molecular subtypes: gastric carcinomas with microsatellite instability (MSI), with epithelial-mesenchymal transition (EMT) and tumors with or without *TP53* loss of function. However, the clinical, predictive and prognostic relevance of the ACRG classification is widely unknown, especially in the context of neoadjuvant chemotherapy. Therefore, the aim of this study was to determine the clinical relevance of the ACRG classification in a western cohort of gastric adenocarcinomas without and after neoadjuvant chemotherapy.

The molecular subgroups of the ACRG classification were analyzed on the one hand at mRNA level, following the work of Cristescu et al. (2015), and on the other hand at protein level with the aim of routine application. The patient cohorts included a total of 758 gastric carcinomas and adenocarcinomas of the gastroesophageal junction (AEG II/III) (291 patients without chemotherapy, 327 patients after neoadjuvant chemotherapy and 140 pretherapeutic biopsies before neoadjuvant chemotherapy).

MSI status was determined by multiplex PCR and p53 activity was determined immunohistochemically using a three-tiered classification scheme. EBV⁺ tumors were identified by PCR and positive cases were confirmed by in situ hybridization.

The EMT subgroup was initially determined mRNA-based by qPCR of the genes *CDH1*, *VIM* and *ZEB1*. At protein level, an immunohistochemically aberrant E-cadherin expression was used as a surrogate for tumors with EMT. The *CDKN1A* and *MDM2* expression was analyzed by qPCR.

First, gene and protein expression data were analyzed separately. High E-cadherin expression, both at mRNA and protein level, was a positive independent prognostic factor for patients after neoadjuvant chemotherapy. In patients without CTx an inverse prognostic relationship was found at protein level. A high expression of *MDM2* was found to be a negative prognostic marker for patients without chemotherapy.

The evaluation of p53 protein expression showed a concordance of 90% with NGS-based mutation analyses, can thus be considered a valid method for the determination of *TP53* status and was used for the determination of the ACRG subgroups.

Aberrant p53 protein expression was an independent negative prognostic factor for patients without chemotherapy, especially in distally localized tumors. The dependence of prognostic

relevance of p53 on the tumor localization was also observed in pretherapeutic biopsies before chemotherapy. Furthermore, an association of the p53 status with the molecular subgroups EBV⁻ and MSI-L/MSI-H and clinical characteristics was shown. Cases with p53 wild-type expression were associated with the EBV⁺ and MSI-H subtypes. Altered p53 expression became more frequent in MSI-L tumors. p53 was not associated with chemotherapy response.

To identify tumors with EMT, three approaches to combine EMT-associated genes were evaluated and the 75% quantile of *CDH1/ZEB1* expression was selected for classification. This showed prognostic relevance with the longest survival of patients with epithelially differentiated tumors. Mesenchymal differentiation was associated with low/no chemotherapy response.

Subsequently, the molecular subgroups of the ACRG classification were determined, including EBV⁺ and MSI-L subtypes. These were associated with certain clinicopathological characteristics, with particular emphasis on the association of tumors with aberrant p53 expression with proximal localization and of nonintestinal tumors with the EMT group. In survival analyses, the molecular subgroups at mRNA and protein level proved to be prognostically relevant for patients without and after neoadjuvant chemotherapy. Although patients with EMT and MSI tumors showed predominantly no response to neoadjuvant chemotherapy, MSI tumors had the best and EMT tumors the worst prognosis. In addition, patients with EBV⁺ and p53 wild-type tumors had a good prognosis, those with tumors with aberrant p53 expression had a poor prognosis. However, the negative prognostic relevance of tumors with EMT could only be demonstrated at protein level for patients after chemotherapy.

In summary, the present study identified the clinical and prognostic relevance of the ACRG classification and modified variants at mRNA and protein level in the context of perioperative chemotherapy in a western cohort of gastric adenocarcinomas. This presents new possibilities for a better prognostic assessment and individualized therapy of the molecular subtypes associated with certain genetic alterations and clinicopathological characteristics.

2. Einleitung

2.1. Epidemiologie des Magenkarzinoms

Das Magenkarzinom stellt mit einer Inzidenz von etwa einer Million Neuerkrankungen 2018 die sechsthäufigste Krebserkrankung weltweit dar und ist damit für etwa 5,7% aller malignen Erkrankungen verantwortlich. Es nimmt mit 782685 Fällen (8,2%) Platz drei der krebsassoziierten Todesfälle ein. Die Hochinzidenzregionen liegen in Asien, hier vor allem in China, Korea und Japan, in Osteuropa sowie Zentral- und Lateinamerika. In Deutschland belegt das Magenkarzinom 2018 Platz elf der Krebsfälle mit 14173 Neuerkrankungen und Platz sechs der krebsassoziierten Todesfälle. (Bray et al., 2018)

Es ist eine kontinuierliche Abnahme an Magenkarzinomen, vor allem der distal lokalisierten Tumoren, zu verzeichnen, was am wahrscheinlichsten durch veränderte Ernährungsgewohnheiten und die *Helicobacter pylori* Eradikation zu erklären ist. Trotzdem scheint es zu einem Anstieg an diffusen, proximal lokalisierten Tumoren zu kommen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei über 50 Jahren, wobei die Inzidenz mit steigendem Alter zunimmt. Es wurden auch Fälle bei unter 30-Jährigen beobachtet, in welchen oft erbliche, diffuse Karzinome zu finden sind. Insgesamt sind Männer etwa im Verhältnis 3:2 häufiger betroffen als Frauen. Das 5-Jahres-Überleben beträgt etwa 30%, da trotz kurativer Resektion ein hohes Risiko für Lokalrezidive, lymphogene Mikrometastasen und organische Fernmetastasierung besteht. (Kaneko & Yoshimura, 2001; Curado et al., 2007; Miyahara et al., 2007; Bosman et al., 2010; S3-Leitlinie Magenkarzinom, 2019)

2.2. Risikofaktoren des Magenkarzinoms

Den wichtigsten Risikofaktor in der Genese des Magenkarzinoms stellt eine Infektion mit *Helicobacter pylori* dar, welches seit 1994 als Klasse I Karzinogen durch die Weltgesundheitsorganisation anerkannt wurde (de Martel & Franceschi, 2009). *Helicobacter pylori* induziert eine chronisch aktive Gastritis, die nach der Correa-Hypothese, abhängig von Umweltfaktoren, bei einem Teil der Patienten über eine atrophische Gastritis und intestinale Metaplasie in ein intestinales Magenkarzinom übergehen kann (Correa, 1992). Das Risiko eines Magenkarzinoms erhöht sich durch die Infektion um das 2-3-fache, auch für Karzinome des diffusen Typs (Correa, 1992; Uemura et al., 2001; Malfertheiner et al., 2005), wobei Polymorphismen des Interleukin 1 β und des Interleukin 1 Rezeptor Antagonisten eine familiäre Empfänglichkeit für die *H. pylori* assoziierte Karzinogenese bedingen (Huang et al., 2003; Bosman et al., 2010).

Ein weiterer anerkannter Risikofaktor ist das Alter. Das Magenkarzinom entsteht vor allem bei Menschen über 55 Jahren, mit einem Median von 72 Jahren (de Martel & Franceschi, 2009). Auch ein niedriger sozioökonomischer Status (de Martel & Franceschi, 2009) und das

Leben in einer Hochrisikopopulation (wie zum Beispiel Japan) (Imagawa et al., 2008), Tabakrauchen, Alkoholkonsum (Lagergren et al., 2000; L. S. Engel et al., 2003), vorangegangene Magenoperationen (Bilroth II) (Lundegårdh et al., 1994), Gallereflux, familiäre Belastung und perniziöse Anämie (W Ye & Nyren, 2003) sind mit der Krebsentstehung assoziiert. Ernährungs- und Umweltfaktoren wie der Verzicht auf salzreiche oder geräucherte Speisen, ballaststoff- und vitaminreiche Nahrung, im Allgemeinen ein gesunder Lebensstil wirken sich positiv auf das Erkrankungsrisiko aus. Für Karzinome des ösophagogastralen Übergangs stellt zudem Übergewicht einen gesicherten Risikofaktor dar (Ping Yang et al., 2009). (S3-Leitlinie Magenkarzinom, 2019)

2.3. Familiäres Risiko und hereditäre Syndrome

Verwandte ersten Grades eines Patienten mit Magenkarzinom haben ein zwei- bis dreifach erhöhtes Magenkarzinomrisiko, möglicherweise bedingt durch die Kombination gemeinsamer Umweltbedingungen und genetischer Veranlagung (S3-Leitlinie Magenkarzinom, 2019).

Das autosomal dominant vererbte hereditäre diffuse Magenkarzinom ist für etwa 1% aller Magenkarzinome verantwortlich. Diesem liegt eine heterozygote Keimbahnmutation im Gen für E-Cadherin (*CDH1*) zugrunde (Keller, 2002; Oliveira et al., 2009; Wolf et al., 2010). Mutationsträger weisen ein frühes Erkrankungsalter, einen diffusen histopathologischen Typ und eine familiäre Häufung auf. Es besteht ein 70%iges (Männer) bzw. 56%iges (Frauen) Lebenszeitrisiko, ein Magenkarzinom zu entwickeln. Frauen weisen außerdem ein 42%iges Risiko für die Entstehung eines lobulären Mammakarzinoms auf. (Pharoah et al., 2001) Den Patienten wird aufgrund der geringen Sensitivität des endoskopischen Screenings eine prophylaktische Gastrektomie empfohlen (van der Post et al., 2015).

Patienten mit hereditärem kolorektalem Karzinom ohne Polyposis (HNPCC) besitzen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Magenkarzinoms bis 70 Jahre von 6,7% bei Männern und 2,6% bei Frauen im Vergleich zu 1,5% der westlichen Normalbevölkerung (Keller, 2002; Barrow et al., 2009; Koornstra et al., 2009; C. Engel et al., 2012).

2.4. Diagnostik

Die Diagnosestellung des Magenkarzinoms findet häufig erst in späten Stadien statt, da Symptome zunächst sehr unspezifisch sind oder fehlen können. Unter anderem kann es zum Auftreten von Dysphagie, rezidivierendem Erbrechen, Inappetenz, Gewichtsverlust oder gastrointestinalen Blutungen kommen. (S3-Leitlinie Magenkarzinom, 2019)

Nach aktuellen Leitlinien sollte in diesen Fällen frühzeitig eine vollständige endoskopische Untersuchung des Ösophagus und Magens durchgeführt werden. Während der Endoskopie werden mindestens acht Biopsien aus jeder suspekten Läsion entnommen. Bei Patienten mit kurativer Therapieintention sollte ein endoskopischer Ultraschall komplementär zur Computertomographie (CT) zur Selektion von Patienten für eine perioperative Therapie erfolgen. In

fortgeschrittenen Stadien kann eine Staging-Laparoskopie zum Ausschluss von Leber- und Peritonealmetastasen durchgeführt werden. (S3-Leitlinie Magenkarzinom, 2019)

Magenfrühkarzinome beschränken sich auf die Mukosa (T1a) oder Submukosa (T1b) und werden nach der Klassifikation der Japanischen Gesellschaft für gastroenterologische Endoskopie eingeteilt in vorgewölbte (I), oberflächlich erhabene (IIa), ebene (IIb), eingesenkte (IIc) und exkavierte (III) Tumoren (Association JGC, 1998). Die Prognose der Frühkarzinome ist deutlich günstiger, wobei in 5-20% bereits Lymphknotenmetastasen vorliegen. Fortgeschrittene Karzinome werden nach der Borrmann-Klassifikation (Borrmann, 1926) beurteilt und dem polypösen, ulzerierten mit scharfem Rand, ulzerierten mit Wandinfiltration und diffusen Typ zugeordnet (Bosman et al., 2010).

Zur Bestimmung der Fernmetastasierung wird eine B-Bild-Sonographie und ein CT des Thorax und Abdomens durchgeführt (S3-Leitlinie Magenkarzinom, 2019). Die Metastasierung intestinaler Karzinome erfolgt bevorzugt hämatogen in die Leber, während jene vom diffusen Typ häufiger peritoneale Metastasen aufweisen. Diffuse Tumoren des Antrum-pyloricus Übergangs können neben der Serosa und Lymphgefäßen auch das Duodenum infiltrieren. Eine Metastasierung in die Ovarien wird als Krukenbergtumor bezeichnet (Bosman et al., 2010).

2.5. Klassifikationen des Magenkarzinoms

2.5.1. UICC-TNM-Klassifikation, UICC-Stadien und Siewert-Klassifikation

Das Staging wird nach der aktuellen UICC-TNM-Klassifikation (8. Auflage) vorgenommen (Gospodarowicz et al., 2017). Tumoren des gastroösophagealen Übergangs (AEG) werden nach der Siewert-Klassifikation (Siewert & Stein, 1998a) in AEG I, II und III eingeteilt (Tabelle 1). AEG I und II Tumoren werden den Ösophaguskarzinomen, AEG III den Magenkarzinomen zugeordnet. Prognostisch relevante Faktoren des Magenkarzinoms stellen die Tumorklassifikation, die lokale Infiltrationstiefe, der lokoregionäre Lymphknotenbefall, Fernmetastasen und die Gefäßinvasion dar (Siewert et al., 1998b; Shiraishi et al., 2007).

Tabelle 1: Siewert-Klassifikation für AEG Tumoren (Siewert & Stein, 1998a)

Typ	Lokalisation
Siewert Typ I	Zentrum der Raumforderung 1-5 cm oberhalb der Z-Linie
Siewert Typ II	Zentrum der Raumforderung 1 cm über bis 2 cm unter der Z-Linie
Siewert Typ III	Zentrum der Raumforderung 2-5 cm unterhalb der Z-Linie

2.5.2. WHO-Klassifikation

Die WHO-Klassifikation teilt die Tumoren anhand ihrer morphologischen Struktur in fünf Hauptgruppen und weitere seltenere Typen ein. Diese umfassen tubuläre, papilläre, muzinöse, wenig kohäsive und gemischte Karzinome. Andere Subtypen stellen adenosquamöse oder hepatoide Adenokarzinome dar. (Bosman et al., 2010)

2.5.3. Laurén-Klassifikation

Die Laurén-Klassifikation unterscheidet Tumoren in diffuse und intestinale Karzinome (Lauren, 1965). Intestinale Tumoren bilden Drüsen mit unterschiedlicher Differenzierung und wachsen expansiv. Einen schematischen Überblick über die Magenkarzinogenese, insbesondere des intestinalen Typs, gibt Abbildung 1. Zunächst kommt es durch eine *H. pylori* Infektion über eine chronische Gastritis zu einer atrophischen Gastritis, was dann durch den Einfluss genetischer Faktoren, wie zum Beispiel einer ektopischen CDX2 Expression, zu einer intestinalen Metaplasie führt. Mutationen in *APC*, β -catenin und die Methylierung von *MLH1* tragen zur weiteren Entwicklung in ein Adenom und letztendlich zum intestinalen Magenkarzinom bei. (Correa, 1992; Yuasa, 2003)

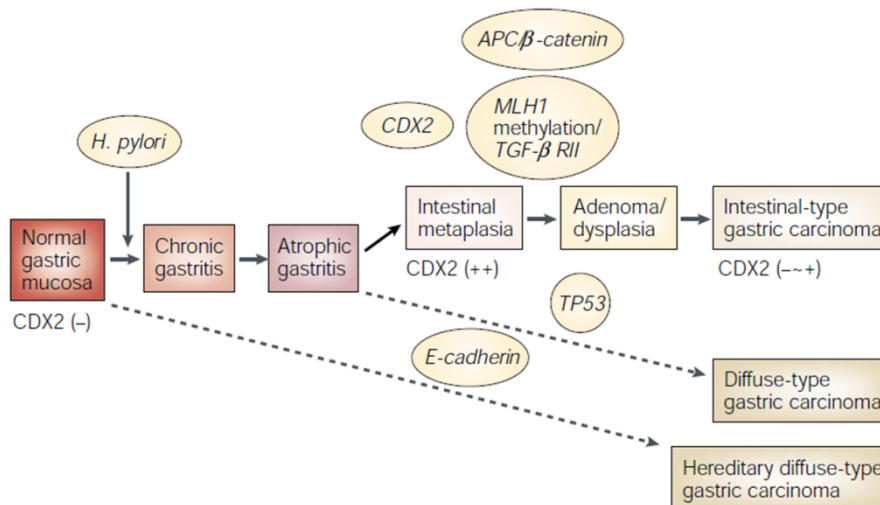


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Magenkarzinogenese (Yuasa, 2003)

Diffuse Karzinome bestehen aus wenig kohäsiven Zellen und weisen geringe oder keine Drüsenformationen auf. Sie entwickeln sich ohne Zwischenschritte direkt aus der atrophischen Gastritis, wobei hier häufig ein Funktionsverlust von p53 oder E-Cadherin zu beobachten ist. (Yuasa, 2003) Diffuse Karzinome treten vermehrt bei jungen und weiblichen Patienten auf (Berlth et al., 2014). Liegen beide Wachstumsmuster in gleichen Teilen innerhalb des Tumors vor, spricht man vom gemischten Typ (Lauren, 1965).

2.6. Therapie des Magenkarzinoms

2.6.1. Chirurgische Therapie

Oberflächliche Karzinome, die auf die Mukosa beschränkt sind (T1a N0 M0), können endoskopisch reseziert werden, wenn sie eine Größe kleiner 2 cm in erhabenen und kleiner 1 cm in flachen Typen, einen Differenzierungsgrad von gut oder mäßig (G1/G2) und keine makroskopischen Ulzerationen aufweisen. Dabei soll die Resektion en-bloc erfolgen und ein R0 Status erzielt werden. (S3-Leitlinie Magenkarzinom, 2019)

Weiter fortgeschrittene Karzinome werden durch chirurgische Resektion mit Lymphadenektomie behandelt. Hierbei soll durch die Einhaltung eines 5 cm Resektionsrandes bei intestinalen Karzinomen und 8 cm beim diffusen Karzinom der R0 Status sichergestellt werden. Bei Karzinomen des ösophagogastralen Übergangs (AEGII, AEGIII) wird eine erweiterte Gastrektomie mit Resektion des distalen Ösophagus notwendig. Tumoren des mittleren Drittels können bei Vorliegen eines intestinalen Karzinoms durch eine subtotale distale Magenresektion entfernt werden, sodass der proximale Anteil des Magens erhalten bleiben kann, während dies bei Tumoren des mittleren Drittels vom diffusen Typ nicht möglich ist und eine Gastrektomie indiziert ist. Tumoren des distalen Drittels können meistens durch eine subtotale Gastrektomie reseziert werden. (S3-Leitlinie Magenkarzinom, 2019)

Für eine valide Beurteilung des Lymphknotenstatus sollen mindestens 15 besser noch 25, regionäre Lymphknoten entfernt werden. Laut Leitlinie stellt die D2-Lymphadenektomie den Standard der operativen Behandlung mit kurativer Intention dar. Hierbei werden zusätzlich zu den Lymphknoten der Station I, die direkt dem Magen (perigastrisch entlang der großen und kleinen Kurvatur) anliegen, auch die Lymphknoten der Station II (entlang der A. gastrica sinistra, A. hepatica communis, A. lienalis, Truncus coeliacus und Lig. hepatoduodenale) entfernt. (S3-Leitlinie Magenkarzinom, 2019)

2.6.2. Chemotherapie

In der aktuellen S3-Leitlinie zum Magenkarzinom liegt eine „Soll/Sollte-Empfehlung“ zur perioperativen Chemotherapie bei Patienten mit lokalisierten Tumoren der Kategorie uT3 und resektablen uT4 Karzinomen vor. Diese wird neoadjuvant begonnen und nach der Operation adjuvant fortgeführt. In Bezug auf uT2 Karzinome liegt eine „Kann-Empfehlung“ vor. Was die Art der Chemotherapie angeht, stellte das in der von Cunningham et al. (2006) publizierte sogenannte MAGIC-Studie angewandte ECF-Regime (infusionales 5-FU, Cisplatin und Epirubicin) den Standard dar (Grenacher et al., 2012). Die neue S3-Leitlinie von 2019 sieht jedoch das FLOT-Schema (5-FU, Leucovorin, Oxaliplatin, Docetaxel) aufgrund neuer Studienergebnisse (Al-Batran et al., 2019) als Standardprotokoll an. 5-FU kann auch durch das Fluoropyrimidin Capecitabin ersetzt werden, was dann als XP-Regime (Cisplatin/Capecitabin) bezeichnet wird. Analog zum ECF-Regime ist auch das ECX-Regime möglich (Epirubicin, Cisplatin, Capecitabin). (S3-Leitlinie Magenkarzinom, 2019)

Bei Tumoren des ösophagogastralen Übergangs der Kategorien uT3 und resektablen uT4 soll/sollte eine perioperative Chemotherapie oder Radiochemotherapie durchgeführt werden. Die Chemotherapie soll hier platin-basiert sein und zusätzlich entweder 5-FU, Taxane oder Topoisomeraseinhibitoren enthalten. Der Antikörper Trastuzumab soll zusätzlich bei HER2-Überexpression bei metastasiertem Magenkarzinom eingesetzt werden (Van Cutsem et al., 2009). (S3-Leitlinie Magenkarzinom, 2019)

Das Ansprechen auf die präoperative Chemotherapie wird durch den Tumorregressionsgrad (TRG) nach Becker evaluiert, welcher unabhängige prognostische Relevanz besitzt. Es wer-

den drei Gruppen hinsichtlich des prozentualen Tumoranteils nach neoadjuvanter Chemotherapie unterschieden. In TRG1-Tumoren finden sich weniger als 10%, in TRG2- 10-50% und in TRG3-Tumoren mehr als 50% residuale Tumorzellen. Tumoren mit TRG2 und TRG3 werden als *Nonresponder* bezeichnet. (Becker et al., 2011)

2.7. Molekulare Klassifikationen

2.7.1. TCGA-Klassifikation (Bass et al., 2014)

In letzter Zeit kam es durch die Fortschritte in der Hochdurchsatztechnologie zur umfassenden Kartierung molekularer Alterationen solider Tumoren. Auf Basis dieser Daten wurde vom *Cancer-Genome-Atlas Projekt* (TCGA) eine molekulare Klassifikation für Magenkarzinome beschrieben (Abbildung 2). Diese umfasst vier Subtypen. Die erste Gruppe bilden Epstein-Barr-Virus (EBV) positive Tumoren. Diese weisen Mutationen der Gene *PIK3CA*, *ARID1A*, *BCOR* sowie Hypermethylierungen des *CDKN2A*-Gens auf. Eine weitere Gruppe stellen die mikrosatelliteninstabilen Karzinome mit Hypermethylierungen des *MLH1*-Gens dar. Tumoren mit genomischer Stabilität besitzen häufig Mutationen in *RHOA*, *CDH1* und *ARID1A* sowie Genfusionen von RHO-GTPase aktivierenden Genen. Die letzte Untergruppe umfasst Tumoren mit chromosomaler Instabilität (CIN) und Mutationen in *TP53*. (Bass et al., 2014)

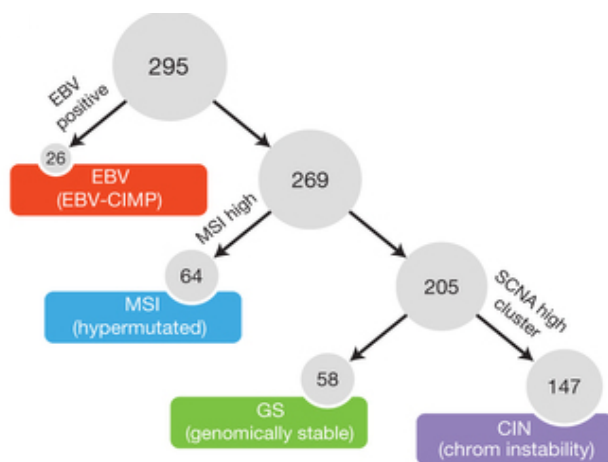


Abbildung 2: Klassifikationsschema der TCGA-Subtypen (Bass et al., 2014)

2.7.2. ACRG-Klassifikation (Cristescu et al., 2015)

Die *Asian Cancer Research Group* (ACRG) beschrieb 2015 eine weitere neue molekulare Klassifikation für Magenkarzinome (Abbildung 3). Das Kollektiv, an dem diese Klassifikation identifiziert wurde, beinhaltet 300 Magenkarzinome, die weder eine neoadjuvante Chemotherapie noch eine Radiochemotherapie erhielten, wobei 98 Patienten adjuvant chemo- oder radiochemotherapiert. Es wurde zunächst an 49 Karzinomen eine Sequenzierung des gesamten Genoms durchgeführt, um somatische Mutationen zu identifizieren. Anhand von Genexpressionsprofilen wurden vier molekulare Subtypen gebildet. Außerdem wurden immunhistoche-

mische Untersuchungen mit Antikörpern gegen MLH1, HER2 und EGFR und zusätzlich MSI- und EBV-Analysen durchgeführt.

Die erste Gruppe der ACRG-Klassifikation umfasst mikrosatelliteninstabile Tumoren mit einem Verlust der MLH1 Expression. Diese weisen die beste Prognose mit der niedrigsten Rezidivrate (22%) auf. Außerdem sind sie mit dem intestinalen Typ nach Laurén (>60%) assoziiert und vor allem im Magenantrum (75%) zu finden. Häufige Mutationen der MSI-Tumoren sind in *KRAS*, im PI3K-PTEN-Signalweg, *ALK* und *ARID1A* zu finden.

Eine weitere Untergruppe besteht in Tumoren, die eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen haben und ein hierfür charakteristisches Expressionsmuster aufweisen. Diese sind unter anderem durch eine hohe *VIM*- und *ZEB1*-Expression und eine niedrige Expression bzw. einen Expressionsverlust von *CDH1* gekennzeichnet. Tumoren mit EMT sind jene mit der schlechtesten Prognose, höchsten Rezidivrate (63%) und peritonealen Metastasen. Außerdem sind sie mit dem diffusen Typ nach Laurén (>80%) assoziiert und treten vermehrt in frühen Lebensjahren auf. Im Vergleich zu den anderen Subtypen ist hier eine geringe Anzahl an Mutationen zu finden.

Die restlichen Tumoren werden in Bezug auf *TP53* in jene mit einer intakten Funktion und einem Verlust der Aktivität eingeteilt. Als Grundlage für deren Klassifikation wird die Genexpression von *CDKN1A* und *MDM2* verwendet. Diese Tumoren besitzen eine mittlere Prognose, wobei jene mit intaktem *TP53* ein besseres Gesamtüberleben aufweisen. Hier sind Mutationen in *APC*, *ARID1A*, *KRAS*, *PIC3CA* und *SMAD4* zu finden, während *TP53* negative Karzinome den größten Anteil an *TP53*-Mutationen (60%) und zusätzlich Amplifikationen in *HER2*, *EGFR* und *MYC* aufweisen. EBV-Infektionen treten gehäuft in den *TP53* positiven Tumoren auf. (Cristescu et al., 2015)

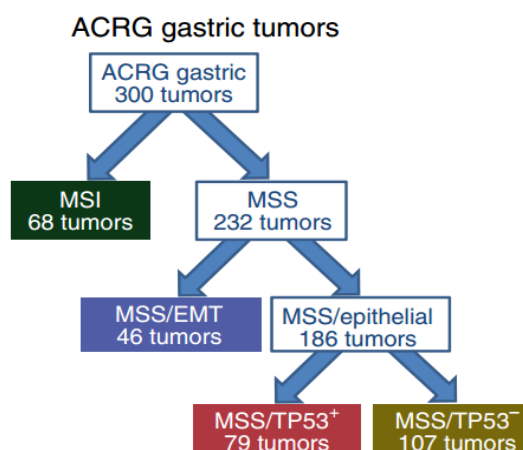


Abbildung 3: Klassifikationsschema der ACRG-Subtypen (Cristescu et al., 2015)

2.8. Subgruppen der molekularen Klassifikationen

2.8.1. Epstein-Barr-Virus positive (EBV+)-Tumoren

Das Epstein-Barr-Virus, ein gamma-Herpesvirus, führt weltweit zu Infektionen im Menschen. Die Symptome einer Infektion sind sehr variabel von subklinischen Verläufen bis zur typischen Präsentation als infektiöse Mononukleose. Die Durchseuchungsrate liegt bei nahezu 100%. (Cohen, 2000; Nowalk & Green, 2016) Außerdem gilt EBV als anerkanntes Karzinogen im Menschen (IARC Working Group, 1997). Die karzinogene Wirkung des EBV-Virus beruht wahrscheinlich auf der latenten Expression antiapoptotischer Proteine (Kelly et al., 2009). Eine weitere mögliche Ursache stellt die Induktion chromosomaler Instabilität aufgrund einer Zentrosomamplifikation durch das Virusprotein BNRF-1 in infizierten B-Lymphozyten dar (Shumilov et al., 2017).

EBV-assoziierte Tumoren stellen etwa 4-10% der Magenkarzinome dar (Bass et al., 2014; Camargo et al., 2014; Hewitt et al., 2018). EBV-Positivität geht hier mit einer besseren Prognose einher, obwohl sich auch Studien finden, die keine klare prognostische Relevanz erkennen können. Außerdem ist die prädiktive Wertigkeit in Bezug auf das Chemotherapieansprechen von EBV⁺-Fällen nicht geklärt. (Camargo et al., 2014; Hewitt et al., 2018) EBV⁺-Tumoren weisen häufig eine *PDL-1*- oder *PDL-2*-Überexpression, *PIK3CA*-Mutationen und ein hohes Maß an tumorinfiltrierenden Immunzellen auf und sind deshalb, genauso wie MSI-Tumoren, einer Therapie mit Immuncheckpointinhibitoren zugänglich (Ajani et al., 2010; Camargo et al., 2014; Desrichard et al., 2016; S. T. Kim et al., 2018).

2.8.2. Mikrosatelliteninstabilität

Mikrosatelliteninstabilität wird durch Defekte in der DNA-Mismatch Reparatur (MMR) verursacht. Hierfür werden Proteine, wie unter anderem MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 benötigt, die während der Replikation fehlgepaarte Basen erkennen und ausschneiden. Die Inaktivierung des MMR-Systems führt zur Erhöhung der Mutationsrate und der Krebsentstehung (Carneiro et al., 2008).

Diese spiegelt sich in einer Akkumulation von Längenalterationen repetitiver Mikrosatellitensequenzen wider. Beim Lynch Syndrom oder auch dem hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinom-Syndrom (HNPCC), welches für ca. 3% der Kolonkarzinome ursächlich ist, liegen die Mutationen des MMR auf Keimbahnebene vor. Klinische Charakteristika stellen ein junges Erkrankungsalter und das Auftreten multipler Tumoren wie Kolon-, Magen-, oder Ovarialkarzinome dar. Bei etwa 12 % der sporadischen Kolonkarzinome und bei 7-24% der Magenkarzinome ist ebenfalls eine MSI vorhanden. (An et al., 2012; S. Y. Kim et al., 2015; Smyth et al., 2017; Hewitt et al., 2018) Am häufigsten ist in diesen Tumoren die Expression des Proteins MLH1 durch Promotorhypermethylierung vermindert und ein *CpG island methylator phenotype (CIMP)* vorzufinden. Als CIMP bezeichnet man das Vorhandensein einer

Hypermethylierung multipler Promotorregionen. Sowohl im Kolon- als auch im Magenkarzinom gehen diese MSI-Tumoren mit einer besseren Prognose einher, wobei widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der prognostischen Relevanz bei Chemotherapie vorliegen. (Boland & Goel, 2010; An et al., 2012; Choi et al., 2014; S. Y. Kim et al., 2015; Smyth et al., 2017; Mereiter et al., 2018; Haag et al., 2019)

Im Rahmen eines internationalen Workshops im Jahre 1997 wurde die Definition von MSI standardisiert. Die Tumoren werden je nach Anzahl der instabilen Marker in MSI mit hoher Frequenz (MSI-H) und jene mit niedriger Frequenz (MSI-L) eingeteilt, wobei zwei oder mehr von fünf instabilen Markern zur Einordnung in die MSI-H und ein instabiler Marker zur Einordnung in die MSI-L führen. Außerdem wurde ein Panel aus fünf Mikrosatelliten validiert, welches zur Bestimmung des MSI-Status empfohlen wird und sich aus den Markern *BAT26*, *BAT25*, *D5S346*, *D2S123* und *D17S250* zusammensetzt. (Boland et al., 1998)

MSI-L wurde bereits in verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem auch im Magenkarzinom, beschrieben. Deren biologische und klinische Relevanz ist jedoch weitgehend unklar und MSI-L-Tumoren werden häufig mit den MSS-Tumoren in einer Gruppe zusammengefasst. (An et al., 2012; S. Y. Kim et al., 2015)

2.8.3. Epitheliale-mesenchymale-Transition

Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) ist ein Prozess, der bei Vorgängen während der embryonalen Entwicklung, der Wundheilung und auch der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielt (Hay, 2005; Zeisberg & Neilson, 2009). Im Verlauf der EMT erlangen Tumorzellen Stammzeleigenschaften, die ihnen ermöglichen, dynamisch zwischen epithelialer und mesenchymaler Differenzierung zu wechseln, wobei auch intermediäre Stadien möglich sind (Shook & R. Keller, 2003; J. M. Lee et al., 2006). Dies ermöglicht die Loslösung der Krebszellen vom Primärtumor und deren Ausbreitung in das umliegende Stroma, aber auch über Blut-, oder Lymphfluss in andere Organe. Außerdem ist EMT an der Entstehung von Resistenzen gegen durch Chemotherapie induzierte Apoptose beteiligt. Der entgegengesetzte Ablauf, also die Entwicklung von Zellen mit mesenchymalem Phänotyp zu epithelial differenzierten Zellen, wird als mesenchymale-epitheliale Transition (MET) bezeichnet. (J. P. Thiery, 2002; Elyer & Rich, 2008; Schmalhofer et al., 2009)

EMT ist charakterisiert durch den Verlust der apiko-basalen Zellpolarisation durch die Modifikation des Zelladhäsionsproteins E-Cadherin (Natalwala et al., 2008; J. P. Thiery et al., 2009). Dies wird durch spezifische Transkriptionsfaktoren wie *Snail*, *Slug*, *Twist*, *ZEB1*, *ZEB2*, aber auch durch mi-RNAs und epigenetische und post-translationale Regulatoren induziert (Rosivatz et al., 2002; Alves et al., 2007; Jia et al., 2012; Sánchez-Tilló et al., 2012; Huangyang & Shang, 2013). Tumorzellen, welche die EMT durchlaufen, weisen ein spezifisches Genexpressionsmuster mit niedriger E-Cadherin- (*CDH1*) und hoher Vimentin- (*VIM*) und *ZEB1*-Expression auf (J. P. Thiery et al., 2009; Loboda et al., 2011).

2.8.3.1. E-Cadherin

Die Adhäsion zwischen Epithelzellen wird bei Säugetieren durch drei verschiedene Verbindungsarten gewährleistet. Eine davon sind die Adherens-Junctions, deren Transmembrandomäne aus Cadherinen besteht. Die Verbindung der einzelnen Zellen führt zur Ausbildung eines koordinierten Gewebes mit apiko-basaler Polarität, ermöglicht Bewegungen innerhalb des Epithels und den Austausch von Informationen zwischen der Umgebung und dem Inneren der Zellen. (Perez-Moreno et al., 2003)

Die Cadherin-Familie beinhaltet mehr als 100 Glykoproteine mit einer extrazellulären, transmembranären und einer zytoplasmatischen Domäne. Die extrazelluläre Domäne interagiert mit anderen Cadherin-Molekülen benachbarter Zellen. Das zytoplasmatische Ende der klassischen Cadherine besitzt Bindungsstellen für β -Catenin oder γ -Catenin. Allen Cadherinen gemeinsam ist eine Sequenz aus ungefähr 110 Aminosäuren. (Wheelock & Johnson, 2003)

E-Cadherin, der Prototyp der klassischen Cadherine, wird durch das Gen *CDH1* kodiert und vorwiegend in epitheliale Gewebe exprimiert. *CDH1* liegt auf Chromosom 16q22 und besitzt 16 Exons. (Berx et al., 1995; NCBI, 2016)

E-Cadherin trägt neben der Wahrung der apiko-basalen Polarisation durch die Adherens-Junction auch als negativer Regulator des WNT-Signalwegs zur epithelialen Differenzierung bei. Bei intakter E-Cadherin-Funktion und Abwesenheit eines WNT-Moleküls wird β -Catenin an die Zellmembran rekrutiert und durch einen Degradationskomplex unter Beteiligung von APC abgebaut. So wird die Translokation von β -Catenin in den Kern und dessen transkriptionelle Aktivität verhindert. E-Cadherin, β -Catenin und der WNT-Signalweg spielen eine wichtige Rolle während der EMT. (Schmalhofer et al., 2009)

Die Funktion von E-Cadherin kann durch verschiedene Mechanismen vermindert oder vollständig inaktiviert werden. Das Auftreten somatischer Alterationen oder Keimbahnmutationen (siehe Hereditäres Magenkarzinom) führt zum Verlust der E-Cadherin-Funktion. Diese wurden im lobulären Mammakarzinom und diffusen Magenkarzinom identifiziert. Des Weiteren beeinflussen *CpG island* Hypermethylierungen des Promoters von *CDH1* dessen Expression. Eine weitere Form der Inaktivierung von *CDH1* findet durch spezifische Transkriptionsfaktoren wie *ZEB1*, *Snail 1* oder *Snail 2* statt. (Keller et al., 1999; Schmalhofer et al., 2009)

In den vom TCGA-Projekt veröffentlichten Daten finden sich 11% *CDH1* Mutationen im Magenkarzinom (Cerami et al., 2012; J. Gao et al., 2013; Bass et al., 2014). Die negative prognostische Relevanz konnte bereits in primär resezierten Magenkarzinomen, sowohl für somatische Mutationen als auch eine verminderte Proteinexpression, gezeigt werden (Corso et al., 2013; T. Li et al., 2014; H. Gao et al., 2017).

2.8.3.2. Vimentin

Das Zytoskelett besteht aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten. Diese Intermediärfilamente bestehen aus ähnlichen alpha-helikalen Domänen und werden in sechs

Untergruppen eingeteilt, wobei Vimentin der Klasse 3 der Intermediärfilamente zugeordnet wird. (Robert et al., 2016) Das Expressionsmuster der Intermediärfilamente ist gewebe- und zellspezifisch, sodass diese jedem Zelltyp einen eigenen Fingerabdruck verleihen und deren Anpassung an die mechanischen Eigenschaften verschiedener Gewebe und Entwicklungsstadien widerspiegeln (Helfand et al., 2004; Robert et al., 2016).

Vimentin wird durch das Gen *VIM* kodiert, das auf Chromosom 10p13 liegt und 9 Exons umfasst (NCBI, 2016). Vimentin wird spezifisch in mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten exprimiert und ist ein Marker für die mesenchymale Differenzierung eines Gewebes. Je nach Funktion der Zelle lagern sich die Polypeptide zu unterschiedlichen Filamenten zusammen und bestehen in Koexistenz mit anderen Faktoren oder als lösliche Tetramere. Dies führt zu der Annahme, dass Vimentin nicht nur mechanische Aufgaben erfüllt, sondern auch an dynamischen Prozessen wie der Adhäsion, Migration, Invasion und an der Zellsignalisierung teilnimmt (Robert et al., 2016).

Somatische *VIM* Mutationen spielen mit 2-4% im Magenkarzinom eher eine untergeordnete Rolle, wohingegen epigenetische Expressionsveränderungen von Bedeutung sind (Bass et al., 2014; Forbes et al., 2016). Die prognostische Relevanz einer veränderten Vimentin Expression wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnte in einigen Studien ein negativer prognostischer Effekt einer vermehrten Vimentin-Expression im Kolon- (Lazarova & Bordonaro, 2016), Lungen- (Kidd et al., 2014) und Magenkarzinom (Ryu et al., 2012; Z. Liu et al., 2014) gezeigt werden. Andere wiesen keine prognostische Relevanz für Vimentin im Magenkarzinom nach (Hou et al., 2012).

2.8.3.3. ZEB1

Der Transkriptionsfaktor *ZEB1* gehört zur Familie der *Zinc-finger-E-box-binding* Proteine und wird durch das Gen *TCF8* kodiert, das auf Chromosom 10p11 liegt und 21 Exons umfasst. Somatische *ZEB-1*-Mutationen haben eine niedrige Frequenz von etwa 1,5-3% im Magenkarzinom, wohingegen der epigenetischen Regulation der Proteinexpression eine größere Bedeutung zukommt (Bass et al., 2014; NCBI, 2016; Forbes et al., 2016).

Neben der für die Gruppe typischen Zink-Finger Domäne, die der Bindung an E-Boxes in der DNA dient, besitzt *ZEB1* andere Interaktionsdomänen wie zum Beispiel die *Smad interaction domain* (SID), *CtBP interaction domain* (CID) und die *p300-P/CAF binding domain* (CBD). Durch die Rekrutierung von Co-Repressoren oder Aktivatoren an diese Domänen, kann *ZEB1* verschiedene Zielgene regulieren. Die Expression von *ZEB1* wird durch verschiedenste Signalwege wie dem WNT-, NFkB-, TGF- β -, COX2- oder HIF-Signalweg beeinflusst und *ZEB1* selbst reguliert mehrere hundert Gene, die meistens im Kontext epithelialer Differenzierung stehen. So führt es unter anderem zu einer Repression der *CDH1*-Expression und kann so EMT induzieren oder es aktiviert über eine vermehrte TGF- β -Expression die Differenzierung der Osteoblasten. Außerdem induziert die *ZEB1*-Expression Resistenzen gegen Radio- und Chemotherapien. (Aigner et al., 2007; P. Zhang et al., 2015)

Eine Metaanalyse von Chen et al. (2019) konnte zeigen, dass eine Überexpression von *ZEB1* im Kolorektalen, Pankreas-, Hepatozellulären- und Magenkarzinom mit einem signifikant schlechteren Überleben einhergeht.

2.8.4. Tumorsuppressorprotein 53 (TP53) und assoziierte Gene

Das Gen *TP53* codiert für einen Tumorsuppressor mit multiplen Funktionen in Bezug auf Apoptose, Zell-Seneszenz, DNA-Reparatur, Zellmetabolismus, Zellzyklus-Kontrolle und Differenzierungsgrad. Im nicht aktivierten Zustand wird p53 durch *MDM2* ubiquitinyliert und so für die Degradation durch das Proteasom markiert und auf einem niedrigen Niveau gehalten. Zelluläre Stresssignale wie die Expression von Onkogenen, DNA-Schäden, Hypoxie, metabolische Dysfunktion und replikativer Stress führen zu einer Aktivierung der p53 Funktion. Darauf agiert p53 als tetramerer Transkriptionsfaktor und nimmt Einfluss auf die Transkription tausender Gene, was in geringerem Maße auch im nicht-aktivierten Zustand geschieht. Abhängig von spezifischen Zelleigenschaften und der Stärke oder Dauer des Stresssignals werden unterschiedliche Mechanismen ausgelöst. So führt ein kleiner DNA-Schaden zum Zellzyklusarrest mit nachfolgender Aktivierung der DNA-Reparatur, während ein großer DNA-Schaden in Apoptose oder Seneszenz mündet. Am G1-Zellzyklusarrest ist *CDKN1A* (p21) beteiligt, welches durch p53 vermehrt exprimiert wird. (Aubrey et al., 2016; Wasylischen & Lozano, 2016)

TP53 liegt auf Chromosom 17p13, umfasst 12 Exons und ist das am häufigsten mutierte Gen in den meisten Krebsarten (Nigro et al., 1989). *TP53*-Mutationen finden sich beim Magenkarzinom in etwa 50% (Bass et al., 2014; Cerami et al., 2012; J. Gao et al., 2013). Hierbei stellen Missense-Mutationen den größten Anteil dar (NCBI, 2016; Forbes et al., 2016). Auch bei intakter Funktion sind häufig epigenetische Veränderungen durch die Interaktion mit viralen Proteinen und die negative Regulation durch *MDM2* zu finden (Vogelstein et al., 2000; Aubrey et al., 2016). In mehreren Studien konnte die negative prognostische Relevanz einer *TP53*-Mutation oder aberranter p53-Expression in verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem dem Magenkarzinom, gezeigt werden (Petitjean et al., 2007; Robles & Harris, 2010; Yıldırım et al., 2015; Tahara et al., 2016).

Die prognostische Bedeutung der p53-Proteinexpression, vor allem im Kontext perioperativer Chemotherapie, wird jedoch auch kontrovers diskutiert und in einigen Studien keine prognostische Relevanz von p53 beobachtet (Yıldırım et al., 2015; X. Liu et al., 2014).

2.8.4.1. *CDKN1A*

Der *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*, auch p21 (p21^{WAF1/Cip1}) genannt, liegt auf Chromosom 6p21, umfasst 6 Exons und wird durch das Gen *CDKN1A* codiert. Die häufigsten Mutationen in *CDKN1A* sind Missense-Substitutionen. Sie treten im Magenkarzinom mit einer Häufigkeit von etwa 0,5-2% auf. (Cerami et al., 2012; J. Gao et al., 2013; NCBI, 2016;

Forbes et al., 2016) *CDKN1A* fungiert sowohl als Sensor, als auch Effektor für viele anti-proliferative Signale, besitzt jedoch auch eine widersprüchliche onkogene Wirkung. *CDKN1A* gilt als eines der wichtigsten Effektormoleküle des p53-Signalwegs und führt in Abhängigkeit bestimmter Signale zum G1-Zellzyklusarrest. Beispiele für seine Aufgabe als Tumorsuppressor sind neben der Bindung an die *cyclin-dependent kinase* (CDK) 2 und CDK4 mit einhergehendem Zellzyklusarrest die Interaktion mit dem *Proliferation Cell Nuclear Antigen* (PCNA), welches für die DNA-Polymerase Aktivität benötigt wird und so den Einfluss auf die Modulation der DNA-Replikation und -Reparatur vermittelt. *CDKN1A* moduliert die MYC-abhängige Transkription und deprimiert durch die E2F1 abhängige Verminderung der Wnt 4-Expression das Zellwachstum. Die onkogene Wirkung erzielt *CDKN1A* durch Inhibition der Apoptose und durch die Zusammenführung von D-Zyklinen mit CDK4 und 6. (Abukhdeir & Park, 2008; Abbas & Dutta, 2009)

2.8.4.2. MDM2

MDM2 (*Murine Double Minute Clone 2*) wurde zuerst in einer genomischen Region auf einem Double Minute Chromosom, was einem bis zu 100kbp großen extrachromosomalen Chromatinstück entspricht, aus der murinen Zelllinie 3T3-DM identifiziert. *MDM2* ist eine nukleäre E3 Ubiquitin-Ligase, die auf Chromosom 12q15 codiert ist, 13 Exons umfasst und einen wesentlichen negativen Regulator der p53-Aktivität während der Entwicklung normaler Gewebhomeostase und DNA-Reparatur darstellt. (Momand et al., 2000; NCBI, 2016; Wasylshen & Lozano, 2016) Hohe p53 Level führen zur vermehrten Transkription von *MDM2*, was wiederum p53 ubiquitinyliert und so für die proteasomale Degradation markiert. Somit bilden die beiden eine autoregulatorische Einheit. DNA-Schäden führen zur Phosphorylierung von p53 aber auch von *MDM2* und verhindern die p53 Ubiquitinylierung. Außerdem wird die p53 Degradation durch weitere Regulatoren wie ARF, *MDM2* oder den Selbstabbau von *MDM2* beeinflusst und *MDM2* ist nicht nur für die Ubiquitinylierung, sondern auch für eine effiziente Degradation nötig. (Kubbutat et al., 1997)

MDM2 besitzt neben der p53 Regulation auch andere Funktionen wie die Modulation der Differenzierung zusammen mit SP1 und pRb. Eine Amplifikation von *MDM2* ist in verschiedensten Tumoren zu finden und fördert die Tumorprogression. (Momand et al., 2000; Daujat et al., 2001) Im Magenkarzinom finden sich in etwa 1-6% der Fälle *MDM2* Mutationen (Bass et al., 2014; Forbes et al., 2016). Die negativ prognostische Relevanz einer vermehrten *MDM2*-Proteinexpression konnte bereits im Magenkarzinom gezeigt werden (Y. Ye et al., 2013).

2.9. Zielsetzung

Mit der Entwicklung der Hochdurchsatztechnologien kam es zur Identifikation neuer molekularer Klassifikationen in Bezug auf das Magenkarzinom. Eine davon stellt die ACRG-Klassifikation dar (Cristescu et al., 2015). Die prädiktive und prognostische Wertigkeit derart umfassend erhobener Daten ist jedoch weitgehend unklar. Die Ziele der vorliegenden Arbeit sind deshalb wie folgt definiert und in Abbildung 4 veranschaulicht.

Das Ziel der Arbeit ist die Bestimmung der klinisch-pathologischen, prädiktiven und prognostischen Relevanz der ACRG-Klassifikation in Magenkarzinomen und Adenokarzinomen des gastroösophagealen Übergangs (AEG II/III) in Patienten ohne und nach neoadjuvanter Chemotherapiebehandlung und in prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx.

Um dies zu erreichen, wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Zunächst wurden die mit den Subtypen der ACRG-Klassifikation assoziierten Gene *CDH1*, *VIM*, *ZEB1*, *CDKN1A* und *MDM2* auf mRNA- bzw. cDNA-Ebene mittels quantitativer real-time PCR an einer limitierten Fallzahl analysiert und deren klinische, prognostische und prädiktive Relevanz bestimmt.
- Anschließend wurde die EMT-Klassifikation vorgenommen und eine Gruppe mit epithelial-mesenchymaler Transition durch die Kombination der Genexpressionen der einzelnen Gene *CDH1*, *VIM* und *ZEB1* definiert.
- Darauf erfolgte die Übertragung der EMT-Klassifikation auf Proteinebene und die Bestimmung der p53-Aktivität immunhistochemisch am Gesamtkollektiv mit Analyse der klinischen, prognostischen und prädiktiven Relevanz der einzelnen Faktoren.
- Der MSI-Status wurde im Rahmen der gemeinsamen Datenerhebung in der Arbeitsgruppe bestimmt und die Daten bereits publiziert (Kohlruss, Grosser et al., 2019).

Unabhängig von der ACRG-Klassifikation wurde zusätzlich die Assoziation zwischen MSI-Tumoren und der p53-Proteinexpression betrachtet.

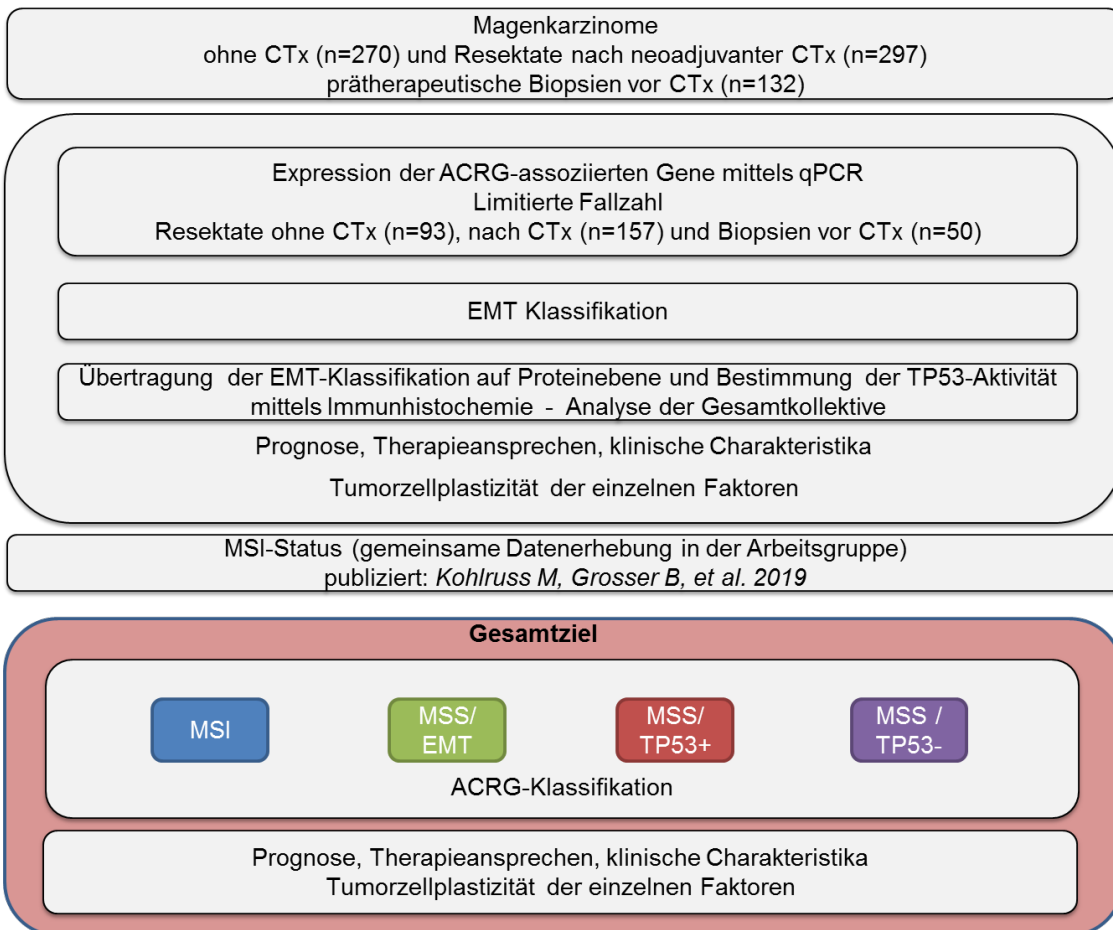


Abbildung 4: Zielsetzungen und Ablauf der vorliegenden Arbeit

3. Material und Methoden

3.1. Patienten und Tumormaterial

3.1.1. Patientencharakteristika

Das Patientenkollektiv für die mRNA-basierten Analysen bestand aus 278 Resektaten und 53 prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx. Die Resektate wurden zwischen 2003 bis 2013 und die Biopsien zwischen 1993 bis 2013 am Klinikum rechts der Isar in München reseziert.

Das Kollektiv für die immunhistochemischen Analysen setzte sich aus 618 Tumoren zusammen, die zwischen 2001 und 2013 am Klinikum rechts der Isar in München und am Universitätsklinikum Heidelberg reseziert wurden. Die 140 prätherapeutischen Biopsien wurden von Patienten zwischen 1993 und 2013 am Klinikum rechts der Isar in München gewonnen. Die klinischen Daten der Biopsien wurden im Rahmen der Masterarbeit von Marie Krenauer (2018) zusammengestellt und in der Arbeit Kohlruss, Grosser, et al. (2019) veröffentlicht. Die klinischen und pathologischen Charakteristika der Tumorresektate wurden bereits in der Arbeit von Bauer et al. (2017) beschrieben.

Die klinischen Charakteristika der Kollektive sind unter den Punkten 4.1 in Tabelle 30 und 4.4 in Tabelle 45 im Ergebnisteil zu finden.

Das pathologische Staging erfolgte nach der UICC-Klassifikation für Magenkarzinome (7. Auflage) (Sobin et al., 2011). Die Kollektive schlossen sowohl Adenokarzinome des Magens als auch des gastroösophagealen Übergangs (AEGII und III nach Siewert & Stein, (1998a)) ein.

Die Verwendung der Gewebeproben für die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München (Referenz 502/155) und der Universität Heidelberg (Referenz 501/2001) genehmigt.

3.1.2. Neoadjuvante Chemotherapie und chirurgische Therapie

Die Häufigkeiten der angewandten Chemotherapiesubstanzen und chirurgischen Operationsverfahren sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Neoadjuvante Chemotherapie-Schemata und Operationsverfahren

	Biopsien vor CTx		Resektate				
			ohne CTx		nach CTx		
	n	%	n	%	n	%	
Total	140	100	291	100	327	100	
Präoperative Chemotherapie	Cis + 5-FU or Cap	116	83	0	0	124	38
	Ox + 5-FU oder Cap	19	14	0	0	46	14
	Cis + 5-FU + Doc or Pac	2	1	0	0	27	8
	Ox + 5-FU + Doc	0	0	0	0	22	7
	Cis or Ox + 5-FU or Cap + Epi	2	1	0	0	84	26
	Sonstige	1	1	0	0	23	7

	k.A.	0	0	0	0	1	<1
Operationsverfahren	Totale Gastrektomie	22	16	93	32	97	30
	Abdomino-thorakale Ösophagektomie	21	15	11	4	47	14
	Transhiatal erweiterte Gastrektomie	50	36	77	27	155	47
	Subtotale Gastrektomie	4	3	97	33	23	7
	Transmediastinale Ösophagektomie	0	0	3	1	0	0
	Sonstige	2	1	10	3	5	2
	k.A.	41	29	0	0	0	0

Cis: Cisplatin, Ox: Oxaliplatin, 5-FU: 5-Fluorouracil, Cap: Capecitabine, Doc: Docetaxel, Pac: Paclitaxel, Epi: Epirubicin, Sonstige: Kombination aus Cis/Ox mit anderen Substanzen. k.A.: keine Angabe

3.1.3. Beurteilung des Therapieansprechens

Das Therapieansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie wurde durch die histopathologische Evaluierung mittels Tumorregressionsgrad (TRG) nach Becker vorgenommen. Dieser stellt einen unabhängigen prognostischen Faktor in Bezug auf das Gesamtüberleben beim Magenkarzinom dar. Die Beurteilung der Tumorregression beruht auf dem prozentualen Vorliegen des Residualtumors im Vergleich zum makroskopisch abschätzbaren primären Tumorknoten. Weniger als 10% verbliebenes Tumorgewebe entspricht Grad 1 (TRG1). Dieser wird weiter unterteilt in eine vollständige (1a) Regression mit nicht nachweisbarem Resttumor und in eine subtotale (1b) Tumorregression. Grad 2 (TRG2), oder die teilweise Regression, beinhaltet Tumoren mit Resttumor zwischen 10-50%. Bei mehr als 50% Tumorgewebe pro Tumorknoten liegt ein Tumorregressionsgrad 3 (TRG3) vor, was als minimale oder nicht vorhandene Regression bezeichnet wird. Patienten mit TRG1 werden als *Responder*, jene mit TRG2 und 3 als *Non-Responder* bezeichnet. (Becker et al., 2011)

Das Kollektiv für die mRNA-basierten Analysen (Tabelle 30) bestand aus 161 Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie, von denen 50% den Tumorregressionsgrad 2 und 41% den Tumorregressionsgrad 3 aufwiesen. Das Kollektiv der Biopsien vor CTx beinhaltete 20% TRG1, 16% TRG2 und 62% TRG3 Tumoren. Zu einem Patienten war keine Angabe vorhanden.

Im Kollektiv für die immunhistochemischen Analysen (Tabelle 45) befanden sich 297 Patienten nach CTx, von denen 46% den Tumorregressionsgrad 2 und 54% den Tumorregressionsgrad 3 aufwiesen. Patienten mit TRG1 wurden nicht eingeschlossen, da in diesen Fällen keine oder nur sehr wenige residuale Tumorzellen vorhanden waren und eine weitere Analyse nicht möglich war. Das Kollektiv der Biopsien vor CTx setzte sich aus 33% TRG1, 30% TRG2 und 36% TRG3 Tumoren zusammen.

