

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

Analyse des Stammzellmarkers CD133 in einem Kollektiv aus Patienten mit
Karzinomen des Magens und des gastroösophagealen Übergangs der
Universitätsmedizin Mainz

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

Vorgelegt von

Franziska Sophie Wolf
aus Frankfurt am Main

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis.....	III
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Literaturdiskussion.....	2
2.1 Das Magenkarzinom	2
2.1.1 Epidemiologie	2
2.1.2 Pathogenese und Risikofaktoren	4
2.1.3 Klinik und Diagnostik	7
2.1.4 Klassifikation und Stadieneinteilung	9
2.1.5 Therapie	12
2.2 Tumorstammzellen und Tumorstammzellmarker	16
2.2.1 Vorstellung des untersuchten Stammzellmarkers CD133.....	18
2.2.2 Bedeutung von CD133 in gastrointestinalen Tumoren	19
3 Patienten, Material und Methoden	22
3.1 Das Patientenkollektiv, Datenerhebung und Datendokumentation	22
3.2 Material	23
3.3 Methoden	25
3.3.1 Immunhistochemie im Allgemeinen	25
3.3.2 Allgemeine Probenvor- und Nachbereitung	27
3.3.3 CD133 Immunhistochemie.....	28
3.3.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	29
3.3.5 Statistische Auswertung	29
4 Ergebnisse.....	31
4.1 Deskriptive Statistiken des Gesamtkollektivs	31
4.1.1 Patienten- und Tumorcharakteristika	31
4.1.2 Risiko-und Einflussfaktoren	34
4.1.3 Therapiealgorithmus des Patientenkollektivs.....	35
4.1.4 Korrelation des Therapiealgorithmus mit Tumorcharakteristika des Patientenkollektivs	38
4.2 Evaluationen der CD133 Färbeergebnisse	40
4.2.1 Deskriptive Analyse der Färbeergebnisse	40

4.2.2	Korrelation der Färbung mit den klinisch-pathologischen Patientenparametern.....	43
4.3	Überlebenszeitanalysen	47
4.3.1	Überlebenszeitanalyse bezüglich therapeutischer Maßnahmen.....	47
4.3.2	Überlebenszeitanalyse bezüglich Patienten- und Tumoreigenschaften..	52
4.3.3	Überlebenszeitanalyse bezüglich Risiko- und Einflussfaktoren	55
4.3.4	Überlebenszeitanalyse bezüglich CD133 Expression.....	55
5	Diskussion.....	58
5.1	Bewertung des Gesamtkollektivs	58
5.1.1	Geschlechter- und Altersverteilung.....	58
5.1.2	Tumorlokalisierung, Laurén-Klassifikation und TNM-Status	60
5.1.3	Einfluss chemotherapeutischer Therapiekonzepte	62
5.1.4	Überlebenszeitanalyse und Prognose	64
5.2	Diskussion der Ergebnisse des Stammzellmarkers CD133	68
5.2.1	CD133 als Prognosefaktor beim Magenkarzinom und Karzinom des gastroösophagealen Übergangs	73
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	79
7	Literatur	81
8	Anhang.....	93
8.1	Arbeitsablauf der immunhistochemischen Färbung.....	93
9	Danksagung	95
10	Lebenslauf	96

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
5-FU	5- Fluorouracil
Abb.	Abbildung
AEG	Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs
AIO	Arbeitsgemeinschaft internistische Onkologie
BMI	Body Mass Index
CagA	cytotoxin-associated gene A
CD133	Cluster of differentiation 133
CAPOX	Therapieregime aus Capecitabin und Oxaliplatin
CDH1	E-Cadherin
CT	Computertomographie
CTX	Chemotherapie
DAB	Diaminobenzidin
ECF	Therapieregime aus Epirubicin, Cisplatin, 5-FU
ECX	Therapieregime aus Epirubicin, Cisplatin, Capecitabin
EOF	Therapieregime aus Epirubicin, Oxaliplatin, 5-FU
EOX	Therapieregime aus Epirubicin, Oxaliplatin, Capecitabin
EPIC	European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition
ESA	Epidemiologische Suchtsurvey
ESD	endoskopische Submukosadisektion
et al.	et alii (und andere)
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FLO/FOLFOX	Therapieregime aus 5-FU, Leukovorin und Oxaliplatin
FLOT	Therapieregime aus Docetaxel, Oxaliplatin und 5-FU
FOLFIRI	Therapieregime aus Leukovorin, 5-FU und Irinotecan
HIF	Hypoxie- induzierter Faktor
HDAC1	Histondeacetylase 1
HER2/neu	human epidermal growth factor 2
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HR	Hazard ratio
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
MAGIC	Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy
ÖGD	Ösophago-Gastro-Duodenoskopie
p	p-Wert
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed cell death ligand 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
R	Residualtumor
ROC	Receiver Operating Characteristic
UICC	Union internationale contre le cancer
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Magenkarzinom im geographischen Vergleich, Abb. entnommen aus (4)	2
Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht melanotischen Hautkrebs), Abb. entnommen aus (5)	3
Abbildung 3: Aktuell diskutierte Entstehungsmodelle für Krebs, Abb. entnommen aus (67)	17
Abbildung 4: direkte Immunhistochemie, Abbildung entnommen aus (98)	26
Abbildung 5: indirekte Immunhistochemie, Abbildung entnommen aus (98)	27
Abbildung 6: Therapiealgorithmus des Patientenkollektivs.....	35
Abbildung 7: Negative Färbung von CD133	40
Abbildung 8: Apikale Färbung von CD133.....	41
Abbildung 9: Zytoplasmatische Färbung von CD133.....	41
Abbildung 10: Apikale und zytoplasmatische Färbung von CD133	42
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich des Erhalts einer neoadjuvanten Chemotherapie.....	47
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve bezüglich des Erhalts einer adjuvanten Chemotherapie.....	48
Abbildung 13: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich Tumorgröße, aufgeteilt nach erhaltener neoadjuvanter Chemotherapie oder therapienaiv.	49
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich lokoregionärer Lymphknotenmetastasierung, aufgeteilt nach erhaltener neoadjuvanter Chemotherapie oder therapienaiv	50
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich Fernmetastasierung, aufgeteilt nach erhaltener neoadjuvanter Chemotherapie oder therapienaiv.....	51
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich Grading, aufgeteilt nach erhaltener neoadjuvanter Chemotherapie oder therapienaiv	51
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich T-Status.....	53
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich N-Status.	53
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich M-Status.....	54
Abbildung 20: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich CD133 Expression	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM Klassifikation nach UICC 8. Auflage 2017, angelehnt an (44)	10
Tabelle 2: Stadien nach UICC 8. Auflage 2017, angelehnt an (44)	11
Tabelle 3: Übersicht über das Patientenkollektiv	31
Tabelle 4: Übersicht über die Lokalisation des Primarius und der Fernmetastasen des zusammengestellten Patientenkollektivs	33
Tabelle 5: Risiko- und Einflussfaktoren bezüglich der Karzinogenese eines Karzinoms des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs	34
Tabelle 6: Therapieregimes des Patientenkollektivs	36
Tabelle 7: Zusammenhang des Therapiealgorithmus mit Tumorcharakteristika des Patientenkollektivs	38
Tabelle 8: Färbeergebnisse für CD133	40
Tabelle 9: Verteilung der klinisch-pathologischen Patientenparameter zur CD133 Expression.....	43
Tabelle 10: Verteilung von Risiko-und Einflussfaktoren zur CD133 Expression	45
Tabelle 11: Überlebenszeitanalyse bezüglich therapeutischer Maßnahmen	49
Tabelle 12: Überlebenszeitanalyse bezüglich Patienten- und Tumoreigenschaften	52
Tabelle 13: Überlebenszeitanalyse bezüglich Risiko- und Einflussfaktoren.....	55
Tabelle 14: Überlebenszeitanalyse bezüglich CD133 Expression	55

1 Einleitung und Zielsetzung

Das Magenkarzinom erlangt als weltweit eine der am häufigsten auftretenden Tumorentitäten des Gastrointestinaltrakts klinische Relevanz und steht trotz rückläufiger Inzidenzen an zweiter Stelle krebsassoziierter Todesfälle (1). Obgleich Diagnostik und Therapie sich in den letzten Jahren als ein sich stetig weiterentwickelnder Prozess mit zahlreichen Fortschritten erwiesen, geht das Magenkarzinom weiterhin mit einer hohen Mortalität einher. Aufgrund des langen asymptomatischen Verlaufs wird die Diagnose häufig erst in einem Stadium gestellt, welches die Grenzen der Kurabilität bereits überschritten hat (2). Deshalb kommt der Identifikation von Risikokonstellationen und einer frühen Diagnosestellung eine wegweisende Bedeutung zu, um Therapiemaßnahmen in kurativer Intention einleiten zu können. Hierbei nimmt die chirurgische Resektion eine zentrale Rolle ein (3). Beim lokal fortgeschrittenen Karzinomen des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs hat sich eine perioperative Chemotherapie etabliert, welche einen Überlebensvorteil gegenüber der alleinigen Operation mit sich bringt (4). Für Patienten¹ mit einer palliativen Tumorbehandlung bleibt die Prognose mit einem medianen Gesamtüberleben von 8 bis 10 Monaten weiterhin unbefriedigend (5).

Deshalb kommt der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten eine besondere Bedeutung zu. Als Angriffspunkt moderner Therapieoptionen etablieren sich zunehmend molekulare Strukturen, deren Rolle in Tumorentstehung und -wachstum es zu evaluieren gilt. Dies setzt ein umfangreiches Verständnis der Karzinogenese voraus, weshalb Tumorstammzellen und deren Biomarker wie CD133 zunehmend in den Fokus zahlreicher Forschungsanstrengungen gerückt sind.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Expression des Tumorstammzellmarkers CD133 bei einem Patientenkollektiv mit einem Magenkarzinom oder Karzinom des gastroösophagealen Übergangs der Universitätsmedizin Mainz mittels Immunhistochemie. Es soll dessen Vorhersagewert als Prognosefaktor eruiert, die Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern herausgearbeitet sowie der Stellenwert von CD133 als möglicher Bestandteil moderner Diagnostik und Therapie beleuchtet werden.

¹ Im Interesse der besseren Lesbarkeit werden in der vorliegenden Arbeit nicht ausdrücklich geschlechtsspezifische Personenbezeichnungen unterschieden. Alle personenbezogenen Bezeichnungen sind somit geschlechtsneutral zu verstehen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das Magenkarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das Magenkarzinom zählt weltweit zu den häufigsten Krebsentitäten. Mit weltweit 1.033.700 Neuerkrankungen im Jahr 2018 handelt es sich um die sechst häufigste Ursache maligner Neoplasien (1). Vor weniger als einem Jahrhundert noch führte das Magenkarzinom die Liste der am häufigsten vorkommenden Krebsentitäten in weiten Teilen der Welt an und war bis Mitte der 1990er Jahre die häufigste Ursache krebssassoziierter Todesfälle (6, 7). Doch trotz rückläufiger Inzidenzen stellt das Magenkarzinom mit jährlich rund 782.700 Todesfällen (Stand 2018) weiterhin als zweithäufigste Krebstodesursache ein globales Problem dar (1).

Hinsichtlich Inzidenz und Mortalität lassen sich jedoch regionale Unterschiede erkennen. Während die meisten Neuerkrankungen in weiten Teilen Ostasiens, insbesondere in Korea, der Mongolei, Japan und China, in Teilen Zentral- und Osteuropas sowie in Südamerika registriert werden, finden sich die niedrigsten Inzidenzraten in Nordamerika und Afrika (8), (siehe Abb. 1).

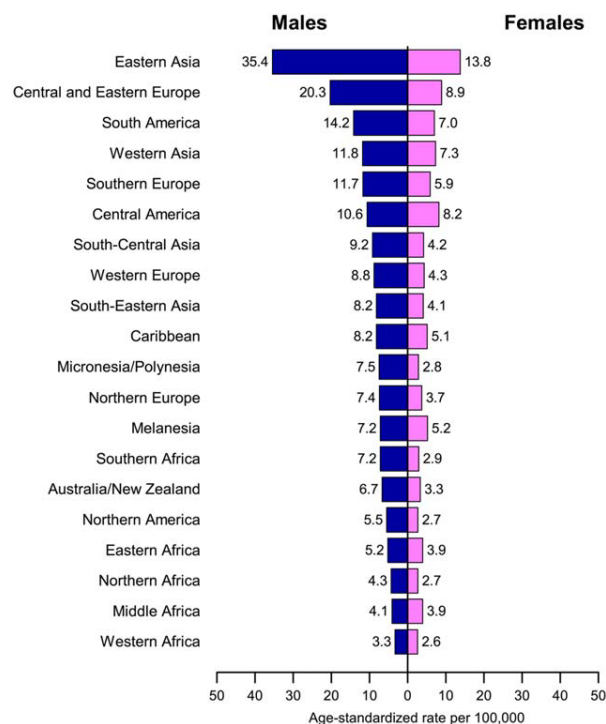


Abbildung 1: Das Magenkarzinom im geographischen Vergleich, Abb. entnommen aus (8)

Auch bezüglich des Geschlechts zeigen sich deutliche Unterschiede. Weltweit erkranken Männer doppelt so häufig an einem Magenkarzinom wie Frauen (8). Betrachtet man östliche Teile Asiens, erkranken hier 35,4 pro 100.000 Männer sowie 13,8 pro 100.000 Frauen an Magenkrebs, während in Westafrika 3,3 pro 100.000 Männer sowie 2,2 pro 100.000 Frauen von dieser Entität betroffen sind. Es lässt sich somit erkennen, dass sich geschlechtsspezifische und geographische Risikokonstellationen ergeben.

In Deutschland erkrankten im Jahr 2016 9.300 Männer und 5.840 Frauen an Magenkrebs. Damit ergibt sich für Männer eine standardisierte Erkrankungsrate von 14,8 pro 100.000 Personen, für Frauen entspricht diese 7,2 pro 100.000 Personen. Im Vergleich aller neuauftretenden Karzinomerkrankungen in Deutschland steht das Magenkarzinom für Männer an 10. und für Frauen an 8. Stelle (9).

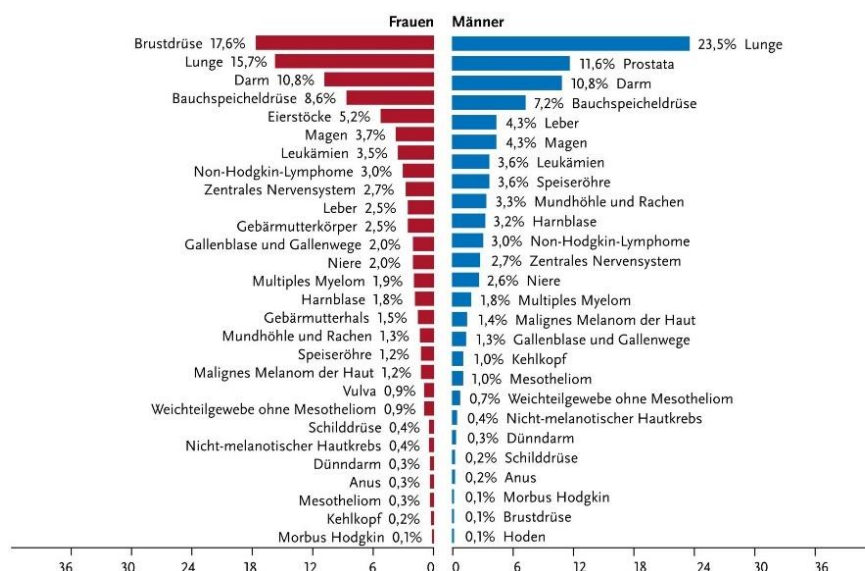


Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht melanotischen Hautkrebs), Abb. entnommen aus (9)

Auch in Deutschland zeigt sich, wie in anderen Industrienationen, sowohl eine stetig rückläufige Inzidenz als auch Mortalität bei beiden Geschlechtern (9). Ursächlich hierfür wird das Zusammenspiel verschiedener Faktoren, wie unter anderem die Verfügbarkeit frischer Lebensmittel und damit einhergehende Unabhängigkeit von salzbasierten Konservierungsformen, sowie abnehmendes Auftreten *Helicobacter pylori* assoziierter chronischer Gastritiden angesehen (8). Dennoch steht das

Magenkarzinom mit 4,3% bei Männern an 5. Stelle und bei Frauen mit 3,7% an 6. Stelle der krebsassoziierten Sterbefälle in Deutschland (9).

Durch den langen asymptomatischen Verlauf wird das Magenkarzinom in über der Hälfte der Fälle erst in einem fortgeschrittenem oder nicht mehr kurativ behandelbaren Stadium diagnostiziert, sodass die Prognose insgesamt ungünstig bleibt (2). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt in Deutschland für Männer bei circa 32%, während sie bei Frauen circa 34% entspricht (9).

Betrachtet man die Neuinfektionen, lässt sich erkennen, dass das mittlere Erkrankungsalter bei Männern 72 Jahre beträgt, Frauen erkranken im Mittel mit 76 Jahren an einem Magenkarzinom. Im Allgemeinen kann man einen Anstieg des Erkrankungsrisikos mit zunehmendem Alter feststellen (9).

2.1.2 Pathogenese und Risikofaktoren

Der Entstehung eines Magenkarzinoms liegt eine multifaktorielle Genese zugrunde. Die Vielzahl an pathogenetisch relevanten Faktoren lassen sich in drei Kategorien subsumieren, die die Ätiologie näher charakterisieren. So lassen sich Erkrankungen mit erhöhtem Karzinomrisiko, ernährungsbedingte Faktoren sowie genetische Faktoren finden (2).

Unter den Erkrankungen mit erhöhtem Karzinomrisiko steht an erster Stelle die durch *Helicobacter pylori* verursachte Typ B Gastritis, welche bei über 90% der Magenfrühkarzinome nachweisbar ist (2). Die Infektion mit *Helicobacter pylori* gilt somit als bedeutendster Risikofaktor zur Entstehung eines Magenkarzinoms und wurde aus diesem Grund 1994 von der „International Agency for Research on Cancer“ der WHO als Klasse-I-Karzinogen eingestuft (3, 10). *Helicobacter pylori* ist ein gram negatives Bakterium, welches, häufig schon in der frühen Kindheit, von Mensch zu Mensch übertragen wird und anschließend das Magenepithel besiedelt. Ohne antiinfektive Therapie persistiert das Bakterium ein Leben lang und führt immer zu einer chronischen Gastritis (3, 11). Dieser kann konsekutiv eine Atrophie, eine intestinale Metaplasie und Dysplasie folgen. Am Ende dieser 1988 als Correa-Kaskade publizierten Hypothese steht letztendlich die Karzinomentstehung auf Boden der vorbestehenden präkanzerösen Läsionen (12, 13).

Um das Magenepithel besiedeln und dort bestehen zu können, produzieren alle *Helicobacter pylori* Stämme multiple Virulenzfaktoren. Neben Virulenzfaktoren, die von allen Stämmen exprimiert werden, existieren ebenso Faktoren, deren Gene nur von einer Subpopulation codiert werden. Ein Beispiel hierfür ist CagA, cytotoxin-associated gene A, dessen Expression *Helicobacter pylori* Stämme in zwei große Gruppen einteilt. Typ I Bakterien verfügen über CagA und damit einhergehende Einflüsse auf das Magenepithel, Typ II Bakterien nicht (14).

Es wird geschätzt, dass mindestens 50% der Weltbevölkerung mit *Helicobacter pylori* infiziert sind, doch nur bei einem sehr geringen Prozentsatz (unter 1%) schreitet die chronische Entzündung zu einem Karzinom fort (11). Es bedarf demnach zusätzlicher Einflüsse, die zur malignen Entartung prädisponieren. Neben wirtsspezifischen Einflussfaktoren erwies sich auch CagA als ein der Entstehung eines Magenkarzinoms begünstigendes Protein. So konnte gezeigt werden, dass Personen, die Antikörper gegen CagA aufweisen, ein 5,8 mal höheres Risiko haben an Magenkrebs zu erkranken, als *Helicobacter pylori* -negative Personen (15).

Somit kommt der Eradikation von *Helicobacter pylori* eine besondere Bedeutung zu. Eine Metaanalyse mit insgesamt 6695 Probanden konnte zeigen, dass durch die Eradikation die Wahrscheinlichkeit an einem Magenkarzinom zu erkranken sinkt (HR 0,65, CI 0,43-0,98) (16). Entscheidend steht der Beginn der Behandlung im Vordergrund. Diese reduziert das Risiko der malignen Entartung am wirkungsvollsten, wenn zum Zeitpunkt der Eradikation noch keine Präkanzerosen detektierbar sind (17). Zum Zweck der Eradikation stehen verschiedene Therapieschemata zur Verfügung, deren Auswahl sich an vorherrschenden Resistenzen orientieren sollte. Im Mittelpunkt stehen hierbei Standard-Triple-Therapien nach italienischem oder französischem Schema sowie die Bismuth-Quadrupeltherapie (18).

