

Aus der I Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

**Analyse von CXCR4 in einem
Subkollektiv der randomisierten weltweiten
EXPAND-Studie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Anna Bartmann
aus Aschaffenburg

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter

[REDACTED]

2. Gutachter

[REDACTED]

Tag der Promotion

07.12.2021

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG UND ZIEL DER DISSERTATION	1
2 LITERATURDISKUSSION	2
2.1 MAGENKARZINOME	2
2.1.1 Grundlagen und Epidemiologie	2
2.1.2 Lokalisation	4
2.1.3 Ursachen und Risikofaktoren	5
2.1.4 Morphologie	7
2.1.5 Metastasierungswege	9
2.1.6 Klinik.....	10
2.1.7 Diagnose und Staging.....	10
2.1.8 Stadieneinteilung.....	12
2.1.9 Therapie	14
2.1.10 Prognose und Nachsorge.....	21
2.2 MONOKLONALER ANTIKÖRPER CETUXIMAB	23
2.3 VORSTELLUNG DER EXPAND-STUDIE	26
2.4 MEMBRANREZEPTOR CXCR4.....	28
2.4.1 Physiologische Eigenschaften.....	28
2.4.2 Tumorspezifische Eigenschaften.....	30
3 MATERIAL UND METHODEN	32
3.1 MATERIALIEN	32
3.2 METHODEN	33
3.2.1 Vorbereitung der Proben-Epitop-Demaskierung	33
3.2.2 Immunhistochemische Färbung	34
3.2.3 Mikroskopische Auswertung.....	36
3.2.4 Statistische Auswertung und Datenanalyse	37
4. ERGEBNISSE:	41
4.1 VORSTELLUNG SUBKOLLEKTIV	42
4.2 FÄRBUNG.....	47

4.3 ABHÄNGIGKEIT DER CXCR4 EXPRESSION VON EIGENSCHAFTEN DES PATIENTEN UND DES TUMORS	53
4.3.1 <i>Patientenspezifische Eigenschaften</i>	54
4.3.2 <i>Tumorspezifische Eigenschaften</i>	55
4.4 GESAMTÜBERLEBEN SUBKOLLEKTIV UND CXCR4	59
5. DISKUSSION	65
5.1. VERGLEICH DES SUBKOLLEKTIVS MIT DEM GESAMTKOLLEKTIV DER EXPAND STUDIE	65
5.2 MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN SCHNITTE.....	65
5.2.1 <i>Auswirkungen der Abhängigkeit der CXCR4-Expression und der Art des pathologischen Präparates</i>	66
5.2.2 <i>Auswirkung der Festlegung der Positivkriterien auf die Rate an positiven Schnitten</i>	66
5.3 AUSWIRKUNGEN DER EXPERIMENTELLEN THERAPIE MIT CETUXIMAB AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN DES SUBKOLLEKTIVS ABHÄNGIG VON DER CXCR4 EXPRESSION	68
5.4 DER MEMBRANREZEPTOR CXCR4 ALS BIOLOGISCHER PROGNOSEMARKER BEIM MAGENKARZINOM.....	69
5.4.1 <i>Abhängigkeit von der Laurén-Klassifikation</i>	70
5.4.2 <i>Abhängigkeit zur M-Klassifikation</i>	71
5.4.3 <i>Abhängigkeit der T-Klassifikation</i>	71
5.4.4 <i>Abhängigkeit der N-Klassifikation</i>	72
5.4.5 <i>Abhängigkeit der anatomischen Lokalisation der Karzinome</i>	73
5.5 EINSATZ VON IMMUNCHECKPOINTINHIBITOREN BEIM ADENOKARZINOM DES MAGENS	74
5.5.1 <i>Möglicher Einfluss der Expression von CXCR4 auf das körpereigene Immunsystem</i>	76
6 ZUSAMMENFASSUNG	79
7 LITERATURVERZEICHNIS	82
8 ANHANG :	87
9 DANKSAGUNG	90
10 LEBENSLAUF	90

Abkürzungsverzeichnis

AEG	Adenokarzinom des ösophagealen Übergangs
BSC	Best supportive care
CT	Systemische Chemotherapie mit Cisplatin und Capecitabin
CTX	Systemische Chemotherapie mit Cisplatin und Capecitabin und zusätzlich Cetuximab
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CPI	Immuncheckpointinhibitoren
ESD	Endoskopische Submukosadisektion
HER-2	Epidermaler Wachstumsfaktor
HNPCC	Hereditäres non polypöses colorektales Karzinom (Lynch-Syndrom)
HR	Hazard Ration
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitoren
KI	Konfidenzintervall
LK	Lymphknoten
NA	Nicht klassifiziert (Not Available)
OS	Gesamtüberleben (overall survival)
ÖGD	Ösophagus-Gastro-Duodenoskopie
RCT	Radiochemotherapie
S-1	(enthält Tegafur, Gimeracil und Oteracil Kalium)
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
PFS	Progressionsfreies Überleben (Progression free survival)
TGF	Transforming growth factor
5-FU	5-Fluoruracil
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs
V	Assoziationskoeffizient Cramer-V
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen in Deutschland des Jahres 2016 (ohne nicht melanotischen Hautkrebs) (1)	3
Abbildung 2: Anatomie des Magens (6)	4
Abbildung 3: Therapievorgehen in Abhängigkeit von TNM- und UICC-Klassifikation;	15
Abbildung 4: Einteilung der Lymphknotengruppen (nach: Japanese Research Society gastric cancer (E. Wenzl, #122)),	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des EGFR-Antikörpers Cetuximab	24
Abbildung 6: EXPAND Studie: Beurteilung Progressionsfreies Überleben (A), Gesamtüberleben (B) (5).....	27
Abbildung 7: Ablauf: Prozess der Rehydrierung bei einer immunhistochemischen Färbung;.....	33
Abbildung 8: Flowchart: Einzelne Prozessschritte der immunhistochemischen Färbung von CXCR4 im Dako Autostainer (48).....	35
Abbildung 9: Formel zur Berechnung des Chi-Quadrat-Wertes aus einer Kreuztabelle (49).....	38
Abbildung 10: Formel zur Berechnung des Freiheitsgrades im Chi-Quadrat Test (49)	38
Abbildung 11: Versuchsaufbau;.....	41
Abbildung 12: Positivkontrolle der immunhistochemischen Färbung des CXCR4-Membranrezeptors bei humanen Hepatozyten (200-fache Vergrößerung)	47
Abbildung 13: Negativkontrolle der CXCR4-Färbung eines Tumorschnittes der EXPAND-Studie, Tumorzellen zeigen typische pleomorphe große Nukleoli, keine immunhistochemische braune Anfärbung der Zellmembranen oder der Zellen zu erkennen, bei den minimalen bräunlichen Anfärbungen handelt es sich um Artefakte (100-fache Vergrößerung)	47
Abbildung 14: A: Tumor mit negativer Expression des CXCR4-Membranrezeptors, aber Auftreten von Immunzellinfiltraten in der Nähe des Tumors mit Expression des CXCR4-Membranrezeptors auf der Oberfläche der Immunzellen. (100-fache Vergrößerung) B: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung A.....	48

Abbildung 15: Tumorschnitte mit positiv exprimierenden Tumoren der Stärke 1-3; A: Tumor CXCR4 positiv Expressionsstärke 1 (unter 10% aller Tumorzellen des Präparates weisen eine Membranfärbung auf) (100-fache Vergrößerung); B: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung A; Membranfärbung der CXCR4 exprimierenden Tumorzellen C: Tumor CXCR4 positiv Expressionsstärke 2 (10-50% aller Tumorzellen des Präparates weisen eine Membranfärbung auf) (100-fache Vergrößerung); D: Tumor CXCR4 positiv Expressionsstärke 3 (mehr als 50% aller Tumorzellen des Präparates weisen eine Membranfärbung auf) (200-fache Vergrößerung)	49
Abbildung 16: CXCR4-Expression des Tumors aufgeteilt nach der anatomischen Lage des Tumors;	59
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve, Gesamtüberleben des Subkollektivs abhängig von der CXCR4-Expression des Tumors (Insgesamt 459 Patienten eingeschlossen)	60
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurven abhängig von der Expression von CXCR4; A: Bei Leitlinientherapie (Insgesamt 220 Patienten eingeschlossen: CXCR4 positiv=16 ;CXCR4 negativ=204); B: Bei Experimentalthherapie mit Cetuximab (Insgesamt 234 Patienten eingeschlossen: CXCR4 positiv=21; CXCR4 negativ=21);	61
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit des Auftretens von Immuzellinfiltraten in der Nähe der Tumorzellen; Legende: grün: Immuzellinfiltrate vorhanden (Anzahl der Patienten=126); blau: keine Immuzellinfiltrate nachweisbar (Anzahl der Patienten=333).....	62
Abbildung 20: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit des Auftretens von Immuzellinfiltraten in der Nähe der Tumorzellen mit zusätzlicher Expression von CXCR4 auf der Oberfläche der Immuzellen	63
Abbildung 21: Kaplan-Meier Kurve in Abhängigkeit des Auftretens von Immuzellen mit gleichzeitiger Expression von CXCR4; A: Bei CXCR4 negativem Tumor (Insgesamt=420; Immuzellinfiltrate CXCR4 positiv=54; Immuzellinfiltrate CXCR4 negativ=366); B: Bei CXCR4 positivem Tumor (Insgesamt=37; Immuzellinfiltrate CXCR4 positiv=12; Immuzellinfiltrate CXCR4 negativ=25);	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Siewert Klassifikation der Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs (AEG) (7)	5
Tabelle 2: Laurén -Klassifikation der Adenokarzinome (7, 8)	8
Tabelle 3: TCGA Einteilung der Magenkarzinome(13)	9
Tabelle 4 TNM-Klassifikation des Adenokarzinoms des Magens (UICC, 2010)(7)....	13
Tabelle 5: Kriterien für die Indikationsstellung einer endsokopischen Submukosadisektion (ESD) bei Magenfrühkarzinomen	16
Tabelle 6: 5-Jahres-Überlebensrate bei Magenfrühkarzinome (7)	22
Tabelle 7: Lösungen und Puffer zur Herstellung der immunhistochemischen Färbungen von CXCR4	32
Tabelle 8: Kriterien der mikroskopischen Auswertung zur Kategorisierung der Präparate als CXCR4 positiv.....	36
Tabelle 9: Einteilung der Stärke der Expression von CXCR4.....	37
Tabelle 10: Deskriptive Bewertung des Assoziationskoeffizienten Cramers-V (51) ..	39
Tabelle 11: Deskriptive Auswertung der Randomisierungsparameter der EXPAND-Studie im Subkollektiv und aufgeteilt nach Behandlungsarmen	42
Tabelle 12: Deskriptive Auswertung der patientenspezifischen Eigenschaften im Subkollektiv und aufgeteilt nach Behandlungsarmen	43
Tabelle 13: Deskriptive Auswertung der tumorspezifischen Eigenschaften im Subkollektiv und aufgeteilt nach Behandlungsarmen	45
Tabelle 14: Deskriptive Auswertung der anatomischen Lage der Karzinome im Subkollektiv und aufgeteilt nach Behandlungsarmen	46
Tabelle 15: Deskriptive Auswertung des Stärkegrades der Expression von CXCR4 im Tumor, dargestellt im Subkollektiv und aufgeteilt nach Behandlungsarmen	50
Tabelle 16: Kreuztabelle: Art des pathologischen Präparates und CXCR4 Expression des Tumors	51
Tabelle 17: Deskriptive Auswertung des Auftretens von Immunzellinfiltraten in der Nähe des Tumors: im Subkollektiv und aufgeteilt nach Behandlungsarmen.....	51
Tabelle 18: Kreuztabelle: Auftreten von Immunzellinfiltraten mit CXCR4-Expression in der Nähe des Tumors und CXCR4-Expression des Tumors	52
Tabelle 19: Kreuztabelle: Untersuchung im Subkollektiv (Auftreten von Immunzellinfiltraten Anzahl=126) Expression von CXCR4 in den Immunzellen und der Expression von CXCR4 im Tumor	52

Tabelle 20: Kreuztabelle CXCR4-Expression des Tumors in Abhängigkeit zum Geschlecht	54
Tabelle 21: Kreuztabelle CXCR4-Expression in Abhängigkeit zum Alter (gruppiert in Patienten unter 65 Jahren und Patienten über 65 Jahren).....	54
Tabelle 22: Kreuztabelle CXCR4-Expression des Tumors und Herkunft der Patienten	54
Tabelle 23: Auswertung Chi-Quadrat-Test mit zugehörigen p-Wert und dem Assoziationskoeffizienten Cramers-V sowie die p-Werte des exakten Tests nach Fisher bei den Patientenspezifischen Eigenschaften Geschlecht, Alter und Herkunft.....	55
Tabelle 24: Kreuztabelle T-Klassifikation mit CXCR4-Expression des Tumors.....	56
Tabelle 25: Kreuztabelle N-Klassifikation des Tumors und CXCR4-Expression des Tumors	56
Tabelle 26: Kreuztabelle M-Klassifikation des Tumors und CXCR4-Expression des Tumors	57
Tabelle 27: Kreuztabelle: Grading des Tumors und CXCR4-Expression des Tumors	57
Tabelle 28: Kreuztabelle: Laurén-Klassifikation des Tumors und CXCR4-Expression des Tumors	57
Tabelle 29: Kreuztabelle anatomische Lage des Karzinoms und CXCR4-Expression des Tumors	58
Tabelle 30: Klassifikation der Tumorstadien nach UICC-Stadien (71).....	87
Tabelle 31: Erweiterte Kriterien zur Durchführung einer ESD bei Magenfrühkarzinomen (10)	87
Tabelle 32: Weitere alternative Therapieregime der perioperativen Therapie bei Magenkarzinomen, (10)	88
Tabelle 33: Regressionsgrading nach Becker (72) (10)	89
Tabelle 34: Auflistung der kritischen Werte des Qui-Quadrat Testes auf einem Signifikanzniveau von 5%, abhängig von den Freiheitsgraden; Legende: d_f = Freiheitsgrad des Qui- Quadrat Testes(73).....	89

1 Einleitung und Ziel der Dissertation

Das Magenkarzinom und das Karzinom des gastroösophagealen Übergangs zählen zu den schwerwiegendsten und häufigsten Karzinomarten weltweit. Es handelt sich dabei um eine bösartige Neubildung der Zellen des Magens und der Speiseröhre. Vor dem Hintergrund der aktuellen Behandlungsmöglichkeiten bleibt die Prognose eher ungünstig. In Deutschland beträgt die 5-Jahres-Überlebensraten im Durchschnitt für Männer 32% und für Frauen 34% (1). Weltweit konnte im Jahre 2018 sogar jeder zwölfte Krebstote auf ein Magenkarzinom zurückgeführt werden (2, 3).

Aufgrund der hohen Zahl der Erkrankungs- und der damit einhergehenden Todesfälle nimmt die Entwicklung neuartiger Therapieansätze einen hohen Stellenwert in der onkologischen Forschung ein. Dafür versuchen verschiedenste Forschungsgruppen weltweit die pathologischen Zusammenhänge der Tumorentstehung sowie Überlebens- und Proliferationsmechanismen der Tumore zu verstehen. Dazu gehört auch die Erforschung des CXCR4 Membranrezeptors. Dieser ist ein transmembranöses Rezeptorprotein aus der Familie der Chemokinrezeptoren, das vermehrt auf Stamm-, Immun- und Tumorzellen exprimiert wird. Dieser Rezeptor soll mit der Proliferation und der Metastasierung der Tumorzellen in Verbindung stehen (4). Solches Wissen könnte sowohl zur Prävention der Erkrankung als auch zur Entwicklung neuartiger Therapieansätze verwendet werden. Neben der Entwicklung von neuartigen Tumortherapien werden auch Therapievarianten, die bei anderen Tumorentitäten zum Einsatz kommen, auf eine Wirksamkeit beim Magenkarzinom untersucht. Dazu zählt der monoklonale Antikörper Cetuximab, der unter anderem bei der Behandlung des Kolonkarzinoms eingesetzt wird. Die weltweit durchgeführte Phase III EXPAND-Studie untersuchte den Effekt des Einsatzes von Cetuximab in Kombination mit der Standardchemotherapie beim Magenkarzinom. Die Studie wies im gesamten Studienkollektiv keinen signifikanten Vorteil des progressionsfreien Überlebens (PFS) beim zusätzlichen Einsatz des Antikörpers zur Leitlinientherapie nach (5).

Zielsetzung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird das Patientenkollektiv der Phase-III-EXPAND-Studie auf die Expression des Membranrezeptors CXCR4 und dessen Einfluss auf das Gesamtüberleben hinsichtlich der Behandlung mit und ohne Cetuximab untersucht. Dafür werden 504 Präparate der EXPAND-Studie auf die Expression des CXCR4 Membranrezeptors mittels immunhistochemischer Färbung analysiert. Anschließend wird die Haupthypothese, dass die Expression des Membranrezeptors keinen Unterschied sowohl im Gesamtüberleben des gesamten Subkollektivs als auch in die Behandlungsarme aufgeteilt zeigt, untersucht. Die Nebenhypothese hinterfragt, inwiefern die Expression von CXCR4 als biologischer Marker für eine prognostische Aussage verwendet werden kann. Zusätzlich wird das Gesamtüberleben von Patienten, die eine Expression des CXCR4 in möglichen Immunzellinfiltraten in der Umgebung der malignen Zellen zeigen, betrachtet.

2 Literaturdiskussion

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich zunächst mit der Darstellung der wissenschaftlichen Grundlage des Magenkarzinoms und der aktuellen leitliniengerechten Therapie. Anschließend werden die Therapiemöglichkeit mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab und die EXPAND-Studie vorgestellt. Diese untersuchte den Effekt des Einsatzes von Cetuximab beim Magenkarzinom. Das letzte Kapitel beschäftigt sich mit dem Membranrezeptor CXCR4. Dabei wird sowohl auf die physiologischen Eigenschaften des Rezeptors, sowie dessen Funktion bei malignen entarteten Zellen eingegangen.

2.1 Magenkarzinome

2.1.1 Grundlagen und Epidemiologie

Trotz insgesamt rückläufiger Inzidenzraten ist der Magentumor das fünfthäufigste diagnostizierte Karzinom der Welt und führt am dritthäufigsten zum Tode. Im Jahr 2018 wurden weltweit über 1.000.000 Neuerkrankungen registriert. Die Inzidenz der Männer beträgt dabei 15,7:100.000, bei Frauen 7:100.000 Menschen. 783.000 Menschen verstarben 2018 an einem Magenkarzinom (2, 3). Aus Abbildung 1 wird ersichtlich,

dass in Deutschland im Jahr 2016 das Magenkarzinom bei Männern mit 3,6% die achthäufigste und bei Frauen mit 2,5% die zehnthäufigste Tumorlokalisation war (1).

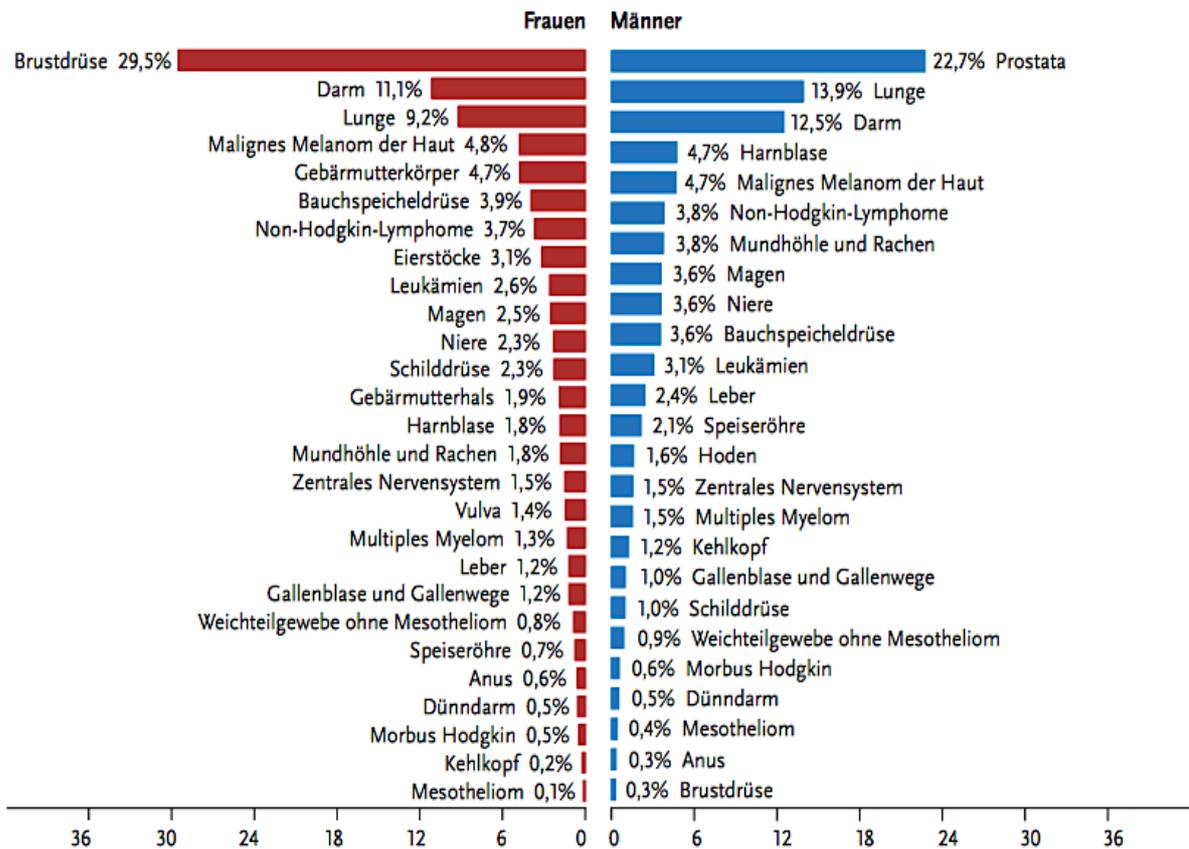


Abbildung 1 Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen in Deutschland des Jahres 2016 (ohne nicht melanotischen Hautkrebs) (1)

Global liegt das Durchschnittsalter der Erkrankung jenseits des 50. Lebensjahr (2). Männer erkranken in Deutschland durchschnittlich mit 72 Jahren und Frauen mit 76 Jahren (1). Neben dem Alter spielen auch das Geschlecht und die Herkunft der Patienten eine entscheidende Rolle. So konnte für Männer ein zweifach höheres Erkrankungsrisiko als bei Frauen nachgewiesen werden. Weiterhin lassen sich regionale Unterschiede in der Inzidenz des Magenkarzinoms feststellen. Während in West-Asien das Magenkarzinom zu den häufigsten Todesursachen unter den Krebserkrankungen zählt, weisen Amerika, Europa und Afrika weitaus geringere Fallzahlen auf. Die höchste Inzidenz hat dabei, unabhängig vom Geschlecht, die Republik von Korea (3).

2.1.2 Lokalisation

Die Adenokarzinome sind maligne epitheliale Tumore, die aufgrund ihrer anatomischen Lage in Karzinome des gastroösophagealen Übergangs (AEG) und Magenkarzinome unterteilt werden. Die

Abbildung 2 zeigt die für die Klassifikation essentielle Anatomie des Magens.

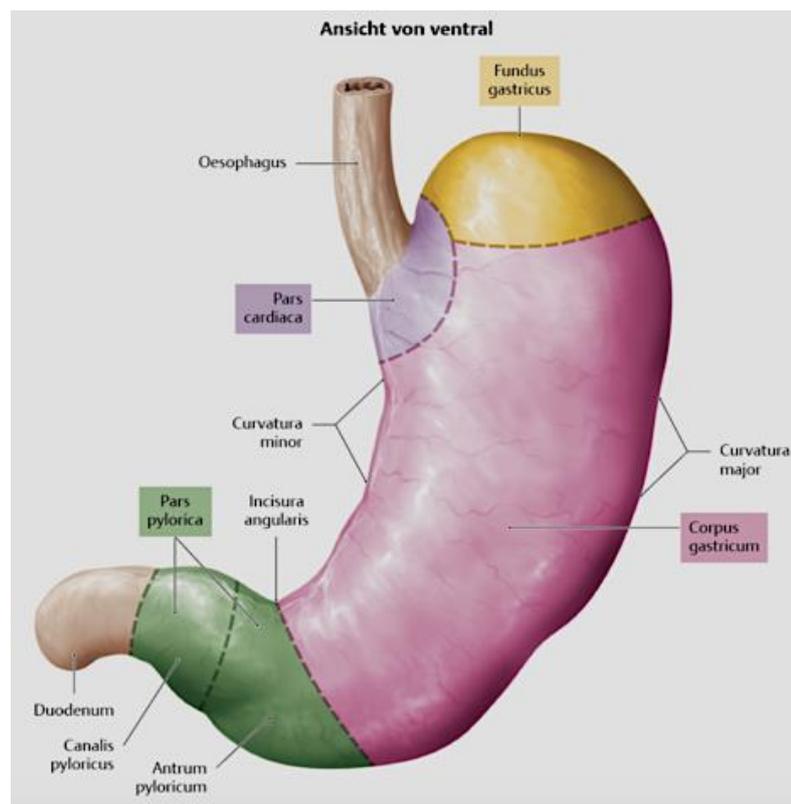


Abbildung 2: Anatomie des Magens (6)

Zu 25% kommen die Tumore im gastroösophagealen Übergang vor und gehören damit zu den Kardia Karzinomen. Da diese je nach konkreter anatomischer Lage zum Mageneingang, verschiedene Entitäten aufweisen und therapeutische Vorgehensweisen bedürfen, werden sie anhand der Siewert Klassifikation nochmals in AEG Tumore I-III unterteilt. Dies wird in Tabelle 1 veranschaulicht.

Tabelle 1: Siewert Klassifikation der Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs (AEG) (7)

Siewert Klassifikation	Anatomische Lage zur Kardia
AEG I	Tumorzentrum zwischen 1cm bis 5cm oral der Kardia.
AEG II	Tumorzentrum zwischen 1cm oral und bis zu 2cm aboral der Kardia
AEG III	Tumorzentrum zwischen 2cm bis 5cm aboral der Kardia

AEG I Tumore befinden sich am weitesten kranial in der Speiseröhre, bis zu 5cm oral zur Kardia. Sie entstehen häufig aus einem Barrett Ösophagus bei Reflux Anamnese und werden daher auch als Barrett-Karzinom bezeichnet. Etwas kaudaler wachsen die AEG II Tumore. Angesichts der direkten Lage zum Mageneingang werden sie die klassischen Kardiakarzinome genannt. Subkardial, im proximalen Anteil des Magens, wachsen die AEG III Tumore mit einem Tumorzentrum von bis zu 5cm aboral der Kardia.

Die Adenokarzinome des Magens liegen im mittleren bis distalen Anteil des Gasters. Am häufigsten sind mit 35% das Antrum und der Pylorus betroffen. Danach folgt die kleine Kurvatur mit 30% und übrige Lokalisationen mit 10% (2, 7). Während die Inzidenz der mittleren und distalen Karzinome sinkt, steigt die Anzahl der Neuerkrankungen im proximalen Magen an (1, 3).

Differentialdiagnostisch treten neben dem Adenokarzinom noch weitere Tumorentitäten im Magen auf. Dazu gehören die Non-Hodgkin Lymphome (MALT-Lymphome) oder mesenchymale Tumore wie die gastrointestinalen Stromatumore (GIST-Tumore) und neuroendokrine (NET-) Tumore. Raritäten stellen dabei die Leiomyosarkome, Lipome und Fibrome dar (7, 8).

2.1.3 Ursachen und Risikofaktoren

Die Genese des Magenkarzinoms ist aller Wahrscheinlichkeit nach multifaktoriell. Als einer der wichtigsten Risikofaktoren gilt die Infektion mit *Helicobacter pylori*. Eine jahrelange Besiedlung mit *H. pylori* verursacht eine asymptomatische chronische Gastritis (9). Bei manchen Patienten ist die Erkrankung progredient. Es entwickelt sich eine atrophische Gastritis und eine intestinale Metaplasie, die sich im Verlauf, wiederum bei einem Teil der Patienten, zu einem Magenkarzinom entwickeln kann.

Das Risiko wird aber zusätzlich von Wirts-, Umwelt und Virulenzfaktoren beeinflusst. Somit ist die Infektion mit *H. pylori* und die damit einhergehende chronische Entzündung die Grundvoraussetzung der Karzinomentstehung, die durch die weiteren Risikofaktoren modifiziert werden kann. Dies betrifft insbesondere die Karzinome des Corpus und des Antrums, die zu 89% auf eine Infektion mit *H. pylori* zurückgeführt werden. Daneben weisen auch über 90% der Magenfrühkarzinome eine *H.pylori*-Gastritis (HP-Gastritis) auf. Es konnte weiterhin ein Zusammenhang mit der Karzinogenese von AEG III Tumoren nachgewiesen werden. Bei AEG I-II gilt *H. pylori* nicht als der Hauptrisikofaktor. Trotz dieses Zusammenhangs wird in Deutschland eine Eradikationstherapie von *H. pylori* nur bei Risikopatienten empfohlen (10).

Neben der bakteriellen Infektion können auch virale Erreger, wie das Epstein-Barr-Virus und eine Autoimmungastritis Typ A das Risiko der Karzinomentstehung im Magen erhöhen.

Weiterhin wird das Erkrankungsrisiko auch von folgenden Faktoren beeinflusst. Adenomatöse Magenpolypen können in 20% der Fälle zu einem malignen Tumor mutieren. Daneben steigt die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung 15 bis 20 Jahre nach einer vorangegangenen Magenteilresektion an. Zuletzt geht auch die Erkrankung des M. Menetriers, der sogenannten Riesenfaltengastritis mit einem Entartungsrisiko von 10% einher (7).

Andere Risikofaktoren sind, wie schon bei der statistischen Verteilung der Erkrankungen erwähnt, das Alter, das Geschlecht und die Herkunft der Patienten. Daneben erhöht auch der niedrige soziale Status sowie Konsum von Alkohol und Tabak die Erkrankungswahrscheinlichkeit (7).

Ein weiteres wichtiges Gebiet ist die Ernährung. So gelten der Verzehr von nitratreicher Nahrung, insbesondere gesalzene und gepökelte Speisen, als Tumor begünstigend, während eine mediterrane Ernährung mit Obst, Gemüse und Vitamin C protektiv sein soll (2, 7).