3.1.4. Definition des Gesamt- und Rezidivfreien Überlebens

Das Gesamtüberleben (OS) ist definiert als Zeitspanne in Monaten zwischen dem Datum der Operation und dem Todesdatum (Ereigniszeitpunkt) oder dem letzten Nachsorgetermin (Zensierungszeitpunkt).

3.2. Zelllinien

Die Zelllinien HGC-27 und LMSU stammen aus dem RIKEN BioResource Center (Tsukuba, Japan), die Zelllinie MKN28 stammt von Dr. Wacheck (Fachbereich für klinische Pharmakologie) von der Medizinischen Universität Wien (Österreich) und die Zelllinie AGS aus der European Collection of Cell Culture (Port Down, UK).

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
HGC-27	Humane Zelllinie; isoliert aus Lymphknotenmetastasen eines undifferenzierten Magenkarzinoms
LMSU	Humane Zelllinie; isoliert aus Lymphknotenmetastasen des Magenkarzinoms einer 27-jährigen japanischen Frau
AGS	Humane Zelllinie; isoliert aus einem unbehandelten Magenkarzinom einer 54-jährigen kaukasischen Frau
MKN28	Humane Zelllinie; isoliert aus einem gut differenzierten tubulären Adenokarzinom einer 70-jährigen Frau
HS746T	Humane Zelllinie; isoliert aus einer Metastase des Magenkarzinoms eines 74-jährigen Mannes

3.3. Material

3.3.1. Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoresegerät Power PAC 300	BioRAD (München, Deutschland)
Elektrophoresekammern Wide Mini Sub CELL GT	BioRAD (München, Deutschland)
Spektralphotometer Nanodrop 2000c	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
LightCycler 480	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Zentrifuge 4K15	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge (5417R)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
epMotion® 5075	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Thermoblock	Schutron (Quedlinburg, Deutschland)
Sequencer 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Zentrifuge 5075 und 5424	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 4K15	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland)
Geldokumentation E-BOX VX2	Vilber (Eberhardzell, Deutschland)
Laborwaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Mastercycler Nexus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Minishaker MS1	IKA (Staufen, Deutschland)
Oberflächen Heizplatte	Ikamag Ret (Staufen i.Br., Deutschland)
Qubit® 3.0 Fluorometer	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Schnippschüttler Thermoshaker	Schutron (Quedlinburg, Deutschland)
Tissue Microarrayer	Beecher Instruments, Sun Praierie, USA
Vortexer VF2	Janke und Kunkel IKA (Staufen, Deutschland)

3.3.2. Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
RNAse Inhibitor RNase OUT (40 units/ μ L)	Invitrogen, Carlsbad, USA

AmpliTaq Gold	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
dNTP Set bestehend aus dATP, dGTP, dCTP, dTTP à 100mM	Invitrogen, Carlsbad, USA
Gelatine	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Formamid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Random Primer Oligonukleotide (3 µg/µl)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Stratagene® QPCR Human Reference Total RNA*	Agilent Technologies
LE Agarose	Biozym (Oldendorf, Deutschland)
Gel Red™ Nucleid Acid Gel Stain	GeneON (Ludwigshafen am Rhein, Deutschland)
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Wasser, PCR grade	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Laufpuffer (10x) mit EDTA (Sequencer 3130)	Thermo Fisher (Waltham, USA)
POP-7 Performance Optimized Polymer	Thermo Fisher (Waltham, USA)
PCR Nucleotide Mix Plus	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
dTTP 100mM	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Gel Loading Dye Purple 6x	Bio Labs

* zusammengesetzt aus RNA zehn humaner Karzinomzelllinien

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmittel	Hersteller
96 Well Standard, Skirted PCR Plate	4titude (Wotton, England)
FrameStar® 384 Well PCR Plate	4titude (Wotton, England)
epT.I.P.S. Motion Reloads	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
PCR soft tubes (0,2 ml)	Biozym (Oldendorf, Deutschland)
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 µl)	Biozym (Oldendorf, Deutschland)
Safe-Seal Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2,0 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Probenröhrchen mit Schraubverschluss	Biozym (Oldendorf, Deutschland)
DeckWorks™ Pipettenspitzen	Corning (Corning, USA)
Septa-Matte (für ABI 3100)	Kisker Biotech (Steinfurt, Deutschland)
Greiner HLA Terasaki multiwell plates	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)

3.3.3. Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
UltraPure™ 10x TBE Puffer (pH = 8,4)	Invitrogen GIBCO (Darmstadt, Deutschland)
ATE-Puffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Bromphenol Blue Xylene Cyanole Dye	Sigma (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 8: Zusammensetzung des 10x TBE-Puffers (pH=8,4) für die Agarose-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Konzentration
TRIS	1 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	0,01 M

Tabelle 9: Zusammensetzung des 10x DNA-Ladepuffers für die Agarose-Gelelektrophorese (Bromphenol Blue Xylene Cyanole Dye)

Bezeichnung	Konzentration
Formamid	80 % (v/v)
Bromphenolblau	0,05% (w/v)

Xylencyanol	0,5 % (v/v)
-------------	-------------

Tabelle 10: Zusammensetzung des ATE-Puffers zum Lösen der lyophilisierten Mikrosatelliten-Primer

Bezeichnung	Konzentration
Tris-HCl pH=8,3	10 mM
EDTA	0,1 mM
NaN ₃ (Natriumazid)	0,04 %

Tabelle 11: Zusammensetzung der 10x PCR Puffer Stammlösung (pH=8,3)

Bezeichnung	Konzentration
Tris-HCL	100 mM
KCL	500 mM
Gelatine	0,1%
MgCl ₂	30mM

3.3.4. Kommerzielle Kits

Tabelle 12: Kommerziell erhältliche Kits

Bezeichnung	Hersteller
SuperScript™ II First-Strand-Synthesis Kit	Life Technologies (Carlsbad, USA)
RNeasy® FFPE Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Qubit® dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen GIBCO (Darmstadt, Deutschland)
High Pure RNA Paraffin Kit	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Maxwell® Tissue DNA Purification Kit	Promega (Madison, USA)
Type-it® Microsatellite PCR Kit **	Qiagen (Hilden, Deutschland)
ultraView Universal DAB Detection Kit	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

*TaqMan® Fast Advanced Master Mix enthält: AmpliTaq® Fast DNA Polymerase, Uracil-N glycosylase, dNTPs mit dUTP, ROX™ dye und optimierte Puffer Komponenten

** 2x Type-it Multiplex PCR Master Mix enthält: HotStarTaq® Plus DNA Polymerase, Type-it Microsatellite PCR Puffer (6 mM MgCl₂, pH 8,7) und dNTPs

3.3.5. Genexpressionsassays

Tabelle 13: Verwendete TaqMan™-Geneexpressionsassays

Symbol	Entrez Gene ID	Assay	Exon- überspannend	bp	Amplifikationseffizienz ¹
Zielgene					
<i>CDH1</i>	999	Hs01023894_m1	ja	61	1,81
<i>CDKN1A</i>	1026	Hs00355782_m1	ja	66	1,83
<i>MDM2</i>	4193	Hs01066930_m1	ja	99	1,81
<i>VIM</i>	7431	Hs00958111_m1	ja	65	1,83
<i>ZEB1</i>	6935	Hs00232783_m1	ja	63	1,89
Referenzgene					
<i>B2M</i>	567	Hs99999907_m1	ja	75	1,81
<i>IPO8</i>	10526	Hs00183533_m1	ja	71	1,96
<i>PPIA</i>	5478	Hs99999904_m1	(ja) ²	98	1,84

¹ berechnet mit LC480 Software

² sehr kurzes Intron; gDNA - Amplifikation möglich

Tabelle 14: Zusammensetzung der TaqMan™-Geneexpressionsassays

Bezeichnung	Konzentration
-------------	---------------

2 unmarkierte PCR Primer	900 nM
1 FAM markierte TaqMan® MGB Sonde	250 nM

3.3.6. Software

Tabelle 15: Verwendete Software

Software	Herausgeber
LightCycler® 480 SW 1.5	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
qBase ⁺ 3.0	Biogazelle (Zwijnaarde, Belgien)
SPSS Statistics 25	IBM (Armonk, USA)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software (San Diego, USA)
RStudio 1.1.383	RStudio Inc
Gene Mapper Software 5	Applied Biosystems (Waltham, USA)
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

3.4. Methoden

3.4.1. RNA-Isolation

Die RNA wurde, wie durch Bauer et al. (2017) beschrieben, aus Formalin-fixiertem Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE) nach manueller Mikrodisektion mittels *High Pure RNA Paraffin Kit* nach den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim, Deutschland) extrahiert. Hierbei wurde ein DNase Verdau durchgeführt. Die Konzentration wurde mit dem Spektralphotometer Nanodrop bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Extrahierte RNA war in den meisten Fällen bereits vorhanden.

3.4.2. DNA-Isolation

Die DNA-Isolation wurde, wie bereits in den Arbeiten von Ott et al. (2003) und Kohlruss, Grosser et al. (2019) beschrieben, aus Formalin-fixiertem Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE) nach manueller Mikrodisektion aus 8µm dicken Schnitten nach Deparaffination und Proteinase K Verdau mit dem *Maxwell® Tissue DNA Purification Kit* nach den Angaben des Herstellers (Promega, Madison, USA) durchgeführt. Es wurden ausschließlich Fälle mit einem Tumorzellgehalt von mehr als 10% eingeschlossen. Extrahierte DNA lag in den meisten Fällen bereits vor.

3.4.3. Verdau genomischer DNA in prätherapeutischen Biopsien

Die vorliegende RNA aus prätherapeutischen Biopsien vor CTx war mittels Phenol-Chloroform-Extraktion im Rahmen der Masterarbeit von Anna Munzig (2013) gewonnen worden. Es erfolgte kein Verdau genomischer DNA (gDNA). Da der in dieser Arbeit verwendete Assay für *PPIA* genomische DNA erkennt, musste vor Durchführung der Genexpressionsanalysen die gDNA entfernt werden. Hierfür wurde die DNase I aus dem *RNeasy® FFPE Kit* verwendet.

Zunächst wurde ein Verdau genomischer DNA mit fünf RNA-Testproben, welche ebenfalls mit Phenol-Chloroform extrahiert wurden, durchgeführt, um einen funktionierenden Verdau zu gewährleisten. In einem Vorversuch wurde die zu erwartende gDNA Menge in den Testproben bestimmt, indem eine qPCR mit diesen und einer reinen gDNA mit einer Konzentration von 200 ng/µl, was einer Verunreinigung der Testproben von 50% gDNA entsprach, durchgeführt wurde. So konnten die Cq Werte der Testproben im Verhältnis zur gDNA betrachtet und deren Anteil an gDNA abgeschätzt werden.

Nun wurden die fünf Testproben auf 400 ng/µl und die reine gDNA aus FFPE-Material auf 200ng/µl verdünnt. Es wurde mit allen Proben je ein Verdau unter Zugabe von 1 µl DNase I und 1,78 µl 10-fach-Puffer und ein blinder Verdau unter Ersatz der DNase I durch 1 µl H₂O durchgeführt. Zur Aktivierung der DNase I wurden die Proben bei 37°C für 45 Minuten inkubiert und anschließend zur Inaktivierung für 10 Minuten auf 75°C erhitzt. Die Konzentrationen wurden nun mit dem *Qubit*® 3.0 Fluorometer unter Verwendung eines RNA spezifischen Assays gemessen. Darauf folgte je eine positive (+RT) und negative reverse Transkription (-RT). In der anschließenden qPCR mit dem Assay für *PPIA* zeigte sich ein Verdau genomischer DNA, da die Cq-Werte um den im Vorversuch abgeschätzten Anteil durch Verlust an gDNA anstiegen und in den Proben mit reiner gDNA und Verdau, sowohl mit +RT als auch -RT, keine Amplifikation detektiert wurde.

3.4.4. Reverse Transkription

Um Expressionsanalysen mit quantitativer real-time PCR (qPCR) durchführen zu können, musste die vorliegende Tumor RNA durch retrovirale Reverse Transkriptasen in komplementäre cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde das *SuperScript™ II First-Strand-Synthesis Kit* verwendet, welches neben dem Enzym zusätzlich Fünffach-FS-Puffer und Dithiothreitol (DTT) enthält. Die cDNA-Synthese wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt und bereits durch Bauer et al. (2017) beschrieben.

Zunächst wurde die RNA auf Eis aufgetaut und mit RNase freiem H₂O auf eine Konzentration von 1 ng/µl ad 17,5 µl verdünnt. Darauf wurden 1 µl Random Primer (200 ng/µl) zu jeder Probe gegeben und diese im Thermocycler für 5 Minuten bei 70°C inkubiert, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzubrechen und das Annealing der Primer zu ermöglichen. Nach Abkühlung der Proben für 5 Minuten auf Raumtemperatur wurden je 11,5 µl des Mastermixes zugegeben, der sich wie in Tabelle 16 beschrieben zusammensetzt.

Tabelle 16: Pipettierschema des Mastermixes für die cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen (µl)
5x FS-Puffer	6 µl
0,1 M DTT	3 µl
10 mM dNTP	1 µl
RNAse Out	0,5 µl
RT Superscript II	1 µl

DTT verhindert die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen (SH-) zu Disulfidbrücken durch Luft-sauerstoff und stabilisiert Proteine so in ihrer funktionalen Form. Unmittelbar vor Verwendung wurden dem Mastermix 0,5 µl RNase Inhibitor *RNAse Out* und 1 µl Reverse Transkriptase *Superscript II* zugefügt.

Die cDNA-Synthese fand bei 42°C für eine Stunde im Thermocycler statt. Am Ende wurde die cDNA bei 70°C für 15 Minuten im Thermoblock abgekocht, um die *SuperScript II* zu inaktivieren. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.4.5. Quantitative real-time PCR (qPCR)

Die qPCR beruht auf der zyklischen Detektion von Fluoreszenzsignalen, deren Intensität von der Amplifikatmenge abhängig ist. Durch Einbeziehung der Amplifikationseffizienz und der Form der Amplifikationskurve (exponentieller Bereich) kann auf die eingesetzte Template-Menge zurückgeschlossen werden. Hier wurden *TaqManTM*-Sonden verwendet, die sich zwischen den Primern an das Template anlagern. Am einen Ende besitzen diese einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff, am anderen einen Quencher, der das Signal unterdrückt. Durch die Exonukleaseaktivität der *AmpliTaqDNA-Polymerase* wird die Sonde bei der Amplifikation der Zielsequenz hydrolysiert, wodurch die räumliche Beziehung zwischen Reporter und Quencher verloren geht und das Fluoreszenzsignal des Reporters detektiert werden kann. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz des Reporters also mit jedem PCR-Zyklus an. Der Zyklus, ab dem das Amplifikationssignal aus dem Hintergrund rauschen hervortritt, wird Cq-Wert genannt und ist umso kleiner, je mehr cDNA am Anfang vorhanden war. Im Idealfall bewirkt eine Verdopplung der Ausgangsmenge eine Reduktion des Cq-Werts um 1.

Der folgende Ablauf wurde bereits durch Bauer et al. (2017) beschrieben. Die qPCR wurde im 384-Well Format mit 10 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Für die Befüllung der 384 Well Platten wurde der Pipettierroboter epMotion 5075 (Eppendorf) verwendet. Der Mastermix wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße vorgelegt (Mastermixzusammensetzung: siehe Tabelle 17). Die Proben-cDNAs wurden 1:5 verdünnt, die cDNA der *Stratagene® QPCR Human Reference Total RNA* (SHR) 1:20 verdünnt in 96-Well-Platten vorgelegt und H₂O als Negativkontrolle mitgeführt. Die Analysen erfolgten in Triplikaten.

Tabelle 17: Pipettierschema des Reaktionsansatzes für die qPCR

Reagenz	Volumen (µl)
TaqMan TM Fast Advanced Master Mix	5
TaqMan TM Geneexpressionsassays	0,5
H ₂ O, PCR-grade, RNase-free	2,5
cDNA	2

Nach Verschluss der Wells wurde die Platte zentrifugiert und in den 384er-Block des Lightcyclers eingelegt. Hierfür wurde das in Tabelle 18 veranschaulichte PCR-Programm mit

Detektion des Fluoreszenzsignals bei 533-610 nm (ROX) und bei 465-510 nm (FAM) verwendet.

Tabelle 18: PCR-Programm für die qPCR

Schritte	°C	T (m:ss)	Zyklen
UNG – Aktivierung	50	5:00	1
UNG - Inaktivierung/Taq Aktivierung	95	2:00	1
Denaturierung	95	0:03	
Annealing		0:30	50
Elongation	60	0:30	
Finale Elongation	60	0:30	1
Kühlen	10	forever	

Die Amplifikationskurven wurden zur Identifikation von Ausreißern im Programm *LightCycler® 480 SW 1.5* analysiert. Diese konnten zum einen an einem auffälligen ROX-Signal, was durch eine geringere Menge Mastermix erklärt werden konnte, erkannt werden. Zum anderen zeigten sich Fehler in der Detektion des Fluoreszenzsignals durch einen stark abweichenden Kurvenverlauf. Bei Standardabweichungen größer gleich 0,5 wurde der Test nach Grubbs durchgeführt. Messungen ohne nachweisbare Amplifikation wurde ein Cq-Wert von 41 zugeordnet. (Bauer et al., 2017)

Die normalisierte relative Quantifizierung wurde mit dem Programm *qBase⁺ 3.0* durchgeführt. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene in Relation zu den Referenzgenen (*B2M*, *IPO8*, *PPIA*) gesetzt. Hierfür wurde eine Weiterentwicklung der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode verwendet. Die Differenz zwischen dem Cq-Wert des Zielgens für die unbekannte Probe und die *Stratagene® QPCR Human Reference Total RNA* (SHR; Kalibrator und Positivkontrolle) ergab den Δ Cq-Wert. Die Amplifikationseffizienzen des Ziel- und Referenzgens wurden nun um den Δ Cq-Wert exponiert und zueinander in Relation gesetzt. (Pfaffl, 2001)

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta Cq_{target} (control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta Cq_{target} (control-sample)}}$$

Formel 1: Berechnung der normalisierten relativen Genexpression nach Pfaffl (2001): E = Amplifikationseffizienz; target = Zielgen; ref = Referenzgen; control = SHR; sample = Probe

Das Programm *qBase⁺ 3.0* benutzt eine Weiterentwicklung der Methode nach Pfaffl (Formel 2). In diese kann mehr als nur ein Referenzgen unter Berechnung des geometrischen Mittels aller Referenzgene miteinfließen (Hellemans et al., 2007).

$$NRQ = \frac{E_{goi}^{\Delta Cq, goi}}{\sqrt[f]{\prod_0^f E_{ref_0}^{\Delta Cq, ref_0}}}$$

Formel 2: Berechnung der relativen Genexpression mit *qBase⁺ 3.0* (Hellemans et al., 2007): E = Amplifikationseffizienz ; Ct = Cq-Wert; goi = gene of interest (Zielgen); ref = Referenzgen

Um mögliche Fehlerquellen bei der Erzeugung der Genexpressionsdaten auszuschließen, wird die Ratio aus Ziel- und Referenzgen aller Proben durch die Ratio aus Ziel- und Referenzgen

renzen der SHR, die zudem als Kalibrator zwischen den verschiedenen Läufen (inter-run) dient, normalisiert. Die hierfür verwendeten Referenzgene sollten stabil exprimiert sein und wurden in vorherigen Experimenten getestet (Bauer et al., 2017). Die logarithmierten Daten der relativen Quantifizierung und die zugehörigen Cq-Werte wurden daraufhin exportiert. Der Fallausschluss erfolgte nun unter Berechnung der intrinsischen Varianz unter Verwendung der Cq-Werte der drei Referenzgene wie folgt:

$$InVar_m[\pm Cq] = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (Cq_n^m - meanCq_n)^2$$

Formel 3: Berechnung der intrinsischen Varianz (Pfaffl et al., 2004)

$$InVar_m[\pm x_{fold}] = E_m^{InVar[\pm Cq]}$$

Formel 4: Berechnung der intrinsischen Varianz unter Berücksichtigung der Amplifikationseffizienz (Pfaffl et al., 2004)

Nach der Excel-basierten Software *Bestkeeper* berechnet sich die intrinsische Varianz einer Probe nach folgenden Schritten:

- 1) Berechnung des geometrisches Mittels aller Proben für jedes Referenzgen
- 2) Differenz aus Cq einer Probe und unter 1) berechnetem geometrischen Mittel aller Proben
- 3) Potenzierung der Effizienz für das Referenzgen mit der unter 2) errechneten Differenz
- 4) Berechnung der Standardabweichung des Wertes aus 3) für die drei Referenzgene

Werte größer 5 ließen auf eine schlechte Qualität der RNA oder Fehler bei der cDNA-Synthese schließen und wurden nicht in die weiteren Analysen mitaufgenommen. (Pfaffl et al., 2004; Bustin et al., 2009) In Tabelle 19 ist der Anteil ausgeschlossener Messungen der qPCR dargestellt.

Tabelle 19: Anteil ausgeschlossener Messungen der qPCR in den Resektaten und Biopsien vor CTx

Gen	Anteil ausgeschlossener Fälle (%)	
	Resektate	Biopsien vor CTx
<i>CDH1</i>	3,5	5,3
<i>VIM</i>	3,5	3,5
<i>ZEB1</i>	3,9	2,9
<i>CDKN1A</i>	4,9	1,8
<i>MDM2</i>	5,8	4,7

3.4.6. Bestimmung der Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Die MSI- und EBV-Analysen wurden bereits in der Publikation mit geteilter Erstautorenschaft Kohlruss M, Grosser B et al. (2019) beschrieben.

Zur Bestimmung der Mikrosatelliteninstabilität wurde eine multiplex PCR sowohl an Tumor DNA als auch an DNA aus dem zugehörigen Normalgewebe durchgeführt. Es wurden zwei

Mononukleotidmarker BAT 25 und BAT26 und drei Dinukleotidmarker D2S123, D5S346 und D17S250 analysiert (Boland et al., 1998). Die zugehörigen Sequenzen sind Tabelle 20 zu entnehmen. Die *forward*-Primer wurden zur Detektion mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Bei den Markern D5S346, D2S123 und BAT 25 war dies FAM, bei BAT 26 und D17S250 HEX.

Tabelle 20: Sequenzen der Primer für die MSI multiplex PCR (Boland et al., 1998)

Marker	Forward Primer Sequenz (5' → 3')	Reverse Primer Sequenz (5' → 3')	bp(Broman et al., 1998)
D5S346	FAM-ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG	AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT	96 - 122
D2S123	FAM-AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA	GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC	197 - 227
BAT 25	FAM-TAC CAG GTG GCA AAG GGC A	TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC	153
BAT 26	HEX-CTG CGG TAA TCA AGT TTT TAG	AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C	116
D17S250	HEX-GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT	GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC	151 - 169

Der Primer-Mix wurde anhand des *Type-it Microsatellite* PCR Protokolls zu einem zehnfach-Primermix angesetzt und bestand aus je 10 µl Forward und Reverse Primer für die Marker D17S250 (3,2 µM) und BAT 26 (0,4 µM) und aus je 5 µl Forward und Reverse Primer für die Marker D5S346 (0,4 µM), D2S123 (1 µM) und BAT 25 (1 µM). Die Mikrosatelliten PCR wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der PCR-Reaktionsansatz ist in Tabelle 21 aufgezeigt. Die PCR wurde im Mastercycler Nexus von Eppendorf mit dem in Tabelle 22 dargestellten Programm durchgeführt.

Tabelle 21: Pipettierschema des Reaktionsansatzes für die MSI multiplex PCR

Reagenz	Volumen (µl)
H ₂ O	4
2x Type-it Multiplex PCR Master Mix*	6,25
Primermix	1,25
DNA (20 ng/µl)	1

Tabelle 22: PCR Programm für die MSI multiplex PCR

PCR	°C	Minuten	Zyklen
Aktivierung	95	5	
Denaturierung	95	0,5	
Annealing	55	1,5	32
Elongation	72	0,5	
Finale Elongation	60	30	
Kühlen	10	forever	

Darauf wurden 4 µl des Amplifikats und 1 µl *Loading Dye* auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei 130 V für 25 Minuten. Anhand der Stärke der Bande wurde die Verdünnung für jede Probe bestimmt (1:5 bis 1:80). Die verdünnten Amplifikate wurden für die Fragmentanalyse verwendet.

Bei der Kapillarelektrophorese werden die geladenen Amplifikate durch Anlegen einer elektrischen Spannung in einer Glaskapillare nach ihrer Größe in einem Polymer aufgetrennt. Bevor sie die Anode erreichen, wandern die Amplifikate durch einen Laserstrahl, der die Farbstoffe zum Fluoreszieren anregt. Das Fluoreszenzsignal wird detektiert.

Der Mastermix (Tabelle 23) für die Kapillarelektrophorese wurde in 96-Well Platten vorgelegt mit einem Reaktionsvolumen von 20,5 µl.

Tabelle 23: Mastermixzusammensetzung für die Kapillarelektrophorese

Reagenz	Volumen (µl)
Formamid	15
ROX	0,5
Amplifikat	5

Vor der Analyse der Amplifikate wurden sie bei 95°C für 2 Minuten im Ofen erhitzt. Die Auswertung der Fragmentanalysen erfolgte mit der *GeneMapper Software* (Applied Biosystem, Version 5).

3.4.7. Bestimmung des EBV-Status

Zur Bestimmung des EBV-Status wurden multiplex PCRs mit extrahierter Tumor DNA für die Virusesequenzen BamHI-W mit einer Basenpaarlänge von 126 und für BamHI-K mit einer Länge von 264 Basenpaaren nach dem Protokoll von Huber et al (2002) durchgeführt. Die Sequenzen sind Tabelle 24 zu entnehmen.

Hierfür wurde folgender Reaktionsansatz verwendet, zu dem je 2 µl Tumor DNA zugegeben wurde. Diese wurde unverdünnt und in der Konzentration 10 µg/µl eingesetzt.

Die PCR wurde im Mastercycler Nexus von Eppendorf mit dem Programm in Tabelle 26 durchgeführt. Darauf wurden die Amplifikate auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, wobei ein EBV⁺-Fall als positiv Kontrolle und eine negativ Kontrolle mitgeführt wurden.

EBV⁺-Fälle in der PCR wurden in der Arbeitsgruppe, wie beschrieben (Kohlruß, Groszer et al., 2019), mittels in situ Hybridisierung unter Verwendung der EBV *early RNA*-Sonde und dem *iVIEW Blue Detection Kit* auf einem Autostainer (Ventana Medical System, Roche) nach den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Positivität lag bei Färbung im Zellkern vor.

Tabelle 24: Sequenzen der Primer für die EBV-multiplex-PCR (Huber et al., 2002)

Primer	Sequenz (5' → 3')
BamHI-W F	TCG GGC CAG AGG TAA GTG GAC TTT AAT
BamHI-W R	ACC GGT GCC TTC TTA GGA GCT GTC
BamHI-K F	TCT CTT TTA GTG TGA ATC ATG TCT GAC GA
BamHI-K R	GCA GCC AAT GCA ACT TGG ACG

Tabelle 25: Pipettierschema des Reaktionsansatzes zum EBV-Nachweis

Reagenz	Volumen (µl)
H ₂ O	18
dUTP's/dTTP's (1:3)	1,25
Puffer (30 mM MgCl ₂)	2,50
F-Primer (10 µM)	0,50
R-Primer (10 µM)	0,50
Taq Gold	0,25
DNA je Ansatz (10 ng/µl)	2

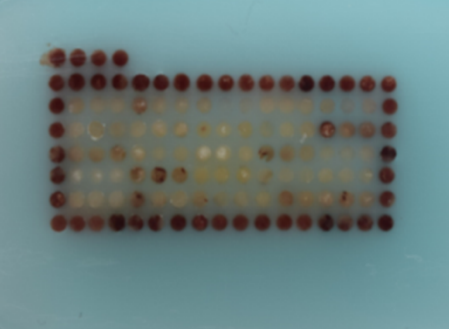
Tabelle 26: PCR Programm für die EBV-multiplex-PCR

PCR	°C	Minuten	Zyklen
Aktivierung	95	10	
Denaturierung	94	1	
Annealing	65	1	37
Elongation	72	1	
Finale Elongation	72	7	
Kühlen	10	forever	

3.4.8. Herstellung der Tissue Microarrays (TMAs)

Für jeden Tumor wurden je drei repräsentative Areale auf dem zugehörigen H.E. Schnitt ausgewählt. Es wurden sowohl zentrale und Randbereiche des Tumors als auch Areale der Invasionsfront gewählt, wobei auf einen hohen Tumoranteil geachtet wurde. Mit einem *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments, Sun Praierie, USA) wurden Stanzen mit einem Durchmesser von 0,6 mm aus dem FFPE-Block in einen leeren Paraffinblock überführt. Ein Beispiel für ein Belegungsschema und einen gestanzten Array ist in Abbildung 5 zu finden. Es wurden insgesamt 16 TMAs mit 360 Tumoren und Kontrollen hergestellt. TMAs mit 258 Tumoren waren bereits vorhanden. Hier waren je Tumor 3 bis 24 Stanzen aufgebracht.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	0
0	w	w	w	w													
1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
2	w	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	w
3	w	6	6	6	7	7	7	8	8	8	9	9	9	10	10	10	w
4	w	11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	w
5	w	16	16	16	17	17	17	18	18	18	19	19	19	20	20	20	w
6	w	21	21	21	22	22	22	23	23	23	24	24	24	25	25	25	w
7	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	0


Abbildung 5: Beispielbelegungsschema und gestanzter TMA

3.4.9. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung wurde an 2 µm Schnitten eines TMAs auf dem *Autostainer Ventana Medical Systems* mit dem *iVIEW DAB Detection Kit* nach den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die Antikörper wurden manuell aufgetragen und sind Tabelle 27 zu entnehmen.

Tabelle 27: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Antigen	Produkt-Nr.	Klon	Hersteller	Verdünnung
E-Cadherin	EP700Y	EP700Y	Cell Marque (Rocklin, United States)	1:100
Vimentin	M0725	V9	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)	1:300
ZEB1	HPA027524	HPA027524	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland)	1:500
TP53	M700129-2	DO-7	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)	1:200

Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit gastrointestinal spezialisierten Pathologen. Jede Stanze wurde einzeln bewertet und ein Durchschnittswert über alle drei Stanzen gebildet und nach den in Tabelle 28 und 29 dargestellten Schemata eingeordnet.

Tabelle 28: Auswerteschema der immunhistochemischen Analyse von p53 (Darb-Esfahani et al., 2016; Köbel et al., 2016)

TP53	Bewertung
<60% der Tumorzellen zeigen eine nukleäre Färbung mit variabler Intensität	Wildtyp Färbemuster (WT)
0% der Tumorzellen zeigen eine positive nukleäre Färbung	Expressionverlust (CA)
≥60% der Tumorzellen zeigen eine nukleäre Färbung mit mittlerer bis starker Intensität	Überexpression (OE)

Tabelle 29: Auswerteschema der immunhistochemischen Analyse der EMT-Marker (Bronsert et al., 2014)

E-Cadherin	Bewertung
≥50% der Tumorzellen zeigen eine positive membranäre Färbung	Negativ
<50% der Tumorzellen zeigen keine positive membranäre Färbung	Positiv
Vimentin	
≥50% der Tumorzellen zeigen eine positive zytoplasmatische Färbung	Negativ
<50% der Tumorzellen zeigen keine positive zytoplasmatische Färbung	Positiv
Zeb1	
<1% der Tumorzellen zeigen eine nukleäre Färbung	Negative
1–10% der Tumorzellen zeigen eine nukleäre Färbung	Niedrig positiv
>10% der Tumorzellen zeigen eine nukleäre Färbung	Stark positiv

3.4.10. Statistische Analysen

Alle Analysen wurden im gesamten Kollektiv und in den Subgruppen getrennt nach Vorhandensein von neoadjuvanter Chemotherapie durchgeführt. Alle statistischen Tests erfolgten auf zweiseitigem 5%-Signifikanzniveau und wurden mit der *Software IBM SPSS Statistics 25* durchgeführt. Die Graphiken wurden mit *GraphPad Prism 5* erstellt.

Die mediane Nachbeobachtungszeit wurde durch die inverse Kaplan-Meier Methode bestimmt. Überlebenskurven wurden entsprechend der Kaplan-Meier Methode erstellt und durch Log-Rank Tests verglichen. Durch Cox-Regressionsmodelle wurden in univariaten und multivariaten Analysen Hazard-Ratios mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen ermittelt. Hierbei wurde darauf geachtet, pro zehn Ereignisse eine Variable einzuschließen. Die Assoziation der Genexpressionsdaten mit klinischen Charakteristika wurde mit dem Chi²-Test bzw. exakten Test nach Fisher (durch Median und *cut-off-Wert* dichotomisierte Werte) und Mann-Whitney-U (zwei mögliche Ausprägungen der ordinal skalierten Variable) oder Kruskal-Wallis Test (mehr als zwei mögliche Ausprägungen der ordinal skalierten Variable) für metrische Werte betrachtet. Außerdem wurden Korrelationen der Gene untereinander mit dem Spearman Korrelationskoeffizienten bestimmt. Die optimalen *cut-off-Werte* der Genexpressionen in Bezug auf das Gesamtüberleben wurden mittels maximaler Teststatistik (*conditional inference test*) in R berechnet (Hothorn & Lausen, 2002) und der Bonferroni-adjustierte p-Wert angegeben.

Zur Berechnung der Quotienten der Genexpressionen wurden entlogarithmierte Werte verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Zusammensetzung des Patientenkollektivs für die mRNA-basierten Analysen

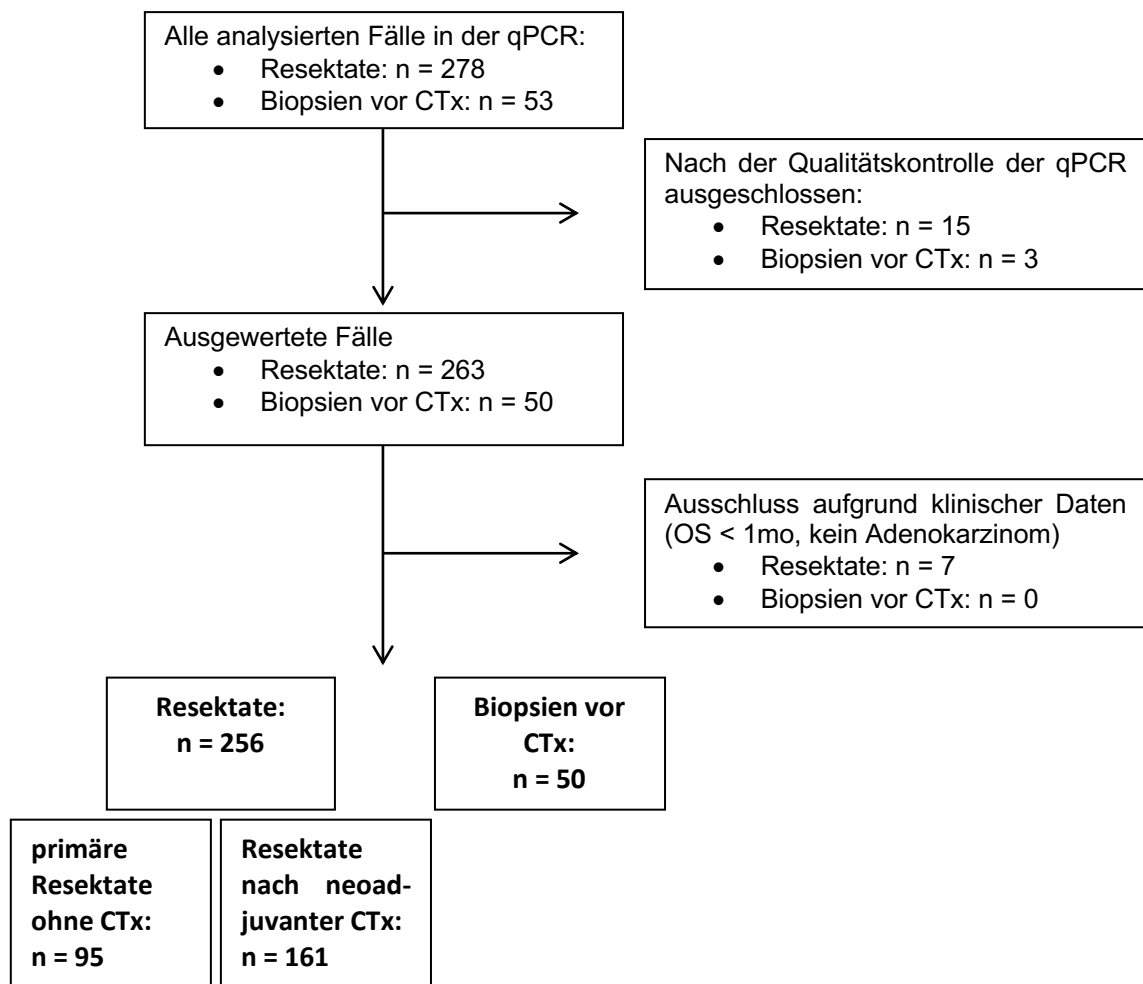


Abbildung 6: Flussdiagramm zur Zusammenstellung des Patientenkollektivs der mRNA-basierten Analysen

Wie in Abbildung 6 gezeigt, wurden insgesamt 278 Resektate und 53 prätherapeutische Biopsien vor neoadjuvanter CTx in der qPCR analysiert. Nach der Qualitätskontrolle der qPCR und dem Patientenausschluss aufgrund klinischer Daten bestand das Kollektiv aus 256 Resektaten und 50 prätherapeutischen Biopsien vor CTx. Die Resektate setzten sich aus 95 primären Resektaten ohne CTx und 161 Resektaten nach neoadjuvanter CTx zusammen. Korrespondierende Paare aus Biopsie vor CTx und Resektat nach neoadjuvanter CTx waren in 14 Fällen vorhanden.

Die Patientencharakteristika aller Resektate und der prätherapeutischen Biopsien mit deren prognostischer Relevanz sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

Tabelle 30: Patientencharakteristika der Kollektive für die mRNA-basierten Analysen und Assoziati-on mit dem Gesamtüberleben der Patienten

Patientencharakteristika	Biopsien vor CTx n (%)	p*	Resektate			
			keine CTx n (%)	p*	CTx n (%)	p*
Total	50 (100)		95 (100)		161 (100)	
Medianes OS (95%KI) [mo]	29,1 (0,6 – 75,3)		n.a.		28,6 (17,9 – 39,3)	
Ereignisse OS	28		26		86	
Mediane Nachbeobachtungs- zeit (95%KI) [mo]	52,1 (45,5 – 58,7)		29,9 (19,3 – 40,5)		60,7 (36,0 – 85,4)	
Alter, in Jahren Range	67 (44 – 79)	0,10	70,3 (38 – 91)	0,01	62 (29 – 81)	0,70
Geschlecht						
weiblich	12 (24,0)	0,26	35 (36,8)	0,33	36 (22,4)	0,03
männlich	38 (76,0)		60 (63,2)		125 (77,6)	
Lokalisation						
Proximal	33 (66,0)		22 (23,2)		108 (67,1)	
Medial	6 (12,0)	0,30	34 (35,8)	0,07	29 (18)	0,23
Distal	11 (22,0)		32 (33,7)		16 (9,9)	
Linitis	0 (0)		7 (7,4)		8 (5,0)	
Laurén						
Intestinal	32 (64,0)	0,25	47 (49,5)	0,55	95 (59)	0,435
Nicht-intestinal	18 (36,0)		48 (50,5)		66 (41)	
Grading						
G1/2	13 (26,0)	0,65	23 (24,2)	0,49	29 (18)	0,25
G3/4	36 (72,0)		72 (75,8)		132 (82)	
k.A.	1 (2,0)		0 (0)		0 (0)	
Resektionsstatus						
R0	42 (84,0)	< 0,01	77 (81,1)	< 0,01	114 (70,8)	< 0,01
R1/2	7 (14,0)		18 (18,9)		47 (29,2)	
k.A.	1 (2,0)					
Metastasenstatus						
M0	34 (68,0)	< 0,01	77 (81,1)	< 0,01	126 (78,3)	< 0,01
M1	12 (24,0)		18 (18,9)		35 (21,7)	
k.A.	4 (8,0)		0 (0)		0 (0)	
Tumorausdehnung						
präoperativ						
cT2	1 (2,0)	0,26	47 (49,5)	< 0,01	7 (4,3)	0,701
cT3/4	48 (96,0)		48 (50,5)		154 (95,7)	
postoperativ						
(y) pT0	2 (4,0)	0,08	0 (0)	< 0,01	0 (0)	< 0,01
(y) pT1	6 (12,0)		23 (24,2)		7 (4,3)	
(y) pT2	12 (24,0)		13 (13,7)		13 (8,1)	
(y) pT3	17 (34,0)		26 (27,4)		86 (53,4)	
(y) pT4	13 (26,0)		33 (34,7)		55 (34,2)	
Lymphknotenstatus						
(y) pN0	22 (44,0)	< 0,01	42 (44,2)	< 0,01	40 (24,8)	< 0,01
(y) pN1/2/3	28 (56,0)		53 (55,8)		121 (75,2)	
Regressionsgrad						
TRG1	10 (20,0)	0,15			0 (0)	0,44
TRG2	8 (16,0)				81 (31,6)	
TRG3	31 (62,0)				80 (31,3)	
k.A.	1 (2,0)				0 (0)	
TRG1	10 (20,0)	0,09				
TRG2/3	39 (78,0)					
k.A.	1 (2,0)					

*p-Wert: Log-Rank Test

Die Patientenkollektive stellten typische Kollektive an Magenkarzinomen dar. So waren der Resektions-, Lymphknoten-, Metastasenstatus und die klinische und pathologische Tumorausdehnung hochsignifikant prognostische Faktoren für das Gesamtüberleben. Hier gingen höhere Werte in den jeweiligen Kategorien mit einem hoch signifikant schlechteren Überleben einher. Auch die Geschlechterverteilung und der Altersmedian lagen im Bereich der zu erwartenden Werte.

Im Kollektiv der Biopsien vor CTx lag das mediane Alter mit 52,1 Jahren eher niedrig. Außerdem fanden sich hier und in den Resektaten nach CTx vermehrt proximale Tumoren mit

mehr als 60% und mit mehr als 95% fast ausschließlich fortgeschrittene Karzinome. Letzteres liegt in der Empfehlung zur perioperativen Chemotherapie bei uT3/4 Tumoren begründet. Wohingegen bei uT2 Tumor eine „Kann-Empfehlung“ vorliegt.

Im Kollektiv der prätherapeutischen Biopsien vor CTx zeigten der Tumorregressionsgrad und insbesondere die Aufteilung in *Responder* und *Nonresponder* eine deutliche Trennung der Überlebenskurven. *Responder* erreichen das mediane Überleben nicht und weisen ein 5-Jahres-Überleben von 70% im Vergleich zu *Nonrespondern* mit 32,7 (16,8 - 48,6) Monaten und einem 5-Jahres-Überleben von 40% auf.

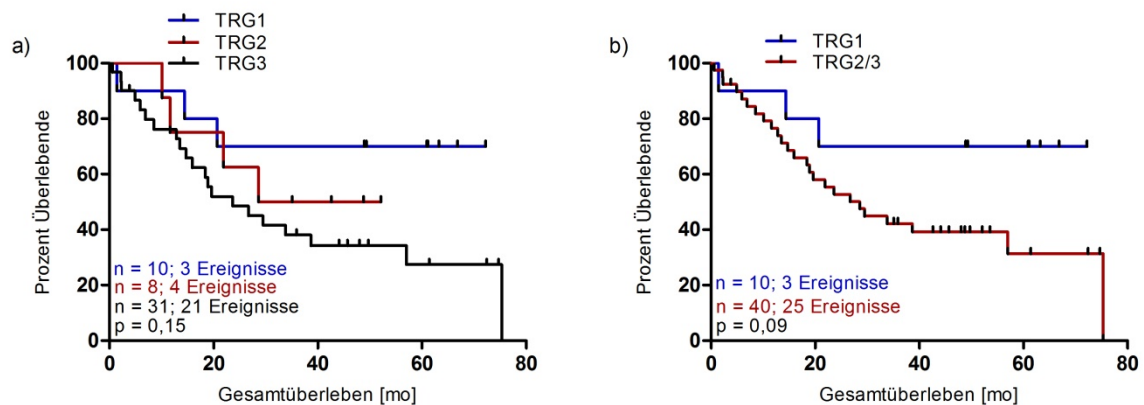


Abbildung 7: Assoziation des Tumorregressionsgrades mit dem Gesamtüberleben in den prätherapeutischen Biopsien vor CTx

4.2. Expressionsanalysen der EMT- und TP53-assoziierten Gene

4.2.1. Assayetablierung

4.2.1.1. Assayauswahl

Für die Expressionsanalysen (qPCR) wurden *TaqManTM*-Assays für die EMT-assoziierten Gene *CDH1*, *VIM*, *ZEB1* und für die Bestimmung der *TP53*-Aktivität für *CDKN1A* und *MDM2* ausgewählt, wobei deren Amplikons exonüberspannend sein und eine Länge zwischen 60bp bis 100bp besitzen sollten. So wurde die Erkennung genomischer DNA (gDNA) durch den Assay verhindert und die Amplifikatlänge für RNA aus FFPE-Gewebe optimiert. Als Referenzgene wurden *B2M*, *IPO8* und *PPIA* gewählt. Die ausgewählten Assays sind im Abschnitt Material und Methoden unter Punkt 3.3.5. in Tabelle 13 zu finden.

4.2.1.2. Assaytest auf Spezifität für cDNA

Daraufhin folgte die Analyse der fünf Assays der Zielgene hinsichtlich ihrer Amplifikation und Spezifität für cDNA, da die Erkennung von gDNA durch den Assay die tatsächlich zugrunde liegende mRNA-Menge überschätzen würde. Hierfür wurde eine qPCR mit der *Stratagene*®

QPCR Human Reference Total RNA (SHR) und zusätzlich mit gDNA aus FFPE-Gewebe durchgeführt, die die Spezifität der Assays bestätigte.

4.2.1.3. Amplifikation von cDNA aus FFPE-Gewebe

Um mögliche unspezifische Nebenprodukte der Assays bei der Amplifikation von cDNA aus FFPE-Gewebe zu identifizieren, wurde eine qPCR mit einem Tumorgemisch (Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:20; 1:40; 1:80) durchgeführt. Dieses bestand aus Tumor- und zugehörigem Normalgewebe dreier verschiedener Tumoren. Auch der Assay des Referenzgens *PPIA* wurde mit dem Tumorgemisch und zusätzlicher gDNA getestet, da dieser möglicherweise genomische DNA erkennt.

Nach Auftragen der Amplifikate aus der qPCR erschienen in der Gelelektrophorese keine Nebenprodukte und die Banden hatten die erwarteten Längen für ihren spezifischen Assay. So stimmte die Amplifikatlänge auch mit den jeweiligen Amplifikationsprodukten der SHR überein.

4.2.1.4. Effizienzermittlung

Die PCR ist eine exponentiell verlaufende Reaktion, bei der unter Annahme einer 100 %igen Effizienz der Reaktion eine Verdopplung (Effizienz = 2) der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus erfolgt. Normalerweise liegt die Effizienz von guten Assays nicht exakt bei 100% (= 2), sondern darüber oder darunter. Um möglichst gleiche Assays auszuwählen und in der relativen Quantifizierung eine Effizienzkorrektur vornehmen zu können, wurde nun die Effizienz der einzelnen Assays durch die Erstellung von Standardkurven ermittelt.

Als Template wurde die SHR verwendet und in den Verdünnungen 1:5, 1:20, 1:80, 1:320, 1:1280, 1:5120, 1:20480 eingesetzt.

Die Effizienz leitet sich aus der Steigung (s) der Standardkurve wie folgt ab: $E=10^{-1/s}$ und wurde vom Programm *qBase*⁺ ausgegeben. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 13 zu finden.

Alle Assays erkannten spezifisch RNA bzw. cDNA und keine Nebenprodukte bei der Amplifikation von FFPE-Material. Beim Assay für *PPIA* war aus Vorversuchen in der Arbeitsgruppe bekannt, dass er möglicherweise gDNA erkennt, dies stellte für die Messung der Proben jedoch kein Problem dar, da diese mit einem DNase Verdau behandelt wurden.

4.2.2. Verteilung der Genexpressionsdaten

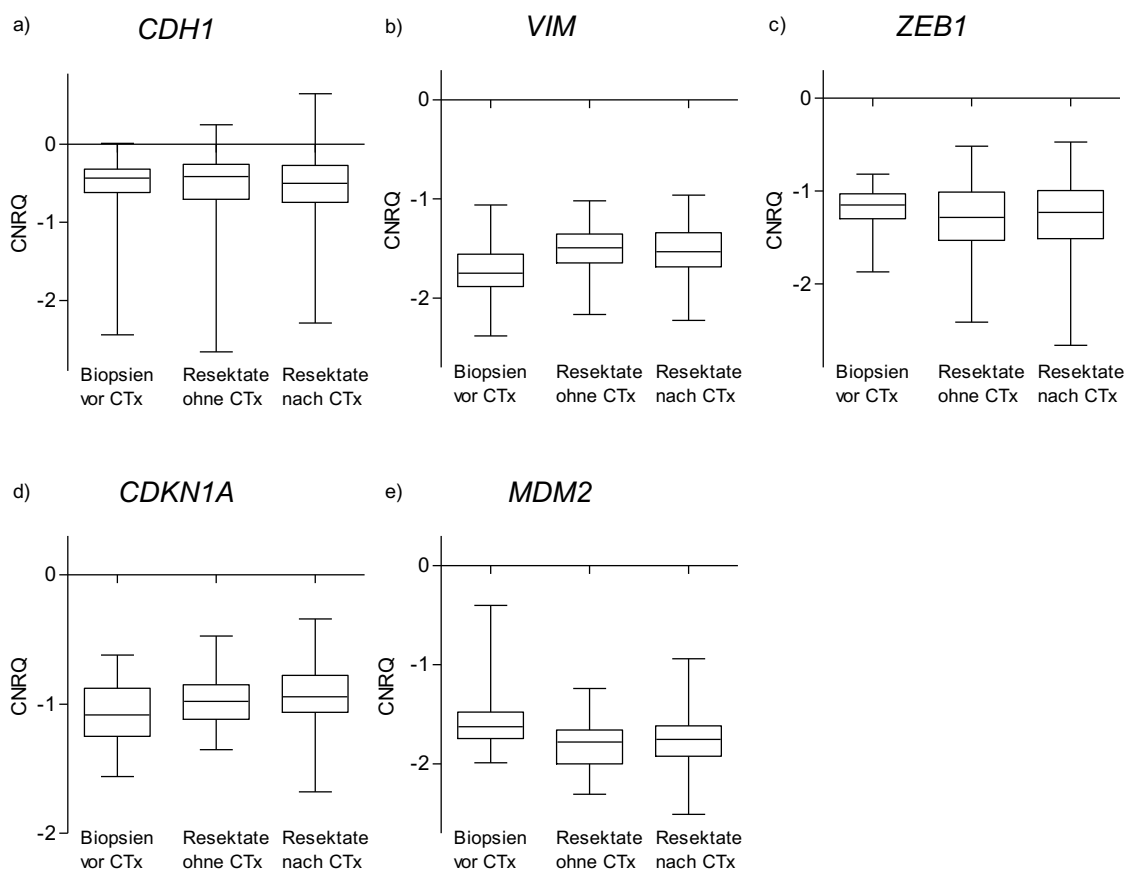


Abbildung 8: Darstellung des Medians, der minimalen und maximalen CNRQ-Werte der einzelnen Gene in den prätherapeutischen Biopsien vor CTx, Resektaten ohne CTx und nach neoadjuvanter CTx

Alle weiteren statistischen Analysen wurden unter Verwendung der Werte der kalibrierten normalisierten relativierten Quantifizierung (CNRQ) durchgeführt (Abbildung 8). Die Verteilung der Expressionsdaten entspricht einer Normalverteilung.

Da die ACRG-Klassifikation von Cristescu et al. (2015) auf RNA-Ebene identifiziert wurde, wurden zunächst Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene mittels qPCR durchgeführt, um den EMT- und *TP53*-Status zu bestimmen. Im Folgenden wurde die klinische, prognostische und prädiktive Relevanz der einzelnen EMT- und *TP53*-assoziierten Gene betrachtet.

4.2.3. Korrelation der Genexpression

Auffällige Assoziationen der EMT-assoziierten Gene untereinander wurden mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman ermittelt. Im Kollektiv der Resektate ohne CTx zeigte die Expression von *ZEB1* eine mittelstarke negative Korrelation mit *CDH1* mit einem Korrelationskoeffizienten von -0,41. Mit *VIM* korrelierte *ZEB1* mittelstark gleichgerichtet mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,40. Dies ließ sich auch in den Resektaten nach CTx beobachten, wobei hier eine stärkere Korrelation zwischen *ZEB1* und *VIM* mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,52 und eine etwas schwächere Korrelation von *ZEB1* und *CDH1* mit einem Korrelationskoeffizienten von -0,37 im Vergleich zu den Resektaten ohne CTx zu er-

kennen war. In den Biopsien vor CTx zeigten *VIM* und *ZEB1* keine negative Korrelation mit *CDH1*. Sie korrelierten untereinander jedoch gleichgerichtet mit einem Koeffizienten von 0,71. Weitere Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 31 zu finden.

Die mit der *TP53*-Aktivität assoziierten Gene *CDKN1A* und *MDM2* zeigten sowohl in den Resektaten ohne CTx als auch in den Resektaten nach CTx keine bedeutende Korrelation. Im Kollektiv der Biopsien vor CTx lag eine gleichgerichtete Korrelation zwischen den zwei Genen mit einem Koeffizienten von 0,29 vor.

Tabelle 31: Korrelation der Gene in prätherapeutischen Biopsien vor CTx, Resektaten ohne CTx und nach CTx

Gene	Biopsien vor CTx		Resektate ohne CTx		Resektate nach CTx	
	ρ	p	ρ	p	ρ	p
<i>CDH1</i> und <i>VIM</i>	0,24	0,10	0,19	0,06	0,04	0,66
<i>CDH1</i> und <i>ZEB1</i>	0,19	0,19	-0,41	< 0,01	-0,37	< 0,01
<i>VIM</i> und <i>ZEB1</i>	0,71	< 0,01	0,40	< 0,01	0,52	< 0,01
<i>CDKN1A</i> und <i>MDM2</i>	0,29	0,04	-0,01	0,97	0,07	0,38

ρ = Korrelationskoeffizient nach Spearman

4.2.4. Assoziation mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika und dem Therapieansprechen

Die Assoziation der Genexpression mit klinisch pathologischen Parametern erfolgte unter Verwendung des Chi²-Tests für Median-dichotomisierte Werte und des Mann-Whitney-U-Tests oder Kruskal-Wallis-Tests für kontinuierliche Werte getrennt nach primären Resektaten ohne CTx, Resektaten nach neoadjuvanter CTx und prätherapeutischen Biopsien vor CTx.

Die Analysen der kontinuierlichen Werte mittels Mann-Whitney-U-Test oder Kruskal-Wallis-Test bestätigten im Wesentlichen die gezeigten Ergebnisse. Alle Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle A1 und A2 zusammengefasst.

4.2.4.1. EMT-assozierte Gene (*CDH1*, *VIM*, *ZEB1*)

CDH1 und *ZEB1* zeigten eine Assoziation mit dem pathologischen T-Stadium. Dies lässt sich sowohl in Resektaten ohne (*CDH1*: $p < 0,05$; *ZEB1*: $p < 0,01$) und nach CTx (*CDH1*: $p < 0,01$; *ZEB1*: $p < 0,01$) beobachten. Wie in Abbildung 9 und 10 dargestellt sind höhere pathologische T-Stadien mit einer hohen Expression von *ZEB1* und entgegengesetzt mit einer niedrigen *CDH1*-Expression assoziiert.

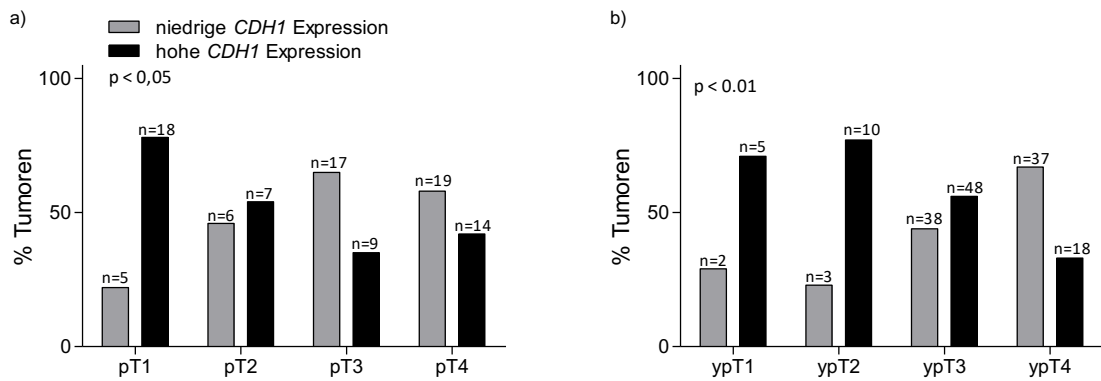


Abbildung 9: Assoziation der Genexpression von *CDH1* mit dem pathologischen T-Stadium in den Resektaten a) ohne CTx und b) nach neoadjuvanter CTx

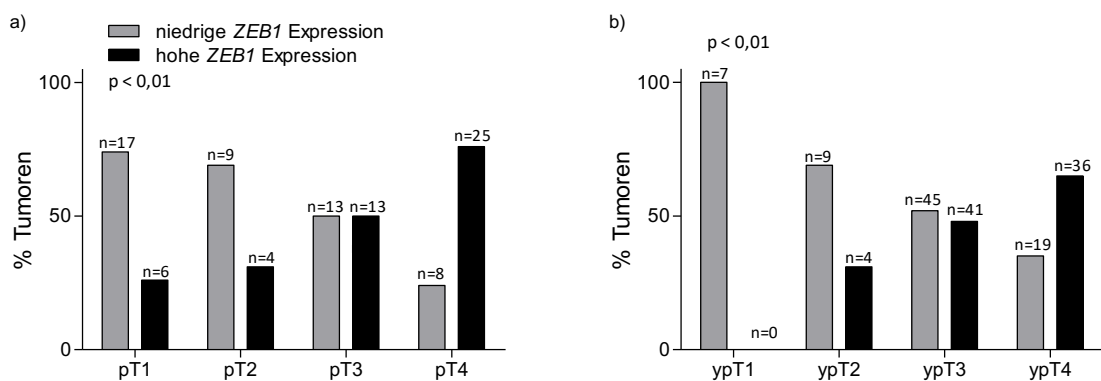


Abbildung 10: Assoziation der Genexpression von *ZEB1* mit dem pathologischen T-Stadium in Resektaten a) ohne CTx und b) nach neoadjuvanter CTx

ZEB1 zeigte in den Resektaten ohne CTx eine Assoziation mit dem Lymphknoten- ($p < 0,05$) und Metastasenstatus ($p < 0,05$) (Abbildung 11). Hohe Werte in den Kategorien waren hier mit einer hohen *ZEB1*-Expression verbunden.