Weitere Erkrankungen, die als Risikofaktoren zur Entwicklung eines Magenkarzinoms gelten, sind adenomatöse Magenpolypen (2, 19), Morbus Ménétrier (2, 20) und der Zustand nach Magenteilresektion, insbesondere viele Jahre nach dieser. So zeigte eine Kohortenstudie mit 3470 Patienten nach vorausgegangener Magenteilresektion aufgrund benigner Läsionen, dass das Risiko, an einem Karzinom des Restmagens zu erkranken, 40-45 Jahre nach der Operation 7,3 fach erhöht ist, während es 5-10 Jahre nach der chirurgischen Intervention dem Risiko der Normalbevölkerung entspricht (21).

Bezüglich der ernährungsbedingten Faktoren, die als Risiko zur Entwicklung eines Magenkarzinoms gelten, wird der Einfluss nitratreicher Speisen kontrovers diskutiert und kommt aufgrund inkonsistenter Datenlage auch in einer Metaanalyse zu keiner klaren Schlussfolgerung (22). Auch bezüglich des vermeintlichen Risikofaktors Übergewicht herrscht in der Literatur Uneinigkeit. In einer Metaanalyse wurde der Zusammenhang zwischen BMI und dem Auftreten von Karzinomen des Ösophagus und des Magens untersucht. Hier zeigte sich, insbesondere für einen BMI ≥ 30 , dass Übergewicht und Adipositas das Krebsrisiko erhöhen, mehr jedoch das des Ösophagus als das des Magens (23). Untersuchungen auf Grundlage von Daten der EPIC Studie hingegen ließen erkennen, dass Übergewicht und Adipositas, gemessen am BMI, keinen Risikofaktor für ösophageale oder gastrale Tumore darstellen (24). Des Weiteren werden Alkohol und Nikotinkonsum als Risikofaktoren in der Karzinogenese des Magenkarzinoms deklariert (25–27), während der Verzehr von Obst und Gemüse mit dem enthaltenen antioxidativ wirkendem Vitamin C protektiv wirken soll (2, 11, 28).

Das Magenkarzinom ist eine Krebsentität, deren Ursprung genetisch determiniert sein kann. So haben Verwandte ersten Grades von Patienten mit Magenkarzinom ein 2,5-fach erhöhtes Risiko, ebenfalls an diesem zu erkranken (29).

In 1-3% der Fälle liegen der Genese des Tumors hereditäre Magenkrebsentitäten zugrunde. Diese umfassen das hereditäre diffuse Magenkarzinom, das familiäre intestinale Magenkarzinom sowie das gastrale Adenokarzinom mit proximaler Polyposis des Magens (3, 30).

Das hereditäre diffuse Magenkarzinom ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung und geht in 30-50% der Fälle mit einer Mutation im E-Cadherin Gen CDH1, welches als Zelladhäsions- und Tumorsuppressorprotein fungiert, einher (31). Das Lebenszeitrisiko für Träger der CDH1 Mutation an einem diffusen hereditären Magenkarzinom zu erkranken, beträgt für Männer 70%, für Frauen sind es 56% (32). Weitere hereditäre Karzinomsyndrome, die zu einem erhöhten Risiko führen, an Magenkrebs zu erkranken, sind unter anderem das Lynch-Syndrom (HNPCC), die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das Li-Fraumeni-Syndrom, das Peutz-Jeghers-Syndrom sowie das Cowden-Syndrom (3).

2.1.3 Klinik und Diagnostik

Das Magenkarzinom verbleibt lange Zeit asymptomatisch. Viele Patienten merken erst in fortgeschrittenen Tumorstadien Beschwerden, die folglich zur Diagnosestellung führen. Als sogenannte Alarmsymptome werden Dysphagie, rezidivierendes Erbrechen, Inappetenz, unklarer Gewichtsverlust, gastrointestinale Blutung sowie eine unklare Eisenmangelanämie angesehen und sollten zu einer endoskopischen Diagnostik veranlassen (3). Weitere Symptome, die auf eine bereits stattgefundene Metastasierung hinweisen können, umfassen unter anderem das Vorhandensein von Aszites, eine Vergrößerung der Leber sowie ein vergrößert tastbarer Virchow-Lymphknoten, welcher sich links supraklavikulär befindet und Hinweis auf eine lymphogene Metastasierung bieten kann (2).

Die Metastasierung des Magenkarzinoms erfolgt frühzeitig und vollzieht sich auf unterschiedlichen Metastasierungswegen. Dabei nimmt die lymphogene Metastasierung eine besondere klinische Rolle und Bedeutsamkeit ein, denn zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind bei 70% der Patienten schon lymphogene Tochtergeschwülste vorhanden, welche vor allem an der großen und kleinen Magenkurvatur, am Truncus coeliacus sowie paraaortal und mesenterial zu finden sind (2). Hämatogen metastasiert das Magenkarzinom bevorzugt über das Portalsystem in die Leber, weiterhin können multiple Organe wie Lunge, Knochen und Gehirn betroffen sein. Ein weiterer Metastasierungsweg stellt die Bildung von Tochtergeschwülsten per continuitatem dar. Hierbei werden benachbarte Organe wie beispielsweise der Ösophagus oder Teile des Darms infiltriert. Des Weiteren ist die Ausbildung einer Peritonealkarzinose, der Befall des Bauchfells, klinisch bedeutsam. Als Krukenberg-Tumor bezeichnet man Abtropfmetastasen, welche sich an den Ovarien manifestiert haben (2).

Wie bereits vorhergehend geschildert, ist die Prognose des fortgeschrittenen Magenkarzinoms insgesamt ungünstig. Deshalb kommen der frühzeitigen Diagnostik und damit einhergehender Therapiemöglichkeit eine tragende Rolle zu.

Mittels einer Ösophago-Gastro-Duodenoskopie wird sowohl eine bioptische Sicherung der Verdachtsdiagnose Magenkarzinom als auch eine genaue Lokalisation des Tumors möglich. Diagnostische Schwierigkeiten kann die Identifikation von Magenkarzinomen in frühen Stadien, sogenannte Magenfrühkarzinome, bereiten. Der

Einsatz einer Chromendoskopie, das Aufsprühen von Farbstoffen auf die Magenmukosa, kann das Auffinden verdächtiger Areale erleichtern und im Vergleich zur Standard-Weißlichtendoskopie die Zuverlässigkeit der Detektion verbessern (33, 34).

Der Stellenwert der Bestimmung von Tumormarkern in der Diagnostik des Magenkarzinoms wird kontrovers diskutiert. Aufgrund geringer Sensitivität und Spezifität und fehlender klinischer Konsequenz ist der Einsatz dieser molekularen Marker jedoch in der Primärdiagnostik nicht vorgesehen (3).

Um das Ausmaß und die Ausbreitung einer Tumorerkrankung im Körper einzuschätzen, wird eine Stadieneinteilung, das Staging, durchgeführt.

Bezüglich des Magenkarzinoms wird der Abdomensonographie eine wichtige Rolle zur Beurteilung der Leber zuteil. Diese breit verfügbare Untersuchungstechnik weist eine gute Sensitivität und Spezifität auf, die sich, durch den Einsatz von Kontrastmittel, sogar noch weiter verbessern lassen (35, 36). Patienten mit einem Tumor im Bereich des gastroösophagealen Übergangs sollte zusätzlich eine sonographische Untersuchung der Halslymphknoten erfolgen, diese diagnostische Maßnahme kann bei Patienten mit Tumoren im Bereich des Magens ebenfalls durchgeführt werden (3). Ein weiteres Verfahren, das Aufschluss über eine mögliche Fernmetastasierung sowie die Ausdehnung des Primärtumors bietet ist die Computertomographie. Diese umfasst diagnostisch vor allem die Untersuchung des Thorax sowie des Abdomens und Beckens und sollte mit intravenösem Kontrastmittel und unter Distension des Magens mit Kontrastmittel oder Wasser durchgeführt werden. Alle potenziell kurativ zu behandelnden Patienten sollen laut aktueller Leitlinie diese Art der Diagnostik erhalten (3).

Die Endosonographie ist ein Verfahren, welches durch die gute Darstellung der Wandschichten des Gastrointestinaltraktes detaillierte Aussagen über die Tiefenausdehnung erlaubt und somit ein lokoregionäres Staging ermöglicht.

Es existieren zahlreiche Studien, die eine gute Treffsicherheit des T-Stagings belegen. So wurde beispielsweise 2015 eine Metaanalyse aus 50 Studien mit 4397 Patienten veröffentlicht, die die Sensitivität und Spezifität zur Unterscheidung der Karzinome im Stadium T1/2 von fortgeschrittenen Stadien T3/T4 mit 86% bzw. 90% angab (37).

Die Endosonographie bietet weiterhin die Möglichkeit lokoregionäre Lymphknoten zu beurteilen und somit ein N-Staging durchzuführen. Dies stellt den Untersucher jedoch vor das Problem, auffällige Befunde nicht zwischen reaktiv entzündlich verändert oder

durch Tumorzellen befallen, unterscheiden und klassifizieren zu können. Somit kann auch in der Aufarbeitung durch Metaanalysen das N-Staging die hohe Sensitivität und Spezifität des T-Stagings nicht erreichen (37, 38).

Andere diagnostische Verfahren, die keinen routinemäßigen Einsatz finden, umfassen das PET-CT, die Knochenszintigraphie und die Magnetresonanztomographie, deren Anwendung laut aktueller Leitlinie auf spezifische Fragestellung oder bei spezieller klinischer Indikation beschränkt werden (3). Dies trifft auch auf die diagnostische Laparoskopie zu, die bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Magenkarzinom Kurabilität ermitteln und die Entscheidung hinsichtlich einer neoadjuvanten Therapie stützen soll (3).

2.1.4 Klassifikation und Stadieneinteilung

Das Magenkarzinom bietet als morphologisch heterogene Erkrankung mehrere Möglichkeiten der Einteilung.

So führt die Klassifikation nach Laurén eine Einteilung von Magentumoren nach dem Wachstumsmuster durch und unterscheidet einen intestinalen von einem diffusen Typ, ein Mischtyp kann sich ebenfalls klinisch manifestieren (39).

Dabei zeigt der intestinale Typ ein eher polypöses, gut begrenztes Wachstumsmuster, während der diffuse Typ das Stroma infiltriert und eher schlecht abgrenzbar ist (2). Diese histopathologische Klassifikation ist seit 1965 etabliert und hat seitdem nicht an klinischer Relevanz verloren. Die Laurén Klassifikation kann als Prognosefaktor fungieren. Es zeigte sich, dass Patienten mit einem intestinalen Tumortyp längere Überlebenszeiten aufwiesen als solche mit einem diffusen oder Mischtyp (40, 41). Des Weiteren kann die Laurén-Klassifikation als Entscheidungsgrundlage zur Wahl und Ausmaß des Therapieverfahrens herangezogen werden. So richtet sich im Fall einer chirurgischen Intervention der Sicherheitsabstand der Resektionsgrenze unter anderem nach dem Wachstumsmuster und beträgt beim intestinalen Typ 5 cm, während er bei Vorliegen einer diffusen Komponente 8 cm beträgt (3).

Um den Tumor hinsichtlich seines Grades der Differenzierung zu beschreiben, wird bei der pathologischen Aufarbeitung ein Grading durchgeführt. So ergibt sich eine Graduierung von G1 als hoch differenziert, G2 als mäßig differenziert, G3 als gering differenziert sowie G4 als losgelöst von jeglicher Differenzierung (2).

Eine weitere Einteilung, die auf der Tumorhistologie basiert, stellt die WHO Klassifikation dar. Unterschieden werden hierbei papilläre, tubuläre und muzinöse Adenokarzinome, selten vorherrschende Siegelringkarzinome, Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse Karzinome, kleinzellige Karzinome sowie undifferenzierte Karzinome (2, 42, 43).

Eine gängige Klassifikation, die die Evaluation der Tumorausbreitung in mehreren Dimensionen ermöglicht, ist die TNM Klassifikation der Union nationale contre le cancer (UICC, siehe Tabelle 1). Hierbei beschreibt das T die Größe bzw. die Infiltrationstiefe des Primärtumors, während das N den Status einer lokoregionären Lymphknotenmetastasierung implementiert. Das M gibt darüber Aufschluss, ob bereits Fernmetastasen auffindbar sind. Die Zuordnung zu einem Stadium erfolgt entweder klinisch (cTNM) durch bildgebende Verfahren, wie beispielsweise Ultraschall sowie Computertomographie, oder nach Aufarbeitung des Tumorgewebes durch den Pathologen (pTNM) (44, 45).

TNM Klassifikation	
T	Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	T1a: Infiltration der Lamina propria oder muscularis mucosae T1b: Infiltration der Submukosa
T2	Infiltration der Muscularis propria
T3	Infiltration der Subserosa
T4	T4a: Perforation der Serosa T4b: Infiltration von Nachbarstrukturen
N	Lymphknotenstatus
N1	1-2 lokoregionäre Lymphknoten befallen
N2	3-6 lokoregionäre Lymphknoten befallen
N3	N3a: 7-15 lokoregionäre Lymphknoten befallen N3b: ≥16 lokoregionäre Lymphknoten befallen
M	Fernmetastasen
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM Klassifikation nach UICC 8. Auflage 2017, angelehnt an (46)

Auf Basis der TNM Klassifikation lassen sich verschiedene UICC Stadien einteilen, welche fortlaufend aktualisiert werden, aktuell in der 8. Auflage von 2017 vorliegen und eine wichtige Grundlage zur Therapieentscheidung darstellen (siehe Tabelle 2).

UICC Stadium	TNM-Klassifikation		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1	N3a	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
Stadium IIIA	T2	N3a	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N1, N2	M0
	T4b	N0	M0
Stadium IIIB	T1, T2	N3b	M0
	T3, T4a	N3a	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stadium IIIC	T3, T4a	N3b	M0
	T4b	N3a, N3b	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 2: Stadien nach UICC 8. Auflage 2017, angelehnt an (46)

Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs nehmen eine Sonderrolle ein und werden als solche definiert, wenn sie sich innerhalb 5 cm oral bis 5 cm aboral der Kardie des Magens befinden. Die Klassifikation der Tumore des gastroösophagealen Übergangs erfolgt nach Siewert und etabliert drei Gruppen, die als AEG I-III bezeichnet werden (47). AEG I Tumore sind Karzinome des distalen Ösophagus, liegen oberhalb der Kardie und zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus einer intestinalen Metaplasie, dem sogenannten Barrett-Ösophagus, hervorgehen, bei welchem sich das normalerweise im Ösophagus etablierte Plattenepithel zu Zylinderepithel verändert. AEG II Tumore sind Kardiakarzinome im eigentlichen Sinne und entspringen dem Epithel des gastroösophagealen Übergangs. Karzinome vom AEG Typ III haben ihren

Ursprung subkardial und können von distal den gastroösophagealen Übergang infiltrieren (48).

2.1.5 Therapie

Der Behandlung des Magenkarzinoms liegen multimodale Therapiekonzepte zugrunde. Die optimale und stadiengerechte Therapieentscheidung sollte interdisziplinär im Rahmen eines Tumorboards getroffen werden (3).

Um ein Magenkarzinom kurativ zu behandeln, nimmt die R0 *Resektion* eine entscheidende Rolle ein. Diese kann sowohl endoskopisch als auch operativ erfolgen. Die endoskopische Therapie kann bei Magenfrühkarzinomen eingesetzt werden, bei denen noch keine Lymphknotenmetastasierung anzunehmen ist, welches durch verschiedene Kriterien definiert wird: der Tumor sollte sich auf die Mukosa beschränken, nicht größer als 2 cm sein, sowie sollte er keine Ulzerationen vorweisen. Histologisch sollte ein intestinaler Typ nach Laurén sowie ein gutes (G1) oder mäßiges (G2) Grading vorliegen. Die Erfüllung aller dieser Tumoreigenschaften ist zur endoskopischen Therapie notwendig (3). Die aktuelle Leitlinie des Magenkarzinoms etabliert jedoch zusätzlich sogenannte „erweiterte Kriterien“, bei deren Vorhandensein von maximal einem Kriterium eine Lymphknotenmetastasierung ebenfalls nicht wahrscheinlich und somit eine endoskopische Resektion möglich ist (3). Dies geschah auf Basis einer Studie, welche das Auftreten von Lymphknotenmetastasen nähergehend untersuchte und zeigen konnte, dass die darauffolgend in der Leitlinie als „erweiterte Kriterien“ definierten Tumoreigenschaften nicht mit einer höheren Rate der nodalen Metastasierung vergesellschaftet waren (3, 49).

Die Therapiemethode der Wahl stellt die Endoskopische Submukosadisektion (ESD) dar, welche zum Ziel hat, das gesamte Tumorgewebe in einem Stück (en bloc) zu reseziieren. Im Vergleich zur Endoskopischen Mukosaresektion (EMR) konnte gezeigt werden, dass dieses Ziel mit Hilfe der ESD häufiger erreicht werden kann (50).

Im Vergleich zur Operation stellt die endoskopische Resektion von Magenfrühkarzinomen das weitaus weniger invasive Therapieverfahren dar, welches mit einer kürzeren Krankenhausverweildauer, einer geringeren Komplikationsrate sowie kürzeren Operationsdauer einhergeht (51, 52).

Da sich die Rezidivrate nach endoskopischer Therapie im Vergleich zur chirurgischen Behandlung als höher erwies, bedarf es einer sorgfältigen Nachsorge (52).

Karzinome, die sich der Möglichkeit einer endoskopischen Therapie entziehen, müssen chirurgisch reseziert werden, um einer kurativen Intention zu folgen. Hierbei besteht das primäre Ziel darin, eine vollständige Resektion mit tumorfreien Resektionsrändern, die vom Pathologen als solche bestätigt werden, zu erreichen. Je nach Tumorlokalisierung und Stadium kommen verschiedene Operationsverfahren zum Einsatz. Bei proximalem Befall wird in der Regel eine Gastrektomie notwendig, die, je nach Lokalisation, eine partielle Ösophagusresektion mit sich bringen kann. Karzinome, die distale Anteile des Magens befallen, können gegebenenfalls subtotal und somit unter Erhalt proximaler Magenanteile operiert werden (3).

Die kurative Chirurgie geht mit einer Lymphadenektomie einher. Diese dient sowohl zu diagnostischen als auch zu therapeutischen Zwecken. Um eine valide Aussage über den Nodalstatus treffen zu können, wird die Entnahme und histologische Aufarbeitung von 16 lokoregionären Lymphknoten empfohlen (3).

Bezüglich des Resektionsausmaßes unterscheidet man eine D1 von einer D2 Lymphadenektomie, welche noch zusätzliche Lymphknotenkompartimente einschließt. Hierbei zeigt sich ein Überlebensvorteil bei Patienten, die eine D2 Lymphadenektomie und somit eine ausgedehntere nodale Resektion erhalten haben (53–55).

Je nach Stadium der Krebserkrankung und sich daraus ergebenden Risikokonstellationen besteht die Indikation zur chemotherapeutischen Behandlung. Diese kann neoadjuvant, adjuvant oder im Rahmen perioperativer Therapiekonzepte durchgeführt werden. Bei fehlender Kurabilität kann eine palliative Chemotherapie zum Einsatz kommen.

Das *perioperative Therapiekonzept* beinhaltet neoadjuvante, dies bedeutet präoperativ applizierte, sowie adjuvante, nach der Operation verabreichte, chemotherapeutische Behandlungen. Dies wird für Karzinome des Magens und des gastroösophagealen Übergangs im Stadium cT3 und cT4 empfohlen, für Tumore mit einer Tumordinfiltration im Stadium cT2 wird laut aktueller Leitlinie eine „Kann“-Empfehlung ausgesprochen (3). Karzinome des gastroösophagealen Übergangs nehmen hierbei eine Sonderstellung ein. Für diese ist sowohl ein perioperatives chemotherapeutisches als auch ein radiochemotherapeutisches Therapiekonzept möglich (3).

Die Wirksamkeit der perioperativen Chemotherapie zeigte sich in der 2006 durchgeführten MAGIC Studie. Diese verglich den Einsatz einer perioperativen Chemotherapie mit Epirubicin, Cisplatin und infusionalem 5-Fluoruracil (ECF Schema) mit der alleinigen Operation. Cunningham et al. kamen zu dem Schluss, dass die perioperative Chemotherapie ein Downstaging des Tumors sowie ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben ermöglicht (4). Auch weitere Studien und Metaanalysen unterstrichen den Stellenwert der perioperativen Chemotherapie, auch unter Verwendung abweichender Therapieregimen (56–58). Ein weiteres etabliertes Therapieregimen stellt das FLOT Schema, bestehend aus 5-FU, Leucovorin, Oxaliplatin und Docetaxel dar. Im Rahmen der FLOT 4 Studie wurde dieses Behandlungskonzept mit dem ECF-Schema verglichen und es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von FLOT das Gesamtüberleben sowie das progressionsfreie Überleben weiter signifikant verlängern kann. So betrug das Gesamtüberleben unter FLOT im Median 50 Monate, während es unter ECF 35 Monate betrug (HR 0,77 (0,63–0,94); $p = 0,012$) (59). Auf Basis dieser Erkenntnisse hat sich FLOT bei entsprechend geeigneten Patienten als Standardtherapie zur perioperativen Chemotherapie der Karzinome des Magens und des gastroösophagealen Übergangs etabliert (3). Das angestrebte Downstaging sollte nach Abschluss der neoadjuvanten Behandlung mittels CT und ÖGD zur Bewertung des Therapieerfolges im Rahmen eines Reststaging objektiviert werden (3).