Neben ausgewählten Nahrungsmitteln gilt auch die Adipositas, bei einem BMI über 25, als für die Entstehung von Kardiakarzinome förderlich. Es zeigt sich eine scheinbare kontinuierliche Zunahme des Risikos mit steigendem BMI. Dieser Zusammenhang konnte allerdings nur für die Kardiakarzinome, nicht aber für distale Magenkarzinome, signifikant gezeigt werden (10).

Neben der Nahrungsmittelaufnahme können auch Erkrankungen, die in Zusammenhang mit der Ernährung, wie beispielsweise der Reflux von Magensäure in den Ösophagus, ein Hauptrisikofaktor zur Entstehung eines AEG Typ I darstellen (2). Dabei kommt es bei anhaltender Reflux Anamnese in etwa 5% der Fälle zu einer Metaplasie der Schleimhaut, dem sogenannten Barrett-Oesophagus, der sich im Verlauf zu einem Adenokarzinom entwickeln kann (7). Eine Assoziation des gastroösophagealen Refluxes und des Auftretens eines Adenokarzinoms konnte auch bei den AEG Typ II und III gezeigt werden (10). Neben dem Reflux der Magensäure in den Ösophagus kann ebenfalls ein duodenaler Reflux der Gallensäuren in den Magen auftreten. In einer Studie konnte ein Zusammenhang der Schweregrade des Gallerefluxes mit der Progression der gastralen mukosalen Schädigungen gezeigt werden (11). Dabei besitzen besonders die Gallensalze kanzerogene Eigenschaften, indem sie unspezifische Schädigungen der DNA und der Zellmembranen, aufgrund erhöhter Belastung mit Sauerstoffradikalen, hervorrufen (10, 12).

Weiterhin zeigt sich ein zwei bis dreifach erhöhtes Risiko ein Magenkarzinom zu entwickeln, wenn ein Verwandter 1.Grades daran erkrankt ist. Daher ist davon auszugehen, dass die genetische Disposition eine wichtige Rolle spielt. Dabei konnten zwei Mutationen entdeckt werden, die zusammen mit einer familiären Häufung des Magenkarzinoms auftreten. Zunächst kann eine CDH1-Keimbahnmutation vorliegen, die mit einem hereditären diffusen Magenkarzinom vergesellschaftet ist. Die zweite Untergruppe stellt das Lynch-Syndrom dar. Bei dieser Erkrankung liegt eine Mikrosatelliteninstabilität vor, die ebenfalls das Risiko der Entwicklung eines Magenkarzinoms erhöht (13). Davon unabhängig gibt es weitere hereditäre Erkrankungen, wie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das Peutz-Jegher-Syndrom und das Li-Fraumeni-Syndrom, welche mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Magenkarzinomen einhergehen (7). Als weiterer genetischer Risikofaktor gilt neben dem männlichen Geschlecht die Blutgruppe A (10).

2.1.4 Morphologie

Magenkarzinome werden nach makroskopischen und mikroskopischen Eigenschaften weiter klassifiziert. Dabei wird zunächst die Ausbreitung der Karzinome betrachtet. Es wird dabei zwischen den Magenfrühkarzinomen und den fortgeschrittenen Tumoren unterschieden. Magenfrühkarzinome zeigen ein beschränktes Wachstum auf der

Mukosa und Submukosa der Magenschleimhaut. Aufgrund des weniger stark infiltrierenden Wachstums kommt es seltener zu einer lymphogenen Metastasierung und somit zu einer prognostisch günstigeren 5-Jahres-Überlebensrate. Sollte das Wachstum die Submukosa überschreiten, spricht man von einem fortgeschrittenen Karzinom. Makroskopisch können die Tumore auch hinsichtlich ihrer Wachstumsform nach der Borrmann-Klassifikation in polypös, schlüsselförmig-ulzerierend, ulzerierend-infiltrativ und diffus infiltrierend eingeteilt werden (8).

Bei der mikroskopischen Einteilung werden die Magentumore zunächst histologisch, nach ihrem Ursprungsgewebe, unterteilt. Dazu zählen die Adenokarzinome, die aus dem Epithel und damit dem drüsenbildenden Gewebe hervorgehen. Daneben kommen auch seltener die Plattenepithelkarzinome, das adenosquamöse Karzinom, sowie kleinzellige und undifferenzierte Karzinome vor.

Das Adenokarzinom wird nach der WHO nochmals in papillär, tubulär, muzinös und das Siegelzellringkarzinom unterteilt. Weiterhin kann eine Unterscheidung, aufgrund seines Wachstumsmusters in die Laurén-Klassifikation, die in Tabelle 2 beschrieben wird, vorgenommen werden. Diese Einteilung ist für die Festlegung des Ausmaßes des Resektionsverfahrens relevant (8).

Tabelle 2: Laurén -Klassifikation der Adenokarzinome (7, 8)

Intestinaler Typ	Ausbildung drüsiger Strukturen, Schleimproduktion, polypöses Wachstum, gut begrenzt
Diffuser Typ	Ausbildung entdifferenziertes Gewebe, unscharfe Begrenzungen, diffus infiltrierendes Wachstum, schlechtere Prognose
Gemischter Typ	Abschnitte mit diffusen und intestinalen Wachstumsmustern nachweisbar

Außerdem geht das diffuse Wachstumsmuster, im Gegensatz zum intestinalen, mit einer frühen lymphogenen Metastasierung und dadurch mit einer schlechteren Prognose einher. Daher ist die Behandlung auch mit einem höherem Resektionsausmaß vergesellschaftet. Aufgrund des schlechteren Verlaufs wird beim

gemischt wachsenden Typ ebenfalls die Behandlungsstrategie von diffusen Karzinomen angewendet (8).

In neueren Studien werden die Magenkarzinome aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften nach der TCGA (Tumor Cancer Genome Atlas) eingeteilt. Dabei werden Untersuchungsergebnisse des Genoms, Transkriptoms, Epigenoms und Proteoms eingeschlossen. Danach werden Magenkarzinome in folgende vier Untergruppen unterteilt (

Tabelle 3):

Tabelle 3: TCGA Einteilung der Magenkarzinome(13)

1. Epstein-Barr-Virus assoziierte-EBV
2. Chromosomal instabile-CIN
3. Mikrosatelliten instabil- MSI
4. Genomisch stabil-GS

Diese Unterteilung hat im Moment noch keinen Einfluss auf die Therapieentscheidung. Allerdings soll diese für Studien mit neuen Target Therapien genutzt werden und somit helfen eine individuelle Therapie der Karzinome zu entwickeln (13).

2.1.5 Metastasierungswege

Die Metastasierung des Adenokarzinoms kann auf fünf verschiedenen Wegen erfolgen. Eine Frühmetastasierung tritt überwiegend lymphogen in die regional anliegenden Lymphknoten auf. Selten, aber pathognomisch für das Magenkarzinom kommt es zur Schwellung des Virchow-Lymphknotens, supraclaviculär links. Später metastasiert das Magenkarzinom auch hämatogen. Hierbei sind besonders Leber und Lunge sowie Knochen und Hirn betroffen. Kontinuierlich, also per continuatam, breitet sich das Karzinom in Ösophagus, Duodenum, Kolon und Pankreas aus. Über direkten Kontakt kann es per contingentatem zu einer Peritonealkarzinose und Aszites kommen. Eine besondere Art der Metastasen des Magenkarzinoms stellt der sogenannte Krukenbergtumor, eine Abtropfmetastase in die Ovarien oder des Douglasraumes, dar (7, 8).

2.1.6 Klinik

Häufig wird das Magenkarzinom erst in den fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. So weisen bei der Diagnose circa 70% der Patienten schon eine lymphogene Metastasierung auf (7). Das lässt sich hauptsächlich durch das klinische Bild des Magenkarzinoms begründen. Die Symptome sind meist diskret und unbestimmt, daher kann der Tumor auch über einen längeren Raum asymptomatisch verlaufen. Meist fallen unspezifische Symptome wie ein Völlegefühl, Drückgefühl im Oberbauch und ein Leistungsabfall auf. Daneben treten subfebrile Temperaturen und ein Abneigungsgefühl gegenüber Fleischkonsum auf. Gehäuft kommt es nach kurzer Zeit zu einer Gewichtsabnahme und Kachexie.

Weiterhin kann im fortgeschrittenen Stadium ein tastbarer Tumor im Oberbauch auftreten.

Warnsymptome sind akute obere gastrointestinale Blutungen und Magenausgangsstenosen. Im Labor zeigen sich gegebenenfalls eine Eisenmangelanämie und ein positiver Nachweis für okkultes Blut im Stuhl.

Anzeichen für eine schon stattgefundene Metastasierung des Magenkarzinoms sind eine Hepatomegalie, Aszites sowie eine Vergrößerung des Virchow-Lymphknotens (2, 7, 8).

2.1.7 Diagnose und Staging

Bei der Prognose des Magenkarzinoms ist besonders das Stadium zum Zeitpunkt der Entdeckung ausschlaggebend. Eine Diagnosestellung in möglichst frühen Stadien des Tumors ist dabei besonders wichtig. Daher sollte bei allen Patienten mit Magenbeschwerden und Verdacht auf einen „Reizmagen“, bei denen nach einem dreiwöchigen Therapieversuch die Symptome persistieren, eine endoskopisch-biopsische Klärung erfolgen. Weitere Alarmsymptome, die zu einer schnellen Abklärung führen sollten, sind Dysphagie, rezidivierendes Erbrechen, Inappetenz, Gewichtsverlust und gastrointestinale Blutungen. Bei Risikoerkrankungen, wie dem Ulkus und einem krankhaften Reflux, sollten jährlich klinische Kontrollen durchgeführt werden.

Den Goldstandard zur Diagnose stellt dabei die Videoendoskopie oder genauer die Ösophagus-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) dar. Diese Methode besitzt die höchste

Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von Neoplasien im Magen und Ösophagus. Außerdem weist diese Untersuchungsmethode eine geringe Komplikationsrate, in einem von tausend Fällen, auf. Daneben liegt keine Strahlenbelastung bei dieser Untersuchungsart vor (10).

Während der ÖGD ist die Entnahme von multiplen Biopsien (8-10) aller suspekten Veränderungen obligat. Bei größeren Läsionen sollten mindestens 10 Biopsien und zusätzlich zu den Läsionen jeweils 2 Proben aus Corpus und Antrum entnommen werden. Ohne eine histologische Sicherung der Läsion ist eine Unterscheidung zwischen einem benignen oder malignen Geschehen nicht möglich. Die Entnahme von gesunder Schleimhaut ist nicht erforderlich, kann aber zur Erstellung eines Risikoprofils, wie der Atrophie oder einer Infektion mit *H. pylori*, sinnvoll sein.

Neben der Videoendoskopie kann eine Endosonographie (EUS) durchgeführt werden. Die Nähe des Schallkopfes zum untersuchenden Präparat ermöglicht eine sehr viel höhere Auflösung als eine transperitoneal durchgeführte Ultraschalluntersuchung (14). Daher kann mit dieser Untersuchungsmethode die Tiefenausdehnung des Tumors sehr genau bestimmt werden. Diese ist für die Klassifikation und anschließende Therapie des Tumors entscheidend. Weiterhin können auch benachbarte Lymphknoten untersucht werden, wobei die Spezifität der Untersuchung für Lymphknoten wesentlich geringer als für die Karzinome ist. Der Nachweis eines Lymphknotenbefalls kann ausschließlich histologisch geführt werden. Weiterhin weist die EUS, im Gegensatz zum CT, eine höhere Sensibilität bei der Entdeckung eines Aszites, die verdächtig für eine Fernmetastasierung ist, auf. Somit lässt sich die EUS gut zur Risikostratifizierung einsetzen und kann zur Optimierung präziserer Prognosevorhersagen und der Therapieentscheidungen genutzt werden (10).

Eine Blutuntersuchung auf Tumormarker wird aufgrund fehlender Evidenz nicht empfohlen. Zu diesen Markern zählen unter anderem CEA, CA19-9, CA-72-4 (10).

Staging

Ist die Diagnose eines Karzinoms des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs gesichert, wird nachfolgend eine Staging-Untersuchung durchgeführt. Diese dient zum Ausschluss von Metastasen. Dazu gehören beim Magenkarzinom die Abdomensonographie, sowie die Anfertigung einer Computertomographie des Thorax und des Abdomens. Zur Abklärung von Lebermetastasen ist als erster Schritt die

Abdomensonographie durchzuführen (7). Bei AEG-Tumoren sollte zusätzlich sonographisch die Halsregion zum Ausschluss einer lokalen Metastasierung untersucht werden. Bei Magenkarzinomen ist diese Untersuchung nicht obligat, kann aber ergänzend eingesetzt werden. Danach schließen sich die computertomographischen Untersuchungen an.

Während die meisten Metastasen in den genannten Untersuchungen entdeckt werden können, ist eine Peritonealkarzinose weder sonographisch noch in einer computertomographischen Untersuchung nachweisbar. Jedoch ist das Vorhanden oder nicht Vorhandensein einer Peritonealkarzinose unter anderem bei der Entscheidung für eine chirurgischen Therapie relevant. Zur Vermeidung nicht indizierter Operationen sollte daher schon vor Therapiebeginn eine Peritonealkarzinose exkludiert werden. Zum Staging wird dafür eine Laparoskopie durchgeführt. Diese Untersuchung weist eine hohe diagnostische Genauigkeit auf.

Trotz makroskopisch unauffälliger Befunde kann eine positive Zytologie in der Peritoneallavage gefunden werden. Daher sollte, um falsch negativen Ergebnissen vorzubeugen, während der Staging-Laparoskopie eine zusätzliche Zytolavage durchgeführt werden. Dieser Befund könnte in der Zukunft zum einen die Prognosevorhersagen optimieren, zum anderen könnten ergänzende Therapiekonzepte, wie eine intraperitoneale Chemotherapie, in Betracht gezogen werden (10).

2.1.8 Stadieneinteilung

Anhand der Untersuchungsergebnisse kann anschließend die Tumorausbreitung bestimmt werden. Diese ist für Therapieplanungen und Prognosevorhersagen entscheidend. Wichtig für die Therapieentscheidung ist dabei die einheitliche Einteilung der Tumore mithilfe des TNM-Systems und der Stadieneinteilung nach UICC (Union International Contre le Cancer). Das TNM-System stützt sich auf drei Komponenten. Die T-Klassifikation bezieht sich auf die anatomische Ausbreitung des Primärtumors im befallenen Organ. Die N-Klassifikation berücksichtigt den Befall der regionären Lymphknoten und die M-Klassifikation beschreibt das Vorliegen einer hämatogenen Metastasierung (8). Dabei berücksichtigt das System für jede Karzinomart individuelle Kriterien. Die auf das Magenkarzinom zutreffenden werden in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4 TNM-Klassifikation des Adenokarzinoms des Magens (UICC, 2010)(7)

T-Primärtumore nach Infiltrationstiefe

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
Tis	Carcinoma in situ: Intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der Lamina propria, hochgradige Dysplasie
T1_a	Tumor infiltrierte Lamina propria oder Muscularis mucosae
T1_b	Tumor infiltrierte Submukosa
T2	Tumor infiltrierte Muscularis propria
T3	Tumor infiltrierte Subserosa
T4_a	Tumor perforierte Subserosa
T4_b	Tumor infiltrierte benachbarte Strukturen (benachbarte Strukturen des Magens sind Milz, Colon transversum, Leber, Zwerchfell, Pankreas, Bauchwand, Nebennieren, Niere, Dünndarm und Retroperitoneum. Ein Tumor, der sich in das Ligamentum gastrocolicum oder gastrohepaticum ausbreitet – ohne Perforation des viszerale Peritoneums – wird als T3 klassifiziert)

N-regionäre Lymphknoten nach Anzahl der befallenen Lymphknoten

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-2 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 3-6 regionären Lymphknoten
N3_a	Metastasen in 7-15 regionären Lymphknoten
N3_b	Metastasen in 16 oder mehr regionären Lymphknoten

M-Fernmetastasen

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen (Fernmetastasen schließen peritoneale Metastasen (Aussaat) und positive Peritonealzytologie sowie Tumore im Netz mit ein, soweit diese nicht Teil einer kontinuierlichen Ausbreitung sind)

Die einzelnen Komponenten der TNM-Klassifikation werden für das Karzinom histologisch bestimmt und dann in Tumorstadium nach UICC zusammengefasst. Detailliert aufgeführt wird dies in Tabelle 30 im Anhang. Die UICC-Stadien reichen von

0-IV und beschreiben dabei das Entwicklungsstadium des Tumors. Zum Beispiel beinhaltet das Stadium 0 das Carcinoma in situ. Aufgrund des frühen Stadiums und lokalen Wachstums ohne Möglichkeit der Metastasierung haben diese eine sehr gute Prognose. Dagegen weist das UICC-Stadium IV meist eine Fernmetastasierung auf, und geht somit mit einer sehr schlechten Prognose und einer eher palliativen Versorgung einher.

Neben der Tumorstadieneinteilung kann das Karzinom auch nach histologischen Kriterien in verschiedene Differenzierungsgrade eingeordnet werden. Dabei wird die Tumorzelle mit der ursprünglichen Organzelle verglichen und auf Ähnlichkeiten überprüft. Die Einteilung reicht von hochdifferenzierten G1 Tumoren bis hin zu undifferenzierten, anaplastischen G4 Tumoren. Dabei kommt es zu einer negativen Korrelation zwischen Entdifferenzierung der Tumorzelle und Prognose des Krankheitsverlaufes.

Zuletzt erfolgt postoperativ die Einteilung nach dem Resektionsstatus. Ein R0 resezierter Tumor impliziert, dass der Tumor im Gesunden und somit vollständig ohne Nachweis eines Residualtumors entfernt wurde. Bei R1 Tumoren kann mikroskopisch durch den Pathologen ein Resttumor festgestellt werden. Bei einem R2 resezierten Tumor ist ein makroskopischer Nachweis eines Residualtumors möglich (8).

2.1.9 Therapie

Die Therapie richtet sich nach dem lokalen Fortschritt des Tumors und damit nach der TNM-Klassifikation und der UICC-Stadieneinteilung. Die Therapieschemata wurden durch eine interdisziplinäre Tumorkonferenz in der S3-Leitlinie festgelegt. Die nachfolgende Abbildung 3 stellt das Therapievorgehen anhand der TNM-Klassifikation als vereinfachte Übersicht dar. Die Behandlungsoptionen werden in drei Übergruppen eingeordnet. Die Karzinome im UICC-Stadium IA werden der Gruppe der kurativen Therapien zugeordnet. Vom UICC-Stadium IB-III wird eine potentiell kurative Therapie eingeleitet. Dagegen ist beim UICC-Stadium IV kein kurativer Ansatz mehr vorhanden und es wird eine palliative Therapie angewendet.

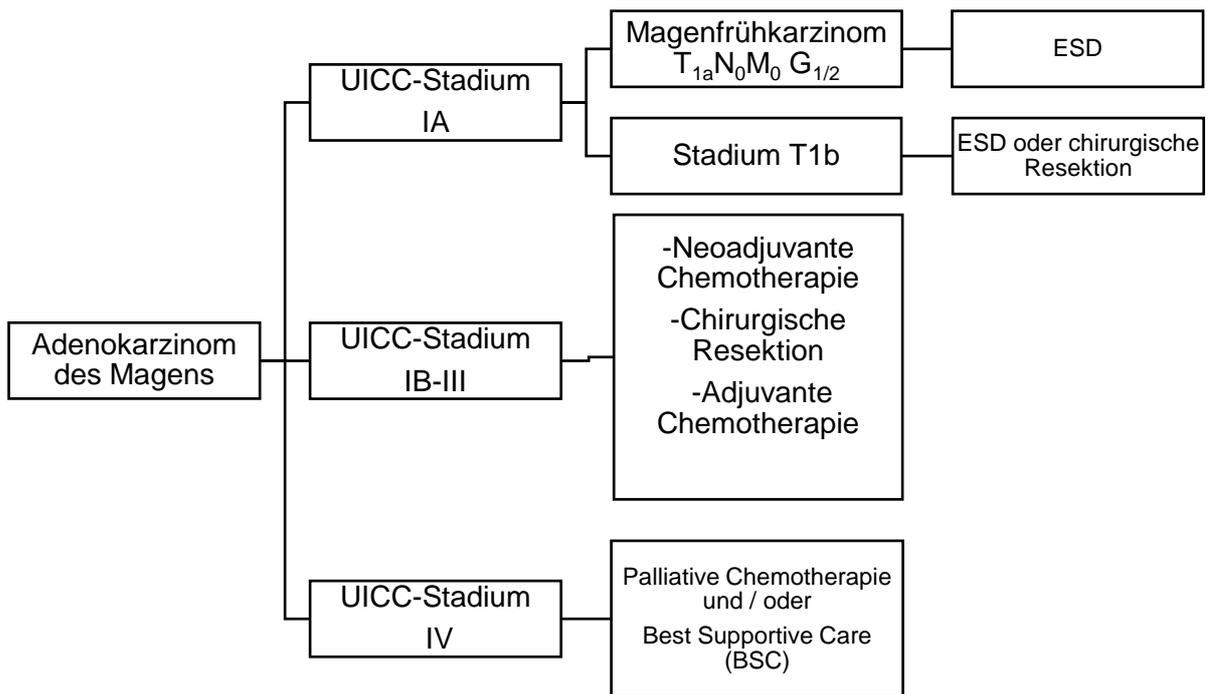


Abbildung 3: Therapievorgehen in Abhängigkeit von TNM- und UICC-Klassifikation; Legende: UICC= Internationale Vereinigung gegen Krebs ESD= endoskopische Submukosadissektion; BSC= Best Supportiv Care;

In den folgenden Abschnitten werden die Säulen der Therapie, die chirurgische Resektion und die Chemotherapie sowie die Palliativtherapie einzeln vorgestellt.

Chirurgische Therapie

Es besteht Einigkeit darüber, dass die chirurgische R0-Resektion für alle potentiell resektablen Magenkarzinome als Standardtherapie durchgeführt werden soll. Bei dem Eingriff werden 16 Lymphknoten entnommen und pathologisch auf einen Tumorbefall untersucht. Dieses Verfahren dient zur exakten TNM-Klassifizierung und bestimmt das nachfolgende Prozedere.

Von diesem standardisierten Vorgehen werden Magenfrühkarzinome mit T_{1a}N₀M₀G_{1/2}, die die folgenden vier Kriterien erfüllen, ausgenommen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Kriterien für die Indikationsstellung einer endoskopischen Submukosadisektion (ESD) bei Magenfrühkarzinomen

1. < 2cm Durchmesser
2. Nicht ulzeriert
3. Mukosakarzinom
4. Intestinaler bzw. histologischer Differenzierungsgrad gut oder mäßig G_{1/2}

Diese Karzinome sollen endoskopisch en-bloc reseziert werden. Für dieses Vorgehen wird das Verfahren der endoskopischen Submukosadisektion (ESD) als Goldstandard angewendet. Nach neuesten Erkenntnissen sollte die ESD auch eingesetzt werden, wenn maximal eines der erweiterten Kriterien, wie in Tabelle 31 im Anhang zu sehen, erfüllt ist. Sollte der Tumor mehr als ein erweitertes Kriterium aufweisen wird eine endoskopische Nachresektion empfohlen.

Sollte kein Magenfrühkarzinom vorliegen ist die chirurgische Resektion die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit und gehört zur Standardtherapie der potentiell resektablen Magenkarzinome. Die Zielsetzung sollte eine R₀-Resektion des Tumors sein. Dabei muss beachtet werden, dass auch die Resektionsränder des Tumors frei von malignem Gewebe sein müssen. Daher wird der Tumor im Gesunden mit einem Sicherheitsabstand von 5cm beim intestinalen Typ und 8cm beim diffus wachsenden Karzinom entfernt. Somit ist das Resektionsausmaß sowohl von der TNM-Klassifikation als auch von der Laurén-Einteilung abhängig.

Zur Erreichung des Ziels ist bei proximalen Tumoren häufig eine vollständige Gastrektomie notwendig, bei AEG-Tumoren des Typ II und III wird zusätzlich eine distale Ösophagusresektion durchgeführt. Im Gegensatz dazu kann bei distal gelegenen Tumoren der proximale Magen erhalten bleiben. Wächst der Tumor adhärent an anderen Organen, sollen diese, falls möglich, mitreseziert werden. Von einer prinzipiell durchgeführten Splenektomie wird aber abgeraten.

Weiterhin wird das Omentum majus und das Omentum minus entfernt, sowie eine Lymphknotenadenektomie der Kompartimente D1 und D2, wie in Abbildung 4 gezeigt, durchgeführt.

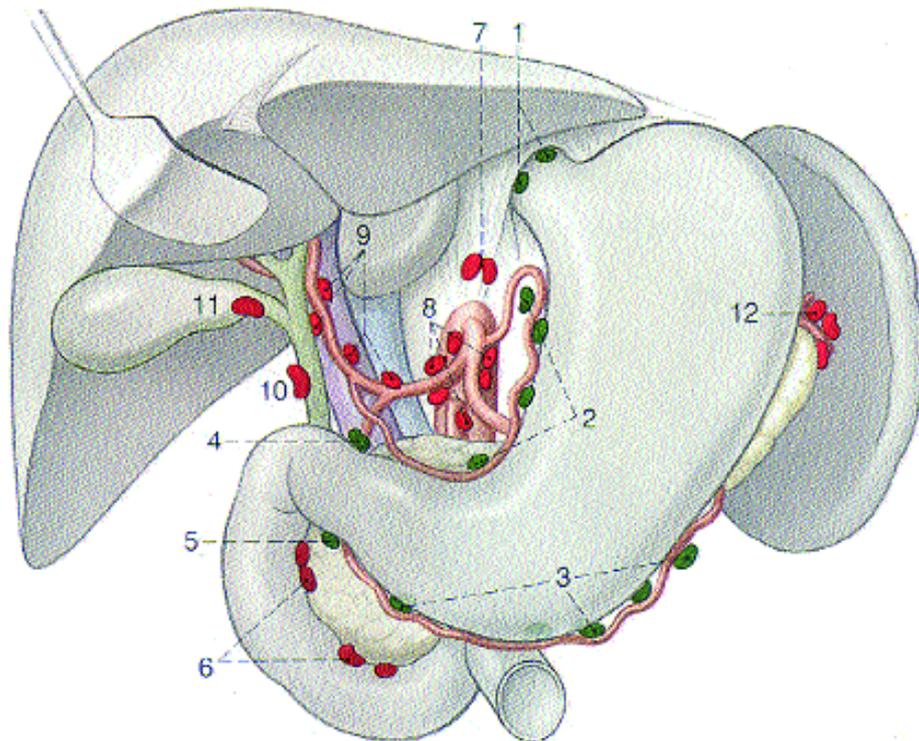


Abbildung 4: Einteilung der Lymphknotengruppen (nach: Japanese Research Society gastric cancer (15),
 Legende: D1=Lymphknoten 1-6 (perigastrisch gelegen); D2=Lymphknoten 7-11(suprapankreatisch gelegen)

Das D1-Kompartiment umfasst dabei die perigastrischen Lymphknoten Nummer 1-6. Bei einer D2-Lymphadenektomie werden die suprapankreatischen Lymphknoten 7-11 entfernt. Die anschließende Passagenwiederherstellung wird am häufigsten durch eine Ösophagojejunostomie (Y-Roux) bei Gastrektomie und eine Gastrojejunostomie bei einer subtotalen Magenresektion ermöglicht (7, 10).

Bei Vorliegen eines T4b-Tumors mit Befall von nicht resektablen Organen oder einer Fernmetastasierung sollte keine primär chirurgische Intervention angestrebt werden.

Perioperative Chemotherapie

Bei fortgeschrittenen Stadien ist eine alleinige chirurgische Therapie nicht ausreichend. Daher wird bei diesen Karzinomen ein multimodales Therapiekonzept mit zwei Säulen, die Chemotherapie und die chirurgische Intervention, angestrebt.

Die Leitlinie empfiehlt, dass bei klinisch diagnostizierten T3 (cT3) und resektablen cT4a-Tumoren eine perioperative Chemotherapie durchgeführt werden soll. Beim Vorliegen eines cT2-Stadiums kann dasselbe Vorgehen in Betracht gezogen werden. Die perioperative Chemotherapie beinhaltet sowohl prä- als auch postoperative therapeutische Zyklen. Falls keine Kontraindikation besteht, sollte dafür das FLOT-

Schema angewendet werden. Die zur Therapie eingesetzten Chemotherapieschemata werden in Tabelle 32 im Anhang beschrieben. In der FLOT4 Studie konnte ein medianes Überleben von 50 Monaten im Gegensatz zum ECF/ECX-Schema mit einem medianen Überleben von 35 Monaten (HR=0,77) gesehen werden. Weiterhin zeigte sich eine Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens (30 gegen 18 Monate) sowie eine höhere Rate an R₀-Resektionen (85% gegen 78%) (16, 17).

Im Gegensatz zu den Magenkarzinomen sind die Karzinome des gastroösophagealen Übergangs strahlensensibel. Daher sollte bei AEG-Tumoren mit einem cT3- oder resektablen cT4a-Stadium eine perioperative Chemo oder eine neoadjuvante Radiochemotherapie durchgeführt werden (18).

Für den Behandlungsverlauf ist das Ansprechen des Patienten auf die angewendete Chemotherapie unabdingbar. Da die Tumorregression aber erst im verzögerten Verlauf bildmorphologisch nachgewiesen werden kann, sollten keine Verlaufsuntersuchungen durchgeführt werden. Eine Erfassung des klinischen Verlaufs ist allerdings wichtig. Daher sollten die Patienten in regelmäßigen Abständen nach relevanten Symptomen wie Völlegefühl, Erbrechen und Gewichtsverhalten befragt werden. Kann in diesen Re-Evaluationen eine klinische Verschlechterung der Patienten nachgewiesen werden, sollte auch eine erneute Diagnostik erfolgen. Zeigt sich während der Untersuchung ein fehlendes Ansprechen oder sogar eine Tumorprogression, sollte die Chemotherapie abgesetzt und eine frühzeitige Operation geplant werden. Dieser Verlauf ist relevant um potentiell toxische Nebenwirkungen der Chemotherapeutika vermeiden zu können. Vor dem anschließenden operativen Eingriff erfolgt ein Re-Staging. Kann eine Fernmetastasierung gesehen werden, ist keine Indikation mehr für ein operatives Vorgehen gegeben.