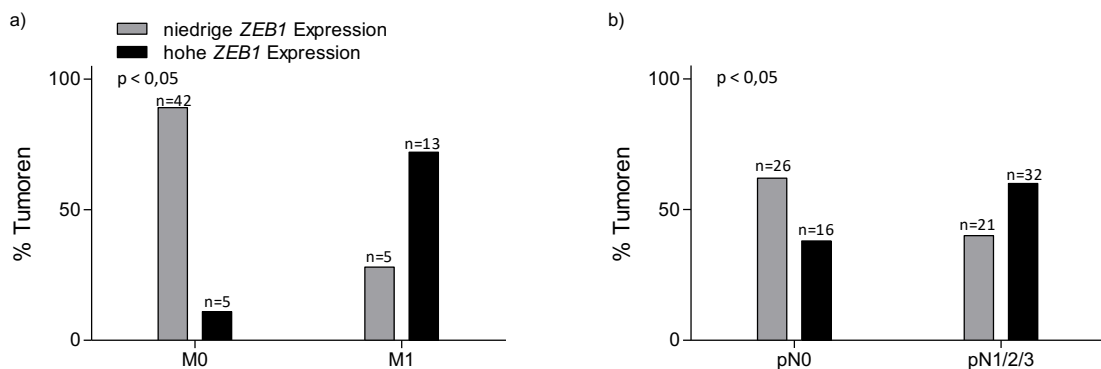


Abbildung 11: Assoziation der Genexpression von *ZEB1* mit dem a) Metastasen- und b) Lymphknotenstatus in Resektaten ohne CTx

Des Weiteren zeigte sich eine Assoziation der Genexpression von *CDH1*, *VIM* und *ZEB1* mit der histologischen Klassifikation nach Laurén wie in Abbildung 12 zu sehen ist. Intestinale Tumoren nach Laurén wiesen sowohl in Resektaten ohne und nach CTx eine hohe *CDH1*-

(ohne CTx: $p = 0,36$; nach CTx: $p < 0,01$), niedrige *VIM*- ($p < 0,01$; $p < 0,01$) und *ZEB1*- ($p < 0,01$; $p < 0,01$) Expression auf. Im Gegensatz dazu war hinsichtlich der nicht-intestinalen Tumoren eine niedrige *CDH1*- und hohe *VIM*- und *ZEB1*-Expression zu beobachten.

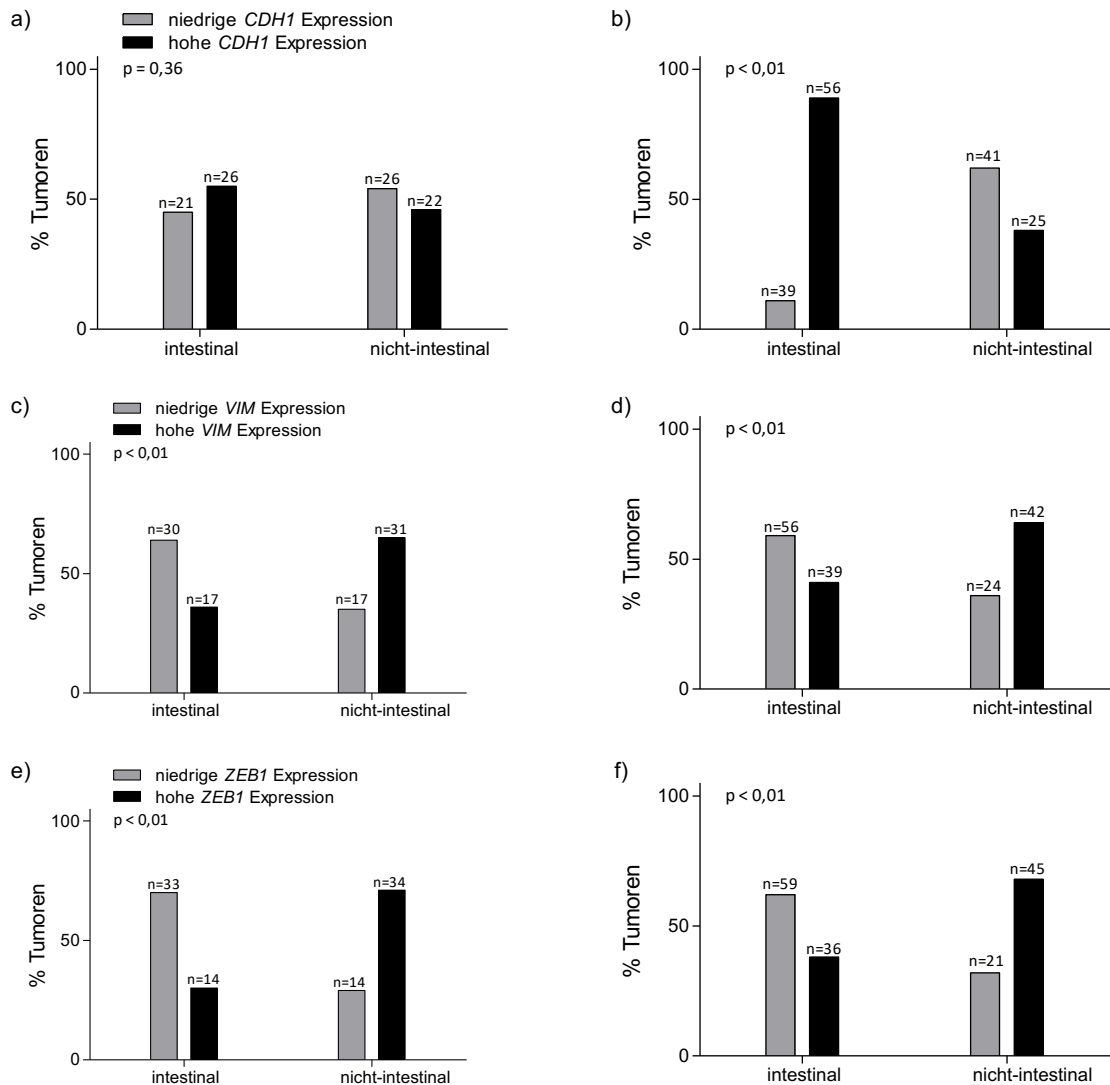


Abbildung 12: Assoziation der Genexpression von a), c), e) *CDH1*, *VIM* und *ZEB1* in Resektaten ohne CTx und von b), d), f) *CDH1*, *VIM*, *ZEB1* in Resektaten nach neoadjuvanter CTx mit der Laurén-Klassifikation

Bei Betrachtung der prätherapeutischen Biopsien zeigte sich eine Assoziation von *CDH1* mit der Tumorlokalisation ($p = 0,05$). Wie in Abbildung 13 zu sehen, fanden sich vermehrt Tumoren mit niedriger *CDH1*-Expression in proximaler Lokalisation.

Außerdem wiesen ältere Patienten eine hohe *VIM*- ($p < 0,05$) und *ZEB1*- ($p < 0,01$) Expression auf.

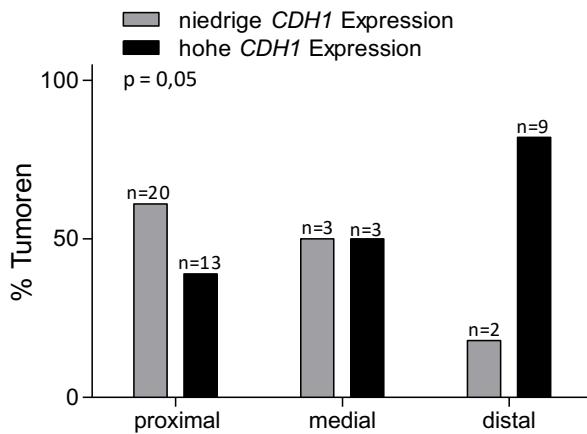


Abbildung 13: Assoziation von *CDH1* mit der Tumorlokalisation in prätherapeutischen Biopsien vor CTx

In Bezug auf das Therapieansprechen zeigten TRG1 Tumoren (*Responder*) eine hohe *CDH1*-Expression ($p = 0,16$; Abbildung 14a). Es lag keine Assoziation hinsichtlich *VIM* und *ZEB1* vor (Abbildung 14b, c). Alle Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle A3 zusammengefasst.

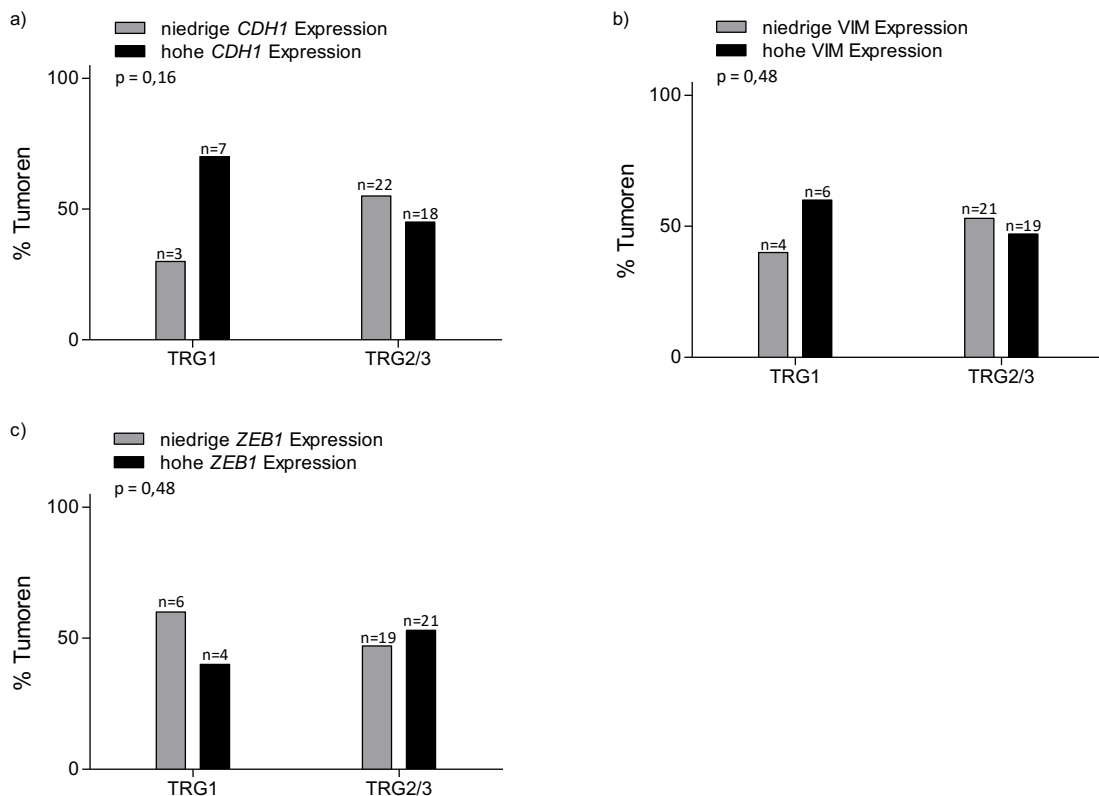


Abbildung 14: Assoziation der a) *CDH1*-, b) *VIM*- und c) *ZEB1*-Expression mit dem Tumorregressionsgrad in prätherapeutischen Biopsien vor CTx

4.2.4.2. TP53-assoziierte Gene (*CDKN1A*, *MDM2*)

Die Expression von *CDKN1A* in Assoziation mit der Tumorlokalisierung in den drei unterschiedlichen Kollektiven wurde in Abbildung 15 dargestellt. In Resektaten ohne CTx war kein Zusammenhang mit der Lokalisation zu erkennen (Abbildung 15a). Wie in Abbildung 15b zu sehen, war in proximalen Tumoren eine hohe *CDKN1A*-Expression ($p = 0,05$) zu beobachten. In den prätherapeutischen Biopsien vor CTx konnte hinsichtlich *CDKN1A* eine signifikante Assoziation ($p = 0,01$) mit der Lokalisation des Tumors (Abbildung 15c) beobachtet werden. Tumoren des proximalen Drittels wiesen im Vergleich zu jenen im medialen und distalen Drittel eine niedrige *CDKN1A*-Expression auf.

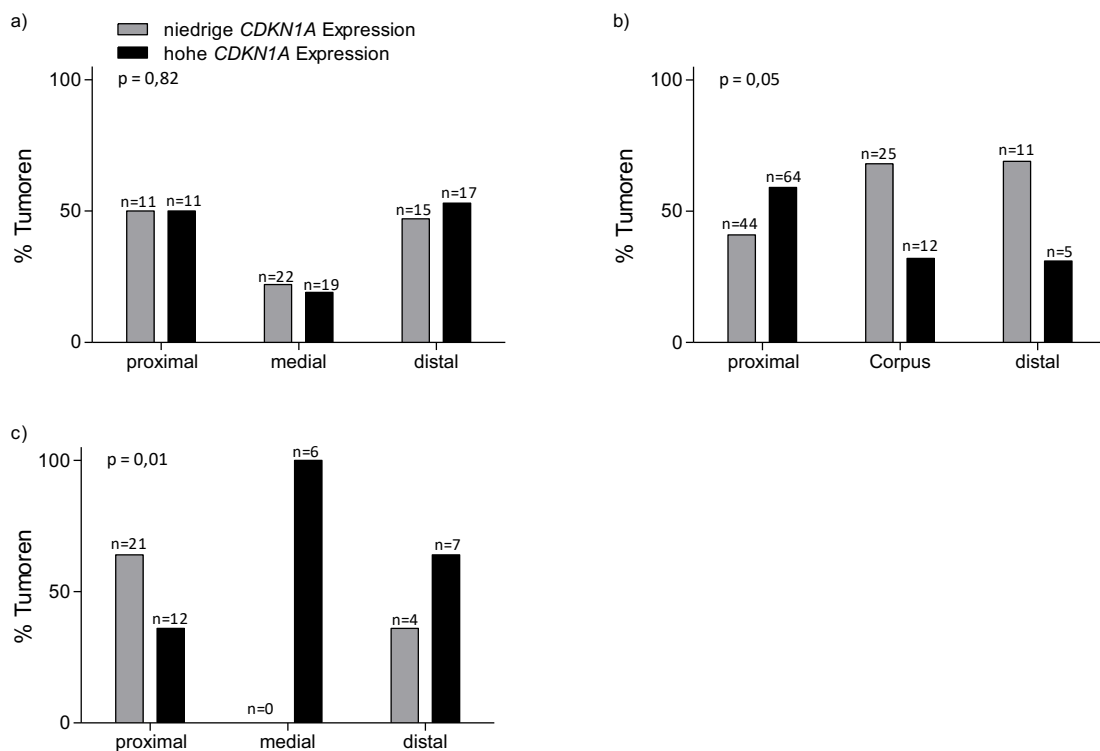


Abbildung 15: Assoziation der *CDKN1A*-Expression mit der Tumorlokalisierung in Resektaten a) ohne und b) nach CTx und in c) prätherapeutischen Biopsien vor CTx

Mit zunehmender Tumorausdehnung nahm, wie in Abbildung 16 gezeigt, in beiden betrachteten Kollektiven, signifikant in den Resektaten nach CTx ($p = 0,05$), auch die Expression von *MDM2* zu.

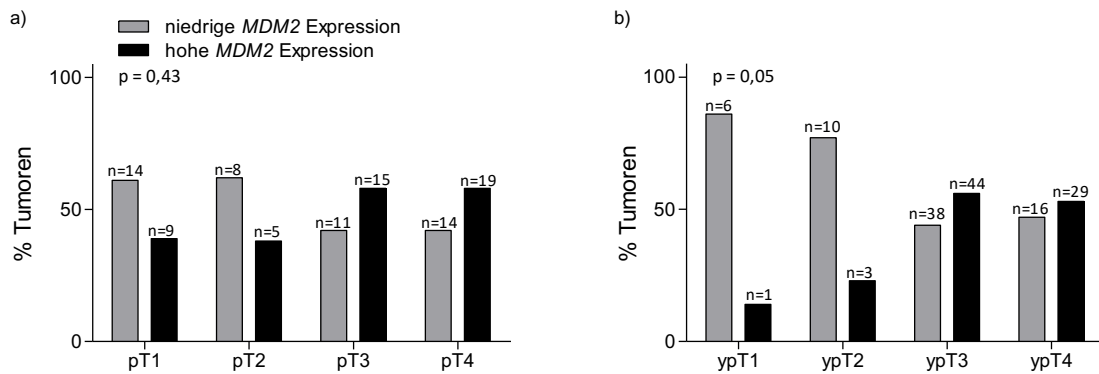


Abbildung 16: Assoziation der *MDM2*-Expression mit dem pT-Stadium in Resektaten a) ohne CTx und b) nach CTx

Die Expression von *MDM2* zeigte in den Biopsien vor CTx keine auffälligen Assoziationen mit Patientencharakteristika.

Hinsichtlich des Therapieansprechens findet sich eine eher hohe *CDKN1A*-Expression in *Respondern* ($p = 0,16$) (Abbildung 17a). *MDM2* zeigte keinen auffälligen Zusammenhang (Abbildung 17b).

Alle Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle A4, A5 und A6 zusammengefasst.

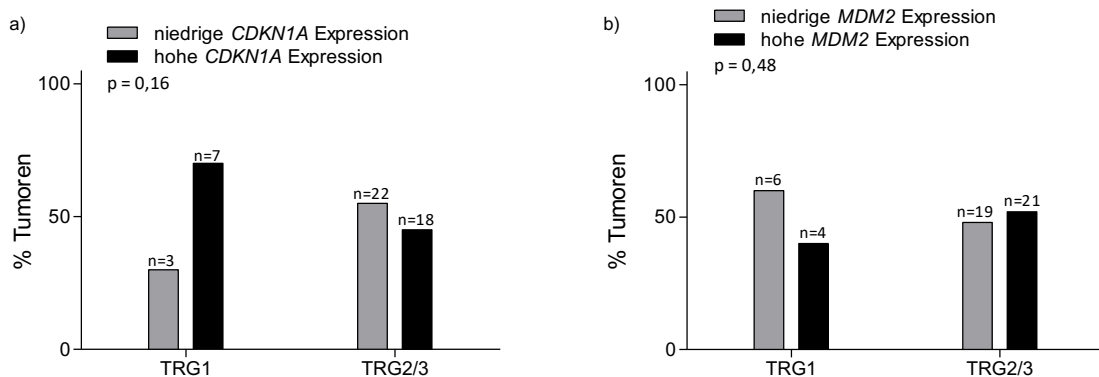


Abbildung 17: Assoziation des Tumorregressionsgrades mit der a) *CDKN1A*- und b) *MDM2*-Expression in prätherapeutischen Biopsien vor CTx

4.2.5. Assoziation mit dem Gesamtüberleben der Patienten

Die Assoziation der Genexpression mit dem Überleben (Tabelle 32) wurde zum einen unter Verwendung Median-dichotomisierter Werte mit dem Log-Rank Test und zum anderen mit kontinuierlichen Werten durch die Cox-Regression, getrennt nach Resektaten ohne CTx, Resektaten nach neoadjuvanter CTx und Biopsien vor CTx, ermittelt.

Zudem wurden durch den *conditional inference* Test optimale *cut-off* Werte berechnet und die Tumoren in Gruppen mit niedriger und hoher Expression getrennt. Im Wesentlichen zeigte sich hier kein Unterschied zur Median-basierten Einteilung.

4.2.5.1. EMT-assoziierte Gene

Bei der Betrachtung der EMT-assoziierten Gene zeigte die Expression von *CDH1* in den Resektaten nach CTx eine signifikante Assoziation mit dem Gesamtüberleben. Dies konnte sowohl im Log-Rank Test ($p < 0,01$) als auch in der univariaten Cox-Regression (HR, 0,33, 95% KI, 0,17 – 0,61, $p < 0,01$; Tabelle 32) nachgewiesen werden. So lag das mediane OS in der Gruppe mit hoher *CDH1*-Expression bei 37,9 im Gegensatz zu 18,4 Monaten in der Gruppe mit niedriger *CDH1*-Expression.

Des Weiteren wurde die *CDH1*-Expression durch ein multivariates Cox-Regressionsmodell analysiert. Hierbei wurden zusätzlich das pTNM-Stadium und der Resektionsstatus als mögliche Einflussgrößen betrachtet. Wie in Tabelle 33 zu sehen wurde die *CDH1*-Expression im Kollektiv der Resektate nach CTx zusätzlich nach dem Metastasen- und Resektionsstatus in das Modell integriert (HR, 0,35, 95% KI, 0,19 – 0,66, $p < 0,01$).

Bei Betrachtung der Resektate ohne CTx und der Biopsien vor CTx waren keine auffälligen Ergebnisse zu erkennen.

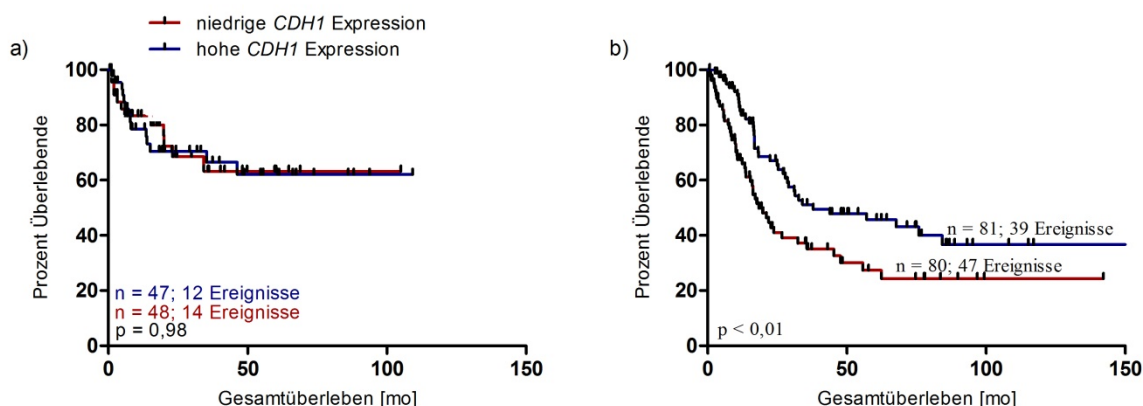


Abbildung 18: *CDH1*-Expression und Gesamtüberleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter CTx

Tabelle 32: Assoziation des Gesamtüberlebens mit der *CDH1*-, *VIM*- und *ZEB1*-Expression

	Gene	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p [†]
Biopsien vor neoadjuvanter CTx	<i>CDH1</i> < Median	25	13	47,7	38,7 (n.a.)	0,77	0,81 (0,22 – 2,96)	0,75
	<i>CDH1</i> ≥ Median	25	14	37,5	29,5 (11,0 – 48,0)			
Resektate ohne neoadjuvante CTx	<i>CDH1</i> < Median	47	12	63,3	n.e.	0,98	0,89 (0,39-2,02)	0,78
	<i>CDH1</i> ≥ Median	48	14	62,1	n.e.			
Resektate nach neoadjuvanter CTx	<i>CDH1</i> < Median	80	47	27,4	18,4 (13,1 – 23,7)	<0,01	0,33 (0,17-0,61)	<0,01
	<i>CDH1</i> ≥ Median	81	39	45,7	37,9 (3,2 – 72,6)			
Biopsien vor neoadjuvanter CTx	<i>VIM</i> < Median	25	15	41,8	33,8 (19,5 – 48,1)	0,90	2,59 (0,56 - 11,96)	0,22
	<i>VIM</i> ≥ Median	25	12	41,7	21,9 (0,6 – 71,2)			
Resektate ohne neoadjuvante CTx	<i>VIM</i> < Median	47	10	70,8	n.e.	0,38	0,74 (0,13 – 4,25)	0,73
	<i>VIM</i> ≥ Median	48	16	56,1	n.e.			
Resektate nach neoadjuvanter CTx	<i>VIM</i> < Median	80	42	32,3	27,1 (14,7 – 39,5)	0,59	0,84 (0,36 – 1,99)	0,69
	<i>VIM</i> ≥ Median	81	44	41,4	32,7 (13,0 – 52,3)			
Biopsien vor neoadjuvanter CTx	<i>ZEB1</i> < Median	25	15	37,6	29,5 (15,3 – 43,7)	0,55	2,76 (0,43 - 17,83)	0,29
	<i>ZEB1</i> ≥ Median	25	12	43,3	57,0 (0,6 – 118,8)			

Resektate ohne neoadjuvante CTx	<i>ZEB1</i> < Median	47	9	76,1	n.e.	0,20	1,75 (0,62 - 4,97)	0,29
	<i>ZEB1</i> ≥ Median	48	17	53,2	n.e.			
Resektate nach neoadjuvanter CTx	<i>ZEB1</i> < Median	80	40	37,6	26,7 (18,7 – 34,7)	0,95	1,30 (0,71 - 2,36)	0,39
	<i>ZEB1</i> ≥ Median	81	46	37,2	32,4 (18,5 – 46,3)			

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

Tabelle 33: Multivariate Cox-Regression: Assoziation von *CDH1*, (y)pTNM und R mit dem Gesamtüberleben

	Variablen in der Gleichung	HR	95% KI	p*
Biopsien vor neoadjuvanter CTx	N-Status (Ref. N0)	2,92	1,21 – 7,09	0,02
	R-Status (Ref. R0)	2,78	1,02 – 7,58	0,05
Resektate ohne neoadjuvante CTx	R-Status (Ref. R0)	5,17	2,27 – 11,78	<0,01
	M-Status (Ref. M0)	3,02	1,86 – 4,90	<0,01
Resektate nach neoadjuvanter CTx	R-Status (Ref. R0)	2,45	1,53 – 3,93	<0,01
	<i>CDH1</i> (Ref. <i>CDH1</i> < Median)	0,35	0,19 – 0,66	<0,01
	N-Status (Ref. N0)	2,14	1,14 – 4,02	0,02

*p-Wert: Log-Rank Test

4.2.5.2. *TP53*-assoziierte Gene

Eine signifikante Assoziation mit dem Überleben wies hinsichtlich der *TP53*-assoziierten Gene die Expression von *MDM2* in den Resektaten ohne CTx auf (HR 6,07, 95% KI, 1,27 - 20,0, p = 0,02; Tabelle 34; Abbildung 19). Patienten mit niedriger Expression erreichten das mediane Überleben nicht, jene mit hoher Expression hatten ein medianes Überleben von 46,3 Monaten. Das 5-Jahres-Überleben derjenigen mit niedriger *MDM2*-Expression lag bei 76,9%, jenes der Patienten mit hoher Expression bei 41,3%. In die multivariate Cox-Regression wurde die *MDM2*-Expression nicht zusätzlich zu den klinisch-pathologischen Faktoren mitaufgenommen (Tabelle 35). *CDKN1A* zeigte keine Assoziation mit dem Überleben.

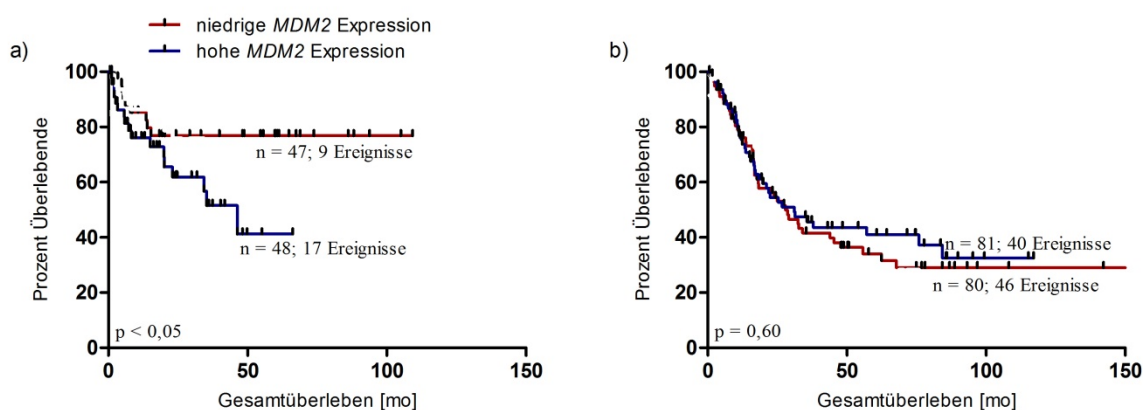


Abbildung 19: *MDM2*-Expression und Gesamtüberleben in Resektaten a) ohne und b) nach CTx

Tabelle 34: Assoziation des Gesamtüberlebens mit der *CDKN1A*- und *MDM2*-Expression

	Gene	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p†
Biopsien vor neoadjuvanter CTx	<i>CDKN1A</i> < Median	25	15	26,4	29,5 (10,1 – 48,9)	0,30	0,55 (0,1 – 3,02)	0,49
	<i>CDKN1A</i> ≥ Median	25	12	52,3	75,3 (n.a.)			

Resektate ohne neoadjuvante CTx	<i>CDKN1A</i> < Median	47	13	59,2	n.e.	0,50	1,00 (0,13 – 7,63)	1,00
	<i>CDKN1A</i> ≥ Median	48	13	65,7	n.e.			
Resektate nach neoadjuvanter CTx	<i>CDKN1A</i> < Median	80	40	35,4	25,3 (13,5 – 37,1)	0,91	0,61 (0,24 – 1,57)	0,31
	<i>CDKN1A</i> ≥ Median	81	46	38,8	29,0 (12,7 – 45,3)			
Biopsien vor neoadjuvanter CTx	<i>MDM2</i> < Median	25	15	35,1	20,7 (15,3 – 26,1)	0,11	1,63 (0,38 – 6,99)	0,52
	<i>MDM2</i> ≥ Median	25	12	47,5	57,0 (n.a.)			
Resektate ohne neoadjuvante CTx	<i>MDM2</i> < Median	47	9	76,9	n.e.	0,04	6,07 (1,27 - 29,00)	0,02
	<i>MDM2</i> ≥ Median	48	17	41,3	46,3 (28,0–64,6)			
Resektate nach neoadjuvanter CTx	<i>MDM2</i> < Median	80	46	34,1	27,9 (17,7-38,1)	0,60	1,46 (0,68 - 3,15)	0,33
	<i>MDM2</i> ≥ Median	81	40	41,0	31,0 (15,4-46,6)			

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

Tabelle 35: Multivariate Cox-Regression: Assoziation von *MDM2*, (y)pTNM und R mit dem Gesamtüberleben

Kollektiv	Variablen in der Gleichung	HR	95% KI	p*
Biopsien vor neoadjuvanter CTx	N-Status (Ref. N0)	2,92	1,21 – 7,09	0,02
	R-Status (Ref. R0)	2,78	1,02 – 7,58	0,05
Resektate ohne neoadjuvante CTx	R-Status (Ref. R0)	5,17	2,27 – 11,78	< 0,01
	M-Status (Ref. M0)	2,81	1,73 – 4,57	< 0,01
Resektate nach neoadjuvanter CTx	R-Status (Ref. R0)	2,57	1,59 – 4,15	< 0,01
	N-Status (Ref. N0)	2,25	1,20 – 4,21	0,01

*p-Wert: Log-Rank Test

4.3. EMT-Klassifikation

Die Expressionsanalysen der Gene *CDH1*, *VIM* und *ZEB1* sollten nun kombiniert werden, um die EMT-Subgruppe der ACRG-Klassifikation zu identifizieren. In der Literatur findet sich hierzu keine eindeutige Vorgehensweise, weshalb nachfolgend drei verschiedene Methoden auf die unterschiedlichen Kollektive angewandt wurden.

4.3.1. *CDH1/VIM*- und *CDH1/ZEB1*-Quotient

In Anlehnung an Loboda et al. (2011) wurde zum einen der Quotient aus der Expression (entlogarithmierte Werte) von *CDH1* und *VIM* und zum anderen aus *CDH1* und *ZEB1* gebildet. Getrennt nach Resektaten ohne neoadjuvante CTx, Resektaten nach neoadjuvanter CTx und prätherapeutischen Biopsien vor CTx wurden optimale *cut-off*-Werte der Quotienten für eine Trennung hinsichtlich des Überlebens mit der maximalen Teststatistik berechnet, die Tabelle 36 und 37 zu entnehmen sind. Ein niedriger Quotient wird als Surrogat für einen eher mesenchymalen Tumortyp gewertet.

Tabelle 36: Median, Minimum, Maximum und optimale *cut-off* Werte des *CDH1/VIM*-Quotienten

Kollektiv	Minimum	Maximum	Median	Optimaler <i>cut-off</i> Wert
alle Resektate	0,05	105,65	11,44	22,70
Resektate ohne CTx	0,06	51,25	12,49	2,85
Resektate nach CTx	0,05	105,65	10,78	22,62
Biopsien vor CTx	0,06	60,06	22,98	26,80

Tabelle 37: Median, Minimum, Maximum und optimale *cut-off* Werte des *CDH1/ZEB1*-Quotienten

Kollektiv	Minimum	Maximum	Median	Optimaler <i>cut-off</i> Wert
alle Resektate	0,01	606,97	5,68	7,96
Resektate ohne CTx	0,01	353,08	7,64	7,96

Resektate nach CTx	0,11	606,97	5,06	5,71
Biopsien vor CTx	0,03	36,13	5,53	7,88

Der Quotient aus *CDH1/VIM* (Abbildung 20) war bei Betrachtung aller Resektate ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,03$; HR 0,99, 95% KI 0,97 - 1,02, $p = 0,10$) und der Patienten nach CTx ($p_{\text{Log-Rank}} < 0,01$; HR, 0,98, 95% KI, 0,97 – 1,00, $p = 0,08$) mit dem Gesamtüberleben assoziiert. Mit niedrigem Wert erreichten diese ein medianes Überleben von 21,9 Monaten und ein 5-Jahres-Überleben von 29% im Vergleich zu 58,6% bei hohem Quotienten. In den primären Resektaten ohne CTx ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,84$) und den prätherapeutischen Biopsien vor CTx ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,82$) war kein Einfluss des *CDH1/VIM*-Quotienten auf das Überleben zu erkennen.

Bei Betrachtung des gesamten Kollektivs ($p_{\text{Log-Rank}} < 0,01$; HR, 0,29, 95% KI, 0,06 – 1,35, $p = 0,12$) und der Resektate nach CTx ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,05$; HR, 1,0, 95% KI, 1,0 – 1,0, $p = 0,83$) zeigte sich eine Assoziation des *CDH1/ZEB1*-Quotienten (Abbildung 21) mit dem Überleben unter Verwendung der dichotomisierten Werte, jedoch nicht in der univariaten Cox-Regression.

Die Patienten nach CTx wiesen mit einem niedrigen Wert ein schlechteres Überleben mit 19,7 Monaten und einem 5-Jahres-Überleben von 29,4% im Vergleich zu den Patienten mit hohem Quotienten mit 47,7 Monaten und 46,1% 5-Jahres-Überleben auf. Im Kollektiv der primär resezierten Patienten ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,31$) und prätherapeutischen Biopsien vor CTx ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,92$) war keine signifikante Assoziation des *CDH1/ZEB1*-Quotienten mit dem Überleben zu beobachten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 38 zusammengefasst.

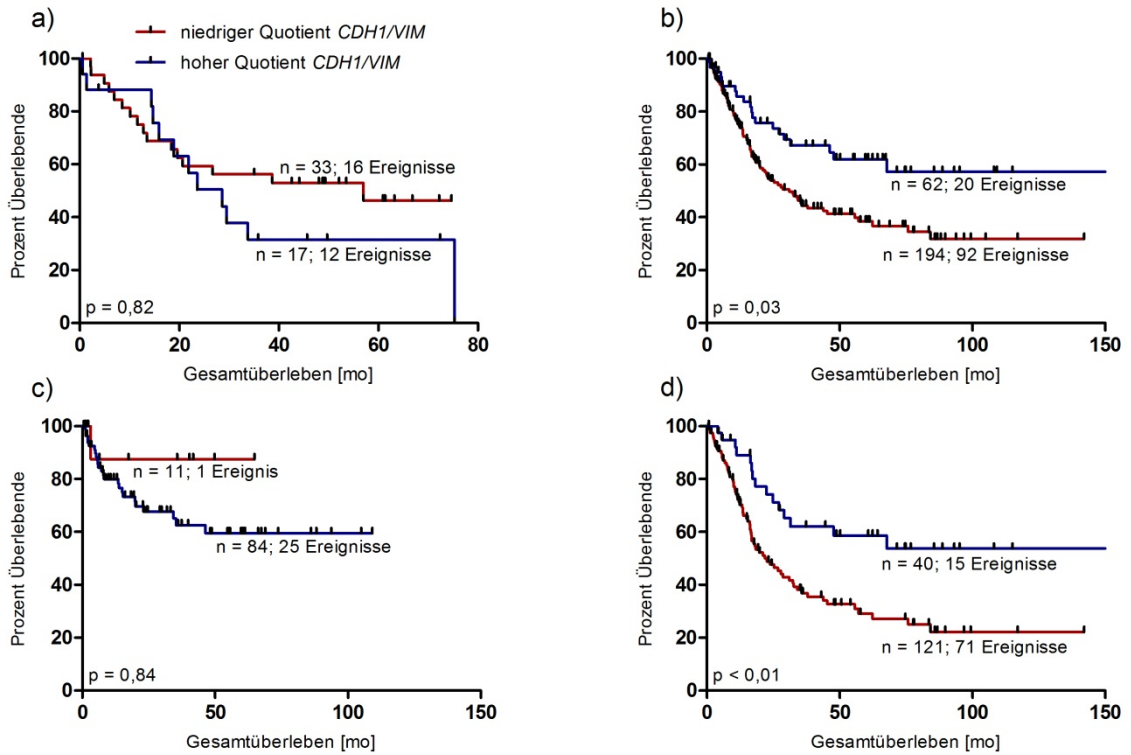


Abbildung 20: Assoziation des *CDH1/VIM*-Quotienten mit dem Gesamtüberleben in a) prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx, b) allen Resektaten, c) Resektaten ohne CTx und d) Resektaten nach CTx

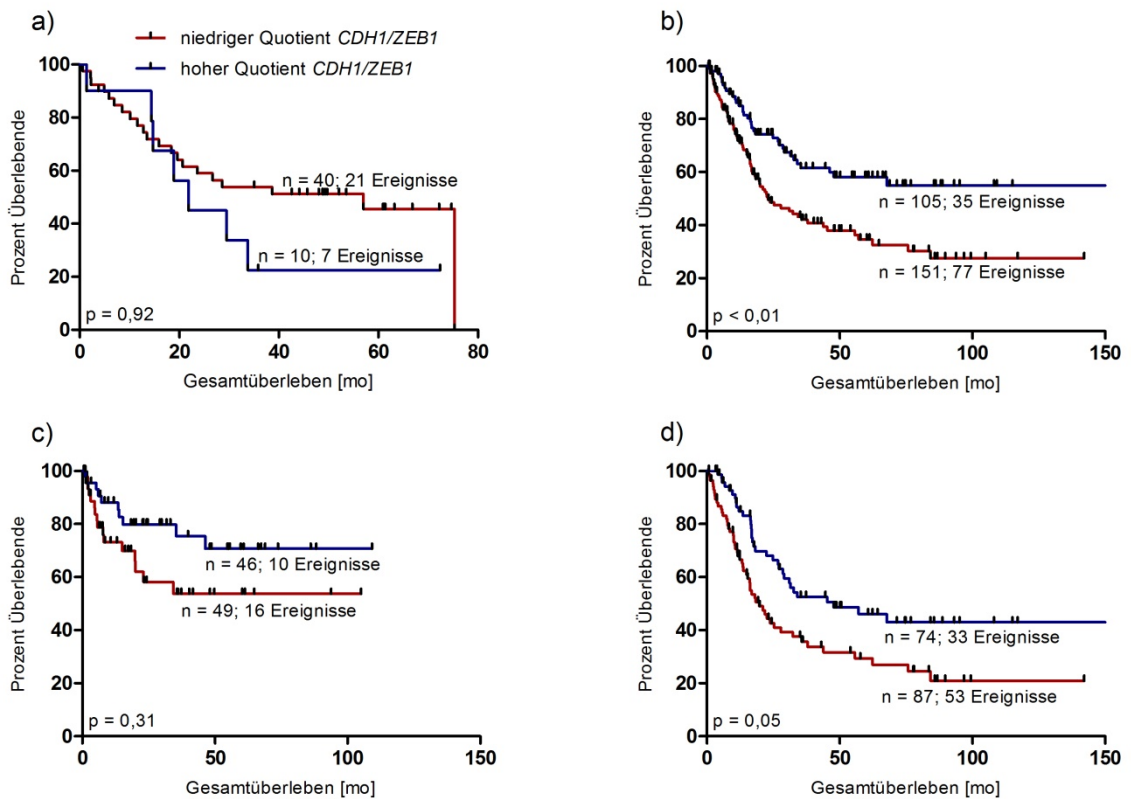


Abbildung 21: Assoziation des *CDH1/ZEB1*-Quotienten mit dem Gesamtüberleben in a) prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx, b) allen Resektaten, c) Resektaten ohne CTx und d) Resektaten nach CTx

Tabelle 38: Assoziation des CDH1/VIM- und CDH1/ZEB1-Quotienten mit dem Gesamtüberleben

		n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p†	
CDH1/VIM Quotient	Biopsien vor neoadjuvanter CTx	niedrig	33	16	46,3	57,0 (n.a.)	0,82	0,99 (0,96 - 1,03)	0,68
		hoch	17	12	31,5	28,6 (15,7-41,5)			
	Alle Resektate	niedrig	194	92	38,4	31,0 (21,4-40,6)	0,03	0,99 (0,97 - 1,02)	0,10
		hoch	62	20	62,0	n.e.			
	Resektate ohne neoadjuvante CTx	niedrig	11	1	87,5	n.e.	0,84	1,0 (0,96 - 1,03)	0,78
		hoch	84	25	59,5	n.e.			
	Resektate nach neoadjuvanter CTx	niedrig	121	71	46,3	21,9 (13,0-30,8)	0,82	0,98 (0,97 - 1,00)	0,08
		hoch	40	15	31,5	28,6 (15,7-41,5)			
CDH1/ZEB1 Quotient	Biopsien vor neoadjuvanter CTx	niedrig	40	21	45,5	57,0 (41,9-72,1)	0,92	0,99 (0,92 - 1,06)	0,68
		hoch	10	7	22,5	21,9 (13,2-30,6)			
	Alle Resektate	niedrig	151	77	34,5	23,0 (12,9-33,1)	< 0,01	0,29 (0,06 - 1,35)	0,12
		hoch	105	35	58,3	n.e.			
	Resektate ohne neoadjuvante CTx	niedrig	49	16	53,7	n.e.	0,31	1,0 (0,99 - 1,00)	0,74
		hoch	46	10	70,7	n.e.			
	Resektate nach neoadjuvanter CTx	niedrig	87	53	29,4	19,7 (12,9-26,5)	0,049	1,0 (1,00 - 1,00)	0,83
		hoch	74	33	46,1	47,7 (11,9-83,5)			

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

4.3.2. Gewichteter Mittelwert der EMT-assoziierten Gene (EMT-Score)

Neben dem Quotienten aus *CDH1* und *ZEB1* wurde für jeden Patienten ein *EMT-Score* gebildet, der sich aus dem Regressionskoeffizienten (Tabelle 39) und den normalisierten relativierten Genexpressionswerten wie folgt zusammensetzt. Es wurden optimale *cut-off* Werte des *EMT-Scores* in Bezug auf das Überleben bestimmt, die in Tabelle 40 zu finden sind. Ein hoher *EMT-Score* wurde als Surrogat für einen eher mesenchymalen Tumortyp gewertet.

$$EMT - Score_i = \beta_1 CDH1_i + \beta_2 VIM_i + \beta_3 ZEB1_i$$

Formel 5: Berechnung des *EMT-Scores*; β = Regressionskoeffizient

Tabelle 39: Regressionskoeffizienten zur Berechnung des EMT-Scores

Kollektiv	$\beta_1(CDH1)$	$\beta_2(VIM)$	$\beta_3(ZEB1)$
Alle Resektate	-0,534	-0,492	0,301
Resektate ohne neoadjuvante CTx	0,192	-0,744	0,800
Resektate nach neoadjuvanter CTx	-1,217	-0,007	-0,216
Biopsien vor neoadjuvanter CTx	-0,241	0,634	0,512

Tabelle 40: Median, Minimum, Maximum und optimale cut-off Werte des EMT-Scores

Kollektiv	Minimum	Maximum	Median	Optimaler cut-off Wert
Alle Resektate	-0,48	1,97	0,64	0,79
Resektate ohne neoadjuvante CTx	-0,87	0,48	0,04	0,12
Resektate nach neoadjuvanter CTx	-0,31	3,09	0,86	1,10
Biopsien vor neoadjuvanter CTx	-2,18	-0,66	-1,62	-1,88

Im gesamten Kollektiv ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,02$; HR, 2,72, 95% KI, 1,38 – 5,35, $p < 0,01$) und den Resektaten nach CTx ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,02$; HR, 2,72, 95% KI, 1,57 – 4,70, $p < 0,01$) war der

EMT-Score, wie in Tabelle 41 und Abbildung 22 gezeigt, mit dem Überleben assoziiert. Im Kollektiv der CTx-Patienten ging ein hoher *Score* mit einem medianen Überleben von 15,3 im Vergleich zu 34 Monaten bei niedrigem *Score* mit einem besseren Überleben einher. Bei Betrachtung der Resektate ohne CTx ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,23$) waren keine Assoziationen mit dem Überleben zu erkennen.

Tabelle 41: Assoziation des *EMT-Scores* mit dem Gesamtüberleben

	<i>EMT-Score</i>	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p^*	HR (95% KI)	p^\dagger
Biopsien vor neoadjuvanter CTx	niedrig	7	3	57,1	n.e.	0,81	2,72 (0,63 – 11,72)	0,18
	hoch	43	25	38,3	28,6 (8,1 – 49,1)			
Alle Resektate	niedrig	180	70	52,0	75,8 (n.a.)	0,02	2,72 (1,38 – 5,35)	< 0,01
	hoch	76	42	25,6	21,0 (14,7-27,3)			
Resektate ohne neoadjuvante CTx	niedrig	63	13	53,7	nicht erreicht	0,23	2,72 (0,59 – 12,48)	0,20
	hoch	32	13	70,7	nicht erreicht			
Resektate nach neoadjuvanter CTx	niedrig	115	57	44,3	34,0 (7,4-60,6)	0,02	2,72 (1,57 – 4,70)	< 0,01
	hoch	46	29	14,8	15,3 (8,9-21,7)			

* p -Wert: Log-Rank Test; $^\dagger p$ -Wert: Cox-Regression

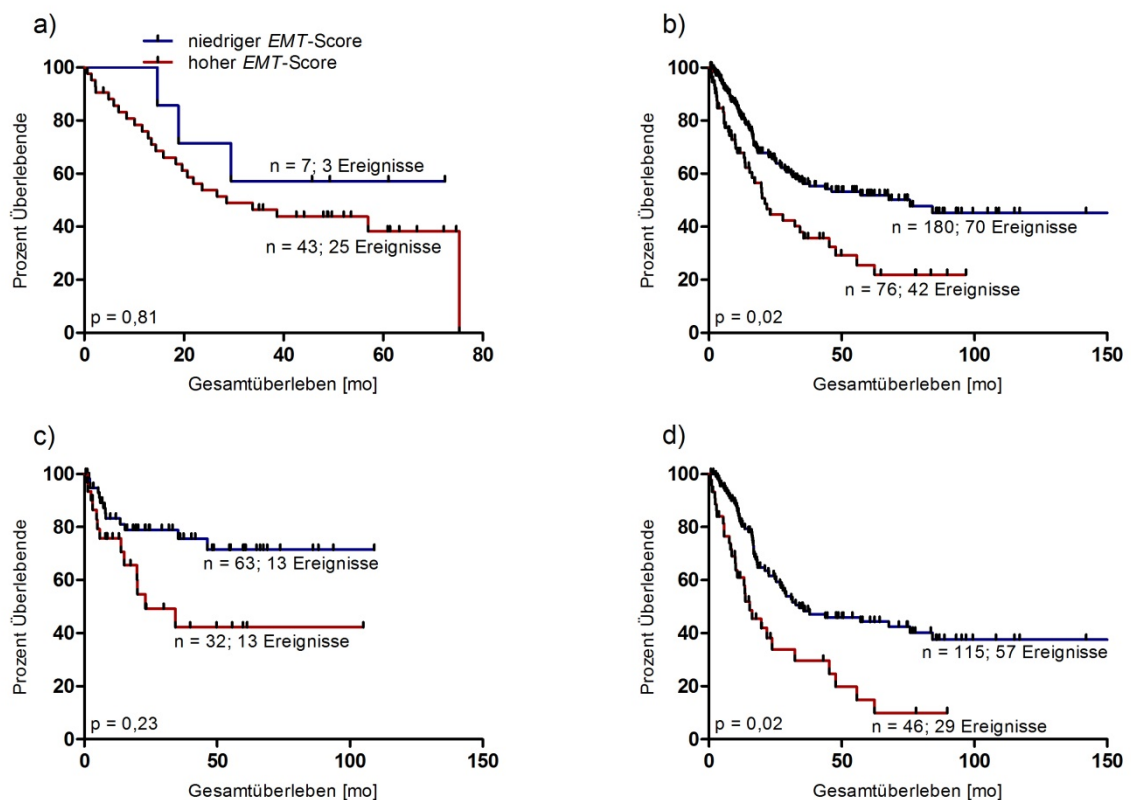


Abbildung 22: Assoziation des *EMT-Scores* mit dem Gesamtüberleben in a) prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx, b) allen Resektaten, c) Resektaten ohne CTx und d) Resektaten nach CTx

4.3.3. 75%-Quantil der *CDH1*- und *ZEB1*- Expression

Eine dritte Methode, um mesenchymal und epithelial differenzierte Tumoren zu identifizieren, war es, die Expression von *CDH1* gegen die Expression von *ZEB1* und *VIM* in Streudiagrammen aufzutragen. Wie exemplarisch anhand der Abbildung 23 gezeigt, wurde hier das 75%-Quantil der *CDH1*- und *ZEB1*-Expression für die Bildung dreier Gruppen verwendet. Im

Bereich oben links kommen die Tumoren mit mesenchyalem (m) Expressionsmuster vor, während jene mit epithelialer (e) Differenzierung im Bereich unten rechts zu finden sind. Die beiden Felder oben rechts und unten links bilden die Gruppe der intermediären (i) Tumoren. Zum einen wurde die Klassifizierung mit dem 75%-Quantil und dem 70%-Quantil der *CDH1*- und *ZEB1*-Expression, zum anderen auch mit dem 70%-Quantil der *CDH1*- und *VIM*-Expression durchgeführt. Letztendlich wies das 75%-Quantil der *CDH1*- und *ZEB1*-Expression die höchste Übereinstimmung mit der Laurén-Klassifikation (Abbildung 23) und dem Mikrosatellitenstatus (Abbildung 24) auf. Außerdem wurden untersuchte Magenkarzinomzelllinien (Abbildung 23) in die zu erwartenden Gruppen eingeordnet, sodass diese Vorgehensweise ausgewählt wurde.

Die jeweiligen Quantile der Genexpressionen und die Fallzahlen in den Gruppen sind in der Tabelle 42 zu finden.

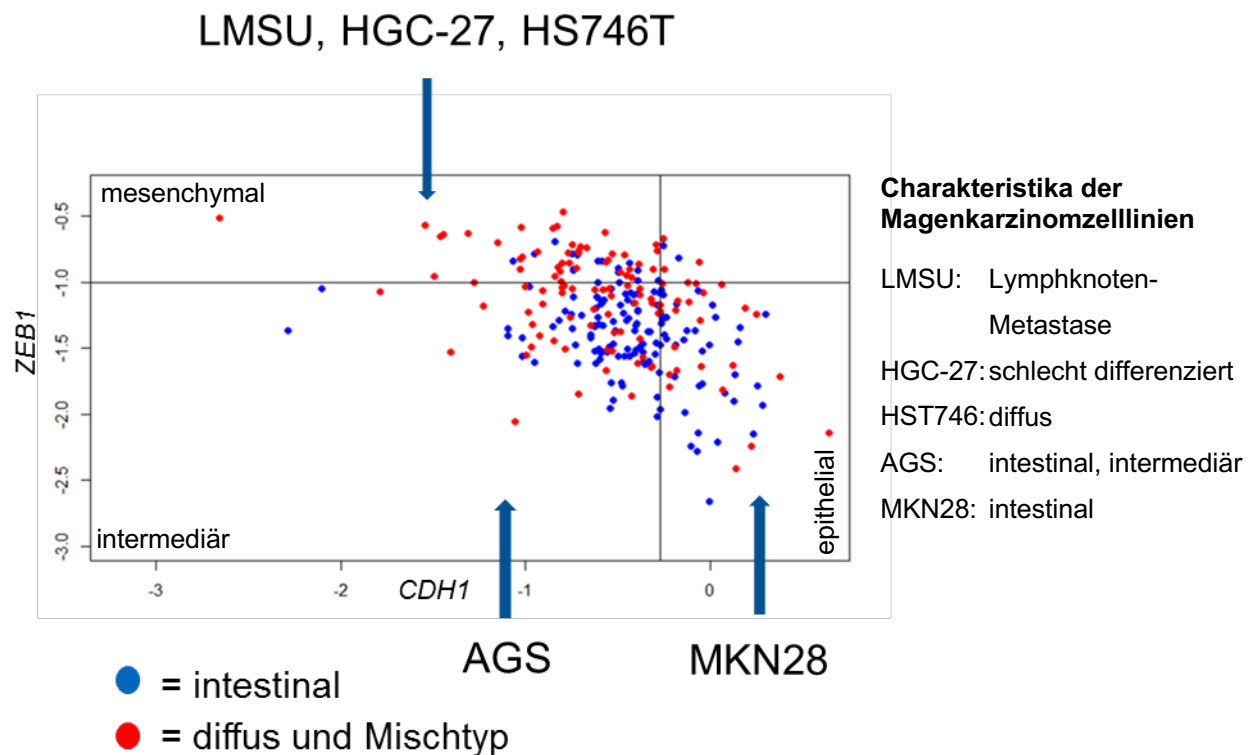
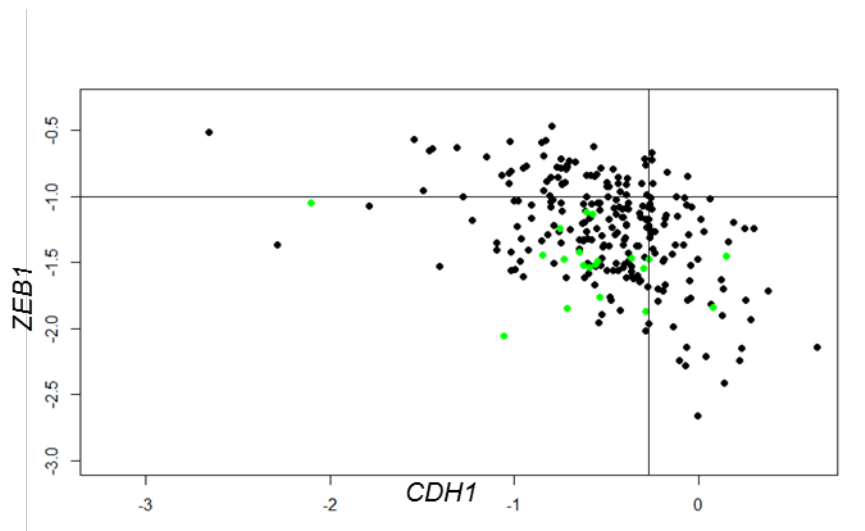


Abbildung 23: Einordnung der Magenkarzinomzelllinien anhand der 75%-Quantile der *CDH1*- und *ZEB1*-Expression in mesenchymale, intermediäre und epitheliale Subgruppen im gesamten Kollektiv und Charakteristika der Magenkarzinomzelllinien (Jang et al., 2017; H. J. Kim et al., 2018)



● = keine MSI

● = MSI

Abbildung 24: Einordnung der Magenkarzinome anhand der 75%-Quantile der *CDH1*- und *ZEB1*-Expression in mesenchymale, intermediäre und epitheliale Subgruppen und Verteilung der Mikrosatelliteninstabilität

Tabelle 42: 75%-Quantile der *CDH1*- und *ZEB1*-Expression und Fallzahlen in den einzelnen Kollektiven bei Einordnung der Tumoren hinsichtlich des 75%-Quantils der Expressionen

Kollektiv	epithelial	mesenchymal	intermediär	75%-Quantil <i>CDH1</i>	75%-Quantil <i>ZEB1</i>
Alle Resektate	59	59	138	-0,272	-1,006
Resektate ohne CTx	21	21	53	-0,259	-1,021
Resektate nach CTx	37	37	87	-0,275	-1,002
Biopsien vor CTx	8	8	34	-0,318	-1,034

4.3.3.1. Assoziationen mit dem Gesamtüberleben der Patienten

Bei Einteilung der Tumoren unter Verwendung des 75%-Quantils der *CDH1*- und *ZEB1*-Expression (Abbildung 25 und Tabelle 43) zeigten sich keine signifikanten, jedoch auffällige Assoziationen in allen Resektaten ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,10$) und den Resektaten nach CTx. Hier überlebten Patienten mit epithelialen Tumoren mit 67,7 Monaten am längsten, gefolgt von den intermediären mit 25,3 Monaten und den mesenchymalen Tumoren mit 19,7 Monaten. In der univariaten Cox-Regression erwies sich die epitheliale Differenzierung als positiv prognostisch (HR, 0,59, 95% KI, 0,34 – 1,05, $p = 0,07$).