Rein *adjuvante* Therapiekonzepte haben mit Etablierung perioperativer Behandlungsstrategien an Bedeutung verloren. Es konnte gezeigt werden, dass die Durchführung einer perioperativen Chemotherapie der alleinigen postoperativen chemotherapeutischen Behandlung überlegen ist (57, 58).

Es zeigte sich jedoch auch, dass im Rahmen der perioperativen Chemotherapie häufig auf die adjuvanten Behandlungen verzichtet werden musste. So erhielten im Rahmen der MAGIC Studie nur circa 50% der Patienten postoperativ eine Chemotherapie. Gründe für das Abweichen vom ursprünglich vorgesehenen Therapieprotokoll stellten unter anderem postoperative Komplikationen und der Patientenwunsch dar (4). Somit gestaltet sich die abschließende Evaluation der prognostischen Bedeutung der adjuvanten Therapigaben schwierig. Dennoch gilt laut der aktuellen Leitlinie die Empfehlung, die perioperative Chemotherapie postoperativ fortzusetzen, sofern es präoperativ nicht unter dieser zu einem Progress kam (3). Bei Ausbleiben einer

neoadjuvanten zytostatischen Behandlung und entsprechender Risikokonstellation, wie beispielsweise unzureichende Lymphadenektomie, sollte eine adjuvante Chemotherapie oder Radiochemotherapie nach interdisziplinärer Evaluation im Rahmen eines Tumorboards erwogen werden (3).

Sobald der Tumor die Grenzen der Kurabilität überschritten hat, liegt eine *palliative Situation* vor. Um eine Verlängerung des Überlebens und eine Symptomkontrolle mit einhergehender Verbesserung der Lebensqualität zu erreichen, sollte allen Patienten in einem guten Allgemeinzustand frühestmöglich eine medikamentöse palliative Tumorthherapie angeboten werden (3). Die Wirksamkeit hinsichtlich der zuvor genannten Faktoren wurde in Studien und Metaanalysen untersucht, dabei stellte sich ein Vorteil gegenüber der alternativen Best Supportive Care, heraus (60, 61).

Zur palliativen Chemotherapie stehen verschiedene Substanzen zur Verfügung, dabei erwies sich eine platin-/fluorpyrimidinhaltige Kombinationstherapie als zielführend und wird deshalb in der Erstlinientherapie verwendet (3). Metaanalysen zeigten, dass die Kombinationschemotherapie einen Überlebensvorteil gegenüber der alleinigen Gabe von 5-FU mit sich bringt (60, 62).

Bestehen Kontraindikationen, die eine platinhaltige Chemotherapie nicht ermöglichen, so kann eine Kombinationstherapie aus Irinotecan und Fluorpyrimidin als Off-Label-Use erwogen werden (3).

Alternativ besteht die Möglichkeit zu einer Dreifachtherapie, die zusätzlich zur platin/fluorpyrimidinhaltigen Chemotherapie die Gabe von Docetaxel vorsieht. Auch hier konnte ein Vorteil hinsichtlich Ansprechens, progressionsfreier Zeit sowie Überleben registriert werden, jedoch gilt es die zusätzliche Toxizität mit sich daraus ergebenden Konsequenzen zu beachten (63).

Sobald die Indikation zur Einleitung einer palliativen Chemotherapie besteht, sollte das Tumorgewebe auf die Expression von HER-2neu untersucht werden (3). HER-2neu ist ein Membranprotein, welches als Rezeptor dient und durch Stimulation der Zellproliferation Einfluss auf die Pathogenese von Tumoren nehmen kann.

Bei Vorliegen einer Überexpression besteht die Möglichkeit zur gezielten Rezeptorblockade durch den Einsatz des monoklonalen Antiköpers Trastuzumab. Im Rahmen der ToGA Studie stellte sich heraus, dass jene Patienten, welche neben der Chemotherapie Trastuzumab erhielten im Median 13,8 Monate überlebten, während die Überlebenszeit der Patienten, welche ausschließlich mit Chemotherapie behandelt

wurden, im Median 11,1 Monate betrug (64). Auf Basis dieser Erkenntnisse gilt laut aktueller S3 Leitlinie die Empfehlung, bei Patienten mit Tumoren, welche eine Überexpression und/oder Amplifikation von HER-2 aufweisen, die palliative Chemotherapie mit Trastuzumab zu ergänzen.

Zur Behandlung des HER2-negativen fortgeschrittenen oder metastasierten Adenokarzinoms des Magens, des gastroösophagealen Übergangs oder des Ösophagus etablierte sich 2021 mit Nivolumab der erste PD-1-Inhibitor in Kombination mit einer fluorpyrimidin- und platinbasierten Chemotherapie als adjuvante Erstlinientherapie für Patienten, deren Tumore PD-L1 (Combined Positive Score ≥ 5) exprimieren (65, 66). PD-1-Inhibitoren gehören zu der Gruppe der Immuncheckpointinhibitoren, die sich gegen das Transmembranprotein PD-1 (programmed cell death protein 1) richten. PD-1 hat physiologisch die Funktion, T-Zellen als Teil des Immunsystems zu dämpfen und somit überschießende Immunreaktionen, auch autoimmuner Genese, zu unterbinden. Durch die Inhibition kommt es zur Steigerung der, auch gegen Tumorzellen gerichteten, zellulären Immunantwort.

2.2 Tumorstammzellen und Tumorstammzellmarker

Krebs als komplexe Erkrankung unterliegt zahlreichen Prozessen, deren Summe die Variabilität klinischer Verläufe bestimmt. Vielen Tumoren gemeinsam ist die Heterogenität der malignen Zelltypen, die unterschiedliche Morphologie und Verhaltensweisen zum Vorschein bringen. Zur Genese der Heterogenität werden verschiedene Erklärungen herangezogen, darunter stattgehabte genetische Mutationen, Umwelteinflüsse sowie die Anwesenheit von zur Selbstregeneration und Differenzierung befähigten Tumorstammzellen (67). Die Rolle dieser in der Entstehung von Krebs wird kontrovers diskutiert. So steht die Theorie, dass der Ursprung maligner Entartung in Tumorstammzellen liegt, dem Konzept der klonalen Evolution nach Novell gegenüber (siehe Abb. 3). Dieser postulierte im Jahr 1976, dass jede Zelle das Potential hat, Ursprung eines tumorösen Geschehens multipler Klone zu werden, sofern sie zur Zellteilung befähigt ist und, beispielsweise durch eine zufällige Mutation, einen Wachstumsvorteil erhält (68). Dies wird auch als stochastisches Modell der Krebsentstehung bezeichnet, während es sich beim auf Tumorstammzellen basierten Erklärungsmodell um ein hierarchisches handelt. Dies ist darin begründet, dass das

maligne Wachstum auf eine geringe Population von Tumorstammzellen zurückzuführen ist, die durch ihr unbegrenztes Potential der Selbsterneuerung stets neue Zellen produzieren und damit das Tumorstammwachstum aufrechterhalten (69). Somit könnte unzureichendes Therapieansprechen und Tumorstammprogress trotz adäquater Therapie darin begründet sein, dass sich die Tumorstammzellen der chemotherapeutischen Wirksamkeit entzogen haben und somit zum aggressiven Wachstum und Metastasierung beitragen (67).

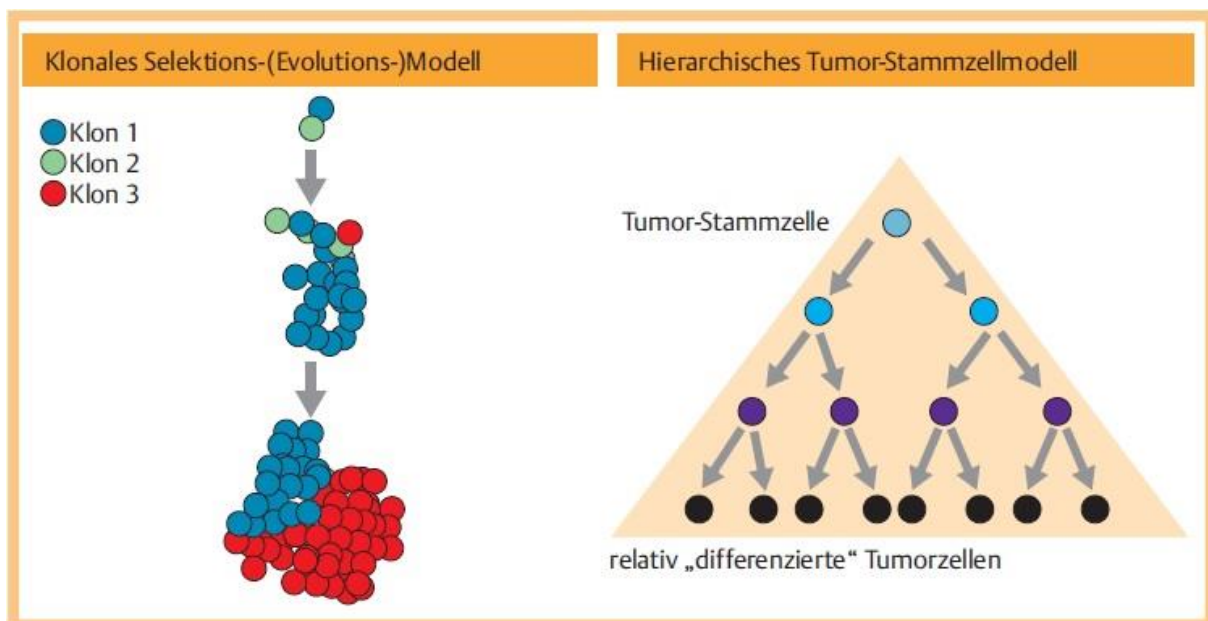


Abbildung 3: Aktuell diskutierte Entstehungsmodelle für Krebs, Abb. entnommen aus (70)

Um intratumoröse Pathomechanismen tiefergehend zu verstehen und Tumorstammzellen gegebenenfalls als Ziel therapeutischer Optionen nutzen zu können, gewinnt deren Detektion mit Hilfe von Stammzellmarkern zunehmend an Bedeutung. Durch strukturelle Ähnlichkeiten und paralleles Auftreten der Oberflächenmarker stellt sich jedoch das Problem der Diskrimination zwischen Stammzellen und Tumorstammzellen. Die meisten Stammzellmarker sind Proteine. Viele Tumorstammzellen hingegen unterscheiden sich hiervon dahingehend, dass das zugrundeliegende Protein durch Glykosylierung um Polysaccharide ergänzt und damit eine Änderung der Oberflächeneigenschaften erreicht wurde. Ein möglicher Ansatzpunkt zur Unterscheidung könnte demnach im Auftreten von spezifischen Glykoproteinen als Oberflächenmarker liegen (71). Dies nährt weiterhin die

Hypothese, dass eine Möglichkeit der Herkunft von Tumorstammzellen in der malignen Transformation normaler Stammzellen liegt (72).

Die Detektion und Untersuchung von Tumorstammzellen erwies sich bislang als Gegenstand beachtlicher Forschungsanstrengungen. Dabei erwuchs die Erkenntnis, dass Stammzellmarker nicht allen Krebsentitäten gemein und ebenfalls nicht exklusiv auf Stammzellen zu finden sind (73). Weiterhin zeigte sich, dass die Untersuchung einzelner Stammzellmarker zu einer unzureichenden Abbildung von Stammzeleigenschaften führen kann, wohingegen die Kombination mehrerer Stammzellmarker validere Aussagen bezüglich Stammzell- und Tumoreigenschaften bestimmter Krebsentitäten ermöglichen (74, 75).

2.2.1 Vorstellung des untersuchten Stammzellmarkers CD133

Einer der am häufigsten verwendeter Marker zur Identifikation von Tumorstammzellen stellt das Oberflächenprotein CD133 dar, welches zunehmend in den Fokus zahlreicher Forschungsarbeiten gerückt ist (76). Das im menschlichen Genom auf Chromosom vier liegende CD133 wurde erstmals 1997 in humanen hämatopoetischen Stammzellen detektiert (77). Im gleichen Jahr fand man CD133 in murinem Neuroepithel, sodass die erstmalige Entdeckung im Rahmen zweier unabhängiger Untersuchungen erfolgte (78).

Als erster Vertreter der Prominin-Familie wird das Glykoprotein auch als Prominin-1 bezeichnet, besteht aus 865 Aminosäuren und besitzt fünf Transmembrandomänen. Dabei liegt der Carboxyterminus intrazellulär, während der potenziell zur Glykosylierung dienende N-Terminus innerhalb der Extrazellulärdomäne lokalisiert ist. Ebenfalls extrazellulär befinden sich die Epitope AC133 sowie AC144. Diese können dort in ihrer Funktion als Marker eine weitere Identifikations- und Differenzierungsmöglichkeit in Gewebeproben befindlicher Tumorstammzellen bilden, insbesondere bei im Rahmen des Differenzierungsprozesses stattfindenden Änderungen des Glykosylierungsmusters (79, 80). So ließ sich für das Kolonkarzinom erkennen, dass CD133 sowohl auf Tumorstammzellen als auch auf differenzierten Tumorzellen zu finden war. Jedoch führte die Glykosylierung zu einer Faltung des Proteins und somit zu einer Änderung der Tertiärstruktur mit Maskierung von Epitopen wie AC133 (79).

Die Expression von CD133 unterliegt zahlreichen Prozessen, die sowohl intrazellulärer als auch extrazellulärer Natur sind. Hierunter nimmt das Tumormikromilieu mit einhergehender Hypoxie eine zentrale Rolle ein. Um trotz dieser proliferieren zu können, verfügen Tumorzellen über Adaptationsvorgänge auf Transkriptionsebene. Durch vorherrschende Hypoxie kommt es zur Hochregulation des Transkriptionsfaktors Hif1 α , welcher den malignen Zellen durch intrazelluläre Signalwege ein Anpassen ermöglicht und somit die Möglichkeit des invasiven und metastatischen Wachstums verleiht (81, 82). Auch Tumorstammzellen stehen unter dem protektiven Effekt von Hypoxie und durch Hif1 α vermittelter Prozesse (83, 84). Dies ließ sich auch in Bezug auf CD133 erkennen. So konnte gezeigt werden, dass Hypoxie zu einer Hif1 α vermittelten Selbererneuerung sowie zur Proliferation CD133 positiver Tumorstammzellen in Gliomen führt (85).

Ein weiterer Regulationsmechanismus zur Expression von CD133 obliegt dem Tumorsuppressorgen p53. P53 bindet an den CD133 Promotor, dies induziert darauffolgend die Histonacetylase 1 (HDAC1) zur Änderung des Acetylierungsmusters der Histone, was eine Suppression der CD133 Expression zur Folge hat (86).

Neben p53 beeinflusst auch der Transkriptionsfaktor Ikaros durch seine Bindung am Promotor P1 die Transkription des Tumorstammzellmarkers CD133 negativ. In einer Untersuchung von an einem hepatozellulären Karzinom erkrankten Patienten erwies sich eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors mit einer schlechteren Prognose einhergehend (87).

Auch epigenetische Faktoren beeinflussen die Ausprägung von CD133. Hierbei bestimmt insbesondere das Methylierungsmuster der Promotorregion die Aktivität der Expression. In Tumorgewebe von Ovarial- und Endometriumkarzinomen konnte gezeigt werden, dass der Grad der Methylierung der Promotorregion P2 negativ mit der CD133 Expression korreliert (88). Auch in Hinblick auf Gastrointestinale Stromatumore wurde der Methylierungsstatus in Zusammenhang mit der Ausprägung von CD133 untersucht. Eine Hypomethylierung erwies sich mit einer hohen CD133 Expression und konsekutiv einer schlechteren Prognose einhergehend (89).

2.2.2 Bedeutung von CD133 in gastrointestinalen Tumoren

In zahlreichen Studien wird der Einfluss von CD133 in seiner Funktion als Stammzellmarker auf die Tumorgenese, Prognose und Therapieresistenz diskutiert.

So konnte in einer Studie von Lee et al. gezeigt werden, dass in Bezug auf das Pankreaskarzinom CD133 positive Zellen mit einer höheren Entartungsneigung sowie Metastasierungstendenz einhergingen als CD44 und CD24 positive Zellen (90).

Untersuchungen an kolorektalen Karzinomen wiesen auf, dass ein Zusammenhang zwischen der CD133 Expression und dem Grad der Tumordifferenzierung sowie der TumorgroÙe besteht und CD133 somit ebenfalls Einfluss auf die Tumorgenese nimmt (91). Bezüglich des Therapieansprechens konnten Nagata et al. aufzeigen, dass eine chemotherapeutische Behandlung größere Erfolge erzielt, wenn keine CD133 Expression vorliegt (92). Des Weiteren führte eine Metaanalyse unter Einbeziehung von 37 Studien von Huang et al. zu der Erkenntnis, dass eine CD133 Expression kolorektaler Karzinome positiv mit der TumorgroÙe und einer Lymphknoten- sowie Fernmetastasierung korreliert. Ebenfalls ergab sich hinsichtlich 5-Jahres- und Gesamtüberlebens eine schlechtere Prognose für Patienten mit CD133 positiven Tumoren (93, 94).

Auch bezüglich des hepatozellulären Karzinoms bestätigte sich eine schlechtere Ansprechrate und Chemoresistenz in CD133 positivem Gewebe. Song et al. führen dies auf eine durch oxidativen Stress vermehrte CD133 Expression zurück, welche die Resistenz der Tumorzellen gegen reaktive Sauerstoffspezies erhöht und somit zu gesteigerten Abwehrmechanismen gegen Zytostatika befähigt (95).

Hinsichtlich des Magenkarzinoms konnte ebenfalls der Zusammenhang klinischer und prognostischer Parameter mit der CD133 Expression gezeigt werden. Eine Metaanalyse aus 8 Studien unter Einschluss von 603 Patienten einer asiatischen Population wies eine Assoziation zwischen fortgeschrittenen TNM-Stadien, lymphogener Metastasierung sowie Fernmetastasierung und einer CD133 Expression auf. Auch hier zeigte sich eine schlechtere Prognose, diese war in Form eines kürzeren 5-Jahres-Überlebens für Patienten mit CD133 positiven Tumoren objektivierbar (96). Einige Studien, die ebenfalls Teil der metaanalytischen Evaluation waren, beschrieben die Häufigkeitsverteilung der CD133 Expression nähergehend. So fanden Wakamatsu et al. bei 9% der Magenkarzinompatienten den Stammzellmarker (97), während dies in einer Studie von Wang et al. bei 44% der Fall war (98). Ishigami et al. untersuchten eine Population von 97 Magenkarzinompatienten, die sich einer kurativen Gastrektomie unterzogen und ermittelten in 28% der Fälle eine positive immunhistochemische Färbung auf CD133 (99).

Hashimoto et al. nahmen eine detailliertere Unterteilung der Färbeergebnisse vor. So

ließ sich bei 128 von 189 (67,7%) Patienten mit einem Magenkarzinom das Tumorgewebe auf CD133 anfärben. Jedoch wurde eine Positivität erst bei einem Anteil von über 5% definiert, sodass diese bei 56 Patienten (29,6%) vorlag. Weiterhin führten die Autoren eine Unterteilung nach Lokalisation der Färbung in luminal und zytoplasmatisch durch, sodass sich eine Verteilung von 17,4% luminalen Fällen sowie 12,1% zytoplasmatischen Fällen ergab. Luminale Färbungen ließen sich vor allem in differenzierten Karzinomen nachweisen, während sich undifferenziertes Tumorgewebe zytoplasmatisch anfärbte. In Bezug auf die Korrelation zu klinischen Parametern ließ sich erkennen, dass eine zytoplasmatische Färbung mit Tumorprogress, fortschreitender Metastasierung und Therapieresistenz einherging. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass eine zytoplasmatische Expression von CD133, im Gegensatz zur luminalen oder negativen, ein unabhängiger prognostischer Marker des Magenkarzinoms ist, welcher zu einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben der betroffenen Patienten führt (100).