Nach Abschluss der neoadjuvanten Chemotherapie wird die Resektion des Tumors, wie im Kapitel chirurgische Therapie beschrieben, durchgeführt. Eine anschließende adjuvante Chemotherapie sollte interdisziplinär anhand der folgenden Kriterien diskutiert werden.

Zeigen die Patienten, neben der Verträglichkeit, auch ein gutes Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie so wird auch eine adjuvante Chemotherapie im Verlauf empfohlen. Wurde während der präoperativen therapeutischen Zyklen eine klinische Verschlechterung des Patienten oder ein Tumorprogress ersichtlich, sollte im Weiteren

keine Therapie erfolgen. Dies gilt ebenfalls für Patienten, bei denen eine Unverträglichkeit der Medikamente aufgetreten ist. Ob und inwiefern eine erneute Chemotherapie vertragen werden kann, hängt auch vom Allgemeinzustand der Patienten ab. Es liegt keine Empfehlung für die Verwendung eines anderen Therapieschemas vor, es kann aber eine Deeskalation auf das zum Teil besser verträgliche FLO-Schema vorgenommen werden (siehe Tabelle 32) (10).

Palliative Therapie

Wird der Tumor mit einem UICC-Stadium IV klassifiziert, ist kein kuratives Behandlungskonzept mehr gegeben. Dieses Stadium schließt unter anderem alle Arten einer Fernmetastasierung ein, auch wenn diese erst im Verlauf der Erkrankung erkannt werden. Bei diesen Patienten wird eine palliative Therapie eingeleitet.

Das Ziel der palliativen Medizin ist die Verbesserung der Überlebenszeit und der Erhalt von Lebensqualität. Daher ist auch bei diesen Therapieschemata häufig ein multimodales Vorgehen indiziert. Zum einen kann der Tumor mit Hilfe einer systemischen Chemotherapie behandelt werden, um den Tumorprogress zu verlangsamen. Zum anderen werden, je nach individuellem Verlauf, chirurgische Interventionen zur Entlastung der Patienten und damit zur Verbesserung der Lebensqualität durchgeführt. Dazu gehören zum Beispiel Operationen von Magenausgangsstenosen, Tumorblutungen und anderen Komplikationen der Tumorerkrankung. Diese Interventionen werden als Best Supportive Care (BSC) bezeichnet. Eine chirurgische Resektion des Karzinoms wird in dieser Situation nicht empfohlen.

In verschiedenen Studien konnte belegt werden, dass der Einsatz einer Chemotherapie im Gegensatz zur alleinigen Therapie mit BSC, das Gesamtüberleben deutlich verlängert. In der Cochrane-Analyse von 64 Studien zeigt sich eine Verlängerung des Gesamtüberlebens von 6,7 Monaten bei Einsatz einer Chemotherapie (HR=0,3) (18). Daneben werden auch die Verlängerung des Erhalts der Lebensqualität und eine Verbesserung der Symptomkontrolle sowie des Allgemeinzustandes gesehen. Die Therapieentscheidung über den Einsatz und die Wahl der Chemotherapie ist von den Komorbiditäten und Präferenzen sowie vom Allgemeinzustand des Betroffenen abhängig. Dabei wird in der Leitlinie ein

systemischer Einsatz der Chemotherapie für Patienten mit einem ECOG-Status 0-1 empfohlen. Das Lebensalter stellt keine generelle Kontraindikation dar. Allerdings kann für Patienten mit schlechterem Allgemeinzustand (ECOG 3) oder sehr hohem Lebensalter keine Wirksamkeit der Therapie nachgewiesen werden. Eine Empfehlung zur Anwendung der Chemotherapie ist deswegen und mangels Durchführbarkeit aufgrund des schlechten Patientenzustandes, nicht gegeben. Aufgrund der raschen Progression des metastasierten Magenkarzinoms und der damit einhergehenden Verschlechterung des Allgemeinzustandes ist der frühe Therapiebeginn entscheidend.

Die Erstlinienchemotherapie sollte eine Kombination aus Platin- und fluorpyrimidinhaltigen Medikamenten enthalten. Bei den Platinderivaten kann sowohl Oxaliplatin und das Cisplatin angewendet werden. Beide zeigen vergleichbare Ergebnisse und unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem Nebenwirkungsprofil. Dabei steht bei Cisplatin Übelkeit und Erbrechen sowie die Nephrotoxizität im Vordergrund. Im Gegensatz dazu treten bei Oxaliplatin verstärkt Neuropathien auf. Die Wahl sollte individuell auf den Patienten, seine Präferenzen und Komorbiditäten angepasst werden. Das Gleiche trifft für den Einsatz der fluorpyrimidinhaltigen Medikamente zu, dabei gibt es drei Alternativen: 5-Fluoruracil (5-FU), Capecitabine oder S-1. Daneben werden auch Docetaxel-haltige Regime in der Triplett-Therapie mit Cisplatin und 5-FU in der Erstlinientherapie empfohlen.

Eine regelmäßige Reevaluation des klinischen Verlaufs im Hinblick auf den Allgemeinzustand, tumorassoziierten Beschwerden und Vitalfunktionen wird empfohlen. Alle 6-12 Wochen soll zusätzlich eine geeignete Bildgebung erfolgen. Auf dieser Grundlage kann eine wiederholende Risiko-Nutzen-Abwägung hinsichtlich der Fortführung der Therapie gewährleistet werden. Bei progredient schlechten Verläufen soll ein Abbruch oder die Umstellung der Chemotherapie, zur Vermeidung einer potentiell toxischen Therapie diskutiert werden. Die Dauer der Chemotherapie wird individuell auf den Krankheitsverlauf und die Verträglichkeit der Medikamente angepasst.

Bei der Wahl des Therapieschemas spielt neben dem Allgemeinzustand des Patienten der HER2neu-Expressionsstatus eine wichtige Rolle. Bei HER2neu positiven Patienten kann zusätzlich zur Chemotherapie der Antikörper-Trastuzumab eingesetzt werden. Dies ist ein Antikörper, der zur Therapie des HER2neu positiven

Mammakarzinoms entwickelt wurde. In der ToGA Studie konnte auch beim Magenkarzinom eine mediane Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit von 2,7 Monaten gezeigt werden (19). Daher sollten alle Patienten, mit einem UICC-Stadium IV oder einem inoperablen Tumor, auf den HER2neu-Status (Expression und Amplifikation) hin untersucht werden (20).

In der Zweitlinientherapie kommen zusätzlich noch weitere Behandlungsoptionen mit Irinotecan, Docetaxel, Paclitaxel und Ramurcirumab in Betracht. Ramurcirumab ist ein VEGF-Rezeptor2-Antikörper, der die Blutzufuhr des Tumors unterbinden soll. Eine Kombinationstherapie von Paclitaxel mit dem Antikörper Ramurcirumab zeigte bessere Wirksamkeit als Paclitaxel mit Placebo. So konnte das mediane Überleben von 7,4 Monate im Placebo-Arm auf 9,6 Monate in der Kombination gesteigert werden (HR=0,017) (21).

Eine weitere Option zur Behandlung des Magenkarzinoms, stellen die Immuncheckpointinhibitoren dar. Diese Therapieoptionen werden zurzeit in Studien untersucht (10, 22, 23).

2.1.10 Prognose und Nachsorge

Nach der Durchführung einer kurativen Therapie sollte den Patienten eine strukturierte ganzheitliche Nachsorge angeboten werden. Dabei sollten die drei Bereiche onkologische Diagnostik, psychoonkologische Nachsorge und die internistische Behandlung der Postgastrektomie-Symptomatik berücksichtigt werden.

Die Diagnostik umfasst klinische, endoskopische und bildgebende Untersuchungen zur frühen Erfassung von Rezidiven. Diese sollte in den ersten beiden Jahren alle drei Monate oder halbjährlich und anschließend für weitere drei Jahre im jährlichen Abstand durchgeführt werden.

Dabei ist zu beachten, dass bisweilen keine Prognoseverbesserung aufgrund einer Nachsorge bewiesen werden konnte. Möglicherweise hängt das damit zusammen, dass nur ein Bruchteil der Rezidive, die bis zu zwei Jahren nach Abschluss der Therapie auftreten, behandelbar ist. Als therapierbar gelten lokoregionäre Rezidive, die im Restmagen auftreten. Bei den gastrektomierten Patienten treten Rezidive extragastrisch oder als Fernmetastasen auf und haben keine Therapieempfehlung. Eine Ausnahme sind die Magenfrühkarzinome, welche mit einer ESD behandelt worden sind. Diese können lokale und häufig asymptomatische Rezidive aufweisen, die bei frühzeitiger Erkennung chirurgisch reseziert werden können. Weiterhin können

nur durch die onkologische Diagnostik die Therapieerfolge von adjuvanter und palliativer Chemotherapie nachgewiesen werden (15, 24).

Die internistische Behandlung beinhaltet die Substitution von Pankreasenzymen, sollte der Patient nach Gastrektomie an Fettstühlen leiden. Weiterhin kommt es aufgrund des fehlenden Intrinsic-Faktors zu einem Vitamin B12-Mangel und damit zu einer makrozytären Anämie oder funikulären Myelose. Eine lebenslange Substitution mit Vitamin B12 ist empfohlen. Die häufige, mikrozytäre Eisenmangelanämie wird mit einer entsprechenden Eisensubstitution behandelt. Außerdem sollte allen rehabilitierungsfähigen Patienten eine Anschlussheilbehandlung zur Vermeidung eines weiteren Gewichtsverlust und Förderung des Muskelaufbaus angeboten werden (7, 10).

Die Prognose ist, wie bereits erwähnt, von verschiedenen Punkten abhängig. Einer der wichtigsten Faktoren ist die Früherkennung. So konnten die in Tabelle 6 folgende 5-Jahres-Überlebensraten für Magenfrühkarzinome ermittelt werden.

Tabelle 6: 5-Jahres-Überlebensrate bei Magenfrühkarzinome (7)

Magenfrühkarzinome	5-Jahres-Überlebensrate
1. pTis:	100%
2. pT1:	90%
3. pT ₁ N ₁ M ₀ oder pT ₂ N ₀ M ₀ :	70%

Bei Tumoren im weiter fortgeschrittenen Stadium stellt der Resektionsstatus den wichtigsten prognostischen Faktor dar. Ein R₀-resezierter Tumor hat, je nach TNM-Klassifikation, weniger als 45% 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit. Bei einer R₁/R₂-Resektion überlebt kaum ein Patient den 5-Jahreszeitraum (7).

2.2 Monoklonaler Antikörper Cetuximab

Aufgrund dieser schlechten Prognosevorhersagen werden immer wieder neue Behandlungsansätze für die Therapie des Magenkarzinoms erforscht. Neben den Immuncheckpoint-Inhibitoren werden auch weitere neuartige Target-Therapien wie der EGFR-Antikörper Cetuximab auf Wirksamkeit beim Magenkarzinom erforscht. Cetuximab ist ein monoklonaler chimärer Antikörper, der durch seine Bindung an EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) und die damit unterbundene Signalkaskade zu einer Verminderung des Zellwachstums und der Proliferation führt.

Dieser Mechanismus lässt sich durch die EGFR-Signalwege erklären. EGFR ist ein Oberflächenrezeptor, der physiologisch hauptsächlich auf Zellen mit epithelialeem Ursprung wie der Haut, des Magen-Darm-Traktes und der Leber, zu finden ist. Er ist unter anderem verantwortlich für die Regulation der Teilungsrate und des Überlebens und Absterbens der Zellen. Seine Hauptliganden sind dabei der EGF (Epidermal Growth Factor) und der $TGF\alpha$ (Transforming growth factor alpha). Durch die Bindung zu den Liganden wird im Zellinneren eine Reaktion ausgelöst. Diese führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase und zum Ablauf intrazellulärer Signalkaskaden sowie zur Phosphorylierung von Proteinen.

Es konnte gezeigt werden, dass dieser Rezeptor nicht nur auf gesunden Zellen vorzufinden ist, sondern dass viele verschiedene Arten von Tumoren eine Überexpression des EGFRs zeigen (25).

Zu diesen Tumorentitäten gehören vor allem das kolorektale Karzinom, Plattenepithelkarzinome des Hals/Kopfes, das nicht-kleinzellige-Lungenkarzinom, sowie Pankreas- und Nierenzellkarzinome (25-27). In den Tumorzellen spielt dieser Rezeptor aufgrund der Regulation des Zellwachstums und der Proliferation eine große Rolle für die Malignität des Tumors. Daneben werden durch diesen sowohl der Zellzyklus, die Inhibition der Apoptose, die Angiogenese als auch die Tumorzellmobilität und die Metastasierung gesteuert. Das könnte erklären, dass die Überexpression des EGFRs häufig mit einer schlechteren Prognose aufgrund eines aggressiveren Verlaufs einhergeht.

Die Wirkung von Cetuximab geht auf eine kompetitive Hemmung dieses Rezeptors zurück. Dabei konkurrieren die Hauptliganden mit dem monoklonalen Antikörper um die Bindungsstelle an dem Oberflächenrezeptor. Aufgrund einer zehnfach höheren Affinität des Antikörpers zu EGFR als die physiologischen Liganden, kommt es zu einer wirksamen Inhibition des Rezeptors. Durch die Interaktion mit dem Antikörper wird die Rezeptorbindungsstelle, ohne Auslösung der intrazellulären Reaktion blockiert. Aufgrund der fehlenden Aktivierung werden die Tumorzellen in ihrem Wachstum und der Proliferation gestört. Weiterhin führt der Einsatz des Antikörpers zu einer verstärkten Apoptose, verminderter Angiogenese und Invasivität sowie Metastasierung des Tumors. Die Wirkungsweise wird schematisch in Abbildung 5 dargestellt (25).

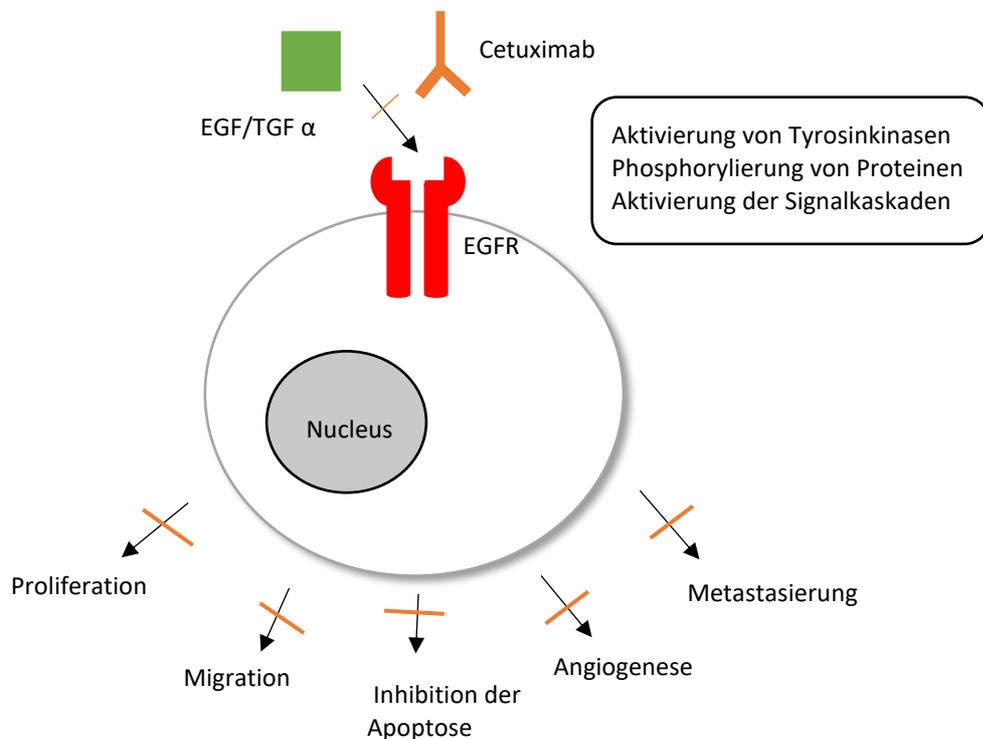


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des EGFR-Antikörpers Cetuximab

Die Chimärität des Antikörpers ergibt sich aus dem Aufbau mit einem murinen variablen F_v Anteil, der die Bindungsstelle zum EGFR beinhaltet, und einer humanen konstanten F_c Region. Zu den häufigen Nebenwirkungen des Antikörpers, die bei 70% der Patienten auftreten, gehört ein akneartiger Hautausschlag. Es zeigt sich, dass das Auftreten des Hautausschlages mit dem Ansprechen der Therapie positiv korreliert (26). Weitere unerwünschte Nebenwirkungen sind eine Hypersensitivität, Infusionsreaktionen und eine interstitielle Lungenerkrankung (25).

Der Einsatz des Antikörpers als neue zielgerichtete Target-Therapie wurde in unterschiedlichen Studien untersucht. In diesen Studien konnte bewiesen werden, dass es bei der Therapie mit Cetuximab zu einem Arrest der Zelle in der G₁-Phase des Zellzyklus kommt, wodurch der Prozess der Zellteilung unterbrochen wird.

Darüber hinaus zeigt sich bei der Therapie mit dem Antikörper eine Herunterregulation des Rezeptors auf der Zellmembran. Beim kombinierten Einsatz einer Radiochemotherapie mit Cetuximab ist eine geringere Rate an Resistenzen und damit eine bessere Ansprechrate auf die Therapie nachweisbar. In einer Phase-II-Studie kann bei Patienten mit Resistenzentwicklung auf Irinotecan bei metastasiertem Kolonkarzinom eine Wirksamkeit beim zusätzlichen Einsatz von Cetuximab gesehen werden. Dabei zeigen die Patienten sowohl ein Ansprechen auf die Monotherapie, als auch auf eine Kombinationstherapie aus Cetuximab mit Irinotecan. Wobei Letztere eine höhere Ansprechrate mit einem längeren progressionsfreien Überleben zeigt. In beiden Studien wurden nur Patienten eingeschlossen, die eine Expression von EGFR auf den Tumorzelloberflächen zeigen. Die Wirkung des Antikörpers ist dabei unabhängig von der Stärke der Expression (26, 28).

In der Leitlinie zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms, wird Cetuximab in der Therapie der fortgeschrittenen metastasierten Tumore eingesetzt. Empfohlen wird der Einsatz in Kombination mit Fluorpyrimidin plus Oxaliplatin und Irinotecan. Als Voraussetzung für die Behandlung mit Cetuximab muss der Tumor eine linkshemikolische Lage und einen RAS-Wildtyp aufweisen. Es zeigen sich Verbesserungen im Gesamtüberleben und dem progressionsfreien Überleben (mit HRs von 0,75 (0,67-0,84) und 0,78 (0,70-0,87)). Allerdings kann keine Wirksamkeit bei vorliegenden Mutationen des RAS-Gens nachgewiesen werden (29).

2.3 Vorstellung der EXPAND-Studie

Nachdem Cetuximab in der Therapie des Kolon-Karzinoms eine wichtige Rolle eingenommen hat, sollte im Folgenden untersucht werden, ob der EGFR-Antikörper auch positive Ergebnisse bei der Therapie des Magenkarzinoms erbringen könnte. Dafür wurde die EXPAND-Studie durchgeführt. In dieser wird die Leitlinientherapie des Magenkarzinoms und des gastroösophagealen Übergangs, Capecitabin mit Cisplatin alleine dem Therapieschema Capecitabin, Cisplatin zusammen mit Cetuximab gegenübergestellt. Die Studie wurde als randomisierte, kontrollierte Phase-III-Studie durchgeführt.

Die EXPAND-Studie ist im Zeitraum vom 30.8.2008 bis zum 15.12.2010 durchgeführt worden und schloß 904 Patienten ein. Das Studienkollektiv umfasste Patienten mit einem Mindestalter von 18 Jahren an 164 Kliniken aus 25 verschiedenen Ländern. Die Personen wiesen alle ein Adenokarzinom des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs auf, welches entweder lokal ausgebreitet wuchs oder fernmetastasiert war. Weiterhin sollten alle Karzinome eine radiologisch nachgewiesene Läsion von >2cm in handelsüblichen Verfahren oder >1cm in der Spiral-Computertomographie aufweisen. Die Zulassung zur Studie beinhaltet zusätzlich ein ECOG-Stadium von 0 oder 1 mit einer adäquaten Organfunktion. Eine weitere Anforderung beinhaltete das Vorhandensein einer histologischen Probe zur Untersuchung des Tumors auf die Expression von EGFR und HER2neu. Die Studie wurde als unverblindete (open label) randomisierte, kontrollierte Phase-III-Studie durchgeführt.

Als Randomisierungsparameter wurden eine TNM-Klassifikation von M0 oder M1 und die Durchführung oder der Verzicht auf eine Ösophag- oder Gastrektomie sowie die neoadjuvante Radiochemotherapie festgelegt. Die Studiauswertung wird nach der Intention-to-treat Methode mit dem primären Endpunkt des progressionsfreien Überlebens (PFS Progression Free Survival) ausgewertet.

In dem Studiendesign wird die Leitlinientherapie Cisplatin mit Capecitabin (6), der experimentellen Therapiegruppe Cisplatin mit Capecitabin und der zusätzlichen Gabe von Cetuximab (CTX) verglichen.

Die Patienten wurden im 3-Wochen-Zyklus chemotherapeutisch alle mit Capecitabin und Cisplatin behandelt. Der Experimentalgruppe wurde zusätzlich zu der Leitlinienchemotherapie einmal wöchentlich Cetuximab verabreicht. Dieses

Therapieschema wurde bis zum radiologischen Nachweis eines Tumorprogresses, unerwünschten toxischen Nebenwirkungen oder einem Rücktritt des Patienten aus der Studie angewendet. Bei der Auswertung zeigt sich kein signifikanter Unterschied im progressionsfreien Überleben bei den unterschiedlichen Therapieschemata, wie in der Abbildung 6 ersichtlich ist. Das mittlere progressionsfreie Überleben in der Experimentalgruppe betrug 4,4 Monate im Gegensatz zu 5,6 Monate in der Gruppe mit Leitlinienbehandlung bei einem Hazard Ratio von 1,09.

Die Ergebnisse zeigen ein Gesamtüberleben in der Experimentalgruppe von 9,4 Monaten im Vergleich zu 10,7 Monaten in der Leitliniengruppe. Dabei kann bei 30% der Patienten ein Ansprechen auf die Cetuximab-Therapie nachgewiesen werden.

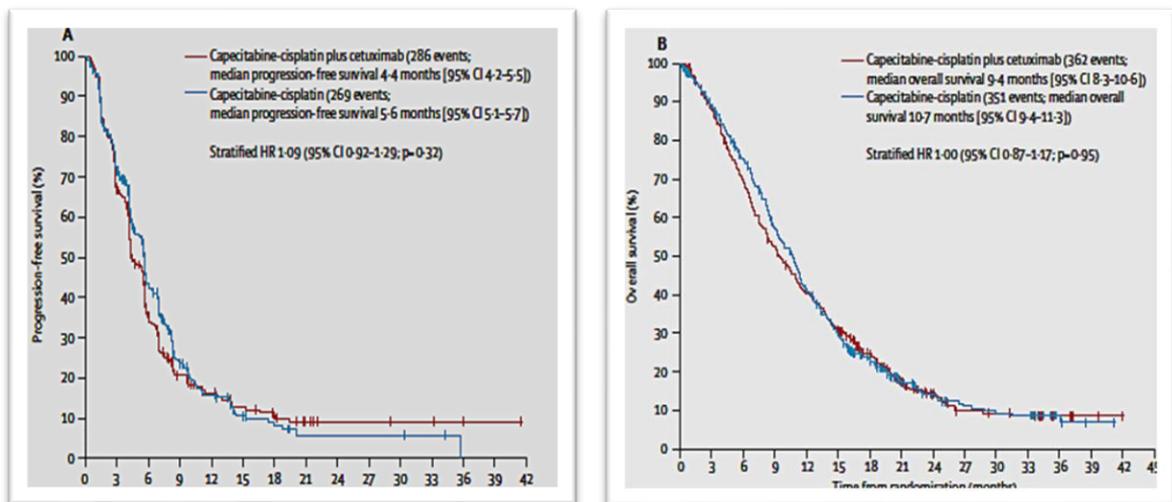


Abbildung 6: EXPAND Studie: Beurteilung Progressionsfreies Überleben (A), Gesamtüberleben (B) (5) Legende A: rot: Capecitabine-Cisplatin plus Cetuximab (286 Ereignisse; Medianes Progressionsfreies Überleben (PFS) 4x4 Monate [95% KI 4x2–5x5]); blau: Capecitabine-Cisplatin (296 Ereignisse; Medianes PFS 5x6 Monate [95% KI 5x1–5x7]) Legende B: rot Capecitabine-Cisplatin und Cetuximab (362 Ereignisse; Medianes Gesamtüberleben (OS) 9x4 Monate [95% KI 8x3-10x6]); blau: Capecitabine-Cisplatin (351 Ereignisse; Medianes OS 10x7 Monate [95% KI 9x4–11x3] (5).

Eine Expression von EGFR konnte im Tumormaterial von 398 Patienten in der Experimentalgruppe und 376 Patienten in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Expressionsstärke war niedrig und es konnte kein Unterschied im PFS und im Gesamtüberleben (OS) beim Vergleich der verschiedenen Expressionsstärken gefunden werden. Eine Untersuchung auf vorhandene KRAS-Mutationen wurde nicht durchgeführt (5).

2.4 Membranrezeptor CXCR4

2.4.1 Physiologische Eigenschaften

Bei der Entwicklung neuer Therapieansätze werden die verschiedenen molekularen Eigenschaften der Tumorzellen untersucht. Die Erforschung der Signalwege und deren dazugehörige Signalproteine sowie Rezeptoren kann das Verständnis des Tumorzellwachstums und der Proliferation verbessern. Eine mögliche Inhibition dieser Signalübertragungen könnte eine Möglichkeit zur Kontrolle und Regression des Tumorzellwachstums darstellen. Weiterhin ist bekannt, dass häufig die Target Therapeutika nur bei bestimmten Mutationen des Tumors oder speziellen Subkollektiven ihre Wirksamkeit entfalten. So konnte gezeigt werden, dass beim Einsatz von Trastuzumab eine Überexpression des HER2neu-Rezeptors vorliegen muss. Dasselbe gilt für Cetuximab, der nur bei Tumoren einsetzbar ist, die einen RAS-Wildtyp aufweisen. Daher ist es wichtig, dass bei Medikamentenstudien sowohl das gesamte Patientenkollektiv als auch einzelne Subgruppen auf die Wirksamkeit des Medikaments untersucht werden. Ansonsten könnte ein Benefit, der nur für bestimmte Patienten mit speziellen Tumoreigenschaften vorliegt, übersehen werden.

Zu den Signalkaskaden, die Tumorzellen für ihren Stoffwechsel und ihre Proliferation nutzen, gehört auch der CXCR4-Rezeptor aus der Gruppe der Chemokinrezeptoren. Diese Rezeptoren spielen im Allgemeinen eine wichtige Rolle bei der Zellmigration im Zuge von Entzündungsreaktionen. Weiterhin sind sie essentiell bei der Erstellung der lymphoiden Mikroumgebung und der Organogenese beteiligt (30).

CXCR4 ist ein Gi-Protein-gekoppelter-Chemokinrezeptor mit sieben Transmembrandomänen. Sein Ligand ist CXCL12, auch SDF-1 α (stromal cell-derived factor 1 alpha) genannt.

Die Signalkaskade wird über verschiedene Wege übermittelt. Nach Bindung des Liganden kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors. Diese führt zur Aktivierung des G-Proteins, wodurch zum einen die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K) und die Phospholipase C sowie der JAK/STAT-Signalweg initiiert werden. Mithilfe dieser Kaskaden werden die Zellmigration, die Zelladhäsion und die Transkription gesteuert. Die Transkription ermöglicht wiederum die Produktion verschiedener antiapoptotisch wirkender Signalmoleküle, die das Überleben der Zelle sichern. Der Abbau erfolgt über das Protein β -Arrestin, das die Endocytose des Rezeptors einleitet. Der Rezeptor wird zellintern über die Verschmelzung im Endosom lysosomal abgebaut und anschließend recycelt (31, 32).

Erstmalig wurde CXCR4 auf der Oberfläche von Lymphozyten entdeckt. Mittlerweile ist bekannt, dass zahlreiche Zellreihen wie hämatopoetischen Stammzellen, Endothelzellen und Epithelzellen den Rezeptor exprimieren. Viele Zellen des Immunsystems entstehen aus den Progenitorzellen der hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und tragen damit ebenfalls den Rezeptor auf ihrer Membran. Dazu gehören die B- und T-Zell Lymphozyten, die Monozyten und Makrophagen, die Neutrophilen und die Eosinophilen. Außerdem tritt CXCR4 verstärkt im Gehirn, Lunge, Kolon, Herz, Leber und Niere auf (33).

CXCR4 spielt eine essentielle Rolle bei der Entwicklung, der Hamatopoese, Organogenese und der Vaskularisation. Die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors nimmt einen direkten Einfluss auf die Migration der Zellen. Mit der Migration wird die Ortsänderung der Zelle oder eines Zellverbandes im Organismus beschrieben. Zellintern kommt es dabei zu einer zytoskelettalen Umlagerung, die durch die Aktinpolymerisation und die Pseudopodenformationen bestimmt wird. Zum anderen kann die Adhäsion von endothelialen Zellen über die vermehrte Expression von Metalloproteasen und Integrinen verstärkt werden (34). Anhand eines zellexternen CXCL12-Konzentrationsgefälles wird dabei der Ort der Migration bestimmt. Dieser Mechanismus wird ebenfalls beim Homing der Hämopoetischen Stammzellen im Knochenmark angewendet. Die Stromazellen des Knochenmarks produzieren eine erhöhte Konzentration des als Botenstoff wirkenden Liganden, wodurch die Progenitorzellen, die CXCR4 exprimieren, angelockt werden (35).