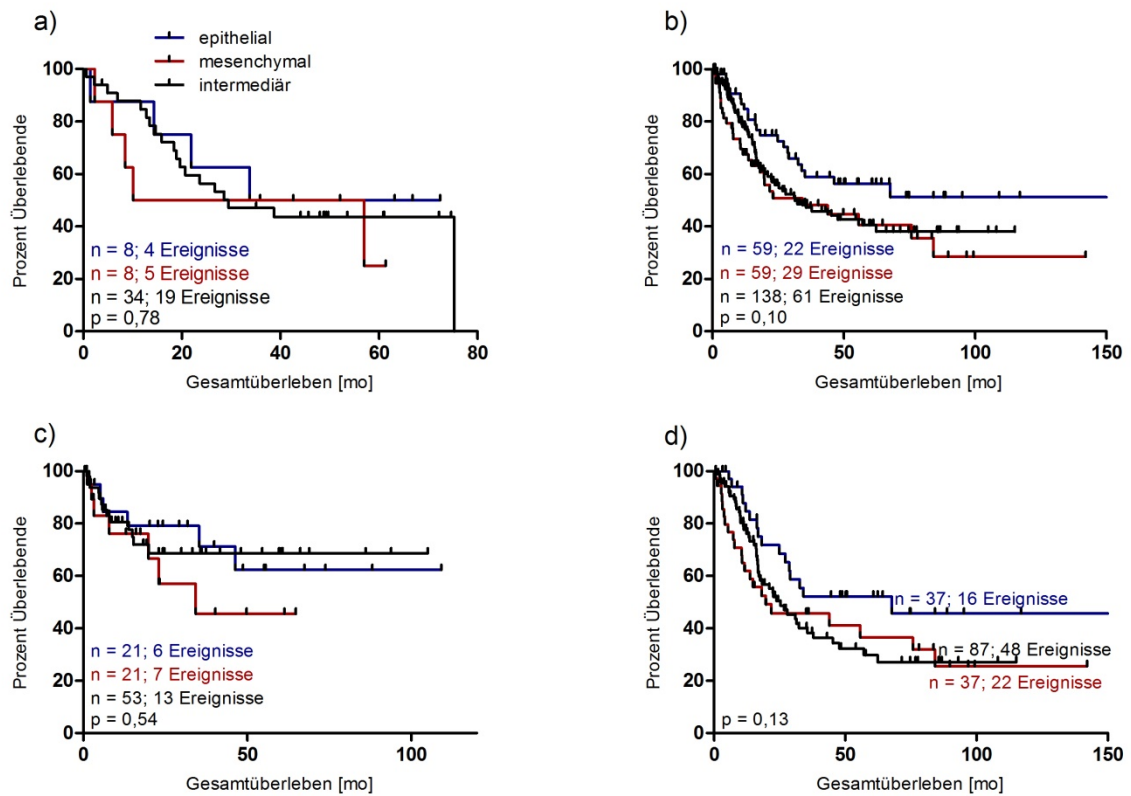


Abbildung 25: Assoziation der Einordnung hinsichtlich der 75%-Quantile der Expression von *CDH1* und *ZEB1* mit dem Überleben in a) prätherapeutischen Biopsien vor CTx, b) allen Resektaten und Resektaten c) ohne CTx und c) nach neoadjuvanter CTx

Tabelle 43: Assoziation der 75%-Quantile der *CDH1/ZEB1*-Expression mit dem Gesamtüberleben

	75%-Quantil	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p†
Biopsien vor neoadjuvanter CTx	epithelial	8	4	50,0	33,8 (n.a.)	0,78	0,69 (0,20 - 2,34)	0,55
	mesenchymal	8	5	50,0	10,1 (0,0 - 54,9)		1,31 (0,48 - 3,53)	0,60
	intermediär	34	19	43,7	29,5 (9,0 - 50,0)		Ref.	
Alle Resektate	epithelial	59	22	56,3	nicht erreicht	0,10	0,66 (0,41 - 1,08)	0,10
	mesenchymal	59	29	39,0	23,0 (0,0 - 48,4)		1,24 (0,80 - 1,94)	0,33
	intermediär	138	61	41,4	32,4 (13,4 - 51,4)		Ref.	
Resektate ohne neoadjuvante CTx	epithelial	21	6	62,3	n.e.	0,54	0,94 (0,36 - 2,49)	0,90
	mesenchymal	21	7	45,7	34,3 (n.a.)		1,59 (0,63 - 3,99)	0,32
	intermediär	53	13	68,7	n.e.		Ref.	
Resektate nach neoadjuvanter CTx	epithelial	37	16	52,2	67,7 (n.a.)	0,13	0,59 (0,34 - 1,05)	0,07
	mesenchymal	37	22	36,6	19,7 (0,00 - 53,5)		1,09 (0,66 - 1,81)	0,74
	intermediär	87	48	29,8	25,3 (15,1 - 35,5)		Ref.	

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

4.3.3.2. Assoziation mit klinischen Charakteristika und dem Chemotherapieansprechen

In der Resektatgruppe ohne CTx war die Einteilung nach den 75%-Quantilen der *CDH1*- und *ZEB1*-Expression signifikant mit der Tumorlokalisation, der Laurén-Klassifikation, dem Re-

sektionsstatus und dem pT-Stadium assoziiert ($p < 0,01$). Auch in den Resektaten nach CTx zeigte die Einteilung eine Assoziation mit der Laurén-Klassifikation ($p < 0,01$) und mit dem pT-Stadium ($p = 0,04$). In den Biopsien wies die Einteilung einen Zusammenhang mit der Tumorlokalisation auf ($p < 0,01$).

Die Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle A7, A8 und A9 zusammengefasst.

Wie in Abbildung 26 gezeigt, war die Einteilung nach dem 75%-Quantil der *CDH1*- und *ZEB1*-Expression in den prätherapeutischen Biopsien vor CTx mit dem Tumorregressionsgrad, unterteilt in *Responder* und *Non-Responder*, assoziiert ($p = 0,04$). In der mesenchymalen Subgruppe fanden sich ausschließlich *Non-Responder*.

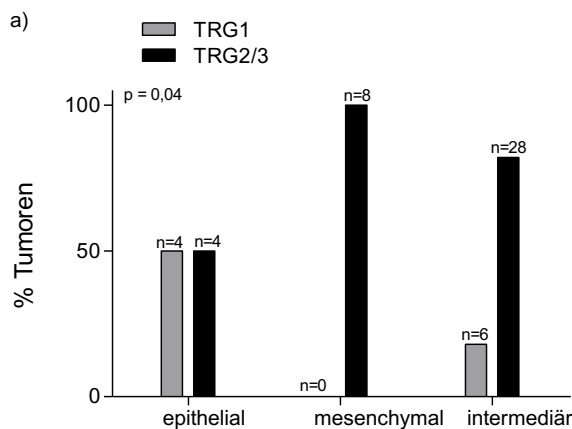


Abbildung 26: Assoziation des 75%-Quantils der *CDH1*- und *ZEB1*-Expression mit dem Tumorregressionsgrad in prätherapeutischen Biopsien

4.3.4. Genexpressionsveränderung zwischen Biopsie und korrespondierendem Resektat

Nachfolgend wurden die Genexpressionen und die EMT-Klassifikation in 14 Fällen zwischen prätherapeutischer Biopsie vor CTx und korrespondierendem Resektat nach CTx verglichen, um Genexpressionsveränderungen durch die neoadjuvante Chemotherapie zu erfassen.

Die *VIM*- ($p = 0,03$) und *ZEB1*- ($p = 0,04$) Expressionen wiesen einen signifikanten Unterschied in den Verteilungen zwischen Biopsie und Resektat auf (Abbildung 27).

In Abbildung 28 wurde die EMT-Einteilung nach dem 75%-Quantil der *CDH1*- und *ZEB1*-Expression zwischen Biopsie und korrespondierendem Resektat gegenübergestellt. In den prätherapeutischen Biopsien fanden sich fünf epithelial differenzierte Tumoren, in den Resektaten nach CTx ein epithelial differenzierter Fall.

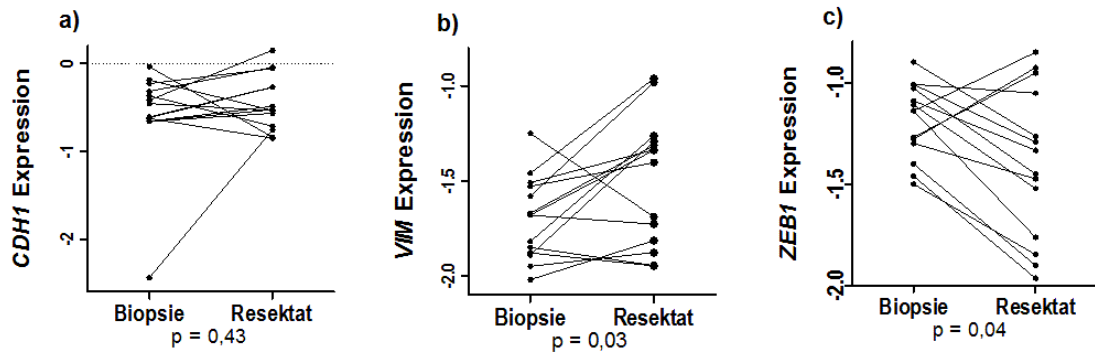


Abbildung 27: Genexpressionsveränderung von a) *CDH1*, b) *VIM* und c) *ZEB1* zwischen prätherapeutischer Biopsie vor CTx und Resektat nach neoadjuvanter CTx

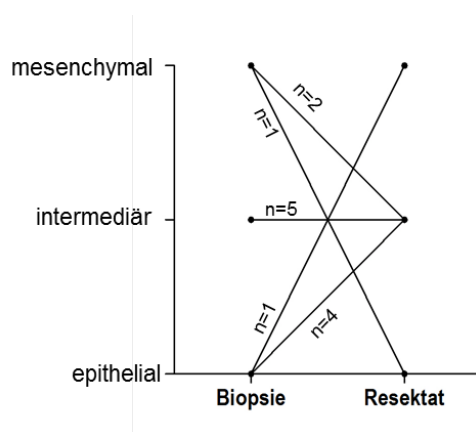


Abbildung 28: Vergleich der EMT-Einteilung zwischen prätherapeutischer Biopsie vor CTx und korrespondierendem Resektat nach neoadjuvanter CTx unter Verwendung des 75%-Quantils der *CDH1*- und *ZEB1*-Expression⁸

4.4. Genexpressionsanalysen auf Proteinebene mittels Immunhistochemie

Um die ACRG-Klassifikation mit einfachen, routinemäßig angewandten und kostengünstigeren Methoden bestimmen zu können, sollte der EMT- und p53-Status neben der Expression auf mRNA-Ebene auf Proteinebene mittels Immunhistochemie bestimmt werden.

4.4.1. Assoziation der immunhistochemischen Analysen mit der Genexpression auf mRNA-Ebene

Die Expressionen der für die EMT-Klassifikation relevanten Gene auf mRNA- und Proteinebene wurden zur Vergleichbarkeit der beiden Ansätze gegenübergestellt.

Die E-Cadherin-Protein- und *CDH1*-mRNA-Expression sind signifikant miteinander assoziiert ($p < 0,01$; Tabelle 44, Abbildung 29). So befinden sich in der Gruppe mit E-Cadherin-Expression $< 50\%$ in den meisten Fällen Tumoren mit *CDH1*-Expression $< 50\%$.

Tabelle 44: Assoziation der E-Cadherin-Proteinexpression und *CDH1*-mRNA-Expression

		<i>CDH1</i> mRNA-Expression					
		Resektate ohne CTx n (%)			Resektate nach CTx n (%)		
		< 50%	> 50%	p	< 50%	> 50%	p
E-Cadherin Proteinexpression	0%/ $< 50\%$	12 (12,9)	0 (0)	< 0,01	11 (7,2)	1 (0,7)	< 0,01
	> 50%	34 (35,8)	47 (50,5)		63 (41,2)	77 (50,3)	

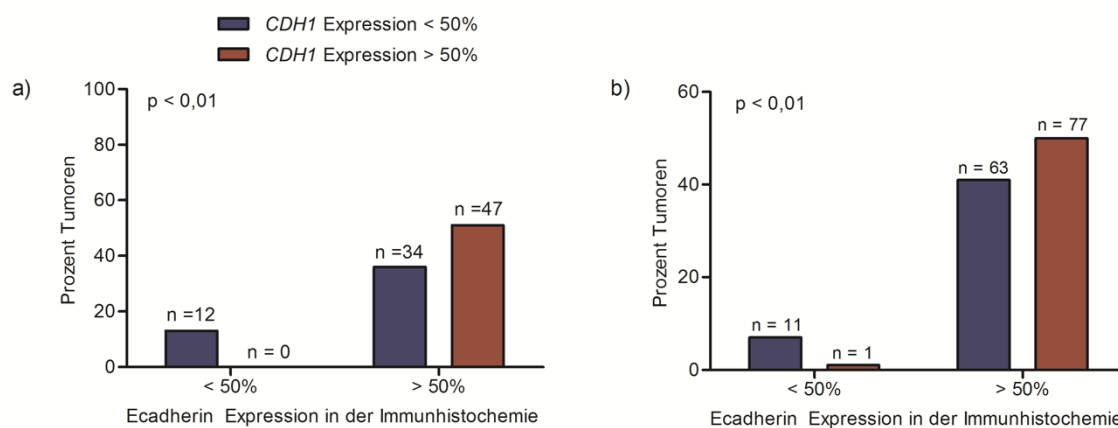


Abbildung 29: Assoziation der E-Cadherin-Proteinexpression und *CDH1*-mRNA-Expression in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter CTx

4.4.2. Vergleich der p53- und E-Cadherin-Proteinexpression mit NGS-basierten Mutationsanalysen

Da der p53-Status letztendlich nur auf Proteinebene bestimmt wurde, sollte die Validität der immunhistochemischen Analysen durch den Vergleich mit Next Generation Sequencing (NGS)-basierten Mutationsanalysen überprüft werden.

Es wurden an 42 Resektaten ohne CTx im Rahmen der Promotionsarbeit von Meike Kohlruß (2020) NGS-basierte Mutationsanalysen durchgeführt und die Ergebnisse im Vergleich zur p53- und E-Cadherin-Proteinexpression in Abbildung 30 dargestellt.

Hinsichtlich der p53-Expression zeigten 90% der 42 Resektate ohne CTx übereinstimmende Ergebnisse zwischen der Proteinexpression und den NGS-basierten Mutationsanalysen. Tumoren mit komplettem Expressionsverlust in der Immunhistochemie wiesen auf DNA-Ebene eine Stopmutation, Deletion und zwei *Spliceside* Varianten auf. Eine Überexpression ging vor allem mit *Missense*-Mutationen auf DNA-Ebene einher.

Die vier diskrepanten Fälle setzen sich wie folgt zusammen:

- Zwei Fälle mit Wildtyp-Expressionsmuster und *Missense*-Mutation (p.R282W, p.R175H)
- Ein Fall mit Wildtyp-Expressionsmuster und *Spliceside*-Mutation
- Ein Fall mit einer Überexpression und keinem Mutationsnachweis

Auch in Bezug auf E-Cadherin waren 90% der immunhistochemischen Ergebnisse konkordant mit den Mutationsanalysen. In Fällen mit verminderter Expression oder komplettem Expressionsverlust wurden Deletionen, eine *Spliceside*- und eine *Missense*-Mutation nachgewiesen.

Die vier diskrepanten Fälle setzen sich wie folgt zusammen:

- Ein Fall mit E-Cadherin-Expression > 50% und *Missense*-Mutation
- Ein Fall mit E-Cadherin-Expression > 50% und Deletion
- Ein Fall mit E-Cadherin-Expression > 50% und *Spliceside*-Mutation
- Ein Fall mit Expressionsverlust und keinem Mutationsnachweis

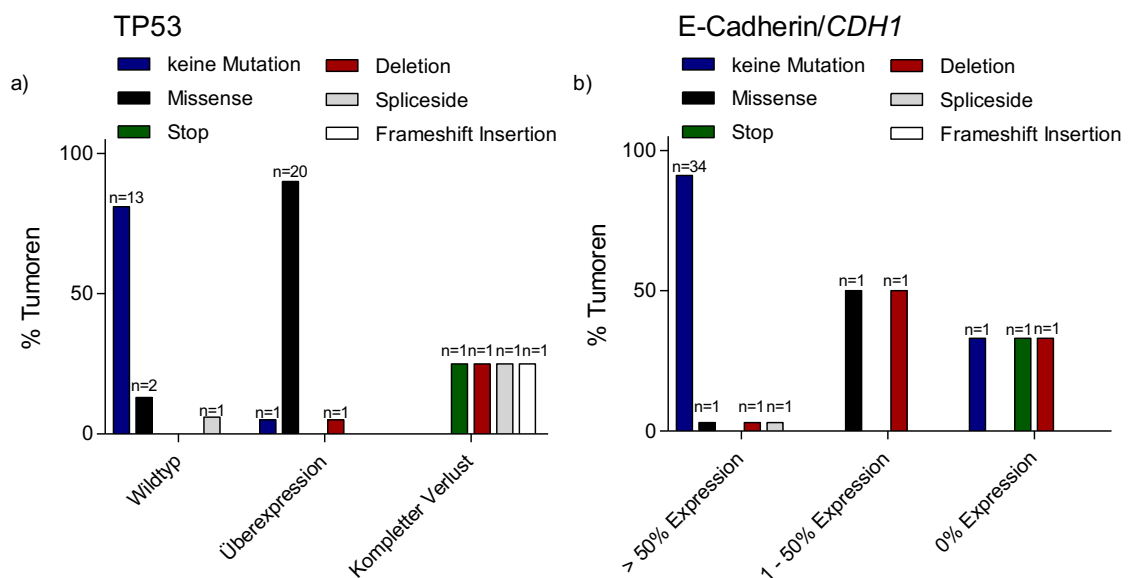


Abbildung 30: a) p53- und b) E-Cadherin-Proteinexpression und NGS-basierte Mutationsanalysen

4.4.3. Zusammensetzung des Patientenkollektivs für die Genexpressionsanalysen auf Proteinebene

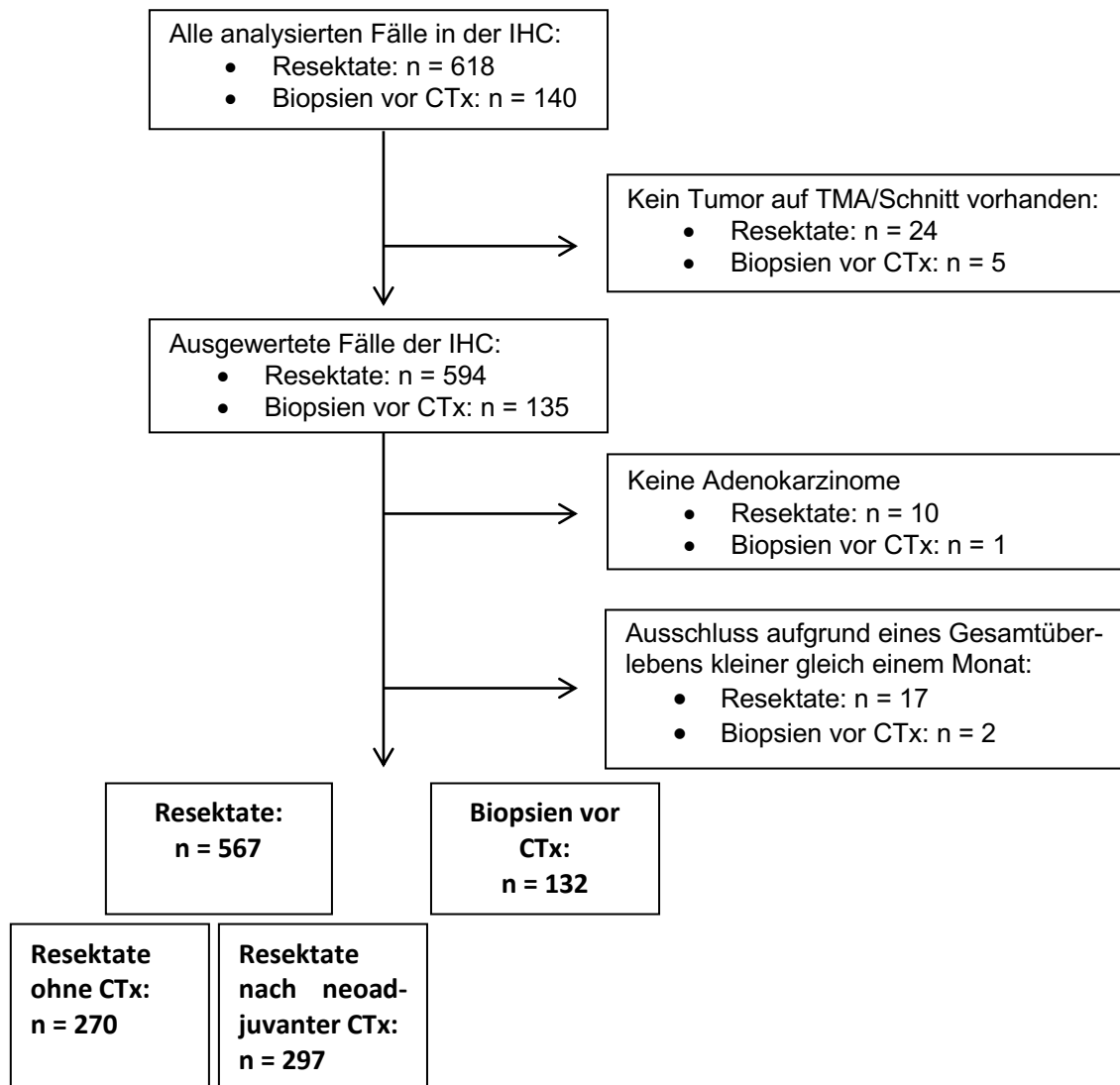


Abbildung 31: Flussdiagramm zur Darstellung des Patientenausschlusses der Patientenkollektive für die immunhistochemischen Analysen

Wie in Abbildung 31 gezeigt, wurden insgesamt 618 Resektate und 140 prätherapeutische Biopsien vor neoadjuvanter CTx immunhistochemisch analysiert. Nach der Qualitätskontrolle und dem Patientenausschluss aufgrund klinisch-pathologischer Charakteristika bestand das Kollektiv aus 567 Resektaten und 132 prätherapeutischen Biopsien. Die Resektate setzten sich aus 270 primären Resektaten ohne CTx und 297 Resektaten nach neoadjuvanter CTx zusammen.

Die Patientencharakteristika der untersuchten Kollektive mit deren prognostischer Relevanz sind in Tabelle 45 zusammengefasst.

Tabelle 45: Patientencharakteristika der immunhistochemisch untersuchten Kollektive und Assoziation mit dem Gesamtüberleben

Patientencharakteristika	Biopsien vor CTx n (%)	p [†]	Resektate			
			ohne CTx * n (%)	p [†]	nach CTx n (%)	p [†]
Total	132 (100)		270 (100)		297 (100)	
Medianes OS (95%KI) [mo]	48,0 (30,0 – 66,0)		52,4 (21,6 – 83,2)		31,4 (21,2 – 41,6)	
Ereignisse OS	70		122		150	
Mediane Nachbeobachtungs- zeit (95%KI) [mo]	61,8 (60,1 – 63,5)		68,9 (56,5 – 81,3)		54,0 (44,1 – 63,9)	
Alter, in Jahren Range	63,4 (39,5 – 79,1)		68,6 (32,1 – 90,9)		60,9 (28,3 – 81,2)	
Geschlecht						
weiblich	33 (25,0)	0,04	89 (33,0)	0,56	65 (21,9)	0,05
männlich	99 (75,0)		181 (67)		232 (78,1)	
Lokalisation						
Proximal	92 (69,7)	< 0,01	103 (38,7)	< 0,01	188 (63,3)	0,10
Medial	23 (17,4)		65 (24,4)		62 (20,9)	
Distal	15 (11,4)		83 (31,2)		34 (11,4)	
Linitis	2 (1,5)		15 (5,6)		13 (4,4)	
k.A.	0 (0)		4 (1,5)		0 (0)	
Laurén						
Intestinal	68 (51,5)	0,35	145 (53,7)	0,37	175 (78,9)	0,43
Nicht-intestinal	64 (48,5)		125 (46,3)		122 (41,1)	
Grading						
G1/2	32 (24,2)	0,60	67 (24,8)	0,38	46 (15,5)	0,58
G3/4	100 (75,8)		202 (74,8)		189 (63,6)	
k.A.	0 (0)		1 (0,4)		62 (20,9)	
Resektionsstatus						
R0	113 (85,6)	< 0,01	219 (81,1)	< 0,01	217 (73,1)	< 0,01
R1/2	18 (13,6)		51 (18,9)		80 (26,9)	
k.A.	1 (0,8)					
Metastasenstatus						
M0	95 (72,0)	< 0,01	249 (92,2)	< 0,01	238 (80,1)	< 0,01
M1	32 (24,3)		21 (7,8)		59 (19,9)	
k.A.	5 (3,8)		0 (0)		0 (0)	
Tumorausdehnung						
präoperativ						
cT2	8 (6,1)	< 0,01	118 (43,9)	< 0,01	13 (4,4)	0,08
cT3	81 (61,4)		134 (49,8)		252 (85,1)	
cT4	26 (19,7)		17 (6,3)		31 (10,5)	
k.A.	17 (12,9)		1 (0,4)		1 (0,3)	
postoperativ						
(y) pT0	8 (6,1)	< 0,01	0 (0)	< 0,01	0 (0)	< 0,01
(y) pT1	12 (9,1)		39 (14,4)		15 (5,1)	
(y) pT2	19 (14,4)		40 (14,8)		28 (9,4)	
(y) pT3	71 (53,8)		129 (47,8)		172 (57,9)	
(y) pT4	21 (15,9)		62 (23,0)		82 (27,6)	
k.A.	1 (0,8)					
(y) pT0	8 (6,1)	< 0,01	0 (0)	< 0,01	0 (0)	< 0,01
(y) pT1/T2	31 (23,5)		79 (29,3)		43 (14,5)	
(y) pT3/4	92 (69,7)		191 (70,7)		254 (85,5)	
k.A.	1 (0,8)		0 (0)		0 (0)	
Lymphknotenstatus						
(y) pN0	58 (43,9)	< 0,01	96 (35,6)	< 0,01	78 (26,3)	< 0,01
(y) pN1/2/3	73 (55,5)		174 (64,4)		219 (73,7)	
k.A.	1 (0,8)		0 (0)		0 (0)	
Regressionsgrad						
TRG1	44 (33,3)	0,02			0 (0)	< 0,01
TRG2	40 (30,3)				137 (46,1)	
TRG3	48 (36,4)				160 (53,9)	
TRG1	44 (33,3)	<0,01				
TRG2/3	88 (66,7)					

*keine Daten für Überlebensanalysen vorhanden (n=1); †p-Wert: Log-Rank Test

Das Patientenkollektiv stellte ein typisches Kollektiv an Magenkarzinomen dar. So waren der Resektions-, Lymphknoten-, Metastasenstatus, die klinische und pathologische Tumorausdehnung und der Tumorregressionsgrad hochsignifikant prognostische Faktoren auf das

Gesamtüberleben. Auch die Geschlechterverteilung und der Altersmedian lagen im Bereich der zu erwartenden Werte. Weibliche Patienten wiesen ein längeres Überleben auf. Patienten mit proximal lokalisierten Tumoren überlebten signifikant kürzer als jene mit Tumoren im mittleren oder distalen Magendrittel.

Das Kollektiv der prätherapeutischen Biopsien vor CTx und der Resektaten nach CTx beinhaltete mit mehr als 60% vermehrt proximale Tumoren und mit mehr als 90% fast ausschließlich fortgeschrittene Karzinome. Die Resektate nach CTx setzen sich mit 79% anteilmäßig vermehrt intestinalen Tumoren zusammen.

4.4.4. Häufigkeit bzw. Verteilung der Proteinexpression

Im Folgenden ist die Verteilung der Ergebnisse der Proteinexpression mittels Immunhistochemie für die verschiedenen Antikörper in den primären Resektaten ohne CTx und Resektaten nach neoadjuvanter CTx dargestellt. Im Kollektiv der prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx wurde aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit bioptischen Tumorgewebes zunächst nur die p53 Immunhistochemie durchgeführt. Die unterschiedlichen Färbemuster sind durch repräsentative Ausschnitte veranschaulicht (Abbildung 32 - 34).

4.4.4.1. p53

In Anlehnung an die Literatur wurde das durch Darb-Esfahani et al. (2016) und Köbel et al. (2016) im Mamma- und Ovarialkarzinom beschriebene Auswerteschema gewählt. Es wurden drei verschiedene Färbemuster der p53 Immunhistochemie unterschieden. Das Wildtypexpressionsmuster (WT) ist definiert durch eine nukleäre Expression mit variabler Intensität in <60% der Tumorzellen (Abbildung 32A). Ein Verlust der p53-Expression (CA) (Abbildung 32B) und eine Überexpression (OE) mit nukleärer Färbung in $\geq 60\%$ der Tumorzellen (Abbildung 32C) wurden als Surrogat für ein mutiertes p53 gewertet und im Folgenden als solches bezeichnet.

In fünf Fällen war die Immunhistochemie nicht auswertbar. Wie Tabelle 46 zeigt, wiesen 50% der Magenkarzinome ein Wildtyp-Expressionsmuster auf. Eine mutierte Form lag in 49% der Fälle vor, wobei 11% einen kompletten Verlust und 38% eine Überexpression zeigten.

Tabelle 46: Häufigkeit bzw. Verteilung der Ergebnisse der p53-Proteinexpression

p53	Biopsien vor CTx n (%)	Resektate n (%)		gesamt
		ohne neoadjuvante CTx	nach neoadjuvanter CTx	
NA	0 (0)	2 (1)	3 (1)	5 (1)
CA	9 (7)	31 (12)	40 (13)	80 (11)
WT	70 (53)	144 (53)	136 (46)	350 (50)
OE	53 (40)	93 (34)	118 (40)	264 (38)
gesamt	132 (100)	270 (100)	297 (100)	699 (100)

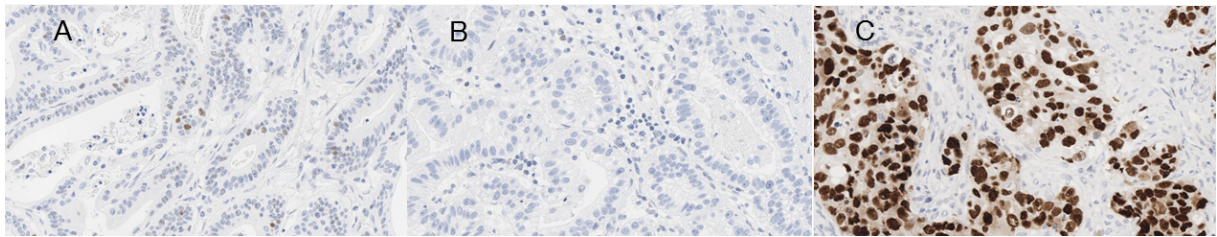


Abbildung 32: p53-Färbemuster: Wildtyp-p53-Expressionsmuster mit <60% nukleärer Färbung mit variabler Intensität (WT) (A), kompletter Expressionsverlust (CA) (B) und Überexpression von p53 mit ≥60% nukleärer Färbung mit mittlerer bis starker Intensität (OE) (C) (Darb-Esfahani et al., 2016; Köbel et al., 2016)

4.4.4.2. E-Cadherin

Wie durch Bronsert et al. (2014) beschrieben lag eine veränderte E-Cadherin-Expression vor, wenn weniger als 50% der Tumorzellen eine membranäre Färbung aufwiesen. Hier wurde weiterhin unterschieden, ob 0% (Abbildung 33A) oder 1-50% (Abbildung 33B) der Tumorzellen E-Cadherin exprimierten. Eine E-Cadherin Wildtypexpression lag vor, wenn mehr als 50% der Tumorzellen eine membranäre Färbung zeigten (Abbildung 33C). Wie in Tabelle 47 zu sehen wurden 89,8% der Fälle als Wildtyp klassifiziert, während eine aberrante E-Cadherinfärbung in 10,3% der Tumoren vorlag.

Tabelle 47: Häufigkeit bzw. Verteilung der Ergebnisse der E-Cadherin-Proteinexpression

E-Cadherin	Resektate n (%)		
	ohne neoadjuvante CTx	nach neoadjuvanter CTx	gesamt
NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0%	22 (8,1)	18 (6,1)	40 (7,1)
< 50%	11 (4,1)	7 (2,4)	18 (3,2)
≥ 50%	237 (87,8)	272 (91,6)	509 (89,8)
gesamt	270 (100)	297 (100)	567 (100)

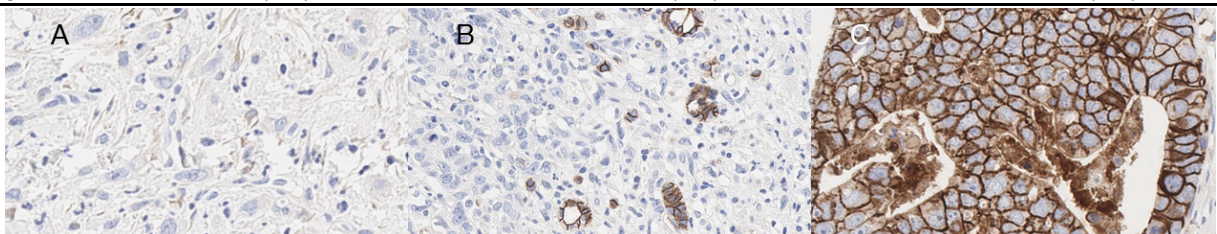


Abbildung 33: Beispiele für die E-Cadherin-Färbemuster: keine membranäre Färbung (A), < 50% membranäre Färbung (B) ≥50% membranäre Färbung (C) (Bronsert et al., 2014)

4.4.4.3. Vimentin

Eine normale Expression von Vimentin lag nach Bronsert et al. (2014) vor, wenn 0% der Tumorzellen dieses zytoplasmatisch exprimierten (Abbildung 34A). Dies waren 92,1% der Fälle. Als aberrant wurde jede andere Färbung gewertet (Abbildung 34B, C). Diese lag in 7,6% aller Resektate vor.

Tabelle 48: Häufigkeit bzw. Verteilung der Ergebnisse der Vimentin-Proteinexpression

Vimentin	Resektate n (%)		
	ohne neoadjuvante CTx	nach neoadjuvanter CTx	gesamt
NA	0 (0)	2 (0,7)	2 (0,9)
0%	251 (93,0)	271 (91,2)	522 (92,1)
< 50%	11 (4,1)	12 (4,0)	23 (4,1)
≥ 50%	8 (3,0)	12 (4,0)	20 (3,5)
gesamt	270 (100)	297 (100)	567 (100)

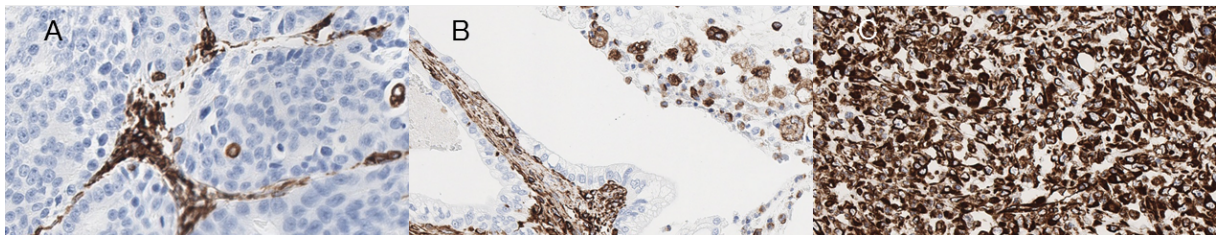


Abbildung 34: Beispiele für die Vimentin-Färbemuster: keine zytoplasmatische Färbung (A), < 50% zytoplasmatische Färbung (B) ≥50% zytoplasmatische Färbung (C) (Bronsert et al., 2014)

4.4.4.4. ZEB1

Eine normale Expression von ZEB1 lag nach Bronsert et al. (2014) vor, wenn 0% der Tumorzellen dieses nukleär exprimierten (Abbildung 35A). Dies waren 96,6% der Fälle. Als aberrant wurde jede andere Färbung gewertet (Abbildung 35B, C). Diese lag in 3,4% aller Resektate vor.

Tabelle 49: Häufigkeit bzw. Verteilung der Ergebnisse der ZEB1-Proteinexpression

ZEB1	Resektate n (%)		
	ohne neoadjuvante CTx	nach neoadjuvanter CTx	gesamt
NA	0 (0)	2 (0,7)	2 (0,4)
0%	261 (96,7)	287 (96,6)	548 (96,6)
1 - 10%	6 (2,2)	6 (2,0)	12 (2,1)
> 10%	3 (1,1)	2 (0,7)	5 (0,9)
gesamt	270 (100)	297 (100)	567 (100)

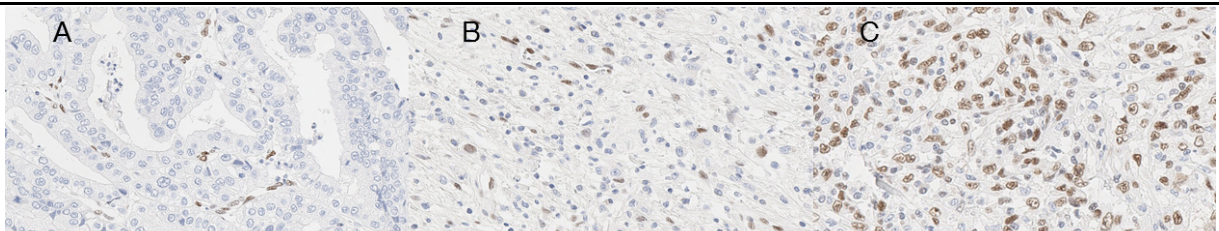


Abbildung 35: Beispiele für die ZEB1-Färbemuster: keine nukleäre Färbung (A), 1-10% nukleäre Färbung (B) > 10% nukleäre Färbung (C) (Bronsert et al., 2014)

4.4.5. Korrelation der Proteinexpressionen

Wie in Tabelle 50 zu sehen, korreliert die p53-Expression mit der E-Cadherin- und Vimentin-Expression in den Resektaten ohne CTx invers. Hier wies auch E-Cadherin eine gleichgerichtete Korrelation mit Vimentin und ZEB1 auf. Vimentin ist in beiden Kollektiven gleichgerichtet mit ZEB1 korreliert.

Tabelle 50: Korrelation der immunhistochemischen Analysen

	Resektate ohne CTx		Resektate nach CTx	
	ρ	p	ρ	p
p53 und E-Cadherin	-0,12	0,05	-0,01	0,86
p53 und Vimentin	-0,11	0,07	0,05	0,36
p53 und ZEB1	-0,09	0,14	0,07	0,22
E-Cadherin und Vimentin	0,12	0,05	-0,05	0,43
E-Cadherin und ZEB1	0,12	0,05	0,10	0,08
Vimentin und ZEB1	0,19	<0,01	0,10	0,08

ρ = Korrelationskoeffizient nach Spearman

4.4.6. Assoziation der Proteinexpressionsanalysen mit Patientencharakteristika

Die Assoziationen der Proteinexpressionen mit Patientencharakteristika in der Resektatgruppe ohne CTx (Tabelle A10), nach neoadjuvanter CTx (Tabelle A11) und in den prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx sind im Anhang zu finden (Tabelle A12). Im Folgenden werden die auffälligen Ergebnisse gezeigt.

4.4.6.1. p53

Wie in Abbildung 36a) und b) veranschaulicht, war die p53-Expression in Resektaten ohne CTx und Resektaten nach CTx mit der Tumorlokalisation assoziiert ($p < 0,01$). So waren Überexpressionen und komplette Expressionsverluste vermehrt in proximalen Tumoren zu finden.

Im Kollektiv der Resektate ohne CTx fanden sich vermehrt intestinale Tumoren unter den Fällen mit aberranter p53-Expression ($p < 0,01$; Abbildung 36c).

Im Kollektiv der Biopsien vor neoadjuvanter CTx ließen sich keine auffälligen Zusammenhänge erkennen.

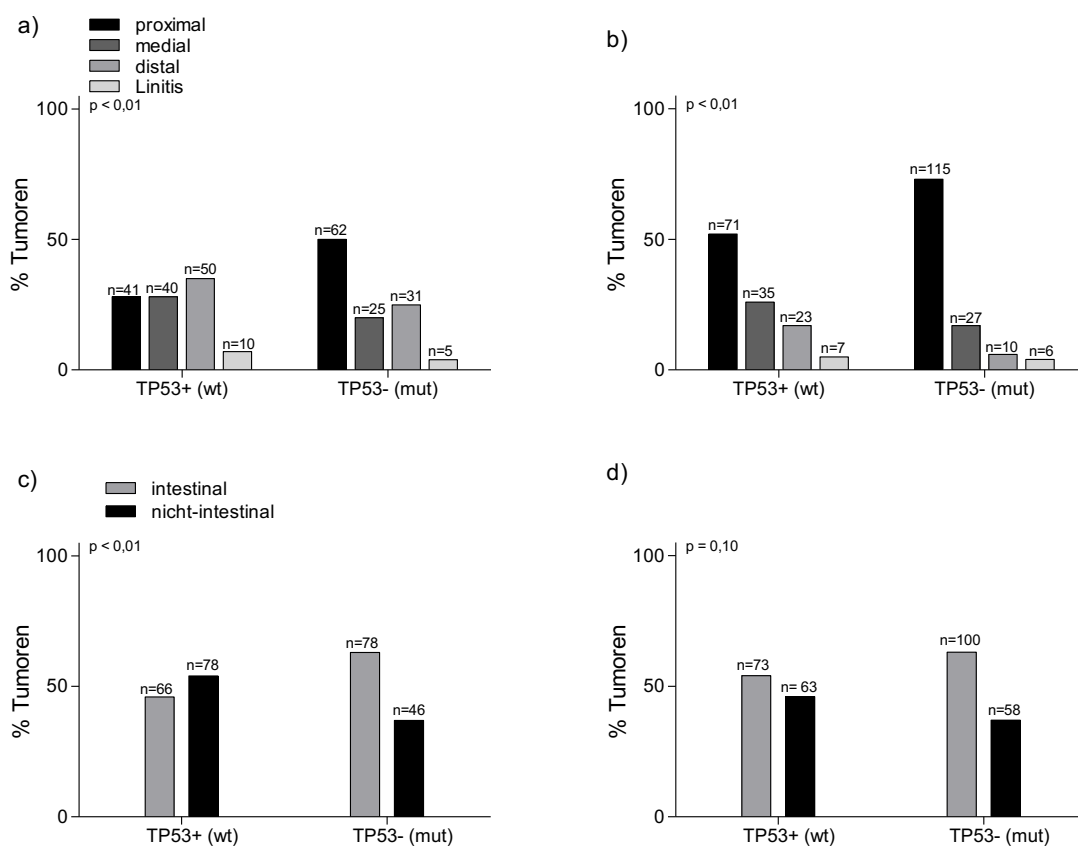


Abbildung 36: Assoziation der p53-Proteinexpression mit der Lokalisation in Resektaten a) ohne und b) nach CTx und mit den Laurén Subtypen in Resektaten c) ohne und d) nach neoadjuvanter CTx

4.4.6.2 E-Cadherin

Wie Abbildung 37a zeigt, fanden sich in der Resektatgruppe ohne CTx in Fällen mit verminderter E-Cadherin-Expression weniger Tumoren mit distaler Lokalisation als bei hoher Expression ($p = 0,05$). In Resektaten nach CTx war kein auffälliger Zusammenhang zu beobachten (Abbildung 37b).

In beiden Kollektiven ging eine verminderte E-Cadherin-Expression mit nicht-intestinalen Tumoren nach Laurén einher ($p < 0,01$; Abbildung 37c, d).

Die Mehrzahl der weniger fortgeschrittenen Karzinome fand sich in beiden Kollektiven in der Gruppe mit hoher E-Cadherin-Expression ($p < 0,01$; Abbildung 37e, f).

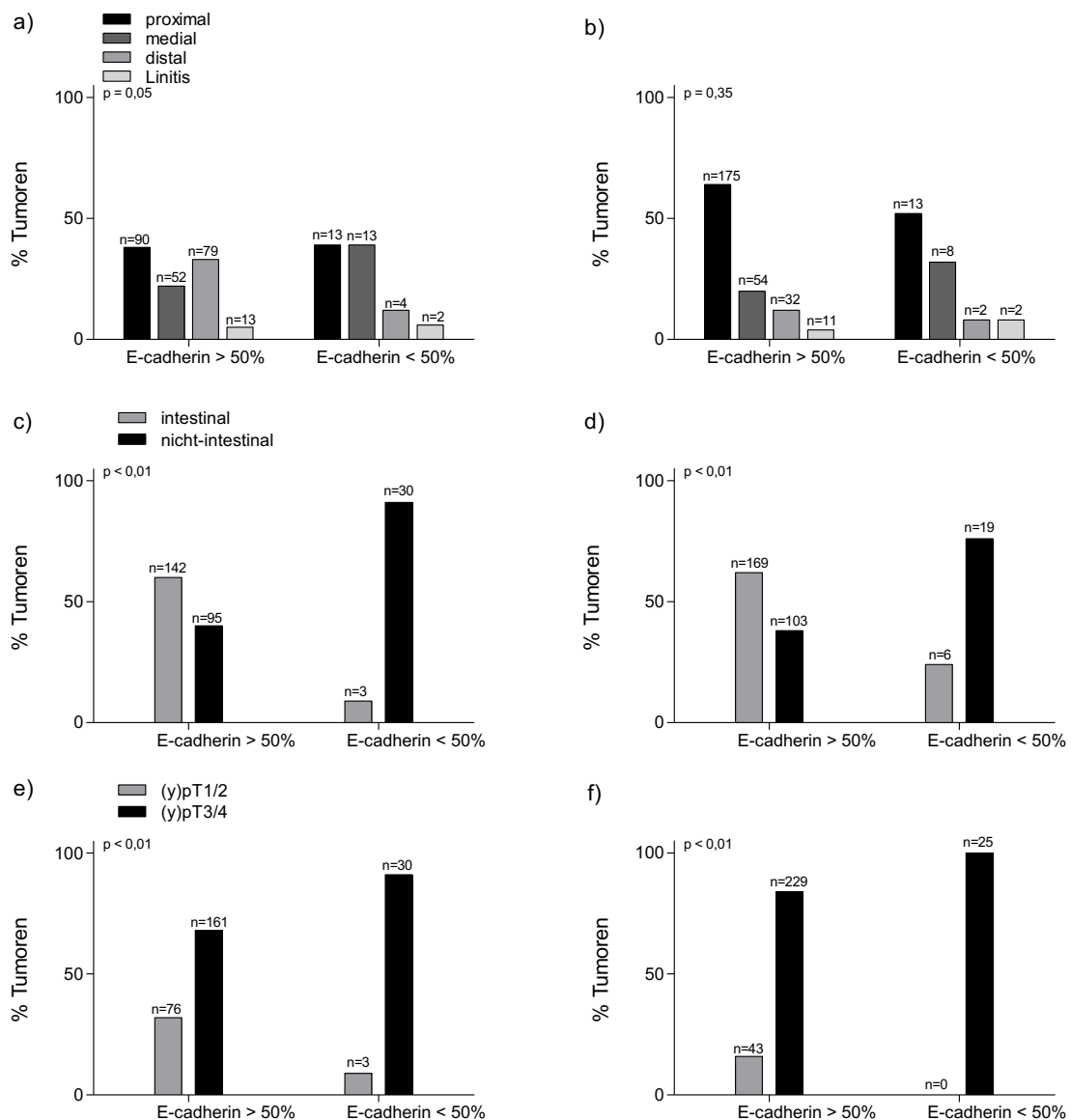


Abbildung 37: Assoziation der E-Cadherin-Expression mit der Lokalisation in Resektaten a) ohne und b) nach CTx, mit den Laurén-Subtypen in Resektaten c) ohne und d) nach CTx und mit dem (y)pT-Stadium in Resektaten e) ohne und f) nach CTx

4.4.7. Assoziation der p53-Expression mit dem Chemotherapieansprechen

Im Kollektiv der prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx ließ sich hinsichtlich der p53-Proteinexpression keine Assoziation mit dem Tumorregressionsgrad erkennen ($p = 0,62$; Abbildung 38).

Bei Betrachtung der Resektate nach CTx fanden sich in den Fällen mit p53-Wildtyp-Expressionsmuster vermehrt Tumoren mit TRG3 ($p = 0,05$; Abbildung 39a).

Auch in Tumoren mit niedriger E-Cadherin-Expression ließen sich vor allem TRG3 Fälle nachweisen, wobei die Unterschiede nicht statistisch signifikant waren ($p = 0,14$; Abbildung 39b).

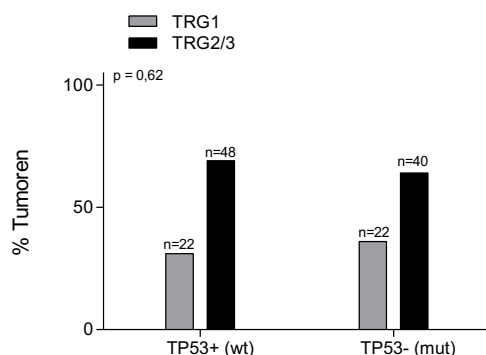


Abbildung 38: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Tumorregressionsgrad in prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx

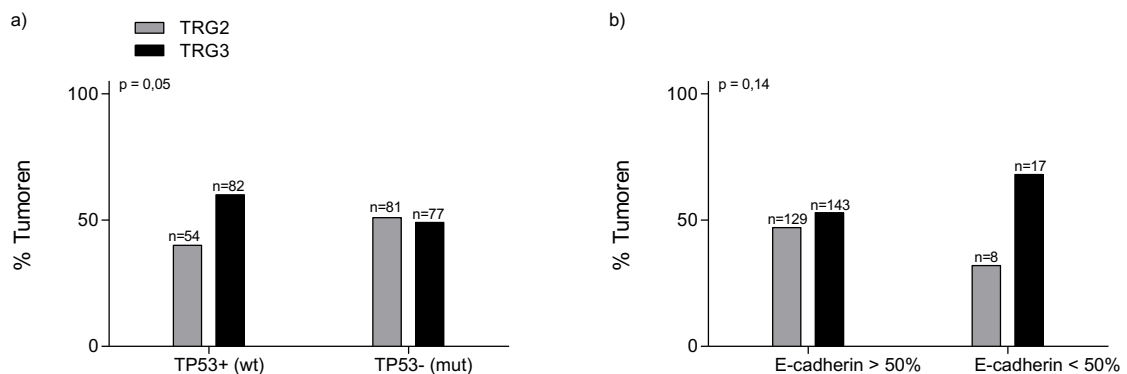


Abbildung 39: Assoziation der a) p53- und b) E-Cadherin-Proteinexpression mit dem Tumorregressionsgrad in Resektaten nach neoadjuvanter Chemotherapie

4.4.8. Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben

4.4.8.1. Überlebensanalysen in Resektaten und prätherapeutischen Biopsien

In Abbildung 40 wurde die Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in Resektaten ohne und nach CTx dargestellt. In Abbildung 41 und Tabelle 51 wurden die Tumoren mit veränderter p53-Expression zusammengefasst.

Die p53-Expression war in den Resektaten ohne CTx hochsignifikant mit dem Überleben assoziiert ($p_{\text{Log-Rank}} < 0,01$; HR, 1,86, 95% KI, 1,27 – 2,72, $p < 0,01$). Patienten mit aberranter p53-Expression im Tumor wiesen ein 5-Jahres-Überleben von 35,5% im Vergleich zu 60% bei Wildtyp-p53-Expression auf.

In der multivariaten Cox-Regression unter Einschluss von pTNM und R war die p53-Proteinexpression ein unabhängiger negativer prognostischer Faktor (HR 1,73, 95% KI, 1,20 – 2,49, $p < 0,01$) für das Überleben.

Im Kollektiv der Resektate nach neoadjuvanter CTx zeigte sich keine Assoziation mit dem Überleben.

Hinsichtlich der Biopsien vor CTx zeigte sich keine signifikante Assoziation, es deutete sich jedoch ein Überlebensvorteil der Tumoren mit Wildtyp-Expressionsmuster mit 57,1 gegenüber 36,6 Monaten bei veränderter p53-Expression an ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,15$; HR, 1,41, 95% KI, 0,88-2,26, $p = 0,15$; Abbildung 42).

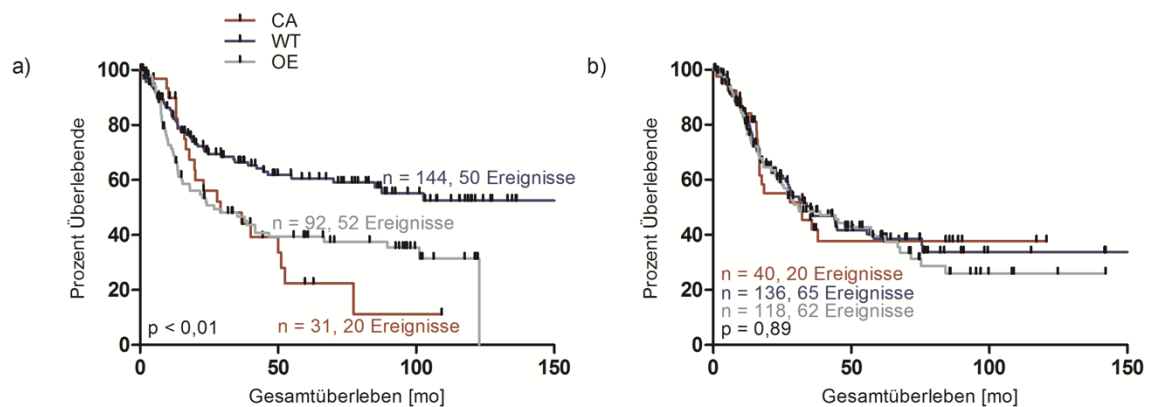


Abbildung 40: Assoziation der p53 -Proteinexpression mit dem Überleben in Resektaten a) ohne CTx und b) nach neoadjuvanter CTx

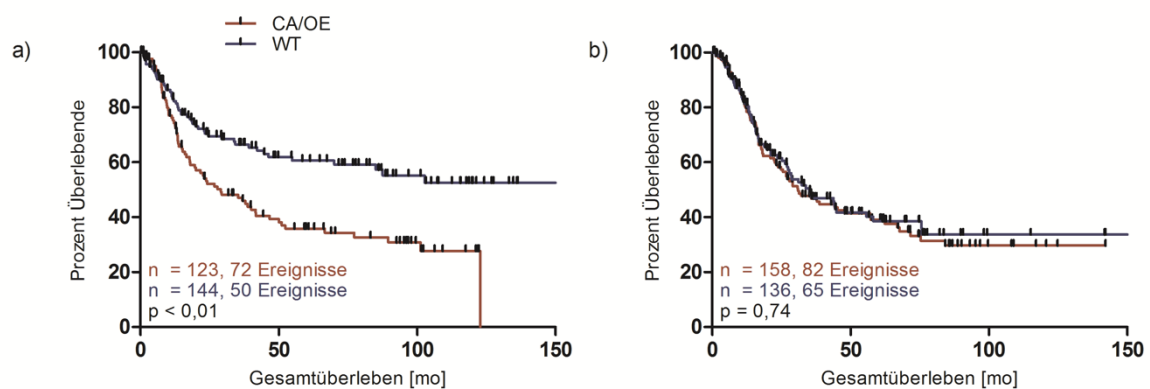


Abbildung 41: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Überleben in Resektaten a) ohne CTx und b) nach neoadjuvanter CTx

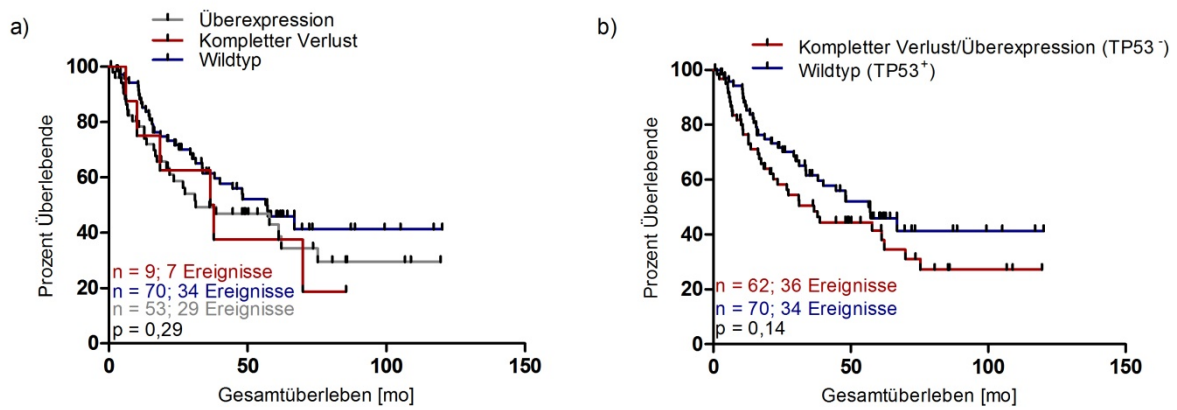


Abbildung 42: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx

Tabelle 51: Assoziation der p53-Expression mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven

Kollektiv	TP53	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p†
Biopsien vor neoadjuvanter CTx	CA/OE	62	36	41,5	36,6 (23,2 – 50,0)	0,15	1,41 (0,88 - 2,26)	0,15
	WT	70	34	45,9	57,1 (37,5 – 76,7)		Ref.	
Resektate ohne neoadjuvante CTx	CA/OE	123	72	35,8	29,1 (14,8 – 43,4)	<0,01	1,86 (1,27 - 2,72)	<0,01
	WT	144	50	60,5	nicht erreicht		Ref.	
Resektate nach neoadjuvanter CTx	CA/OE	158	82	39,1	31,0 (21,2 – 40,8)	0,74	1,01 (0,72 - 1,41)	0,97
	WT	136	65	38,6	35,1 (21,7 – 48,5)		Ref.	

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

Tabelle 52: Multivariate Cox Regression der p53-Proteinexpression und pTNM, R

Kollektiv	Variablen in der Gleichung	HR	95% KI	p*
Resektate ohne neoadjuvante CTx	N-Status (Ref. N0)	3,08	1,90 – 5,0	< 0,01
	M-Status (Ref. M0)	2,13	1,12 – 4,08	0,02
	p53-Expression (Ref. Wildtyp-Expression)	1,73	1,20 – 2,49	< 0,01
	R-Status	1,72	1,12 – 2,65	0,01
Resektate nach neoadjuvanter CTx	M-Status (Ref. M0)	2,75	1,65 – 4,58	< 0,01
	R-Status (Ref. R0)	2,62	1,59 – 4,32	< 0,01
	N-Status (Ref. N0)	2,33	1,18 – 4,60	0,02

*p-Wert: Cox-Regression

4.4.8.2. Subgruppenanalysen

In Subgruppenanalysen in Abhängigkeit vom histopathologischen Typ (intestinal versus nicht intestinal; Tabelle A13) und dem klinischen Tumorstadium (cT2 versus cT3/4; Tabelle A14) zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Überlebensanalysen.

Bei getrennter Analyse nach der Lokalisation des Tumors konnte der Überlebensvorteil bei p53-Wildtyp-Expressionsmuster, vor allem in Tumoren ohne CTx mit distaler Lokalisation (Tabelle 53 und Abbildung 43) beobachtet werden. In der Resektatgruppe nach CTx war in keiner Lokalisation ein Überlebensunterschied hinsichtlich der p53-Expression zu erkennen (Tabelle A16).

Tabelle 53: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in Resektaten ohne neoadjuvante CTx in Abhängigkeit von der Lokalisation

Lokalisation	TP53	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p†
proximal	CA/OE	62	40	34,8	29,1 (6,6 – 51,6)	0,26	1,08 (0,78 - 1,51)	0,64
	WT	41	22	47,9	39,1 (0,0 – 107,8)		Ref.	
medial	CA/OE	29	15	41,5	51,0 (13,9 – 88,1)	0,09	1,35 (0,82 - 2,22)	0,24
	WT	50	15	62,3	102,7 (n.a.)		Ref.	
distal	CA/OE	31	17	29,1	26,8 (15,2 – 38,4)	<0,01	2,20 (1,16 - 4,17)	0,02
	WT	50	12	70,0	nicht erreicht		Ref.	