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Das Patientenkollektiv, Datenerhebung und Datendokumentation

Das Patientenkollektiv setzte sich aus Patienten der Universitätsmedizin Mainz zusammen, die im Zeitraum von September 2003 bis April 2015 eine operative Therapie eines Magenkarzinoms oder Karzinoms des gastroösophagealen Übergangs erhalten haben. Darüber hinaus erstreckte sich das Therapiespektrum über primär operative, neoadjuvante und adjuvante Behandlungskonzepte. Das Patientenkollektiv entstammte sowohl der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik, als auch der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie. Die Daten wurden durch Einsicht in die elektronische Patientenakte mittels SAP, unter Wahrung des Datenschutzes, erhoben. Ziel war die Identifizierung und Datenerhebung von Patienten mit Adenokarzinomen des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs, andere Entitäten führten zum Ausschluss. Nach sorgfältiger Analyse verblieben 173 Patienten, die das Patientenkollektiv der hier vorliegenden Arbeit bildeten. Der Beobachtungszeitraum reichte bis August 2019, die Nachbeobachtung diente vorrangig dem Zweck der Überlebenszeitanalysen.

Es wurden folgende Einschlusskriterien determiniert:

- Patientinnen und Patienten ab einem Alter von 18 Jahren
- pathologisch gesichertes Adenokarzinom des Magen oder des gastroösophagealen Übergangs, welches in der Universitätsmedizin Mainz operativ therapiert wurde

Die Datendokumentation erfolgte anonymisiert mittels Anlage einer Datenbank in Form einer Excel-Tabelle (Microsoft Office 2010). Die der elektronischen Patientenakten entstammenden Informationen ließen sich wie folgt gliedern:

- Allgemeine Patientendaten: Alter, Geschlecht, Datum des letzten Kontakts/Todesdatum, Körpergröße, Körpergewicht
- Anamnese: Begleiterkrankungen, Risikofaktoren
- Informationen zur Tumordiagnose: Datum, Lokalisation, präoperatives Staging (uTNM), Tumormarker
- Neoadjuvante Therapie: Therapieregime, Zeitraum, Zyklen, Ansprechen, Nebenwirkungen

- Informationen zur Operation: Datum, postoperatives Staging (pTNM), Residualtumor, Laurénklassifikation, Siegelringkarzinom
- Adjuvante Therapie: Therapieregime, Zeitraum, Zyklen, Nebenwirkungen
- Verlauf: Auftreten eines Rezidivs oder von Fernmetastasen, Tumormarker
- Immunhistochemische Färbeergebnisse CD133

Die Auswertung führte zum Ausschluss einiger erhobener Parameter, da sich diese als lückenhaft oder für die Thematik nicht relevant erwiesen.

3.2 Material

Die folgende Auflistung beinhaltet alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien mit Herstellerangabe und Produktnummer.

Antikörper

Sigma-Aldrich: Anti-PROM1 antibody produced in rabbit (Bestell-Nr. HPA 004922)

Zusatzprodukte der Immunhistochemie

Dako: EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (DM821)

Dako: EnVision™ FLEX/HRP (DM822)

Dako: EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827)

Dako: EnVision™ FLEX Substrate Buffer (DM823)

Dako: EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, low pH, Citratpuffer pH 6,1 (K 8005, DM 829), 1:20 verdünnt mit Aqua dest.

Dako: EnVision™ FLEX Wash Buffer (K8007, DM831)

Dako: EnVision™ FLEX Antibody Diluent (K8006, DM830)

Dako: EnVision™ FLEX Hematoxylin (K8018, DM826)

Dako: EnVision™ FLEX + Rabbit (LINKER) (K8019, DM825)

SAV Liquid Production GmbH: Ethanol 100%, 96%, 80%, 70 %, 50 %

SAV Liquid Production GmbH: Xylol

Medizintechnik der Universitätsmedizin Mainz: Aqua dest.

VWR International: Entellan (1.00869.0500)

Glasutensilien

Menzel-Gläser: SuperFrost® Plus Objektträger (041300)

Knittel Glass:Deckgläser 24 x 50 mm (VD12450Y1A.01)

VWR: Messzylinder 250ml, 1000 ml (612-3837/ 612-3839)

VWR: Glasküvetten (639328)

VWR: Metallbügel (639329)

VWR: Hitzebeständige Küvetten (720710)

Elektrogeräte

Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co.KG: Brutschränke Heraeus Function Line B6 / Heraeus T 6060

Braun GmbH Kronberg: Dampfgarer Braun 3216

Dako: Färbeautomat für Immunhistochemie: DAKO Cytomation Autostainer Plus

Mediate GmbH: Kühlplatte Tissue Cool Plate COP 30

Liebherr: Kühlschranks: Liebherr FKS 3600

Olympus: Lichtmikroskop Olympus BX 52

Olympus: Lichtmikroskopkamera Olympus CX 50

Leica: Mikrotom

Sonstiges:

Eppendorf: Pipetten Eppendorf Reference® 0,5-10µl, 10-1000µl, 100-1000µl

3.3 Methoden

3.3.1 Immunhistochemie im Allgemeinen

Die Immunhistochemie ist eine etablierte Methode, die nach dem Prinzip der Antigen-Antikörperreaktion funktioniert und den Nachweis eines Antigens im Gewebe oder anderem biologischem Material ermöglicht.

Durch die Affinität der Antikörper zum Antigen können Proteine markiert, durch enzymatische Reaktionen sichtbar gemacht und in weiteren Schritten Färbemuster bestimmt werden.

Die Immunhistochemie findet in zahlreichen Arbeitsgebieten Anwendung, auch medizinische Fragestellungen bedienen sich der Technik, beispielsweise zur Charakterisierung und Klassifizierung von Gewebeschnitten im Allgemeinen und Tumorgewebe im Speziellen. Tumore exprimieren spezifische Antigene als Biomarker, die es zu detektieren gilt, um Wachstumsverhalten, Metastasierungswege und weitere prädiktive Faktoren aufzudecken und sich damit aufzeigende Therapiestrategien zu entwickeln.

Die Immunhistochemie lässt sich mit zwei unterschiedlichen Methoden durchführen: Es sind die direkte und die indirekte Färbemethode voneinander abzugrenzen.

Die *direkte* Methode zeichnet sich dadurch aus, dass der Primärantikörper, welcher an das zu detektierende Antigen bindet, konjugiert an ein Enzym, wie Meerrettichperoxidase oder ein Fluorochrom, wie Fluoresceinisothiocyanat, vorliegt. Sobald der Primärantikörper mit höchstmöglicher Spezifität und Affinität, um unspezifische Bindungen und somit Kreuzreaktionen zu vermeiden, an das Antigen bindet, findet an diesem Bindungsort auch eine Ansammlung des konjugierten Enzyms statt. Im nächsten Schritt wird überschüssiger, nicht gebundener Antikörper ausgewaschen und ein Substrat zugefügt, das mit dem an den Antikörper gekoppeltem Enzym reagiert und eine sichtbare Farbreaktion auslöst.

Zur Verdeutlichung sei im Folgenden die Grundreaktion der direkten Färbemethode genannt (siehe Abb. 4):

Antigen + enzymgekoppelter Primärantikörper + Substrat bzw. Chromogen

= Farbantwort

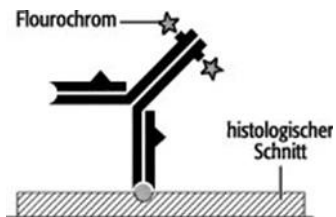


Abbildung 4: direkte Immunhistochemie, Abbildung entnommen aus (101)

Bei der *indirekten* Methode erfolgt die Farbreaktion in zwei Schritten. Zunächst wird das zu untersuchende Gewebepreparat mit einem Primärantikörper in Kontakt gebracht, der nicht, wie bei der direkten Methode, enzymgekoppelt vorliegt, sondern, im zweiten Schritt, von einem zweiten Antikörper spezifisch gebunden wird. Die Konjugation eines Sekundärantikörpers an den Primärantikörper ermöglicht eine effektivere Bindung an das Antigen, was eine höhere Sensitivität zur Folge hat.

Dieser Sekundärantikörper richtet sich gegen den Primärantikörper und bindet diesen mit höchstmöglicher Spezifität und Affinität. Bei der indirekten Methode ist nun der Sekundärantikörper an ein Enzym oder eine Fluoreszenz gekoppelt und löst die Enzym-Substrat-Farbreaktion aus, sobald ein adäquates Substrat angeboten wird.

In dieser Arbeit wurde die indirekte Methode mit Diaminobenzidin als Chromogensubstrat und HRP als gekoppeltes Enzym verwendet, die entstehende Enzym-Substrat-Reaktion führte zu einer Braunfärbung, die unter dem Lichtmikroskop analysiert und bewertet wurde.

Die Reaktion kann vereinfacht zusammengefasst werden als (siehe Abb. 5):

Antigen + Primärantikörper + enzymgekoppelter Sekundärantikörper + Substrat

= Farbantwort

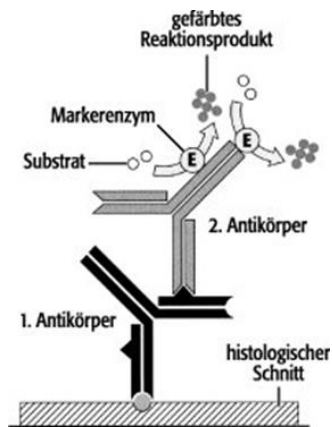


Abbildung 5: indirekte Immunhistochemie, Abbildung entnommen aus (101)

3.3.2 Allgemeine Probenvor- und Nachbereitung

Bevor die eigentliche immunhistochemische Färbung durchgeführt werden kann, bedarf es einiger Schritte, um die Gewebeprobe vorzubereiten. Zunächst wurden aus dem in Paraffin eingebettetem Tumormaterial mittels Mikrotom 3µm starke Schnitte gewonnen und auf SuperFrost plus Objektträger der Firma Menzel aufgezogen. Dann folgte die Entparaffinisierung in Xylol dreimalig zu je 3 Minuten, es schloss sich die Rehydrierung in einer Alkoholreihe absteigender Konzentration (100%, 96%, 80%, 70%, 50% Ethanol zu je 3 Minuten) an, die mit dem Waschen der Schnitte in Aqua dest. für 3 Minuten endete.

Die nun folgende Demaskierung der Epitope erfolgte in der Envision Flex Target Retrieval Solution, einem Citratpuffer, bei pH 6,1. Um ein bestmögliches Ergebnis zu erhalten, wurden die Schnitte vollständig mit der Arbeitslösung benetzt und dann im Dampfgerar bei 100°C für 35 Minuten hitzebehandelt. Die Epitope müssen demaskiert werden, da durch die Vorbehandlung der Gewebeprobe, unter anderem mit Formalin und Paraffin, eine Maskierung durch Quervernetzung von Proteinstrukturen stattgefunden hat, die zu einer Änderung der Immunreaktivität führte. Damit eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung stattfinden kann, gilt es die Immunreaktivität durch Zuführung von Hitze wiederherzustellen, indem die Quervernetzung aufgehoben und Epitope dem Antikörper zugänglich gemacht werden. Anschließend wurden die Schnitte 7 Minuten unter laufendem Wasser abgekühlt und 5 Minuten in Envision Flex Wash Buffer (Verdünnung mit Aqua dest. 1:20) gewaschen. Mit diesem Schritt ist die manuelle Probenvorbereitung abgeschlossen, es folgte die immunhistochemische

Färbung mit Hilfe eines Färbeautomaten. Sobald diese abgeschlossen war, schloss sich die Probennachbereitung an, die als ersten Schritt die Dehydrierung vorsah. Hierzu wurden die Schnitte zunächst 3 Minuten mit Aqua dest. gespült, bevor sie einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt wurden. Diese beinhaltete Ethanolkonzentrationen von 50%, 70%, 80%, 96% sowie 100% zu je 3 Minuten. Der Entwässerungsvorgang endete in einem dreimaligen Xylolbad für je 3 Minuten. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte in Entellan eingedeckt.

3.3.3 CD133 Immunhistochemie

Der Färbeprozess der Präparate erfolgte nach dem Färbeprotokoll des Herstellers unter leichten Anpassungen, verwendet wurde der Färbeautomat DAKO Cytomation Autostainer Plus. Als Positivkontrolle wurde in Paraffin eingebettete Kolonschleimhaut mitgeführt, um die Funktionalität aller Chemikalien zu bestätigen. Nach Abschluss der allgemeinen Probenvorbereitung, wie oben beschrieben, erfolgte als weiterer Vorbereitungsschritt die Anfertigung einer Verdünnung des Primärantikörpers rabbit Anti-hu CD133 antigen (= Anti-PROM1 antibody) mit Envision Flex Antibody Diluent im Verhältnis 1:100. Der verdünnte Antikörper wurde im Anschluss, gemeinsam mit allen benötigten und oben aufgeführten Chemikalien, dem Autostainer zugeführt und das auf CD133 individualisierte Programm gestartet. Die Pipettiermengen für die einzelnen Färbeschritte richteten sich ganz nach der entsprechenden Größe der Präparate. Die Färbung beginnt mit einem Spülvorgang, der sich im Verlauf regelmäßig wiederholt und immer mit dem Flex Wash Buffer durchgeführt wurde. Im Anschluss startete die Blockierung der endogenen Enzyme mittels Flex Peroxidase-Blocking Reagent für 5 Minuten. Damit wurden allen natürlich im Schnitt vorliegenden Peroxidasen, die potentiell ebenfalls das DAB-Chromogen umsetzen könnten, die Reaktionsmöglichkeit entzogen, um somit eine Hintergrundfärbung zu verhindern. Nach einem Spülvorgang kam es im nächsten Schritt zur Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper anti-CD133 für 120 Minuten. Es wurde erneut gespült, bevor das Sekundärreagenz EnvisionFlex + Rabbit Linker auf den Schnitten für 15 Minuten inkubiert wurde. Der Linker sorgte für eine Signalverstärkung. Nach einem weiteren Spülvorgang wurde das Tertiärreagenz EnvisionFlex/HRP für 20 Minuten aufgetragen. Der verwendete Sekundärantikörper, der sich gegen Kaninchenmoleküle richtet, ist HRP (Horseradishperoxidase = Meerrettichperoxidase) gekoppelt und kann damit

verschiedenste Substrate, wie Wasserstoffperoxid und DAB, verstoffwechseln. Um die entstehende Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen, wird, nach wiederholtem Spülen, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen 2-mal für 5 Minuten, unterbrochen durch einen Spülvorgang, hinzugefügt. Das HRP des Sekundärantikörpers reagiert mit dem DAB und ruft eine braune Färbung hervor, die mit dem Lichtmikroskop detektiert werden kann. Es wurde nun gespült und eine Gegenfärbung mit Hämalaun für 3 Minuten durchgeführt. Hämalaun dient der Kontrastverstärkung und morphologischen Charakterisierung der Gewebe. Es folgte ein letzter Spülvorgang, bevor die Schnitte dem Autostainer entnommen werden und mit der oben beschriebenen Probennachbereitung fortgeföhren werden konnte.

3.3.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung der Färbung des Biomarkers CD133 erfolgte nach dem Expressionsmuster im Tumorgewebe. Es wurde zwischen luminaler, zytoplasmatischer sowie gemischt luminal/zytoplasmatischer Färbung unterschieden. Davon abzugrenzen war ein Färbeanteil < 5% angefärbter Tumorzellen, diese Präparate wurden als CD133- negativ bewertet. Die Auswertung erfolgte zunächst durch die Verfasserin dieser Dissertation und wurde darauffolgend von einem unabhängigen, für die klinischen Daten der Patienten verblindeten Pathologen validiert.

3.3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen pseudonymisierten Patientendaten erfolgte mittels der Software SPSS Statistis 23 V5. Zu diesem Zwecke wurde die erstellte Excel-Tabelle in SPSS importiert und nach, für die in dieser Arbeit beleuchtete Thematik, relevanten Parametern analysiert. Für einige Fragestellungen wurde eine Kategorisierung des Kollektivs vorgenommen, um somit entstandenen Subgruppen gegenüberstellen und vergleichen zu können.

Zunächst erfolgte eine deskriptive Analyse aller Daten, um Häufigkeiten und Verteilungsmuster darstellen zu können. Die Darstellung erfolgte tabellarisch, graphisch oder in Textform. Um in Kreuztabellen aufgetragene kategoriale Variablen auf Gruppenunterschiede überprüfen zu können, wurde der Test nach Fisher

verwendet. Stetige Variablen ließen sich mittels Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum, Maximum und Quartilen auswerten.

Es schloss sich eine Überlebenszeitanalyse an, die mit der Methode nach Kaplan Meier durchgeführt wurde. Das Überleben wurde ab dem Tag der Operation bis zum Eintreffen des Ereignisses Tod definiert. Patienten, die diesen festgelegten Endpunkt nicht innerhalb des Beobachtungszeitraumes erreicht haben, wurden am Tag des letzten Kontakts zensiert. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven konnten nach verschiedenen Faktoren erstellt und statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen mittels Log-Rank-Test definiert werden.

Weiterhin wurde die Beziehung zwischen positiven Färbeergebnissen und klinisch-pathologischen Parametern beleuchtet und mittels Test nach Fisher und Kaplan-Meier-Überlebenskurven ausgewertet.

Grundlage dieser Arbeit ist eine explorative Auswertung, das statistische Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf $\leq 5\%$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistiken des Gesamtkollektivs

4.1.1 Patienten- und Tumorcharakteristika

Patienten-und Tumorcharakteristika		Anzahl, n=	Prozent, %
Gesamtzahl		173	100
Geschlecht	männlich	120	69,4
	weiblich	53	30,6
Alter bei Erstdiagnose (Min-Max)		63,21 (30-84)	
Alter bei OP (Min-Max)		63,66 (31-84)	
T-Status	T0*	1	0,6
	T1	40	23,1
	T2	38	22
	T3	72	41,6
	T4	19	11
	unbekannt	3	1,7
N-Status	N0	69	39,9
	N1	39	22,5
	N2	33	19,1
	N3	29	16,8
	unbekannt	3	1,7
M-Status	M0	108	62,4
	M1	30	17,3
	unbekannt	35	20,2
Grading	G1	8	4,6
	G2	59	34,1
	G3	93	53,8
	unbekannt	13	7,5
Resttumor	R0	155	89,6
	R1	12	6,9
	unbekannt	6	3,5
Laurén-Klassifikation	intestinal	62	35,8
	diffus	42	24,3
	Mischtyp	10	5,8
	unbekannt	59	34,1
Siegelringkarzinom	nein/nicht näher definiert	125	72,3
	ja	48	27,7

Tabelle 3: Übersicht über das Patientenkollektiv

*kein Tumorgewebe nach neoadjuvanter Therapie nachweisbar

Das im Rahmen dieser Arbeit erstellte und ausgewertete Kollektiv von operierten Magenkarzinompatienten (siehe Tabelle 3) setzte sich aus 120 männlichen und 53 weiblichen Patienten zusammen, was einer Verteilung von 69,4% zu 30,6% entsprach. Das Alter der Patienten erstreckte sich von 31 bis 84 Jahren (Mittelwert 63,66 Jahre) zum Zeitpunkt der Operation. Zu bemerken ist, dass nach Aufteilung der Geschlechter, das mittlere Alter bei Operation bei den Frauen mit 60,3 Jahren rund 5 Jahre unter dem mittleren Alter bei OP der männlichen Subpopulation lag (Mittelwert 65,2 Jahre). Die Tumorgöße wurde anhand des T-Status dokumentiert, hierbei war bei einem Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie kein Tumorgewebe mehr nachweisbar, woraus sich in diesem Fall der T0 Status ergab. 72 Patienten (41,6%) wurde nach histologischer Aufarbeitung ein T3-Stadium diagnostiziert. 101 Fälle (58,4%) wiesen lokale Lymphknotenmetastasen auf. Bei 30 Patienten (17,3%) konnten Fernmetastasen festgestellt werden, 108 Patienten (62,4%) wiesen solche nicht auf, bei 35 Patienten (20,2%) konnte der Status der Fernmetastasierung nicht erhoben werden. Der am weitesten verbreitet Tumorsubtyp stellte in dieser Population der intestinale Typ nach Laurén dar (n=62; 35,8%), gefolgt vom diffusen Typ (n=42; 24,3%). Zehnmal (5,8%) ließ sich ein Mischtyp feststellen, bei 59 Patienten (34%) war die Laurén-Klassifikation nicht zu eruieren. Die Analyse des Tumorgading ergab, dass ein schlecht differenzierter Tumor (G3) der am häufigsten vorkommende Differenzierungsgrad war (n=93; 53,8%). Bei 155 Patienten (89,6%) zeigte die histologische Aufarbeitung keinen Resttumor mehr, 12 Patienten (6,9%) wiesen einen solchen auf, bei 6 Patienten (3,5%) war der R-Status unbekannt. Bei 48 (27,7%) Fällen fanden sich Siegelringzellen im Tumorgewebe, 125 (72,3%) wiesen solche nicht auf oder wurden im pathologischen Befundbericht nicht näher beschrieben.