Bei Erwachsenen ist der Rezeptor weiterhin ein integraler Baustein zur Retention und zur Differenzierung von HSC im Knochenmark. Durch die Steuerung der lymphoiden Mikroumgebung und deren Migration ins Gewebe ist er maßgeblich an Entzündungsreaktionen beteiligt. Die Expression des Membranrezeptors CXCR4 lockt chemotaktisch diverse Immunzellen, wie CD4+-Zellen, CD8+-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen in das entzündete Gewebe (30).

Aufgrund dessen kann eine höhere CXCL12 Konzentration in verletzten Geweben zum Beispiel nach einer Ischämie oder einem toxischen Leberzellschaden gefunden werden (33).

Die Angiogenese wird ebenfalls durch den Einfluss von CXCR4 reguliert. Es zeigt sich, dass bei diesem Mechanismus CXCR4 unabhängig von CXCL12 als Regulator fungiert (36, 37).

2.4.2 Tumorspezifische Eigenschaften

Der CXCL12/CXCR4-Signalweg zeigt neben dem physiologischen Nutzen auch eine Expression in pathologischen Tumorgeweben. Der Transmembranrezeptor konnte in 23 verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden.

Eine mögliche Erklärung wäre ein häufiges Auftreten von hypoxischen Zuständen in Folge schnellen Tumorwachstums. Diese Hypoxie aktiviert den HIF 1 α (hypoxia induced factor 1 alpha) das zu einer vermehrten Transkription verschiedener Gene, unter anderem CXCR4, führt (38, 39). Auch andere Signalmoleküle wie VEGF und NF- κ B, die von Tumorzellen gebildet werden, führen zur vermehrten Expression von CXCR4 (31).

Verschiedene Studien legen die Vermutung nahe, dass die Expression von CXCR4 in Tumorzellen die Angiogenese, die Proliferation und die Invasivität der Tumorzellen begünstigt (30, 39, 40).

Weiterhin konnte in Studien bei verschiedenen Tumorentitäten gezeigt werden, dass die Aktivierung des CXCL12/CXCR4-Signalweges an dem Prozess der Metastasierung beteiligt ist (36). Es wird beschrieben, dass CXCR4 einen supprimierenden Effekt auf den Prozess der Anoikis aufweist. Dieser Vorgang ähnelt der Apoptose und führt zu einem programmierten Zelltod, sollte der Zell-Matrix-Kontakt verloren gegangen sein. Wird dieser Kontrollmechanismus unterdrückt, überleben die kontaktlosen Zellen besser und es kann zu einer vermehrten Metastasierung kommen (32),(41). Daneben werden noch weitere Theorien, die CXCR4 in Verbindung mit der Metastasierung des Tumors bringen, diskutiert. Bei Brustkrebs wird von A. Müller et al. die Rolle des CXCR4 in der organselektiven Metastasierung beschrieben (34). Mammäre Karzinome, die eine Expression von CXCR4 oder CCR7 aufweisen, metastasieren vorwiegend in Organe, die die Liganden dieser Rezeptoren, CXCL12 und CCL21, vermehrt exprimieren. Dazu gehören die Lymphknoten, Knochen, die Lunge und die Bauchhöhle (39). Dabei geht man davon aus, dass sich die Tumorzelle den direkten Einfluss von CXCR4 auf die Migration anhand des Ligandenkonzentrationsgefälles, zu Nutze macht (33). Im Folgenden konnte bei einer *in vivo* Inhibition des CXCL12/CXCR4-Signalwegs eine Reduktion der Metastasierung, besonders in Lymphknoten und Lunge, gezeigt werden. Dieser Zusammenhang wurde

auch von Iwasa et al. (35) beim Magenkarzinom untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen dem histologischen Typ und der Expression von CXCR4 gibt. Während der intestinale Typ vermehrt CXCR4 exprimiert, ließ sich beim diffusen Typ nur eine geringe oder keine Expression nachweisen. Weiterhin zeigt sich, dass beim Vorliegen des intestinalen Typs die Expression des CXCR4 mit der Tumorgroße, der äußeren Erscheinung und der Tiefeninvasion des Karzinoms assoziiert war. Es lag ebenfalls eine positive Korrelation mit dem Auftreten lymphatischer und vaskulärer Invasion sowie mit dem Vorhandensein von Lymph- und Lungenmetastasen vor. Für den diffusen Typ konnten keine signifikanten Zusammenhänge mit der Expression des CXCR4 hergestellt werden (35).

Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch die Untersuchungen von Arigami et al. (42), die eine Korrelation zum histopathologischen Typ, der Tumorgroße und lymphatischer und vaskulärer Invasion nachwies. Weiterhin wurde das Auftreten von Mikrometastasen in Lymphknoten bei zunächst pN0 deklarierten Patienten untersucht. Dabei konnte ein erhöhtes Auftreten der Mikrometastasen zusammen mit einer Expression von CXCR4 und dem CCR7 gezeigt werden (42, 43).

Neben den beschriebenen Fernmetastasen fanden Yasumoto et al. (44) einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Peritonealkarzinose bei primären gastralen Karzinomen und der Expression von CXCR4. Sie vermuten, dass die Produktion von CXCL12 in Mesothelzellen des Peritoneum zum einen die organspezifische Metastasierung steuert und zum anderen das Überleben und die Proliferation der CXCR4 exprimierenden Tumorzellen innerhalb der Peritonealhöhle verbessern. Aufgrund dieser Ergebnisse wird von einigen Autoren postuliert, dass eine Evaluation des CXCR4/CCR7-Status bei Patienten mit einem gastralen Karzinom das Risiko für das Auftreten von Mikrometastasen sowie einer Peritonealkarzinose besser abschätzen lassen könnte. Dieses Verfahren könnte die Therapie weitestgehend beeinflussen, besonders bei minimal invasiv, mit einer ESD therapierten Patienten, die keiner Lymphadenektomie unterzogen worden sind (42, 44).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Die Lösungen und Puffer, die in Tabelle 7 aufgeführt sind, werden zur immunhistochemischen Färbung verwendet.

Tabelle 7: Lösungen und Puffer zur Herstellung der immunhistochemischen Färbungen von CXCR4

Material	Quelle
Mikroskop	
100 % Ethanol	reinst Carl Roth GmbH, Karlsruhe
96% Ethanol	entsprechende Verdünnung, 40ml A. dest + 960ml 100% Ethanol
70% Ethanol	entsprechende Verdünnung, 300ml A. dest +700ml 100% Ethanol
50% Ethanol	entsprechende Verdünnung, 500ml A. dest +500ml 100% Ethanol
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Leitungswasser	Stadtwerke Mainz
Acqua dest	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
EnVision Wash Buffer (20x)	1:20 in A. dest verdünnen Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x)	1:50 in A. dest verdünnen Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
EnVision FLEX Block	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
CXCR4 Primärantikörper Verdünnung 1:100	Klon UMB2 (ab124824), 1 µl CXCR4 + 99 µl EnVision Antibody Diluent Abcam, Berlin
EnVision Antibody Diluent	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
EnVision FLEX Substrate Working Solution	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Sekundär Reagenz: FLEX rabbit	FLEX EnVision HRP Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Tertiärreagenz: FLEX Envision	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Chromogen: FLEX DAB	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Hämatotoxylin	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Entellan, Eukitt	Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt

3.2 Methoden

3.2.1 Vorbereitung der Proben-Epitop-Demaskierung

Biologische Präparate werden durch eine Behandlung in Formaldehyd und anschließender Paraffinierung haltbar gemacht. Dadurch können diese Proben über einen langen Zeitraum zur Aufbereitung verwendet werden. Durch die Bindung und Quervernetzung zwischen den Proteinen des Präparats und dem Paraffin werden die Färbungen sowie die Isolation des Gewebes erschwert oder vollständig verhindert.

Daher muss die Probe vor der immunhistochemischen Färbung zunächst entparaffiniert werden. Weiterhin befindet sich der Antikörper, mit welchem die Färbung vollzogen wird, in einer wässrigen Lösung. Zur Sicherstellung eines guten Bindungsverhältnisses zwischen Antikörper und Antigen auf der Probe werden die Schnitte nach der Entparaffinisierung zusätzlich rehydriert.

Der Vorgang wird, wie in Abbildung 7 schematisch dargestellt, durchgeführt.

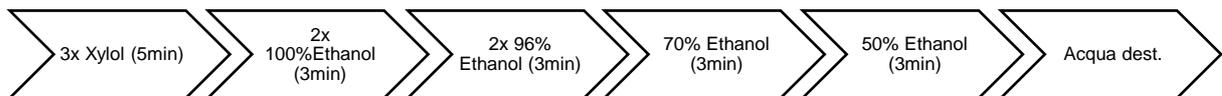


Abbildung 7: Ablauf: Prozess der Rehydrierung bei einer immunhistochemischen Färbung; Legende (Zeit, die die Proben in der jeweiligen Flüssigkeit verbleiben)

Dafür werden die Präparate zunächst in drei hintereinander folgende Behälter, mit Xylol, für jeweils fünf Minuten getaucht. Xylol sorgt für eine Auflösung des Paraffins. Anschließend werden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (45).

Zum erfolgreichen Abschluss einer Epitop-Demaskierung wird die EnVision FLEX Target Retrieval Solution in einem handelsüblichen Dampfgarer auf 100°C erhitzt und die Präparate 20min bei einem pH-Wert von 6,1 gekocht. Zuletzt werden die Schnitte bei Raumtemperatur im EnVision FLEX Wash Buffer (1x) fünf Minuten abgekühlt (46).

3.2.2 Immunhistochemische Färbung

Das Prinzip einer immunhistochemischen Färbung beruht auf der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung. Dadurch können spezielle Strukturen des Präparats sichtbar gemacht werden. Der Färbeprozess beinhaltet zwei Schritte. Zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse werden zu Beginn der Färbung die natürlich im Präparat vorkommenden Peroxidasen mit einer Lösung aus wasserstoffperoxidhaltigem Phosphatpuffer geblockt.

Es folgt die Zugabe des Primärantikörpers, aus Maus oder Kaninchen. Dieser bindet das für ihn spezifische Antigen auf der Probe. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, werden die Präparate zwischenzeitlich gründlich gespült. Durch die weitere Zugabe eines Linkers wird eine Signalverstärkung erzeugt.

Im zweiten Schritt wird der Sekundärantikörper aufgetragen. Dieser ist ein Ziegenantikörpermolekül, welches gegen Kaninchen und Maus gerichtet ist und zusätzlich über einen Enzym-Biotin-Komplex das Enzym Peroxidase gebunden hat. Daher kann er zum einen den Primärantikörper binden, zum anderen bewirkt er über die Enzymreaktion eine Braunfärbung an der Stelle der Primärantikörperbindung. Bei Zugabe eines Chromogens wird dieses, durch die katalytische Wirkung der Peroxidase, zu einem bräunlichen Farbstoff umgesetzt (47).

Zur besseren Auswertung wird eine Gegenfärbung mit Hämatotoxylin durchgeführt, die zu einer Blaufärbung der Zellkerne führt (45).

Die immunhistochemische Färbung wird automatisiert durch das Gerät, wie in Abbildung 8 gezeigt, durchgeführt. Dabei ist besonders darauf zu achten, dass während des Ablaufs die Präparate nicht austrocknen (48).

Zur Qualitätskontrolle laufen bei jedem Färbeprozess eine Positiv- und eine Negativkontrolle mit.

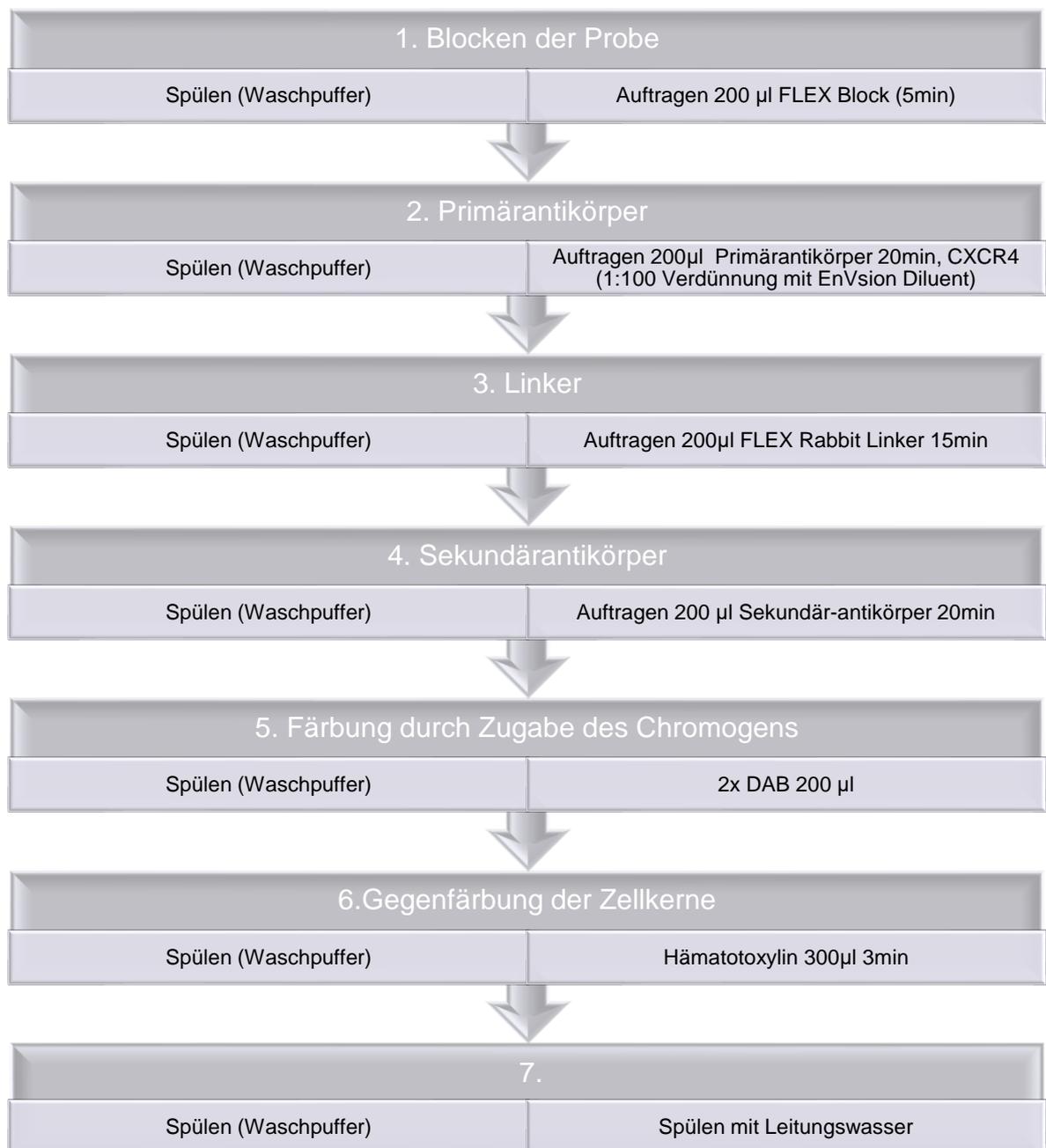


Abbildung 8: Flowchart: Einzelne Prozessschritte der immunhistochemischen Färbung von CXCR4 im Dako Autostainer (48)

Nach Abschluss der Färbung werden die Proben anschließend dehydriert. Dafür wird die Alkoholreihe, die in Abbildung 7 zu sehen ist, in umgekehrter Reihenfolge für jeweils fünf Minuten erneut durchlaufen.

Im letzten Schritt wird auf die Objektträger ein Tropfen Entellan gegeben und mit einem Deckglas bedeckt (48).

3.2.3 Mikroskopische Auswertung

Nachfolgend wurden die Präparate in Zusammenarbeit mit dem pathologischen Institut Mainz ausgewertet. Dafür wurden diese zweifach, einmal durch die Doktorandin selbst und einmal durch einen Pathologen gesichtet. Für die Auswertung wurde ein handelsübliches Lichtmikroskop mit der maximalen Vergrößerung von 200 verwendet. Vor Beginn der Auswertung wurden die Kriterien der Positivität einer Probe, aufgeführt in Tabelle 8, festgelegt.

Tabelle 8: Kriterien der mikroskopischen Auswertung zur Kategorisierung der Präparate als CXCR4 positiv

1. Färbung der Zellen des Adenokarzinom des Magens
2. Membranfärbungen
3. Keine Überfärbung der Zellen

Diese Kriterien sollen dafür Sorge tragen, dass die Rate der falsch positiven Ergebnisse möglichst geringgehalten wird.

Zunächst ist es essentiell die Tumorzellen von gesundem Gewebe zu differenzieren. Dafür wurden verschiedene histologische Kriterien angewandt, die typisch für maligne Zellreihen sind. Makroskopisch lassen sich auf der Schnittfläche häufig regressive Veränderungen nachweisen. Typischerweise sind Blutungen, Nekrosen, Verkalkungen und Narben zu erkennen. Mikroskopisch weisen maligne Tumore im Gegensatz zu gesunden Zellen Unterschiede in der Differenzierung, Wachstumsform, Abgrenzbarkeit zum restlichen Gewebe und Kernmorphismen auf. Die Differenzierung ist schlecht bis nicht vorhanden, meist ist eine atypische Gewebeformation erkennbar. Das Wachstum ist invasiv und häufig von einer Verdrängung des gesunden Gewebes begleitet. Die Tumorzellen sind im gesunden Gewebe fixiert und diffus in diesem verteilt, wodurch die Abgrenzung von der Umgebung erschwert wird. Der Zellkern maligner Zellen weist meist mehrere Besonderheiten auf: Zum einen liegt ein Kernpolymorphismus und eine Polyploidität vor. Das bedeutet, dass die Zellkerne mit sehr unterschiedlichen Erscheinungsbildern bezüglich Form und Größe auftreten und gleichzeitig häufig auch eine Verschmelzung mehrerer Zellkerne nachweisbar ist. Zum anderen ist die Kern-Plasma-Relation in Richtung des Kerns verschoben. Zuletzt weisen maligne Zellen viele vergrößerte Nukleolen auf (8). Aufgrund dieser Kriterien

sollten die Zellen des Adenokarzinoms innerhalb des Schnittes von den anderen Zellen differenziert werden.

CXCR4 ist ein Membranrezeptor, der sowohl in Tumorzellen als auch in anderen Zellreihen des menschlichen Körpers, insbesondere Immunzellen, physiologisch exprimiert wird. Aufgrund der immunologischen Reaktion des Körpers auf das Tumorgewebe, sind CXCR4-Färbungen im Stroma des Gewebes zu erwarten. Die Detektion von Immunzellinfiltraten in der Nähe des Tumors, sowie deren Expression des Membranrezeptors CXCR4, wird als Nebenkriterium in die Auswertung aufgenommen. Weiterhin wird als Hauptkriterium die Membranfärbung der Zellen festgelegt. Dies bedeutet, die Probe wird nur als positiv gewertet, wenn der Rezeptor tatsächlich in der Membran der Zelle verankert ist. Befindet sich CXCR4 innerhalb der Zelle und färbt sich somit nur das Zytoplasma oder der Nukleus an, aber nicht die Membran, wird die Probe nicht als positiv deklariert. Zuletzt soll eine Überfärbung des Präparats ausgeschlossen werden. Dazu sollten sich in der Probe neben angefärbten Zellen auch negative Zellen befinden. Sollten neben den Tumorzellen auch über 90% der restlichen Zellen gefärbt sein, würde dies für eine Überfärbung des Präparats sprechen. Zum anderen wird eine Klassifikation eingeführt, mit der die Stärke der Expression eingeteilt werden kann. Die Klassifikation wird in Tabelle 9 ersichtlich. Dabei wird nicht die Signalstärke der Färbung, sondern die Prozentzahl der gefärbten Zellen an der Gesamtzahl der Tumorzellen auf dem Präparat als Größe festgelegt.

Tabelle 9: Einteilung der Stärke der Expression von CXCR4

Einteilungsgrad der Expressionsstärke	n (%)
1	< 10
2	10-50
3	>50

Legende: n= prozentualer Anteil der immunhistochemisch gefärbten Tumorzellen an allen malignen Zellen auf dem Schnittpräparat

3.2.4 *Statistische Auswertung* und Datenanalyse

Die in der EXPAND-Studie erhobenen Daten des Gesamtkollektivs werden auf das Subkollektiv, der 459 untersuchten Patienten, begrenzt und mit den Ergebnissen der mikroskopischen Auswertung in einer Excel-Tabelle zusammengefasst. Anschließend

wird diese Tabelle zur Auswertung in das Statistikprogramm SPSS (SPSS Statistics Version 23, IBM, Armonk, NY, USA) importiert. Bei der deskriptiven Datenanalyse wird das Subkollektiv nochmals in beide Behandlungsarme, die Leitlinientherapie mit Cisplatin und Capecitabin (6) und die experimentelle Therapie mit zusätzlicher Gabe von Cetuximab (CTX), unterteilt. Alle statistischen Analysen sind rein explorativ und erfolgen somit ohne multiple Testkorrektur. Es liegt keine Kontrolle der FWER (familywise error rate) vor. Testergebnisse mit einem p-Wert < 0,05 werden daher nur als statistisch relevant, nicht jedoch als statistisch signifikant bezeichnet.

3.2.4.1 Auswertung Kreuztabellen

Bei der Untersuchung von Zusammenhängen zwischen der CXCR4-Expression (kategorial) und patienten- oder tumorspezifischen Eigenschaften (kategorial) werden Kreuztabellen verwendet. In diesen können absolute und relative Häufigkeiten der Kombinationen zweier Merkmale dargestellt werden. Mithilfe des Chi-Quadrat-Testes oder dem exakten Test nach Fisher kann zusätzlich auf die Abhängigkeit der beiden Variablen getestet werden.

Dabei wird die Nullhypothese, dass die beiden Variablen keinen Einfluss aufeinander zeigen, mit der Formel in Abbildung 9 geprüft.

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{beobachtete Häufigkeit} - \text{erwartete Häufigkeit})^2}{(\text{erwartete Häufigkeit})}$$

Abbildung 9: Formel zur Berechnung des Chi-Quadrat-Wertes aus einer Kreuztabelle (49)

Anschließend wird der Freiheitsgrad der Tabelle nach der Formel in Abbildung 10 ermittelt.

$$d_f = (\text{Anzahl der Spalten} - 1) * (\text{Anzahl der Zeilen} - 1)$$

Abbildung 10: Formel zur Berechnung des Freiheitsgrades im Chi-Quadrat Test (49)

Abhängig vom Freiheitsgrad werden die kritischen Werte des Chi-Quadrat-Testes bei einem lokalen Fehlerniveau der 1. Art von 5% in Tabelle 34 im Anhang aufgelistet. Liegt der errechnete Chi-Quadrat-Wert unterhalb des kritischen Wertes kann die Nullhypothese der Unabhängigkeit nicht abgelehnt werden. Andernfalls kann eine Abhängigkeit der beiden Variablen angenommen werden. Für eine zusätzliche Aussage über die Effektstärke kann bei Anwendung des Chi-Quadrat-Testes der

Assoziationskoeffizient Cramers-V (V) ermittelt werden. Dieser beschreibt quantitativ die Stärke des Zusammenhangs der Variablen und kann dabei Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Bei einem Wert von 0 kann von einer völligen Unabhängigkeit beider Variablen ausgegangen werden, ein Wert von 1 hingegen entspricht einer sehr starken Korrelation. Somit nimmt die Effektstärke der beiden Variablen mit steigenden V -Werten zu. Da der Cramer-Index nur positive Werte annimmt, lässt er keine Rückschlüsse auf die Richtung der Korrelation der beiden Variablen zu (50). Bei der deskriptiven Auswertung von Cramers-V orientieren wir uns an der Bewertung von Cleff, die in Tabelle 10 dargestellt wird (51).

Tabelle 10: Deskriptive Bewertung des Assoziationskoeffizienten Cramers-V (51)

Cramers-V	Bewertung nach Cleff
0-0,1	kein Zusammenhang
0,1-0,3	schwacher Zusammenhang
0,3-0,6	mittlerer Zusammenhang
0,6-1	starker Zusammenhang

Zur Anwendung des Chi-Quadrat-Tests wird eine minimale erwartete Häufigkeit von fünf in allen Zellen vorausgesetzt. Sollte dieser Wert aufgrund von kleinen Fallzahlen unterschritten werden, ist der exakte Test nach Fisher anzuwenden (49, 52).

Ein exakter Test nach Fisher kann nur für 2×2 Kreuztabellen, die sogenannten Vierfeldertafeln, ermittelt werden. Dieser Test berechnet dabei den exakten Wert für die Wahrscheinlichkeiten (p -Wert), die beobachteten Resultate tatsächlich zu erhalten unter der Bedingung, dass die Variablen unabhängig voneinander sind und die Randverteilung als fest angenommen werden kann. Sollte sich der p -Wert unterhalb der 0,05 Grenze befinden, liegen statistisch relevante Differenzen zwischen den beobachteten und den berechneten Wahrscheinlichkeiten vor. Daher wird die H_0 -Hypothese abgelehnt (49).

3.2.4.2 Auswertung Kaplan Meier-Kurven

Zur Auswertung der Hauptfragestellung, inwiefern die CXCR4-Expression einen Einfluss auf das Gesamtüberleben bei Behandlung mit oder ohne Cetuximab zeigt, werden die Kaplan-Meier-Überlebensfunktionen angewendet. Die EXPAND-Studie analysierte die Ergebnisse auf der Grundlage des progressionsfreien Überlebens. In der Diskussion der Studie wird postuliert, dass sich die Verwendung des Gesamtüberlebens wahrscheinlich besser eignen würde (5). Deshalb wird in dieser Arbeit das Gesamtüberleben der Patienten als Auswertungsgrundlage herangezogen. Bei der Analyse werden stets zwei Überlebensfunktionen miteinander verglichen. Für den Signifikanztest wird der Log-Rank-Test verwendet. Dieser testet die H_0 -Hypothese, dass sich die Überlebenskurven zu keinem Zeitpunkt unterscheiden. Sollte ein p-Wert unter 0,05 nachweisbar sein, kann die H_0 -Hypothese verworfen werden (52).

4. Ergebnisse

In Abbildung 11 wird schematisch der Versuchsaufbau dargestellt. Von ursprünglich 904 EXPAND-Studienteilnehmern standen von 504 Patienten, histologische Schnitte der Tumore für eine immunhistochemische Untersuchung zur Verfügung.

Von 504 gefärbten Präparaten wurden letztendlich 459 Präparate für die Auswertung herangezogen. Aufgrund eines fehlenden Nachweis der Tumorzellen auf dem Schnitt oder einer Überfärbung des Präparats konnten 45 Proben nicht ausgewertet werden. Daher beziehen sich alle folgenden Ergebnisse auf die Gesamtzahl von 459 Patienten. Diese ausgewerteten Präparate unterteilen sich in 159 Großpräparate, 288 Biopsien und 12 nicht klassifizierte Schnitte. Dieser Versuchsaufbau ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

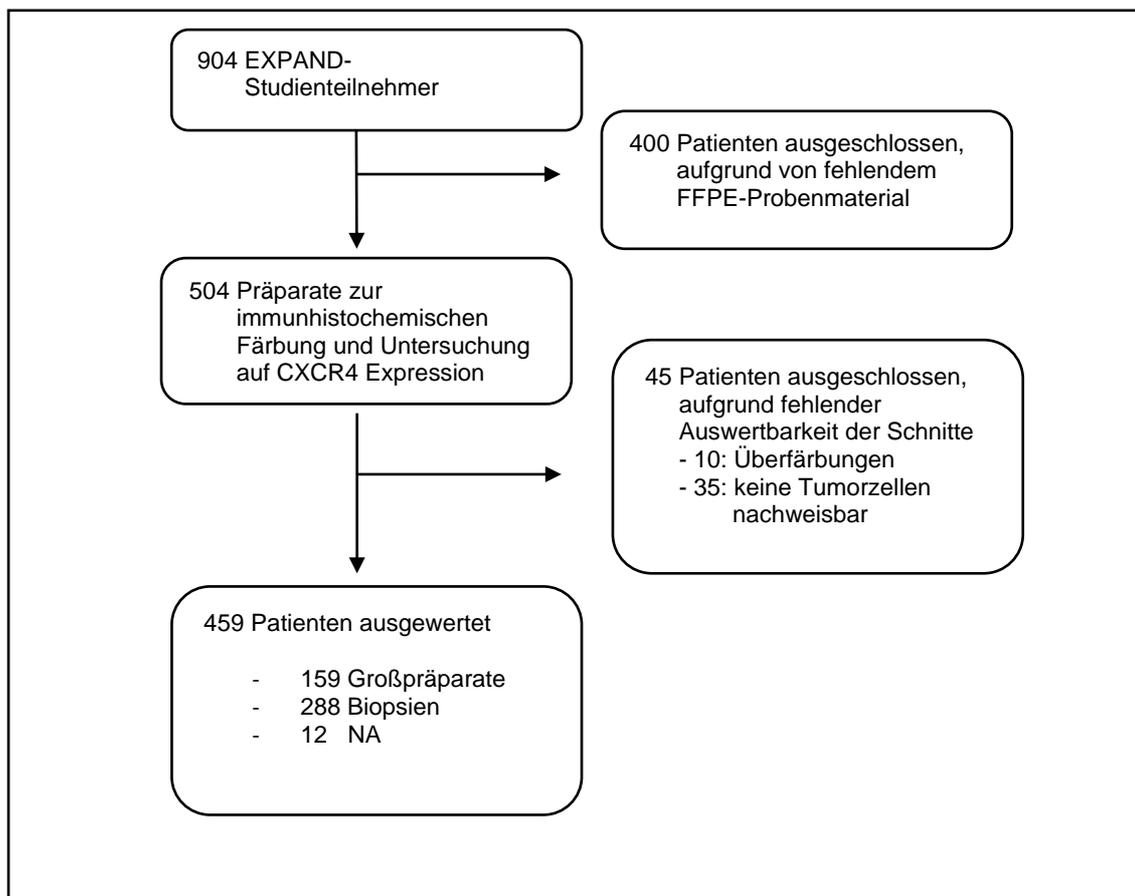


Abbildung 11: Versuchsaufbau; Legende: CXCR4=CXC-Motiv-Chemokinrezeptor, NA=Nicht klassifiziert

4.1 Vorstellung Subkollektiv

Die im Folgenden aufgeführten Tabelle 11-
Tabelle 13 stellen die in der EXPAND-Studie erhobenen Patientendaten für das hier untersuchte Subkollektiv von 459 Patienten dar. Dafür werden die erhobenen Parameter in der Gesamtzahl und aufgeteilt nach den Behandlungsarmen dargestellt.