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

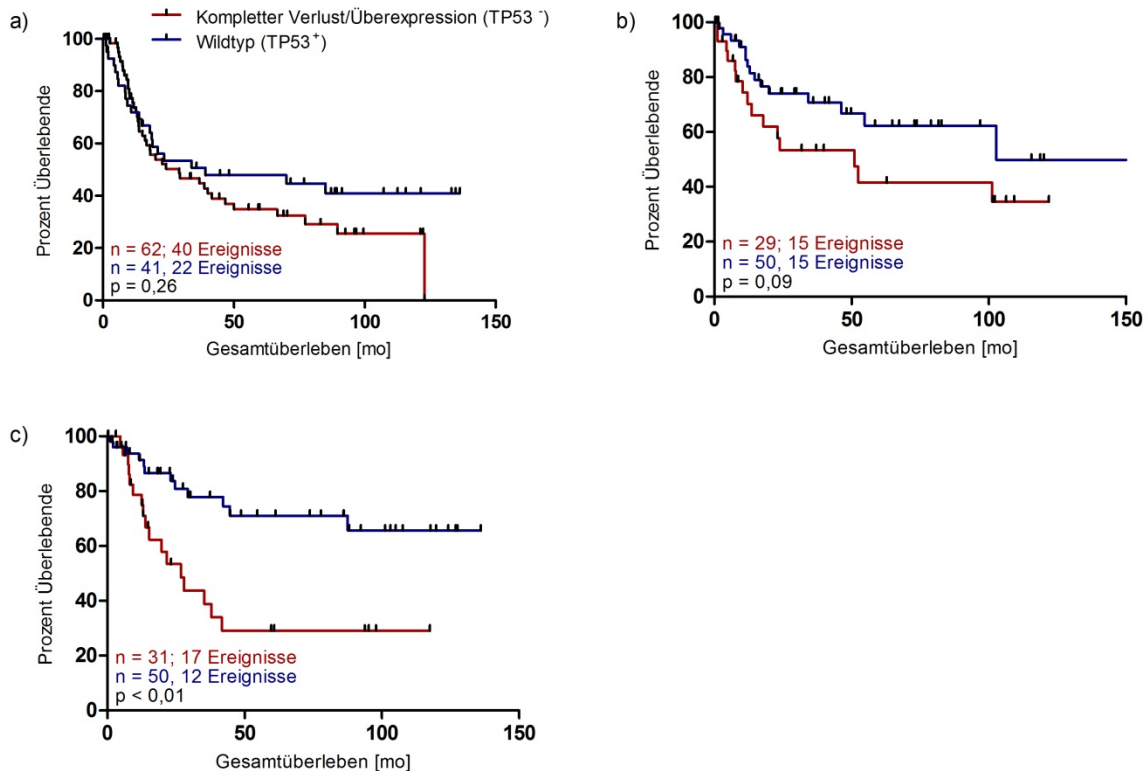


Abbildung 43: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben der Resektate ohne CTx in a) proximalen, b) medialen und c) distalen Magenkarzinomen

Hinsichtlich der Biopsien vor CTx wurden Subgruppenanalysen in Abhängigkeit von der Lokalisation (Tabelle 54 und Abbildung 44) und dem Tumorregressionsgrad (Tabelle 55 und Abbildung 45) durchgeführt.

Ähnlich zu den Resektaten ohne CTx zeigte sich auch im Kollektiv der Biopsien vor CTx eine Assoziation der p53-Expression mit dem Überleben der Patienten vor allem in distalen Tumoren ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,05$; Tabelle 54; Abbildung 44).

In der Subgruppe der resezierten Tumoren mit TRG3 nach CTx ließ sich ebenfalls ein Überlebensvorteil bei p53-Wildtyp-Expression erkennen ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,05$; Tabelle 55; Abbildung 45).

Tabelle 54: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in prätherapeutischen Biopsien vor CTx in Abhängigkeit von der Lokalisation

Lokalisation	p53	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p†
proximal	CA/OE	36	23	42,0	37,9 (7,8 – 68,0)	0,58	1,17 (0,68 - 2,02)	0,58
	WT	49	29	38,9	44,6 (17,5 – 71,8)		Ref.	
medial	CA/OE	17	8	42,9	27,4 (0,0 – 63,1)	0,45	1,56 (0,49 - 4,92)	0,45
	WT	8	5	50,0	nicht erreicht		Ref.	
distal	CA/OE	10	3	0,0	21,9 (n.a.)	0,05	8,42 (0,71 - 99,5)	0,09
	WT	5	2	64,3	nicht erreicht		Ref.	

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

Tabelle 55: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in prätherapeutischen Biopsien vor CTx in Respondern und Nonrespondern

Lokalisation	p53	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p†
TRG1 (Responder)	CA/OE	22	8	61,6	nicht erreicht	0,79	0,87 (0,31 - 2,40)	0,87
	WT	22	7	50,9	nicht erreicht		Ref.	
TRG2/3 (Nonresponder)	CA/OE	40	29	32,1	21,9 (9,5 - 34,3)	0,10	1,71 (1,01 - 2,89)	0,05
	WT	48	26	43,2	48,1 (20,6 - 75,6)		Ref.	

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

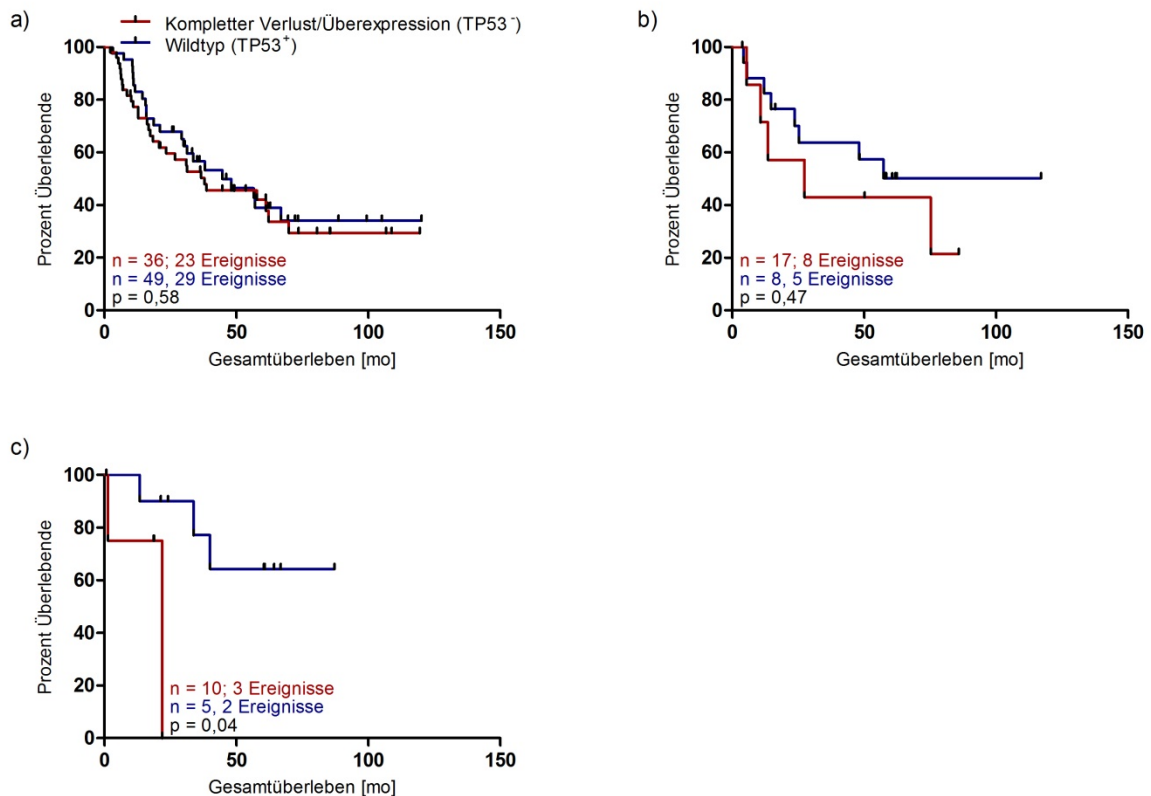


Abbildung 44: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben der prätherapeutischen Biopsien vor CTx in Abhängigkeit von der Lokalisation in a) proximale, b) mediale und c) distale Magenkarzinome

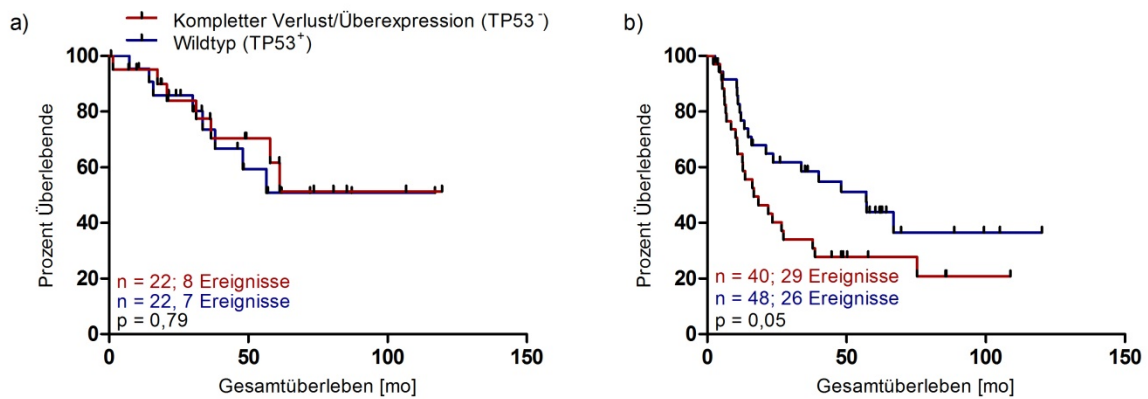


Abbildung 45: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben der prätherapeutischen Biopsien vor CTx in a) TRG1 (*Responder*) und TRG2/3 (*Nonresponder*) Tumoren

4.4.9. Assoziation der EMT-assoziierten Proteine mit dem Gesamtüberleben

4.4.9.1. E-Cadherin

In Tabelle 56 und Abbildung 46 ist die Assoziation der E-Cadherin-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben der Patienten dargestellt.

Es zeigte sich ein Überlebensnachteil bei niedriger E-Cadherin-Expression in der Resektatgruppe nach CTx ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,02$; HR, 1,93, 95% KI, 1,13 – 3,30, $p = 0,02$).

In den Resektaten ohne CTx deutete sich ein Überlebensvorteil bei niedriger E-Cadherin-Expression an ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,10$; HR, 0,63, 95% KI 0,33 – 1,21, $p = 0,17$).

Sowohl in Resektaten ohne CTx (HR, 0,52, 95% KI 0,28 – 0,97, $p = 0,04$) als auch in den jenen nach CTx (HR, 2,04, 95% KI 1,18 – 3,40, $p = 0,01$) wurde die E-Cadherin-Expression als unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben in die multivariate Analyse aufgenommen (Tabelle 57). In beiden Kollektiven wiesen Patienten mit 0% E-Cadherin Expression ein längeres Überleben als jene mit einer Expression zwischen 1-50% auf.

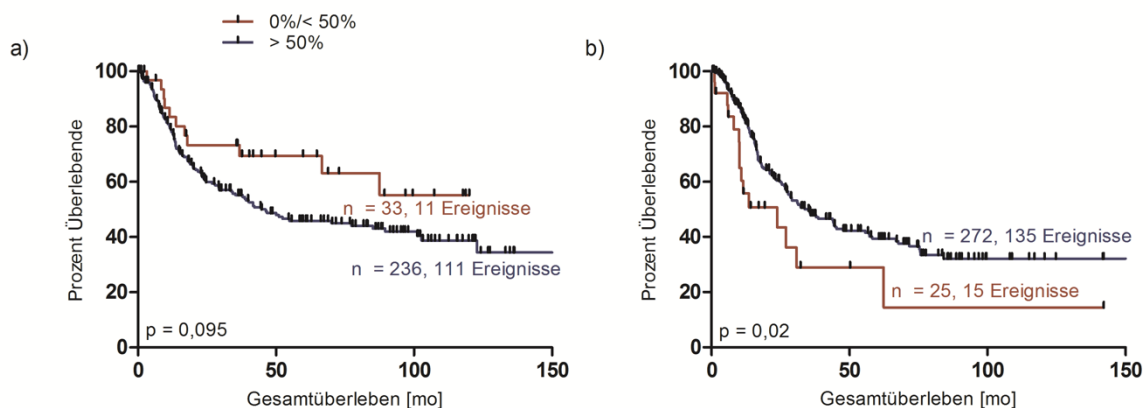


Abbildung 46: Assoziation der E-Cadherin-Expression mit dem Gesamtüberleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter Chemotherapie

Tabelle 56: Assoziation der E-Cadherin-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben der Patienten in den Patientenkollektiven

Kollektiv	E-Cadherin	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p [†]
Resektate ohne neoadjuvante CTx	0% / < 50%	33	11	69,4	nicht erreicht	0,10	0,63 (0,33 - 1,21)	0,17
	> 50%	236	111	45,9	46,3 (18,9 - 73,7)		Ref.	
Resektate nach neoadjuvanter CTx	0% / < 50%	25	15	29,0	23,8 (1,5 - 46,1)	0,02	1,93 (1,13 - 3,30)	0,02
	> 50%	272	135	39,3	35,1 (24,6 - 45,6)		Ref.	

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

Tabelle 57: Multivariate Cox Regression der E-Cadherin-Proteinexpression und (y)pTNM, R

Kollektiv	Variablen in der Gleichung	HR	95% KI	p*
Resektate ohne neoadjuvante CTx	N-Status (Ref. N0)	3,46	2,14 - 5,60	< 0,01
	M-Status (Ref. M0)	2,17	1,13 - 4,15	0,02
	R-Status (Ref. R0)	1,68	1,09 - 2,60	0,02
	E-Cadherin Proteinexpression (Ref. <50%)	0,52	0,28 - 0,97	0,04
Resektate nach neoadjuvanter CTx	R-Status (Ref. R0)	2,26	1,57 - 3,25	< 0,01
	N-Status s (Ref. N0)	2,78	1,75 - 4,44	< 0,01
	M-Status (Ref. M0)	1,77	1,22 - 2,59	< 0,01
	E-Cadherin Proteinexpression (Ref. > 50%)	2,04	1,18 - 3,40	0,01

*p-Wert: Cox-Regression

4.4.9.2. Vimentin

Die Assoziation der Vimentin-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben der Patienten ist in Tabelle 58 und Abbildung 47 dargestellt. Es deutet sich in den Resektaten ohne CTx ein negativer prognostischer Wert bei hoher Vimentin Expression an ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,08$; HR, 1,67, 95% KI, 0,85 - 3,34, $p = 0,14$).

Außerdem wurde die Vimentin-Expression als negativer unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben in die multivariate Analyse aufgenommen (HR, 2,31, 95% KI, 1,19 - 4,46, $p = 0,01$; Tabelle 59).

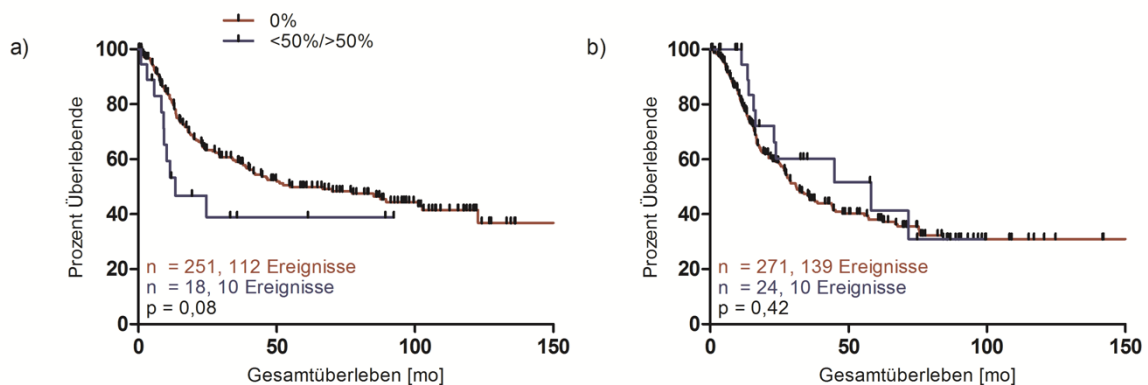


Abbildung 47: Assoziation der Vimentin-Expression mit dem Gesamtüberleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter Chemotherapie

Tabelle 58: Assoziation der Vimentin-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven

Kollektiv	Vimentin	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p†
Resektate ohne neoadjuvante CTx	0%	251	112	49,9	54,8 (24,5 – 85,1)	0,08	Ref. 1,67 (0,85 - 3,34)	0,14
	< 50%/> 50%	18	10	38,9	13,4 (0,1 – 30,3)			
Resektate nach neoadjuvanter CTx	0%	271	139	38,1	31,1 (24,3 – 37,9)	0,42	Ref. 0,77 (0,40 - 1,46)	0,42
	< 50%/> 50%	24	10	41,3	58,2 (9,0 – 107,4)			

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

Tabelle 59: Multivariate Cox Regression der Vimentin-Proteinexpression und pTNM, R

Kollektiv	Variablen in der Gleichung	HR	95% KI	p*
Resektate ohne neoadjuvante CTx	N-Status (Ref. N0)	3,52	2,18 – 5,70	< 0,01
	M-Status (Ref. M0)	2,20	1,15 – 4,20	0,02
	Vimentin Proteinexpression (Ref. 0%)	2,31	1,19 – 4,46	0,01
	R-Status (Ref. R0)	1,68	1,08 – 2,60	0,02
Resektate nach neoadjuvanter CTx	R-Status (Ref. R0)	2,27	1,57 – 3,26	< 0,01
	N-Status (Ref. N0)	2,79	1,75 – 4,45	< 0,01
	M-Status (Ref. M0)	1,71	1,18 – 2,29	< 0,01

*p-Wert: Cox-Regression

4.4.9.3. ZEB1

Die Assoziation der ZEB1-Proteinexpression mit dem Überleben ist in Abbildung 48 und Tabelle 60 dargestellt und zeigte keine Auffälligkeiten. Die Aussagekraft ist aufgrund der geringen Anzahl an Fällen mit einer positiven Expression begrenzt.

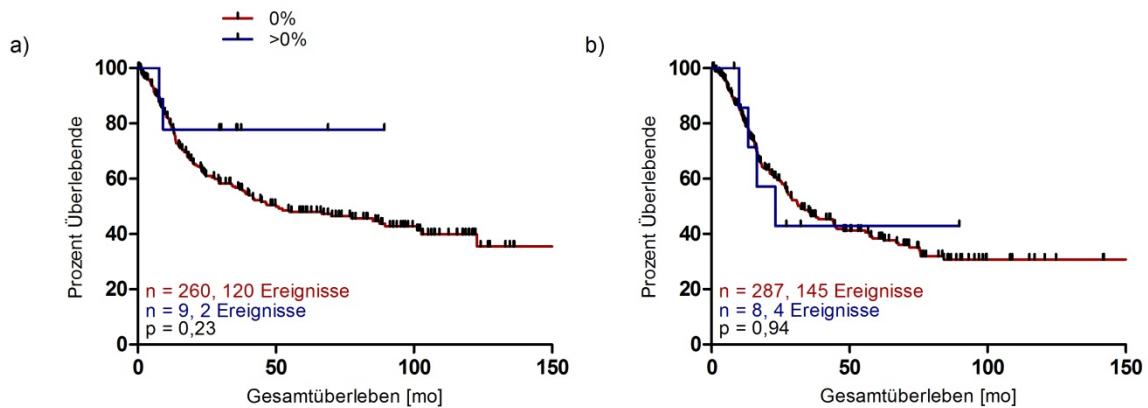


Abbildung 48: Assoziation der ZEB1- Expression mit dem Gesamtüberleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter Chemotherapie

Tabelle 60: Assoziation der ZEB1-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven

Kollektiv	ZEB1	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p†
Resektate ohne neoadjuvante CTx	0%	260	120	48,0	50,0 (19,2 – 80,8)	0,23	Ref. 0,22 (0,03 - 1,61)	0,14
	>0%	9	2	77,8	nicht erreicht			
Resektate nach neoadjuvanter CTx	0%	287	145	38,4	32,2 (21,7 – 42,7)	0,94	Ref. 1,49 (0,56 - 4,05)	0,43
	>0%	8	4	42,9	23,1 (5,9 - 40,3)			

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

4.5. ACRG-Klassifikation

Die Tumoren wurden nun, wie in Abbildung 49 dargestellt, analog der ACRG-Klassifikation eingeteilt. Als erste Gruppe wurden die Fälle mit Mikrosatelliteninstabilität identifiziert. Die EMT-Gruppe wurde zum einen mittels qPCR auf mRNA-Ebene an 250 Resektaten und 23 prätherapeutischen Biopsien wie unter Punkt 4.3.3. bestimmt. Zum anderen wurde die E-Cadherin Immunhistochemie als Surrogat für den EMT-Subtyp unter Punkt 4.5.2. an 532 Resektaten verwendet.

Die weiteren Tumoren wurden in Abhängigkeit von der p53-Proteinexpression eingeteilt. Unterschieden wurden Fälle mit p53-Wildtyp-Expression und damit erhaltener p53-Aktivität (TP53⁺) und jene mit einer Überexpression oder komplettem Expressionsverlust entsprechend einem p53-Funktionsverlust (TP53⁻).

Nach beiden Einteilungen stellten Tumoren mit aberranter p53-Expression den häufigsten Subtyp dar, gefolgt von jenen mit p53-Wildtypexpression. Im Unterschied zur Klassifikation auf mRNA-Ebene zeigte sich nach der proteinbasierten Klassifikation ein geringerer Anteil an EMT-Tumoren und ein größerer Anteil an Tumoren mit aberranter p53-Expression.

Die ACRG-Klassifikation mittels mRNA-basierter Genexpressionsanalysen konnte im Kollektiv der prätherapeutischen Biopsien vor CTx (n=50) ausschließlich an 23 Fällen vorgenommen werden, da nur in diesen Fällen immunhistochemische Analysen zur Bestimmung des p53-Status aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit biopsischen Gewebes möglich waren.

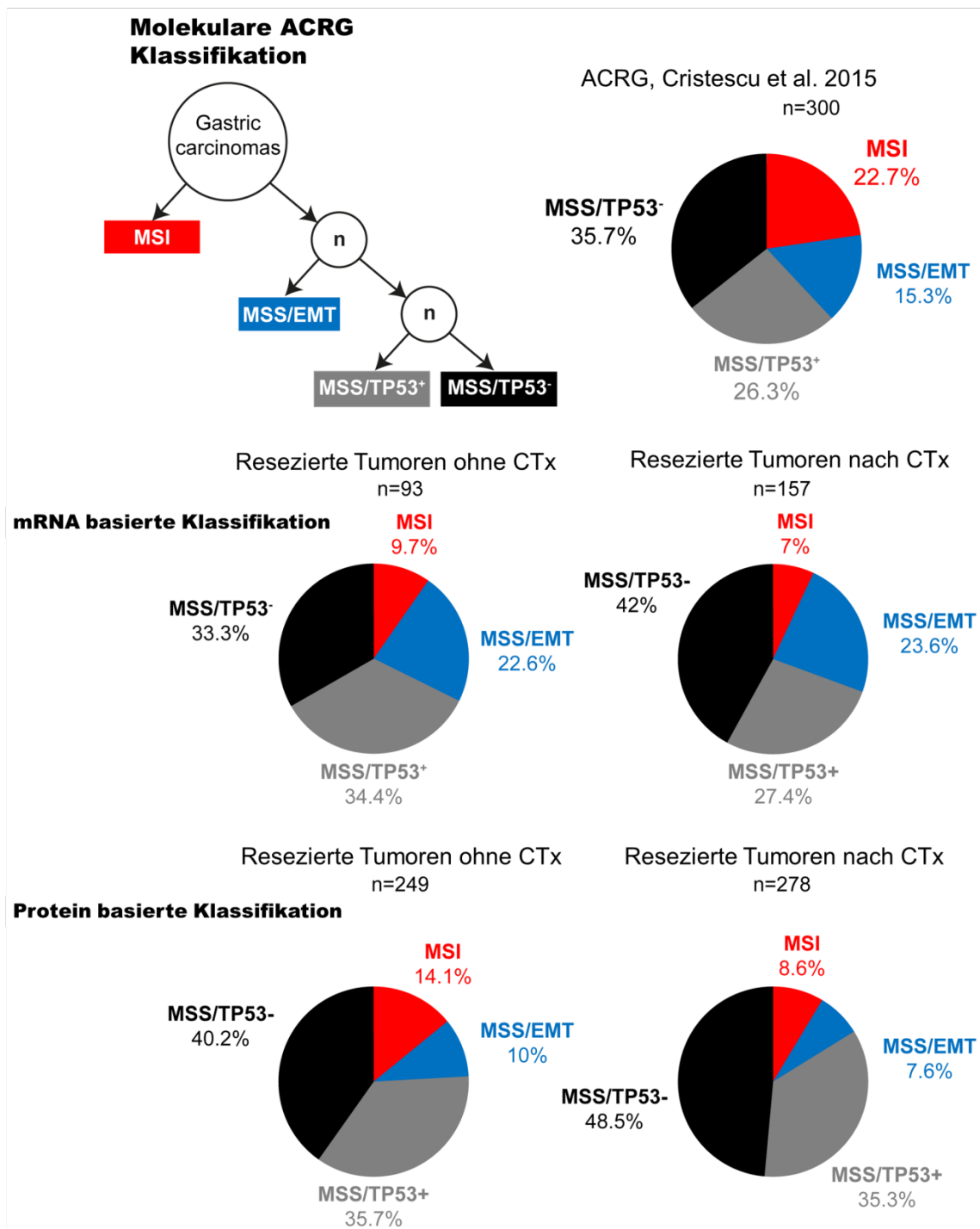


Abbildung 49: Vergleich der Häufigkeiten der Subgruppen der molekularen ACRG-Klassifikation nach Cristescu et al. (2015) mit den in der vorliegenden Arbeit angewandten Klassifikationsschemata

4.5.1. Einteilung der EMT-Typen auf mRNA-Ebene

Wie unter Punkt 4.3.3. bereits beschrieben, wurden die Tumoren auf mRNA-Ebene nach dem 75%-Quantil der *CDH1/ZEB1*-Expression eingeteilt.

4.5.1.1. Verteilung und Häufigkeit der Subtypen

In Tabelle 61 sind die Häufigkeiten und Verteilungen der Subtypen der ACRG-Klassifikation bei Einteilung der EMT-Subgruppe auf mRNA-Ebene getrennt in Resektaten ohne und nach neoadjuvanter Chemotherapie und in den prätherapeutischen Biopsien vor CTx dargestellt.

Tabelle 61: ACRG-Klassifikation: Fallzahlen in den einzelnen Kollektiven bei Einordnung der EMT-Tumoren hinsichtlich des 75%-Quantils der CDH1/ZEB1-Expression

Subtypen	Anzahl Tumoren n (%)		
	Biopsien vor CTx	Resektate ohne neoadjuvante CTx	Resektate nach neoadjuvanter CTx
MSI	3 (13,0)	9 (9,7)	11 (7,0)
EMT	2 (8,7)	21 (22,6)	37 (23,6)
TP53 ⁺ (wt)	4 (17,4)	32 (34,4)	43 (21,7)
TP53 (mut)	14 (60,9)	31 (33,3)	66 (42,0)
gesamt	23 (100)	93 (100)	157 (100)
NA	17 (34,0)	2 (2)	4 (2,5)

4.5.1.2. Assoziation der ACRG-Klassifikation mit dem Überleben

In Tabelle 62 und Abbildung 50 ist die Assoziation der ACRG-Klassifikation auf mRNA-Ebene mit dem Überleben dargestellt. Es zeigte sich in beiden Kollektiven eine deutliche Trennung der Überlebenskurven. In der Resektatgruppe ohne CTx überlebten Patienten mit MSI-Tumoren (HR, 0,71, 95% KI, 0,17 – 3,02, $p = 0,65$) und p53-Wildtyp-Expression (HR, 42, 95% KI, 0,16 – 1,10, $p = 0,08$) am längsten und erreichten das mediane Überleben nicht. Tumoren mit aberranter p53-Expression mit einem medianen Überleben von 35,3 Monaten (HR, 1,14, 95% KI, 0,94 – 1,38, $p=0,19$), gefolgt von Tumoren der EMT-Subgruppe mit 34,3 Monaten (HR, 1,25, 95% KI, 0,81 – 1,92, $p = 0,32$) wiesen das kürzeste Überleben auf.

Im Kollektiv der Resektate nach CTx konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden. So wiesen Patienten mit MSI-Tumoren (HR, 0,51, 95% KI, 0,19 – 1,38, $p = 0,10$) das längste Überleben auf, gefolgt von Patienten mit p53-Wildtyp-Karzinomen mit 35,6 Monaten (HR, 0,75, 95% KI, 0,44 – 1,27, $p = 0,28$), jenen mit p53-Verlust mit 26,7 Monaten (HR, 1,19, 95% KI, 0,77 – 1,84, $p = 0,43$) und jenen mit EMT-Tumoren mit 19,7 Monaten (HR, 1,34, 95% KI, 0,82 – 2,18, $p = 0,25$). In die multivariate Analyse wurde die ACRG-Klassifikation nicht aufgenommen (Tabelle 63).

Aufgrund des ähnlichen Überlebens der MSI⁺- und TP53⁺-Gruppe sowie des TP53⁻- und EMT-Subtyps wurden die Gruppen in Abbildung 51 zusammengefasst ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,04$; $p_{\text{Log-Rank}} = 0,07$).

Die Überlebensanalysen im Kollektiv der prätherapeutischen Biopsien vor CTx zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p_{\text{Log-Rank}} = 0,76$). Aufgrund der geringen Fallzahlen in den Subgruppen ist eine Aussage jedoch nur sehr eingeschränkt möglich.

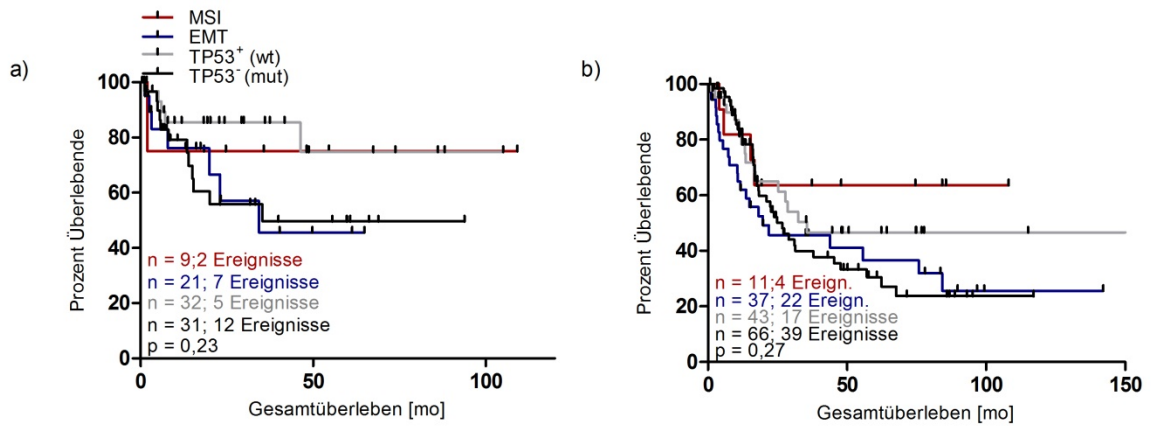


Abbildung 50: Assoziation der ACRG-Klassifikation auf mRNA-Ebene mit dem Überleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter Chemotherapie

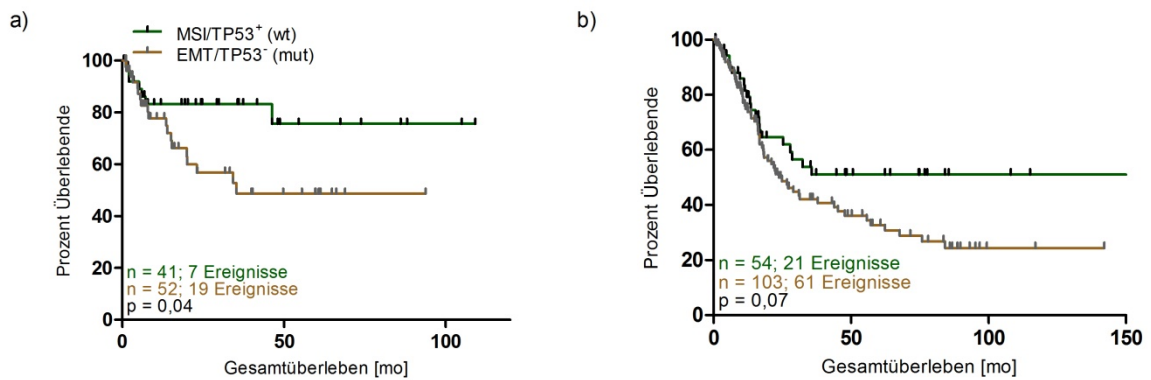


Abbildung 51: Assoziation der ACRG-Klassifikation auf mRNA-Ebene mit dem Überleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter Chemotherapie

Tabelle 62: Assoziation der ACRG-Klassifikation mit der EMT-Subgruppe auf mRNA-Ebene mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven

Kollektiv	Subtypen	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p [†]
Resektate ohne neoadjuvante CTx	MSI	9	2	75,0	not reached	0,23	0,71 (0,17 - 3,02)	0,65
	EMT	21	7	45,7	34,3 (n.a.)		1,25 (0,81 - 1,92)	0,32
	TP53 ⁺ (wt)	32	5	74,8	not reached		1,14 (0,94 - 1,38)	0,19
	TP53 ⁻ (mut)	31	12	49,6	35,3 (n.a.)		0,42 (0,16 - 1,10)	0,08
Resektate nach neoadjuvanter CTx	MSI	11	4	63,6	not reached	0,27	0,51 (0,19 - 1,38)	0,18
	EMT	37	22	36,6	19,7 (1,1 - 53,5)		1,34 (0,82 - 2,18)	0,25
	TP53 ⁺ (wt)	43	17	46,6	35,6 (n.a.)		1,19 (0,77 - 1,84)	0,43
	TP53 ⁻ (mut)	66	39	30,5	26,7 (19,3 - 34,1)		0,75 (0,44 - 1,27)	0,28

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

Tabelle 63: Multivariate Cox-Regression der ACRG-Subgruppen auf mRNA-Ebene und pTNM, R

Kollektiv	Variablen in der Gleichung	HR	95% KI	p*
Resektate ohne neoadjuvante CTx	R-Status (Ref. R0)	4,98	2,19 - 11,34	<0,01
	N-Status (Ref. N0)	2,50	1,27 - 4,92	<0,01
Resektate nach neoadjuvanter CTx	M-Status (Ref. M0)	2,78	1,69 - 4,55	<0,01
	R-Status (Ref. R0)	2,58	1,58 - 4,20	<0,01

*p-Wert: Cox-Regression

4.5.1.3. Assoziation der ACRG-Klassifikation mit Patientencharakteristika und dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie

Auffällige Assoziationen mit Patientencharakteristika zeigte die ACRG-Klassifikation auf mRNA-Ebene in beiden Kollektiven hinsichtlich der Tumorlokalisation, dem pT-Stadium und der Laurén-Klassifikation (Abbildung 52).

Wie in Abbildung 52c) und d) zu sehen ist, fanden sich in der Resektatgruppe ohne ($p < 0,01$) und nach neoadjuvanter Chemotherapie ($p = 0,05$) in der Gruppe der MSI- und TP53⁻-Tumoren vor allem intestinale Karzinome, während der EMT-Subtyp zum überwiegenden Anteil nicht-intestinale Tumoren beinhaltete.

In Resektaten ohne CTx zeigte die Klassifikation eine auffällige Assoziation mit dem N- und M-Status (Abbildung 52g, h). So wiesen MSI- und TP53⁺-Tumoren in der Mehrheit keine Lymphknoten- ($p = 0,02$) und Fernmetastasen ($p = 0,02$) auf, wohingegen in der TP53⁻- und EMT-Subgruppe Entgegengesetztes zu beobachten war.

Die Ergebnisse sind in Tabelle A17 und A18 im Anhang zusammengefasst.

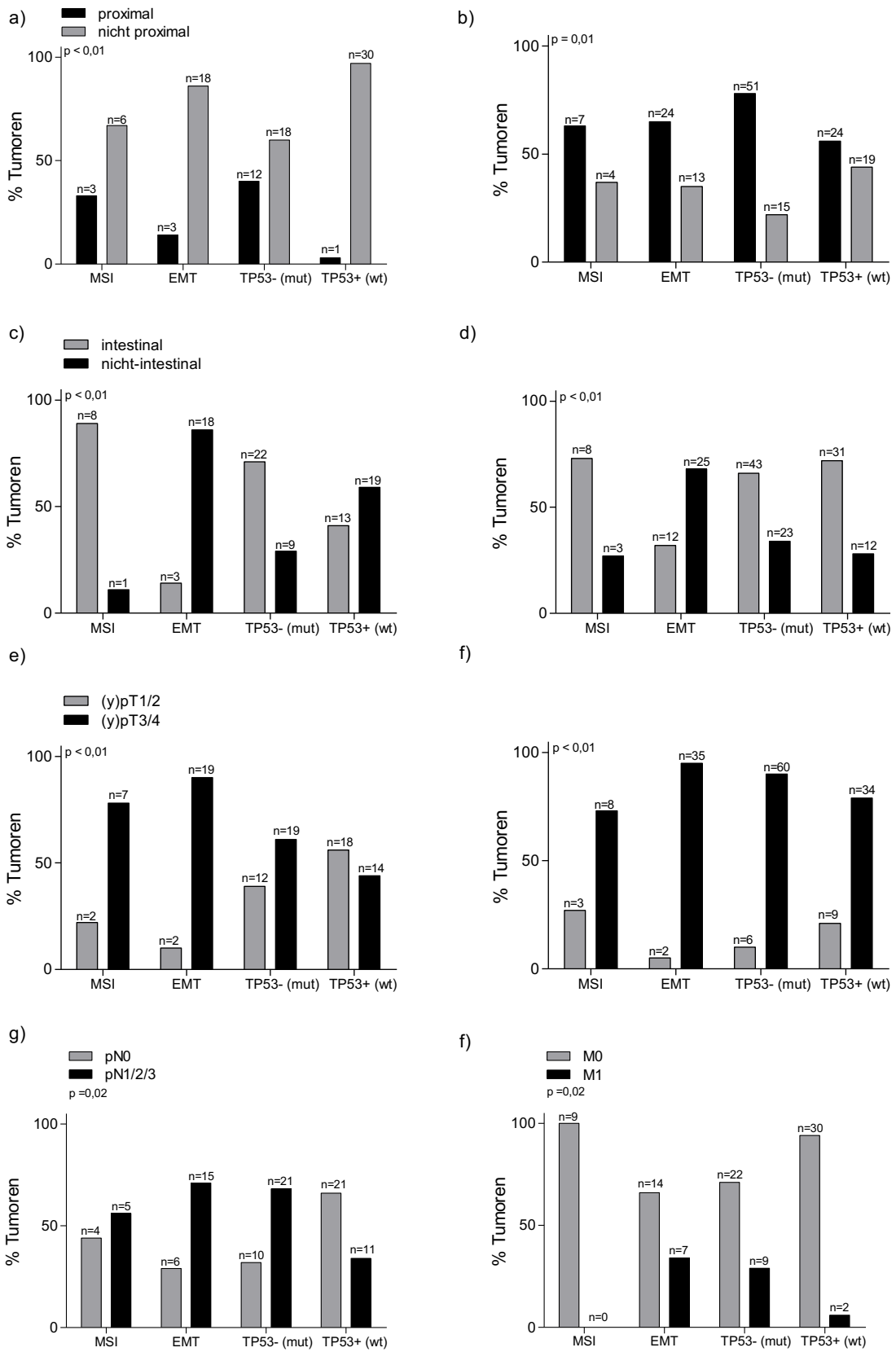


Abbildung 52: Assoziation der ACRG-Subgruppen mit der Lokalisation, der Laurén-Klassifikation und dem T-Stadium in Resektaten a), c), d) ohne und b), d), e) nach neoadjuvanter CTx; Assoziation mit dem g) Lymphknoten- und h) Metastasenstatus in Resektaten ohne CTx

Wie bereits unter Punkt 4.5. beschrieben, konnte die ACRG-Klassifikation auf mRNA-Ebene an 23 Fällen im Kollektiv der prätherapeutischen Biopsien vor CTx angewandt werden. Es zeigte sich, wie in Abbildung 53a) dargestellt, keine Assoziation mit dem Tumorregressionsgrad ($p = 0,41$). Es waren jedoch keine *Responder* in der EMT- und p53-Wildtyp-Subgruppe zu finden, wobei die Aussagekraft im Anbetracht der geringen Fallzahl sehr begrenzt ist. Hinsichtlich der Resektate nach CTx zeigte sich kein signifikanter ($p = 0,12$) Zusammenhang mit dem Tumorregressionsgrad. Es ließ sich jedoch erkennen, dass Patienten mit MSI-Tumoren vor allem den Tumorregressionsgrad 3 aufwiesen und EMT-Patienten den Tumorregressionsgrad 2 (Abbildung 53b).

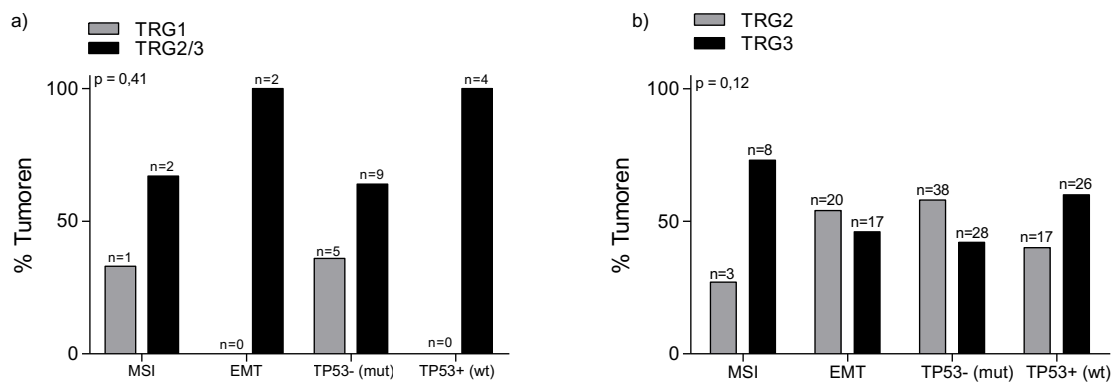


Abbildung 53: Assoziation der ACRG-Subgruppen mit dem Tumorregressionsgrad in a) prätherapeutischen Biopsien vor CTx und in b) Resektaten nach neoadjuvanter Chemotherapie

4.5.2. Einteilung der EMT Subgruppe nach der E-Cadherin Proteinexpression

Die E-Cadherin-Proteinexpression wurde als Surrogat für die Einteilung in die EMT-Gruppe auf Proteinebene gewählt. Im Folgenden wurde die ACRG-Klassifikation am Gesamtkollektiv angewandt. Die Fallzahl aberranter Vimentin- und ZEB1-Expressionen war so gering, dass diese nicht mit in die Klassifikation des EMT-Subtyps aufgenommen wurden.

4.5.2.1. Verteilung und Häufigkeit der Subtypen

Im Folgenden finden sich die Häufigkeiten und Verteilungen (Tabelle 64) der ACRG-Subtypen mit der EMT-Einordnung auf Proteinebene.

In 237 Fällen lag die ACRG-Klassifikation auf mRNA- und Proteinebene vor. Auf mRNA-Ebene wurden 53 Fälle, auf Proteinebene 22 dieser 237 Tumoren als EMT klassifiziert. In acht Fällen wurden die Tumoren von beiden Methoden als EMT eingeordnet.

Tabelle 64: Fallzahlen der ACRG-Klassifikation bei Einordnung der EMT-Tumoren auf Proteinebene in den Patientenkollektiven

Subtypen	Anzahl Resektate n (%)	
	Resektate ohne neoadjuvante CTx	Resektate nach neoadjuvanter CTx
MSI	35 (14,1)	24 (8,6)
EMT	25 (10,0)	21 (7,6)
TP53 ⁺ (wt)	89 (35,7)	98 (35,3)
TP53 ⁻ (mut)	100 (40,2)	135 (48,5)
gesamt	249 (100)	278 (100)
NA	41 (14,1)	48 (14,7)

4.5.2.2. Assoziation der ACRG-Klassifikation mit dem Überleben

Es zeigte sich in der Resektatgruppe ohne ($p < 0,01$) und nach neoadjuvanter CTx ($p=0,02$) eine Assoziation der ACRG-Klassifikation mit dem Gesamtüberleben der Patienten (Tabelle 65). In den Resektaten ohne CTx wiesen Patienten mit EMT-Tumoren mit einem 5-Jahres-Überleben von 68%, gefolgt von jenen mit MSI-Tumoren mit 66%, den TP53⁺-Fällen mit 54% und den TP53⁻-Patienten mit 36% das längste Überleben auf. Hinsichtlich der Resektate nach CTx überlebten Patienten mit MSI-Tumoren mit einem 5-Jahres-Überleben von 59% am längsten, vor den TP53⁻ mit 41%, den TP53⁺ mit 36% und den EMT-Tumoren mit 24%.

Tabelle 65: Assoziation der ACRG-Klassifikation auf Proteinebene mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven

Kollektiv	Subtypen	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p [†]
Resektate ohne neoadjuvante CTx	MSI	35	13	66,2	nicht erreicht	<0,01	0,71 (0,40 - 1,27)	0,25
	EMT	25	8	68,0	nicht erreicht		0,64 (0,31 - 1,32)	0,23
	TP53 ⁺ (wt)	89	32	53,9	102,7 (n.a.)		0,71 (0,47 - 1,07)	0,10
	TP53 ⁻ (mut)	100	58	36,0	27,9 (13,5 - 42,3)		1,92 (1,32 - 2,78)	<0,01
Resektate nach neoadjuvanter CTx	MSI	24	8	58,5	nicht erreicht	0,02	0,55 (0,27 - 1,13)	0,10
	EMT	21	14	23,7	13,5 (0,0 - 28,8)		2,17 (1,25 - 3,78)	<0,01
	TP53 ⁺ (wt)	98	49	36,2	32,4 (24,7 - 40,1)		1,00 (0,71 - 1,42)	0,97
	TP53 ⁻ (mut)	135	69	40,6	31,4 (16,4 - 46,4)		0,92 (0,66 - 1,28)	0,62

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

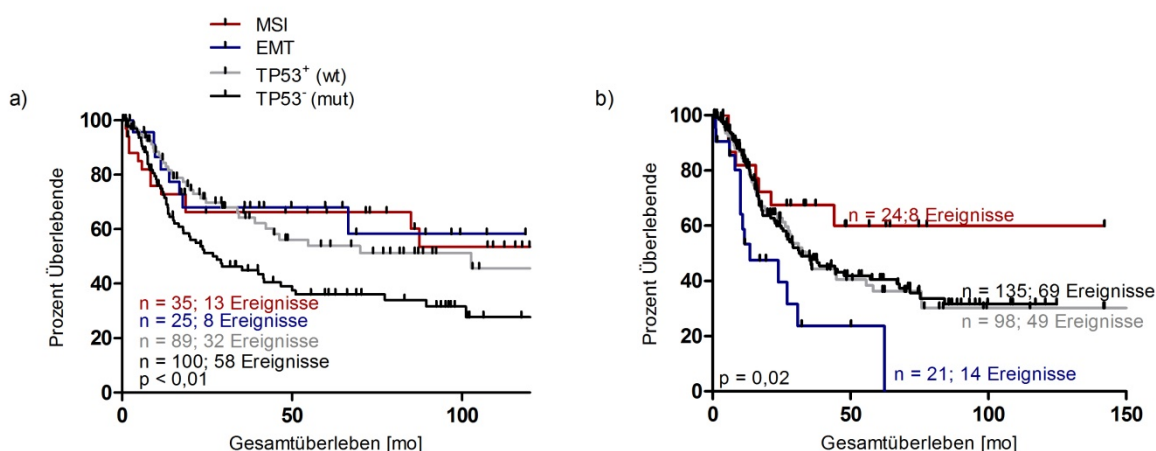


Abbildung 54: Assoziation der ACRG-Klassifikation auf Proteinebene mit dem Überleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter CTx

4.6. Modifizierte ACRG-Klassifikationen

4.6.1. Verteilung und Häufigkeiten der Subgruppen nach den modifizierten ACRG-Klassifikationen

Mehrere Arbeitsgruppen entwickelten bereits Methoden zur Vereinfachung der ACRG-Klassifikation, um sie in der Routinediagnostik anwenden zu können.

Ahn et al. (2017) konnten die molekulare Klassifikation an primären Magenkarzinomen ohne CTx mit immunhistochemischen Analysen und in-situ Hybridisierung unter Hinzunahme des EBV⁺-Subtyps reproduzieren. Auch Setia et al. (2016) und Koh et al. (2019) wandten die ACRG-Klassifikation mit zusätzlichem EBV⁺-Subtyp an primären Karzinomen ohne CTx an. Analog zu diesen Arbeiten wurde eine modifizierte ACRG-Klassifikation mit zusätzlicher EBV⁺-Subgruppe analysiert. Außerdem wurde eine weitere Variante unter Hinzunahme des EBV⁺- und MSI-L-Subtyps betrachtet (Abbildung 55). Die Daten bezüglich der MSI-L-Tumoren wurden bereits in der Arbeit Kohruss, Grosser et al. (2019) veröffentlicht.

Die Häufigkeiten der modifizierten ACRG-Klassifikationen sind in Tabelle 66 dargestellt.

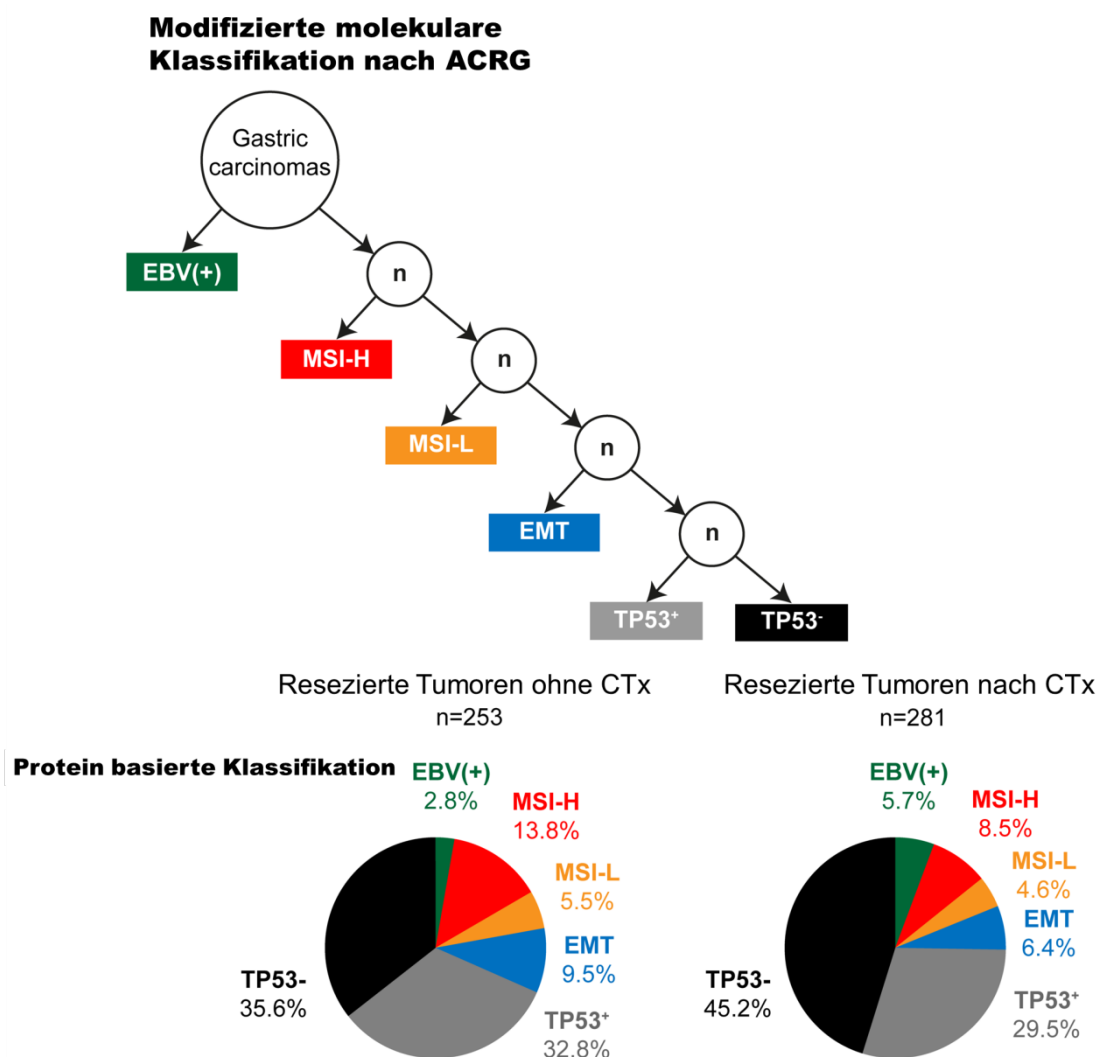


Abbildung 55: Klassifikationsschema und Häufigkeiten der Subgruppen der modifizierten molekularen Klassifikation nach ACRG mit zusätzlicher EBV⁺- und MSI-L-Subgruppe

Tabelle 66: Häufigkeiten und Verteilung der Subgruppen der modifizierten ACRG-Klassifikationen

Subgruppen	Anzahl Tumoren (%)	
	Resektate ohne neoadjuvante CTx	Resektate nach neoadjuvanter CTx
EBV ⁺	7 (2,8)/7 (2,8)*	16 (5,7)/16 (5,7)*
MSI-H	35 (14,0)/35 (13,8)*	24 (8,6)/24 (8,5)*
MSI-L	0 (0)/14 (5,5)*	13 (4,6)*
EMT	24 (9,6)/24 (9,5)*	19 (6,7)/18 (6,4)*
TP53 ⁺	85 (34,0)/83 (32,8)*	87 (31,1)/83 (29,5)*
TP53 ⁻	99 (39,6)/90 (35,6)*	134 (47,9)/127 (45,2)*
gesamt	250 (100)/253 (100)*	280 (100)/281 (100)*
NA	40 (13,8)/37 (12,8)*	45 (13,8)/44 (13,5)*

*Fallzahlen der ACRG-Klassifikation mit MSI-L-Subgruppe

4.6.2. Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikationen mit dem Gesamtüberleben

Die modifizierte ACRG-Klassifikation mit EBV⁺-Subgruppe zeigte in der Resektatgruppe ohne (p = 0,02) und nach neoadjuvanter Chemotherapie (p = 0,04) auffällige Zusammenhänge mit dem Überleben der Patienten (Tabelle 67 und Abbildung 56).

In Resektaten ohne CTx wiesen Patienten mit EBV⁺-Tumoren das längste 5-Jahres-Überleben mit 83% auf (HR, 0,23, 95% KI, 0,03 - 1,68, p = 0,15), gefolgt von jenen mit EMT-Tumoren (HR, 0,68, 95% KI, 0,33 - 1,40, p = 0,30), Patienten mit MSI- (HR, 0,71, 95% KI, 0,40 - 1,27, p = 0,25), jenen mit TP53⁺-Tumoren (HR, 0,80, 95% KI, 0,53 - 1,21, p = 0,29) und den TP53⁻-Patienten (HR, 1,87, 95% KI, 1,29 - 1,72, p < 0,01).

In der Resektatgruppe nach CTx überlebten Patienten mit MSI-Tumoren mit einem 5-Jahres-Überleben von 60% am längsten (HR, 0,55, 95% KI, 0,27 - 1,13, p = 0,10), gefolgt von jenen mit EBV⁺-Tumoren mit 50% (HR, 0,69, 95% KI, 0,30 - 1,56, p = 0,37), den TP53⁻-Patienten mit 40% (HR, 0,93, 95% KI, 0,67 - 1,30, p = 0,68), jenen mit TP53⁺-Tumoren mit 34% (HR, 1,09, 95% KI, 0,77 - 1,57, p = 0,61) und Patienten mit EMT-Tumoren mit 24% (HR, 2,11, 95% KI, 1,19 - 3,74, p = 0,01).

Die Klassifikation wurde in der multivariaten Analyse unter Einschluss des pTNM- und R-Status nicht in das finale Modell integriert.

Tabelle 67: Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit der EBV⁺-Subgruppe mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven

Kollektiv	Subtypen	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p [†]
Resektate ohne neoadjuvante CTx	EBV ⁺	7	1	83,3	nicht erreicht	0,02	0,23 (0,03 - 1,68)	0,15
	MSI	35	13	66,2	nicht erreicht		0,71 (0,40 - 1,27)	0,25
	EMT	24	8	66,5	nicht erreicht		0,68 (0,33 - 1,40)	0,30
	TP53 ⁺ (wt)	85	32	51,3	70,0 (15,2 - 124,8)		0,80 (0,53 - 1,21)	0,29
	TP53 ⁻ (mut)	99	57	36,4	27,9 (11,1 - 44,7)		1,87 (1,29 - 1,72)	<0,01
Resektate nach neoadjuvanter CTx	EBV ⁺	16	6	47,9	nicht erreicht	0,04	0,69 (0,30 - 1,56)	0,37
	MSI	24	8	60,0	nicht erreicht		0,55 (0,27 - 1,13)	0,10
	EMT	19	13	24,0	13,5 (0,0 - 28,8)		2,11 (1,19 - 3,74)	0,01
	TP53 ⁺ (wt)	87	45	34,0	31,1 (23,4 - 38,8)		1,09 (0,77 - 1,57)	0,61

TP53 ⁻ (mut)	134	69	40,3	31,4 (17,2 – 45,6)	0,93 (0,67 - 1,30)	0,68
-------------------------	-----	----	------	--------------------	--------------------	------

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

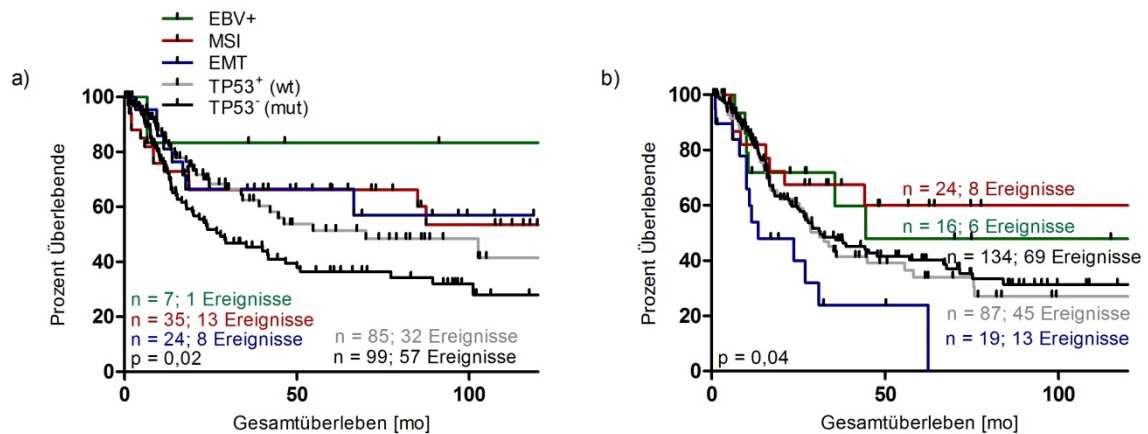


Abbildung 56: Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit der EBV⁺-Subgruppe mit dem Überleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter CTx

Die modifizierte Klassifikation mit zusätzlicher MSI-L-Gruppe zeigte in Resektaten ohne (p_{Log-Rank} < 0,01) und nach CTx (p_{Log-Rank} = 0,04) Assoziationen mit dem Überleben der Patienten (Abbildung 57).