Patienten-und Tumorcharakteristika		Anzahl, n=	Prozent, %
Lokalisation Primärtumor	Magen, nicht näher bezeichnet	5	2,9
	AEG 1 (Barrett, distaler Ösophagus)	16	9,2
	AEG 2 / Kardia	71	41
	AEG 3 / subkardial	3	1,7
	Fundus	1	0,6
	Korpus	38	22
	Antrum	36	20,8
	Pylorus	3	1,7
Lokalisation Fernmetastasen	keine	64	37
	Leber	9	5,2
	Lunge	1	0,6
	Peritoneum	10	5,8
	Lymphknoten	5	2,9
	Peritoneum, Ovar	1	0,6
	Leber, Nebenniere, Milz, Pankreas	1	0,6
	Leber, Peritoneum	2	1,2
	unbekannt	79	45,7

Tabelle 4: Übersicht über die Lokalisation des Primarius und der Fernmetastasen des zusammengestellten Patientenkollektivs

Die Lokalisation des Primärtumors war bei 71 (41%) Patienten in der Kardia, ebenfalls häufig befand sich der Tumor in Korpus (n=38; 22%), Antrum (n=36; 20,8%) und distalem Ösophagus (n=16; 9,2%), (siehe Tabelle 4). Seltener war der Tumor subkardial oder am Pylorus lokalisiert (jeweils n=3; 1,7%), vereinzelt auch am Fundus (n=1 0,6%). Bei 5 Fällen (2,9%) wurde die genaue Lage innerhalb des Magens nicht näher eruiert. Zusammenfassend konnte man 90 (52%) Karzinome dem gastroösophagealen Übergang zurechnen, der sich wiederum in die Subtypen AEG I-III untergliedern lässt, 83 (48%) entsprachen einem reinen Magenkarzinom.

Zum Zeitpunkt der Operation wies ein großer Teil des Kollektivs (n=64; 37%) keine Fernmetastasierung auf. Sofern Fernmetastasen auftraten, waren diese am häufigsten im Peritoneum (n=10; 5,8%) lokalisiert, gefolgt von Leber (n=9; 5,2%) und Lymphknoten (n=5; 2,9%). In einem Fall (0,6%) fanden sich Metastasen in der Lunge. Eine Patientin (0,6%) wies diese in Peritoneum und Ovar auf. Bei zwei Patienten (1,2%) lag eine Metastasierung in Leber und Peritoneum vor, bei einem Patienten (0,6%) waren die Metastasen in Leber, Nebenniere, Milz und Pankreas zu finden. In 79 Fällen (45,7%) blieb der Status der Fernmetastasierung unbekannt.

4.1.2 Risiko- und Einflussfaktoren

Risiko-/Einflussfaktor		Anzahl, n=	Prozent, %
Übergewicht (ab BMI 25)	nein	70	40,5
	ja	89	51,4
	unbekannt	14	8,1
Nikotinkonsum	nein	41	23,7
	ja	76	43,9
	unbekannt	56	32,4
Diabetes mellitus	nein	112	64,7
	ja	38	22,0
	unbekannt	23	13,3
Hypertonie	nein	59	34,1
	ja	91	52,6
	unbekannt	23	13,3
Refluxösophagitis/Gastritis (anamnestisch oder pathologisch gesichert)	nein	56	32,4
	ja	88	50,9
	unbekannt	29	16,8
<i>Helicobacter pylori</i>	nein	88	50,9
	ja	28	16,2
	unbekannt	57	32,9

Tabelle 5: Risiko- und Einflussfaktoren bezüglich der Karzinogenese eines Karzinoms des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs

Bei Analyse der Risiko- und Einflussfaktoren zeigte sich, dass circa die Hälfte (n=89; 51,4%) des Patientenkollektivs einen BMI ≥ 25 aufwies und somit als übergewichtig galt (siehe Tabelle 5). Ein Nikotinkonsum oder ehemaliger Nikotinkonsum lag bei 76 (43,9%) Patienten vor, 41 (23,7%) gaben an Nichtraucher zu sein, bei 56 (32,4%) wurde der Raucherstatus anamnestisch nicht erhoben. In Bezug auf Vorerkrankungen wurden Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und eine anamnestisch oder pathologisch gesicherte Refluxösophagitis beziehungsweise Gastritis, sowie das Vorliegen einer *Helicobacter pylori* Infektion eruiert. Dabei konnte bei 38 (22%) Patienten ein Diabetes mellitus in der Vorgeschichte gefunden werden. 91 (52,6%) Patienten gaben an, an arterieller Hypertonie zu leiden, bei 59 (34,1%) war dies nicht der Fall, bei 23 (13,3%) konnte dazu keine Aussage getroffen werden. Ein Refluxleiden mit sich daraus ergebener Ösophagitis beziehungsweise eine chronische Gastritis, welche anamnestisch festgestellt oder nach feingeweblicher Untersuchung gesichert wurden, lagen in 88 (50,9%) Fällen vor. Eine *Helicobacter*

pylori Infektion fand sich bei 28 (16,2%) Patienten in der Vorgeschichte oder wurde im Zuge der pathologischen Untersuchung festgestellt.

4.1.3 Therapiealgorithmus des Patientenkollektivs

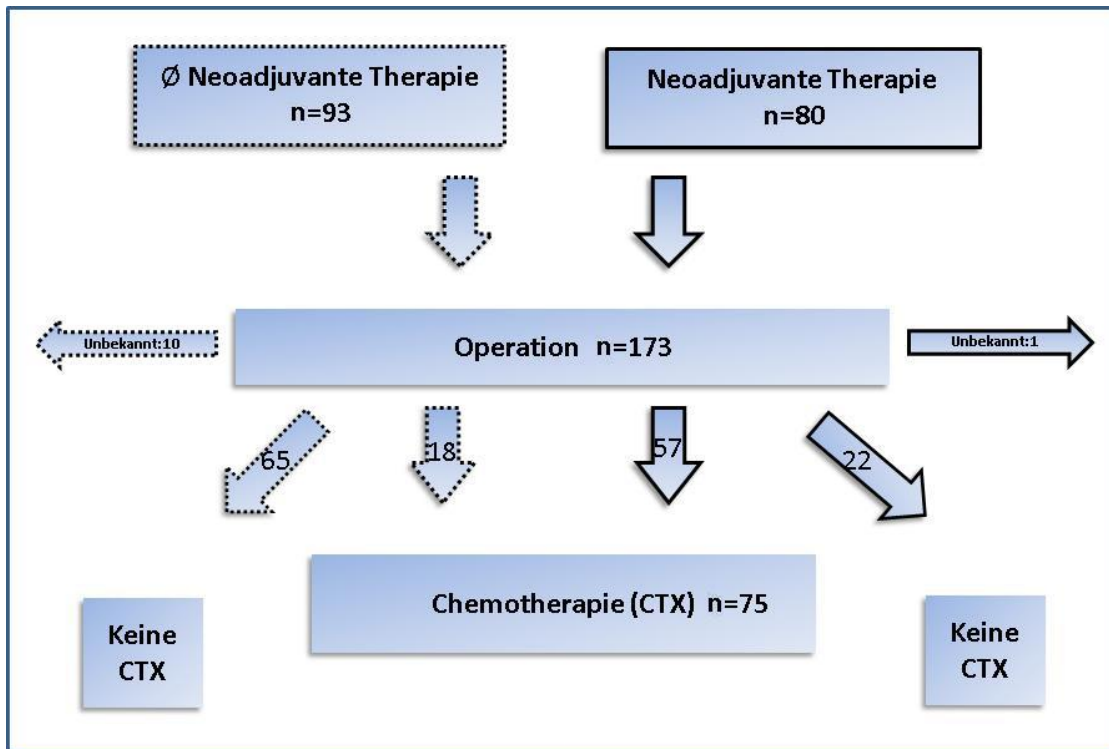


Abbildung 6: Therapiealgorithmus des Patientenkollektivs

Betrachtet wurde der Behandlungsablauf des Gesamtkollektivs, welches, je nach Erhalt einer Chemotherapie vor der Operation, in einen therapienaiven (hier dargestellt als) und neoadjuvanten (hier hervorgehoben durch —) Therapiearm unterteilt wurde.

Alle 173 Patienten des Kollektivs erhielten im Zeitraum von September 2003 bis April 2015 eine operative Therapie des Magenkarzinoms beziehungsweise Karzinoms des gastroösophagealen Übergangs (siehe Abb.6). 80 Patienten (46,2%) unterzogen sich vor der Operation einer neoadjuvanten Chemotherapie. 93 Patienten (53,8%) wurden ohne vorherige Chemotherapie operiert.

Im Anschluss an die operative Resektion erfolgte bei 75 Patienten (43,4%) eine adjuvante Chemotherapie, in 64 Fällen als geplante adjuvante Therapie nach der Operation, in 11 Fällen erst als Eskalation nach Progress. In der Gruppe der adjuvant Therapierten entstammten 57 der Patientensubgruppe, die bereits neoadjuvant behandelt wurden, 18 Patienten waren therapienaiv.

Bei 87 Patienten (50,3%) endete die Therapie mit der Operation, es schloss sich adjuvant keine chemotherapeutische Behandlung an. 65 Patienten hatten diese auch nicht neoadjuvant empfangen, 22 Patienten hingegen waren neoadjuvant vorbehandelt.

In 11 Fällen (6,4%) konnte nach der Operation nicht mehr nachvollzogen werden, ob sich eine adjuvante Chemotherapie anschloss, diese Patienten entstammten zum größten Teil der neoadjuvant therapienaiven Subgruppe, lediglich ein Fall ließ sich der neoadjuvant vortherafierten Patientengruppe zuordnen.

Chemotherapie		Anzahl, n=	Prozent, %
Neoadjuvante Chemotherapie	keine	93	53,8
	FLO/FOLFOX /EOX/EOF	9	5,2
	FOLFIRI	1	0,6
	FLOT	29	16,8
	PLF/ECX/ECF	40	23,1
	nicht näher bezeichnete Chemotherapie	1	0,6
Adjuvante Chemotherapie	keine	87	50,3
	Capecitabin/5-FU Mono	3	1,7
	FLO/FOLFOX/EOX/EOF	18	10,4
	FOLFIRI	4	2,3
	FLOT	21	12,1
	PLF/ECX/ECF	26	15
	CAPOX	1	0,6
	Oxaliplatin mono	1	0,6
	nicht näher bezeichnete Chemotherapie	1	0,6
	unbekannt	11	6,4

Tabelle 6: Therapieregimes des Patientenkollektivs

FLO: 5-FU, Leukovorin, Oxaliplatin; FOLFOX: Leukovorin, 5-FU, Oxaliplatin; EOX: Epirubicin, Oxaliplatin, Capecitabin; EOF: Epirubicin, Oxaliplatin, 5-FU; FOLFIRI: Leukovorin, 5-FU, Irinotecan; FLOT: Docetaxel, Oxaliplatin, 5-FU; CAPOX: Capecitabin, Oxaliplatin, PLF: Folinsäure, 5-FU, Cisplatin; ECX: Epirubicin, Cisplatin, Capecitabin; ECF: Epirubicin, Cisplatin, 5-FU; mono: Monotherapie

Obenstehende Tabelle 6 zeigt neoadjuvante und adjuvante Therapieregime und die Verteilung der Anwendung im untersuchten Patientenkollektiv.

Hervorzuheben ist hierbei, dass von 80 Patienten, die *neoadjuvant* behandelt wurden, 40 Patienten (50%) eine Cisplatin-basierte Chemotherapie (PLF/ECX/ECF) erhielten. 38 (47,5%) Patienten wurden Oxaliplatin-basiert therapiert (FLOT/FLO/FOLFOX/EOX/EOF). Ein Patient (1,25%) erhielt mit FOLFIRI neoadjuvant

eine Irinotecan-basierte Therapie, bei einem Patienten (1,25%) war die Art der neoadjuvanten Chemotherapie nicht näher bezeichnet.

75 Patienten erhielten eine *adjuvante* Chemotherapie. In 26 Fällen (34,7%) war diese Cisplatin-basiert (PLF/ECX/ECF), 41 Patienten (54,7%) und somit die Mehrheit wurden Oxaliplatin-basiert (FLOT/FLO/FOLFOX/EOX/EOF/CAPOX/Oxaliplatin mono) therapiert. Bei 4 Patienten (5,3%) war das Therapiekonzept Irinotecan-basiert (FOLFIRI), 3 Patienten (4%) wurden allein mit 5-FU bzw. dessen Prodrug Capecitabine behandelt, die Chemotherapie eines Patienten (1,3%) wurde nicht näher bezeichnet.

4.1.4 Korrelation des Therapiealgorithmus mit Tumorcharakteristika des Patientenkollektivs

Nachfolgend wurde mittels des exakten Tests nach Fisher ein möglicher Zusammenhang zwischen der Behandlung ohne beziehungsweise mit neoadjuvanter Chemotherapie und Geschlecht, Altersgruppen, Lokalisation des Primärtumors, Tumorgöße, Lymphknotenbefall sowie Fernmetastasen untersucht.

Tumorcharakteristika *		ØnCTX, n=93 (100%)	nCTX, n=80 (100%)
Geschlecht	männlich	62 (66,7%)	58 (72,5%)
	weiblich	31 (33,3%)	22 (27,5%)
Altersgruppen	≤65	39 (41,9%)	51 (63,8%)
	>65	54 (58,1%)	29 (36,3%)
Lokalisation Primärtumor	AEG I-III	31 (33,3%)	59 (73,8%)
	Magen	62 (66,7%)	21 (26,3%)
T-Status	T0/T1/T2	43 (46,7%)	36 (46,2%)
	T3/T4	49 (53,3%)	42 (53,8%)
N-Status	N0/N1	58 (63,7%)	50 (63,3%)
	N2/N3	33 (36,3%)	29 (36,7%)
M-Status	M0	62 (80,5%)	46 (75,4%)
	M1	15 (19,5%)	15 (24,6%)

Tabelle 7: Zusammenhang des Therapiealgorithmus mit Tumorcharakteristika des Patientenkollektivs

* durch unbekannte Fälle (siehe Tabelle 3 Kapitel 4.1.1) ergibt sich die Differenz zu 100%.

Es zeigte sich in diesem Kollektiv kein Zusammenhang zwischen den Merkmalen Geschlecht ($p=0,51$) sowie Tumorgöße und neoadjuvante Chemotherapie ($p=1,00$). Sowohl Patienten mit kleineren (T0/T1/T2) als auch mit größeren Tumoren gingen nahezu gleich häufig mit einer neoadjuvanten Chemotherapie einher ($p=1,00$). Ebenfalls ergab sich kein Zusammenhang zwischen Fernmetastasierung und neoadjuvanter zytostatischer Behandlung ($p=0,54$). Auch bei Betrachtung des N-Status lag keine Korrelation zwischen Lymphknotenbeteiligung und neoadjuvanter Chemotherapie vor ($p=1,00$), (siehe Tabelle 7).

Hinsichtlich der Parameter Altersgruppen ($p=0,01$) sowie Lokalisation des Primärtumors ($p=0,00$) stellte sich eine unterschiedliche Verteilung auf die Therapieoptionen heraus. Während die meisten Patienten mit einem Karzinom des gastroösophagealen Übergangs neoadjuvant behandelt wurden, fiel bei der Mehrzahl der Patienten mit einem reinen Magenkarzinom die Therapieentscheidung gegen eine neoadjuvante Chemotherapie. Bezüglich des Alters ließ sich darauf schließen, dass

Patienten ≤ 65 Jahren vorwiegend neoadjuvant behandelt wurden, während bei älteren Patienten eher auf die zytostatische Therapie vor der Operation verzichtet wurde. In Zusammenschau der untersuchten Parameter zeigte sich eine ähnliche Zusammensetzung der Behandlungsarme „keine neoadjuvante Chemotherapie“ versus „neoadjuvante Chemotherapie“ und somit eine gleichmäßige Verteilung der Geschlechter und Tumorstadien. Lediglich hinsichtlich der Variablen Lokalisation des Primärtumors und Altersgruppen kamen leitliniendefinierte und Therapiealgorithmusbedingte Ungleichverteilungen zum Vorschein.

4.2 Evaluationen der CD133 Färbeergebnisse

4.2.1 Deskriptive Analyse der Färbeergebnisse

Lokalisation der Färbung	Anzahl, n=	Prozent, %
negativ	33	19,1
apikal	114	65,9
zytoplasmatisch	9	5,2
apikal und zytoplasmatisch	6	3,5
nicht auswertbar	11	6,4

Tabelle 8: Färbeergebnisse für CD133

Von der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Datenbank aus 173 Patienten lag bei 162 eine CD133-Färbung des Tumorgewebes vor, 11 Fälle (6,4%) konnten aufgrund von nicht vorhandenem oder nicht auswertbarem Tumormaterial nicht ausgewertet werden (siehe Tabelle 8). Der Ausschluss führte zu keiner Veränderung des Gesamtkollektivs, welches somit in seiner Zusammensetzung weiterhin hinsichtlich aller untersuchten Parameter repräsentativ blieb.

Der Großteil des Patientenkollektivs (65,9%) wies eine apikale Färbung in den Tumorzellen auf (exemplarische Abbildung siehe Abb. 8), in 19,1% der Fälle exprimierte der Tumor nicht den Stammzellmarker CD133 (exemplarische Abbildung siehe Abb. 7).

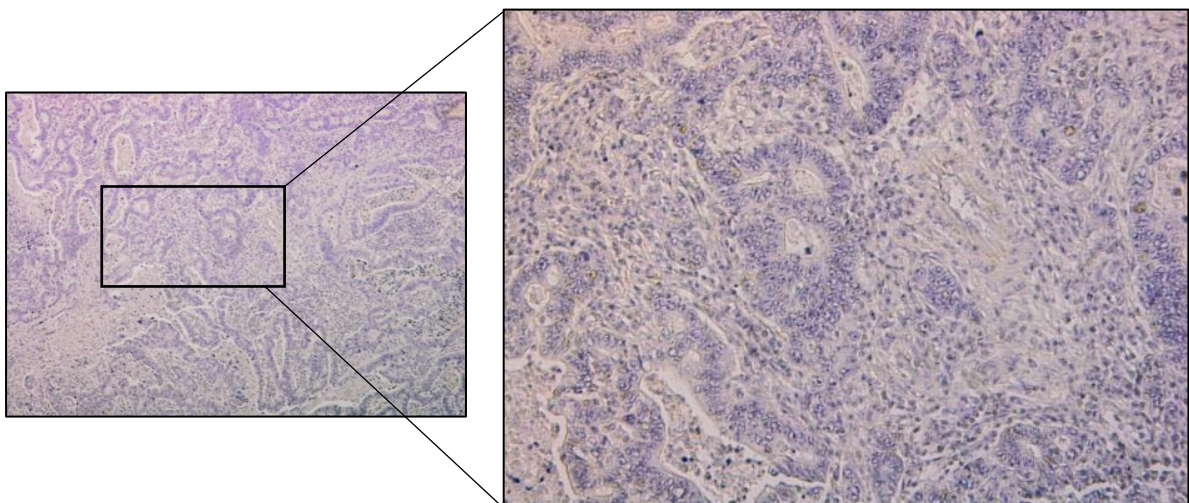


Abbildung 7: Negative Färbung von CD133

Die Abbildung zeigt einen Tumor, welcher kein CD133 exprimiert. Während auf der linken Seite eine 40fache Vergrößerung zu sehen ist, so beträgt diese auf der rechten Seite 100fach

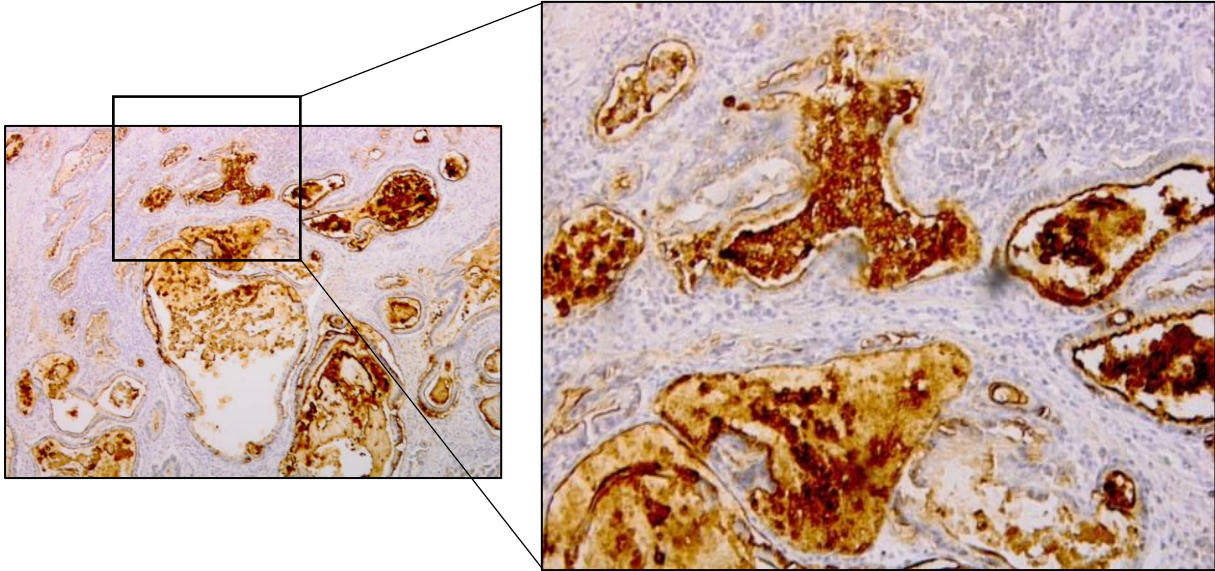


Abbildung 8: Apikale Färbung von CD133

Die Abbildung zeigt einen Tumor, welcher CD133 apikal exprimiert. Die Vergrößerung beträgt links 40fach, auf der rechten Seite ist eine 100fache Vergrößerung zu sehen.