Tabelle 11: Deskriptive Auswertung der Randomisierungsparameter der EXPAND-Studie im Subkollektiv und aufgeteilt nach Behandlungsarmen

Patienten- charakteristika	Subkollektiv n= (%)	Behandlung CT n= (%)	Behandlung CTX n= (%)	NA n= (%)
Gesamtanzahl	459 (100,0)	220 (100,0)	234 (100,0)	5 (100,0)
Oesophag- oder Gastrektomie				
Nein	345 (75,2)	168 (76,4)	174 (74,4)	3 (60,0)
Ja	114 (24,8)	52 (23,6)	60 (25,6)	2 (40,0)
M-Status				
M0	18 (3,9)	6 (2,7)	12 (5,1)	5 (100,0)
M1	440 (95,9)	213 (96,8)	222 (94,9)	
NA	1 (0,2)	1 (0,5)		

Legende: CT=Leitlinientherapie mit Chemotherapie (Cisplatin+Capecitabin); CTX=experimentelle Therapie (Kombination aus Cisplatin+Capecitabin und Cetuximab); n=Gesamtanzahl der Patienten (prozentuale Verteilung der Anzahl gemessen an der Gesamtanzahl der Spalte)

In Tabelle 11 sind die Randomisierungsparameter der EXPAND-Studie in dem Subkollektiv von 459 Patienten dargestellt. In beiden Behandlungsarmen liegt eine Gleichverteilung hinsichtlich der chirurgischen Vorbehandlung mit einer Oesophagektomie oder Gastrektomie vor. In der Leitliniengruppe wurden 76,4%, in der Experimentalgruppe 74,4% der Patientin nicht chirurgisch voroperiert, sowie jeweils 23,6% und 25,6% einer Operation unterzogen. Ähnlich verhält es sich mit dem Metastasierungsstatus, denn in der Leitliniengruppe sind 2,7%, in der Experimentalgruppe 5,1% nicht metastasiert. Wie schon im Gesamtkollektiv zeigt sich auch hier, dass die meisten Patienten ein fernmetastasiertes Stadium M1 aufweisen, mit 96,8% in der Vergleichsgruppe sowie 94,9% in der experimentellen Therapiegruppe. Die Daten der neoadjuvant durchgeführten Therapie lagen nicht vor.

Die verwendeten Randomisierungsparameter sind im untersuchten Subkollektiv gleichmäßig verteilt. Somit wird deutlich, dass das Subkollektiv ebenfalls einer Randomisierung unterliegt. Damit kann eine willkürliche Wahl der Patienten ausgeschlossen werden.

Nachfolgend werden in Tabelle 12 weitere Patientencharakteristika des Subkollektivs beschrieben.

Tabelle 12: Deskriptive Auswertung der patientenspezifischen Eigenschaften im Subkollektiv und aufgeteilt nach Behandlungsarmen

Patientencharakteristika		Subkollektiv	Behandlung	Behandlung	NA
		n= (%)	CT n= (%)	CTX n= (%)	n= (%)
Gesamtanzahl		459 (100,0)	220 (100,0)	234 (100,0)	5 (100,0)
Alter					
	Mittelwert	59,0	58,9	59,0	70,0
	Median	60	60	60	73
	Minimum	18	18	23	58
	Maximum	84	80	84	81
Geschlecht					
	weiblich	122 (26,6)	60 (27,3)	60 (25,6)	2 (40,0)
	männlich	337 (73,4)	160 (72,7)	174 (74,4)	3 (60,0)
Herkunft					
	Asiat	33 (7,2)	15 (6,8)	18 (7,7)	0 (0,0)
	Black	2 (0,4)	2 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Kaukasier	359 (78,2)	175 (79,5)	179 (76,5)	5 (100,0)
	Hispanic	47 (10,2)	17 (7,7)	30 (12,8)	0 (0,0)
	Japanese	17 (3,7)	10 (4,5)	7 (0,03)	0 (0,0)
	Other	1 (0,2)	1 (0,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
ECOG Screening					
	0	242 (52,7)	109 (49,5)	132 (56,4)	1 (20,0)
	1	217 (47,3)	111 (50,5)	102 (43,6)	4 (80,0)

Legende: CT=Leitlinientherapie mit Chemotherapie (Cisplatin+Capecitabin); CTX=experimentelle Therapie (Kombination aus Cisplatin+Capecitabin und Cetuximab); n=Gesamtanzahl der Patienten (prozentuale Verteilung der Anzahl gemessen an der Gesamtanzahl der Spalte)

Das Durchschnittsalter der eingeschlossenen Patienten lag im Median bei 60 Jahren. Die Altersspanne reicht von 18 bis einschließlich 84 Jahren. Dabei sind 26,6% der Patienten weiblich und 73,4% männlich. Diese Eigenschaft sowie der Medianwert des Alters sind in beiden Behandlungsarmen gleichermaßen verteilt. Die Studienteilnehmer kommen aus 64 verschiedenen Ländern, wobei der größte Anteil mit 78,2% auf Kaukasier entfällt.

Die untersuchten Patienten wiesen zu Beginn der Therapie in 52,7% einen ECOG-Status 0 und in 47,3% einen ECOG-Status 1 auf. Diese Gleichverteilung zeigte sich auch in den beiden Behandlungsarmen.

Aus der

Tabelle 13 sind die Tumoreigenschaften der untersuchten Patienten zu entnehmen. Die meisten Tumore zeigen hinsichtlich der TNM-Klassifikation ein fortgeschrittenes Stadium. Während bei 43 Patienten (9,5%) ein T1-T2b-Stadium des Tumors nachgewiesen werden konnte, haben 251 Probanden (54,4%) ein fortgeschrittenes Karzinom mit Stadium T3-T4a.

Dies bestätigt sich auch im nodalen Verteilungsmuster der Tumore sowie bei dem Metastasierungsgrad. Nur 59 Patienten (12,9%) des Subkollektives weisen ein N0-Status auf. Am häufigsten zeigt sich mit 44,7% ein N1-N2 Befall der Lymphknoten. Ein N3-Status wird bei 14,6% nachgewiesen. Wie schon in der EXPAND Studie beschrieben, sind die meisten Studienteilnehmer fernmetastasiert. Einen M1-Status haben 95,9% aller Probanden. In Bezug auf die Behandlungsarme zeigt sich eine Gleichverteilung der TNM-Kriterien.

Bei der Betrachtung des Gratings, also dem Differenzierungsgrad der Tumore, entfallen die meisten Proben auf einen G3-Status. Damit zeigen 37,5% ein entdifferenziertes Wachstum, wobei nur 3,7% der Tumore ein G1-Stadium, und damit eine gute Differenzierung aufweisen.

Zuletzt wurde der Tumor nach der Laurén-Klassifikation eingeteilt. Dabei konnte am häufigsten mit 41,8% der intestinale Typ nachgewiesen werden. Daneben wuchsen 15,5% der Tumore diffus und 6,3% der Tumore wiesen ein gemischtes Wachstumsmuster auf. Diese Verteilung ließ sich auch bei den 904 Patienten des Gesamtkollektivs zeigen (5).

Tabelle 13: Deskriptive Auswertung der tumorspezifischen Eigenschaften im Subkollektiv und aufgeteilt nach Behandlungsarmen

Patientencharakteristika	Subkollektiv n= (%)	Behandlung CT n= (%)	Behandlung CTX n= (%)	NA n= (%)
Gesamtanzahl	459 (100,0)	220 (100,0)	234 (100,0)	5 (100,0)
T-Status				
TX	45 (9,8)	20 (9,1)	25 (10,7)	0 (0,0)
T1	3 (0,7)	0 (0,0)	3 (1,3)	0 (0,0)
T2	37 (8,1)	20 (9,1)	17 (7,3)	0 (0,0)
T2b	3 (0,7)	1 (0,5)	2 (0,9)	0 (0,0)
T3	137 (29,8)	66 (30,0)	68 (29,1)	3 (60,0)
T4	113 (24,6)	58 (26,4)	55 (23,5)	0 (0,0)
T4a	1 (0,2)	0 (0,0)	1 (0,4)	0 (0,0)
NA	120 (26,1)	55 (25,0)	63 (26,9)	2 (40,0)
N-Status				
N0	59 (12,9)	33 (15,0)	26 (11,1)	1 (20,0)
N1	115 (25,1)	54 (24,5)	60 (25,6)	2 (40,0)
N2	90 (19,6)	41 (18,6)	47 (20,1)	0 (0,0)
N3	66 (14,4)	26 (11,8)	40 (17,1)	0 (0,0)
N3a	1 (0,2)	1 (0,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
NA	128 (27,9)	33 (15,0)	61 (26,1)	2 (40,0)
M-Status				
M0	18 (3,9)	6 (2,7)	12 (5,1)	5 (100,0)
M1	440 (95,9)	213 (96,8)	222 (94,9)	0 (0,0)
NA	1 (0,2)	1 (0,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
Metastasen				
Leber:	230 (50,1)	104 (47,3)	124 (53,0)	2 (40,0)
Lunge:	101 (22,0)	49 (22,3)	50 (21,4)	2 (40,0)
Knochen:	25 (5,4)	14 (6,4)	10 (4,3)	1 (20,0)
Andere:	327 (71,2)	159 (72,3)	164 (70,1)	4 (80,0)
G-Status				
Grade 1	17 (3,7)	8 (3,6)	9 (3,8)	0 (0,0)
Grade 2	120 (26,1)	51 (23,2)	67 (28,6)	2 (40)
Grade 3	172 (37,5)	93 (42,3)	76 (32,5)	3 (60)
NA	150 (32,7)	68 (30,9)	82 (35,0)	0 (0,0)
Laurén-Klassifikation				
Diffuse type	71 (15,5)	38 (17,3)	33 (14,1)	4 (80)
Intestinal type	192 (41,8)	85 (38,6)	103 (44,0)	0 (0,0)
Mixed-	29 (6,3)	14 (6,4)	14 (6,0)	1 (20)
NA	167 (36,4)	83 (37,7)	84 (35,9)	0 (0,0)

Legende: CT=Leitlinientherapie mit Chemotherapie (Cisplatin+Capecitabin); CTX=experimentelle Therapie (Kombination aus Cisplatin+Capecitabin und Cetuximab); n=Gesamtanzahl der Patienten (prozentuale Verteilung der Anzahl gemessen an der Gesamtanzahl der Spalte), NA=nicht klassifiziert

Tabelle 14: Deskriptive Auswertung der anatomischen Lage der Karzinome im Subkollektiv und aufgeteilt nach Behandlungsarmen

Patientencharakteristika	Subkollektiv n= (%)	Behandlung CT n= (%)	Behandlung CTX n= (%)	NA n= (%)
Gesamtanzahl	459 (100,0)	220 (100,0)	234 (100,0)	5 (100,0)
Anatomische Lage des Tumors				
AEG I	32 (7,0)	13 (5,9)	17 (7,3)	2 (40,0)
AEG II	39 (8,5)	19 (8,6)	20 (8,5)	0 (0,0)
AEG III	24 (5,2)	12 (5,5)	12 (5,1)	0 (0,0)
Magenkarzinom	353 (76,9)	172 (78,2)	178 (76,1)	3 (60,0)
NA	11 (2,4)	4 (1,8)	7 (3,0)	0 (0,0)

Legende: CT=Leitlinientherapie mit Chemotherapie (Cisplatin+Capecitabin); CTX=experimentelle Therapie (Kombination aus Cisplatin+Capecitabin und Cetuximab); n=Gesamtanzahl der Patienten (prozentuale Verteilung der Anzahl gemessen an der Gesamtanzahl der Spalte), NA=nicht klassifiziert.

In Legende: CT=Leitlinientherapie mit Chemotherapie (Cisplatin+Capecitabin); CTX=experimentelle Therapie (Kombination aus Cisplatin+Capecitabin und Cetuximab); n=Gesamtanzahl der Patienten (prozentuale Verteilung der Anzahl gemessen an der Gesamtanzahl der Spalte), NA=nicht klassifiziert

Tabelle 14 wird der Tumor nach seiner anatomischen Lage eingeteilt. Die meisten Patienten mit 76,9% erkrankten an einem Magenkarzinom. 20,7% der Studienteilnehmer hingegen weisen ein Karzinom des gastroösophagealen Übergangs auf. Unter den AEG-Tumoren war der Typ II mit 8,5% der häufigste, gefolgt vom Typ I mit 7,0% und Typ III mit 5,2%.

4.2 Färbung

Im folgenden Kapitel wird die CXCR4-Färbung und histologische Auswertung der 459 Tumorschnitte auf die Expression von CXCR4 dargestellt.

Bei jedem Durchlauf der immunhistochemischen Färbung wird jeweils eine Positivkontrolle aus humaner Leber zur Qualitätsprüfung angefertigt. Durch eine vermehrte Expression von CXCR4 eignen sich Hepatozyten gut als Positivkontrolle des Färbeprozesses. Zur Veranschaulichung findet sich eine Kontrolle in Abbildung 12. Hauptsächlich färben sich die Membranen der Hepatozyten, während Zellkerne und Zytoplasma weitestgehend ungefärbt bleiben. Die in dieser Arbeit gezeigten Beispiele der Färbepreparate sind mit 100 bis 200-facher Vergrößerung aufgenommen, und zeigen somit lediglich kleine, exemplarische Ausschnitte der untersuchten Präparate. Bei den gewählten Beispielen handelt es sich ausschließlich um Großpräparate.

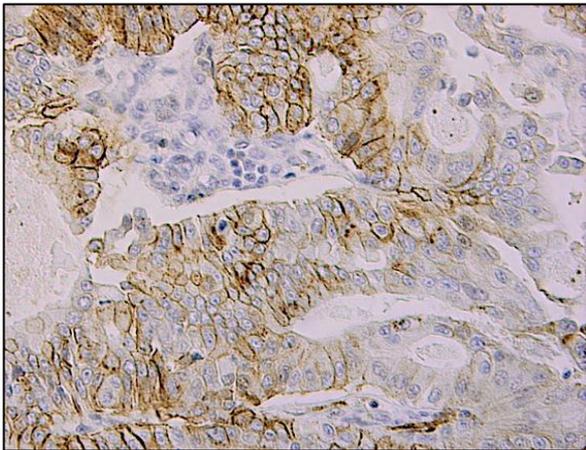


Abbildung 12: Positivkontrolle der immunhistochemischen Färbung des CXCR4-Membranrezeptors bei humanen Hepatozyten (200-fache Vergrößerung)

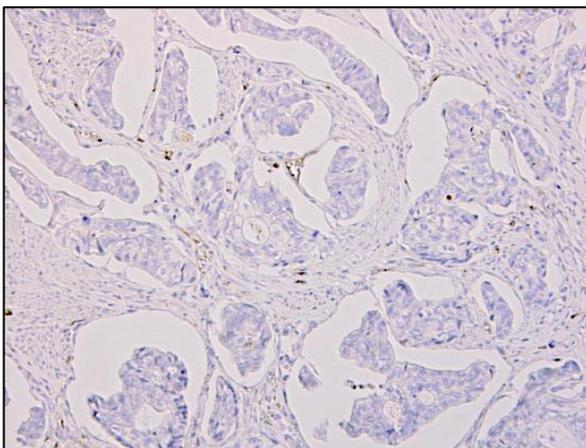


Abbildung 13: Negativkontrolle der CXCR4-Färbung eines Tumorschnittes der EXPAND-Studie, Tumorzellen zeigen typische pleomorphe große Nukleoli, keine immunhistochemische braune Anfärbung der Zellmembranen oder der Zellen zu erkennen, bei den minimalen bräunlichen Anfärbungen handelt es sich um Artefakte (100-fache Vergrößerung)

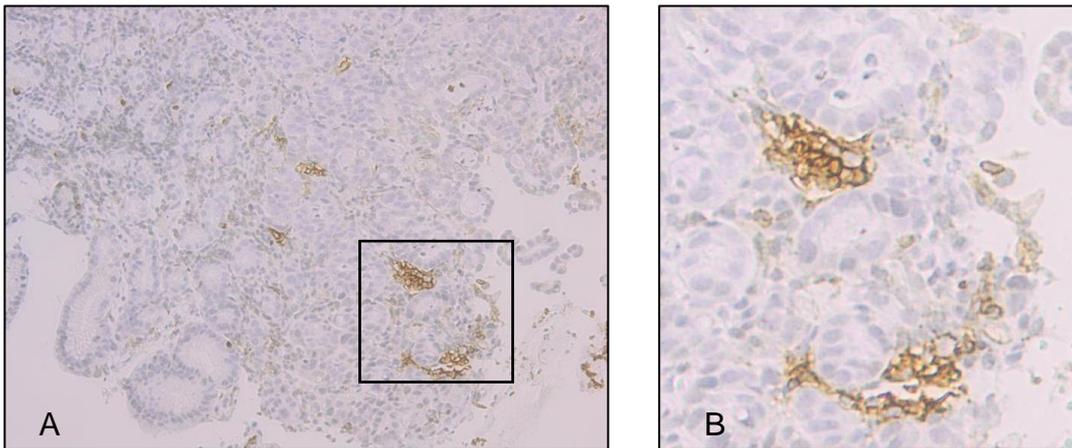


Abbildung 14: A: Tumor mit negativer Expression des CXCR4-Membranrezeptors, aber Auftreten von Immuzellinfiltraten in der Nähe des Tumors mit Expression des CXCR4-Membranrezeptors auf der Oberfläche der Immuzellen. (100-fache Vergrößerung) B: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung A

Zur Demonstration eines negativen Ergebnisses wird Abbildung 13 gezeigt. In dieser Probe kann keine Expression von CXCR4 nachgewiesen werden. In Abbildung 14 sind negative Tumorzellen mit einem positiven Struma erkennbar. Dabei handelt es sich um Immuzellen und auch vereinzelt Stromazellen, wie die Fibroblasten, die den Rezeptor CXCR4 aufweisen. Viele Immuzellen, die aus den Progenitorzellen der Hämatopoetischen Stammzellen entstehen, exprimieren CXCR4 auf ihrer Oberfläche und werden somit ebenfalls immunhistochemisch angefärbt. Allerdings kann man sie aufgrund des kleineren Durchmessers und der vereinzelt Einbettung im Stroma von den Karzinomzellen unterscheiden. Der Tumor wirkt wie ausgestanzt und hebt sich ohne jegliche Färbung von der Umgebung ab. Somit weist diese Probe positive Immuzellinfiltrate in der Nähe des Tumors mit einer Expression von CXCR4 auf, bei fehlendem CXCR4 im Tumor.

In Abbildung 15 (A-D) werden Beispiele für die positiv bewerteten Proben, nach Expressionsstärke aufgeteilt, dargestellt. Abbildung A und B weisen eine Expressionsstärke 1 auf, damit exprimieren weniger als 10% aller Tumorzellen auf dem Schnitt den Membranrezeptor CXCR4. In B werden die positiven Tumorzellen nochmals vergrößert dargestellt. Dadurch lässt sich die Membranfärbung besser beurteilen. Es ist erkennbar, dass sich neben der stärkeren bräunlichen Färbung auf der Zelloberfläche auch das Zytoplasma der Zellen angefärbt hat. Der blaue Zellkern lässt sich gut davon abgrenzen.

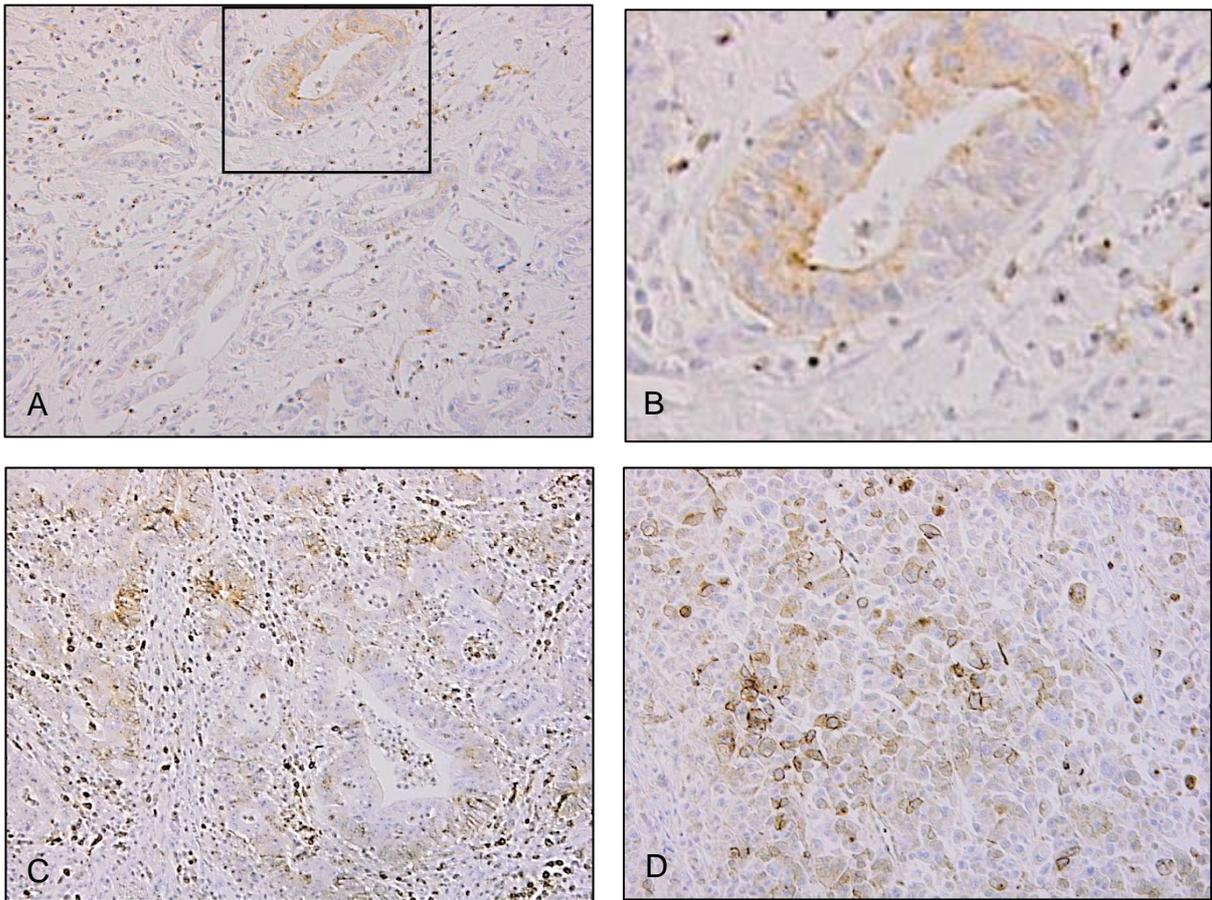


Abbildung 15: Tumorschnitte mit positiv exprimierenden Tumoren der Stärke 1-3; A: Tumor CXCR4 positiv Expressionsstärke 1 (unter 10% aller Tumorzellen des Präparates weisen eine Membranfärbung auf) (100-fache Vergrößerung); B: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung A; Membranfärbung der CXCR4 exprimierenden Tumorzellen C: Tumor CXCR4 positiv Expressionsstärke 2 (10-50% aller Tumorzellen des Präparates weisen eine Membranfärbung auf) (100-fache Vergrößerung); D: Tumor CXCR4 positiv Expressionsstärke 3 (mehr als 50% aller Tumorzellen des Präparates weisen eine Membranfärbung auf) (200-fache Vergrößerung)

In Abbildung C wird exemplarisch ein Präparat mit der Expressionsstärke 2 abgebildet. Zwischen 10-50% der Tumorzellen exprimieren hier den Membranrezeptor CXCR4 auf ihrer Oberfläche. Es können mehrere Tumornester mit einer unterschiedlich starken Anfärbung gesehen werden. Daneben sind ebenfalls wieder kleinere Immunzellen im Stroma zu finden, die ebenfalls das CXCR4 exprimieren. Zuletzt wird in D ein Präparat mit Expressionsstärke 3 gezeigt, hier exprimieren mehr als 50% der Tumorzellen den Rezeptor.

Nachfolgend werden in Tabelle 15 die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung veranschaulicht.

Tabelle 15: Deskriptive Auswertung des Stärkegrades der Expression von CXCR4 im Tumor, dargestellt im Subkollektiv und aufgeteilt nach Behandlungsarmen

	Subkollektiv n= (%)	Behandlung CT n= (%)	Behandlung CTX n= (%)	NA n= (%)
Gesamtanzahl	459 (100,0)	220 (100,0)	234 (100,0)	5 (100,0)
CXCR4 Expression im Tumor				
negativ	421 (91,7)	204 (92,7)	213 (91,0)	4 (80,0)
schwach (<10%)	26 (5,7)	12 (5,5)	13 (5,6)	1 (20,0)
moderat (10-50%)	9 (0,02)	3 (1,4)	6 (2,6)	0 (0,0)
Stark (>50%)	3 (0,7)	1 (0,5)	2 (0,9)	0 (0,0)

Legende: CT=Leitlinientherapie mit Chemotherapie (Cisplatin+Capecitabin); CTX=experimentelle Therapie (Kombination aus Cisplatin+Capecitabin und Cetuximab); NA= Nicht kategorisiert; n=Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung der Anzahl gemessen an der Gesamtanzahl der Spalte)

In 421 Proben des Adenokarzinoms des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs konnte kein Nachweis einer CXCR4-Expression geführt werden. Ein positives Ergebnis wird bei 38 Präparaten nachgewiesen. Dies entspricht 8,4 % des Subkollektivs. Die meisten positiven Proben werden der Expressionsstärke 1 zugeteilt, dabei entfallen 5,7% auf diese Gruppe. Weiterhin zeigen 2% der Präparate eine Expressionsstärke des Grades 2. Eine hohe Expressionsrate von über 50% haben lediglich 3 der 459 untersuchten Präparate, dies entspricht 0,7%.

Aufgrund des geringen Anteils der CXCR4-Expression im gesamten Subkollektiv werden in den statistischen Untersuchungen alle Expressionsstärken zusammengenommen und vereinfacht nur in Expression und Nicht-Expression unterteilt.

Insgesamt wurden 459 Präparate untersucht, davon waren wie in Abbildung 11 beschrieben 158 Großpräparate und 288 Biopsien. 12 Schnitte sind dabei nicht kategorisiert. Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Nachweis einer CXCR4-Expression und der Art des pathologischen Präparates wurden die beiden Variablen in

Tabelle 16 als Kreuztabelle dargestellt.

Tabelle 16: Kreuztabelle: Art des pathologischen Präparates und CXCR4 Expression des Tumors

		CXCR4 Expression des Tumors			
		n= (%)			
Präparate	n= (%)	negativ	positiv		
		B	278 (96,5)	10 (3,5)	288 (100,0)
		GP	131 (82,4)	28 (17,6)	159 (100,0)
		409 (91,5)	38 (8,5)	447 (100,0)	

Legende: n= Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung auf die Gesamtzahl der Zeilen); B: Präparat als Biopsie; GP: Präparat als Großpräparat

Es zeigt sich, dass auf 17,6% der Großpräparate eine Expression des CXCR4 nachgewiesen werden konnte, allerdings nur bei 3,5% der Biopsien.

Diese Abhängigkeit der beiden Variablen wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests überprüft. Bei einem Wert von $\chi^2=26,324$ und einem Freiheitsgrad von 1 wird der kritische Wert des Chi-Quadrat-Tests bei einem p-Wert von 0,00 überschritten. Die Berechnung des Assoziationskoeffizienten Cramers-V ergibt 0,243. Damit kann eine Abhängigkeit mit schwacher Effektstärke nachgewiesen werden.

Neben dem Tumor selbst wird das Auftreten von Immunzellinfiltraten in der Nähe des Tumors untersucht. In Tabelle 17 wird die Expression des CXCR4 auf diesen dargestellt.

Tabelle 17: Deskriptive Auswertung des Auftretens von Immunzellinfiltraten in der Nähe des Tumors: im Subkollektiv und aufgeteilt nach Behandlungsarmen

	Subkollektiv	Behandlung CT	Behandlung CTX	NA
	n= (%)	n= (%)	n= (%)	n= (%)
Gesamtanzahl	459 (100,0)	220 (100,0)	234 (100,0)	5 (100,0)
Immunzellinfiltraten in der Nähe des Tumors				
ja	126 (27,5)	61 (27,7)	64 (27,4)	1 (20,0)
nein	333 (72,5)	159 (72,3)	170 (72,6)	4 (80,0)
Immunzellinfiltrate exprimieren CXCR4				
Ja	66 (14,4)	33 (15,0)	33 (14,1)	0 (0,0)

Nein 393 (85,6) 187 (85,0) 201 (85,9) 0 (0,0)

Legende: CT=Leitlinientherapie mit Chemotherapie (Cisplatin+Capecitabin); CTX=experimentelle Therapie (Kombination aus Cisplatin+Capecitabin und Cetuximab); NA=nicht kategorisiert; n=Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung der Anzahl gemessen an der Gesamtanzahl der Spalte)

Bei 126 Patienten lassen sich in der näheren Umgebung des Tumors Immuzellinfiltrate nachweisen. Dabei exprimierte etwa die Hälfte (52,4%), also 66 Patienten, den Membranrezeptor CXCR4 auf ihrer Oberfläche. Eine Gleichverteilung in beiden Behandlungsarmen liegt vor.

In den Kreuz

Tabelle 18 und

Tabelle 19 wird der Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Immuzellinfiltrate und deren Expression von CXCR4 und die Expression von CXCR4 im Tumor dargestellt.

Tabelle 18: Kreuztabelle: Auftreten von Immuzellinfiltraten mit CXCR4-Expression in der Nähe des Tumors und CXCR4-Expression des Tumors

		CXCR4-Expression im Tumor		
		n= (%)		
		negativ	positiv	
Auftreten von Immuzellinfiltraten	nein	309 (92,8)	24 (7,2)	333 (100,0)
	ja	112 (88,9)	14 (11,1)	126 (100,0)
n= (%)		421 (91,7)	38 (8,3)	459 (100,0)

Legende: n=Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung auf die Gesamtzahl der Zeilen)

Es zeigt sich, dass das alleinige Auftreten von Immuzellinfiltraten ohne eine immunhistochemische Anfärbung bei positiv exprimierenden Tumoren mit 7,2%, bei negativen mit 11,1%, annähernd gleich häufig verteilt ist. Diese Beobachtung wird im Chi-Quadrat-Test verifiziert. Der p-Wert beläuft sich auf 0,176 bei einem V-Wert von 0,063. Damit kann keine Abhängigkeit zwischen dem Auftreten von Immuzellinfiltraten und der Expression von CXCR4 im Tumor gezeigt werden.