In der Resektatgruppe ohne CTx wiesen Patienten mit MSI-L-Tumoren (HR, 2,12, 95% KI, 1,16 - 3,86, p = 0,01) ein geringeres 5-Jahres-Überleben von 32,4% auf. Patienten mit MSI-L Tumoren nach neoadjuvanter CTx überlebten mit einem 5-Jahres-Überleben von 70,7% länger (HR, 0,71, 95% KI, 0,26 - 1,92, p = 0,50).

Tabelle 68: Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit zusätzlicher EBV⁺- und MSI-L Subgruppe

Kollektiv	Subtypen	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p†
Resektate ohne neoadjuvante CTx	EBV ⁺	7	1	83,3	nicht erreicht	0,01	0,23 (0,03 - 1,68)	0,15
	MSI-H	35	13	66,2	nicht erreicht		0,71 (0,40 - 1,27)	0,25
	MSI-L	14	12	23,4	21,7 (1,0 – 42,4)		2,12 (1,16 - 3,86)	0,01
	EMT	24	8	66,5	not reached		0,67 (0,33 - 1,37)	0,27
	TP53 ⁺ (wt)	83	31	52,6	70,0 (8,2 – 131,8)		0,78 (0,52 - 1,18)	0,24
	TP53 ⁻ (mut)	90	48	38,1	27,9 (8,1 – 47,7)		1,54 (1,06 - 2,24)	0,02
Resektate nach neoadjuvanter CTx	EBV ⁺	16	6	47,9	44,4 (n.a.)	0,04	0,69 (0,30 - 1,56)	0,37
	MSI-H	24	8	60,0	nicht erreicht		0,55 (0,27 - 1,13)	0,10
	MSI-L	13	4	70,7	62,4 (n.a.)		0,71 (0,26 - 1,92)	0,50
	EMT	18	12	17,9	13,5 (8,5 – 18,8)		2,35 (1,30 - 4,28)	<0,01
	TP53 ⁺ (wt)	83	44	33,6	28,6 (21,1 - 36,1)		1,12 (0,79 - 1,60)	0,52
	TP53 ⁻ (mut)	127	67	40,0	31,4 (17,3 - 45,5)		0,99 (0,71 - 1,37)	0,93

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

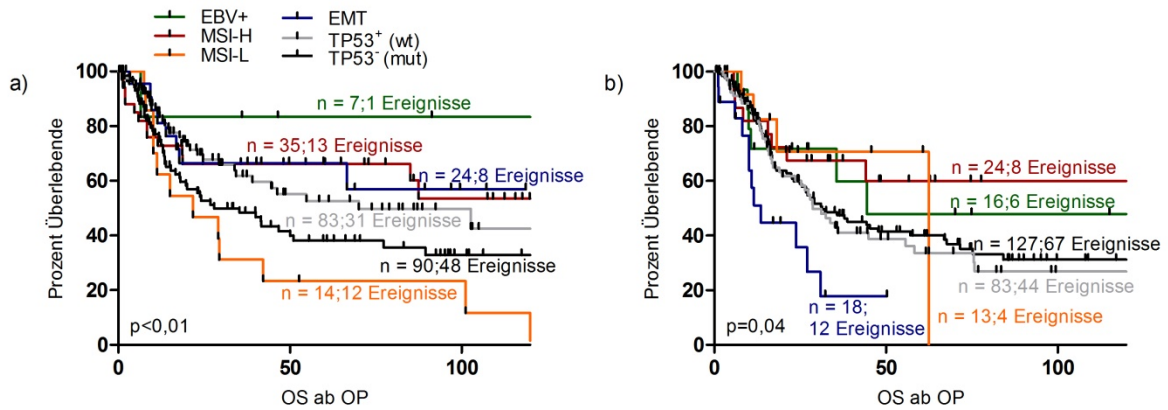


Abbildung 57: Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit zusätzlicher EBV⁺- und MSI-L-Subgruppe mit dem Überleben in Resektaten a) ohne und b) nach CTx

4.6.3. Subgruppenanalysen nach Lokalisation und cT-Stadium

Subgruppenanalysen und Assoziationen mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika wurden ausschließlich unter Betrachtung der modifizierten Variante der ACRG-Klassifikation mit zusätzlichem EBV⁺-Subtyp durchgeführt.

Um die prognostische Relevanz der molekularen Subgruppen näher zu beleuchten, wurden Subgruppenanalysen nach der Lokalisation und dem cT-Stadium vorgenommen (Abbildung 58).

In der Resektatgruppe nach CTx zeigte sich der negative prognostische Effekt der EMT-Subgruppe vor allem in proximalen Magenkarzinomen (Abbildung 58a). In Resektaten ohne CTx und hinsichtlich des cT-Stadiums waren keine Auffälligkeiten erkennbar.

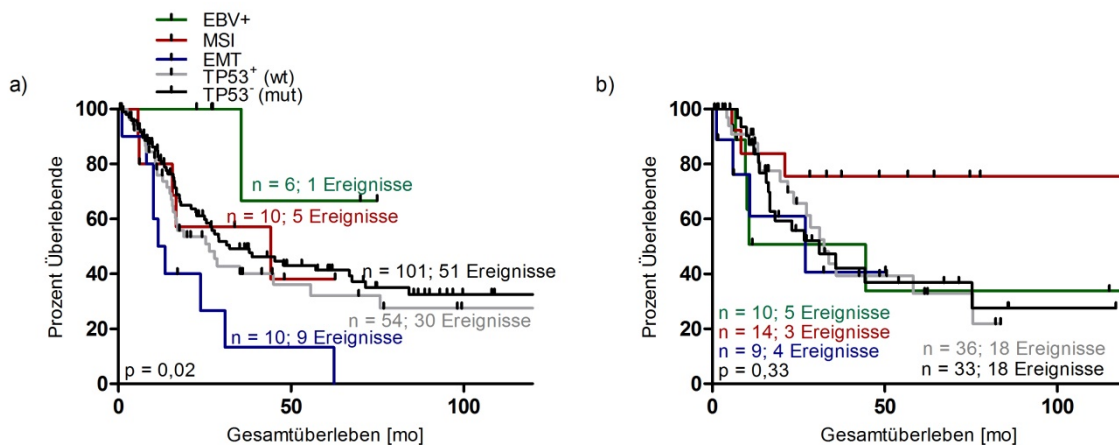


Abbildung 58: Getrennte Betrachtung in Resektaten nach CTx und nach der Lokalisation: Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit zusätzlicher EBV⁺-Subgruppe mit dem Überleben a) in proximalen und b) nicht proximalen Tumoren

4.6.4. Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit Patientencharakteristika und dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie

Die modifizierte ACRG-Klassifikation mit zusätzlicher EBV⁺-Subgruppe zeigte eine auffällige Assoziation mit der Lokalisation. Tumoren mit aberranter p53-Expression befanden sich hier vermehrt in den proximalen Karzinomen (Abbildung 59).

Hinsichtlich der Laurén-Klassifikation konnte ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang beobachtet werden, wobei intestinale Tumoren mit dem MSI-, EBV⁺- und p53-Subtyp einhergingen. In der EMT-Gruppe fanden sich in der Mehrheit nicht-intestinale Karzinome (Abbildung 60a, b).

Die Assoziation der ACRG-Klassifikation auf Proteinebene zeigte Auffälligkeiten hinsichtlich des Alters in beiden Kollektiven. Patienten mit EBV⁺- und EMT-Tumoren waren eher jünger, während Patienten mit MSI-Tumoren in der Mehrheit älter waren (Abbildung 60c, d).

Außerdem bestand in beiden Kollektiven eine Assoziation mit dem pT-Stadium mit dem geringsten Anteil an pT1/2-Tumoren in der EMT-Gruppe.

Alle Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle A19 und A20 zusammengefasst.

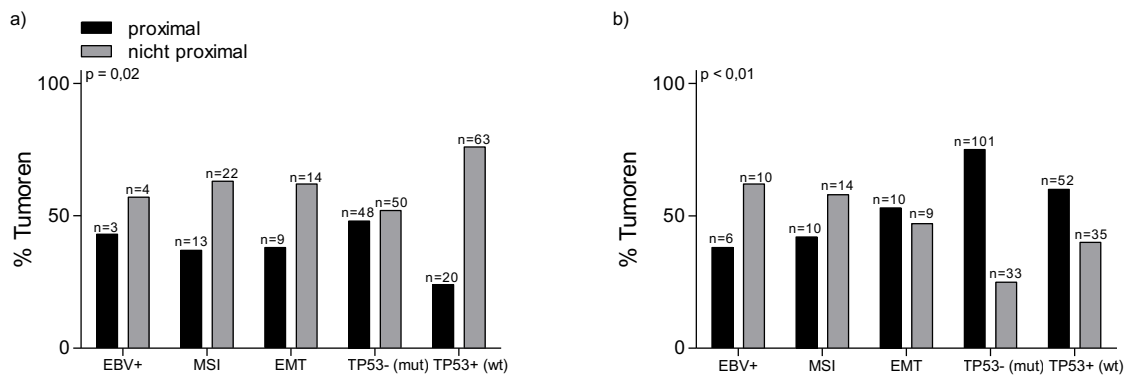


Abbildung 59: Assoziation der modifizierten ACRG-Subgruppen mit der Lokalisation in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter Chemotherapie

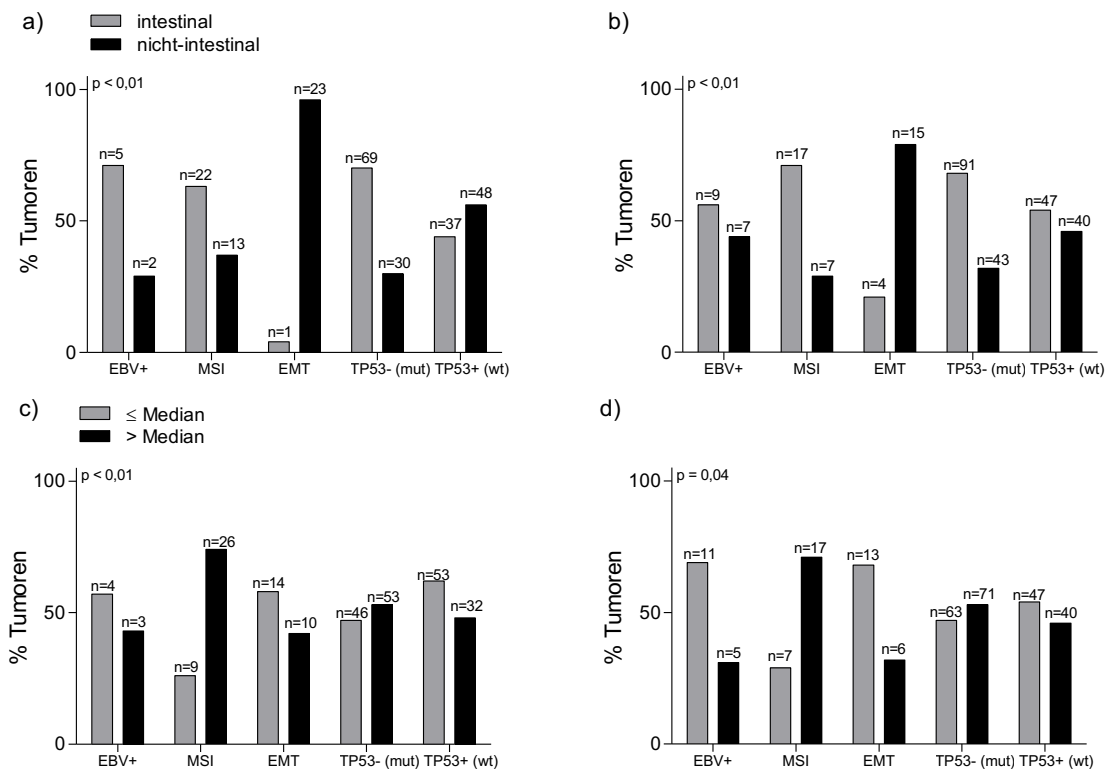


Abbildung 60: Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit der Laurén-Klassifikation und dem Alter der Patienten in Resektaten a) ohne, b) nach neoadjuvanter CTx, c) ohne und d) nach CTx

Die ACRG-Klassifikation auf Proteinebene konnte nicht an den prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx angewandt werden, da keine E-Cadherin-Immunhistochemie durchgeführt wurde.

Mit dem Tumorregressionsgrad (TRG2/3) zeigte die Klassifikation einen signifikanten Zusammenhang ($p = 0,02$) in der Resektatgruppe nach CTx. In der MSI- und EMT-Subgruppe fanden sich in der Mehrheit Tumoren mit TRG3 (Abbildung 61).

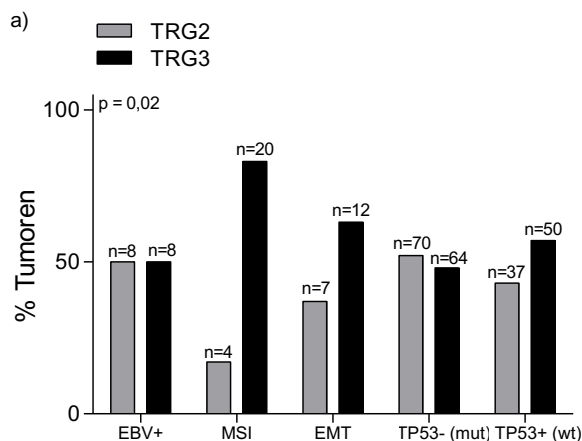


Abbildung 61: Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit dem Tumorregressionsgrad in Resektaten nach neoadjuvanter Chemotherapie

4.7. p53 und MSI

Im Folgenden wurde die prognostische Relevanz des p53 und dessen Assoziation mit dem MSI-Status näher untersucht. In Tabelle 69 sind die Häufigkeiten der MSI-H und MSS/EBV⁻ Tumoren in Biopsien vor CTx und Resektaten getrennt nach dem Vorhandensein einer aberranten p53-Proteinexpression dargestellt.

Tabelle 69: Häufigkeit bzw. Verteilung der MSI-H- und MSS/EBV⁻-Subgruppen in den Patientenkollektiven in Abhängigkeit des p53-Status

Subtypen	Biopsien vor CTx		Resektate	
	Anzahl Tumoren n (%)		Anzahl Tumoren n (%)	
p53-Wildtypexpression	MSI-H	6 (13)	48 (20,1)	
	MSS/EBV ⁻	39 (87)	191 (79,9)	
	gesamt	45 (100)	239 (100)	
Aberrante p53-Expression	MSI-H	6 (13,0)	5 (2,1)	
	MSS/EBV ⁻	40 (87,0)	234 (97,9)	
	gesamt	46 (100)	239 (100)	

4.7.1. p53 und Assoziation mit dem MSI- und EBV⁺-Status

In Tabelle 70 sind die Häufigkeiten der Subgruppen EBV⁺, MSI-L, MSI-H und MSS/EBV⁻ in den Patientenkollektiven dargestellt.

In Abbildung 62 wurden die Assoziationen der Subgruppen mit der p53-Proteinexpression veranschaulicht. Die Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle A21 zusammengefasst.

Sowohl in den Biopsien vor CTx ($p = 0,02$) als auch in allen Resektaten ($p < 0,01$) fand sich in den EBV⁺-Subtypen in der Mehrheit eine p53-Wildtypexpression. Umgekehrt verhielt es

sich mit MSI-L-Tumoren. Diese wiesen in allen Kollektiven in der Mehrheit eine aberrante p53-Expression auf. In allen Resektaten waren in den MSI-H-Fällen vor allem Tumoren mit p53-Wildtypexpression zu finden ($p < 0,01$). Dies ließ sich im Kollektiv der Biopsien vor CTx nicht erkennen.

Tabelle 70: Häufigkeit bzw. Verteilung der MSI-L-, MSI-H- und EBV⁺-Subgruppen in den Patientenkollektiven

Subtypen	Biopsien vor CTx	Resektate
	Anzahl Tumoren n(%)	Anzahl Tumoren n(%)
EBV ⁺	5 (5)	20 (4)
MSI-L	4 (4)	23 (4)
MSI-H	12 (12)	53 (10)
MSS/EBV ⁻	79 (79)	425 (82)
gesamt	100 (100)	521 (100)

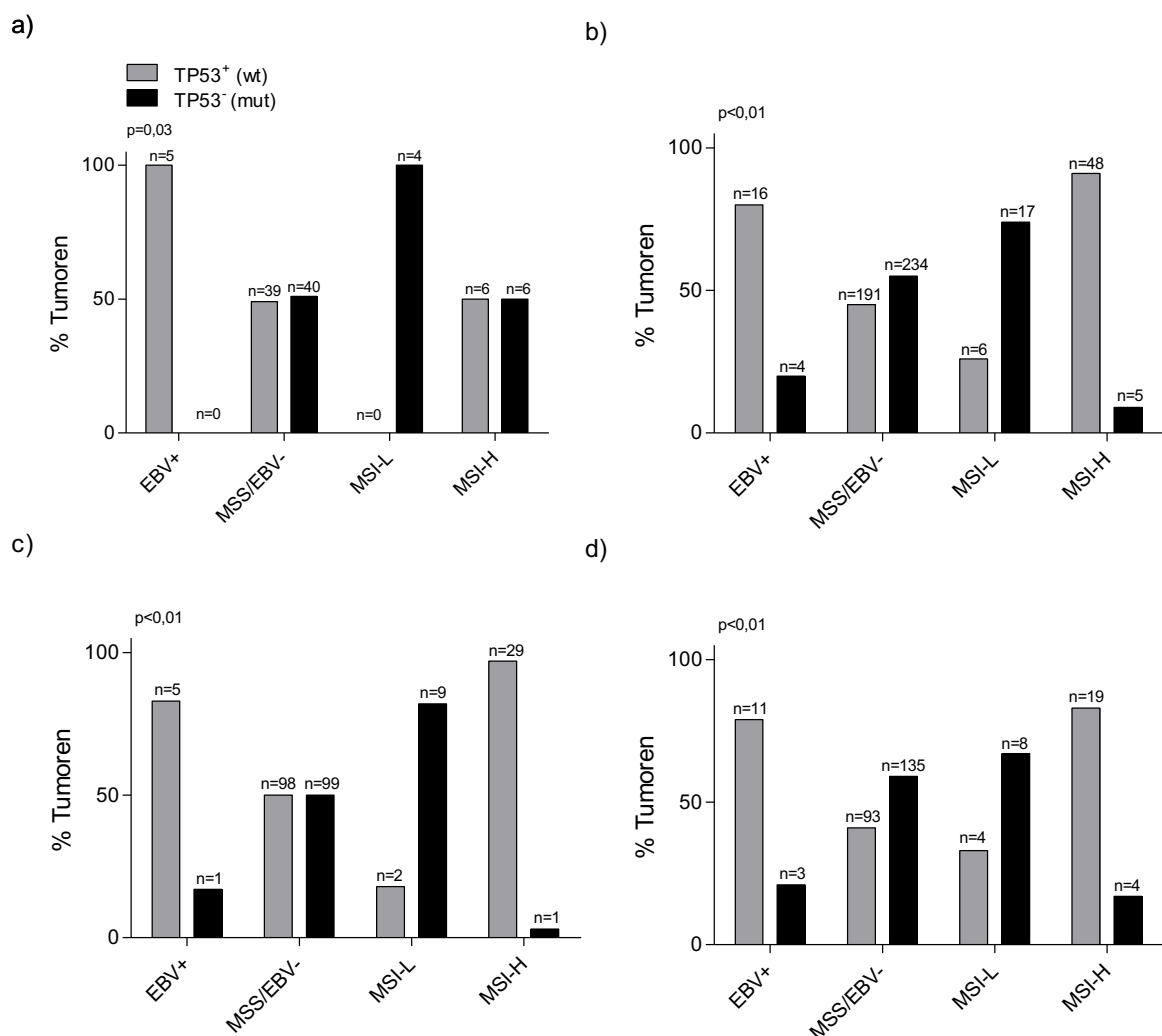


Abbildung 62: Assoziation der p53-Proteinexpression mit den Subgruppen MSI-L, MSI-H und EBV⁺ in a) prätherapeutischen Biopsien vor CTx, b) allen Resektaten und Resektaten c) ohne und d) nach neoadjuvanter CTx

4.7.2. Überleben der Patienten in Abhängigkeit des MSI- und p53-Status

Die Assoziation der Mikrosatelliteninstabilität in Abhängigkeit des p53-Status mit dem Überleben der Patienten zeigt Tabelle 71. In Abbildung 63 sind die vier Subgruppen gemeinsam in den Kollektiven dargestellt.

In der Resektatgruppe ohne CTx wiesen Patienten mit MSI-H-Tumoren mit veränderter p53-Expression das längste 5-Jahres-Überleben mit 100% (HR, 0,05, 95% KI, 0,00 - 671,1, $p = 0,53$) auf, gefolgt von jenen mit MSI-H mit p53 Wildtypexpression mit 68% (HR, 0,72, 95% KI, 0,38 - 1,35, $p = 0,31$), den MSS-Patienten mit p53-Wildtypexpression mit 56% (HR, 0,71, 95% KI, 0,47 - 1,08, $p = 0,11$) und den MSS-Fällen mit aberranter p53-Expression mit 40% (HR, 1,67, 95% KI 1,12 - 2,49, $p = 0,01$).

In der Resektatgruppe nach CTx überlebten ebenfalls Patienten mit MSI-H-Tumoren mit aberranter p53-Expression mit einem 5-Jahres-Überleben von 75% am längsten (HR, 0,35, 95% KI 0,05 - 2,52, $p = 0,30$). Darauf folgten wie in der Resektatgruppe ohne CTx Patienten mit MSI-H-Tumoren mit p53-Wildtypexpression mit 56% 5-Jahres-Überleben (HR, 0,64, 95% KI 0,30 - 1,37, $p = 0,25$), jene mit MSS-Tumoren mit veränderter p53-Expression mit 39% (HR, 1,01, 95% KI 0,72 - 1,43, $p = 0,95$) und jene mit MSS-Tumoren mit p53-Wildtypexpression mit 32% (HR, 1,18, 95% KI 0,83 - 1,68, $p = 0,35$).

Im Kollektiv der prätherapeutischen Biopsien vor CTx wiesen die Patienten mit MSI-H-Tumoren und p53-Wildtypexpression mit 67% das längste 5-Jahres-Überleben auf (HR, 0,43, 95% KI, 0,10 - 1,78, $p = 0,24$), gefolgt von jenen mit MSS-Tumoren mit p53-Wildtypexpression mit 45% (HR, 0,85, 95% KI, 0,47 - 1,51, $p = 0,57$), jenen mit MSS-Tumoren mit aberranter p53-Expression mit 40% (HR, 1,29, 95% KI 0,73 - 2,28, $p = 0,37$) und Patienten mit MSI-H-Tumoren mit veränderter p53-Expression mit 27% (HR, 1,80, 95% KI 0,55 - 5,83, $p = 0,33$).

Tabelle 71: Assoziation der MSI-H- und MSS/EBV-Subgruppen in Abhängigkeit des p53-Status mit dem Gesamtüberleben

	Kollektiv	Subtypen	n	Ereignis	5-JÜ	Medianes Überleben [mo] (95% KI)	p*	HR (95% KI)	p†
p53 Wildtyp Expression	Biopsien vor neoadjuvanter CTx	MSI-H	6	2	66,7	nicht erreicht	0,30	0,43 (0,10 - 1,78)	0,24
		MSS/EBV ⁻	44	22	44,7	44,6 (21,1-68,1)		0,85 (0,47 - 1,51)	0,57
	Resektate ohne neoadjuvante CTx	MSI-H	29	11	67,8	nicht erreicht	0,81	0,72 (0,38 - 1,35)	0,31
		MSS/EBV ⁻	103	35	55,9	102,7 (n.a.)		0,71 (0,47 - 1,08)	0,11
	Resektate nach neoadjuvanter CTx	MSI-H	19	7	55,6	nicht erreicht	0,18	0,64 (0,30 - 1,37)	0,25
		MSS/EBV ⁻	104	54	32,0	28,5 (22,3-34,7)		1,18 (0,83 - 1,68)	0,35
Aberrante p53 Expression	Biopsien vor neoadjuvanter CTx	MSI-H	6	3	26,7	23,4 (7,7-39,1)	0,48	1,80 (0,55 - 5,83)	0,33
		MSS/EBV ⁻	40	24	39,5	36,6 (23,9-68,3)		1,29 (0,73 - 2,28)	0,37
	Resektate ohne neoadjuvante CTx	MSI-H	1	0	100	alle Fälle zensiert	0,30	0,05 (0,0 - 671,1)	0,53
		MSS/EBV ⁻	100	53	40,1			1,67 (1,12 - 2,49)	0,01
Resektate	MSI-H	4	1	75,0	nicht erreicht	0,29	0,35	0,30	

nach neoadjuvanter CTx	MSS/EBV ⁻	138	79	38,5	30,9 (21,2-40,6)	(0,05 - 2,52)	1,01 (0,72 - 1,43)	0,95
------------------------------	----------------------	-----	----	------	---------------------	---------------	-----------------------	------

*p-Wert: Log-Rank Test; †p-Wert: Cox-Regression

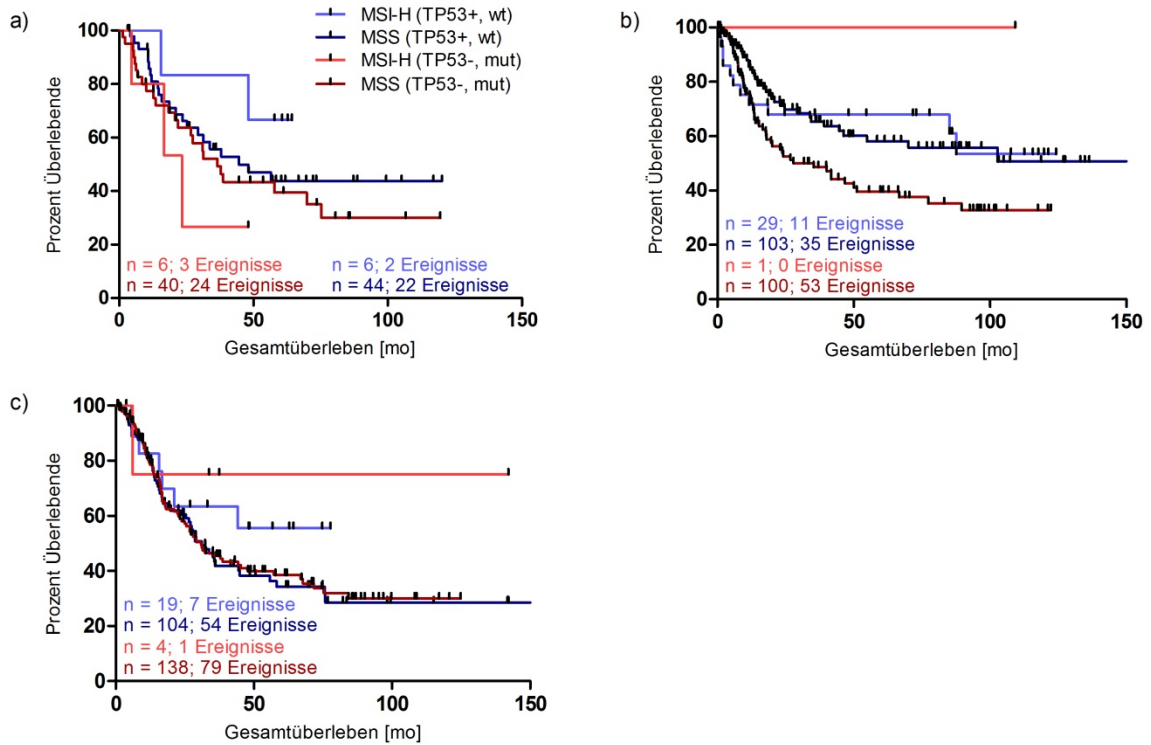


Abbildung 63: Assoziation der Subgruppen MSI-H und MSS/EBV⁻ in Abhängigkeit des p53-Status in a) prätherapeutischen Biopsien vor CTx, in Resektaten b) ohne und c) nach neoadjuvanter CTx mit dem Überleben der Patienten

5. Diskussion

Das Gesamtüberleben der Patienten mit Magenkarzinom ist trotz der Identifikation spezifischer Risikofaktoren und verbesserter Vorsorgemaßnahmen limitiert. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit molekularer Klassifikationen zur Identifikation neuer therapeutischer Zielstrukturen in den unterschiedlichen Patientengruppen. Unter Einbezug molekularer Technologien und Analysen wurden in der vergangenen Zeit epigenetische und genetische Klassifikationen für das Magenkarzinom erarbeitet. Zwei davon sind die TCGA- und die ACRG-Klassifikation (Bass et al., 2014; Cristescu et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit sollte die klinische, prognostische und prädiktive Relevanz der ACRG-Klassifikation, vor allem im Rahmen neoadjuvanter Chemotherapie, in einem westlichen Kollektiv an Magenkarzinomen bestimmt werden. In einem weiteren Schritt sollte die Anwendbarkeit der ACRG-Klassifikation auf routinemäßig verfügbare Methoden übertragen und deren klinische Relevanz analysiert werden.

Um dies zu erreichen, wurden die molekularen Gruppen der ACRG-Klassifikation mRNA- und proteinbasiert auf ein heterogenes Kollektiv an insgesamt 758 Magenkarzinomen angewandt. Dieses setzte sich zum einen aus Resektaten ohne und nach neoadjuvanter Chemotherapie und zum anderen aus prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter Chemotherapie zusammen und beinhaltete Adenokarzinome des Magens und AEGII/III Tumoren aus zwei verschiedenen unabhängigen Zentren.

5.1. Prognostische und klinische Relevanz der ACRG-Klassifikation

In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmalig die Analyse der klinischen Relevanz der ACRG-Klassifikation sowie modifizierter Varianten im Kontext perioperativer, Platin/5-FU-basierter Chemotherapie.

Da die ursprüngliche ACRG-Klassifikation von Cristescu et al. (2015) an Genexpressionsdaten identifiziert wurde, sollte die Klassifikation zunächst mRNA-basiert angewandt werden. Die Häufigkeiten der Subgruppen nach Anwendung der mRNA-basierten Klassifikation waren mit jenen in der Arbeit von Cristescu et al. (2015) vergleichbar, wobei ein geringerer Anteil an MSI- (10% vs. 23%) und ein größerer Anteil an EMT- und MSS/TP53⁺-Tumoren vorlag.

Um die Klassifikation nun auf ein größeres Kollektiv übertragen zu können, wurde die E-Cadherin-Proteinexpression als Surrogat für den EMT-Subtyp verwendet. In Anlehnung an die Arbeiten von Setia et al. (2016), Ahn et al. (2017) und Koh et al. (2019) wurden EBV⁺-Tumoren als zusätzliche Subgruppe miteingeschlossen und die Einteilung als modifizierte ACRG-Klassifikation bezeichnet. In beiden Einteilungen stellten Tumoren mit aberranter p53-Expression den häufigsten Subtyp dar, gefolgt von jenen mit p53-Wildtypexpression. Im Vergleich zur Klassifikation auf mRNA-Ebene zeigte sich nach der proteinbasierten Klassifikation ein geringerer Anteil an EMT-Tumoren und ein größerer Anteil an Tumoren mit aberranter

p53-Expression. Die Häufigkeiten bewegten sich jedoch in ähnlichen Größenordnungen wie in den bereits veröffentlichten Arbeiten, womit beide Ansätze zur Reproduktion der Subgruppen der ACRG-Klassifikation als geeignet erscheinen.

Die molekularen Subtypen der Klassifikation waren mit bestimmten klinisch-pathologischen Charakteristika assoziiert. In der Resektatgruppe ohne und nach Chemotherapie waren Tumoren mit aberranter p53-Expression eher proximal lokalisiert und gingen wie MSI-Tumoren mit intestinalem histopathologischem Typ einher. EMT-Tumoren waren vor allem mit nicht-intestinalen Karzinomen assoziiert. Patienten mit MSI-Tumoren waren eher älter, jene mit EMT-Tumoren eher jünger. Diese Ergebnisse stimmen mit vorherigen Arbeiten (Cristescu et al., 2015; Setia et al., 2016; Ahn et al., 2017) überein, was zudem die Plausibilität der Einteilung in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Cristescu et al. (2015) fanden zusätzlich eine Assoziation zwischen MSI-Tumoren, antraler Lokalisation und frühen Tumorstadien. EMT-Tumoren gingen mit fortgeschrittenem T-Stadium, Rezidiven und peritonealer Metastasierung einher. Ahn et al. (2017) zeigten zudem, dass EBV⁺-Tumoren vor allem bei männlichen Patienten und im Corpus auftraten.

Bei Betrachtung des Gesamtüberlebens der Patienten ließ sich, sowohl bei Anwendung der Klassifikation auf mRNA- als auch auf Proteinebene ein deutlicher prognostischer Unterschied der molekularen Subgruppen in der Resektatgruppe ohne und nach neoadjuvanter Chemotherapie erkennen. Die beste Prognose wiesen Patienten mit EBV⁺-, mikrosatelliteninstabilen Magenkarzinomen und einer p53-Wildtypexpression auf. Jene mit aberranter p53-Expression und epithelialer-mesenchymaler Transition zeigten ein kürzeres Gesamtüberleben. Somit konnte die prognostische Relevanz der ACRG-Klassifikation unter Verwendung beider methodischer Ansätze und in einem westlichen Patientenkollektiv gezeigt werden.

Bereits in der ursprünglichen Arbeit von Cristescu et al. (2015), welche die ACRG-Klassifikation zum ersten Mal beschrieb, konnte die prognostische Relevanz der Einteilung an primär resezierten Magenkarzinomen ohne Chemotherapie gezeigt werden. Im Verlauf wurden weitere Studien zur Evaluation der ACRG-Klassifikation veröffentlicht, welche die klinische und prognostische Relevanz der molekularen Subgruppen der ACRG-Klassifikation mit zusätzlichem EBV⁺-Subtyp bestätigten (Setia et al., 2016; Ahn et al., 2017; Díaz del Arco et al., 2018; Koh et al., 2019).

In allen oben genannten Studien (Setia et al., 2016; Ahn et al., 2017; Díaz del Arco et al., 2018; Koh et al., 2019) wurden immunhistochemische Analysen zur Identifikation des EMT- und p53-Status verwendet und im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit ausschließlich Magenkarzinome ohne neoadjuvante Chemotherapie analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde demnach zum ersten Mal die prognostische Bedeutung der modifizierten ACRG-

Klassifikation im Magenkarzinom im Kontext neoadjuvanter 5FU/Platinbasierter Chemotherapie gezeigt.

Im Unterschied zur Klassifikation auf mRNA-Ebene wiesen Patienten ohne Chemotherapie mit EMT-Tumoren bei Anwendung der proteinbasierten Klassifikation interessanterweise eine positive prognostische Relevanz auf mit einem ähnlichen Gesamtüberleben, wie es Patienten mit mikrosatelliteninstabilen Tumoren zeigten.

Dies wurde auch in einer Arbeit von Díaz del Arco et al. (2018) in Resektaten ohne Chemotherapie beobachtet. In deren Arbeit lag der Anteil der EMT-Tumoren bei 6% im Vergleich zu 11% in der vorliegenden Arbeit.

Die positive prognostische Relevanz des EMT-Subtyps ist jedoch nicht in Übereinstimmung mit den Studien von Setia et al. (2016), Ahn et al. (2017) und Koh et al. (2019). Hier lagen die Häufigkeiten der EMT-Gruppe bei 15-38%. Die Diskrepanz hinsichtlich der Häufigkeiten und der Prognose des EMT-Subtyps kann in unterschiedlichen E-Cadherin-Antikörpern für die immunhistochemischen Analysen und deren Evaluation begründet sein. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich der prozentuale Anteil membranärer Färbung, wie von Bronsert et al. (2014) im Pankreaskarzinom beschrieben, in die Auswertung der E-Cadherin-Proteinexpression miteinbezogen. In den anderen genannten Arbeiten wurde eine Kombination mit der Färbeintensität und der Homogenität des Färbemusters oder auch zytoplasmatischer Färbung verwendet. Die größte Vergleichbarkeit besteht somit in der Gruppe mit komplettem Verlust der E-Cadherin-Expression, was auch an den prozentualen Fallzahlen (7% in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu 8% in der Arbeit von Setia et al. (2016)) ersichtlich ist. Die Gruppe mit 0% E-Cadherin-Expression zeigt in den Resektaten ohne CTx jedoch sogar ein längeres Gesamtüberleben als bei kombinierter Betrachtung mit Fällen mit weniger als 50% Expression. Auch in der Resektatgruppe nach CTx weisen Fälle mit komplettem Verlust der E-Cadherin-Expression ein längeres Überleben im Vergleich zu jenen mit weniger als 50% Expression auf. Eine negative prognostische Wertigkeit intakter membranärer E-Cadherin-Expression konnte in einer Arbeit von Gillett et al. (2001) im Mammakarzinom beobachtet werden. Die Autoren sehen eine mögliche Begründung in der Notwendigkeit einer intakten E-Cadherin Funktion für die Ausbildung von Metastasen (Gillett et al., 2001).

Außerdem ist die Vergleichbarkeit der Arbeiten miteinander durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Patientenkollektive limitiert. So beinhalten die Kollektive der Arbeiten von Koh et al. (2019) und Ahn et al. (2017) ausschließlich asiatische Patienten, die einzige Studie mit einem westlichen Kollektiv von Setia et al. (2016) ist aufgrund ihrer geringen Fallzahl (n=146) in der Aussagekraft limitiert. Außerdem scheint eine proximale Lokalisation des Tumors einen negativen Einfluss auf die Prognose der Patienten zu haben, wie in der vorliegenden Arbeit in beiden Resektatgruppen gezeigt. Dies trägt weiterhin zur eingeschränkten Vergleichbarkeit, zum einen der Resektatgruppen innerhalb der vorliegenden Arbeit mit ei-

nem deutlich größeren Anteil an proximalen Tumoren im Kollektiv nach CTx und zum anderen mit den bereits beschriebenen Arbeiten bei. Zudem kann einen weiteren Grund für die prognostische Diskrepanz die relativ kleine Fallzahl der EMT-Subgruppe darstellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Analyse der Resektate nach neoadjuvanter CTx zum ersten Mal eine Assoziation der Subtypen mit dem Tumorregressionsgrad nach CTx gezeigt werden. Aufgrund der fehlenden Tumoren mit TRG1 lässt sich zwar keine direkte Aussage bezüglich des Chemotherapieansprechens treffen, es zeigte sich jedoch eine Prädominanz des Tumorregressionsgrads 3 in MSI- und EMT-Tumoren. Dies unterstreicht die positive prognostische Bedeutung des MSI-Subtyps, der das längste Überleben trotz fehlendem Chemotherapieansprechen entsprechend der histopathologischen Evaluation nach Becker (2011) aufwies. Hinsichtlich des EMT-Typs verdeutlicht es die Notwendigkeit alternativer Therapieoptionen aufgrund der Kombination aus fehlendem Therapieansprechen und der gleichzeitig schlechtesten Prognose bei Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie.

Häufige Veränderungen innerhalb der EMT-Subgruppe sind *CDH1*- und *RHO-A*-Mutationen. Diese sind zwar aktuell nicht direkt als therapeutische Zielstrukturen nutzbar, jedoch zeigen Patienten mit Tumoren dieses Subtyps ein längeres Überleben bei Verwendung einer Chemotherapie aus Cisplatin plus S1 im Vergleich zu Cisplatin plus 5-FU (Ajani et al., 2010; Sunakawa & Lenz, 2015; Tirino et al., 2018). Für den IGF-Rezeptor 1 Inhibitor Linsitinib wurde im Mausmodell Wirksamkeit bei mesenchymal differenzierten Magenkarzinomzelllinien nachgewiesen (Oh et al., 2018).

Hinsichtlich der anderen Subtypen der molekularen Klassifikation sind bereits therapeutische Strukturen bekannt. So weisen EBV⁺-Tumoren häufig *PDL-1*-, *PDL-2*- oder *PIK3CA*-Überexpressionen auf. MSI-Subtypen zeigen eine hohe Mutationslast und sind wie EBV⁺-Tumoren einer Immuntherapie aufgrund ihrer hohen Expression an PDL-1 und tumorinfiltrierender Immunzellen zugänglich (Janku et al., 2011; Sukawa et al., 2012; Bass et al., 2014; Desrichard et al., 2016; Fontana & Smyth, 2016). Tumoren mit *TP53*-Mutation weisen häufig auch Amplifikationen von *HER2* und *VEGFR-2* auf, die als therapeutische Zielstrukturen verwendet werden können und mit Trastuzumab bereits genutzt werden (Bang et al., 2010; Bass et al., 2014; Wilke et al., 2014).

Als weiterer Subtyp wurden MSI-L-Tumoren mit in die Klassifikation aufgenommen. Diese wiesen, wie in der publizierten Studie von Kohlruss, Grosser et al. (2019) bereits beschrieben, bei Patienten ohne CTx das kürzeste und in neoadjuvant chemotherapierten Patienten das längste Überleben auf. Dies verdeutlicht vermutlich die Notwendigkeit einer neoadjuvanten Chemotherapie bei MSI-L-Tumoren. Zusammenfassend kann durch die modifizierte ACRG-Klassifikation und deren Anwendbarkeit in der Routinediagnostik eine bessere Prognoseabschätzung und individualisierte Therapie im Magenkarzinom ermöglicht werden.

5.1.1. EMT-Subgruppe und deren klinische Relevanz

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gruppe mit epithelialer-mesenchymaler Transition, wie unter Punkt 5.1. beschrieben, zum einen auf mRNA-Ebene mittels Genexpressionsanalysen durch qPCR und zum anderen durch immunhistochemische Analyse der E-Cadherin-Proteinexpression ermittelt.

Cristescu et al. (2015) bildeten die EMT-Gruppe durch Berechnung eines Scores, indem sie das geometrische Mittel der Expression der EMT-assoziierten Gene verwendeten. Hinsichtlich der EMT-Gene verweisen sie auf die Arbeit von Loboda et al. (2011). In dieser wurde die EMT-Signatur in 92 Lungenkarzinomzelllinien, die mittels *CDH1*- und *VIM*-Expression als epithelial oder mesenchymal klassifiziert wurden, bestimmt. Diese beiden Gruppen wurden dazu verwendet, etwa 300 Gene zu identifizieren, die mit dem mesenchymalen Typ assoziiert sind. Die Kombination dieser Gene nannten sie EMT-Signatur.

Um die Bestimmung des EMT-Subtyps auf routineverfügbare Methoden zu übertragen, wurden drei verschiedene Ansätze evaluiert. Zum einen wurde der Quotient aus der *CDH1/VIM*- oder *CDH1/ZEB1*-Expression bestimmt, zum anderen ein gewichteter Mittelwert, mit dem die Expression aller drei Gene gleichzeitig berücksichtigt werden kann. Zudem wurde eine Einteilung anhand des 75%-Quantils der *CDH1/VIM*- oder *CDH1/ZEB1*-Expression vorgenommen. Das 75%-Quantil der *CDH1/ZEB1*-Expression führte zur erwarteten Einteilung der Laurén- und MSI-Subtypen und es konnten alle mesenchymalen Magenkarzinomzelllinien nach dieser Variante in die EMT-Gruppe eingeteilt werden.

Im mesenchymalen Subtyp fanden sich in der Resektatgruppe ohne Chemotherapie 86% und bei Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie 68% nicht-intestinale Tumoren nach Laurén. Dies zeigt, dass das 75%-Quantil der *CDH1/ZEB1*-Expression zur Identifikation des EMT-Subtyps auf mRNA-Ebene geeignet erscheint (Loboda et al., 2011).

Patienten mit mesenchymalen Tumoren wiesen im Vergleich zu jenen mit epithelialen Tumoren ein schlechteres Gesamtüberleben sowohl in der Resektatgruppe ohne Chemotherapie (62,3 vs. 45,7 5-JÜ) als auch nach neoadjuvanter Chemotherapie (52,2 vs. 36,6 5-JÜ) auf. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit verschiedenen Studien, in denen die klinische Relevanz epithelialer-mesenchymaler Transition evaluiert wurde (Rosivatz et al., 2002; Alves et al., 2007). Mehrere EMT-assoziierte Gene korrelierten signifikant mit dem Gesamtüberleben. In der Arbeit von Zhong et al. (2008) stellte die Cripto-1- und E-Cadherin-Expression einen unabhängigen prognostischen Marker im Magenkarzinom dar. Kim et al. (2009) konnten zeigen, dass der Verlust epithelialer und die Akquisition mesenchymaler Proteine mit schlecht differenzierten Tumoren, fortgeschrittenem T-Stadium und kürzerem Überleben assoziiert ist. In einer anderen Studie stellt EMT einen unabhängigen prognostischen Faktor auf das Überleben dar (Murai et al., 2014).

Außerdem war der mesenchymale Typ in den prätherapeutischen Biopsien vor CTx in der vorliegenden Arbeit negativ prädiktiv hinsichtlich des Therapieansprechens mit 100%

Non-Respondern. Auch der EMT-Subtyp der modifizierten ACRG-Klassifikation auf Proteinebene unter Punkt 5.1. zeigt eine Assoziation mit dem Tumorregressionsgrad 3.

Ein besseres Ansprechen von Tumoren mit erhaltener E-Cadherin-Funktion auf eine Therapie mit Cetuximab (Nakamoto et al., 2013) und EGFR-Inhibitoren (Geißler et al., 2017) konnte bereits im kolorektalen Karzinom gezeigt werden. Auch im Ovarialkarzinom gehen Tumoren mit erhaltener E-Cadherin-Funktion mit einem Ansprechen auf eine Platin-basierte Chemotherapie einher (Miše et al., 2015). H. Gao et al. (2017) zeigten im Magenkarzinom eine erhöhte Oxalplatinresistenz bei Verlust der E-Cadherin-Funktion.

In mehreren Studien konnte außerdem in verschiedenen Tumorentitäten beobachtet werden, dass EMT Chemoresistenz induziert (Fischer et al., 2015; Zheng et al., 2015; Nieto et al., 2016). So wird angenommen, dass Snail den Zellzyklus blockiert und den Zelltod verhindert (Vega et al., 2004). Auch in Kolonkarzinomzelllinien wurde nachgewiesen, dass EMT zu verminderter Chemotherapie-Effektivität führt (A. D. Yang et al., 2006).

Auf Proteinebene wurde die immunhistochemische Analyse von E-Cadherin als Surrogat für den EMT-Subtyp verwendet. Der Vergleich zwischen der Genexpression auf mRNA-Ebene und der E-Cadherin-Proteinexpression zeigte eine starke Korrelation. Auch die NGS-basierten Mutationsanalysen in 42 Fällen konnten eine Konkordanz zwischen *CDH1*-Mutation und aberranter E-Cadherin-Proteinexpression von 90% zeigen. Es wurden jedoch nur 36% der EMT-Tumoren auf Proteinebene auch auf mRNA-Ebene als EMT eingeteilt. Dies zeigt, dass die Übertragung der EMT-Subgruppe von der mRNA-Ebene, wie durch Cristescu et al. (2015) publiziert, auf die Proteinebene eine Herausforderung darstellt und dies in weiteren Studien näher beleuchtet werden sollte. Außerdem ist die E-Cadherin-Proteinexpression wahrscheinlich zur Identifikation des EMT-Subtyps alleine nicht ausreichend. Hier liefern Koh et al. (2019) einen interessanten Ansatzpunkt, indem sie mesenchymale morphologische Kriterien neben der E-Cadherin-Proteinexpression verwenden.

5.1.1.1. E-Cadherin

Wie unter Punkt 5.1.1. beschrieben, wurde zur Identifikation der EMT-Subgruppe die Expression des epithelialen Markers *CDH1*/E-Cadherin und der mesenchymalen Marker *VIM*/Vimentin und *ZEB1* auf mRNA-Ebene mittels qPCR und immunhistochemisch analysiert. Immunhistochemisch wurden in der vorliegenden Arbeit 10% der Tumoren mit aberranter E-Cadherin-Expression identifiziert. Im Magenkarzinomkollektiv der vom TCGA-Projekt veröffentlichten Daten (Bass et al., 2014) finden sich 11% *CDH1*-Mutationen, wobei die Vergleichbarkeit der E-Cadherin Gen- und Proteinexpression limitiert ist.

Bei Betrachtung der einzelnen Gene war eine hohe *CDH1*-Expression in der Resektatgruppe nach neoadjuvanter Chemotherapie mit einem signifikant längerem Überleben der Patienten assoziiert und erwies sich als unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben. Auch auf Proteinebene stellte eine hohe E-Cadherin-Expression einen positiven unabhängigen

gen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben dar. In den Subgruppenanalysen zeigte sich der prognostische Effekt bei Patienten nach CTx unabhängig vom Laurén-Typ, jedoch vor allem in fortgeschrittenen und proximal lokalisierten Tumoren.

Seiner Funktion als Zelladhäsionsprotein entsprechend liegt es nahe, dass Veränderungen des E-Cadherin oder seines codierenden Gens *CDH1* zu einem invasiver wachsenden, metastasierenden Tumor führen. Dies konnte bereits in anderen Karzinomen wie Mamma- (Rakha et al., 2005; Tang et al., 2012) und kolorektalen Karzinomen (S. Lee et al., 2013) gezeigt werden. Eine niedrige *CDH1*- oder veränderte E-Cadherin-Expression war außerdem wie in der vorliegenden Arbeit in Tumoren ohne und nach CTx mit nicht-intestinalen, entdifferenzierten Karzinomen und höheren pT-Stadien und Lymphknoten- und Fernmetastasierung assoziiert (T. Li et al., 2014; H. Gao et al., 2017).

Graziano et al. (2004) zeigten zwar eine unabhängige prognostische Relevanz des E-Cadherin bezüglich des Gesamtüberlebens bei fortgeschrittenen palliativ chemotherapierten Magenkarzinompatienten. Neu in der vorliegenden Arbeit ist jedoch der alleinige Nachweis einer unabhängigen prognostischen Relevanz der E-Cadherin-Expression in neoadjuvant chemotherapierten Magenkarzinomen mit kurativer Therapieintention.

Sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene zeigte sich kein Überlebensunterschied hinsichtlich der E-Cadherin-Expression in Resektaten von Patienten, die nicht chemotherapiert wurden. Auf Proteinebene deutete sich sogar eine positive prognostische Relevanz bei aberranter E-Cadherin-Expression an. Dies wurde bereits in einer Arbeit im Mammakarzinom beobachtet (Gillett et al., 2001). In mehreren Studien konnte jedoch ein signifikant kürzeres Überleben bei aberrantem *CDH1* oder E-Cadherin im Magenkarzinom für nicht chemotherapierte Patienten nachgewiesen werden (Corso et al., 2013; T. Li et al., 2014; H. Gao et al., 2017). So zeigte eine Metaanalyse von T. Li et al. (2014) an 2783 asiatischen Magenkarzinomen die negative prognostische Relevanz veränderter E-Cadherin-Expression (HR 1,5). Es findet sich eine Arbeit, in der keine prognostische Relevanz von E-Cadherin in Resektaten von Patienten ohne CTx gefunden wurde (Schizas et al., 2017).

Dies lässt zwei Hypothesen zu. Zum einen kann die unterschiedliche prognostische Relevanz in Effekten begründet sein, die durch Chemotherapie-assoziierte Effekte induziert werden. Zum anderen wäre es möglich, dass durch die Chemotherapie Tumoren selektioniert werden, die ein verändertes E-Cadherin aufweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch bei Vergleich zwischen prätherapeutischer Biopsie vor CTx und korrespondierendem Resektat nach CTx keine *CDH1*-Expressionsveränderung beobachtet werden.

5.1.1.2. Vimentin und ZEB1

Die *VIM*- und *ZEB1*-Expressionen zeigten auf mRNA-Ebene keine prognostische Relevanz. Auf Proteinebene konnten 3,5% der Fälle mit aberranter Vimentin- bzw. 3% der Fälle mit aberranter *ZEB1*-Expression identifiziert werden. Ähnliche Ergebnisse finden sich im Magen-

karzinomkollektiv der vom TCGA-Projekt veröffentlichten Daten mit 4% *VIM*- und 7% *ZEB1*-Mutationen (Bass et al., 2014).

Es deutete sich ein negativer prognostischer Effekt einer hohen Vimentin-Proteinexpression in Resektaten von Patienten ohne CTx an ($p = 0,08$) und diese stellte in der multivariaten Cox-Regression einen unabhängig prognostischen Faktor dar ($p = 0,01$).

Die prognostische Relevanz von Vimentin wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnte in mehreren Studien ein negativer prognostischer Effekt hoher Vimentin-Expression im Kolon- (Lazarova & Bordonaro, 2016), Lungen- (Kidd et al., 2014) und im Magenkarzinom (Ryu et al., 2012; Z. Liu et al., 2014; Yin et al., 2018) gezeigt werden. Andere wiesen keine prognostische Relevanz für Vimentin im Magenkarzinom nach (Hou et al., 2012).

Die *ZEB1*-Expression zeigte auf mRNA- und Proteinebene keine Assoziation mit dem Überleben. Okugawa et al. (2012) konnten die *ZEB1*-mRNA-Expression in Resektaten von Patienten ohne CTx als unabhängigen negativen Prognosefaktor identifizieren. Eine Metaanalyse von Chen et al. (2019) zeigte, dass eine Überexpression von *ZEB1* im kolorektalen, Pankreas-, hepatozellulären und Magenkarzinom mit einem signifikant kürzeren Überleben einhergeht. Der fehlende Nachweis einer prognostischen Relevanz von *ZEB1* in der vorliegenden Arbeit liegt vermutlich in der limitierten Fallzahl aberranter Proteinexpression (3%) begründet.

Es fanden sich in intestinalen Karzinomen eine niedrige *VIM*- und *ZEB1*-Expression ($p < 0,01$). Hohe *ZEB1*-Expression war mit fortgeschrittenem pT-Stadium und in Resektaten ohne CTx mit positivem M- und N-Status assoziiert (je $p < 0,05$), was seinem mesenchymalen Charakter entspricht und bereits durch Okugawa et al. (2012) und Jia et al. (2012) gezeigt werden konnte. Die Vimentin-Proteinexpression ist ebenfalls mit fortgeschrittenem TNM-Stadium und Entdifferenzierung assoziiert (Yin et al., 2018). Auch in anderen epithelialen Tumoren wurden Vimentin und *ZEB1* als wichtige Proteine epithelialer-mesenchymaler Transition mit fortgeschrittenen T-Stadien und Fernmetastasierung in Verbindung gebracht (Spoelstra et al., 2006; Graham et al., 2008; Singh et al., 2008; G. Zhang et al., 2013). Die Daten unterstützen demnach die Bedeutung von Vimentin und *ZEB1* als negative prognostische Marker und die Assoziation mit negativen klinischen Faktoren, auch wenn die Aussagekraft aufgrund der geringen Fallzahlen eher begrenzt ist.

5.1.2. p53-Status

Die p53-Proteinexpression wurde in Resektaten ohne und nach neoadjuvanter Chemotherapie immunhistochemisch unter Verwendung von TMAs und in prätherapeutischen Biopsien vor Chemotherapie an ganzen Schnitten bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal im Magenkarzinom die immunhistochemische Evaluation des aberranten p53 unter Berücksichtigung von komplettem Verlust und Überexpression vorgenommen, was bereits von Darb-Esfahani et al. (2016) im Mammakarzinom und Köbel et al. (2016) im Ovarialkarzinom publiziert wurde. Bisherige Arbeiten be-

trachteten ausschließlich die Überexpression als verändertes p53-Expressionsmuster und somit wurde ein kompletter Expressionverlust als Wildtyp-p53 gewertet. Die verbesserte Auswertung nach Esfahani et al. (2016) und Köbel et al. (2016) scheint den tatsächlichen *TP53*-Status besser widerzuspiegeln. Dies wurde durch NGS-basierte Mutationsanalysen des *TP53* in 42 Fällen mit einer Übereinstimmung von 90% mit dem immunhistochemisch bestimmten p53-Status bestätigt. Andere Studien wiesen eine *TP53*-Mutation in etwa 50% im Magenkarzinom nach (J. Gao et al., 2013; Bass et al., 2014). Eine aberrante p53-Proteinexpression zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in allen untersuchten Patientenkollektiven in 49% und befindet sich damit im Bereich zu erwartender Werte. Zudem ließ sich keine Diskrepanz zwischen prätherapeutischer Biopsie und korrespondierendem Resektat beobachten. In der vorliegenden Arbeit kann die immunhistochemische Analyse des p53 somit als valide Methode zur Bestimmung des *TP53*-Status angesehen werden.

Die p53-Proteinexpression war bei Patienten ohne Chemotherapie mit dem Gesamtüberleben der Patienten assoziiert und stellte einen unabhängig prognostischen Faktor dar. Patienten mit Tumoren mit p53-Wildtypexpression wiesen ein deutlich längeres Überleben im Vergleich zu jenen mit aberranter p53-Expression auf (35,8 vs. 60,5% 5-JÜ). Auch in prätherapeutischen Biopsien vor CTx deutete sich ein Überlebensvorteil bei p53-Wildtypexpression an. Dies wurde bereits in mehreren Studien beobachtet und ist in Übereinstimmung mit der Funktion von *TP53* als Tumorsuppressor mit Einfluss auf Apoptose, Zell-Seneszenz, DNA-Reparatur, Zellmetabolismus, Zellzyklus-Kontrolle und Differenzierungsgrad (Aubrey et al., 2016; Wasylshen & Lozano, 2016). So konnte in einer Metaanalyse von Yildirim et al. (2015) an 4330 Magenkarzinomen ohne neoadjuvante Chemotherapie die negative prognostische Relevanz einer p53-Überexpression beobachtet werden. Auch Tahara et al. (2016) konnten zeigen, dass *TP53-Hotspot*-Mutationen (R175, G245, R248, R273, R282) negativ prognostisch im Magenkarzinom sind.

Die prognostische Bedeutung der p53-Proteinexpression wird jedoch auch kontrovers diskutiert (Yildirim et al., 2015). X. Liu et al. (2014) analysierten die p53-Proteinexpression in 501 Magenkarzinomen ohne CTx immunhistochemisch und konnten keine prognostische Relevanz nachweisen.