5,2% des Patientenmaterials gingen mit einer zytoplasmatischen Färbung einher (exemplarische Abbildung siehe Abb. 9), 3,5% zeigten sowohl apikale als auch zytoplasmatische CD133 Färbeanteile (exemplarische Abbildung siehe Abb. 10).

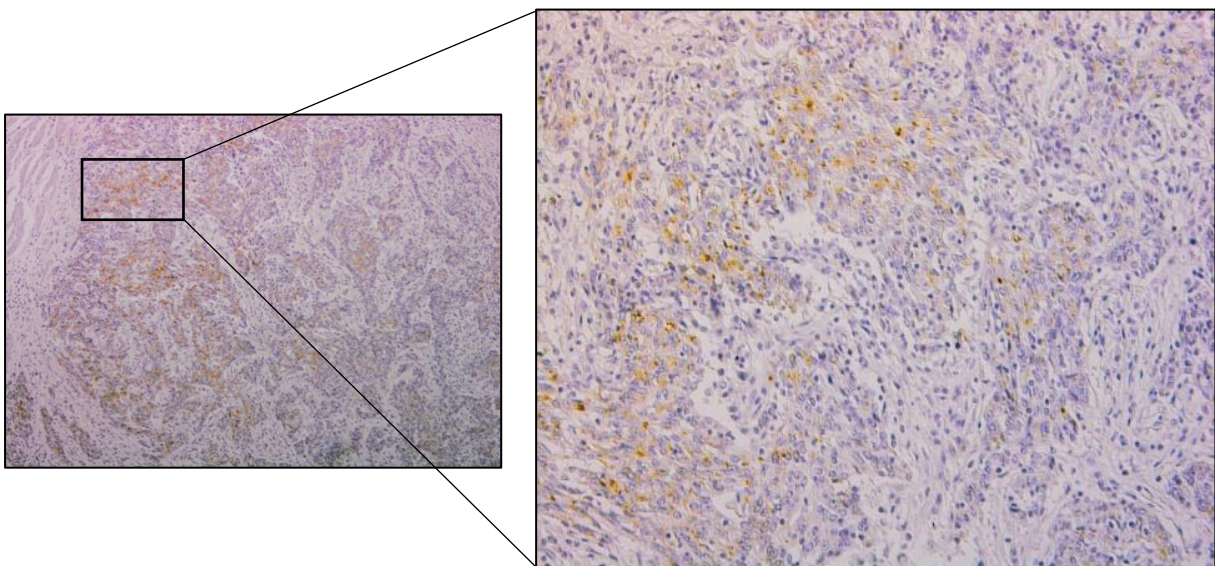


Abbildung 9: Zytoplasmatische Färbung von CD133

Die Abbildung zeigt eine zytoplasmatische Expression von CD133 im Tumorgewebe. Links in 40facher Vergrößerung, der rechte Bildabschnitt ist in 100facher Vergrößerung abgebildet.

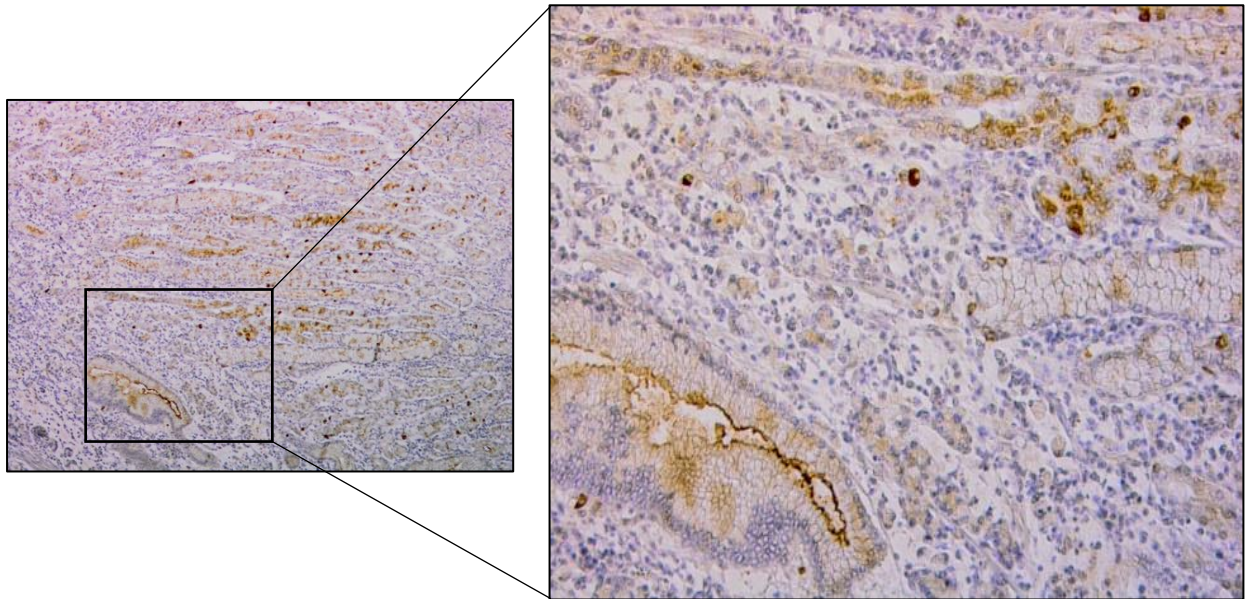


Abbildung 10: Apikale und zytoplasmatische Färbung von CD133

Die Abbildung zeigt einen Tumor, welcher sowohl apikale als auch zytoplasmatische Färbeanteile aufweist. Links in 40facher Vergrößerung, rechts in 100facher Vergrößerung. Im linken unteren Bildrand ist die apikale Expression zu sehen, während die zytoplasmatische Ausprägung vorwiegend in den oberen Bildanteilen sichtbar ist.

4.2.2 Korrelation der Färbung mit den klinisch-pathologischen Patientenparametern

Sobald ein Tumor eine zytoplasmatische Färbung oder Anteile dessen zeigte, wurde die Färbung im Folgenden als zytoplasmatisch klassifiziert. Dies führte zum Zusammenschluss der Subgruppen „zytoplasmatisch“ und „apikal und zytoplasmatisch“.

Patienten- und Tumorcharakteristika		Färbung negativ Anzahl, n= (%)	apikal Anzahl, n= (%)	zytoplasmatisch Anzahl, n= (%)
Geschlecht	männlich	23 (69,7%)	80 (70,2%)	8 (53,3%)
	weiblich	10 (30,3%)	34 (29,8%)	7 (46,7%)
Altersgruppen	≤65	21 (63,3%)	52 (45,6%)	10 (66,7%)
	>65	12 (36,4%)	62 (54,4%)	5 (33,3%)
T-Status	T0/T1/T2	19 (57,6%)	50 (44,2%)	4 (28,6%)
	T3/T4	14 (42,4%)	63 (55,8%)	10 (71,4%)
N-Status	N0/N1	21 (63,6%)	67 (59,3%)	10 (76,9%)
	N2/N3	12 (36,4%)	46 (40,7%)	3 (23,1%)
M-Status	M0	20 (80,0%)	74 (79,6%)	9 (81,8%)
	M1	5 (20,0%)	19 (20,4%)	2 (18,2%)
Lokalisation Primärtumor	AEG I-III Magen	13 (39,4%) 20 (60,6%)	63 (55,3%) 51 (44,7%)	6 (40,0%) 9 (60,0%)
neoadjuvante Chemotherapie	nein	18 (54,5%)	66 (57,9%)	8 (53,3%)
	ja	15 (45,5%)	48 (42,1%)	7 (46,7%)
Grading	G1/G2	12 (38,7%)	51 (47,7%)	1 (7,1%)
	G3	19 (61,3%)	56 (52,3%)	13 (92,9%)
Laurénklassifikation	intestinal	13 (65,0%)	44 (63,8%)	2 (16,7%)
	diffus	7 (35,0%)	25 (36,2%)	10 (83,3%)
Siegelringkarzinom	nein/nicht näher definiert	24 (72,7%)	86 (75,4%)	5 (33,3%)
	ja	9 (27,3%)	28 (24,6%)	10 (66,7%)

Tabelle 9: Verteilung der klinisch-pathologischen Patientenparameter zur CD133 Expression

Um mögliche Korrelationen zwischen Patienten-/Tumorcharakteristika und der CD133 Expression herauszuarbeiten (siehe Tabelle 9), wurde im Folgenden das Kollektiv hinsichtlich der Verteilung der CD133 Expression auf verschiedene Einflussfaktoren untersucht. Hinsichtlich der Variable Laurénklassifikation wurde aufgrund geringer Fallzahl (n= 10) die Ausprägung „Mischtyp“ ausgeschlossen.

In der Subgruppe ohne CD133 Expression zeigte sich eine Umverteilung der Patienten eher mit männlichem Geschlecht, geringerem Alter, negativer oder geringgradiger lokoregionärer Lymphknotenmetastasierung, fehlender Fernmetastasierung, reinem Magenkarzinomen, schlecht differenzierten Tumoren, intestinalem Tumortyp sowie der Abwesenheit von Siegelringzellen. Hinsichtlich neoadjuvanter Chemotherapie verteilten sich negative Färbergebnisse nahezu gleich auf die Gruppen „keine neoadjuvante Chemotherapie“ und „neoadjuvante Chemotherapie“. In Bezug auf die Tumorgroße zeigte sich ebenfalls kein ersichtlicher Unterschied der Expression zwischen kleinen und großen Tumoren.

In der Subgruppe der apikalen CD133 Expression ließ sich erkennen, dass ein höherer Anteil an Patienten mit männlichem Geschlecht, keiner oder N1-Lymphknotenmetastasierung, keiner Fernmetastasierung, intestinalem Tumortyp und fehlenden Siegelringzellen zu finden ist. Für die Variablen Alter, Tumorgroße, Lokalisation des Primärtumors, neoadjuvante Chemotherapie sowie Grading ließ sich kein Unterschied in der Verteilung einer apikalen CD133 Färbung auf die jeweiligen Variablenausprägungsmöglichkeiten erkennen.

In der Subgruppe der zytoplasmatischen Expression von CD133 kristallisierte sich heraus, dass diese eher bei jüngeren Patienten, fortgeschrittener Tumorgroße, ohne oder nur mit geringfügigem Lymphknotenbefall, fehlender Fernmetastasierung, reinen Magenkarzinomen, schlecht differenzierten Tumoren, diffusem Tumorwachstum sowie Siegelringkarzinomen zu finden sind. In Bezug auf Geschlecht und neoadjuvanter Chemotherapie verteilte sich die zytoplasmatische CD133 Expression ohne deutliche Unterschiede auf die möglichen Variablenausprägungen.

Im Anschluss erfolgte die Analyse bezüglich der Verteilung von möglichen Risiko- und Einflussfaktoren auf die Expression von CD133 (siehe Tab.10).

Risiko-/ Einflussfaktor		Färbung		
		negativ Anzahl, n= (%)	apikal Anzahl, n= (%)	zytoplasmatisch Anzahl, n= (%)
Übergewicht	nein	11 (37,9%)	44 (40,7%)	10(66,7%)
	ja	18 (62,1%)	64 (59,3%)	5 (33,3%)
Nikotinkonsum	nein	5 (26,3%)	31 (38,3%)	2 (16,7%)
	ja	14 (73,7%)	50 (61,7%)	10 (83,3%)
Refluxösophagitis/ Gastritis	nein	9 (33,3%)	41 (41,4%)	3 (23,1%)
	ja	18 (66,7%)	58 (58,6%)	10 (76,9%)
<i>Helicobacter pylori</i>	nein	15 (71,4%)	58 (76,3%)	12 (80,0%)
	ja	6 (28,6%)	18 (23,7%)	3 (20,0%)

Tabelle 10: Verteilung von Risiko-und Einflussfaktoren zur CD133 Expression

Sowohl in der Gruppe der Tumore ohne CD133 Expression als auch in der Gruppe der apikal gefärbten Karzinome zeigte sich in diesem Patientenkollektiv ein höherer Patientenanteil mit dem Vorliegen von Übergewicht, Nikotinkonsum, Refluxösophagitis oder Gastritis sowie der Abwesenheit einer *Helicobacter pylori* Infektion.

In der Subgruppe der zytoplasmatischen CD133 Expression ging diese mit einem BMI <25, Nikotinkonsum, dem Vorliegen einer Refluxösophagitis oder Gastritis sowie ohne Nachweis eines *Helicobacter pylori* einher.

Um etwaige Einflüsse der verschiedenen Expressionsmöglichkeiten von CD133 näher zu beleuchten, wurden zur statistischen Analyse die Subgruppen negative gegen apikale Färbung, sowie negative gegen zytoplasmatische CD133 Färbung verglichen. Hierbei konzentrierte sich die Evaluation auf gängige Tumorcharakteristika.

Es zeigte sich beim Vergleich negative gegen apikale Färbungen, dass die Variablen Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Fernmetastasen, Lokalisation des Primärtumors, Laurénklassifikation, Siegelringkarzinom sowie Grading unabhängig von der CD133 Expression waren.

Bei Analyse der negativen gegen zytoplasmatische Färbungen ließ sich für die Charakteristika Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Fernmetastasen und Lokalisation des Primärtumors erkennen, dass auch hier keine Abhängigkeit zur Expression von CD133 bestand.

Für die Variablen Laurénklassifikation ($p=0,01$), Siegelringkarzinom ($p=0,01$) und Grading ($p=0,03$) hingegen stellte sich ein belegbarer Zusammenhang heraus. So zeigte sich, dass ein diffuser Typ nach Laurén, die Expression von Siegelringzellen sowie ein gering differenzierter G3 Tumor häufiger mit einer zytoplasmatischen CD133 Ausprägung einhergingen.

4.3 Überlebenszeitanalysen

Die Überlebenszeitanalyse des Patientenkollektivs hinsichtlich der verschiedenen Einflussfaktoren wie Patienten- und Tumoreigenschaften wurde mittels Kaplan-Meier-Kurve und Log Rank Test durchgeführt.

Das Patientenkollektiv umfasste 173 Patienten, welche im Zeitraum von September 2003 bis April 2015 eine operative Resektion des Magenkarzinoms beziehungsweise des Karzinoms des gastroösophagealen Übergangs erhielten. Von 173 Patienten verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraums bis August 2019 77 Patienten, darunter 120 Männer und 53 Frauen. Das mediane Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs betrug 46 Monate. Die maximale Beobachtungszeit lag bei 122 Monaten.

4.3.1 Überlebenszeitanalyse bezüglich therapeutischer Maßnahmen

Wie unter Punkt 4.1.3: Therapiealgorithmus des Patientenkollektivs beschrieben, haben die Patienten unterschiedliche Therapiekonzepte erhalten, sowohl neoadjuvant als auch adjuvant.

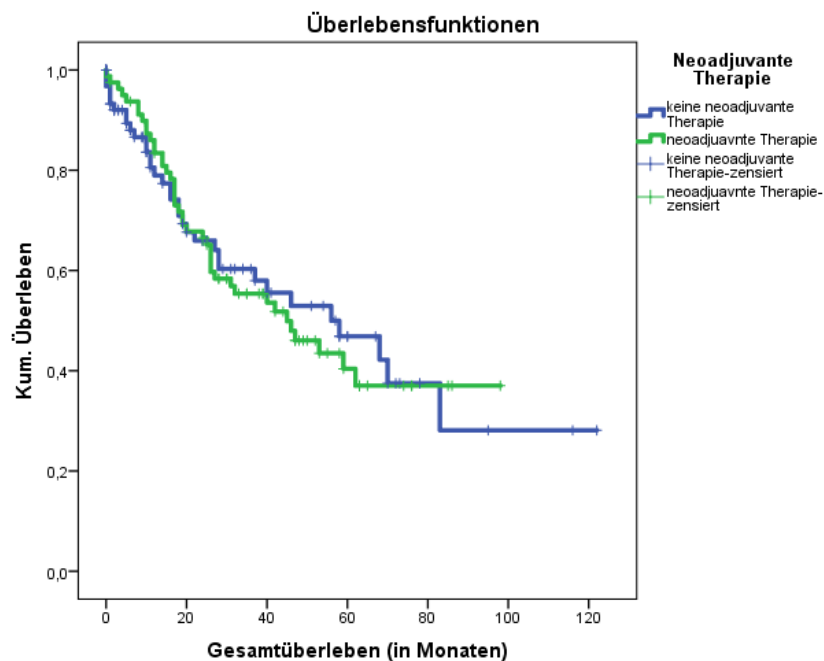


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich des Erhalts einer neoadjuvanten Chemotherapie
Es zeigt sich kein Einfluss der neoadjuvanten Chemotherapie auf das Gesamtüberleben ($p=0,88$).

Hinsichtlich der Überlebenszeit zeigte sich nach Analyse der Kaplan-Meier-Kurve und des Log-Rank-Test, dass die Patienten, die neoadjuvant zytostatisch behandelt wurden, ein medianes Überleben von 45 Monaten aufwiesen. Die Subgruppe der nicht neoadjuvant Behandelten zeigt ein medianes Gesamtüberleben von 56 Monate. Mit dem Log Rank Test konnte kein statistischer Unterschied nachgewiesen werden ($p=0,88$), (siehe Abb.11).

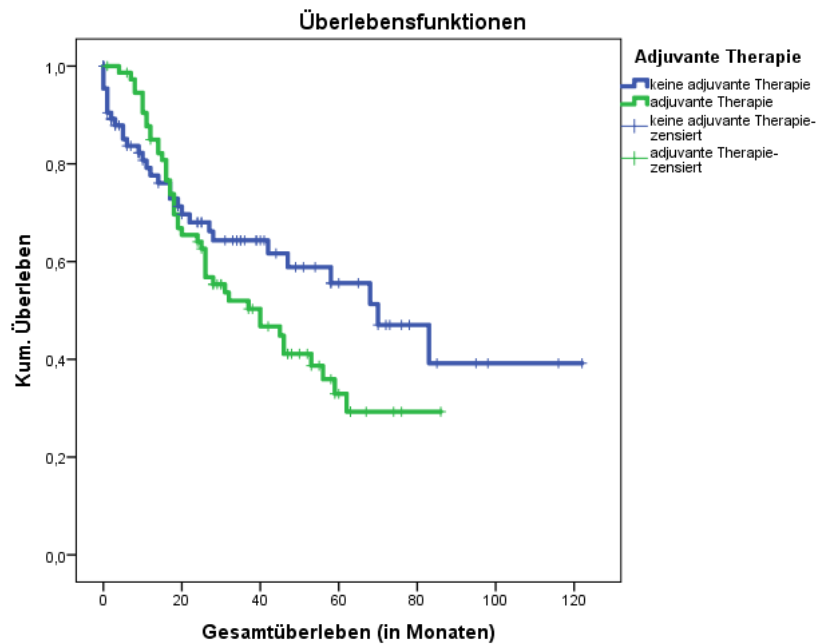


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve bezüglich des Erhalts einer adjuvanten Chemotherapie
 Es zeigt sich keine Beeinflussung des Gesamtüberlebens durch eine adjuvante Chemotherapie ($p=0,17$).

Bei Betrachtung der adjuvanten Therapiekonzepte schien sich mit 70 Monaten ebenfalls ein längeres medianes Überleben in der Gruppe der nicht adjuvant Behandelten zu zeigen, was ein längeres Überleben um 30 Monate im Vergleich zur Subgruppe der adjuvant Therapierten mit 40 Monaten bedeuteten würde. Allerdings stellte sich hier kein nachweisbarer Unterschied heraus ($p=0,17$), (siehe Abb.12).

Im Folgenden wurde das Kollektiv in Abhängigkeit des Erhaltens einer neoadjuvanten Chemotherapie in zwei Gruppen aufgeteilt und das Gesamtüberleben nach Tumoreigenschaften untersucht (siehe Tabelle 11).