Tabelle 19: Kreuztabelle: Untersuchung im Subkollektiv (Auftreten von Immuzellinfiltraten Anzahl=126) Expression von CXCR4 in den Immuzellen und der Expression von CXCR4 im Tumor

CXCR4-Expression im Tumor

n= (%)

Auftreten von		negativ	positiv	
Immunzellinfiltraten mit Expression von CXCR4 n= (%)	nein	58 (96,7)	2 (3,3)	60 (100,0)
	ja	54 (81,8)	12 (18,2)	66 (100,0)
		112 (88,9)	14 (11,1)	126 (100,0)

Legende: n=Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung auf die Gesamtzahl der Zeilen)

Anders stellt es sich in

Tabelle 19 dar. Kann der Rezeptor CXCR4 auf der Oberfläche der Immunzellen nachgewiesen werden, dann liegt in 18,2% der Fälle auch eine Expression von CXCR4 des Tumors vor. Weisen die Immunzellen dahingegen keine Färbung auf, exprimiert der Tumor nur in 3,3% der Fälle CXCR4. Andersherum betrachtet exprimiert das Immunsystem der Patienten in 85,7% der Fälle den Rezeptor, wenn der Tumor diesen ebenfalls exprimiert. Die Durchführung des Chi-Quadrat-Tests ergibt einen Wert von $\chi^2=7,016$. Der p-Wert liegt hier bei 0,008 bei einem Cramers-V von 0,236. Ein zusätzlich durchgeführter exakter Test nach Fisher ergibt einen p-Wert von 0,01. Somit kann in beiden Unabhängigkeitstests eine Assoziation der beiden Variablen mit einem schwachen Effekt bestätigt werden. Zusammenfassend zeigt sich somit ein gehäuftes Auftreten von CXCR4-exprimierenden Immunzellen in der Nähe eines CXCR4 positiven Magenkarzinoms.

4.3 Abhängigkeit der CXCR4 Expression von Eigenschaften des Patienten und des Tumors

Dieses Kapitel untersucht den Zusammenhang zwischen der Expression des CXCR4 Membranrezeptors und dem Auftreten anderer spezifischer Eigenschaften des Tumors und der Patienten.

Dabei werden die Patienteneigenschaften hinsichtlich des Geschlechts, des Alters und der Herkunft analysiert. Bei den tumorspezifischen Eigenschaften wurden die TNM-Kriterien, das Grading, das histologische Wachstumsmuster nach Laurén sowie die lokale Einteilung in Magen- und AEG-Tumore untersucht. Dabei konnten die folgenden Ergebnisse ermittelt werden.

4.3.1 Patientenspezifische Eigenschaften

Für die Erstellung der Kreuztabellen werden die Personen hinsichtlich ihres Alters und ihrer Herkunft gruppiert.

Table 20: Kreuztabelle CXCR4-Expression des Tumors in Abhängigkeit zum Geschlecht

		CXCR4-Expression des Tumors		
		n = %		
Geschlecht n = %		NEGATIV	POSITIV	
	weiblich	115 (94,3)	7 (5,7)	122 (100,0)
	männlich	306 (90,8)	31 (9,1)	337 (100,0)
		421 (91,7)	38 (8,3)	459 (100,0)

Legende: n=Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung auf die Gesamtzahl der Zeilen)

Table 21: Kreuztabelle CXCR4-Expression in Abhängigkeit zum Alter (gruppiert in Patienten unter 65 Jahren und Patienten über 65 Jahren)

		CXCR4-Expression des Tumors		
		n = %		
Alter n = %		NEGATIV	POSITIV	
	<65 Jahre	276 (91,7)	25 (8,3)	301 (100,0)
	>65 Jahre	145 (91,8)	13 (8,2)	158 (100,0)
		421 (91,7)	38 (8,3)	459 (100,0)

Legende: n=Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung auf die Gesamtzahl der Zeile)

Table 22: Kreuztabelle CXCR4-Expression des Tumors und Herkunft der Patienten

		CXCR4-Expression des Tumors	
		n = %	
		NEGATIV	POSITIV

Herkunft n = %	Andere	376 (91,9)	33 (8,1)	409 (100,0)
	Asiaten	45 (9,0)	5 (10,0)	50 (100,0)
		421 (91,7)	38 (8,3)	459 (100,0)

Legende: Andere=gruppiert aus Kaukasiern, Hispaniens, Black und Anderen; Asiat=Asiaten und Japaner; n=Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung der Zeilen)

Aus den KreuzTabelle 20Tabelle 22 ist ersichtlich, dass es sowohl beim Geschlecht, als auch beim Alter und der Herkunft eine annähernd gleiche prozentuale Verteilung auf die einzelnen Gruppen gibt. Männer exprimieren in 9,1% der Fälle den Rezeptor, Frauen in 5,7%. Das Alter zeigt eine Expression bei 8,3% der Patienten, die jünger als 65 Jahre sind und bei 8,2%, die älter als 65 Jahre sind. Ähnlich verhält es sich bei der Herkunft, die Patienten mit asiatischer Herkunft zeigen in 10,0% eine positive Expression, Patienten mit einer anderen Herkunft in 8,1% der Fälle. Zur Überprüfung der Abhängigkeit wird der Chi-Quadrat-Test und der exakte Test nach Fisher angewendet, deren Ergebnisse in Tabelle 23 aufgelistet sind.

Tabelle 23: Auswertung Chi-Quadrat-Test mit zugehörigen p-Wert und dem Assoziationskoeffizienten Cramers-V sowie die p-Werte des exakten Tests nach Fisher bei den Patientenspezifischen Eigenschaften Geschlecht, Alter und Herkunft

	χ^2	p-Wert des Chi-Quadrat-Tests	Cramers-V	p-Wert nach Fisher
Geschlecht	1,413	0,235	0,055	0,337
Alter	0,001	0,977	0,001	1
Herkunft				0,590

Keine der Variablen überschreitet den kritischen Wert von 3,84 oder weist einen p-Wert unterhalb von 0,05 auf. Somit lässt sich für keine der Variablen ein Zusammenhang mit der Expression von CXCR4 zeigen.

4.3.2 Tumorspezifische Eigenschaften

Bei der Analyse der T-Klassifikation, in

Tabelle 24, werden die einzelnen T-Stadien in kleine (T1-T2) und größere Tumore (T3-T4a) aufgeteilt. Die nicht klassifizierten Proben werden zur besseren Übersichtlichkeit in den Tabellen nicht aufgeführt.

Tabelle 24: Kreuztabelle T-Klassifikation mit CXCR4-Expression des Tumors

		CXCR4-Expression des Tumors		
		n = %		
T-Klassifikation	n = %	negativ	positiv	
		T0-T2	75 (85,2)	13 (14,8)
T3-T4A	237 (94,4)	14 (5,6)	251 (100,0)	
		312 (92,0)	27 (8,0)	339 (100,0)

Legende: T0-T2B=Zusammenfassung der T-Stadien T0, T1a,T1b und T2; T3-T4b=Zusammenfassung der T-Stadien T3,T4a und T4b; n=Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung auf die Gesamtzahl der Zeilen)

Die Berechnung des Chi-Quadrats ergibt $\chi^2=7,515$, bei einem p-Wert von 0,006 und einem Cramers-V von 0,149. Eine Abhängigkeit zwischen der Primärtumorausbreitung und der Expression des CXCR4 ist damit bei einer niedrigen Effektstärke bewiesen. Werden dabei die Werte aus der Kreuz

Tabelle 24 verglichen, zeigt sich, dass kleinere Tumore, im Stadium T0-T2b mit 14,6% eine vermehrte CXCR4-Expression aufweisen. Größere Tumore hingegen zeigen nur zu 5,6% eine Expression.

Tabelle 25: Kreuztabelle N-Klassifikation des Tumors und CXCR4-Expression des Tumors

		CXCR4-Expression des Tumors		
		n = %		
N-Klassifikation	n = %	negativ	positiv	
		N0	49 (83,1)	10 (16,9)
N1	111 (96,5)	4 (3,5)	115 (100,0)	
N2	80 (88,9)	10 (11,1)	90 (100,0)	
N3	59 (88,1)	8 (11,9)	67 (100,0)	
		299 (90,3)	32 (9,7)	331 (100,0)

; Legende: N0, N1, N2, N3=jeweiliges N-Stadium des Tumors; n=Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung auf die Gesamtzahl der Zeilen)

Die Berechnung des Chi-Quadrat-Testes aus Tabelle 25 ergibt einen Wert von $\chi^2=9,24$ bei einem p-Wert von 0,026 und einem V-Wert von 0,167. Somit kann auf einem lokalen Fehlerniveau 1.Art von 5% die H_1 Hypothese angenommen werden. Es lässt sich eine Abhängigkeit zwischen dem nodalen Befall und der CXCR4 Expression mit einer niedrigen Effektstärke zeigen. Bei der Auswertung der relativen Häufigkeiten zeigt sich eine höhere Wahrscheinlichkeit

der Expression von CXCR4, sowohl bei N0 mit 16,9%, als auch bei N2, N3 mit jeweils etwa 11%. Im Gegensatz dazu liegt die Expressionsrate von N1 bei 3,5%.

Tabelle 26: Kreuztabelle M-Klassifikation des Tumors und CXCR4-Expression des Tumors

		CXCR4-Expression des Tumors		
		n = %		
M-Klassifikation n = %		negativ	positiv	
		M0	17 (91,6)	1 (5,6)
	M1	403 (91,6)	37 (8,4)	440
		420	38	458

Legende: n=Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung der Zeilen)

Aus Tabelle 26 lässt sich lesen, dass M0 klassifizierte Tumore in 5,6%, M1 Karzinome in 8,4% der Fälle eine Expression des Tumors von CXCR4 aufweisen. Der p-Wert des exakten Tests nach Fisher liegt hier bei 1,0 und entspricht damit nicht dem lokalen Fehlerniveau 1.Art. Eine Abhängigkeit kann nicht belegt werden.

Tabelle 27: Kreuztabelle: Grading des Tumors und CXCR4-Expression des Tumors

		CXCR4-Expression des Tumors		
		n = %		
Grading n = %		negativ	positiv	
		G1-G2	123 (89,9)	14 (10,2)
	G3	157 (91,3)	15 (8,7)	172
		280	29	309

Legende: G1-G2=Zusammenfassung der Gradingstadien G1 und G2; n=Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung der Zeilen)

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich beim Grading des Tumors in Tabelle 27. Gering bis mäßig differenzierte Tumore exprimieren in 10,2% der Fälle den Membranrezeptor und undifferenzierte mit G3-Status in 8,7% der Fälle. Bei einem errechneten Chi-Quadrat von $\chi^2=0,201$, und einem p-Wert von 0,654 kann keine Abhängigkeit gezeigt werden. Die Berechnung des Cramers-V bestätigt bei einem Wert von 0,026, dass kein Zusammenhang der beiden Variablen vorliegt.

Tabelle 28: Kreuztabelle: Laurén-Klassifikation des Tumors und CXCR4-Expression des Tumors

CXCR4-Expression des Tumors

n = %

Laurén Klassifikation n = %		negativ	positiv	
	diffus	65 (91,5)	6 (8,5)	71 (100,0)
intestinal	174 (90,6)	18 (9,4)	192 (100,0)	
gemischt	26 (89,7)	3 (10,3)	29 (100,0)	
	265 (90,8)	27 (9,2)	292 (100,0)	

Legende: n=Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung der Zeilen)

Die verschiedenen Wachstumsmuster nach Laurén, gezeigt in Tabelle 28, weisen alle eine annähernd gleich häufige Expression des CXCR4 auf. Intestinale Tumore exprimieren in 9,4%, diffuse in 8,5% und der gemischte Wachstumstyp in 10,3% der Fälle. Zur statistischen Auswertung wird, trotz der zu geringen erwarteten Häufigkeiten, der Chi-Quadrat-Test verwendet. Die ermittelten prozentualen Häufigkeiten weisen in Zusammenschau mit den statistisch ermittelten Werten auf eine Unabhängigkeit der beiden Variablen bei einem p-Wert von 0,952 und einem Cramers-V von 0,018 hin.

Tabelle 29: Kreuztabelle anatomische Lage des Karzinoms und CXCR4-Expression des Tumors

CXCR4-Expression des Tumors

n = %

Karzinomtyp nach Lage n = %		negativ	positiv	
	AEG I-III	83 (87,4)	12 (12,6)	95 (100,0)
Adenokarzinom Magen	327 (92,6)	26 (7,4)	353 (100,0)	
	410 (91,5)	38 (8,5)	448 (100,0)	

Legende: AEG I-III=Karzinom des gastroösophagealen Übergangs gruppiert AEG I, AEG II und AEG III; n=Anzahl der Patienten (prozentuale Verteilung der Zeilen)

Der Zusammenhang zwischen der anatomischen Lage des Tumors und der Expression des CXCR4 wird in Tabelle 29 dargestellt. Dafür werden die Karzinome des gastroösophagealen Übergangs zusammengefasst und dem Magenkarzinom gegenübergestellt. Dabei zeigt sich, dass 12,6% der AEG-Tumore und 7,4% der Magentumore eine Expression des CXCR4 haben. Bei einem $\chi^2=2,674$, mit einem p-Wert von 0,102, liegt keine Abhängigkeit der beiden Variablen vor. Die Effektstärke beträgt 0,077.

Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 16 nochmal in einem Balkendiagramm verdeutlicht.

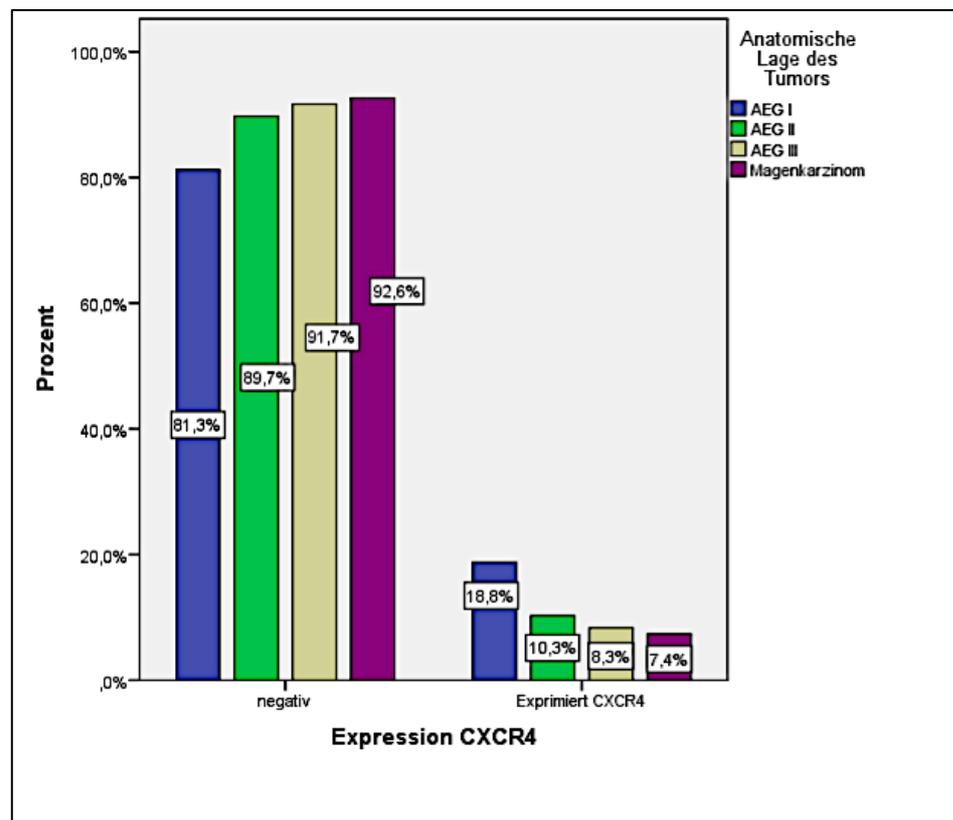


Abbildung 16: CXCR4-Expression des Tumors aufgeteilt nach der anatomischen Lage des Tumors; Legende: blau: AEG I Tumor; grün: AEG II Tumor; beige: AEG III Tumor, violett: Magenkarzinom

Deskriptiv kann gesehen werden, dass AEG I Tumore mit 18,8% am häufigsten eine Expression von CXCR4 zeigen. Tendenziell nimmt mit der Kaudalität des Tumors die Rate an CXCR4 positiven Tumoren ab. So tragen Magenkarzinome nur noch in 7,4% der Fälle den Rezeptor auf ihrer Membranoberfläche. Aufgrund der in Legende: CT=Leitlinientherapie mit Chemotherapie (Cisplatin+Capecitabin); CTX=experimentelle Therapie (Kombination aus Cisplatin+Capecitabin und Cetuximab); n=Gesamtanzahl der Patienten (prozentuale Verteilung der Anzahl gemessen an der Gesamtanzahl der Spalte), NA=nicht klassifiziert

Tabelle 14 aufgeführten geringen Anzahl der jeweiligen AEG-Typen, kann dieser Zusammenhang nur deskriptiv vermutet werden.

4.4 Gesamtüberleben Subkollektiv und CXCR4

Auf die Auswertung der Kreuztabellen folgt die Analyse der Überlebenskurven. Dabei wird zunächst untersucht, wie sich das Gesamtüberleben von Patienten mit und ohne Expression des Membranrezeptors CXCR4 verhält.

Dafür ist in Abbildung 17 das Gesamtüberleben des ganzen Subkollektivs, abhängig von der CXCR4 Expression, dargestellt.

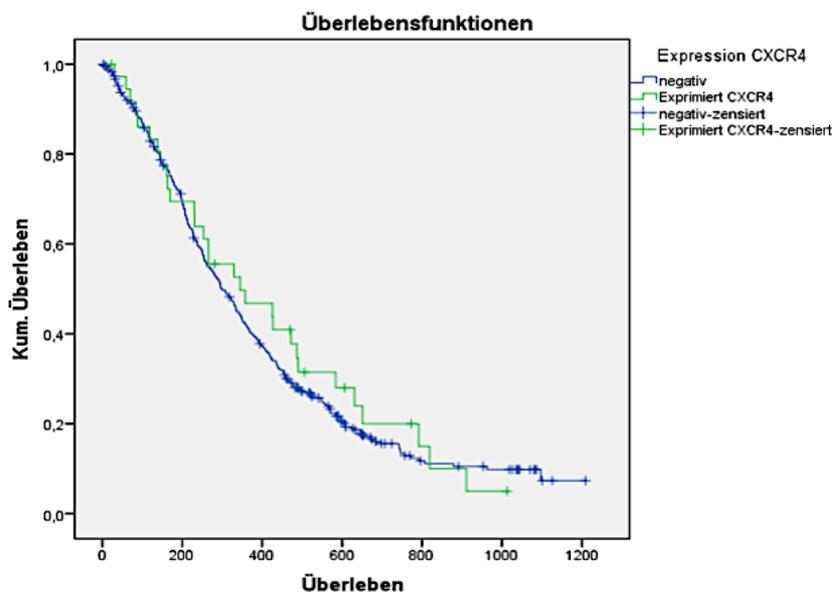


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve, Gesamtüberleben des Subkollektivs abhängig von der CXCR4-Expression des Tumors (Insgesamt 459 Patienten eingeschlossen) Legende: grün: CXCR4 positiver Tumor (Anzahl der Patienten=37); blau: CXCR4 negativer Tumor (Anzahl der Patienten=420)

Man erkennt einen annähernd gleichen Verlauf beider Kurven. Daher ist davon auszugehen, dass es keinen Unterschied im Überleben in den beiden Gruppen gibt. Bei Betrachtung der Medianwerte überleben CXCR4 positive Tumore 345 Tage und negative 298 Tage. Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,542 somit kann kein statistisch relevantes Ergebnis gefunden werden.

Nachfolgend wird dieselbe Hypothese auch in den beiden Behandlungsarme getestet, dies wird in Abbildung 18 dargestellt.

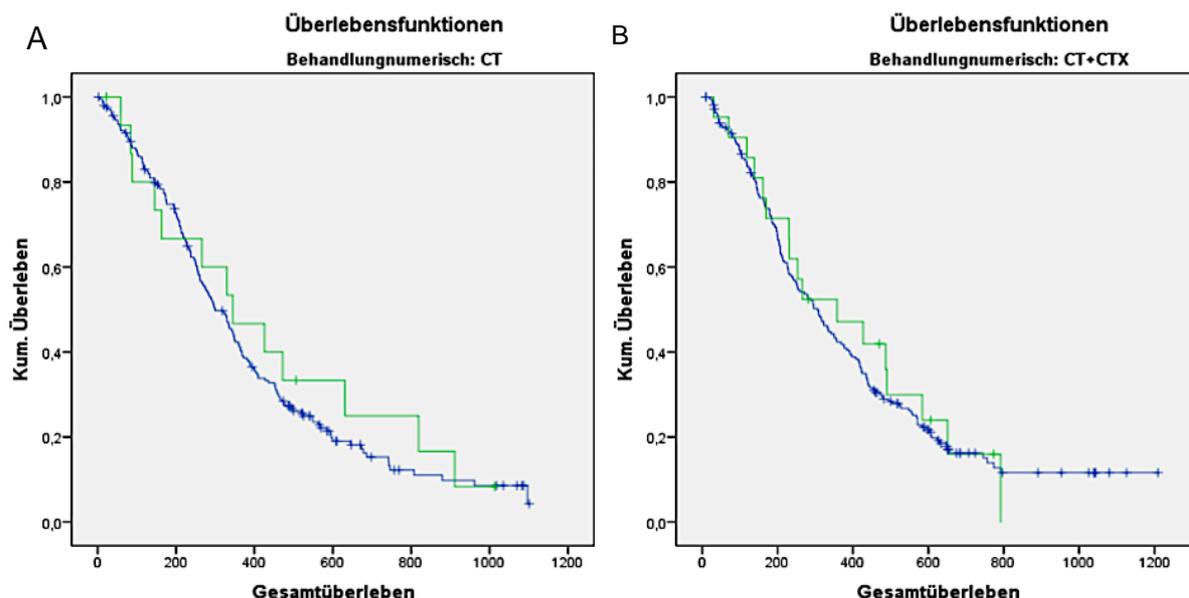


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurven abhängig von der Expression von CXCR4; A: Bei Leitlinientherapie (Insgesamt 220 Patienten eingeschlossen: CXCR4 positiv=16 ;CXCR4 negativ=204); B: Bei Experimentalthherapie mit Cetuximab (Insgesamt 234 Patienten eingeschlossen: CXCR4 positiv=21; CXCR4 negativ=21); Legende: grün: CXCR4 positiver Tumor; blau: CXCR4 negativer Tumor; Legende: CT=Leitlinientherapie mit Chemotherapie (Cisplatin+Capecitabin); CTX=experimentelle Therapie (Kombination aus Cisplatin+Capecitabin und Cetuximab)

Der Vergleich der Medianwerte der Überlebenszeit zeigt, dass Patienten mit CXCR4 positiven Tumoren bei CT-Therapie 345 Tage und bei zusätzlicher Gabe von Cetuximab 358 Tage überleben. Bei CXCR4 negativen Tumoren liegt die mediane Überlebenszeit bei Leitlinientherapie bei 300 Tagen und bei der experimentellen Therapie bei 307 Tagen. Die p-Werte der Log-Rank-Tests ergeben bei der Leitlinientherapie 0,565 und bei der experimentellen Therapie 0,747.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die alleinige Expression von CXCR4 im Tumor keinen statistisch relevanten Einfluss auf das Überleben dieses Patientenkollektives zeigt. Dies lässt sich sowohl für das gesamte Subkollektiv als auch in den beiden verschiedenen Behandlungsarmen beobachten.

Aufgrund dessen soll untersucht werden, ob die Kombination der Expression des Tumors mit dem Auftreten von Immunzellinfiltraten einen Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit der Patienten nimmt. Dies wird in Abbildung 19 dargestellt.

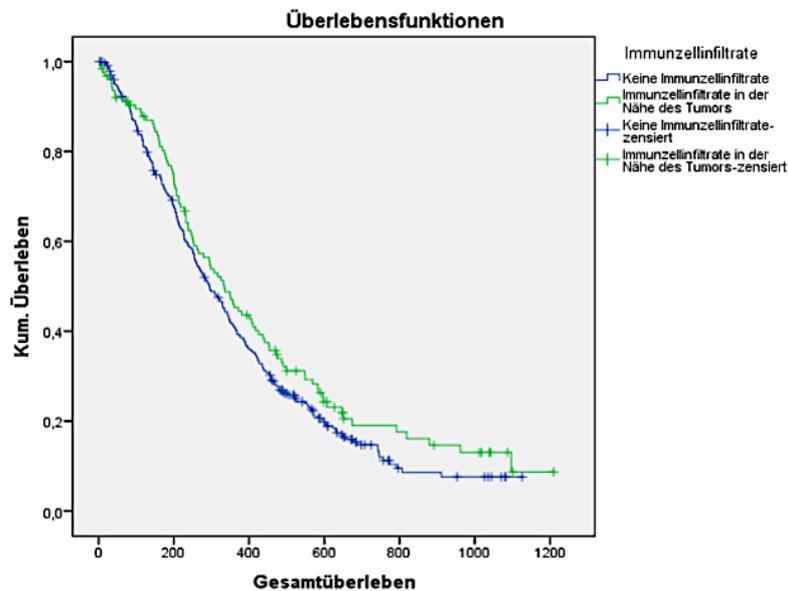


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit des Auftretens von Immunzellinfiltraten in der Nähe der Tumorzellen; Legende: grün: Immunzellinfiltrate vorhanden (Anzahl der Patienten=126); blau: keine Immunzellinfiltrate nachweisbar (Anzahl der Patienten=333)

Beim Vergleich der beiden Kurven zeigt sich, dass beim Auftreten von Immunzellinfiltraten das Überleben tendenziell höher liegt als ohne Reaktion des Immunsystems. Die mediane Überlebenszeit liegt bei Auftreten der Immunzellinfiltrate bei 334 Tagen, ansonsten bei 295 Tagen. Expressieren die Immunzellen zusätzlich den Membranrezeptor CXCR4 auf ihrer Oberfläche, zeigt sich die in Abbildung 20 folgende Überlebenskurve.

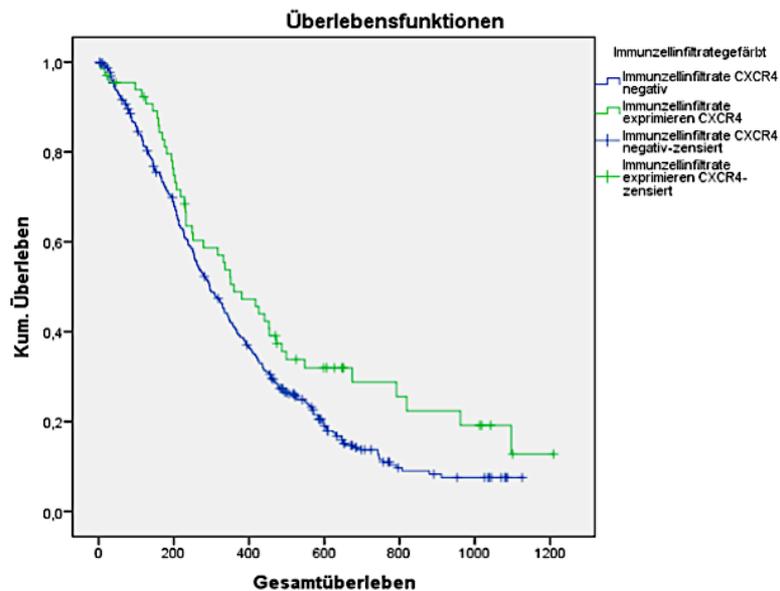


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit des Auftretens von Immunzellinfiltraten in der Nähe der Tumorzellen mit zusätzlicher Expression von CXCR4 auf der Oberfläche der Immunzellen; Legende: grün: Immunzellinfiltrate exprimieren CXCR4 (Anzahl der Patienten=391); blau: keine Expression der Immunzellen vorhanden (Anzahl der Patienten=66)

Über den Zeitraum der Analyse liegt die Kurve der Probanden, die ein Immunzellinfiltrat mit CXCR4 Expression in der Nähe des Tumors aufweisen, oberhalb derer ohne Expression der Immunzellinfiltrate. Im Vergleich zeigen die Medianwerte bei positiver Expression ein Überleben von 360 Tagen und bei ausbleibender Expression 296 Tage. Die Auswertung des Log-Rank-Testes, der mit einem $\chi^2=5,471$ (Freiheitsgrad 1) mit einer Signifikanz von 0,019 errechnet wird, belegt ebenfalls ein statistisch relevant besseres Überleben für diese Gruppe.