Neu in dieser Arbeit ist die Abhängigkeit der prognostischen Relevanz der p53-Expression von der Tumorlokalisierung. So zeigte sich der Überlebensunterschied nur in distalen Magenkarzinomen in Patienten ohne CTx und prätherapeutischen Biopsien vor CTx. In proximal lokalisierten Tumoren ließ sich kein Überlebensvorteil bei p53-Wildtypexpression erkennen. Neben unterschiedlichen immunhistochemischen Antikörpern und Evaluationsmethoden wären heterogene Patientenkollektive demnach ein Erklärungsansatz für die widersprüchliche prognostische Relevanz in den genannten Arbeiten (X. Liu et al., 2014; Yildirim et al., 2015; Tahara et al., 2016). Verändertes p53 fand sich in allen Resektaten vor allem in proximalen

und intestinalen Magenkarzinomen und ging mit fortgeschrittenem pT-Stadium einher. Dies bestätigt die Erkenntnisse aus bereits publizierten Arbeiten (Tahara et al., 2016; Busuttill et al., 2014).

Die prognostische Relevanz der p53-Proteinexpression konnte jedoch nicht wie in der Arbeit von Xu et al. (2014) in Resektaten nach CTx nachgewiesen werden. Außerdem ließ sich keine prädiktive Wertigkeit des p53 in prätherapeutischen Biopsien vor CTx beobachten. In anderen Studien erwies sich p53 auch als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine Platin-basierte Chemotherapie in verschiedenen Tumorentitäten, auch dem Magenkarzinom (X. Liu et al., 2012; He et al., 2017). Bei Patienten nach CTx lag jedoch eine Assoziation mit dem Tumorregressionsgrad vor mit einer Prädominanz von TRG3 in Fällen mit aberranter p53-Expression. Dies kann in den unterschiedlichen Effekten von *TP53*-Mutationen begründet sein.

Die Mechanismen von Chemotherapieresistenz sind vielfältig und reichen von der Aktivierung von Effluxpumpen und Überlebenssignalen über Apoptoseresistenz und die Erlangung von Stammzeleigenschaften bis hin zur Hochregulation der DNA-Reparatur (He et al., 2017). So konnte im Mammakarzinom beobachtet werden, dass eine *TP53*-Mutation zur vermehrten Expression von BRCA1 führt und somit Resistenz gegen Cisplatin induziert (J. Li et al., 2014). Des Weiteren zeigte sich in der Zellkultur, dass eine durch Gentherapie induzierte Verminderung der p53-Expression zu erhöhter Sensitivität für eine Radio- und Chemotherapie führt (Y. Liu et al., 2013). Mechanismen wie die Inhibition von HSP90 mit konsekutiver Destabilisierung des mutierten *TP53* (D. Li et al., 2011), die Reaktivierung des Wildtyp-*TP53* oder die Inhibition von Molekülen im *TP53*-Netzwerk könnten bei vorliegender *TP53*-Mutation als therapeutische Strategien genutzt werden, um ein verbessertes Chemotherapieansprechen zu erreichen (He et al., 2017).

5.1.2.1. MSI und p53

Es zeigte sich eine Korrelation der p53-Proteinexpression in allen Resektaten ($p < 0,01$) und prätherapeutischen Biopsien vor CTx ($p = 0,03$) mit dem EBV-, MSI-H-, und MSI-L-Status. Fälle mit p53 -Wildtypexpression gingen mit dem EBV- und MSI-H-Subtyp einher. Veränderte p53-Expression häufte sich in MSI-L-Tumoren. Dies verdeutlicht, dass MSI-H-, MSI-L- und MSS-Tumoren als eigene Subgruppen betrachtet werden sollten. Mehrere Studien konnten zeigen, dass MSI-H-Tumoren auf eine Therapie mit PD1-Inhibitoren ansprechen (Le et al., 2015; Le et al., 2017; S. T. Kim et al., 2018). Hypothetisch geht man davon aus, dass dies in Defekten der Mismatch-Reparatur und der damit einhergehenden Zunahme der *mutational burden*, der *mutation-associated-neoantigens* (MANANs) und in dem konsekutiv hohen Maß an tumorinfiltrierenden Immunzellen begründet ist (Le et al., 2015). Eine PD-1-Blockade führt dann zur Aufhebung der Resistenz der adaptiven Immunantwort (Tumeh et al., 2014). Doch nicht jeder MSI-Tumor zeigt ein Ansprechen auf Immuncheckpointinhibitoren, was nochmals die große Diversität innerhalb dieser Subgruppe widerspiegelt (Mandal et al., 2019). Deshalb

sind ein weitergehendes Verständnis und eine Subdifferenzierung der MSI-Tumoren wichtig. So stellen MSI-L-Tumoren eine Gruppe mit ungeklärter biologischer und klinischer Relevanz dar und werden häufig mit den MSS-Tumoren zusammen analysiert (An et al., 2012; S. Y. Kim et al., 2015). Man geht davon aus, dass MSI-L auf erhöhte Mutationsraten an bestimmten Mikrosatellitensequenzen zurückzuführen ist, spezifische Defekte der DNA-Reparatur widerspiegelt oder durch DNA-Schäden verursacht wird (Hile et al., 2013). In einer bereits veröffentlichten Arbeit konnten wir zeigen, dass Patienten mit MSI-L-Tumoren ohne CTx eine schlechte, jene nach neoadjuvanter Chemotherapie jedoch eine sehr gute Prognose aufwiesen (Kohlruss, Grosser et al., 2019). Die Tatsache, dass sich in den MSI-L-Tumoren vermehrt Fälle mit aberranter p53-Expression fanden und diese in Resektaten negativ prognostisch war, unterstreicht vermutlich die Notwendigkeit einer neoadjuvanten Chemotherapie in dieser Subgruppe.

Die MSI-Tumoren gehen im Magenkarzinom mit einer besseren Prognose einher, wobei widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der prognostischen Relevanz bei Chemotherapie vorliegen (Boland & Goel, 2010; An et al., 2012; Choi et al., 2014; S. Y. Kim et al., 2015; Smyth et al., 2017; Mereiter et al., 2018; Haag et al., 2019). So fanden Smyth et al. (2017) eine negative prognostische Relevanz von MSI bei Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt. Der MSI-H-Status zeigte jedoch eine unterschiedliche prognostische Relevanz in Abhängigkeit des p53-Status.

5.1.2.2. *CDKN1A* und *MDM2*

CDKN1A gilt als eines der wichtigsten Effektormoleküle des p53-Signalwegs und führt in Abhängigkeit bestimmter Signale zum G1-Zellzyklusarrest.¹⁰⁴ *MDM2* ist ein wesentlicher negativer Regulator der p53-Aktivität während der Entwicklung, normaler Gewebehomöostase und DNA-Reparatur (Momand et al., 2000).

Deshalb wurde die *CDKN1A*- und *MDM2*-Expression auf mRNA-Ebene in den Patientenkollektiven analysiert, um den *TP53*-Status wie in der Arbeit von Cristescu et al. (2015) zu bestimmen. Letztendlich wurde dieser nur auf Proteinebene immunhistochemisch erfasst, so dass die Gene hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz einzeln ausgewertet wurden.

Eine hohe *MDM2*-Expression war bei Patienten ohne CTx mit kürzerem Überleben assoziiert und ging mit fortgeschrittenen Tumorstadien einher. Diese Ergebnisse unterstreichen die bereits in der Literatur bekannten Ergebnisse, auch wenn hier vor allem immunhistochemische Analysen vorliegen. So identifizierten Ye et al. (2013) eine hohe *MDM2*-Proteinexpression in primär resezierten Magenkarzinomen als unabhängig negativen prognostischen Faktor. Außerdem war eine hohe *MDM2*-Expression mit fortgeschrittenem T-Stadium, Lymphknoten- und Fernmetastasierung verbunden. Sepideh et al. (2012) beobachteten im Magen- und Kolonkarzinom eine Assoziation der *MDM2*-Proteinexpression mit fortgeschrittenem T- und N-Stadium. *MDM2*-Expression war mit Lymphknoten- und Fernmetastasierung in intestinalen Karzinomen assoziiert (Aboushousha et al., 2018). Da *MDM2* *TP53*

ubiquitinyliert und so für die Degradation durch das Proteasom markiert, ist die negative prognostische Relevanz einer hohen MDM2-Expression sehr wahrscheinlich und verdeutlicht somit dessen wichtige Rolle während der Karzinogenese, Invasion und Metastasierung (J. Yang et al., 2006; Aubrey et al., 2016; Wasylshen & Lozano, 2016). Es wurden auch Studien veröffentlicht, die keine Korrelation zwischen MDM2 und dem Gesamtüberleben oder klinischen Charakteristika sehen (Kasper et al., 1999; Abdel-Fattah et al., 2000).

Außerdem wurde beobachtet, dass eine hohe MDM2-Proteinexpression prädiktive Wertigkeit für ein Therapieansprechen besitzt (Y. Ye et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit ließ sich keine prädiktive Relevanz der *MDM2*-Expression erkennen.

Die *CDKN1A*-Expression zeigte keine Assoziation mit dem Überleben der Patienten. Es findet sich eine Studie von Lin et al. (2017) zur p21-Proteinexpression in Magenkarzinomen ohne CTx. Eine niedrige Expression war hier mit Lymphknoten- und Fernmetastasierung assoziiert und außerdem ein unabhängiger negativer prognostischer Marker. Dies wäre durch die Funktion von *CDKN1A* als wichtiger Regulator des Zellzyklus und die Inhibition der Tumorentstehung und dessen Wachstum begründet (Park et al., 2014; Andries et al., 2015). Lin et al. (2017) fanden keine prädiktive Wertigkeit von p21 in Bezug auf ein Therapieansprechen und keine Assoziation hinsichtlich der Tumorlokalisierung. In der vorliegenden Arbeit war die *CDKN1A*-Expression in prätherapeutischen Biopsien und Resektaten nach CTx mit der Tumorlokalisierung assoziiert. In prätherapeutischen Biopsien mit proximaler Tumorlokalisierung war eine niedrige *CDKN1A*-Expression zu sehen. In Resektaten nach CTx zeigte sich eine hohe Expression. Dies lässt die Hypothese zu, dass eine niedrige *CDKN1A*-Expression in proximalen Magenkarzinomen zu einem verbesserten Therapieansprechen führt und unterstreicht die Diversität der Magenkarzinome vor allem hinsichtlich ihrer Lokalisation.

5.1.3. Limitationen

Limitationen der Arbeit liegen allgemein in ihrem retrospektiven und explorativen Charakter, sodass ein möglicher Selektionsbias nicht ausgeschlossen werden kann. Zur Validierung der Ergebnisse sind prospektive, randomisierte und kontrollierte Studien an größeren Patientenkollektiven notwendig.

Weitere Limitationen der Arbeit waren die Verwendung von TMAs, wodurch die Intratumorheterogenität nicht berücksichtigt werden konnte. Außerdem ist die prädiktive Relevanz der molekularen Klassifikationen weitgehend unklar und sie sollte an einem größeren Kollektiv mit prätherapeutischen Biopsien vor CTx untersucht werden. Zudem wären funktionelle in-vitro Analysen sinnvoll, um die EMT-Subgruppe besser zu charakterisieren und die Assoziation zwischen dem p53-, MSI-Status und den Einfluss auf eine neoadjuvante Chemotherapie näher zu beleuchten.

5.2. Fazit und Ausblick

Ein wesentliches Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit ist die Identifikation der klinischen und prognostischen Relevanz der ACRG-Klassifikation und modifizierter Varianten auf mRNA- und Proteinebene im Kontext perioperativer Chemotherapie. Dies stellt neue Möglichkeiten für die individualisierte Therapie der molekularen Subtypen dar, die mit bestimmten genetischen Veränderungen und klinisch-pathologischen Charakteristika einhergehen. Vor allem die schlechte Prognose des EMT-Subtyps könnte durch neue therapeutische Ansätze verbessert werden. Die Bestimmung des EMT-Subtyps auf Proteinebene sollte nicht allein basierend auf der E-Cadherin-Proteinexpression durchgeführt werden, sondern auch morphologische, mesenchymale Tumoreigenschaften berücksichtigen. Dies würde dazu beitragen, die inverse prognostische Relevanz in Resektaten ohne CTx näher zu beleuchten.

Eine Validierung der prognostischen Wertigkeit der ACRG-Klassifikation an weiteren unabhängigen Patientenkollektiven ohne und nach neoadjuvanter Chemotherapie könnte zur klinischen Anwendung der Klassifikation führen und so Therapieentscheidungen unterstützen und individualisieren. Hierfür sollte zudem die prädiktive Relevanz der Klassifikation in prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter Chemotherapie analysiert werden.

Eine weitere wichtige Erkenntnis der Arbeit ist die Bestätigung der Validität der p53-Proteinexpression zur Bestimmung des *TP53*-Mutationsstatus im Magenkarzinom. p53 besitzt in der Resektatgruppe ohne CTx und in prätherapeutischen Biopsien vor CTx unabhängige prognostische Relevanz in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation. Zusammen mit der Prädominanz im MSI-L-Subtyp könnte dies für eine Therapieempfehlung zur Durchführung einer neoadjuvanten Chemotherapie sprechen.

Auffällig waren die Assoziationen unter anderem der ACRG-Klassifikation, der p53-, *CDH1*- und *CDKN1A*-Expression mit der Tumorlokalisation. Dies verdeutlicht die Heterogenität innerhalb der Magenkarzinome und die Notwendigkeit einer differenzierten Betrachtung.

Literaturverzeichnis

- Abbas, T. and A. Dutta (2009). "p21 in cancer: intricate networks and multiple activities." *Nature Reviews Cancer* 9(6): 400-414.
- Abdel-Fattah, G., B. Yoffe, B. Krishnan, V. Khaoustov and K. Itani (2000). "MDM2/p53 protein expression in the development of colorectal adenocarcinoma." *Journal of Gastrointestinal Surgery* 4(1): 109-114.
- Aboushousha, T., N. Helal, O. Hammam, M. Ibrahim, S. Khaled, A. Mostafa and A. Anas (2018). "Overview of MDM2 and B-RAF Expression in Gastric Lesions." *Open access Macedonian journal of medical sciences* 6(10): 1795.
- Abukhdeir, A. M. and B. H. Park (2008). "P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance." *Expert reviews in molecular medicine* 10: e19.
- Ahn, S., S.-J. Lee, Y. Kim, A. Kim, N. Shin, K. U. Choi, C.-H. Lee, G. Y. Huh, K.-M. Kim and N. Setia (2017). "High-throughput protein and mRNA expression-based classification of gastric cancers can identify clinically distinct subtypes, concordant with recent molecular classifications." *The American journal of surgical pathology* 41(1): 106-115.
- Aigner, K., B. Dampier, L. Descovich, M. Mikula, A. Sultan, M. Schreiber, W. Mikulits, T. Brabletz, D. Strand and P. Obrist (2007). "The transcription factor ZEB1 (δ EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity." *Oncogene* 26(49): 6979.
- Ajani, J. A., W. Rodriguez, G. Bodoky, V. Moiseyenko, M. Lichinitser, V. Gorbunova, I. Vynnychenko, A. Garin, I. Lang and S. Falcon (2010). "Multicenter phase III comparison of cisplatin/S-1 with cisplatin/infusional fluorouracil in advanced gastric or gastroesophageal adenocarcinoma study: the FLAGS trial." *J Clin Oncol* 28(9): 1547-1553.
- Al-Batran, S.-E., N. Homann, C. Pauligk, T. O. Goetze, J. Meiler, S. Kasper, H.-G. Kopp, F. Mayer, G. M. Haag and K. Luley (2019). "Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial." *The Lancet* 393(10184): 1948-1957.
- Alves, C. C., E. Rosivatz, C. Schott, R. Hollweck, I. Becker, M. Sarbia, F. Carneiro and K. F. Becker (2007). "Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin." *The Journal of pathology* 211(5): 507-515.
- An, J. Y., H. Kim, J. H. Cheong, W. J. Hyung, H. Kim and S. H. Noh (2012). "Microsatellite instability in sporadic gastric cancer: its prognostic role and guidance for 5-FU based chemotherapy after R0 resection." *International journal of cancer* 131(2): 505-511.
- Andries, V., K. Vandepoele, K. Staes, G. Berx, P. Bogaert, G. Van Isterdael, D. Ginneberge, E. Parthoens, J. Vandebussche and K. Gevaert (2015). "NBPF1, a tumor suppressor candidate in neuroblastoma, exerts growth inhibitory effects by inducing a G1 cell cycle arrest." *BMC cancer* 15(1): 391.
- Association, J. G. C. (1998). "Japanese classification of gastric carcinoma—2nd English edition—." *Gastric cancer* 1(1): 10-24.
- Aubrey, B. J., A. Strasser and G. L. Kelly (2016). "Tumor-suppressor functions of the TP53 pathway." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6(5): a026062.
- Bang, Y.-J., E. Van Cutsem, A. Feyereislova, H. C. Chung, L. Shen, A. Sawaki, F. Lordick, A. Ohtsu, Y. Omuro and T. Satoh (2010). "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* 376(9742): 687-697.
- Barrow, E., L. Robinson, W. Alduaij, A. Shenton, T. Clancy, F. Laloo, J. Hill and D. Evans (2009). "Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations." *Clinical genetics* 75(2): 141-149.

- Bass, A., Thorsson, V., Shmulevich, I. et al. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. Nature, Cancer Genome Atlas Research Network.
- Bauer, L., A. Hapfelmeier, S. Blank, M. Reiche, J. Slotta-Huspenina, M. Jesinghaus, A. Novotny, T. Schmidt, B. Grosser and M. Kohlruss (2017). "A novel pretherapeutic gene expression-based risk score for treatment guidance in gastric cancer." *Annals of Oncology* 29(1): 127-132.
- Becker, K., R. Langer, D. Reim, A. Novotny, C. M. zum Buschenfelde, J. Engel, H. Friess and H. Hofler (2011). "Significance of histopathological tumor regression after neoadjuvant chemotherapy in gastric adenocarcinomas: a summary of 480 cases." *Annals of surgery* 253(5): 934-939.
- Berlth, F., E. Bollschweiler, U. Drebber, A. H. Hoelscher and S. Moenig (2014). "Pathohistological classification systems in gastric cancer: diagnostic relevance and prognostic value." *World J Gastroenterol* 20(19): 5679-5684.
- Berx, G., K. Staes, J. van Hengel, F. Molemans, M. J. Bussemakers, A. van Bokhoven and F. Van Roy (1995). "Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1)." *Genomics* 26(2): 281-289.
- Boland, C. R. and A. Goel (2010). "Microsatellite instability in colorectal cancer." *Gastroenterology* 138(6): 2073-2087. e2073.
- Boland, C. R., S. N. Thibodeau, S. R. Hamilton, D. Sidransky, J. R. Eshleman, R. W. Burt, S. J. Meltzer, M. A. Rodriguez-Bigas, R. Fodde and G. N. Ranzani (1998). "A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer." *Cancer research* 58(22): 5248-5257.
- Borrmann, R. (1926). *Geschwülste des Magens und Duodenums. Verdauungsschlauch*, Springer: 812-1054.
- Bosman, F. T., F. Carneiro, R. H. Hruban and N. D. Theise (2010). WHO classification of tumours of the digestive system, World Health Organization.
- Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA: a cancer journal for clinicians* 68(6): 394-424.
- Broman, K. W., J. C. Murray, V. C. Sheffield, R. L. White and J. L. Weber (1998). "Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination." *The American Journal of Human Genetics* 63(3): 861-869.
- Bronsert, P., I. Kohler, S. Timme, S. Kiefer, M. Werner, O. Schilling, Y. Vashist, F. Makowiec, T. Brabletz and U. T. Hopt (2014). "Prognostic significance of Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) expression in cancer cells and cancer-associated fibroblasts in pancreatic head cancer." *Surgery* 156(1): 97-108.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl and G. L. Shipley (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." *Clinical chemistry* 55(4): 611-622.
- Busuttil, R. A., G. V. Zapparoli, S. Haupt, C. Fennell, S. Q. Wong, J.-M. B. Pang, E. A. Takeno, C. Mitchell, N. Di Costanzo and S. Fox (2014). "Role of p53 in the progression of gastric cancer." *Oncotarget* 5(23): 12016.
- Camargo, M. C., W.-H. Kim, A. M. Chiaravalli, K.-M. Kim, A. H. Corvalan, K. Matsuo, J. Yu, J. J. Sung, R. Herrera-Goepfert and F. Meneses-Gonzalez (2014). "Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein–Barr virus positivity: an international pooled analysis." *Gut* 63(2): 236-243.
- Carneiro, F., C. Oliveira, M. Leite and R. Seruca (2008). Molecular targets and biological modifiers in gastric cancer. *Seminars in diagnostic pathology*, Elsevier.
- Cerami, E., J. Gao, U. Dogrusoz, B. E. Gross, S. O. Sumer, B. A. Aksoy, A. Jacobsen, C. J. Byrne, M. L. Heuer and E. Larsson (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data, AACR.
- Chen, B., B. Chen, Z. Zhu, W. Ye, J. Zeng, G. Liu, S. Wang, J. Gao, G. Xu and Z. Huang (2019). "Prognostic value of ZEB-1 in solid tumors: a meta-analysis." *BMC Cancer* 19(1): 635.

- Choi, Y. Y., J. M. Bae, J. Y. An, I. G. Kwon, I. Cho, H. B. Shin, T. Eiji, M. Aburahmah, H. I. Kim and J. H. Cheong (2014). "Is microsatellite instability a prognostic marker in gastric cancer?: A systematic review with meta-analysis." *Journal of surgical oncology* 110(2): 129-135.
- Cohen, J. I. (2000). "Epstein–Barr virus infection." *New England Journal of Medicine* 343(7): 481-492.
- Coordinators, N. R. (2016). "Database resources of the National Center for Biotechnology Information." *Nucleic Acids Research* 44(Database issue): D7-D19.
- Correa, P. (1992). "Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process—first American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention." *Cancer research* 52(24): 6735-6740.
- Corso, G., J. Carvalho, D. Marrelli, C. Vindigni, B. Carvalho, R. Seruca, F. Roviello and C. Oliveira (2013). "Somatic mutations and deletions of the E-cadherin gene predict poor survival of patients with gastric cancer." *Journal of Clinical Oncology*, vol. 31 (7) p. 868-75.
- Cristescu, R., J. Lee, M. Nebozhyn, K.-M. Kim, J. C. Ting, S. S. Wong, J. Liu, Y. G. Yue, J. Wang and K. Yu (2015). "Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes." *Nature medicine* 21(5): 449-456.
- Cunningham, D., W. H. Allum, S. P. Stenning, J. N. Thompson, C. J. Van de Velde, M. Nicolson, J. H. Scarffe, F. J. Lofts, S. J. Falk and T. J. Iveson (2006). "Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer." *New England Journal of Medicine* 355(1): 11-20.
- Curado, M.-P., B. Edwards, H. R. Shin, H. Storm, J. Ferlay, M. Heanue and P. Boyle (2007). *Cancer incidence in five continents, Volume IX*, IARC Press, International Agency for Research on Cancer.
- Darb-Esfahani, S., C. Denkert, A. Stenzinger, C. Salat, B. Sinn, C. Schem, V. Endris, P. Klare, W. Schmitt and J.-U. Blohmer (2016). "Role of TP53 mutations in triple negative and HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy." *Oncotarget* 7(42): 67686-67698.
- Daujat, S., H. Neel and J. Piette (2001). "MDM2: life without p53." *TRENDS in Genetics* 17(8): 459-464.
- de Martel, C. and S. Franceschi (2009). "Infections and cancer: established associations and new hypotheses." *Critical reviews in oncology/hematology* 70(3): 183-194.
- Desrichard, A., A. Snyder and T. A. Chan (2016). "Cancer neoantigens and applications for immunotherapy." *Clinical Cancer Research* 22(4): 807-812.
- Diaz del Arco, C., L. E. Muñoz, E. M. Roldán, M. Á. C. Nieto, L. O. Medina, S. G. G. de las Heras and M. J. F. Aceñero (2018). "Immunohistochemical classification of gastric cancer based on new molecular biomarkers: A potential predictor of survival." *Virchows Archiv* 473(6): 687-695.
- Engel, C., M. Loeffler, V. Steinke, N. Rahner, E. Holinski-Feder, W. Dietmaier, H. K. Schackert, H. Goergens, M. von Knebel Doeberitz and T. O. Goecke (2012). "Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome." *J Clin Oncol* 30(35): 4409-4415.
- Engel, L. S., W. H. Chow, T. L. Vaughan, M. D. Gammon, H. A. Risch, J. L. Stanford, J. B. Schoenberg, S. T. Mayne, R. Dubrow and H. Rotterdam (2003). "Population attributable risks of esophageal and gastric cancers." *Journal of the National Cancer Institute* 95(18): 1404-1413.
- Eyler, C. E. and J. N. Rich (2008). "Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis." *Journal of Clinical Oncology* 26(17): 2839-2845.
- Fischer, K. R., A. Durrans, S. Lee, J. Sheng, F. Li, S. Wong, H. Choi, T. El Rayes, S. Ryu and J. Troeger (2015). "EMT is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance." *Nature* 527(7579): 472.
- Fontana, E. and E. C. Smyth (2016). "Novel targets in the treatment of advanced gastric cancer: a perspective review." *Therapeutic advances in medical oncology* 8(2): 113-125.

- Forbes, S. A., D. Beare, H. Boutselakis, S. Bamford, N. Bindal, J. Tate, C. G. Cole, S. Ward, E. Dawson and L. Ponting (2016). "COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution." *Nucleic acids research* 45(D1): D777-D783.
- Gao, H., X. Lan, S. Li and Y. Xue (2017). "Relationships of MMP-9, E-cadherin, and VEGF expression with clinicopathological features and response to chemosensitivity in gastric cancer." *Tumor Biology* 39(5): 1010428317698368.
- Gao, J., B. A. Aksoy, U. Dogrusoz, G. Dresdner, B. Gross, S. O. Sumer, Y. Sun, A. Jacobsen, R. Sinha and E. Larsson (2013). "Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal." *Sci. Signal.* 6(269): pl1-pl1.
- Geißler, A.-L., M. Geißler, D. Kottmann, L. Lutz, C. D. Fichter, R. Fritsch, B. Weddeling, F. Makowiec, M. Werner and S. Lassmann (2017). "ATM mutations and E-cadherin expression define sensitivity to EGFR-targeted therapy in colorectal cancer." *Oncotarget* 8(10): 17164.
- Gillett, C., D. Miles, K. Ryder, D. Skilton, R. Liebman, R. Springall, D. Barnes and A. Hanby (2001). "Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast." *The Journal of pathology* 193(4): 433-441.
- Gospodarowicz, M. K., J. D. Brierley and C. Wittekind (2017). *TNM classification of malignant tumours*, John Wiley & Sons.
- Graham, T. R., H. E. Zhau, V. A. Odero-Marah, A. O. Osunkoya, K. S. Kimbro, M. Tighiouart, T. Liu, J. W. Simons and R. M. O'Regan (2008). "Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells." *Cancer research* 68(7): 2479-2488.
- Graziano, F., A. Mandolesi, A. Ruzzo, I. Bearzi, E. Testa, F. Arduini, R. Silva, P. Muretto, D. Mari and R. Berardi (2004). "Predictive and prognostic role of E-cadherin protein expression in patients with advanced gastric carcinomas treated with palliative chemotherapy." *Tumor Biology* 25(3): 106-110.
- Grenacher, L., M. Schwarz, F. Lordick, B. Krause, C. Roeken, S. Moenig, M. Ebert, C. Jenssen, H.-U. Kauczor and M. Moehler (2012). *Aktualisierte S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des Magenkarzinoms: Bedeutung für die Radiologische Diagnostik. RöFo-Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*, © Georg Thieme Verlag KG.
- Haag, G. M., E. Czink, A. Ahadova, T. Schmidt, L. Sisic, S. Blank, U. Heger, L. Apostolidis, A. K. Berger and C. Springfield (2019). "Prognostic significance of microsatellite instability in gastric and gastroesophageal junction cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy." *International journal of cancer* 144(7): 1697-1703.
- Hay, E. D. (2005). "The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it." *Developmental dynamics* 233(3): 706-720.
- He, C., L. Li, X. Guan, L. Xiong and X. Miao (2017). "Mutant p53 gain of function and chemoresistance: the role of mutant p53 in response to clinical chemotherapy." *Chemotherapy* 62(1): 43-53.
- Helfand, B. T., L. Chang and R. D. Goldman (2004). "Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture." *Journal of cell science* 117(2): 133-141.
- Hellemans, J., G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman and J. Vandesompele (2007). "qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data." *Genome biology* 8(2): 1.
- Hewitt, L., I. Inam, Y. Saito, T. Yoshikawa, A. Quaas, A. Hoelscher, E. Bollschweiler, G. Fazzi, V. Melotte and R. Langley (2018). "Epstein-Barr virus and mismatch repair deficiency status differ between oesophageal and gastric cancer: A large multi-centre study." *European Journal of Cancer* 94: 104-114.
- Hile, S. E., S. Shabashev and K. A. Eckert (2013). "Tumor-specific microsatellite instability: do distinct mechanisms underlie the MSI-L and EMAS phenotypes?" *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 743: 67-77.
- Hothorn, T. and B. Lausen (2002). "Maximally selected rank statistics in R." *R News* 2(1): 3-5.
- Hou, F., W. Yuan, J. Huang, L. Qian, Z. Chen, J. Ge, S. Wu, J. Chen, J. Wang and Z. Chen (2012). "Overexpression of EphA2 correlates with epithelial-mesenchymal transition-

- related proteins in gastric cancer and their prognostic importance for postoperative patients." *Medical Oncology* 29(4): 2691-2700.
- Huang, J. Q., G. F. Zheng, K. Sumanac, E. J. Irvine and R. H. Hunt (2003). "Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer." *Gastroenterology* 125(6): 1636-1644.
- Huangyang, P. and Y. Shang (2013). "Epigenetic regulation of epithelial to mesenchymal transition." *Current cancer drug targets* 13(9): 973-985.
- Huber, M., B. Pavlova, H. Mühlberger, P. Hollaus and F. Lintner (2002). "Detection of the Epstein-Barr virus in primary adenocarcinoma of the lung with Signet-ring cells." *Virchows Archiv* 441(1): 25-30.
- IARC Working Group (1997). "Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans." Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. Lyon, France, 17–24 June 1997. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 70: 1-492.
- Imagawa, S., M. Yoshihara, M. Ito, S. Yoshida, Y. Wada, M. Tatsugami, A. Takamura, S. Tanaka, K. Haruma and K. Chayama (2008). "Evaluation of gastric cancer risk using topography of histological gastritis: a large-scaled cross-sectional study." *Digestive diseases and sciences* 53(7): 1818-1823.
- Jang, M., I. Koh, S. J. Lee, J.-H. Cheong and P. Kim (2017). "Droplet-based microtumor model to assess cell-ECM interactions and drug resistance of gastric cancer cells." *Scientific reports* 7: 41541.
- Janku, F., A. M. Tsimberidou, I. Garrido-Laguna, X. Wang, R. Luthra, D. S. Hong, A. Naing, G. S. Falchook, J. W. Moroney and S. A. Piha-Paul (2011). "PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors." *Molecular cancer therapeutics* 10(3): 558-565.
- Jia, B., H. Liu, Q. Kong and B. Li (2012). "Overexpression of ZEB1 associated with metastasis and invasion in patients with gastric carcinoma." *Molecular and cellular biochemistry* 366(1-2): 223-229.
- Kaneko, S. and T. Yoshimura (2001). "Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989." *British journal of cancer* 84(3): 400.
- Kasper, H.-U., R. Schneider-Stock, W. Mellin, T. Günther and A. Roessner (1999). "P53-protein accumulation and MDM2-protein overexpression in gastric carcinomas. No apparent correlation with survival." *Pathology-Research and Practice* 195(12): 815-820.
- Keller, G. (2002). "Hereditary aspects of gastric cancer." *Pathologica* 94(5): 229-233.
- Keller, G., H. Vogelsang, I. Becker, J. Hutter, K. Ott, S. Candidus, T. Grundei, K.-F. Becker, J. Mueller and J. R. Siewert (1999). "Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation." *The American journal of pathology* 155(2): 337-342.
- Kelly, G. L., H. M. Long, J. Stylianou, W. A. Thomas, A. Leese, A. I. Bell, G. W. Bornkamm, J. Mautner, A. B. Rickinson and M. Rowe (2009). "An Epstein-Barr virus anti-apoptotic protein constitutively expressed in transformed cells and implicated in burkitt lymphomagenesis: the Wp/BHRF1 link." *PLoS pathogens* 5(3): e1000341.
- Kidd, M. E., D. K. Shumaker and K. M. Ridge (2014). "The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer." *American journal of respiratory cell and molecular biology* 50(1): 1-6.
- Kim, H. J., S. K. Kang, W. S. Kwon, T. S. Kim, I. Jeong, H. C. Jeung, M. Kragh, I. D. Horak, H. C. Chung and S. Y. Rha (2018). "Forty-nine gastric cancer cell lines with integrative genomic profiling for development of c-MET inhibitor." *International journal of cancer* 143(1): 151-159.
- Kim, M. A., H. S. Lee, H. E. Lee, J. H. Kim, H. K. Yang and W. H. Kim (2009). "Prognostic importance of epithelial–mesenchymal transition-related protein expression in gastric carcinoma." *Histopathology* 54(4): 442-451.
- Kim, S. T., R. Cristescu, A. J. Bass, K.-M. Kim, J. I. Odegaard, K. Kim, X. Q. Liu, X. Sher, H. Jung and M. Lee (2018). "Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer." *Nature medicine*: 1.

- Kim, S. Y., Y. Y. Choi, J. Y. An, H. B. Shin, A. Jo, H. Choi, S. H. Seo, H. J. Bang, J. H. Cheong and W. J. Hyung (2015). "The benefit of microsatellite instability is attenuated by chemotherapy in stage II and stage III gastric cancer: results from a large cohort with subgroup analyses." *International journal of cancer* 137(4): 819-825.
- Köbel, M., A. M. Piskorz, S. Lee, S. Lui, C. LePage, F. Marass, N. Rosenfeld, A. M. Mes Masson and J. D. Brenton (2016). "Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma." *The Journal of Pathology: Clinical Research* 2(4): 247-258.
- Koh, J., K. W. Lee, S. K. Nam, A. N. Seo, J. W. Kim, J. W. Kim, D. J. Park, H. H. Kim, W. H. Kim and H. S. Lee (2019). "Development and Validation of an Easy-to-Implement, Practical Algorithm for the Identification of Molecular Subtypes of Gastric Cancer: Prognostic and Therapeutic Implications." *The oncologist: theoncologist*. 2019-0058.
- Kohlruss, M. (2020). "Molecular subtypes based on The Cancer Genome Atlas (TCGA) classification in gastric carcinoma: Prognostic and therapeutic implications."
- Kohlruss, M., B. Grosser, M. Krenauer, J. Slotta-Huspenina, M. Jesinghaus, S. Blank, A. Novotny, M. Reiche, T. Schmidt and L. Ismani (2019). "Prognostic implication of molecular subtypes and response to neoadjuvant chemotherapy in 760 gastric carcinomas: role of Epstein Barr virus infection and high and low microsatellite instability." *The Journal of Pathology: Clinical Research*.
- Koornstra, J. J., M. J. Mourits, R. H. Sijmons, A. M. Leliveld, H. Hollema and J. H. Kleibeuker (2009). "Management of extracolonic tumours in patients with Lynch syndrome." *The lancet oncology* 10(4): 400-408.
- Krenauer, M. (2018). "Masterarbeit: Molekulare Klassifikation von Magenkarzinomen und ihre prädiktive und prognostische Relevanz für eine Platin/5FU basierte neoadjuvante Chemotherapie."
- Kubbutat, M. H., S. N. Jones and K. H. Vousden (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." *Nature* 387(6630): 299-303.
- Lagergren, J., R. Bergström, A. Lindgren and O. Nyrén (2000). "The role of tobacco, snuff and alcohol use in the aetiology of cancer of the oesophagus and gastric cardia." *International journal of cancer* 85(3): 340-346.
- Lauren, P. (1965). "The two histological main types of gastric carcinoma, an attempt at a histoclinical classification." *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 64: 31-49.
- Lazarova, D. L. and M. Bordonaro (2016). "Vimentin, colon cancer progression and resistance to butyrate and other HDAC is." *Journal of cellular and molecular medicine* 20(6): 989-993.
- Le, D. T., J. N. Durham, K. N. Smith, H. Wang, B. R. Bartlett, L. K. Aulakh, S. Lu, H. Kemberling, C. Wilt and B. S. Luber (2017). "Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade." *Science* 357(6349): 409-413.
- Le, D. T., J. N. Uram, H. Wang, B. R. Bartlett, H. Kemberling, A. D. Eyring, A. D. Skora, B. S. Luber, N. S. Azad and D. Laheru (2015). "PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency." *New England Journal of Medicine* 372(26): 2509-2520.
- Lee, J. M., S. Dedhar, R. Kalluri and E. W. Thompson (2006). "The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease." *J Cell Biol* 172(7): 973-981.
- Lee, S.-J., S. Y. Choi, W.-J. Kim, M. Ji, T.-G. Lee, B.-R. Son, S. M. Yoon, R. Sung, E. J. Lee and S. J. Youn (2013). "Combined aberrant expression of E-cadherin and S100A4, but not β -catenin is associated with disease-free survival and overall survival in colorectal cancer patients." *Diagnostic pathology* 8(1): 99.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF):S3-Leitlinie Magenkarzinom, Langversion 2.0, 2019 AWMF Registernummer: 032/009OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/magenkarzinom/> (abgerufen am: 13.10.2019) (2019).
- Li, D., N. D. Marchenko, R. Schulz, V. Fischer, T. Velasco-Hernandez, F. Talos and U. M. Moll (2011). "Functional inactivation of endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 causes aberrant stabilization of mutant p53 in human cancer cells." *Molecular Cancer Research* 9(5): 577-588.

- Li, J., L. Yang, S. Gaur, K. Zhang, X. Wu, Y. C. Yuan, H. Li, S. Hu, Y. Weng and Y. Yen (2014). "Mutants TP 53 p. R273H and p. R273C but not p. R273G Enhance Cancer Cell Malignancy." *Human mutation* 35(5): 575-584.
- Li, T., J. Chen, Q. Liu, Z. Huo and Z. Wang (2014). "Meta-analysis: E-cadherin immunoexpression as a potential prognosis biomarker related to gastric cancer metastasis in Asian patients." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18(18): 2693-2703.
- Lin, Y., X. Wang, Y. Yu, W. Liu, F. Xie, X. Ouyang and Q. Huang (2017). "Expression and prognostic significance of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A in patients with resected gastric adenocarcinoma." *Oncology letters* 14(6): 7473-7482.
- Liu, X., S. Wang, X. Xia, Y. Chen, Y. Zhou, X. Wu, J. Zhang, S. He, Y. Tan and F. Qiang (2012). "Synergistic role between p53 and JWA: prognostic and predictive biomarkers in gastric cancer." *PloS one* 7(12): e52348.
- Liu, X., H. Yu, H. Cai and Y. Wang (2014). "Expression of CD24, p21, p53, and c-myc in alpha-fetoprotein-producing gastric cancer: Correlation with clinicopathologic characteristics and survival." *Journal of surgical oncology* 109(8): 859-864.
- Liu, Y., R. Xing, X. Zhang, W. Dong, J. Zhang, Z. Yan, W. Li, J. Cui and Y. Lu (2013). "miR-375 targets the p53 gene to regulate cellular response to ionizing radiation and etoposide in gastric cancer cells." *DNA repair* 12(9): 741-750.
- Liu, Z., L. Chen, X. Zhang, X. Xu, H. Xing, Y. Zhang, W. Li, H. Yu, J. Zeng and J. Jia (2014). "RUNX 3 regulates vimentin expression via miR-30a during epithelial–mesenchymal transition in gastric cancer cells." *Journal of cellular and molecular medicine* 18(4): 610-623.
- Loboda, A., M. V. Nebozhyn, J. W. Watters, C. A. Buser, P. M. Shaw, P. S. Huang, L. Van't Veer, R. A. Tollenaar, D. B. Jackson and D. Agrawal (2011). "EMT is the dominant program in human colon cancer." *BMC medical genomics* 4(1): 9.
- Lundegårdh, G., H. O. Adami, C. Helmick and M. Zack (1994). "Risk of cancer following partial gastrectomy for benign ulcer disease." *British journal of surgery* 81(8): 1164-1167.
- Malfertheiner, P., P. Sipponen, M. Naumann, P. Moayyedi, F. Mégraud, S.-D. Xiao, K. Sugano and O. Nyrén (2005). "Helicobacter pylori eradication has the potential to prevent gastric cancer: a state-of-the-art critique." *The American journal of gastroenterology* 100(9): 2100.
- Mandal, R., R. M. Samstein, K.-W. Lee, J. J. Havel, H. Wang, C. Krishna, E. Y. Sabio, V. Makarov, F. Kuo and P. Blechua (2019). "Genetic diversity of tumors with mismatch repair deficiency influences anti-PD-1 immunotherapy response." *Science* 364(6439): 485-491.
- Mereiter, S., K. Polom, C. Williams, A. Polonia, M. Guergova-Kuras, N. Karlsson, F. Roviello, A. Magalhães and C. Reis (2018). "The Thomsen-Friedenreich antigen: A highly sensitive and specific predictor of microsatellite instability in gastric Cancer." *Journal of clinical medicine* 7(9): 256.
- Miše, B. P., V. D. Telesmanić, S. Tomić, D. Šundov, V. Čapkun and E. Vrdoljak (2015). "Correlation between E-cadherin immunoexpression and efficacy of first line platinum-based chemotherapy in advanced high grade serous ovarian cancer." *Pathology & Oncology Research* 21(2): 347-356.
- Miyahara, R., Y. Niwa, T. Matsuura, O. Maeda, T. Ando, N. Ohmiya, A. Itoh, Y. Hirooka and H. Goto (2007). "Prevalence and prognosis of gastric cancer detected by screening in a large Japanese population: data from a single institute over 30 years." *Journal of gastroenterology and hepatology* 22(9): 1435-1442.
- Momand, J., H.-H. Wu and G. Dasgupta (2000). "MDM2—master regulator of the p53 tumor suppressor protein." *Gene* 242(1): 15-29.
- Munzig, A. (2013). "Masterarbeit: Bedeutung der Expression von Notch-assoziierten Genen für die Chemotherapieresistenz beim Magenkarzinom."
- Murai, T., S. Yamada, B. C. Fuchs, T. Fujii, G. Nakayama, H. Sugimoto, M. Koike, M. Fujiwara, K. K. Tanabe and Y. Kodera (2014). "Epithelial-to-mesenchymal transition predicts prognosis in clinical gastric cancer." *Journal of surgical oncology* 109(7): 684-689.

- Nakamoto, K., H. Nagahara, K. Maeda, E. Noda, T. Inoue, M. Yashiro, Y. Nishiguchi, M. Ohira and K. Hirakawa (2013). "Expression of E-cadherin and KRAS mutation may serve as biomarkers of cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer." *Oncology letters* 5(4): 1295-1300.
- Natalwala, A., R. Spychal and C. Tselepis (2008). "Epithelial-mesenchymal transition mediated tumourigenesis in the gastrointestinal tract." *World journal of gastroenterology: WJG* 14(24): 3792.
- Nieto, M. A., R. Y.-J. Huang, R. A. Jackson and J. P. Thiery (2016). "EMT: 2016." *Cell* 166(1): 21-45.
- Nigro, J. M., S. J. Baker, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, R. Hosteller, K. Cleary, S. H. Signer, N. Davidson, S. Baylin and P. Devilee (1989). "Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types." *Nature* 342(6250): 705.
- Nowalk, A. and M. Green (2016). "Epstein-Barr Virus." *Microbiology spectrum* 4(3).
- Oh, S. C., B. H. Sohn, J.-H. Cheong, S.-B. Kim, J. E. Lee, K. C. Park, S. H. Lee, J.-L. Park, Y.-Y. Park and H.-S. Lee (2018). "Clinical and genomic landscape of gastric cancer with a mesenchymal phenotype." *Nature communications* 9(1): 1777.
- Okugawa, Y., Y. Toiyama, K. Tanaka, K. Matsusita, H. Fujikawa, S. Saigusa, M. Ohi, Y. Inoue, Y. Mohri and K. Uchida (2012). "Clinical significance of zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) in human gastric cancer." *Journal of surgical oncology* 106(3): 280-285.
- Oliveira, C., J. Senz, P. Kaurah, H. Pinheiro, R. Sanges, A. Haegert, G. Corso, J. Schouten, R. Fitzgerald and H. Vogelsang (2009). "Germline CDH1 deletions in hereditary diffuse gastric cancer families." *Human molecular genetics* 18(9): 1545-1555.
- Ott, K., H. Vogelsang, J. Mueller, K. Becker, M. Müller, U. Fink, J. R. Siewert, H. Höfler and G. Keller (2003). "Chromosomal instability rather than p53 mutation is associated with response to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in gastric carcinoma." *Clinical cancer research* 9(6): 2307-2315.
- Park, C., N. Y. Jeong, G.-Y. Kim, M. H. Han, I.-M. Chung, W.-J. Kim, Y. H. Yoo and Y. H. Choi (2014). "Momilactone B induces apoptosis and G1 arrest of the cell cycle in human monocytic leukemia U937 cells through downregulation of pRB phosphorylation and induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21Waf1/Cip1." *Oncology reports* 31(4): 1653-1660.
- Perez-Moreno, M., C. Jamora and E. Fuchs (2003). "Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions." *Cell* 112(4): 535-548.
- Petitjean, A., M. Achatz, A.-L. Borresen-Dale, P. Hainaut and M. Olivier (2007). "TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes." *Oncogene* 26(15): 2157.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic acids research* 29(9): e45-e45.
- Pfaffl, M. W., A. Tichopad, C. Prgomet and T. P. Neuvians (2004). "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations." *Biotechnology letters* 26(6): 509-515.
- Pharoah, P. D., P. Guilford, C. Caldas and I. G. C. L. Consortium (2001). "Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families." *Gastroenterology* 121(6): 1348-1353.
- Rakha, E., D. Abd El Rehim, S. Pinder, S. Lewis and I. Ellis (2005). "E-cadherin expression in invasive non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance." *Histopathology* 46(6): 685-693.
- Robert, A., C. Hookway and V. I. Gelfand (2016). "Intermediate filament dynamics: What we can see now and why it matters." *BioEssays*.
- Robles, A. I. and C. C. Harris (2010). "Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(3): a001016.
- Rosivatz, E., I. Becker, K. Specht, E. Fricke, B. Lubber, R. Busch, H. Höfler and K.-F. Becker (2002). "Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer." *The American journal of pathology* 161(5): 1881-1891.

- Ryu, H. S., D. J. Park, H. H. Kim, W. H. Kim and H. S. Lee (2012). "Combination of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes has independent prognostic value in gastric cancer." *Human pathology* 43(4): 520-528.
- Sánchez-Tilló, E., Y. Liu, O. de Barrios, L. Siles, L. Fanlo, M. Cuatrecasas, D. S. Darling, D. C. Dean, A. Castells and A. Postigo (2012). "EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness." *Cellular and molecular life sciences* 69(20): 3429-3456.
- Schizas, D., D. Moris, A. Michalinos, P. Kanavidis, D. Oikonomou, A. Papalampros, A. Machairas and T. Liakakos (2017). "E-cadherin in gastric carcinomas: Relations with histological parameters and its prognostic value." *Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology* 22(2): 383-389.
- Schmalhofer, O., S. Brabletz and T. Brabletz (2009). "E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer." *Cancer Metastasis Rev* 28(1-2): 151-166.
- Sepideh, S., J. N. Mohammadreza, D. Ali, T. P. Gholamreza and G. Samira (2012). "Study of the Murine Double Minute 2 status in patients with gastric and colorectal carcinomas and its correlation with prognostic factors." *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 55(2): 192.
- Setia, N., A. T. Agoston, H. S. Han, J. T. Mullen, D. G. Duda, J. W. Clark, V. Deshpande, M. Mino-Kenudson, A. Srivastava and J. K. Lennerz (2016). "A protein and mRNA expression-based classification of gastric cancer." *Modern Pathology* 29(7): 772.
- Shiraishi, N., K. Sato, K. Yasuda, M. Inomata and S. Kitano (2007). "Multivariate prognostic study on large gastric cancer." *Journal of surgical oncology* 96(1): 14-18.
- Shook, D. and R. Keller (2003). "Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development." *Mechanisms of development* 120(11): 1351-1383.
- Shumilov, A., M.-H. Tsai, Y. T. Schlosser, A.-S. Kratz, K. Bernhardt, S. Fink, T. Mizani, X. Lin, A. Jauch and J. Mautner (2017). "Epstein-Barr virus particles induce centrosome amplification and chromosomal instability." *Nature communications* 8: 14257.
- Siewert, J. and H. Stein (1998a). "Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction." *British journal of surgery* 85(11): 1457-1459.
- Siewert, J. R., K. Böttcher, H. J. Stein and J. D. Roder (1998b). "Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study." *Annals of surgery* 228(4): 449.
- Singh, M., N. S. Spoelstra, A. Jean, E. Howe, K. C. Torkko, H. R. Clark, D. S. Darling, K. R. Shroyer, K. B. Horwitz and R. R. Broaddus (2008). "ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers: a marker of aggressive disease." *Modern Pathology* 21(7): 912.
- Smyth, E. C., A. Wotherspoon, C. Peckitt, D. Gonzalez, S. Hulkki-Wilson, Z. Eltahir, M. Fassan, M. Rugge, N. Valeri and A. Okines (2017). "Mismatch repair deficiency, microsatellite instability, and survival: an exploratory analysis of the medical research council adjuvant gastric infusional chemotherapy (MAGIC) trial." *JAMA oncology* 3(9): 1197-1203.
- Sobin, L. H., M. K. Gospodarowicz and C. Wittekind (2011). *TNM classification of malignant tumours*, John Wiley & Sons.
- Spoelstra, N. S., N. G. Manning, Y. Higashi, D. Darling, M. Singh, K. R. Shroyer, R. R. Broaddus, K. B. Horwitz and J. K. Richer (2006). "The transcription factor ZEB1 is aberrantly expressed in aggressive uterine cancers." *Cancer research* 66(7): 3893-3902.
- Sukawa, Y., H. Yamamoto, K. Noshio, H. Kunimoto, H. Suzuki, Y. Adachi, M. Nakazawa, T. Nobuoka, M. Kawayama and M. Mikami (2012). "Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 18(45): 6577.
- Sunakawa, Y. and H.-J. Lenz (2015). "Molecular classification of gastric adenocarcinoma: translating new insights from the cancer genome atlas research network." *Current treatment options in oncology* 16(4): 17.
- Tahara, T., T. Shibata, Y. Okamoto, J. Yamazaki, T. Kawamura, N. Horiguchi, M. Okubo, N. Nakano, T. Ishizuka and M. Nagasaka (2016). "Mutation spectrum of TP53 gene

- predicts clinicopathological features and survival of gastric cancer." *Oncotarget* 7(27): 42252.
- Tang, D., S. Xu, Q. Zhang and W. Zhao (2012). "The expression and clinical significance of the androgen receptor and E-cadherin in triple-negative breast cancer." *Medical oncology* 29(2): 526-533.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." *Nat Rev Cancer* 2(6): 442-454.
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang and M. A. Nieto (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." *cell* 139(5): 871-890.
- Tirino, G., L. Pompella, A. Petrillo, M. Laterza, A. Pappalardo, M. Caterino, M. Orditura, F. Ciardiello, G. Galizia and F. De Vita (2018). "What's New in Gastric Cancer: The Therapeutic Implications of Molecular Classifications and Future Perspectives." *International journal of molecular sciences* 19(9): 2659.
- Tumeh, P. C., C. L. Harview, J. H. Yearley, I. P. Shintaku, E. J. Taylor, L. Robert, B. Chmielowski, M. Spasic, G. Henry and V. Ciobanu (2014). "PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance." *Nature* 515(7528): 568.
- Uemura, N., S. Okamoto, S. Yamamoto, N. Matsumura, S. Yamaguchi, M. Yamakido, K. Taniyama, N. Sasaki and R. J. Schlemper (2001). "Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer." *New England Journal of Medicine* 345(11): 784-789.
- Van Cutsem, E., Y. Kang, H. Chung, L. Shen, A. Sawaki, F. Lordick, J. Hill, M. Lehle, A. Feyereislova and Y. Bang (2009). "Efficacy results from the ToGA trial: a phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy in first-line HER2-positive advanced gastric cancer." *J clin oncol* 27(18)(suppl): LBA4509.
- Van der Post, R. S., I. P. Vogelaar, F. Carneiro, P. Guilford, D. Huntsman, N. Hoogerbrugge, C. Caldas, K. E. C. Schreiber, R. H. Hardwick and M. G. Ausems (2015). "Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers." *Journal of medical genetics* 52(6): 361-374.
- Vega, S., A. V. Morales, O. H. Ocaña, F. Valdés, I. Fabregat and M. A. Nieto (2004). "Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death." *Genes & development* 18(10): 1131-1143.
- Vogelstein, B., D. Lane and A. J. Levine (2000). "Surfing the p53 network." *Nature* 408(6810): 307-310.
- Wasylishen, A. R. and G. Lozano (2016). "Attenuating the p53 pathway in human cancers: many means to the same end." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6(8): a026211.
- Wheelock, M. J. and K. R. Johnson (2003). "Cadherins as modulators of cellular phenotype." *Annual review of cell and developmental biology* 19(1): 207-235.
- Wilke, H., K. Muro, E. Van Cutsem, S.-C. Oh, G. Bodoky, Y. Shimada, S. Hironaka, N. Sugimoto, O. Lipatov and T.-Y. Kim (2014). "Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial." *The lancet oncology* 15(11): 1224-1235.
- Wolf, E.-M., J. Geigl, M. Svrcek, M. Vieth and C. Langner (2010). "Hereditäres Magenkarzinom." *Der Pathologe* 31(6): 423-429.
- Xu, H.-Y., W.-L. Xu, L.-Q. Wang, M.-B. Chen and H.-L. Shen (2014). "Relationship between p53 status and response to chemotherapy in patients with gastric cancer: a meta-analysis." *PloS one* 9(4): e95371.
- Yang, A. D., F. Fan, E. R. Camp, G. van Buren, W. Liu, R. Somcio, M. J. Gray, H. Cheng, P. M. Hoff and L. M. Ellis (2006). "Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines." *Clinical cancer research* 12(14): 4147-4153.
- Yang, J.-Y., C. S. Zong, W. Xia, Y. Wei, M. Ali-Seyed, Z. Li, K. Broglio, D. A. Berry and M.-C. Hung (2006). "MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation." *Molecular and cellular biology* 26(19): 7269-7282.