Tumoreigenschaft		Mediane Überlebenszeit ØnCTX (Mon)	Log Rank	Mediane Überlebenszeit nCTX (Mon)	Log Rank
T	T0/T1/T2	.	p=0,00	62	p=0,03
	T3/T4	19		26	
N	N0/N1	70	p=0,01	47	p=0,19
	N2/N3	20		26	
M	M0	68	p=0,00	53	p=0,09
	M1	11		26	
Grading	G1/G2	70	p=0,46	.	p=0,05
	G3	56		40	

Tabelle 11: Überlebenszeitanalyse bezüglich therapeutischer Maßnahmen

. = Mediane Überlebenszeit war nicht bestimmbar, da zum Zeitpunkt des Beobachtungsendes bei 50% der Kohorte der Endpunkt Tod nicht erreicht wurde.

Es zeigte sich, dass Patienten mit kleinen Tumoren (T0/T1/T2), sowohl mit (p=0,03), als auch ohne (p=0,00) neoadjuvanter Behandlung, länger überleben als Patienten mit großen Tumoren (T3/T4) (siehe Abb.13).

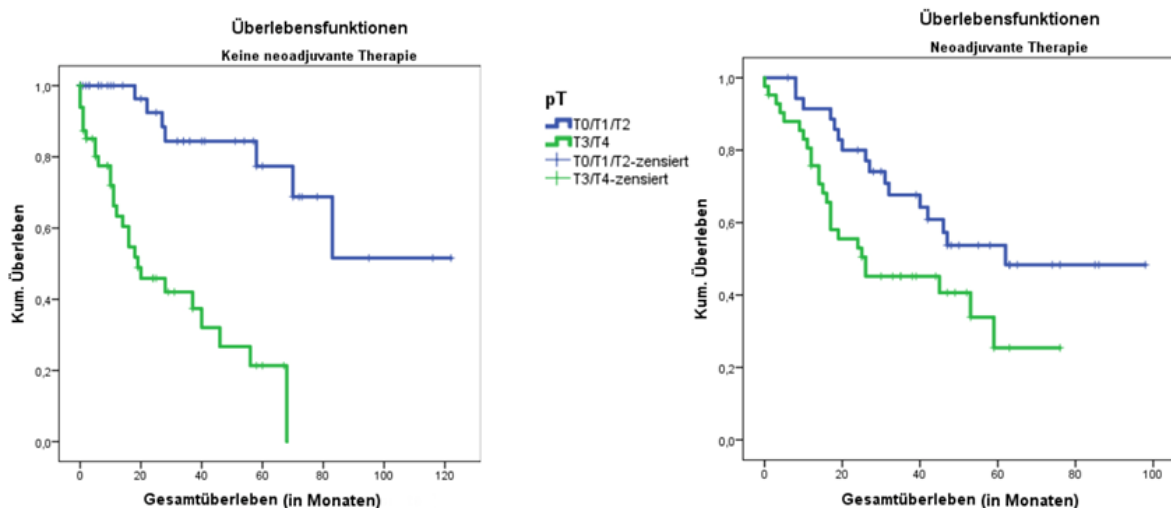


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich Tumorgroße, aufgeteilt nach erhaltener neoadjuvanter Chemotherapie oder therapienaiv.

Die linke Abbildung zeigt die Überlebenskurve der Patienten, die nicht neoadjuvant behandelt wurden, rechts ist die Überlebenszeit (in Monaten) der vortherapierten Patienten abgebildet. Es sticht sowohl im Therapiearm mit neoadjuvanter Chemotherapie (p=0,03), als auch bei therapienaiven Patienten (p=0,00) ein deutlich besseres Überleben der Patienten mit kleineren Tumoren (blau) im Vergleich zu größeren T3/T4 Tumoren (grün) heraus.

In Bezug auf die Lymphknotenmetastasen ließ sich erkennen, dass therapie-naive Patienten ($p=0,00$) ohne oder mit geringgradigem (N0/N1) lokoregionärem Lymphknotenbefall länger überlebten als diejenigen mit stärkerer (N2/N3) Lymphknotenmetastasierung. Dieser prognostische Vorteil war bei den neoadjuvant Therapierten nicht eindeutig nachzuweisen ($p=0,19$) (siehe 14).

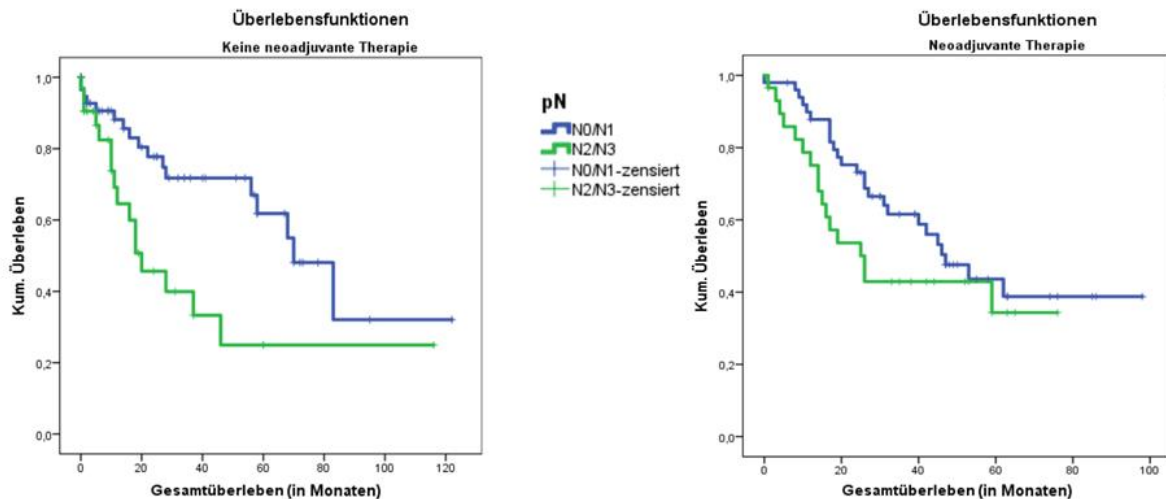


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich lokoregionärer Lymphknotenmetastasierung, aufgeteilt nach erhaltener neoadjuvanter Chemotherapie oder therapie-naiv

Die linke Abbildung zeigt, dass das Gesamtüberleben (in Monaten) von Patienten, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben, von dem Grad der lokoregionären Lymphknotenmetastasierung abzuhängen scheint ($p=0,00$) und somit Patienten ohne oder mit geringgradiger (N0/N1) Lymphknotenmetastasierung länger zu leben scheinen, als solche, die ausgeprägte Lymphknotenmetastasen aufweisen (N2/N3). Wie auf der rechten Abbildung zu erkennen ist, weisen auch Patienten mit neoadjuvanter Chemotherapie einen Trend auf einen Überlebensvorteil bei niedrigem N-Status hin, jedoch nicht statistisch belegbar ($p=0,19$).

In der Gruppe der neoadjuvant nicht vorbehandelten Patienten zeigte sich deutlich ($p=0,00$), dass Patienten mit Fernmetastasen 57 Monate früher starben als Patienten ohne diese. Dieser Trend zeichnete sich auch im neoadjuvanten Therapiearm ab, jedoch statistisch nicht nachweisbar ($p=0,09$) (siehe Abb.15).

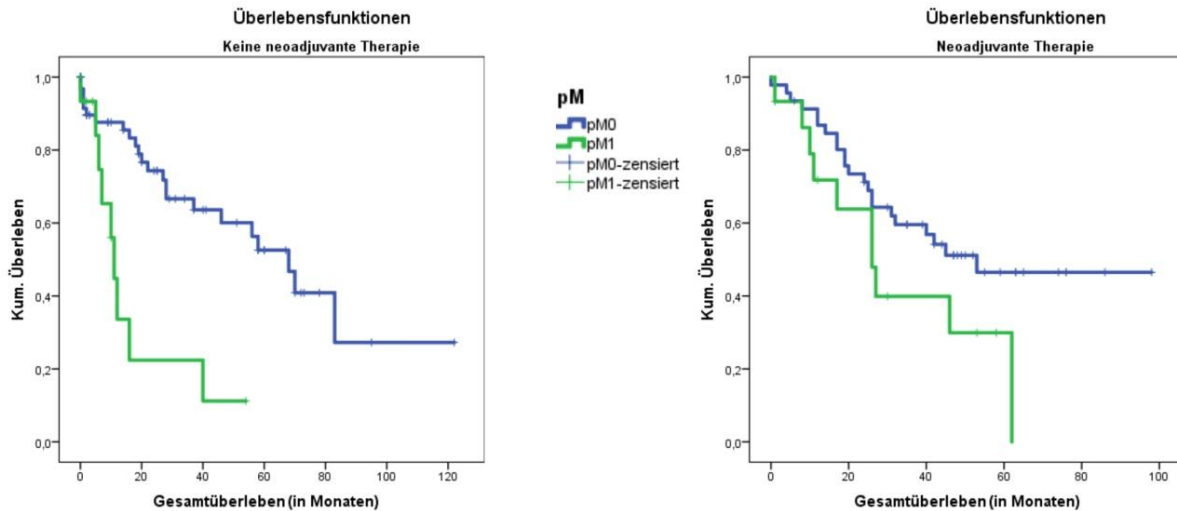


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich Fernmetastasierung, aufgeteilt nach erhaltener neoadjuvanter Chemotherapie oder therapienaiv

Wie auf der linken Abbildung zu erkennen ist, verringert bei Patienten, welche nicht neoadjuvant behandelt wurden, eine Fernmetastasierung das Gesamtüberleben ($p=0,00$). Dieser Trend zeichnet sich auch in der rechten Abbildung ab, welche die Überlebenszeitkurve der neoadjuvant behandelten Patienten zeigt, dies ist statistisch jedoch nicht belegbar ($p=0,09$).

Es zeigte sich jedoch weiterhin ein Trend, dass neoadjuvant therapierte Patienten mit gut (G1) oder mäßig (G2) differenzierten Tumoren länger überleben als solche mit schlecht (G3) differenzierten Neoplasien ($p=0,05$). Dieser Einfluss des Grading auf das Gesamtüberleben trat in der Gruppe der therapienaiven Patienten nicht auf (siehe Abb. 16).

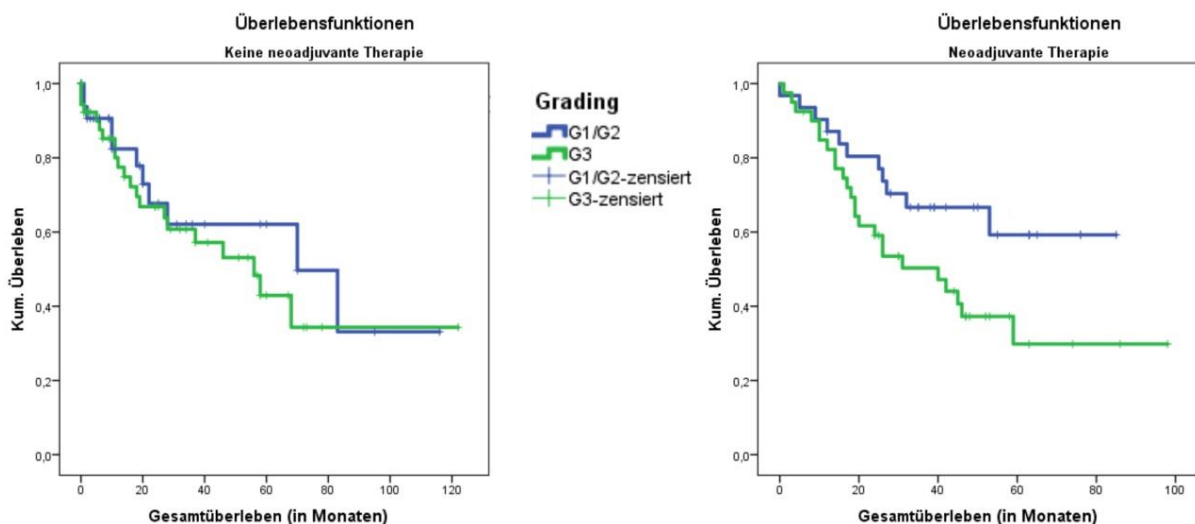


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich Grading, aufgeteilt nach erhaltener neoadjuvanter Chemotherapie oder therapienaiv

Es lässt sich erkennen, dass bei jenen Patienten, welchen keine neoadjuvante Chemotherapie zukam, das Grading keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben hat ($p=0,46$). Im Gegensatz hierzu hat das Grading in der Gruppe der neoadjuvant chemotherapeutisch behandelten Patienten einen prognostischen Vorhersagewert. Patienten, die gut (G1) oder mäßig (G2) differenzierte Tumore aufweisen, leben deutlich länger als Patienten mit schlecht differenzierten (G3) Tumoren ($p=0,05$).

4.3.2 Überlebenszeitanalyse bezüglich Patienten- und Tumoreigenschaften

Patienten-und Tumorcharakteristika*		Anzahl n=	Prozent %	Mediane Überlebenszeit (Mon)	Log Rank
Geschlecht	männlich	120	69,4	37	p=0,03
	weiblich	53	30,6	70	
T-Status	T0/T1/T2	79	45,7	83	p=0,00
	T3/T4	91	52,6	24	
N-Status	N0/N1	108	39,9	62	p=0,00
	N2/N3	62	58,4	25	
M-Status	M0	108	62,4	58	p=0,00
	M1	30	17,3	17	
Grading	G1/G2	8	11,0	83	p=0,08
	G3	152	87,9	45	
Lokalisation Primärtumor	AEG I-III	90	52,0	31	p=0,01
	Magen	83	48,0	70	
Lauren-Klassifikation	intestinal	62	35,8	70	p=0,88
	diffus	42	24,3	68	
	Mischtyp	10	5,8	58	
Siegelringkarzinom	nein/nicht näher definiert	125	72,3	58	p=0,26
	ja	48	27,7	45	

Tabelle 12: Überlebenszeitanalyse bezüglich Patienten- und Tumoreigenschaften

* durch unbekannte Fälle (siehe Tabelle 3 Kapitel 4.1.1) ergibt sich die Differenz zu 100%.

Neben Patientencharakteristika wie dem Geschlecht, konnten Tumoreigenschaften identifiziert werden, die die mediane Überlebenszeit deutlich beeinflussten (siehe Tabelle 12). Mit zunehmender Tumorgöße, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen reduzierte sich die Überlebenszeit deutlich. Während Patienten mit kleineren Tumoren (T0/T1/T2) im Median 83 Monate überlebten, war dies bei Patienten mit größeren Tumoren (T3/T4) lediglich 24 Monate der Fall (siehe Abb.17).

Ein ausgeprägter Lymphknotenbefall (N2/N3) reduzierte die mediane Überlebenszeit auf 25 Monate, wohingegen Patienten mit N0 oder N1 Status im Median 62 Monate überlebten (siehe Abb.18). Bei Patienten ohne Fernmetastasen konnte eine mediane Überlebenszeit von 58 Monaten verzeichnet werden, vorliegende Fernmetastasen verminderten diese auf 17 Monate (siehe Abb.19).

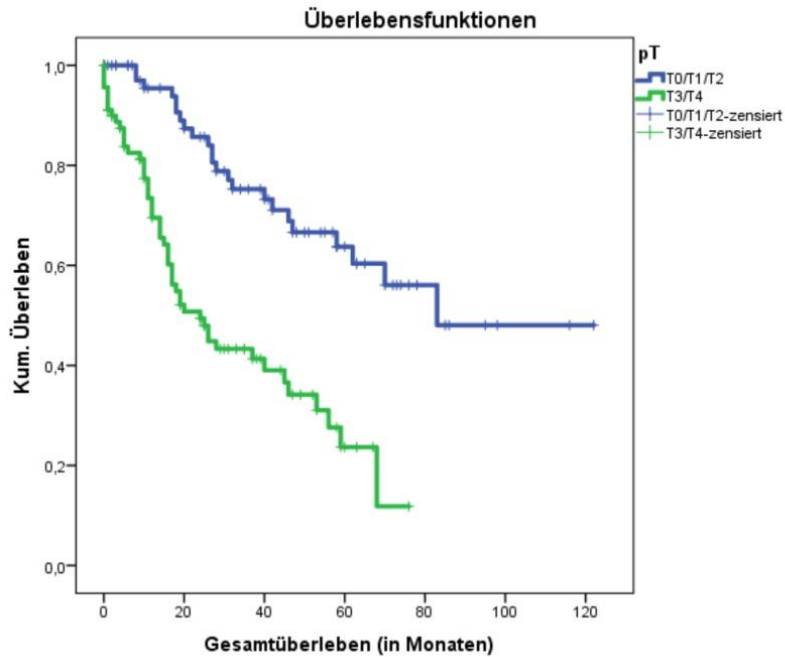


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich T-Status

Es zeigt sich ein nachweislich besseres Überleben für Patienten mit kleinen Tumoren T0/T1/T2 (blau) im Vergleich zu größeren Tumoren T3/T4 (grün), $p=0,00$.

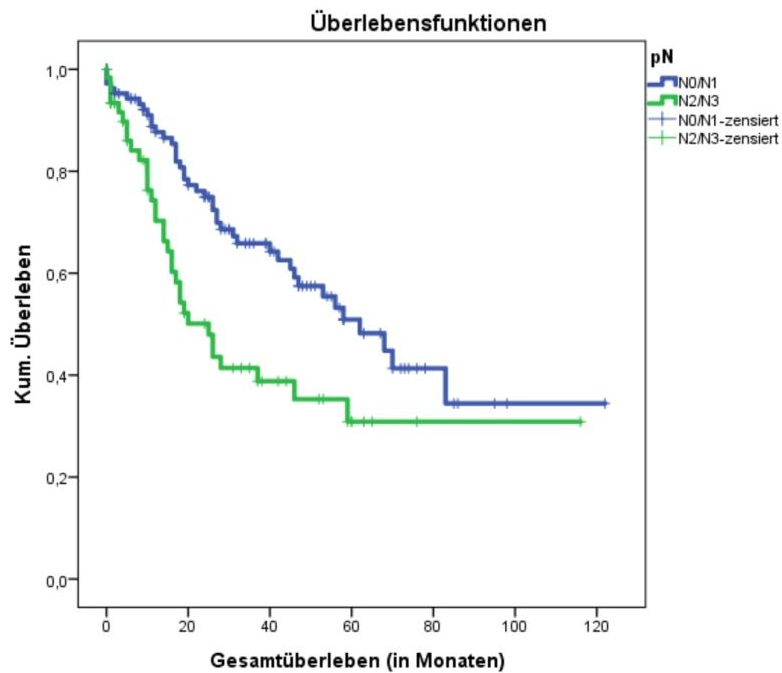


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich N-Status.

Es zeigt sich ein Überlebensvorteil für Patienten ohne oder mit geringgradiger lokoregionärer Lymphknotenmetastasierung N0/N1 (blau) im Vergleich zu Patienten mit ausgeprägter Lymphknotenmetastasierung N2/N3 (grün), $p=0,00$.

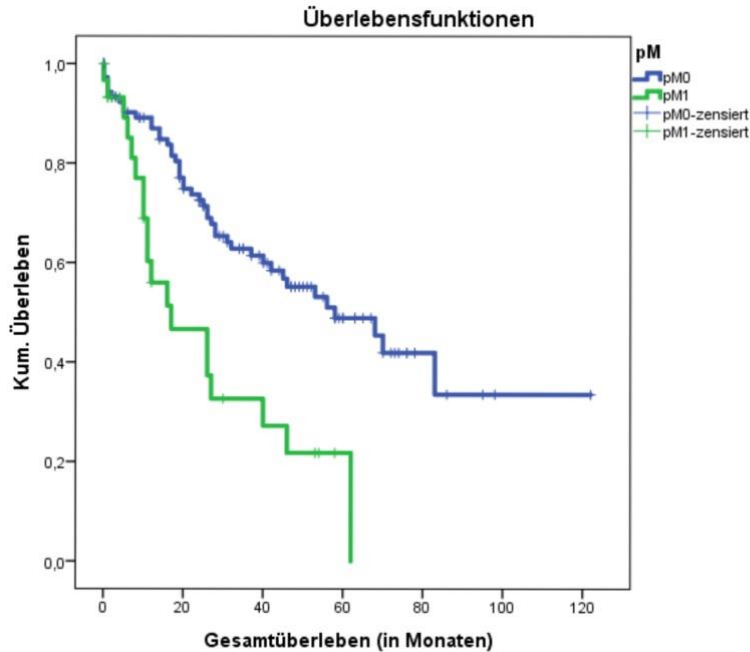


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich M-Status

Es zeigt sich ein eindeutig besseres Überleben von Patienten ohne Fernmetastasierung (blau) im Vergleich zu Patienten mit Fernmetastasen (grün), $p=0,00$.

Des Weiteren schien auch das Grading die mediane Überlebenszeit zu beeinflussen. Patienten mit gut (G1) oder mäßig (G2) differenzierten Tumoren lebten verglichen mit schlecht (G3) differenzierten Karzinomen im Median 38 Monate länger. Diese Annahme war jedoch statistisch nicht zu belegen ($p=0,08$).