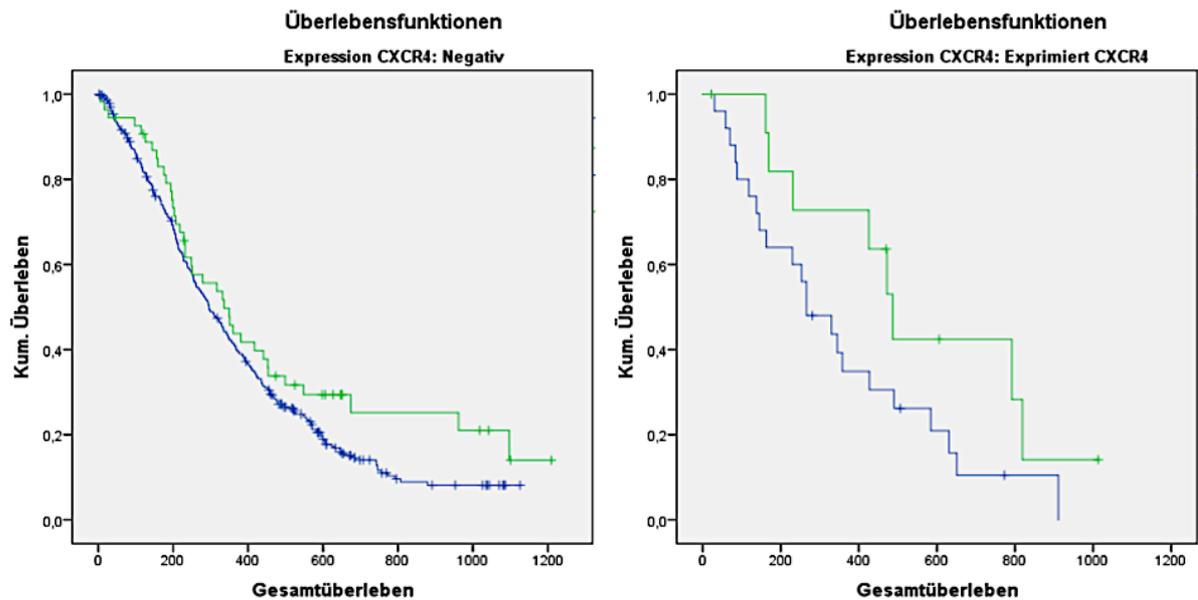


Abbildung 21: Kaplan-Meier Kurve in Abhängigkeit des Auftretens von Immunzellen mit gleichzeitiger Expression von CXCR4; A: Bei CXCR4 negativem Tumor (Insgesamt=420; Immunzellinfiltrate CXCR4 positiv=54; Immunzellinfiltrate CXCR4 negativ=366); B: Bei CXCR4 positivem Tumor (Insgesamt=37; Immunzellinfiltrate CXCR4 positiv=12; Immunzellinfiltrate CXCR4 negativ=25); Legende: grün: Immunzellinfiltrate mit CXCR4 Expression vorhanden, blau: keine Immunzellinfiltrate mit CXCR4 Expression nachweisbar

Zum Schluss wird untersucht, wie sich die Überlebenszeit der Patienten verhält, wenn der Tumor und die Immunzellen gleichzeitig den Membranrezeptor CXCR4 exprimieren, wie es in Abbildung 21 dargestellt ist. Wie bereits gezeigt, liegt bei beiden Abbildungen die grüne oberhalb der blauen Kurve. In Abbildung 21 B fällt zusätzlich auf, dass sich der Abstand der beiden Kurven vergrößert, wenn beide Zellreihen den Membranrezeptor exprimieren. Die medianen Überlebenszeiten, der Patienten, die eine gleichzeitige Expression von CXCR4 im Tumor und in den Immunzellen aufweisen liegt bei 487 Tagen. Patienten ohne Expression in den Immunzellen aber vorhandenem Nachweis von CXCR4 auf der Membranoberfläche des Tumors überleben median 266 Tage. Der log-Rank-Test zeigt bei einem p-Wert von 0,088 allerdings keine statistische Relevanz. Liegt lediglich eine Expression von CXCR4 in den Immunzellen vor, überleben die Patienten median 336 Tage. Bei dem vollständigen Fehlen eines Nachweises von CXCR4 liegt das mediane Überleben bei 296 Tagen. Der in diesem Fall ermittelte Log-Rank-Test weist einen p-Wert von 0,9 auf. Zusammenfassend lässt sich deskriptiv ein tendenziell besseres medianes Überleben für Patienten mit einer gleichzeitig auftretenden Expression von CXCR4 im Tumor und in den Immunzellinfiltraten sehen.

5. Diskussion

5.1. Vergleich des Subkollektivs mit dem Gesamtkollektiv der EXPAND Studie

Das Auswahlkriterium des Subkollektivs war das Vorhandensein eines histologischen Schnittpräparats zur Durchführung der immunhistochemischen Färbung von CXCR4. Für den Nachweis der Einhaltung der Randomisierung wie in der EXPAND Studie werden die Parameter und deren Aufteilung hinsichtlich der Behandlungsarme in Kapitel 4.1 dargestellt. In der Auswertung zeigt sich, dass alle Randomisierungsparameter gleichmäßig auf die Behandlungsarme verteilt sind. Eine gezielte Auswahl der Proben kann damit ausgeschlossen werden.

5.2 Mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Schnitte

Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung und deren mikroskopischer Auswertung betrachtet. Die Rate an positiv exprimierenden Tumorpräparaten beträgt, wie in Kapitel 4.2 aufgelistet, 8,3% des Subkollektivs. Im Gegensatz dazu konnte Iwasa et al. bei 58,9% der Magenkarzinomen eine Expression des CXCR4 nachweisen. Aufgeteilt nach der Expressionsstärke waren 26,6% der Schnitte schwach, 15,3% moderat und 12,1% stark angefärbt (35). Beide Arbeiten untersuchen das Adenokarzinom des Magen und verwenden dabei die gleiche Einteilung hinsichtlich der Expressionsstärke. Daher ist ein direkter Vergleich der relativen Wahrscheinlichkeiten möglich. Es zeigen sich signifikante Unterschiede in der Anzahl der positiv exprimierenden Tumore in den untersuchten Kollektiven. Die Verteilung innerhalb der einzelnen Expressionsstärken nähert sich tendenziell an. Am häufigsten kann die Expressionsstärke 1 nachgewiesen werden. Am seltensten zeigt sich dahingegen die Expressionsstärke 3, in der 50% aller Tumorzellen den Rezeptor exprimieren.

Zur Erklärung der voneinander abweichenden Anzahlen kommen verschiedene Modelle, die im Folgenden erläutert werden, in Frage. Dazu gehört zum einen die Auswahl des pathologischen Schnittbildes, zum anderen die unterschiedliche verwendete Methodik bei der mikroskopischen Auswertung der Proben.

5.2.1 Auswirkungen der Abhängigkeit der CXCR4-Expression und der Art des pathologischen Präparates

Zur mikroskopischen Auswertung standen wie in Kapitel 4.1 beschrieben 459 Präparate zur Verfügung. Diese unterteilten sich in 159 Großpräparate und 288 Biopsien. Bei der Analyse des Zusammenhangs zwischen dem Nachweis einer CXCR4-Expression und der Wahl des pathologischen Präparates zeigt sich eine Abhängigkeit bei einer Signifikanz von 0,0. Die relative Wahrscheinlichkeit auf einem Großpräparat eine Expression von CXCR4 nachzuweisen ist höher als auf einem bioptischen Schnittpräparat.

Dieses Ergebnis lässt sich mit der Aufteilung der Expressionsstärken erklären. In der Analyse finden sich am häufigsten Tumorschnitte, die der Expressionsstärke 1 zugeteilt werden und bei denen weniger als 10% aller Tumorzellen den Rezeptor auf der Oberfläche tragen. Damit eine falsch negative Probe sicher ausgeschlossen werden kann, muss ausreichend Tumormaterial für die Untersuchung zur Verfügung stehen. In einer Biopsie kommt es häufig nur zu einem marginalen Anschnitt des Karzinoms. Die geringe Anzahl der Tumorzellen lässt dabei ungenügende Rückschlüsse auf das Verhalten des gesamten Tumors ziehen. Daher könnte eine erhöhte Rate von falsch negativen Ergebnissen auftreten. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten in Zukunft zur Analyse der Expression von CXCR4 im Tumor ausschließlich Großpräparate verwendet werden.

Die überwiegende Anzahl an Biopsien könnte dabei ausschlaggebend für die geringere Rate an CXCR4 positiven Nachweisen sein. Die relative Wahrscheinlichkeit eine Expression von CXCR4 auf einem Großpräparat zu finden, liegt bei 17,6%. Das Ergebnis weicht weiterhin von den Raten in anderen Studien ab (35).

5.2.2 Auswirkung der Festlegung der Positivkriterien auf die Rate an positiven Schnitten

Neben der Auswahl des pathologischen Präparates, werden Unterschiede in der Methodik, bei der Festlegung der Positivkriterien, festgestellt. Iwasa et al. kategorisiert alle Tumorzellen die CXCR4 exprimieren als positiv. Dabei wird nicht zwischen einer zytoplasmatischen und einer Membranfärbung wie in dieser Arbeit unterschieden. In seinen Ergebnisse beschreibt Iwasa et al. am häufigsten eine zytoplasmatische Anfärbung (35). In den Untersuchungen von Gockel et al., hinsichtlich der Expression

von CXCR4 in Oesophagealen Karzinomen, konnte ebenfalls hauptsächlich eine zytoplasmatische Expression des CXCR4-Rezeptors nachgewiesen werden. Eine membranöse Lokalisation wurde lediglich bei wenigen Karzinomen gefunden (53). Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Im Gegensatz zu Iwasa et al. werten wir diese Schnitte aufgrund der fehlenden Membranfärbung als negativ. Aufgrund der Festlegung der engeren Positivkriterien entfällt der Großteil der zytoplasmatischen Färbungen. Dies spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der geringeren Rate an positiven CXCR4 Tumoren.

Der Grund der Festlegung dieser Positivkriterien liegt in den Eigenschaften des Membranrezeptors. Wie in der Literaturdiskussion beschrieben handelt es sich beim CXCR4 um einen transmembranösen Rezeptor. Im aktiven Zustand befindet sich der Rezeptor auf der Zelloberfläche, nachfolgend wird er endosomal internalisiert und lysosomal abgebaut oder recycelt. Die Arbeitsgruppe um Pelekanos untersuchte dabei die Expression von CXCR4 auf fetalen, mesenchymalen Stromazellen, sowohl transmembranös als auch endosomal. Der Nachweis des Rezeptors konnte in dieser Studie häufiger intrazellulär als transmembranös geführt werden (54). Weitere Studien zeigen, dass CXCR4 von den Tumorzellen sowohl nukleär, zytoplasmatisch als auch membranös exprimiert wird (40, 55). Die unterschiedliche Lokalisation von CXCR4 induziert dabei unterschiedliches biologisches Verhalten. So konnte beispielsweise bei Adenokarzinomen der Lunge sowohl eine nukleäre als auch eine zytoplasmatische Expression des CXCR4 nachgewiesen werden. Dabei definierte die Studie die zytoplasmatische Expression von CXCR4 als einen unabhängigen Risikofaktor für das schlechtere krankheitsfreie Überleben. Dahingegen schien die nukleäre Expression eher als günstiger prognostischer Faktor zu gelten (56). Andere Studien postulieren, dass der Nachweis des Membranrezeptors im Nukleus durch die Translokation des Liganden-Rezeptor-Komplexes in den Kern mit einer höheren Invasivität und damit einer schlechteren Prognose einhergeht (55, 57). Aufgrund der möglicherweise unterschiedlichen Wirkungsweisen und biologischen Eigenschaften der verschiedenen Expressionslokalitäten werden in dieser Arbeit nur Tumore mit einer membranösen Expression als positiv gewertet. Wir gehen davon aus, dass der Rezeptor für seine physiologisch aktive Form auf der Zellmembran verankert sein muss. Eine zusätzlich zur membranös vorliegenden zytoplasmatischen Anfärbung lässt sich aufgrund der physiologischen Wirkungsweise erklären. Dabei ist die Internalisierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes mit anschließender Endozytose

essentiell für die Aktivierung der Signalwege von CXCR4 (32). Ein alleiniger Nachweis des Membranrezeptors im Zytoplasma wird als negative Probe gewertet. Dies orientiert sich an den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Xue, der feststellte, dass trotz des zytoplasmatischen Nachweises von CXCR4 keine Migration oder Proliferation als Reaktion auf den Liganden CXCL12 stattfand (55). Dieses methodische Vorgehen unterscheidet diese Arbeit von den vorherigen Nachweisen von CXCR4 im Magen und im gastroösophagealen Übergang (35, 42). Für eine differenziertere Aussage sollten in nachfolgenden Studien die Schnitte hinsichtlich der lokalen Expression in membranöse, zytoplasmatische und nukleäre Expression des Rezeptors CXCR4 aufgeteilt werden.

Eine weitere Abweichung zu anderen Studien stellt die Einteilung der Expressionsstärke dar. In den meisten Studien wird die Auswertung in schwache und starke Expressionen unterteilt.

In den Ergebnissen konnten dabei unterschiedliche Zusammenhänge zu den tumorspezifischen Eigenschaften und prognostischen Vorhersagewerten gemacht werden (58, 59). Aufgrund der sehr geringen Fallzahlen sind in der statistischen Auswertung dieser Arbeit alle Expressionsstärken gemeinsam analysiert worden.

Dabei exprimiert die Mehrzahl der positiven Proben den Rezeptor nur schwach. Ausschließlich 7,8% der positiven Proben weisen eine starke Expression des Tumors auf. Im Folgenden treffen wir die Annahme, dass sich das Subkollektiv der positiv exprimierenden CXCR4-Patienten dem Verhalten der schwach exprimierenden Tumorzellen annähert.

5.3 Auswirkungen der experimentellen Therapie mit Cetuximab auf das Gesamtüberleben des Subkollektivs abhängig von der CXCR4 Expression

In zuvor durchgeführten Medikamentenstudien hinsichtlich der Wirksamkeit des Einsatzes von Fluoruracil, Leukovorin mit entweder Oxaliplatin (FLO-Schema) oder Cisplatin (FLP-Schema) konnten unterschiedliche Effekte hinsichtlich der Expression von CXCR4 nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass Patienten mit einer hohen Konzentration von CXCR4 ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit dem FLP-Schema zeigten, als bei der Behandlung nach dem FLO-Schema (60). Aufgrund dieser

Ergebnisse wurde untersucht, inwiefern die Expression von CXCR4 auch einen Effekt beim Einsatz des monoklonalen Antikörpers Cetuximab spielen könnte.

Die randomisierte weltweit durchgeführte EXPAND-Studie konnte keinen Nachweis für ein signifikant besseres progressionsfreies Überleben durch die experimentelle Therapie gegenüber der Leitlinientherapie feststellen. Der Versuchsaufbau stellte dabei die Leitlinienchemotherapie, Cisplatin und Capecitabin, der experimentellen Therapie, Cisplatin, Capecitabin und Cetuximab, gegenüber. Bei gleichem Versuchsaufbau wurde in unserer Arbeit das primäre Endziel abgeändert. Dieses Vorgehen orientierte sich an der Diskussion der EXPAND Studie, die postulierte, dass sich das Gesamtüberleben besser als das progressionsfreie Überleben als primäres Endziel eignet. Daher wird als Auswertungsgrundlage das Gesamtüberleben der Patienten verwendet.

Das zu untersuchende Subkollektiv unterteilte sich sowohl hinsichtlich der Behandlungsarme als auch der Expression von CXCR4. Die Auswertung der Kaplan-Meier-Kurven zeigt weder einen statistisch relevanten Einfluss von CXCR4 auf die Leitlinientherapie noch auf die experimentelle Therapie. Daher konnte im untersuchten Subkollektiv, des CXCR4 exprimierenden Karzinom des Magens und des gastroösophagealen Übergangs kein Unterschied hinsichtlich des Therapieerfolges festgestellt werden.

5.4 Der Membranrezeptor CXCR4 als biologischer Prognosemarker beim Magenkarzinom

Viele Studien analysieren den Einfluss der Signalkaskaden des Membranrezeptors CXCR4 in der Tumorentwicklung. Eine wichtige Rolle spielt der Rezeptor bei der Chemotaxis, der Angiogenese, der Proliferation und der Invasivität des Tumors. Er gehört zu den am häufigsten exprimierten Chemokinen auf Tumorzellen (4). Wegen dieser Eigenschaften wird der Membranrezeptor auf die Eignung als biologischer, prognostischer Marker, in den verschiedenen Tumorentitäten, untersucht. Aktuelle Studien beziehen sich dabei auf das Adenokarzinom des Magens. Diese Ergebnisse sind in Teilen noch kontrovers diskutiert.

Die Metaanalyse von Zhao et al. assoziiert die Überexpression von CXCR4 mit einem signifikant schlechteren progressionsfreien und einem niedrigerem Gesamtüberleben

unabhängig von der Tumorentität (4). Dieser Zusammenhang konnte in Subgruppenanalysen für hämatologische Tumore, Brustkrebs, kolorektale Karzinome, dem Oesophaguskarzinom sowie für renale, gynäkologische und pankreatische Tumore gefunden werden (4). Bei der differenzierten Betrachtung des Magenkarzinoms fanden sich ähnliche Korrelationen. So zeigte Arigami et al., dass die Expression von CXCR4 mit tieferem invasivem Tumorwachstum sowie mit vaskulärer und lymphatischer Invasion einhergehen (42). Zum anderen konnten Zusammenhänge mit dem Auftreten von bestimmten Metastasen identifiziert werden. Dazu gehören hauptsächlich Lymphknoten, die Lunge und die Peritonealkarzinose (35, 44).

Diese Arbeit untersuchte ebenfalls die Zusammenhänge zwischen patienten- und tumorspezifischen Eigenschaften und der Expression von CXCR4 im Tumor.

Zusammenfassend zeigt unsere Arbeit keinen Zusammenhang zu patientenspezifischen Eigenschaften. Damit ist die Expression von CXCR4 unabhängig vom Geschlecht, dem Alter und der Herkunft der Patienten.

Bei den tumorspezifischen Eigenschaften konnten keine Korrelation zwischen dem Auftreten des Membranrezeptors und dem Grading des Tumors, der Laurén-Klassifikation, der anatomischen Lage und dem Metastasierungsgrad der Karzinome gefunden werden.

Diese Ergebnisse widersprechen teilweise den Ergebnissen aus vorherigen Studien.

5.4.1 Abhängigkeit von der Laurén-Klassifikation

Der Zusammenhang zwischen der Laurén-Klassifikation und der Expression von CXCR4 wird in verschiedenen Studien kontrovers diskutiert. Iwasa und Arigami et al. beschreiben in ihren Publikationen eine Abhängigkeit der beiden Variablen. Dabei exprimierten intestinal wachsende Tumore vermehrt den Membranrezeptor CXCR4. Zusätzlich fand die Arbeitsgruppe von Iwasa heraus, dass die Kombination aus CXCR4 und einem intestinalen Wachstumsmuster mit der Entwicklung von Leber und Lymphknotenmetastasen einhergeht (35). Eine Korrelation mit dem diffusen Wachstumstyp konnten die beiden Arbeitsgruppen nicht nachweisen (35, 42). Im Gegensatz dazu zeigt die Arbeit von He et al. eine erhöhte Rate an CXCR4-Expressionen in diffus wachsenden Tumoren (61). Die Ergebnisse dieser Arbeit hingegen geben keine Hinweise auf eine Abhängigkeit der Laurén-Klassifikation und

der Expression von CXCR4, daher ergibt sich im Gegensatz zu den vorherigen Studien eine Unabhängigkeit der beiden Variablen.

5.4.2 Abhängigkeit zur M-Klassifikation

Ähnlich verhält es sich bei der Analyse der Abhängigkeiten der Metastasierung und der Expression von CXCR4. In der Literaturdiskussion wurde bereits die mögliche Rolle des Membranrezeptors CXCR4 bei dem Vorgang der Metastasierung beschrieben. Dabei nimmt der Rezeptor sowohl Einfluss auf den Metastasierungsprozess an sich als auch auf den Ort der Metastasenbildung. Dieser Zusammenhang konnte in verschiedenen Studien belegt werden. Yasumoto et al. beschreibt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Peritonealkarzinose bei Expression des Rezeptors CXCR4. Dabei geht die Arbeitsgruppe davon aus, dass die vermehrte Expression des Liganden CXCL12 in der Bauchhöhle als chemotaktischer Reiz agiert (44). Andere Metastasierungsorte wie die Lymphknoten, die Lunge und die Leber konnten ebenfalls mit der Expression von CXCR4 im Magenkarzinom assoziiert werden (35, 39). In dieser Arbeit stellt sich hingegen keine Abhängigkeit zwischen der Expression von CXCR4 und dem Metastasierungsstatus der Adenokarzinome dar. Möglicherweise könnte dies mit der Auswahl des Subkollektives verbunden sein. Da im Gesamtkollektiv der EXPAND Studie nur lokal fortgeschrittene oder fernmetastasierte Tumore eingeschlossen wurden, ist die Vorselektion der Patienten möglicherweise zu stark (5). Für eine aussagekräftige Analyse sollte das zu untersuchende Subkollektiv mehr Tumore in früheren nicht fernmetastasierten Stadien aufweisen.

5.4.3 Abhängigkeit der T-Klassifikation

Neben dem Auftreten einer Fernmetastasierung werden auch weitere Kriterien der TNM-Klassifikation auf Abhängigkeit mit dem Vorhandensein des Membranrezeptors auf der Oberfläche der Tumorzellen untersucht.

Es zeigt sich, dass eine Korrelation zwischen der T-Klassifikation und der Expression des CXCR4 vorliegt. Dieser Nachweis konnte konsistent in verschiedenen Studien geführt werden. Allerdings zeigt sich häufig eine Korrelation von hoch exprimierendem CXCR4 mit einem fortgeschrittenerem T-Status und tiefer infiltrierenden Tumoren (55).

Im Unterschied dazu findet sich in dieser Arbeit ein Zusammenhang der CXCR4-Expression mit früheren Stadien des Tumors. So exprimieren 14,8% der T0-T2-Tumore CXCR4, hingegen aber nur 5,6% der fortgeschrittenen Tumore mit einem T3-T4a-Status.

Dieses Ergebnis könnte mit der Expressionsstärke der Tumore zusammenhängen. In der Studie von Li et al. werden unterschiedliche Korrelation mit den Tumorstadien je nach Expressionsstärke gesehen. Dabei findet sich eine starke Expression des CXCR4 häufiger in fortgeschrittenen Stadien, schwach exprimierende CXCR4-Tumore korrelieren dahingegen mit frühen Stadien (58). Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Arbeitsgruppe von Lee. Dieser zeigt für Tumore mit einer hohen Expression von CXCR4 und CXCL12 eine signifikante Korrelation zur Tumorinvasivität und hohen Tumorstadien auf. Demnach haben die hoch exprimierenden Tumore die schlechteste Prognose. Im Gegensatz dazu wiesen die Karzinome mit einer niedrigen Expression von CXCR4 die günstige Prognose mit einer Assoziation zu niedrigen Tumorstadien auf (59). Unsere gefundene Korrelation der positiv exprimierenden Zellen mit den Tumorstadien T1-T2a unterstützen diese Thesen.

5.4.4 Abhängigkeit der N-Klassifikation

Weiterhin postulieren einige Studien, dass eine positive Expression des Tumors mit einem erhöhten N-Status einhergeht. Daneben wird ebenfalls häufig ein Zusammenhang zwischen der Expression des CXCR4 und vorhandenen Lymphknotenmetastasen dargestellt (35, 59, 62). In dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Allerdings zeigte sich eine Relation sowohl zu N0 als auch zu N2-/N3-Stadien. Diese unterschiedlichen Abhängigkeiten könnten zum einen aufgrund der fehlenden Unterscheidung der Expressionsstärken auftreten. Zum anderen könnte es in der Auswahl des Studienkollektivs begründet liegen. Arigami et al. untersuchte in seiner Studie das Auftreten der CXCR4-Expression bei Mikrometastasen in Lymphknoten. In diesen konnte eine erhöhte Anzahl an CXCR4-exprimierenden Tumorzellen gefunden werden (42). Die in der EXPAND-Studie eingeschlossenen Patienten weisen alle ein fortgeschrittenes oder schon fernmetastasiertes Stadium auf. Daher besteht die Möglichkeit, dass aufgrund der fortgeschrittenen Erkrankung bereits Mikrometastasen aufgetreten sind, die vermehrt den Rezeptor exprimieren.

Da wir keinen Ausschluss der Mikrometastasen geführt haben, lässt sich die Abhängigkeit des N-Status und der Expression des CXCR4 erschwert beurteilen. Diese Zusammenhänge sollten in Folgestudien berücksichtigt werden.

5.4.5 Abhängigkeit der anatomischen Lokalisation der Karzinome

In der KreuzTabelle 29 wird die Relation der anatomischen Lage und der Expression von CXCR4 untersucht. Bei dem Vergleich der AEG-Tumore und dem Magenkarzinom kann keine signifikante Abhängigkeit nachgewiesen werden. Werden die Tumore des gastroösophagealen Übergangs nach der Siewert Klassifikation unterteilt und einzeln betrachten, lässt sich die Abbildung 16 erstellen. Deskriptiv betrachtet scheinen kranialer gelegene Tumore häufiger den Rezeptor CXCR4 zu exprimieren als kaudaler gelegene Karzinome. Inwiefern dieser Zusammenhang Einfluss auf die Therapie und Prognose des Karzinoms des gastroösophagealen Übergangs nehmen könnte, müssen weitere Studien mit größeren Fallzahlen untersuchen.

Zusammenfassend lassen sich in dieser Arbeit nur deutliche Abhängigkeiten zu den T- und N-Klassifikationen der Karzinome des Magens und des gastroösophagealen Übergangs finden. Dabei könnte die Assoziation mit kleineren Tumorstadien für eine bessere Prognose sprechen. Dahingegen weist die Korrelation mit den erhöhten N-Stadien eher auf einen schlechteren prognostischen Verlauf hin. Werden die Kaplan-Meier-Kurven ausgewertet zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben von CXCR 4 positiven oder negativen Tumoren. Aufgrund dieser Ergebnisse können wir in diesem Subkollektiv keinen Nachweis für einen prognostischen Vorhersagewert der Expression des Membranrezeptors CXCR4 finden. Diese Ergebnisse sind aber eng mit der Auswahl des Subkollektives verknüpft. In der EXPAND-Studie wurden nur lokal fortgeschrittene oder fernmetastasierte Patienten zugelassen. Damit ist das untersuchte Subkollektiv nicht repräsentativ auf alle Tumorstadien verteilt, wodurch bestimmte Zusammenhänge zu tumorspezifischen Eigenschaften möglicherweise nicht erkannt worden sind. Andererseits liegt eine sehr geringe Anzahl an CXCR4 positiv exprimierenden Tumoren vor, die die statistische Aussagekraft verringert. Besonders die fehlende Unterteilung in die CXCR4-Expressionsstärken könnten Abhängigkeiten unentdeckt lassen, da sich diese von niedrig- und hochexprimierendem CXCR4 teilweise gegenläufig verhalten. Weiterhin war die generelle Prognose des zu untersuchenden Gesamtkollektiv aufgrund des fortgeschrittenen

Erkrankungszustandes sehr schlecht. Ein Effekt der Expression von CXCR4 könnte aufgrund anderer prognostisch unabhängiger Effekte wie des TNM-Stadiums überdeckt worden sein.

Trotz fehlendem Nachweis der Funktion von CXCR4 als prognostischer Marker in dem hier untersuchten Subkollektiv haben andere Studien diesen Effekt nachgewiesen (58, 59). Daher sollte diese Untersuchung in folgenden Studien an einem größeren Kollektiv an CXCR4 exprimierenden Patienten, abhängig von der Expressionsstärke, erneut untersucht werden.

5.5 Einsatz von Immuncheckpointinhibitoren beim Adenokarzinom des Magens

Eine neue onkologische Therapiemöglichkeit stellt die Gruppe der Immuncheckpointinhibitoren (CPI) dar. Der Wirkmechanismus dieses Therapieansatzes beruht dabei nicht wie bei der Chemotherapie oder den Target-Therapeutika auf dem direkten Angriff des Tumors selbst, sondern auf die zusätzliche Aktivierung des Immunsystems. Dieses stellt das effizienteste körpereigene Werkzeug zur Bekämpfung von Krankheiten dar. Es kann maligne Zelle erkennen und bekämpfen (63). Dafür nutzt es vor allem tumorspezifische zytotoxische T-Lymphozyten (64). Die CPI sind monoklonale Antikörper, die die Aktivität des Immunsystems hochregulieren indem sie entweder die inhibitorische Interaktionen zwischen T-Lymphozyten sowie antigenpräsentierenden Zellen an den sogenannten Checkpoints behindern oder aktivierende Checkpoints stimulieren (65).

Die erste Zulassung eines CPI erfolgte 2011 bei nicht resezierbaren und/oder metastasierten malignen Melanomen. Mittlerweile sind in der europäischen Union fünf Antikörper zur Therapie in verschiedenen Tumorentitäten wie dem Lungenkarzinom, Nierenzellkarzinom oder Hodgkin-Lymphom zugelassen (65). Dabei werden weiterhin bis zu 70 verschiedene Signalmoleküle, die eine modulierende Wirkung auf die T-Zell-Aktivität zeigen sollen, in über 3400 Studien untersucht (64). Studien zeigen, dass nicht alle Tumorentitäten gleich gut auf eine CPI-Therapie ansprechen. Unter anderem könnte das an dem nur unzureichenden Verständnis der Resistenzmechanismen der Karzinome gegenüber der Therapie liegen (64).

In neueren Studien, wie der randomisierten Phase-III-JAVELIN-Studie, wurde der Effekt des Immuncheckpointinhibitors Avemulab in der Erhaltungstherapie bei Patienten mit HER2 negativem, fortgeschrittenem Karzinom des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs geprüft (22). Die Ergebnisse zeigten zwar eine gleich hohe klinische Wirksamkeit, verfehlten aber das primäre Endziel des überlegenen Gesamtüberlebens, gegenüber der Leitlinienchemotherapie. Allerdings zeigte die CPI-Therapie weniger Nebenwirkungen als die Chemotherapie bei gleicher Wirksamkeit (22). In der Keynote-062 Studie konnte ein Gesamtüberleben von 17,4 Monaten im Behandlungsarm der Monotherapie mit Pembrolizumab zu 10,8 Monaten Überlebenszeit mit einer alleinigen Gabe der Chemotherapie nachgewiesen werden (66). Nachfolgend bewies die CheckMate-649 Phase-III-Studie das Erreichen des primären Endziels eines besseren Gesamtüberlebens und eines verlängerten progressionsfreien Überlebens beim Einsatz von Nivolumab in Kombination mit Cisplatin und 5-Fluoruracil im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Chemotherapeutika (67). In den genannten Studien konnte für die Immuncheckpointinhibitoren ein erhöhtes Sicherheitsprofil im Gegensatz zur Chemotherapie gezeigt werden (22, 66, 67). Aufgrund der großen Erfolge der CPI sollten weitere Forschungen hinsichtlich des besseren Verständnisses der unterschiedlichen Wirkungserfolge der CPI bei den verschiedenen Tumorentitäten, sowie den unbekannte Einflussfaktoren, untersucht und Resistenzmechanismen erforscht werden. Dazu könnte auch der Membranrezeptor CXCR4 gehören.