- Yang, P., Y. Zhou, B. Chen, H.-W. Wan, G.-Q. Jia, H.-L. Bai and X.-T. Wu (2009). "Overweight, obesity and gastric cancer risk: results from a meta-analysis of cohort studies." *European journal of cancer* 45(16): 2867-2873.
- Ye, W. and O. Nyren (2003). "Risk of cancers of the oesophagus and stomach by histology or subsite in patients hospitalised for pernicious anaemia." *Gut* 52(7): 938-941.
- Ye, Y., X. Li, J. Yang, S. Miao, S. Wang, Y. Chen, X. Xia, X. Wu, J. Zhang and Y. Zhou (2013). "MDM2 is a useful prognostic biomarker for resectable gastric cancer." *Cancer science* 104(5): 590-598.
- Yıldırım, M., V. Kaya, O. Demirpence, S. Gunduz and H. Bozcuk (2015). "Prognostic significance of p53 in gastric cancer: a meta-analysis." *Asian Pac J Cancer Prev* 16(1): 327-332.
- Yin, S., F.-f. Chen and G.-f. Yang (2018). "Vimentin immunohistochemical expression as a prognostic factor in gastric cancer: A meta-analysis." *Pathology-Research and Practice*.
- Yuasa, Y. (2003). "Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis." *Nature Reviews Cancer* 3(8): 592-600.
- Zeisberg, M. and E. G. Neilson (2009). "Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions." *The Journal of clinical investigation* 119(6): 1429.
- Zhang, G.-J., T. Zhou, H.-P. Tian, Z.-L. Liu and S.-S. Xia (2013). "High expression of ZEB1 correlates with liver metastasis and poor prognosis in colorectal cancer." *Oncology letters* 5(2): 564-568.
- Zhang, P., Y. Sun and L. Ma (2015). "ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance." *Cell cycle* 14(4): 481-487.
- Zheng, X., J. L. Carstens, J. Kim, M. Scheible, J. Kaye, H. Sugimoto, C.-C. Wu, V. S. LeBleu and R. Kalluri (2015). "EMT program is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer." *Nature* 527(7579): 525.
- Zhong, X. Y., L. H. Zhang, S. Q. Jia, T. Shi, Z. J. Niu, H. Du, G. G. Zhang, Y. Hu, A. P. Lu and J. Y. Li (2008). "Positive association of up-regulated Cripto-1 and down-regulated E-cadherin with tumour progression and poor prognosis in gastric cancer." *Histopathology* 52(5): 560-568.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Magenkarzinogenese (Yuasa, 2003).....	8
Abbildung 2: Klassifikationsschema der TCGA-Subtypen (Bass et al., 2014)	10
Abbildung 3: Klassifikationsschema der ACRG-Subtypen (Cristescu et al., 2015)	11
Abbildung 4: Zielsetzungen und Ablauf der vorliegenden Arbeit.....	19
Abbildung 5: Beispielbelegungsschema und gestanzter TMA.....	32
Abbildung 6: Flussdiagramm zur Zusammenstellung des Patientenkollektivs der mRNA-basierten Analysen.....	34
Abbildung 7: Assoziation des Tumorregressionsgrades mit dem Gesamtüberleben in den prätherapeutischen Biopsien vor CTx	36
Abbildung 8: Darstellung des Medians, der minimalen und maximalen CNRQ-Werte der einzelnen Gene in den prätherapeutischen Biopsien vor CTx, Resektaten ohne CTx und nach neoadjuvanter CTx.....	38
Abbildung 9: Assoziation der Genexpression von <i>CDH1</i> mit dem pathologischen T-Stadium in den Resektaten a) ohne CTx und b) nach neoadjuvanter CTx	40
Abbildung 10: Assoziation der Genexpression von <i>ZEB1</i> mit dem pathologischen T-Stadium in Resektaten a) ohne CTx und b) nach neoadjuvanter CTx	40
Abbildung 11: Assoziation der Genexpression von <i>ZEB1</i> mit dem a) Metastasen- und b) Lymphknotenstatus in Resektaten ohne CTx.....	40
Abbildung 12: Assoziation der Genexpression von a), c), e) <i>CDH1</i> , <i>VIM</i> und <i>ZEB1</i> in Resektaten ohne CTx und von b), d), f) <i>CDH1</i> , <i>VIM</i> , <i>ZEB1</i> in Resektaten nach neoadjuvanter CTx mit der Laurén-Klassifikation	41
Abbildung 13: Assoziation von <i>CDH1</i> mit der Tumorlokalisierung in prätherapeutischen Biopsien vor CTx	42
Abbildung 14: Assoziation der a) <i>CDH1</i> -, b) <i>VIM</i> - und c) <i>ZEB1</i> -Expression mit dem Tumorregressionsgrad in prätherapeutischen Biopsien vor CTx	42
Abbildung 15: Assoziation der <i>CDKN1A</i> -Expression mit der Tumorlokalisierung in Resektaten a) ohne und b) nach CTx und in c) prätherapeutischen Biopsien vor CTx	43
Abbildung 16: Assoziation der <i>MDM2</i> -Expression mit dem pT-Stadium in Resektaten a) ohne CTx und b) nach CTx.....	44
Abbildung 17: Assoziation des Tumorregressionsgrades mit der a) <i>CDKN1A</i> - und b) <i>MDM2</i> -Expression in prätherapeutischen Biopsien vor CTx.....	44
Abbildung 18: <i>CDH1</i> -Expression und Gesamtüberleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter CTx.....	45
Abbildung 19: <i>MDM2</i> -Expression und Gesamtüberleben in Resektaten a) ohne und b) nach CTx	46

Abbildung 20: Assoziation des <i>CDH1/VIM</i> -Quotienten mit dem Gesamtüberleben in a) prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx, b) allen Resektaten, c) Resektaten ohne CTx und d) Resektaten nach CTx.....	49
Abbildung 21: Assoziation des <i>CDH1/ZEB1</i> -Quotienten mit dem Gesamtüberleben in a) prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx, b) allen Resektaten, c) Resektaten ohne CTx und d) Resektaten nach CTx.....	49
Abbildung 22: Assoziation des <i>EMT-Scores</i> mit dem Gesamtüberleben in a) prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx, b) allen Resektaten, c) Resektaten ohne CTx und d) Resektaten nach CTx.....	51
Abbildung 23: Einordnung der Magenkarzinomzelllinien anhand der 75%-Quantile der <i>CDH1</i> - und <i>ZEB1</i> -Expression in mesenchymale, intermediäre und epitheliale Subgruppen im gesamten Kollektiv und Charakteristika der Magenkarzinomzelllinien (Jang et al., 2017; H. J. Kim et al., 2018)	52
Abbildung 24: Einordnung der Magenkarzinome anhand der 75%-Quantile der <i>CDH1</i> - und <i>ZEB1</i> -Expression in mesenchymale, intermediäre und epitheliale Subgruppen und Verteilung der Mikrosatelliteninstabilität	53
Abbildung 25: Assoziation der Einordnung hinsichtlich der 75%-Quantile der Expression von <i>CDH1</i> und <i>ZEB1</i> mit dem Überleben in a) prätherapeutischen Biopsien vor CTx, b) allen Resektaten und Resektaten c) ohne CTx und c) nach neoadjuvanter CTx	54
Abbildung 26: Assoziation des 75%-Quantils der <i>CDH1</i> - und <i>ZEB1</i> -Expression mit dem Tumorregressionsgrad in prätherapeutischen Biopsien	55
Abbildung 27: Genexpressionsveränderung von a) <i>CDH1</i> , b) <i>VIM</i> und c) <i>ZEB1</i> zwischen prätherapeutischer Biopsie vor CTx und Resektat nach neoadjuvanter CTx..	56
Abbildung 28: Vergleich der EMT-Einteilung zwischen prätherapeutischer Biopsie vor CTx und korrespondierendem Resektat nach neoadjuvanter CTx unter Verwendung des 75%-Quantils der <i>CDH1</i> - und <i>ZEB1</i> -Expression ⁸	56
Abbildung 29: Assoziation der E-Cadherin-Proteinexpression und <i>CDH1</i> -mRNA-Expression in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter CTx	57
Abbildung 30: a) p53- und b) E-Cadherin-Proteinexpression und NGS-basierte Mutationsanalysen.....	58
Abbildung 31: Flussdiagramm zur Darstellung des Patientenausschlusses der Patientenkollektive für die immunhistochemischen Analysen.....	59
Abbildung 32: p53-Färbemuster: Wildtyp-p53-Expressionsmuster mit <60% nukleärer Färbung mit variabler Intensität (WT) (A), kompletter Expressionsverlust (CA) (B) und Überexpression von p53 mit ≥60% nukleärer Färbung mit mittlerer bis starker Intensität (OE) (C) (Darb-Esfahani et al., 2016; Köbel et al., 2016).....	62

Abbildung 33: Beispiele für die E-Cadherin-Färbemuster: keine membranäre Färbung (A), <50% membranäre Färbung (B) ≥50% membranäre Färbung (C) (Bronsert et al., 2014)	62
Abbildung 34: Beispiele für die Vimentin-Färbemuster: keine zytoplasmatische Färbung (A), < 50% zytoplasmatische Färbung (B) ≥50% zytoplasmatische Färbung (C) (Bronsert et al., 2014)	63
Abbildung 35: Beispiele für die ZEB1-Färbemuster: keine nukleäre Färbung (A), 1-10% nukleäre Färbung (B) > 10% nukleäre Färbung (C) (Bronsert et al., 2014).....	63
Abbildung 36: Assoziation der p53-Proteinexpression mit der Lokalisation in Resektaten a) ohne und b) nach CTx und mit den Laurén Subtypen in Resektaten c) ohne und d) nach neoadjuvanter CTx	64
Abbildung 37: Assoziation der E-Cadherin-Expression mit der Lokalisation in Resektaten a) ohne und b) nach CTx, mit den Laurén-Subtypen in Resektaten c) ohne und d) nach CTx und mit dem (y)pT-Stadium in Resektaten e) ohne und f) nach CTx.....	65
Abbildung 38: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Tumorregressionsgrad in prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx	66
Abbildung 39: Assoziation der a) p53- und b) E-Cadherin-Proteinexpression mit dem Tumorregressionsgrad in Resektaten nach neoadjuvanter Chemotherapie....	66
Abbildung 40: Assoziation der p53 -Proteinexpression mit dem Überleben in Resektaten a) ohne CTx und b) nach neoadjuvanter CTx.....	67
Abbildung 41: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Überleben in Resektaten a) ohne CTx und b) nach neoadjuvanter CTx.....	67
Abbildung 42: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in prätherapeutischen Biopsien vor neoadjuvanter CTx	68
Abbildung 43: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben der Resektate ohne CTx in a) proximalen, b) medialen und c) distalen Magenkarzinomen	69
Abbildung 44: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben der prätherapeutischen Biopsien vor CTx in Abhängigkeit von der Lokalisation in a) proximale, b) mediale und c) distale Magenkarzinome	70
Abbildung 45: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben der prätherapeutischen Biopsien vor CTx in a) TRG1 (<i>Responder</i>) und TRG2/3 (<i>Nonresponder</i>) Tumoren	71
Abbildung 46: Assoziation der E-Cadherin-Expression mit dem Gesamtüberleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter Chemotherapie.....	71

Abbildung 47: Assoziation der Vimentin-Expression mit dem Gesamtüberleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter Chemotherapie.....	72
Abbildung 48: Assoziation der ZEB1- Expression mit dem Gesamtüberleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter Chemotherapie	73
Abbildung 49: Vergleich der Häufigkeiten der Subgruppen der molekularen ACRG- Klassifikation nach Cristescu et al. (2015) mit den in der vorliegenden Arbeit angewandten Klassifikationsschemata.....	75
Abbildung 50: Assoziation der ACRG-Klassifikation auf mRNA-Ebene mit dem Überleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter Chemotherapie.....	77
Abbildung 51: Assoziation der ACRG-Klassifikation auf mRNA-Ebene mit dem Überleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter Chemotherapie.....	77
Abbildung 52: Assoziation der ACRG-Subgruppen mit der Lokalisation, der Laurén- Klassifikation und dem T-Stadium in Resektaten a), c), d) ohne und b), d), e) nach neoadjuvanter CTx;.....	79
Abbildung 53: Assoziation der ACRG-Subgruppen mit dem Tumorregressionsgrad in a) prätherapeutischen Biopsien vor CTx und in b) Resektaten nach neoadjuvanter Chemotherapie.....	80
Abbildung 54: Assoziation der ACRG-Klassifikation auf Proteinebene mit dem Überleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter CTx.....	81
Abbildung 55: Klassifikationsschema und Häufigkeiten der Subgruppen der modifizierten molekularen Klassifikation nach ACRG mit zusätzlicher EBV ⁺ - und MSI-L- Subgruppe	82
Abbildung 56: Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit der EBV ⁺ -Subgruppe mit dem Überleben in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter CTx...	84
Abbildung 57: Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit zusätzlicher EBV ⁺ - und MSI-L-Subgruppe mit dem Überleben in Resektaten a) ohne und b) nach CTx.	85
Abbildung 58: Getrennte Betrachtung in Resektaten nach CTx und nach der Lokalisation: Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit zusätzlicher EBV ⁺ - Subgruppe mit dem Überleben a) in proximalen und b) nicht proximalen Tumoren.....	85
Abbildung 59: Assoziation der modifizierten ACRG-Subgruppen mit der Lokalisation in Resektaten a) ohne und b) nach neoadjuvanter Chemotherapie.....	86
Abbildung 60: Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit der Laurén- Klassifikation und dem Alter der Patienten in Resektaten a) ohne, b) nach neoadjuvanter CTx, c) ohne und d) nach CTx.....	86

Abbildung 61: Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit dem Tumorregressionsgrad in Resektaten nach neoadjuvanter Chemotherapie....	87
Abbildung 62: Assoziation der p53-Proteinexpression mit den Subgruppen MSI-L, MSI-H und EBV ⁺ in a) prätherapeutischen Biopsien vor CTx, b) allen Resektaten und Resektaten c) ohne und d) nach neoadjuvanter CTx.....	88
Abbildung 63: Assoziation der Subgruppen MSI-H und MSS/EBV ⁻ in Abhängigkeit des p53-Status in a) prätherapeutischen Biopsien vor CTx, in Resektaten b) ohne und c) nach neoadjuvanter CTx mit dem Überleben der Patienten.....	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Siewert-Klassifikation für AEG Tumoren (Siewert & Stein, 1998a).....	7
Tabelle 2:	Neoadjuvante Chemotherapie-Schemata und Operationsverfahren.....	20
Tabelle 3:	Verwendete Zelllinien.....	22
Tabelle 4:	Verwendete Geräte	22
Tabelle 5:	Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	22
Tabelle 6:	Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 7:	Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 8:	Zusammensetzung des 10x TBE-Puffers für die Agarose-Gelelektrophorese	23
Tabelle 9:	Zusammensetzung des 10x DNA-Ladepuffers für die Agarose-Gelelektrophorese (Bromphenol Blue Xylene Cyanole Dye)	23
Tabelle 10:	Zusammensetzung des ATE-Puffers zum Lösen der lyophilisierten Mikrosatelliten-Primer	24
Tabelle 11:	Zusammensetzung der 10x PCR Puffer Stammlösung (pH=8,3).....	24
Tabelle 12:	Kommerziell erhältliche Kits.....	24
Tabelle 13:	Verwendete TaqMan™ Geneexpressionsassays.....	24
Tabelle 14:	Zusammensetzung der TaqMan™ Geneexpressionsassays.....	24
Tabelle 15:	Verwendete Software.....	25
Tabelle 16:	Pipettierschema des Mastermixes für die cDNA-Synthese.....	26
Tabelle 17:	Pipettierschema des Reaktionsansatzes für die qPCR	27
Tabelle 18:	PCR-Programm für die qPCR.....	28
Tabelle 19:	Anteil ausgeschlossener Messungen der qPCR in den Resektaten und Biopsien vor CTx	29
Tabelle 20:	Sequenzen der Primer für die MSI multiplex PCR (Boland et al., 1998).....	30
Tabelle 21:	Pipettierschema des Reaktionsansatzes für die MSI multiplex PCR.....	30
Tabelle 22:	PCR Programm für die MSI multiplex PCR	30
Tabelle 23:	Mastermixzusammensetzung für die Kapillarelektrophorese.....	31
Tabelle 24:	Sequenzen der Primer für die EBV-multiplex-PCR (Huber et al., 2002).....	31
Tabelle 25:	Pipettierschema des Reaktionsansatzes zum EBV-Nachweis	31
Tabelle 26:	PCR Programm für die EBV-multiplex-PCR.....	32
Tabelle 27:	Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie.....	32
Tabelle 28:	Auswerteschema der immunhistochemischen Analyse von p53 (Darb-Esfahani et al., 2016; Köbel et al., 2016)	33
Tabelle 29:	Auswerteschema der immunhistochemischen Analyse der EMT-Marker (Bronsert et al., 2014)	33

Tabelle 30:	Patientencharakteristika der Kollektive für die mRNA-basierten Analysen und Assoziation mit dem Gesamtüberleben der Patienten.....	35
Tabelle 31:	Korrelation der Gene in prätherapeutischen Biopsien vor CTx, Resektaten ohne CTx und nach CTx.....	39
Tabelle 32:	Assoziation des Gesamtüberlebens mit der <i>CDH1</i> -, <i>VIM</i> - und <i>ZEB1</i> -Expression	45
Tabelle 33:	Multivariate Cox-Regression: Assoziation von <i>CDH1</i> , (y)pTNM und R mit dem Gesamtüberleben	46
Tabelle 34:	Assoziation des Gesamtüberlebens mit der <i>CDKN1A</i> - und <i>MDM2</i> -Expression	46
Tabelle 35:	Multivariate Cox-Regression: Assoziation von <i>MDM2</i> , (y)pTNM und R mit dem Gesamtüberleben	47
Tabelle 36:	Median, Minimum, Maximum und optimale <i>cut-off</i> Werte des <i>CDH1/VIM</i> -Quotienten	47
Tabelle 37:	Median, Minimum, Maximum und optimale <i>cut-off</i> Werte des <i>CDH1/ZEB1</i> -Quotienten	47
Tabelle 38:	Assoziation des <i>CDH1/VIM</i> - und <i>CDH1/ZEB1</i> -Quotienten mit dem Gesamtüberleben	50
Tabelle 39:	Regressionskoeffizienten zur Berechnung des <i>EMT-Scores</i>	50
Tabelle 40:	Median, Minimum, Maximum und optimale <i>cut-off</i> Werte des <i>EMT-Scores</i>	50
Tabelle 41:	Assoziation des <i>EMT-Scores</i> mit dem Gesamtüberleben	51
Tabelle 42:	75%-Quantile der <i>CDH1</i> - und <i>ZEB1</i> -Expression und Fallzahlen in den einzelnen Kollektiven bei Einordnung der Tumoren hinsichtlich des 75%-Quantils der Expressionen	53
Tabelle 43:	Assoziation der 75%-Quantile der <i>CDH1/ZEB1</i> -Expression mit dem Gesamtüberleben	54
Tabelle 44:	Assoziation der E-Cadherin-Proteinexpression und <i>CDH1</i> -mRNA-Expression	57
Tabelle 45:	Patientencharakteristika der immunhistochemisch untersuchten Kollektive und Assoziation mit dem Gesamtüberleben.....	60
Tabelle 46:	Häufigkeit bzw. Verteilung der Ergebnisse der p53-Proteinexpression.....	61
Tabelle 47:	Häufigkeit bzw. Verteilung der Ergebnisse der E-Cadherin-Proteinexpression	62
Tabelle 48:	Häufigkeit bzw. Verteilung der Ergebnisse der Vimentin-Proteinexpression...	62
Tabelle 49:	Häufigkeit bzw. Verteilung der Ergebnisse der <i>ZEB1</i> -Proteinexpression	63
Tabelle 50:	Korrelation der immunhistochemischen Analysen.....	63

Tabelle 51:	Assoziation der p53-Expression mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven	68
Tabelle 52:	Multivariate Cox Regression der p53-Proteinexpression und pTNM, R.....	68
Tabelle 53:	Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in Resektaten ohne neoadjuvante CTx in Abhängigkeit von der Lokalisation.....	69
Tabelle 54:	Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in prätherapeutischen Biopsien vor CTx in Abhängigkeit von der Lokalisation...	70
Tabelle 55:	Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in prätherapeutischen Biopsien vor CTx in <i>Respondern</i> und <i>Nonrespondern</i>	70
Tabelle 56:	Assoziation der E-Cadherin-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben der Patienten in den Patientenkollektiven.....	72
Tabelle 57:	Multivariate Cox Regression der E-Cadherin-Proteinexpression und (y)pTNM, R.....	72
Tabelle 58:	Assoziation der Vimentin-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven	73
Tabelle 59:	Multivariate Cox Regression der Vimentin-Proteinexpression und pTNM, R..	73
Tabelle 60:	Assoziation der ZEB1-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven	73
Tabelle 61:	ACRG-Klassifikation: Fallzahlen in den einzelnen Kollektiven bei Einordnung der EMT-Tumoren hinsichtlich des 75%-Quantils der <i>CDH1/ZEB1</i> -Expression	76
Tabelle 62:	Assoziation der ACRG-Klassifikation mit der EMT-Subgruppe auf mRNA-Ebene mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven	77
Tabelle 63:	Multivariate Cox-Regression der ACRG-Subgruppen auf mRNA-Ebene und pTNM, R.....	77
Tabelle 64:	Fallzahlen der ACRG-Klassifikation bei Einordnung der EMT-Tumoren auf Proteinebene in den Patientenkollektiven.....	81
Tabelle 65:	Assoziation der ACRG-Klassifikation auf Proteinebene mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven.....	81
Tabelle 66:	Häufigkeiten und Verteilung der Subgruppen der modifizierten ACRG-Klassifikationen	83
Tabelle 67:	Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit der EBV ⁺ -Subgruppe mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven.....	83
Tabelle 68:	Assoziation der modifizierten ACRG-Klassifikation mit zusätzlicher EBV ⁺ - und MSI-L Subgruppe.....	84
Tabelle 69:	Häufigkeit bzw. Verteilung der MSI-H- und MSS/EBV ⁻ -Subgruppen in den Patientenkollektiven in Abhängigkeit des p53-Status	87

Tabelle 70:	Häufigkeit bzw. Verteilung der MSI-L-, MSI-H- und EBV ⁺ -Subgruppen in den Patientenkollektiven	88
Tabelle 71:	Assoziation der MSI-H- und MSS/EBV-Subgruppen in Abhängigkeit des p53-Status mit dem Gesamtüberleben.....	89

Anhang

Tabelle A1: Assoziation der EMT-assoziierten Gene mit klinischen Charakteristika in Resektaten ohne CTx

Patienten- charakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	CDH1 Expression			VIM Expression			ZEB1 Expression		
		< Median ≥			< Median ≥			< Median ≥		
		n	n	p	n	n	p	n	n	p
Total	95 (100)	47	48		47	48		47	48	
Alter, in Jahren	48 (50,5)	23	25	0,76	20	28	0,12	20	28	0,12
Median 70,3 (37,9 – 90,9)	47 (49,5)	24	23		27	20		17	20	
Geschlecht										
weiblich	35 (36,8)	21	14	0,12	17	18	0,90	16	19	0,58
männlich	60 (63,2)	26	34		30	30		31	29	
Lokalisation										
Proximal	22 (23,2)	12	10		14	8		10	12	
Medial	34 (35,8)	17	17	0,13	19	15	0,15	20	14	< 0,05
Distal	32 (33,7)	12	20		12	20		16	16	
Linitis	7 (7,4)	6	1		2	5		7	0	
Laurén-Subtypen										
Intestinal	47 (49,5)	21	26	0,3	30	17	< 0,01	33	14	< 0,01
Nicht-intestinal	48 (50,5)	26	22		17	31		14	34	
Grading										
G1/2	23 (24,2)	10	13	0,55	19	4	< 0,01	17	6	< 0,01
G3/4	72 (75,8)	37	35		28	44		30	42	
Resektionsstatus										
R0	77 (81,1)	37	40	0,57	38	39	0,96	44	33	< 0,01
R1/2	18 (18,9)	10	8		9	9		3	15	
Metastasenstatus										
M0	77 (81,1)	36	41	0,27	40	7	0,32	42	5	< 0,05
M1	18 (18,9)	11	7		7	11		5	13	
Tumorausdehnung										
(y) pT1	23 (24,2)	5	18		14	9		17	6	
(y) pT2	13 (13,7)	6	7	< 0,05	6	7	0,63	9	4	< 0,01
(y) pT3	26 (27,4)	17	9		11	15		13	13	
(y) pT4	33 (34,7)	19	14		16	17		8	25	
Lymphknotenstatus										
(y) pN0	42 (44,2)	20	22	0,75	23	19	0,36	26	16	< 0,05
(y) pN1/2/3	53 (55,8)	27	26		24	29		21	32	

Tabelle A2: Assoziation der EMT-assoziierten Gene mit klinischen Charakteristika in Resektaten nach CTx

Patienten- charakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	CDH1 Expression			VIM Expression			ZEB1 Expression		
		< Median ≥			< Median ≥			< Median ≥		
		n	n	p	n	n	p	n	n	p
Total	161 (100)	80	81		80	81		80	81	
Alter, in Jahren	79 (49,1)	36	43	0,31	33	46	0,05	35	44	0,18
Median 61,7 (28,8 – 80,8)	82 (50,9)	44	38		47	35		45	37	
Geschlecht										
weiblich	36 (22,4)	17	19	0,74	17	19	0,74	13	23	0,06
männlich	125 (77,6)	63	62		63	62		67	58	
Lokalisation										
Proximal	108 (67,1)	54	54		52	56		55	53	
Medial	29 (18)	12	17	0,41	18	11	0,85	15	14	0,56
Distal	16 (9,9)	8	8		8	8		8	8	
Linitis	8 (5,0)	6	2		2	6		2	6	
Laurén-Subtypen										
Intestinal	95 (59)	39	56	< 0,01	56	39	< 0,01	59	36	< 0,01
Nicht-intestinal	66 (41)	41	25		24	42		21	45	
Grading										
G1/2	29 (18)	13	16	0,56	19	10	0,06	17	12	0,29
G3/4	132 (82)	67	65		61	71		63	69	
Resektionsstatus										
R0	114 (70,8)	55	59	0,57	55	59	0,57	58	56	0,64
R1/2	47 (29,2)	25	22		25	22		22	25	
Metastasenstatus										
M0	126 (78,3)	59	67	0,17	61	65	0,54	64	62	0,60
M1	35 (21,7)	21	14		19	16		16	19	
Tumorausdehnung										
(y) pT1	7 (4,3)	2	5		6	1		7	0	
(y) pT2	13 (8,1)	3	10	< 0,01	6	7	0,06	9	4	< 0,01
(y) pT3	86 (53,4)	38	48		48	39		45	41	
(y) pT4	55 (34,2)	37	18		21	34		19	36	

(y) pT4										
Lymphknotenstatus										
(y) pN0	40 (24,8)	15	25	0,08	20	20	0,96	23	17	0,25
(y) pN1/2/3	121 (75,2)	65	56		60	61		57	64	
Regressionsgrad										
TRG2	81	39	42	0,69	33	48	0,02	38	43	0,48
TRG3	80	41	39		47	33		42	38	

Tabelle A3: Assoziation der EMT-assoziierten Gene mit klinischen Charakteristika in prätherapeutischen Biopsien vor CTx

Patienten- charakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	CDH1 Expression			VIM Expression			ZEB1 Expression		
		< Median ≥		p	< Median ≥		p	< Median ≥		p
		n	n		n	n		n	n	
Total	50 (100)	25	25		25	25		25	25	
Alter, in Jahren	25 (50)	12	13	0,77	16	9	< 0,05	19	6	< 0,01
Median 66,5 (44,1 – 79,0)	25 (50)	13	12		9	16		6	19	
Geschlecht										
weiblich	12 (24,0)	6	6	1,00	7	5	0,51	7	5	0,51
männlich	38 (76,0)	19	19		18	20		18	20	
Lokalisation										
Proximal	33 (66,0)	20	13		19	14		17	16	
Medial	6 (12,0)	3	3	0,05	3	3	0,22	3	3	0,94
Distal	11 (22,0)	2	9		3	8		5	6	
Linitis	0 (0)	0	0		0	0		0	0	
Laurén-Subtypen										
Intestinal	32 (64,0)	16	16	1,00	19	13	0,08	16	16	1,00
Nicht-intestinal	18 (36,0)	9	9		6	12		9	9	
Grading										
G1/2	13 (26,0)	5	8	0,38	7	6	0,68	4	9	0,13
G3/4	36 (72,0)	19	17		17	19		20	16	
k.A.	1 (2,0)									
Resektions-Status										
R0	42 (84,0)	20	22	0,64	21	21	0,73	21	21	0,73
R1/2	7 (14,0)	4	3		4	3		4	3	
k.A.	1 (2,0)									
Metastasen-Status										
M0	34 (68,0)	18	16		17	17		17	17	
M1	12 (24,0)	7	5	0,75	6	6	1,00	6	6	1,00
k.A.	4 (8,0)									
Tumorausdehnung										
(y) pT0	2 (4,0)	2	0		2	0		2	0	
(y) pT1	6 (12,0)	3	3	0,63	4	2	0,27	3	3	0,63
(y) pT2	12 (24,0)	6	6		5	7		6	6	
(y) pT3	17 (34,0)	7	10		6	11		7	10	
(y) pT4	13 (26,0)	7	6		8	5		7	6	
Lymphknotenstatus										
(y) pN0	22 (44,0)	10	12	0,57	10	12	0,57	11	11	1,00
(y) pN1/2/3	28 (56,0)	15	13		15	13		14	14	
Regressionsgrad										
TRG1	10 (20,0)	3	7	0,35	4	6	0,14	6	4	0,63
TRG2	8 (16,0)	5	3		2	6		3	5	
TRG3	31 (62,0)	16	15		19	12		16	15	
k.A.	1 (2,0)									
TRG1	40 (80,0)	3	7	0,16	4	6	0,48	6	4	0,48
TRG2/3	10 (20,0)	22	18		21	19		19	21	

Tabelle A4: Assoziation der TP53-assoziierten Gene mit klinischen Charakteristika in Resektaten ohne CTx

Patienten- charakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	CDKN1A Expression			MDM2 Expression		
		< Median ≥		p	< Median ≥		p
		n	n		n	n	
Total	95 (100)	47	48		47	48	
Alter, in Jahren	48 (50,5)	26	22	0,36	23	25	0,76
Median 70,3 (37,9 – 90,9)	47 (49,5)	21	26		24	23	
Geschlecht							
weiblich	35 (36,8)	19	16	0,47	13	22	0,07
männlich	60 (63,2)	28	32		34	26	
Lokalisation							
Proximales Drittel	22 (23,2)	11	11		8	14	
Mittleres Drittel	34 (35,8)	19	15	0,82	19	15	0,15
Distales Drittel	32 (33,7)	15	17		18	14	
Linitis	7 (7,4)	3	4		1	6	

Laurén Klassifikation								
Intestinal	47 (49,5)	21	26	0,36	26	21	0,26	
Nicht-intestinal	48 (50,5)	26	22		21	27		
Grading								
G1/2	23 (24,2)	10	13	0,55	14	9	0,23	
G3/4	72 (75,8)	37	35		33	39		
Resektions-Status								
R0	77 (81,1)	36	41		41	36		
R1/2	18 (18,9)	11	7		6	12		
Metastasen-Status								
M0	77 (81,1)	36	41	0,27	40	37	0,32	
M1	18 (18,9)	11	7		7	11		
Tumorausdehnung								
(y) pT1	23 (24,2)	11	12	0,41	14	9	0,43	
(y) pT2	13 (13,7)	6	7		8	5		
(y) pT3	26 (27,4)	10	16		11	15		
(y) pT4	33 (34,7)	20	13		14	19		
Lymphknotenstatus								
(y) pN0	42 (44,2)	19	23	0,46	21	21	0,93	
(y) pN1/2/3	53 (55,8)	28	25		26	27		

Tabelle A5: Assoziation der TP53-assoziierten Gene mit klinischen Charakteristika in Resektaten nach CTx

Patienten- charakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	CDKN1A Expression			MDM2 Expression		
		< Median ≥		p	< Median ≥		p
		n	n		n	n	
Total	161 (100)	80	81				
Alter, in Jahren	79 (49,1)	36	43	0,31	41	38	0,58
Median 61,7 (28,8 – 80,8)	82 (50,9)	44	38		39	43	
Geschlecht							
weiblich	36 (22,4)	21	15	0,24	15	21	0,28
männlich	125 (77,6)	59	66		65	60	
Lokalisation							
Proximales Drittel	108 (67,1)	44	64	0,05	56	52	0,87
Mittleres Drittel	29 (18)	19	10		13	16	
Distales Drittel	16 (9,9)	11	5		7	9	
Linitis	8 (5,0)	6	2		4	4	
Laurén Klassifikation							
Intestinal	95 (59)	46	49	0,70	44	51	0,30
Nicht-intestinal	66 (41)	34	32		36	30	
Grading							
G1/2	29 (18)	15	14	0,81	12	17	0,32
G3/4	132 (82)	65	67		68	64	
Resektions-Status							
R0	114 (70,8)	62	52		55	59	
R1/2	47 (29,2)	18	29		25	22	
Metastasen-Status							
M0	126 (78,3)	63	63	0,88	60	66	0,32
M1	35 (21,7)	17	18		20	15	
Tumorausdehnung							
(y) pT1	7 (4,3)	6	1	0,08	6	1	0,05
(y) pT2	13 (8,1)	4	9		10	3	
(y) pT3	86 (53,4)	46	40		38	48	
(y) pT4	55 (34,2)	24	31		16	29	
Lymphknotenstatus							
(y) pN0	40 (24,8)	20	20	0,96	20	20	0,96
(y) pN1/2/3	121 (75,2)	60	61		60	61	

Tabelle A6: Assoziation der TP53-assoziierten Gene mit klinischen Charakteristika in prätherapeutischen Biopsien vor CTx

Patienten- charakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	CDKN1A Expression			MDM2 Expression		
		< Median ≥		p	< Median ≥		p
		n	n		n	n	
Total	50 (100)	25	25		25	25	
Alter, in Jahren	25 (50)	15	10	0,16	13	12	0,78
Median 66,5 (44,1 – 79,0)	25 (50)	10	15		12	13	
Geschlecht							
weiblich	12 (24,0)	8	4	0,19	19	19	1,00
männlich	38 (76,0)	17	21		6	6	
Lokalisation							
Proximal	33 (66,0)	21	12	0,01	20	13	0,11

Medial	6 (12,0)	0	6		2	4	
Distal	11 (22,0)	4	7		3	8	
Linitis	0 (0)	0	0		0	0	
Laurén Klassifikation							
Intestinal	32 (64,0)	15	17	0,56	17	15	0,56
Nicht-intestinal	18 (36,0)	10	8		8	10	
Grading							
G1/2	13 (26,0)	5	8	0,38	6	7	0,81
G3/4	36 (72,0)	19	17		18	18	
k.A.	1 (2,0)						
Resektions-Status							
R0	42 (84,0)	20	22	0,24	20	22	0,64
R1/2	7 (14,0)	5	2		4	3	
k.A.	1 (2,0)						
Metastasen-Status							
M0	34 (68,0)	19	15	0,40	18	16	0,50
M1	12 (24,0)	5	7		5	7	
k.A.	4 (8,0)						
Tumorausdehnung							
(y) pT0	2 (4,0)	2	0		2	0	
(y) pT1	6 (12,0)	2	4	0,14	2	4	0,59
(y) pT2	12 (24,0)	3	9		6	6	
(y) pT3	17 (34,0)	10	7		8	9	
(y) pT4	13 (26,0)	8	5		7	6	
Lymphknotenstatus							
(y) pN0	22 (44,0)	10	12	0,57	12	10	0,57
(y) pN1/2/3	28 (56,0)	15	13		13	15	
Regressionsgrad							
TRG1	10 (20,0)	3	7		6	4	
TRG2	8 (16,0)	3	5	0,16	3	5	0,63
TRG3	31 (62,0)	19	12		16	15	
k.A.	1 (2,0)						
TRG1	40 (80,0)	3	7	0,16	6	4	0,48
TRG2/3	10 (20,0)	22	18		19	21	

Tabelle A7: Assoziation der EMT-Klassifikation mit klinischen Charakteristika in Resektaten ohne CTx

Patienten- charakteristika	Gesamtzahl n (%)	75%-Quantil CDH1/ZEB1			
		e	m	i	p
Total	95 (100)	21	21	53	
Alter, in Jahren	47 (49,5)	9	10	28	
Median 70,3 (37,9 – 90,9)	48 (50,5)	12	11	35	0,73
Geschlecht					
weiblich	35 (36,8)	6	12	17	
männlich	60 (63,2)	15	9	36	0,09
Lokalisation					
Proximal	22 (23,2)	2	3	14	
Medial	34 (35,8)	12	6	16	
Distal	32 (33,7)	5	6	21	< 0,01
Linitis	7 (7,4)	1	6	0	
Laurén-Subtypen					
Intestinal	47 (49,5)	14	3	30	
Nicht-intestinal	48 (50,5)	7	18	23	< 0,01
Grading					
G1/2	23 (24,2)	7	2	14	
G3/4	72 (75,8)	14	19	39	0,17
Resektionsstatus					
R0	77 (81,1)	18	12	47	
R1/2	18 (18,9)	3	9	6	< 0,01
Metastasenstatus					
M0	77 (81,1)	19	14	44	
M1	18 (18,9)	2	7	9	0,12
Tumorausdehnung					
(y) pT1	23 (24,2)	10	0	13	
(y) pT2	13 (13,7)	4	2	7	
(y) pT3	26 (27,4)	2	5	19	< 0,01
(y) pT4	33 (34,7)	5	14	14	
Lymphknotenstatus					
(y) pN0	42 (44,2)	12	6	24	
(y) pN1/2/3	53 (55,8)	9	15	29	0,17

Tabelle A8: Assoziation der EMT-Klassifikation mit klinischen Charakteristika in Resektaten nach CTx

Patienten- charakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	75% CDH1/ZEB1			
		e	m	i	p
Total	161(100)	37	37	87	
Alter, in Jahren	80 (49,7)	19	18	43	0,97
Median 61,7 (28,8 – 80,8)	81 (50,3)	18	19	44	
Geschlecht					0,62
weiblich	36 (22,4)	9	10	17	
männlich	125 (77,6)	28	27	70	
Lokalisation					0,19
Proximal	108 (67,1)	23	24	61	
Medial	29 (18)	9	5	15	
Distal	16 (9,9)	4	3	9	
Linitis	8 (5,0)	1	5	2	
Laurén-Subtypen					< 0,01
Intestinal	95 (59)	24	12	59	
Nicht-intestinal	66 (41)	13	25	28	
Grading					0,86
G1/2	29 (18)	6	6	17	
G3/4	132 (82)	31	31	70	
Resektionsstatus					0,51
R0	114 (70,8)	29	25	60	
R1/2	47 (29,2)	8	12	27	
Metastasenstatus					0,53
M0	126 (78,3)	31	27	68	
M1	35 (21,7)	6	10	19	
Tumorausdehnung					0,04
(y) pT1	7 (4,3)	3	0	4	
(y) pT2	13 (8,1)	7	2	4	
(y) pT3	86 (53,4)	53	18	15	
(y) pT4	55 (34,2)	9	17	29	
Lymphknotenstatus					0,10
(y) pN0	40 (24,8)	14	9	17	
(y) pN1/2/3	121 (75,2)	23	28	70	
Regressionsgrad					0,87
TRG2	81 (50,3)	18	20	43	
TRG3	80 (49,7)	19	17	44	

Tabelle A9: Assoziation der EMT-Klassifikation mit klinischen Charakteristika in prätherapeutischen Biopsien vor CTx

Patienten- charakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	75%-Quantil CDH1/ZEB1			
		e	m	i	p
Total	50 (100)	8	8	34	
Alter, in Jahren	Median 66,5	5	2	18	0,27
(44,1 – 79,0)	25 (50)	3	6	16	
Geschlecht					0,31
weiblich	12 (24,0)	3	3	6	
männlich	38 (76,0)	5	5	28	
Lokalisation					< 0,01
Proximal	33 (66,0)	1	5	27	
Medial	6 (12,0)	0	1	5	
Distal	11 (22,0)	7	2	2	
Linitis	0 (0)	0	0	0	
Laurén Klassifikation					0,21
Intestinal	32 (64,0)	3	5	24	
Nicht-intestinal	18 (36,0)	5	3	10	
Grading					0,25
G1/2	13 (26,0)	2	4	7	
G3/4	36 (72,0)	6	4	26	
k.A.	1 (2,0)				
Resektions-Status					0,35
R0	42 (84,0)	8	6	28	
R1/2	7 (14,0)	0	2	5	
k.A.	1 (2,0)				
Metastasen-Status					0,41
M0	34 (68,0)	7	4	23	
M1	12 (24,0)	1	3	8	
k.A.	4 (8,0)	0	1	3	

Tumorausdehnung (y) pT1/pT2 (y) pT3/pT4	20 (40,0) 30 (60,0)	5 3	1 7	14 20	0,12
Lymphknotenstatus (y) pN0 (y) pN1/2/3	22 (44,0) 28 (56,0)	6 2	3 5	13 21	0,16
Regressionsgrad TRG1 TRG2 TRG3 k.A.	10 (20,0) 8 (16,0) 31 (62,0) 1 (2,0)	4 1 3	0 3 5	6 4 23	0,07
TRG1 TRG2/3	40 (80,0) 10 (20,0)	4 4	0 8	6 28	0,04
TRG1/2 TRG3 k.A.	18 (36,0) 31 (63,0) 1 (2,0)	5 3	3 5	10 23	0,24

Tabelle A10: Assoziation der immunhistochemischen Analysen mit Patientencharakteristika in Resektaten ohne CTx

Patientencharakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	p53 Expression			E-Cadherin Expression			VIM Expression			ZEB1 Expression		
		CA/OE	WT	p	< 50%	≥ 50%	p	0%	</≥50%	p	0%	≥ 1%	p
Total	270 (100)	124	144		33	237		251	19		261	9	
Alter, in Jahren	68,6 (32,1 – 90,9)	60 65	76 69	0,47	20 13	116 121	0,21	127 124	9 10	0,50	130 131	6 3	0,73
Geschlecht weiblich männlich	89 (33,0) 181 (67)	38 86	51 93	0,41	13 20	76 161	0,40	83 186	6 13	0,89	86 175	3 6	0,98
Lokalisation Proximal Medial Distal Linitis k.A.	103 (38,7) 65 (24,4) 83 (31,2) 15 (5,6) 4 (1,5)	62 25 31 5	41 40 50 10	< 0,01	13 13 4 2	90 52 79 13	0,05	97 63 74 13	6 2 9 2		100 64 80 13	3 1 3 2	0,15
Laurén-Subtypen Intestinal Nicht-intestinal	145 (53,7) 125 (46,3)	78 46	66 78	< 0,01	3 30	142 95	< 0,01	137 114	8 11	0,29	141 120	4 5	0,57
Grading G1/2 G3/4 k.A.	67 (24,8) 202 (74,8) 1 (0,4)	37 86	29 115	0,06	0 33	67 169	< 0,01	65 185	2 17	0,31	66 194	1 8	0,61
Resektionsstatus R0 R1/2	219 (81,1) 51 (18,9)	98 26	120 24	0,37	26 7	193 44	0,72	202 49	17 2	0,33	213 48	6 3	0,26
Metastasenstatus M0 M1	249 (92,2) 21 (7,8)	111 13	136 8	0,13	29 4	220 17	0,32	232 19	17 2	0,64	241 20	8 1	0,70
Tumorausdehnung (y) pT1 (y) pT2 (y) pT3 (y) pT4	39 (14,4) 40 (14,8) 129 (47,8) 62 (23,0)	16 22 56 30	21 18 73 32	0,59	2 1 17 13	37 39 112 49	0,02	38 38 118 57	1 2 11 5	0,58	38 40 124 59	1 0 5 3	0,57
Lymphknotenstatus (y) pN0 (y) pN1/2/3	96 (35,6) 174 (64,4)	30 94	65 79	< 0,01	10 23	86 151	0,50	90 161	6 13	0,71	95 166	1 8	0,12

Tabelle A11: Assoziation der immunhistochemischen Analysen mit Patientencharakteristika in Resektaten nach CTx

Patientencharakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	p53 Expression			E-Cadherin Expression			VIM Expression			ZEB1 Expression		
		CA/OE	WT	p	< 50%	≥ 50%	p	< 50%	≥ 50%	p	0%	≥ 1%	p
Total	297 (100)	158	136		25	272		271	24		287	8	
Alter, in Jahren	60,9 (28,3 – 81,2)	90 68	85 51	0,34	18 7	159 113	0,19	164 107	11 13	0,16	167 120	0 8	0,02
Geschlecht weiblich männlich	65 (21,9) 232 (78,1)	20 138	44 92	< 0,01	10 15	55 217	0,02	58 213	6 18	0,68	62 225	2 6	0,82
Lokalisation Proximal Medial Distal Linitis	188 (63,3) 62 (20,9) 34 (11,4) 13 (4,4)	115 27 10 6	71 35 23 7	< 0,01	13 8 2 2	175 54 32 11	0,35	171 58 31 11	16 4 2 2	0,71	184 61 31 11	2 1 3 2	0,01

Laurén-Subtypen													
Intestinal	175 (78,9)	100	73	0,10	6	169	< 0,01	163	12	0,33	173	2	0,05
Nicht-intestinal	122 (41,1)	58	63		19	103		108	12		114	6	
Grading													
G1/2	46 (15,5)	22	23	0,35	0	46	0,02	45	1	0,27	46	0	0,30
G3/4	189 (63,6)	106	81		20	169		171	17		183	5	
k.A.	62 (20,9)												
Resektionsstatus													
R0	217 (73,1)	116	99	0,90	16	201	0,29	197	18	0,81	210	5	0,50
R1/2	80 (26,9)	42	37		9	71		74	6		77	3	
Metastasenstatus													
M0	238 (80,1)	124	112	0,41	20	218	0,99	216	20	0,67	230	7	0,61
M1	59 (19,9)	24	24		5	54		55	4		57	1	
Tumorausdehnung													
(y) pT1	15 (5,1)	6	9		0	15		14	1		15	0	
(y) pT2	28 (9,4)	11	17	0,05	0	28	0,19	27	1	0,74	27	1	0,91
(y) pT3	172 (57,9)	102	67		16	156		154	16		166	5	
(y) pT4	82 (27,6)	39	43		9	73		76	6		79	2	
Lymphknotenstatus													
(y) pN0	78 (26,3)	42	36	0,98	6	72	0,79	69	9	0,20	77	1	0,37
(y) pN1/2/3	219 (73,7)	116	100		19	200		202	15		210	7	
Regressionsgrad													
TRG2	137 (46,1)	81	54	0,05	8	129	0,14	125	11	0,98	133	3	0,62
TRG3	160 (53,9)	77	82		17	143		146	13		154	5	

Tabelle A12: Assoziation der p53-Proteinexpression mit Patientencharakteristika in prätherapeutischen Biopsien vor CTx

Patientencharakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	p53 Expression		
		CA/OE	WT	p
Total	132 (100)	62	70	
Alter, in Jahren	66 (50)	33	33	0,46
63,4 (39,5 – 79,1)	66 (50)	29	37	
Geschlecht				
männlich	99 (75,0)	49	50	0,31
weiblich	33 (25,0)	13	20	
Lokalisation				
Proximal	92 (69,7)	49	43	0,13
Medial	23 (17,4)	8	15	
Distal	15 (11,4)	5	10	
Linitis	2 (1,5)	0	2	
Laurén-Subtypen				
Intestinal	68 (51,5)	34	34	0,47
Nicht-intestinal	64 (48,5)	28	36	
Grading				
G1/2	32 (24,2)	16	16	0,69
G3/4	100 (75,8)	46	54	
Resektionsstatus				
R0	113 (85,6)	51	62	0,41
R1/2	18 (13,6)	10	8	
k.A.	1 (<1)			
Metastasenstatus				
M0	95 (72,0)	41	54	0,11
M1	32 (24,2)	19	13	
k.A.	5 (3,8)			
Tumorausdehnung				
(y) pT0	8 (6,0)	3	5	0,66
(y) pT1	12 (9,0)	4	8	
(y) pT2	19 (14,4)	11	8	
(y) pT3	71 (53,8)	32	39	
(y) pT4	21 (15,9)	11	10	
k.A.	1 (<1)			
Lymphknotenstatus				
(y) pN0	58 (43,9)	26	32	0,72
(y) pN1/2/3	73 (55,3)	35	38	
k.A.	1 (<1)			
Regressionsgrad				
TRG1	44 (33,3)	22	22	0,83
TRG2	40 (30,3)	19	21	
TRG3	48 (36,4)	21	27	
Regressionsgrad				
TRG1	44 (33,3)	22	22	0,62
TRG2/3	88 (66,7)	40	48	

Tabelle A13: Assoziation p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven in Abhängigkeit von den Laurén Subtypen

Kollektiv	p53	intestinal			nicht-intestinal		
		Median OS [mo]	5 JÜ (%)	p	Median OS [mo]	5 JÜ (%)	p
Resektate ohne CTx	CA/OE	36,8 (22,4 – 51,2)	39,3	<0,01	19,7 (6,0 – 33,4)	29,2	<0,01
	WT	nicht erreicht	67,7		87,5 (n.a.)	54,1	
Resektate nach CTx	CA/OE	38,7 (18,9 – 58,5)	42,9	0,924	23,8 (7,8 – 39,8)	33,1	0,470
	WT	28,6 (19,4 – 37,8)	39,1		43,9 (20,5 – 67,4)	38,0	

Tabelle A14: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in den Patientenkollektiven ohne CTx in Abhängigkeit von dem cT-Stadium

Kollektiv	p53	cT1/2			cT3/4		
		Median OS [mo]	5 JÜ (%)	p	Median OS [mo]	5 JÜ (%)	p
Resektate ohne CTx	CA/OE	89,5 (31,5 – 147,5)	55,7	0,024	16,0 (11,7 – 20,3)	21,9	<0,01
	WT	nicht erreicht	75,1		46,3 (0,6 – 92,0)	47,9	
Resektate nach CTx	CA/OE	47,7 (1,4 – 94,0)	37,5	0,593	30,9 (21,0 – 40,8)	38,7	0,865
	WT	nicht erreicht	70,0		33,8 (19,5 – 48,1)	36,3	

Tabelle A15: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in Resektaten nach CTx in Abhängigkeit von dem Tumorregressionsgrad

p53	TRG2			TRG3		
	Median OS [mo]	5 JÜ (%)	p	Median OS [mo]	5 JÜ (%)	p
CA/OE	45,3 (11,4 – 79,2)	45,4	0,181	29,0 (19,7 – 38,3)	30,6	0,810
WT	75,8 (n.a.)	52,1		26,4 (18,4 – 34,3)	29,2	

Tabelle A16: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben in Resektaten nach CTx in Abhängigkeit von der Lokalisation

p53	proximal			medial			distal		
	Median OS	5 JÜ	p	Median OS	5 JÜ	p	Median OS	5 JÜ (%)	p
CA/OE	30,9 (19,8 – 42,0)	39,6	0,96	26,7 (0,0 – 53,9)	34,2	0,77	31,0 (n.a.)	48,6	0,89
WT	28,6 (15,7 – 41,5)	37,0		31,1 (2,6 – 59,6)	34,2		35,9 (2,0 – 69,8)	49,7	

Tabelle A17: Assoziation der ACRG-Klassifikation auf mRNA-Ebene mit klinischen Charakteristika in Resektaten ohne CTx

Patientencharakteristika	Gesamtzahl n (%)	ACRG Klassifikation				p
		MSI	EMT	TP53 ⁻	TP53 ⁺	
Total	93 (100)	9	21	31	32	
Alter, in Jahren	47 (49,5)	2	10	15	20	0,18
Median 70,7 (37,9 – 90,9)	46 (50,5)	7	11	16	12	
Geschlecht						0,16
weiblich	35 (37,6)	4	12	9	10	
männlich	58 (63,4)	5	9	22	22	
Lokalisation						< 0,01
Proximal	19 (20,4)	3	3	12	1	
Medial	32 (34,4)	2	6	9	16	
Distal	33 (35,5)	4	6	9	13	
Linitis k.A.	7 (7,5) 2 (2,2)	0	6	0	1	
Laurén-Subtypen						< 0,01
Intestinal	46 (49,5)	8	3	22	13	
Nicht-intestinal	47 (50,5)	1	18	9	19	
Grading						0,21
G1/2	22 (23,7)	4	2	8	8	
G3/4	71 (76,3)	5	19	23	24	
Resektionsstatus						0,01
R0	75 (80,8)	9	12	26	28	
R1/2	18 (19,2)	0	9	5	4	
Metastasenstatus						0,02
M0	75 (80,8)	9	14	22	30	
M1	18 (19,2)	0	7	9	2	
Tumorausdehnung						

pT1	22 (23,7)	1	0	9	12	< 0,01
pT2	12 (12,9)	1	2	3	6	
pT3	26 (28,0)	5	5	7	9	
pT4	33 (35,5)	2	14	12	5	
Lymphknotenstatus						0,02
pN0	41 (44,1)	4	6	10	21	
pN1/2/3	52 (55,9)	5	15	21	11	

Tabelle A18: Assoziation der ACRG-Klassifikation auf mRNA-Ebene mit klinischen Charakteristika in Resektaten nach CTx

Patientencharakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	ACRG Klassifikation				p
		MSI	EMT	TP53 ⁻	TP53 ⁺	
Total	157(100)	11	37	66	43	
Alter, in Jahren	79 (50,3)	3	19	20	37	0,32
Median 62,0 (30,2 – 81,2)	78 (49,7)	8	18	23	29	
Geschlecht						0,01
weiblich	35 (22,3)	1	10	8	16	
männlich	122 (77,7)	10	27	58	27	
Lokalisation						0,05
Proximal	106 (67,5)	7	24	51	24	
Medial	28 (17,8)	3	5	10	10	
Distal	16 (10,2)	1	3	4	8	
Linitis	7 (4,5)	0	5	1	1	
Laurén-Subtypen						< 0,01
Intestinal	94 (59,0)	8	12	43	31	
Nicht-intestinal	63 (40,1)	3	25	23	12	
Grading						0,30
G1/2	29 (18,5)	2	6	9	12	
G3/4	128 (81,5)	9	31	57	31	
Resektionsstatus						0,72
R0	111 (70,7)	9	25	45	32	
R1/2	46 (29,3)	2	12	21	11	
Metastasenstatus						0,14
M0	123 (78,3)	10	27	48	38	
M1	34 (21,7)	1	10	18	5	
Tumorausdehnung						0,02
(y) pT1	7 (4,5)	0	0	2	5	
(y) pT2	13 (8,3)	3	2	4	4	
(y) pT3	85 (54,1)	7	18	41	19	
(y) pT4	53 (33,8)	1	17	19	15	
Lymphknotenstatus						0,74
(y) pN0	38 (24,2)	4	9	14	11	
(y) pN1/2/3	119 (75,8)	7	28	52	32	
Regressionsgrad						0,12
TRG2	78 (49,7)	3	20	38	17	
TRG3	79 (50,3)	8	17	28	26	

Tabelle A19: Assoziation der ACRG-Klassifikation auf Proteinebene mit Patientencharakteristika in Resektaten ohne CTx

Patientencharakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	ACRG Klassifikation					p
		EBV	MSI	EMT	TP53 ⁺	TP53 ⁻	
Total	252 (100)	7	35	24	87	99	
Alter, in Jahren	126 (50)	4	9	14	53	46	<0,01
68,9 (32,1 – 90,9)	126 (50)	3	26	10	34	53	
Geschlecht							0,22
weiblich	172 (68,3)	0	14	10	26	30	
männlich	80 (31,7)	7	21	14	61	69	
Lokalisation							<0,01
Proximal	93 (36,9)	3	13	9	20	48	
Medial	65 (25,8)	4	6	10	24	21	
Distal	77 (30,6)	0	15	2	34	26	
Linitis	13 (5,2)	0	1	2	7	3	
k.A.	4 (1,6)						
Laurén-Subtypen							< 0,01
Intestinal	135 (53,6)	5	22	1	38	69	
Nicht-intestinal	117 (46,4)	2	13	23	49	30	
Grading							0,03
G1/2	64 (25,4)	0	8	0	22	34	
G3/4	187 (74,2)	7	27	24	65	64	
k.A.	1 (0,4)						

Resektionsstatus								
R0	203 (80,6)	7	29	18	70	79	0,68	
R1/2	49 (19,4)	0	6	6	17	20		
Metastasenstatus								
M0	233 (92,5)	7	35	20	83	88	0,06	
M1	19 (7,5)	0	0	4	4	11		
Tumorausdehnung								
(y) pT1	37 (14,7)	2	2	0	18	15	0,06	
(y) pT2	37 (14,7)	1	4	1	14	17		
(y) pT3	119 (47,2)	3	22	12	40	42		
(y) pT4	59 (23,4)	1	7	11	15	25		
Lymphknotenstatus								
(y) pN0	90 (35,7)	3	14	7	42	24	0,01	
(y) pN1/2/3	162 (64,3)	4	21	17	45	75		

Tabelle A20: Assoziation der ACRG-Klassifikation auf Proteinebene mit Patientencharakteristika in Resektaten nach CTx

Patientencharakteristika	Gesamtzahl der Patienten n (%)	ACRG Klassifikation					p
		EBV	MSI	EMT	TP53 ⁺	TP53 ⁻	
Total	283 (100)	16	24	19	90	134	
Alter, in Jahren	141 (50,3)	11	7	13	48	63	0,04
61,1 (28,3 – 81,2)	140 (49,7)	5	17	6	42	71	
Geschlecht							
weiblich	60 (21,2)	1	7	9	28	15	< 0,01
männlich	223 (78,8)	15	17	10	62	119	
Lokalisation							
Proximal	181 (64,0)	6	10	10	54	101	<0,01
Medial	60 (21,2)	8	8	5	20	19	
Distal	32 (11,3)	2	6	2	13	9	
Linitis	10 (3,5)	0	0	2	3	5	
Laurén-Subtypen							
Intestinal	170 (60,0)	9	17	4	49	91	<0,01
Nicht-intestinal	113 (40,0)	7	7	15	41	43	
Grading							
G1/2	44 (15,5)	0	3	0	20	21	0,02
G3/4	181 (64,0)	11	11	15	55	89	
k.A.	58 (20,5)						
Resektionsstatus							
R0	208 (73,5)	15	18	11	65	99	0,21
R1/2	75 (26,5)	1	6	8	25	35	
Metastasenstatus							
M0	228 (80,6)	15	21	14	73	105	0,48
M1	55 (19,4)	1	3	5	17	29	
Tumorausdehnung							
(y) pT1	13 (4,6)	1	1	0	7	4	0,25
(y) pT2	28 (9,9)	2	4	0	11	11	
(y) pT3	161 (56,9)	9	13	11	41	87	
(y) pT4	81 (28,6)	4	6	8	31	32	
Lymphknotenstatus							
(y) pN0	73 (25,8)	6	7	2	25	33	0,42
(y) pN1/2/3	210 (74,2)	10	17	17	65	101	
Regressionsgrad							
TRG2	128 (45,2)	8	4	7	39	70	0,02
TRG3	155 (44,8)	8	20	12	51	64	

Tabelle A21: Assoziation der p53-Proteinexpression mit dem MSI-L-, MSI-H- und EBV-Status in den Patientenkollektiven

Kollektiv	Patientencharakteristika	Gesamtzahl		Subgruppen			p
		n (%)	EBV	MSI-L	MSI-H	MSS	
Alle Resektate	Total	521	20	23	53	425	
	p53						
	WT	261 (50)	16	6	48	191	<0,01
	OE	195 (37)	4	15	4	172	
	CA	65 (13)	0	2	1	62	
	p53						
WT/OE/CA	261 (50)	16	6	48	191	<0,01	
OE/CA	260 (50)	4	17	5	234		
Resektate vor CTx	Total	244 (100)	6	11	30	197	
	p53						
	WT	134 (55)	5	2	29	98	<0,01
	OE	83 (34)	1	8	0	74	
CA	27 (11)	0	1	1	25		

	p53							
	WT	134 (55)	5	2	29	98	<0,01	
	OE/CA	110 (45)	1	9	1	99		
Resektate nach CTx	Total	277	14	12	23	228		
	p53							
	WT	127 (46)	11	4	19	93	<0,01	
	OE	112 (40)	3	7	4	98		
	CA	38 (14)	0	1	0	37		
	p53							
	WT	127 (46)	11	4	19	93	<0,01	
	OE/CA	150 (54)	3	8	4	135		
Biopsien vor CTx	Total	100 (100)	5	4	12	79		
	p53							
	WT	50(50)	5	0	6	39	0,07	
	OE	41 (41)	0	4	6	33		
	CA	7 (7)	0	0	0	7		
	p53							
	WT	50 (50)	5	0	6	39	0,03	
	OE/CA	48 (48)	0	4	6	40		

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert

Kohlruss M*, Grosser B*, Krenauer M, Slotta-Huspenina J, Jesinghaus M, Blank S, Novotny A, Reiche M, Schmidt T2, Ismani L, Hapfelmeier A, Mathias D, Meyer P, Gaida MM, Bauer L, Ott K, Weichert W, Keller G. Prognostic implication of molecular subtypes and response to neoadjuvant chemotherapy in 760 gastric carcinomas: role of Epstein Barr virus infection and high and low microsatellite instability. J Pathol Clin Res. 2019; 5(4):227-239.

*geteilte Erstautorenschaft

Teile dieser Arbeit wurden präsentiert

Vorträge

Grosser B, Bauer L, Slotta-Huspenina J, Jesinghaus M, Kohlruss M, Reiche A, Novotny A, Steiger K, Weichert W, Keller G. The molecular ACRG classification and prognosis in gastric cancer.

102. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 2018, 24.-26.05.2018, Berlin.

Posterpräsentationen

Grosser B, Bauer L, Reiche M, Slotta-Huspenina J, Jesinghaus M, Novotny A, Hapfelmeier A, Weichert W, Keller G. Gene expression of EMT and p53 activity markers and prognosis in gastric cancer.

101. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 2017, 22.-24.06.2017, Erlangen.

Danksagungen

Ich möchte mich bei jedem bedanken, der mir auf die eine oder andere Art geholfen hat, diese Arbeit fertigzustellen.

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. rer. nat. Gisela Keller, die mich mit ihrem Fachwissen, ihrer Genauigkeit und ihrer Leidenschaft für die Wissenschaft durch diese Promotion geführt hat. Ich bin ehrlich dankbar für alle Ratschläge, Ideen, und die kontinuierliche Betreuung.

Ich möchte mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der „AG-Keller“ bedanken. Ein herzliches Dankeschön an Lukas Bauer für die Einführung in die Laborarbeit und die Unterstützung bei den qPCR-Analysen. Ohne seine Vorarbeiten, die Zusammenstellung der Patientenkollektive und RNA-Extraktionen zusammen mit Magdalena Reiche wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. Besonders möchte ich mich bei Meike Kohlruf bedanken, nicht nur für die gemeinsame Datenerhebung und die kurzweilige Zeit im Labor, sondern vor allem für die schönen Momente außerhalb des Instituts.

Ich möchte mich außerdem bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie für ihre Unterstützung bedanken. Vielen Dank an PD Dr. med. Julia Slotta-Huspenina und PD Dr. med. Moritz Jesinghaus für die Hilfe bei den immunhistochemischen Auswertungen, an Dr. med. vet. Katja Steiger für die Möglichkeit, die immunhistochemischen Färbungen auf dem Ventana Autostainer zusammen mit Petra Meyer durchführen zu können. Ein herzliches Dankeschön auch an Susanne Plaschke und Daniela Angermeier, die mir im Labor stets eine große Hilfe waren.

Herrn Prof. Dr. med. Wilko Weichert, an dessen Institut ich diese Promotion durchführen durfte, danke ich für die freundliche Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Ein besonderes Dankeschön geht an meine Großeltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung, die mir von unschätzbarem Wert ist.