Der Einfluss von CXCR4 auf die lymphoide Mikroumgebung in Entzündungsreaktionen wurde bereits in der Literaturdiskussion beschrieben. Dabei zeigt das umliegende Stroma eine essentielle Rolle in der Tumorentstehung und dem Progress. Mikrobiologisch setzt es sich unter anderem aus den Zellen der Fibroblasten, des Immunsystems und des Endothels sowie deren Matrixproteinen, Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Enzymen zusammen. Die mesenchymalen Stromazellen können den Liganden CXCL12 in hohen Konzentrationen produzieren und sollen dadurch chemotaktisch bei der Metastasierung der CXCR4 positiven Tumoren helfen. Weiterhin stimuliert CXCL12 die Transformation normaler epitheloider Zellen. Diese produzieren im Folgenden Wachstumsfaktoren und Chemokine, die einen positiven Einfluss auf das Tumorwachstum zeigen (68). In der Arbeit von Zhang et al. beschreiben diese die Progression des Tumors mithilfe der Produktion

antiapoptotischer Moleküle und Wachstumsfaktoren, die durch die Mikroumgebung des Tumors gebildet werden (40, 55).

Li et al. beschreibt 2020 (58) detaillierter die Auswirkungen der CXCR4-Expression des Tumors und die Wirkung auf die inflammatorischen Zellen in der Umgebung. Dieser erkannte, dass die Expressionsstärke von CXCR4 im Tumor die Zusammensetzung der einzelnen Immunzellen verändert. Bei Tumoren mit einer hohen Expression von CXCR4 konnte im Gegensatz zu niedrig exprimierenden Tumoren ein vermehrtes Auftreten von B-Lymphozyten und CD8+ Zellen gefunden werden. Zugleich wurde eine geringere Anzahl an CD4+ Zellen, Monozyten und natürlichen Killerzellen gesehen (58). In vorherigen Studien konnte das vermehrte Auftreten von CD8+ Zellen mit einem schlechteren Gesamtüberleben beschrieben werden (69). Dagegen sind CD4+ Zellen, Monozyten und NK-Zellen positive prognostische Marker (70).

5.5.1 Möglicher Einfluss der Expression von CXCR4 auf das körpereigene Immunsystem

In dieser Arbeit wurde neben der Expression von CXCR4 im Tumor auch das Vorhandensein des Oberflächenrezeptors in Stromazellen untersucht. Dabei wird der Rezeptor nicht ausschließlich von Immunzellen, sondern auch aus Fibroblasten, die in das umliegende Stroma des Tumors eingebettet sind, exprimiert. In der Analyse wurden die histologischen Schnitten auf das Vorkommen von Immunzellinfiltraten in der Nähe des Tumors untersucht. Diese zeigen sich sowohl mit und ohne Expression von CXCR4 auf ihrer Oberfläche. Dabei wird keine Abhängigkeit zwischen dem generellen Auftreten von Immunzellinfiltraten und der Expression von CXCR4 im Tumor festgestellt. Allerdings zeigt

Tabelle 19 eine Korrelation zwischen der Expression von CXCR4 intratumoral und in den Immunzellen. Die relative Wahrscheinlichkeit im Umfeld eines CXCR4 exprimierenden Magenkarzinoms Immunzellinfiltrate mit der gleichen Expression nachzuweisen ist erhöht. Dieser Einfluss der CXCR4 positiven Tumore auf ihre mikrobiologische Umgebung konnte in vorherigen Studien gezeigt werden (40, 58). Die Auswirkung dieser Immunzellinfiltrate auf den Outcome des Patienten ist inkonsistent.

Studien belegen eine schlechtere Prognose für Tumore mit CXCR4 positivem Stroma. Unter der Kontrolle des CXCR4-Signalweges spielen die im Stroma befindlichen Fibroblasten eine wichtige Rolle in der Inhibition des Immunsystems, bei einem gleichzeitigen Ausschluss von T-Lymphozyten. Dies könnte eine Erklärung für den CXCR4-Resistenzmechanismus gegenüber Chemotherapeutika und CPI sein (63). Weiterhin soll die Überexpression von CXCR4 mit einer erhöhten Anzahl von CD8+ Zellen in der Umgebung des Tumors und damit einem schlechteren Überleben einhergehen (58, 69).

Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Dabei wird zunächst in Abbildung 19, der Einfluss der Immunzellinfiltrate auf das Gesamtüberleben des Tumors untersucht. Auch wenn dabei tendenziell eine bessere Überlebenskurve bei gleichzeitigem Auftreten von Immunzellinfiltraten gesehen werden kann, ist der Unterschied nicht statistisch relevant.

Ein deutlicher Effekt auf das Überleben konnte im hier untersuchten Kollektiv nur für Patienten mit CXCR4 exprimierenden Immunzellinfiltraten, dargestellt in Abbildung 20, nachgewiesen werden.

In weiteren Analysen wurde das Gesamtüberleben von Tumoren mit CXCR4 positiven Immunzellinfiltraten und einer zusätzlichen intratumoralen CXCR4-Expression untersucht. Dabei scheint sich deskriptiv in der Betrachtung der Kaplan-Meier-Kurven der positive Effekt auf ein besseres Gesamtüberleben der Patienten zu verstärken. Dieses Ergebnis könnte sich mit den gewonnenen Erkenntnissen von Li et al. erklären lassen. Aufgrund der überwiegend schwachen Expression von CXCR4 in den Tumorzellen setzt sich die Mikroumgebung möglicherweise vermehrt aus Monozyten, natürlichen Killerzellen und CD4+ Zellen zusammen (58). Dieses Mikromilieu hätte einen prognostisch günstigeren Verlauf. Das Ergebnis beruht allerdings nur auf der Untersuchung eines sehr kleinen Kollektivs.

Daher wäre es essentiell wichtig die gezeigten Tendenzen in Studien mit größeren Fallzahlen zu untersuchen. Diese Erkenntnisse könnten eine entscheidende Rolle bei der Wahl einer Immuncheckpointtherapie spielen. Weiterhin könnte der Einsatz einer Kombinationstherapie aus CXCR4-Antagonisten und CPI neu evaluiert werden. Dafür wären weitere Analysen der genauen Zusammensetzung des immunologischen Tumormilieus nützlich. Außerdem sollte nach weiteren Einflussgrößen wie des

Auftretens von Immunzellinfiltraten und deren Expression von CXCR4 geforscht werden

6 Zusammenfassung

Das Adenokarzinom des Magens und des gastroösophagealen Übergang stellt trotz der Bemühungen zur Entwicklung neuer onkologischer Therapieschemata weiterhin einer der schwerwiegendsten Erkrankungen weltweit dar. Im Rahmen der Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten entstand auch die weltweit randomisierte Phase-III-EXPAND-Studie. Diese testete den zusätzlichen Einsatz des monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab mit der Leitlinienchemotherapie im Gegensatz zur alleinigen Therapie mit Cisplatin und Capecitabin. In dieser Studie konnte kein signifikanter Effekt für ein besseres Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein Subkollektiv der EXPAND-Studie auf die Expression des Membranrezeptors CXCR4 mikroskopisch untersucht. CXCR4 ist ein physiologischer Membranrezeptor, der in Tumorzellen zu einer gesteigerten Proliferation, Invasion und Metastasierung führt. Dabei wurde ermittelt, ob die Expression des Membranrezeptors CXCR4 einen Einfluss auf die Therapie mit Cetuximab zeigt und inwiefern dieser Rezeptor als biologischer Marker für die Prognose der Patienten genutzt werden kann. Weiterhin wurde histologisch das Auftreten von Immunzellinfiltrate in der Umgebung des Tumors und deren Expression von CXCR4 auf der Membranoberfläche detektiert und anschließend auf die Folgen, für den Patienten untersucht. Dafür wurden in der Arbeit 459 histologische Schnittproben immunhistochemisch gefärbt und auf die Expression des Membranrezeptors CXCR4 untersucht. Anschließend wurden die positiven und negativen Proben hinsichtlich ihres Gesamtüberlebens verglichen. Dies wurde zusätzlich auch aufgeteilt in die Behandlungsarme wiederholt. Die Ergebnisse zeigten konsistent zur EXPAND-Studie kein statistisch relevant besseres Überleben, weder insgesamt noch aufgeteilt in die Behandlungsarme. Somit ließ sich kein positiver Effekt bei der Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab bei Patienten mit einem CXCR4 exprimierenden Tumor des Magens oder des Gastroösophagealen Übergangs zeigen.

Bei der Untersuchung der CXCR4-Expression als biologischer Marker konnte keine Abhängigkeit der Expression des Membranrezeptors mit den patientenspezifischen Eigenschaften wie Alter, Geschlecht und Herkunft sowie den tumorspezifischen Merkmalen der Laurén-Klassifikation, Grading und Metastasierung, gezeigt werden. Weiterhin ließen sich nur deskriptiv Unterschiede bei der Expressionsrate der unterschiedlichen Wachstumsstadien der Karzinome unterteilt in die AEG-Typen I-III und das Adenokarzinom des Magens zeigen. Dabei war zu beobachten, dass die weiter

proximal liegenden Tumore den Membranrezeptor mit höherer Wahrscheinlichkeit exprimieren als distal gelegene Karzinome. Diese Ergebnisse waren allerdings nicht statistisch relevant. Stattdessen konnten Zusammenhänge der Expression des CXCR4-Rezeptors zum einen mit kleinen Tumorstadien, zum anderen zu den nodalen Stadien N0 und N2-, N3 gesehen werden. Diese Erkenntnisse zeigten aber keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten. Somit konnte für das in dieser Arbeit untersuchte Subkollektiv die Expression des CXCR4 nicht als prognostischer biologischer Marker verwendet werden. Diese Ergebnisse widersprachen anderen zuvor durchgeführten Studien, die die Expression des CXCR4 mit einem schlechten prognostischen Outcome assoziieren konnten (4, 35, 42, 44).

In weiteren Untersuchungen wurde das Auftreten von Immunzellinfiltraten in der Nähe des Tumors untersucht. Dabei wurde zum einen mögliche Zusammenhänge zwischen der Expression von CXCR4 im Tumor und im umliegenden Stroma analysiert, zum anderen wurden die Auswirkungen auf das Gesamtüberleben der Patienten beurteilt. Die Resultate zeigten eine Assoziation zwischen dem Auftreten von Immunzellinfiltraten mit einer positiven Expression von CXCR4 bei gleichzeitiger Merkmalsausprägung des CXCR4 auf der Membranoberfläche der Tumorzellen. Somit exprimierte das Immunsystem der Patienten mit höherer Wahrscheinlichkeit den Rezeptor CXCR4, wenn dieser gleichzeitig von den Tumorzellen exprimiert wurde. In der statistischen Auswertung des Effekts auf das Gesamtüberleben, konnte ein statistisch relevant besseres Überleben für Patienten mit positiv exprimierenden CXCR4 Immunzellen gesehen werden. Wurde das untersuchte Kollektiv noch weiter in Gruppen mit positiv exprimierenden Immunzellen und gleichzeitig CXCR4 positiven Tumorzellen unterteilt, war aufgrund der sehr kleinen Datenmengen kein statistisch relevantes Ergebnis zu errechnen. Deskriptiv ließ sich aber vermuten, dass die Patienten, bei denen gleichzeitig der Membranrezeptors in den Immunzellen und in den Tumorzellen auftritt, eine bessere Überlebenskurve zeigten, als Patienten mit keiner oder nur einseitiger Expression des CXCR4 in einer Zellreihe.

Zusammenfassend hat diese Doktorarbeit verdeutlicht, dass die Expression des CXCR4-Membranrezeptors keinen Effekt auf die Behandlung mit Cetuximab in dem untersuchten Subkollektiv gezeigt hat. Weiterhin konnte bei schon lokal fortgeschrittenen oder bereits fernmetastasierten Patienten CXCR4 in diesem Patientenkollektiv nicht als biologisch prognostischer Marker verwendet werden. Allerdings könnte, aufgrund der Ergebnisse hinsichtlich des besseren Gesamtüberlebens der Patienten mit positiv exprimierenden CXCR4-Immunzellen, ein

Effekt der Expression von CXCR4 in der Behandlung mit Immuncheckpointinhibitoren postuliert werden. Der Einsatz von Immuncheckpointinhibitoren bei der Therapie des Adenokarzinom des Magens und des gastroösophagealen Übergangs ist aktuell Mittelpunkt in vielen klinischen Studien. In eben jeden klinischen Studien, sollte daher der Effekt der Expression von CXCR4 sowohl in den Tumor umgebenden Immunzellen, sowie in den Tumorzellen selbst, untersucht werden

7 Literaturverzeichnis

1. Zentrum für Krebsregisterdaten, epidemiologisches Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland für 2015/2016 Berlin: Robert Koch Institut; [cited 2020 03.06.]. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/ki_d_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?blob=publicationFile.
2. Layer P, Rosien U, (Hrsg.). Praktische Gastroenterologie. München: Urban und Fischer, Elsevier GmbH; 2011. 125-48 p.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
4. Zhao H, Guo L, Zhao H, Zhao J, Weng H, Zhao B. CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2015;6(7):5022-40.
5. Lordick F, Kang Y-K, Chung H-C, Salman P, Oh SC, Bodoky G, et al. Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomised, open-label phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(6):490-9.
6. Quizlet. [cited 2021 30.04.]. Available from: <https://quizlet.com/506778622/anatomie-flash-cards/>.
7. Mitarbeiter GHu. INNERE MEDIZIN-Eine vorlesungsorientierte Darstellung Unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs für die Ärztliche Prüfung. Köln: Dr. med. Gerd Herold; 2018.
8. Massalme S. Crashkurs Pathologie. München: Elsevier Urban und Fischer; 2004.
9. Mims CD, H.M.; Goering, R.V.; Roitt, I.; D.Wakelin; M.Zuckerman. Medizinische Mikrobiologie Infektionologie mit Virologie und Immunologie. München: Urban and Fisher, Elsevier GmbH; 2006.
10. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Magenkarzinom. 2019;Langversion 2.01 (Konsultationsfassung)(AWMF Registernummer: 032/009OL).
11. Li D, Zhang J, Yao WZ, Zhang DL, Feng CC, He Q, et al. The relationship between gastric cancer, its precancerous lesions and bile reflux: A retrospective study. *J Dig Dis*. 2020;21(4):222-9.
12. Quante M, Bhagat G, Abrams JA, Marache F, Good P, Lee MD, et al. Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia. *Cancer cell*. 2012;21(1):36-51.
13. Bass A, Thorsson, V., Shmulevich, I. et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *nature*. 2014;513:202-9.
14. Jenssen C, et al. Kursbuch Endosonographie. Stuttgart, New York, Delhi, Rio: Thieme; 2018.
15. E. Wenzl, Zacherl J, Unter Mitarbeit: R. Roka MH, E. Bodner, F. Gschnitzer, G. Jatzko, H. W. Waclawiczek. acoasso Österreichische Gesellschaft für Chirurgische Onkologie [cited 2020 28.04.]. Available from: <https://www.aco-asso.at/publikationen/aco-asso-consensusberichte/consensus-bericht-magenkarzinom/14-nachsorge-des-magenkarzinoms/>.
16. Fornaro L, Vivaldi C, Calvetti L, Cappetta A, Falcone A, Aprile G. FLOaTing toward new standards in locally advanced resectable gastroesophageal cancer. *Journal of Thoracic Disease*. 2019;11(12):5694-700.

17. Al-Batran SE, Homann N, Pauligk C, Goetze TO, Meiler J, Kasper S, et al. 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. *Lancet*. 2019;393(10184):1948-57.
18. Wagner AD, Syn NLX, Moehler M, Grothe W, Yong WP, Tai B-C, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
19. Satoh T, Bang YJ, Gotovkin EA, Hamamoto Y, Kang YK, Moiseyenko VM, et al. Quality of life in the trastuzumab for gastric cancer trial. *Oncologist*. 2014;19(7):712-9.
20. Lordick F, Al-Batran SE, Dietel M, Gaiser T, Hofheinz RD, Kirchner T, et al. HER2 testing in gastric cancer: results of a German expert meeting. *Journal of cancer research and clinical oncology*.143(5):835-41.
21. Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, Oh SC, Bodoky G, Shimada Y, et al. 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. *Lancet Oncol*. 2014;15(11):1224-35.
22. Moehler M, Dvorkin M, Boku N, Özgüroğlu M, Ryu MH, Muntean AS, et al. Phase III Trial of Avelumab Maintenance After First-Line Induction Chemotherapy Versus Continuation of Chemotherapy in Patients With Gastric Cancers: Results From JAVELIN Gastric 100. *J Clin Oncol*. 2021;39(9):966-77.
23. Moehler M, Ryu MH, Dvorkin M, Lee KW, Coşkun H, Wong R, et al. Maintenance avelumab versus continuation of first-line chemotherapy in gastric cancer: JAVELIN Gastric 100 study design. *Future oncology (London, England)*. 2019;15(6):567-77.
24. D'Ugo D, Biondi A, Tufo A, Persiani R. Follow-up: the evidence. *Dig Surg*. 2013;30(2):159-68.
25. Harding J, Burtneß B. Cetuximab: An epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs of Today*. 2005;41(2).
26. Galizia G, Lieto E, De Vita F, Orditura M, Castellano P, Troiani T, et al. Cetuximab, a chimeric human mouse anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in the treatment of human colorectal cancer. *Oncogene*. 2007;26(25):3654-60.
27. Burtneß B. The role of cetuximab in the treatment of squamous cell cancer of the head and neck. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5(8):1085-93.
28. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(4):337-45.
29. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, Venook A, et al. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Ann Oncol*. 2017;28(8):1713-29.
30. Schimanski CC, Galle PR, Moehler M. Chemokine receptor CXCR4-prognostic factor for gastrointestinal tumors. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(30):4721-4.
31. Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2007;1768(4):952-63.
32. English EJ, Mahn SA, Marchese A. Endocytosis is required for CXC chemokine receptor type 4 (CXCR4)-mediated Akt activation and antiapoptotic signaling. *J Biol Chem*. 2018;293(29):11470-80.

33. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(11):2927-31.
34. Anja Müller BH, Hortensia Soto*, Nianfeng Ge*, Daniel Catron*, Matthew E. Buchanan*, Terri McClanahan*, Erin Murphy* WY, Stephan N. Wagner§, Jose Luis Barrerak, Alejandro Mohark¶, Emma VeraÂ steguir & Albert Zlotnik*. Involvement of chemokine receptors in breast cancer. *Nature.* 2001;410:50-6.
35. Iwasa S, Yanagawa T, Fan J, Katoh R. Expression of CXCR4 and its ligand SDF-1 in intestinal-type gastric cancer is associated with lymph node and liver metastasis. *Anticancer research.* 2009;29(11):4751-8.
36. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Nickels RM, Haberl GC, Tilton B, et al. CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. *Int J Cancer.* 2010;126(6):1302-15.
37. Dimova I, Karthik S, Makanya A, Hlushchuk R, Semela D, Volarevic V, et al. SDF-1/CXCR4 signalling is involved in blood vessel growth and remodelling by intussusception. *J Cell Mol Med.* 2019;23(6):3916-26.
38. Ding X, Huang R, Zhong Y, Cui N, Wang Y, Weng J, et al. CTHRC1 promotes gastric cancer metastasis via HIF-1 α /CXCR4 signaling pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie.* 2020;123:109742.
39. Oh YS, Kim HY, Song IC, Yun HJ, Jo DY, Kim S, et al. Hypoxia induces CXCR4 expression and biological activity in gastric cancer cells through activation of hypoxia-inducible factor-1 α . *Oncology reports.* 2012;28(6):2239-46.
40. Guo F, Wang Y, Liu J, Mok SC, Xue F, Zhang W. CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene.* 2016;35(7):816-26.
41. Kochetkova M, Kumar S, McColl SR. Chemokine receptors CXCR4 and CCR7 promote metastasis by preventing anoikis in cancer cells. *Cell Death Differ.* 2009;16(5):664-73.
42. Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, Yanagita S, Arima H, Hirata M, et al. CCR7 and CXCR4 expression predicts lymph node status including micrometastasis in gastric cancer. *International journal of oncology.* 2009;35(1):19-24.
43. Kwak MK, Hur K, Park DJ, Lee HJ, Lee HS, Kim WH, et al. Expression of chemokine receptors in human gastric cancer. *Tumour Biol.* 2005;26(2):65-70.
44. Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, Saitoh Y, Arita Y, Shinohara K, et al. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res.* 2006;66(4):2181-7.
45. Lang G. *histotechnik praxislehrbuch für die biomedizinische analytik.* Wien: Springer; 2006. 159-295 p.
46. E. KBCBMMMKR. *Verfahren zur Entparaffinisierung biologischer Proben.* 2010.
47. Röthhämel MJS. *Gentechnische Methoden Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2012.
48. Autostainer D. *EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus).* In: Dako, editor. P04115EFG_01_K8010. Glostrup 2015.
49. Jürgen Janssen WL. *Statistische Datenanalyse mit SPSS, Eine anwendungsorientierte Einführung in das Basissystem und das Modul Exakte Tests.* Berlin: Springer; 2017.
50. Weiß C. *Basiswissen Medizinische Statistik.* Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2008.
51. Cleff T. *Deskriptive Statistik und Explorative Datenanalyse.* 2015. Available from: https://static.springer.com/sgw/documents/1536175/application/pdf/Folien_Deskriptive+Statistik_3.+Aufl_Kapitel_4.pdf.

52. Held L, Rufibach K, Seifert B. Medizinische Statistik Konzepte, Methoden, Anwendungen. Hallbergmoos Deutschland: Pearson 2013.
53. Gockel I, Schimanski CC, Heinrich C, Wehler T, Frerichs K, Drescher D, et al. Expression of chemokine receptor CXCR4 in esophageal squamous cell and adenocarcinoma. *BMC cancer*. 2006;6:290.
54. Pelekanos RA, Ting MJ, Sardesai VS, Ryan JM, Lim YC, Chan JK, et al. Intracellular trafficking and endocytosis of CXCR4 in fetal mesenchymal stem/stromal cells. *BMC cell biology*. 2014;15:15.
55. Xue LJ, Mao XB, Ren LL, Chu XY. Inhibition of CXCL12/CXCR4 axis as a potential targeted therapy of advanced gastric carcinoma. *Cancer medicine*. 6(6):1424-36.
56. Wagner PL, Hyjek E, Vazquez MF, Meherally D, Liu YF, Chadwick PA, et al. CXCL12 and CXCR4 in adenocarcinoma of the lung: association with metastasis and survival. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2009;137(3):615-21.
57. Masuda T, Nakashima Y, Ando K, Yoshinaga K, Saeki H, Oki E, et al. Nuclear expression of chemokine receptor CXCR4 indicates poorer prognosis in gastric cancer. *Anticancer research*. 2014;34(11):6397-403.
58. Li Y, Wang HC, Wang JS, Sun B, Li LP. Chemokine receptor 4 expression is correlated with the occurrence and prognosis of gastric cancer. *FEBS open bio*. 2020;10(6):1149-61.
59. Lee HJ, Huang SM, Kim HY, Oh YS, Hwang JY, Liang ZL, et al. Evaluation of the combined expression of chemokine SDF-1 α and its receptor CXCR4 as a prognostic marker for gastric cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2011;2(3):499-504.
60. Thomaidis T, Maderer A, Al-Batran SE, Kany J, Pauligk C, Steinmetz K, et al. VEGFR-3 and CXCR4 as predictive markers for treatment with fluorouracil, leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin in patients with advanced esophagogastric cancer: a comparative study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *BMC cancer*. 2014;14:476.
61. He H, Wang C, Shen Z, Fang Y, Wang X, Chen W, et al. Upregulated expression of C-X-C chemokine receptor 4 is an independent prognostic predictor for patients with gastric cancer. *PloS one*. 2013;8(8):e71864.
62. Yu S, Wu T, Wang J, Cheng C, Wang J, Sun L, et al. Combined Evaluation of Expression of CXCR4 and Nrf2 as Prognostic Factor for Patients with Gastric Carcinoma. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2018;18(3):388-93.
63. Zhou W, Guo S, Liu M, Burow ME, Wang G. Targeting CXCL12/CXCR4 Axis in Tumor Immunotherapy. *Current medicinal chemistry*. 2019;26(17):3026-41.
64. Schardt J. [The use of immune checkpoint inhibitors in routine oncology]. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2020;79(8):809-17.
65. Heinzerling L, de Toni EN, Schett G, Hundorfean G, Zimmer L. Checkpoint Inhibitors. *Dtsch Arztebl Int*. 2019;116(8):119-26.
66. Shitara K, et al.,. Efficacy and Safety of Pembrolizumab or Pembrolizumab Plus Chemotherapy vs Chemotherapy Alone for Patients With First-line, Advanced Gastric Cancer: The KEYNOTE-062 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6(10):1571-80.
67. Moehler MH, et al. CheckMate 649: A randomized, multicenter, open-label, phase III study of nivolumab (NIVO) + ipilimumab (IPI) or nivo + chemotherapy (CTX) versus CTX alone in patients with previously untreated advanced (Adv) gastric (G) or gastroesophageal junction (GEJ) cancer. *J clin Oncol*. 2020.
68. Woo IS, Hong SH, Byun JH, Kang JH, Jeon HM, Choi MG. Circulating stromal cell derived factor-1 α (SDF-1 α) is predictive of distant metastasis in gastric carcinoma. *Cancer investigation*. 2008;26(3):256-61.

69. Thompson ED, Zahurak M, Murphy A, Cornish T, Cuka N, Abdelfatah E, et al. Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma. *Gut*.66(5):794-801.
70. Ubukata H, Motohashi G, Tabuchi T, Nagata H, Konishi S, Tabuchi T. Evaluations of interferon- γ /interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients. *Journal of surgical oncology*. 2010;102(7):742-7.
71. Florian Lordick DA, Markus Borner, Christiane J. Bruns, Wolfgang Eisterer, Gerhard Faber, Susanna Hegewisch-Becker, Markus Möhler, Ron Pritzkeleit, Marianne Sinn, Michael Stahl, Peter Thuss-Patience, Ewald Wöll, AIO IKmd. 2021 [Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/magenkarzinom/@@guideline/html/index.html>].
72. Becker K, Mueller JD, Schulmacher C, Ott K, Fink U, Busch R, et al. Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer*. 2003;98(7):1521-30.
73. Jesussek DM. Datatab e.U. Graz [cited 2020 09.12.]. Available from: <https://datatab.de/tutorial/tabelle-chi-quadrat>.

8 Anhang :

Tabelle 30: Klassifikation der Tumorstadien nach UICC-Stadien (71)

UICC-Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Fernmetastasen
Stadium 0	Tis (Carcinome in situ)	N0	M0
Stadium IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
Stadium IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N2	M0
Stadium IIB	T1	N3	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
Stadium IIIA	T2	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N1	M0
Stadium IIIB	T3	N3	M0
	T4a	N2	M0
	T4b	N0/1	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 31: Erweiterte Kriterien zur Durchführung einer ESD bei Magenfrühkarzinomen (10)

1. Differenziertes Mukosakarzinom (G1/2) ohne Ulzeration und Größe > 2cm
2. Differenziertes Mukosakarzinom mit Ulzeration und Größe < 3cm
3. Gut differenzierte Karzinome mit Submukosainvasion < 500µm und Größe < 3cm
4. Undifferenziertes Mukosakarzinom < 2cm Durchmesser (sofern bioptisch kein Nachweis von Tumorzellen im Abstand ≤ 1cm besteht)

Tabelle 32: Weitere alternative Therapieregime der perioperativen Therapie bei Magenkarzinomen, (10)

Protokoll	Medikamente	Verabreichung
FLOT	Docetaxel Oxaliplatin 5-FU+Folinsäure	i.v.
ECF	Epirubicin Cisplatin 5-FU+Folinsäure	i.v.
PLF	Cisplatin 5-FU+ Folinsäure	i.v.
EOX	Epirubicin Oxaliplatin Capecitabine	i.v. p.o.
FLO	Oxaliplatin 5-FU+ Folinsäure	i.v.
FLP	Cisplatin 5-FU+ Folinsäure	i.v.

Tabelle 33: Regressionsgrading nach Becker (72) (10)

Regressionsgrad nach Becker	Anmerkung
Kompletter Response (CR)	Keine Tumorzellen nachweisbar
Grad 1a	
Subtotaler Response (1)	In <10% des Tumorbettes
Grad 1b	morphologisch intakte neoplastische Zellen
Partieller Response (16)	In 10 bis 50% des Tumorbettes
Grad 2	morphologisch intakte neoplastische Zellen
Geringer Response (MR)	In >50% des Tumorbettes
Grad 3	morphologisch intakte neoplastische Zellen
Keine Response (53)	Keine histologischen Regressionszeichen

Tabelle 34: Auflistung der kritischen Werte des Qui-Quadrat Testes auf einem Signifikanzniveau von 5%, abhängig von den Freiheitsgraden; Legende: d_f = Freiheitsgrad des Qui-Quadrat Testes(73)

Freiheitsgrad Qui Quadrat d_f =	Kritischer Wert des Qui-Quadrat Testes Bei Signifikanzniveau von 5%
1	3,841
2	5,991
3	7,815
4	9,488
5	11,070

9 Danksagung

Zum Schluss möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, [REDACTED], der es mir ermöglichte diese Dissertationsarbeit anzufertigen. Ich bedanke mich für die große fachliche und wissenschaftliche Hilfe, sowie die persönliche Unterstützung während des Erfassens dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Zweitkorrektor, [REDACTED], für die Bemühungen und die Korrektur der Arbeit bedanken.

Ein weiterer Dank gilt meiner Betreuerin [REDACTED]. Sie hat mir mit Ihren Erfahrungen sehr in der Erhebung und Auswertung der Daten geholfen.

Besonders danken möchte ich [REDACTED] und [REDACTED], die mit Ihren sprachlichen Fähigkeiten viel Mühe und Gewissenhaftigkeit, diese Arbeit verbessert haben.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls meiner Familie, die mich zum Studium der Humanmedizin motiviert und mir dieses ermöglicht haben. Weiterhin bedanke ich mich für die große Unterstützung und die vielen Ratschläge während der Studienzeit.

Zuletzt möchte ich meinem Freund [REDACTED] für seine große Unterstützung und Motivation während der Erarbeitung dieser Arbeit danken. Dies war mir stets eine große Hilfe und Stütze.

10 Lebenslauf

Name: Anna Bartmann