Die Lokalisation des Primärtumors nahm prognostisch eine wichtige Rolle ein. Während Patienten mit einem Karzinom am gastroösophagealen Übergang im Median 31 Monate überlebten, war dies bei Patienten mit einem reinen Magenkarzinom mit 70 Monaten mehr als doppelt so lang der Fall ($p=0,01$).

Unterschiede in der Überlebenszeit je nach histologischem Subtyp (intestinal, diffus, Mischtyp) oder durch das Vorliegen von Siegelringzellen erwiesen sich nicht als unterschiedlich.

4.3.3 Überlebenszeitanalyse bezüglich Risiko- und Einflussfaktoren

Risiko-/Einflussfaktor*		Anzahl n=	Prozent %	Mediane Überlebenszeit (Mon)	Log Rank
Übergewicht	nein	70	40,5	70	p=0,23
	ja	89	51,4	45	
Nikotinkonsum	nein	41	23,6	62	p=0,38
	ja	76	43,9	46	
Diabetes mellitus	nein	112	64,7	47	p=0,88
	ja	38	22,0	56	
Refluxösophagitis/Gastritis	nein	56	32,3	.	p=0,16
	ja	88	50,9	46	
Helicobacter pylori	nein	88	50,9	45	p=0,26
	ja	28	16,2	83	

Tabelle 13: Überlebenszeitanalyse bezüglich Risiko- und Einflussfaktoren

*Durch fehlende Angaben ergibt sich die Differenz zu 100%

. = Mediane Überlebenszeit war nicht bestimmbar, da zum Zeitpunkt des Beobachtungsendes bei 50% der Kohorte der Endpunkt Tod nicht erreicht wurde.

Im Folgenden wurden Risiko- und Einflussfaktoren und ihre Einwirkung auf die Überlebenszeit evaluiert (siehe Tabelle 13). Bei allen untersuchten Parametern ließ sich auf diese kein Einfluss erkennen, jedoch schien sich beim Vorliegen einer Refluxösophagitis bzw. Gastritis ein gewisser Trend ($p=0,16$) des längeren Überlebens abzuzeichnen. Während das mediane Überleben ohne einen entzündlichen Prozess nicht bestimmbar war, da bei 50% der Kohorte der Endpunkt Tod innerhalb des Beobachtungszeitraumes nicht erreicht wurde, verkürzte sich mit Refluxösophagitis bzw. Gastritis diese Zeit auf 46 Monate.

4.3.4 Überlebenszeitanalyse bezüglich CD133 Expression

Im Folgenden wurde der Einfluss des Stammzellmarkers CD133 auf das Gesamtüberleben eruiert.

CD133 Färbung	Anzahl n=162	Prozent 100%	Mediane Überlebenszeit (Mon)
negativ	33	20,3	83
apikal	114	70,4	56
zytoplasmatisch	15	9,3	37

Tabelle 14: Überlebenszeitanalyse bezüglich CD133 Expression

Hinsichtlich der medianen Überlebenszeit stellte sich heraus, dass Patienten ohne CD133 Expression im Median 83 Monate lebten, während dies bei Patienten mit apikaler Färbung 56 Monate der Fall war. Jene Tumore, welche CD133 zytoplasmatisch exprimierten, führten zur kürzesten medianen Überlebenszeit von 37 Monaten (siehe Tabelle 14).

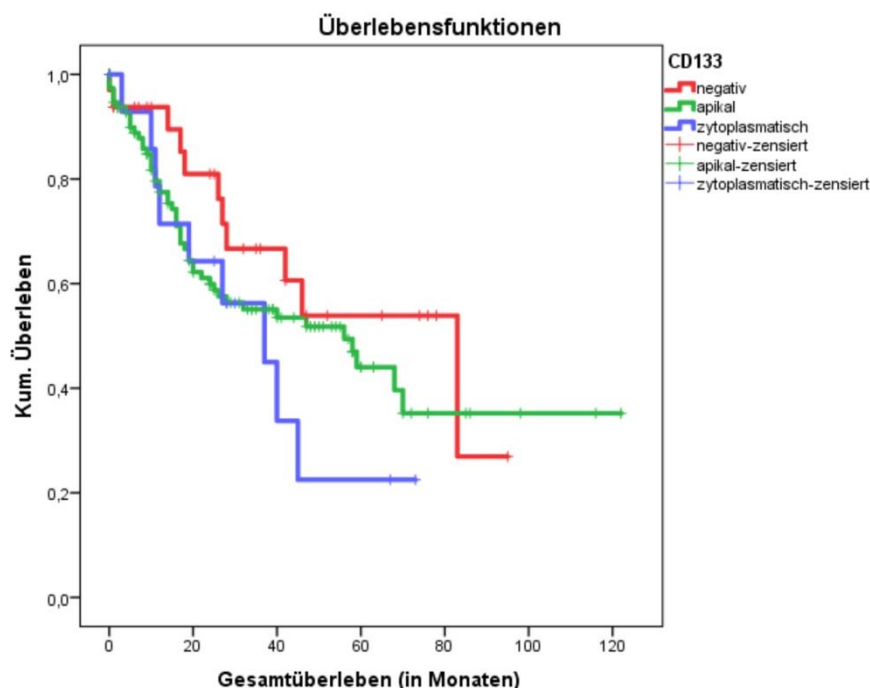


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezüglich CD133 Expression

Die Grafik zeigt das Gesamtüberleben der Patienten in Monaten in Abhängigkeit der CD133 Färbung (CD133 negativ = rot im Vergleich zu apikal = grün und zytoplasmatisch = blau). 11 Patienten konnten aufgrund fehlender Daten nicht analysiert werden.

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberlebens hinsichtlich der CD133 Expression zeigte keinen deutlichen Unterschied der Patientengruppen negativ, apikal und zytoplasmatisch gefärbt ($p=0,38$), (siehe Abb.20).

Für weitere Analysen wurde das Gesamtüberleben der Subgruppe der apikal gefärbten Tumore mit negativen Färbungen verglichen. Auch hier zeigte sich kein Unterschied, der auf einen Überlebensvorteil einer der Gruppen schließen lassen könnte ($p=0,30$).

Um den Einfluss zytoplasmatischer CD133 Expression näher zu eruieren, wurde diese mit der Gruppe von Karzinomen ohne CD133 Expression verglichen. Hinsichtlich der Kaplan-Meier-Überlebenskurve ließ sich eine gewisse Tendenz für einen Überlebensvorteil von Patienten mit Tumoren ohne CD133 Expression im Vergleich

zu Tumoren mit zytoplasmatischer CD133 Expression erkennen, jedoch ergab der Log-Rank-Test keinen statistischen Zusammenhang ($p=0,12$).

5 Diskussion

Grundlage dieser wissenschaftlichen Arbeit stellte die Erhebung und statistische Auswertung klinischer und pathologischer Parameter von Patienten mit einem operablen Magenkarzinom oder Karzinom des gastroösophagealen Übergangs verschiedener Krankheitsstadien dar. Des Weiteren erfolgte im Rahmen dieser Studie die immunhistochemische Färbung und Auswertung der Expression des Stammzellmarkers CD133 im Tumorgewebe der zuvor genannten Patienten.

Ziel dieser Arbeit war die retrospektive Identifikation von Risiko- und Prognosefaktoren, die Evaluation des Einflusses verschiedener therapeutischer Strategien sowie die Beleuchtung der Rolle des Stammzellmarkers CD133 in der Karzinogenese und im Krankheitsverlauf des Magenkarzinoms und Karzinoms des gastroösophagealen Übergangs. Im Folgenden sollen die erhobenen Daten kritisch diskutiert sowie mit der aktuellen Studienlage verglichen werden.

5.1 Bewertung des Gesamtkollektivs

5.1.1 Geschlechter- und Altersverteilung

Das im Rahmen dieser Studie untersuchte Gesamtkollektiv setzte sich aus 173 Patienten zusammen. Hierunter zeigte sich eine Geschlechterverteilung von 120 (69,4%) männlichen und 53 (30,6%) weiblichen Patienten, was einem Verhältnis von 2,26:1 entspricht. Gleiches ließ sich in der weltweit erhobenen Statistik zum Auftreten von Krebserkrankungen erkennen, in der Torre et al. ein Überwiegen des männlichen Geschlechts unter den Magenkrebspatienten in weiten Teilen der Welt fanden (8). Auch in Deutschland lässt sich ein höherer Anteil männlicher Magenkarzinompatienten nachweisen. Im Jahr 2016 erkrankten nach Daten des deutschen Krebsregisters 9300 Männer an Magenkrebs, während 5840 Frauen neu diagnostiziert wurden, was einer Verteilung von circa 1,6:1 entspricht. Diese spiegelt sich auch in Hinblick auf die Prävalenz wider (9).

Somit zeigte sich in dem hier vorliegenden Kollektiv zwar ein noch höherer Anteil männlicher Patienten, jedoch wurde eine ähnliche Geschlechterverteilung auch in anderen Studien beobachtet. So fanden beispielsweise Kim et al. mit einem Verhältnis

von 1,98:1 fast doppelt so viele erkrankte Männer wie Frauen in ihrem im Rahmen einer Metaanalyse ausgewählten Kollektiv aus 4722 Patienten (102). Ein möglicher Erklärungsansatz dafür, dass mehr Männer als Frauen an Magenkrebs erkranken, könnte im Konsum von Genussmitteln und damit verbundenen geschlechterdifferenten Risikokonstellation liegen. So ist weithin bekannt, dass der Konsum von Alkohol und Zigaretten das Auftreten einer malignen Neoplasie des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs begünstigt. Laut Daten des Robert Koch Instituts rauchen in Deutschland 20,8% der Frauen und 27% der Männer. Somit sind deutlich mehr Männer dem Risikofaktor Zigarettenkonsum exponiert (103). Weitergehend untersuchten Li et al. in einer Metaanalyse den geschlechtsspezifischen Zusammenhang zwischen Rauchen und dem Magenkrebsrisiko und fanden heraus, dass männliche Raucher ein höheres Risiko haben, an einem Magenkarzinom zu erkranken als weibliche Raucher (104).

In Deutschland konsumieren 18% der Männer und 14% der Frauen riskante Mengen Alkohol. Dies entspricht bei Männern >20 g Reinalkohol/Tag, bei Frauen handelt es sich um >10 g Alkohol pro Tag. Daten der ESA zufolge nehmen Männer fast doppelt so viel Gramm Reinalkohol zu sich wie Frauen. Trotz sinkender 30-Tage-Prävalenz des Alkoholkonsums lässt sich dennoch feststellen, dass Männer dem Risikofaktor Alkoholkonsum und damit einem erhöhten Krebsrisiko stärker exponiert sind als Frauen (105). Zusammenfassend lässt sich hinsichtlich Genuss- und Suchtmittel ein unterschiedlicher Lebensstil zwischen Männern und Frauen erkennen, der möglicherweise seinen Beitrag zur häufigeren Krebsentstehung bei Männern leisten könnte.

Dass in diesem Kollektiv ein überdurchschnittlich hoher Anteil des männlichen Geschlechts vertreten ist, könnte sich auch auf Basis zufälliger Auswahlkriterien ereignet haben und hat keinen negativen Einfluss auf die folgenden Ausführungen.

Betrachtet man die Daten des deutschen Krebsregisters in Bezug auf das Magenkarzinom, so lässt sich der Median des Erkrankungsalters für Frauen mit 72 Jahren und für Männer mit 76 Jahren ermitteln (9). Das Alter zum Zeitpunkt der Operation des hier untersuchten Kollektivs, welches aufgrund des kurativen Therapieansatzes und daraus folgendem raschen Therapiebeginns nahezu mit dem Erkrankungsalter übereinstimmt, lag bei 63,21 Jahren und somit rund 10 Jahre unter der im deutschen Krebsregister eingeschlossenen gesamtdeutschen Bevölkerung.

Frauen waren mit durchschnittlich 60,3 Jahren sogar 12 Jahre früher betroffen, Männer mit 65,2 Jahren knapp 11 Jahre. Auch in anderen Studien zeigten die erhobenen Daten eine ähnliche Altersverteilung wie in diesem Kollektiv. So ergab die bereits zuvor benannte Metaanalyse von Kim et al., dass von den 4722 eingeschlossenen Patienten, die sich einer Gastrektomie unterzogen und auf geschlechterspezifische Unterschiede untersucht wurden, das mittlere Erkrankungsalter für Frauen bei 55 Jahren sowie für Männer bei 57,9 Jahren und somit sogar noch unterhalb des in dieser Arbeit untersuchten Kollektivs lag (102).

Ein möglicher Erklärungsansatz für das im Vergleich zum deutschen Krebsregister abweichende frühe Erkrankungsalter der hier untersuchten Population könnte in der Auswahl potenziell kurativ therapierbarer Patienten liegen. Wie in der Metaanalyse von Kim et al., erhielten alle Patienten in diesem Kollektiv eine operative Therapie, sodass rein palliative Therapiekonzepte hier keine Anwendung fanden und möglicherweise ältere, nicht mehr kurativ behandelbare Patienten in dieser Studie nicht berücksichtigt wurden. Zudem ist denkbar, dass jüngere Patienten häufiger den Weg in eine Universitätsklinik suchen, um dort bestmöglich und unter Berücksichtigung neuer Therapiekonzepte behandelt zu werden, insbesondere dann, wenn die Grenzen der kurativen Behandlungsmöglichkeiten umstritten sind.

Weiterhin könnte die zufällige Auswahl der Patienten die Altersverteilung verzerrt haben und somit für die Abweichung des Erkrankungsalters gesorgt haben.

Dennoch verdeutlichen die Daten, dass auch junge Patienten an Magenkrebs erkranken, in diesem Kollektiv war der jüngste Patient zum Zeitpunkt der Operation 31 Jahre alt. Kim et al. konnten zeigen, dass von einem frühen Erkrankungsalter vor allem Frauen betroffen sind und dass das weibliche Geschlecht mit einer schlechteren Prognose des fortgeschrittenen Magenkarzinoms einhergeht (102). Diesem Faktor gilt es zu begegnen und gegebenenfalls genetische Komponenten oder familiäre Häufungen zu identifizieren, um präventiv handeln zu können.

5.1.2 Tumorlokalisation, Laurén-Klassifikation und TNM-Status

Das hier untersuchte Kollektiv umfasste sowohl Patienten mit Adenokarzinomen im Bereich des Magens als auch im Bereich des gastroösophagealen Übergangs. So entsprachen 48% einem reinen Magenkarzinom, während man 52% der Karzinome dem gastroösophagealen Übergang zurechnen konnte, der sich nach Siewert in die

Subtypen AEG I-III unterteilen lässt. Der gastroösophageale Übergang stellt sich als komplexe Zone anfällig für schädigende Einflüsse des sauren Magenmilieus und daraus resultierenden entzündlichen Prozesse mit möglicher maligner Entartung dar. Insgesamt lässt sich ein Trend beobachten, der in der westlichen Welt einen Rückgang der Magenkarzinome, insbesondere von Antrum und Pylorus, aufzeigt (2, 9, 106). Gleichzeitig erwies sich die Inzidenz der Karzinome des gastroösophagealen Übergangs als steigend und spricht daher für eine Verschiebung der Lokalisation der malignen Neoplasien in proximale Magenabschnitte, bis in den distalen Ösophagus reichend (107). Ursächlich hierfür wird die Zunahme der Refluxerkrankung sowie eine weite Verbreitung von Übergewicht in der Bevölkerung der Industrienationen diskutiert (108). Auch in diesem Kollektiv spiegelte sich ein hoher Anteil an Patienten mit Refluxösophagitis und/oder Übergewicht wider. So lag bei 51,4% der Patienten ein BMI >25 vor, eine anamnestische oder pathologisch gesicherte Refluxösophagitis war bei 50,9% der Patienten zu eruieren.

Die unmittelbare anatomische Nähe führte, insbesondere vor der Klassifikation in AEG I-III Tumore, in der Literatur häufig zu Diskrepanzen bezüglich der klaren Abgrenzung und Einteilung zwischen Magenkarzinomen und Karzinomen des gastroösophagealen Übergangs (109). Dies hat Auswirkungen auf die Vergleichbarkeit von Studien, häufig erfolgt keine oder lediglich eine unscharfe Definition und lässt unter anderem die Frage offen, in welchem Maße die verschiedenen Tumorlokalisationen innerhalb des Studienkollektivs repräsentiert sind. In diesem Kollektiv fand durch den vergleichbaren Anteil von reinen Magenkarzinomen sowie Tumoren des gastroösophagealen Übergangs eine zufällige und homogene Verteilung auf die analysierten Subgruppen statt.

Nach Laurén lässt sich eine Klassifikation des Magenkarzinoms in den intestinalen, den diffusen sowie einen Mischtyp vornehmen (39). In einem von Chen et al. untersuchten Kollektiv aus 3017 Patienten, welche sich einer Gastrektomie unterzogen, war bei 46,3% ein intestinaler Tumortyp, bei 32,6% ein diffuser Tumortyp sowie bei 21,1% ein Mischtyp feststellbar (40). Klar zu erkennen ist der überwiegende Anteil des intestinalen Typs, welches sich auch in dem hier untersuchten Kollektiv widerspiegelte. So zeigte sich bei 35,8% der Patienten ein intestinaler Typ, ein diffuser Typ konnte bei 24,3% festgestellt werden und bei 5,8% der Patienten ließ sich ein Mischtyp nachweisen. Die Abweichung zu den Daten von Chen et al. könnte zum einen

durch die deutlich umfangreichere Kollektivgröße zustande kommen, zum anderen war bei gut einem Drittel (34,1%) des hier untersuchten Kollektivs keine Angabe zur Laurén-Klassifikation eruiert. Zudem fällt auf, dass in der Literatur häufig von der Klassifikation in 3 Typen abgesehen wird und die Einteilung lediglich in die ursprünglich von Laurén etablierten Tumortypen intestinal sowie diffus erfolgt, woraus sich eine eingeschränkte Vergleichbarkeit der Literaturquellen ergibt.

Mit der TNM-Klassifikation steht eine Beschreibung der Tumorausdehnung in mehreren Dimensionen zur Verfügung. Durch den lange asymptomatischen Verlauf des Magenkarzinoms und der Karzinome des gastroösophagealen Übergangs kommt es in vielen Fällen erst in fortgeschrittenen Tumorstadien zur Diagnosestellung (3). Bei circa 70% liegen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits Lymphknotenmetastasen vor (2). Auch in dem hier untersuchten Kollektiv ließ sich bei der Mehrheit der Patienten eine fortgeschrittene Tumorgöße erkennen. Das Verhältnis von kleineren Tumoren (bis T2) zu T3/T4 Tumoren betrug 1:1,17. Bezüglich der Lymphknotenmetastasierung wiesen 58,4% der Patienten eine solche auf. Dies erscheint im Vergleich zur Literatur als Überrepräsentation früherer Krankheitsstadien. Jedoch gilt es zu beachten, dass dieses Kollektiv Patienten einschloss, die sich einer chirurgischen Therapie unterzogen haben und somit überwiegend potenziell kurativen Therapieintentionen folgten. Dieser Selektionsbias kann ebenfalls als Erklärung für den geringen Anteil von Patienten mit einer primären Metastasierung (17,3%) herangezogen werden. Gründe für eine Magen(teil)resektion trotz bereits stattgefundener Metastasierung könnten beispielsweise die operative Wiederherstellung der Magenpassage, dringender Therapiewunsch oder operable und somit kurable Metastasen sein.

5.1.3 Einfluss chemotherapeutischer Therapiekonzepte

Die Therapie des Magenkarzinoms stellt sich als ein sich stetig weiterentwickelnder Prozess dar. So bieten multimodale Therapiekonzepte vielfältige Möglichkeiten der Behandlung, die basierend auf dem aktuellen Forschungsstand und passend zu Tumorstadium und anderen patientenindividuellen Faktoren, in Leitlinien empfohlen werden.

In dem hier untersuchten Kollektiv aus 173 Patienten, die sich einer Operation und damit einer potenziell kurativen Therapieoption unterzogen, erfolgte diese bei 93

Patienten ohne vorhergehende neoadjuvante Chemotherapie, bei 80 Patienten ging eine chemotherapeutische Behandlung der Operation voraus. Leitliniengerecht wird die perioperative Chemotherapie für Karzinome des Magens und des gastroösophagealen Übergangs im Stadium cT3 und cT4 empfohlen, für Tumore mit einer Infiltrationstiefe, die dem Stadium cT2 entspricht, wird laut der aktuellen Leitlinie eine „Kann“-Empfehlung ausgesprochen (3). In dem hier untersuchten Kollektiv konnte kein Zusammenhang zwischen der Tumorgröße und dem Erhalt einer neoadjuvanten Chemotherapie gezeigt werden ($p=1,00$). Sowohl Patienten mit kleineren Tumoren (T0/T1/T2), als auch Patienten mit lokal fortgeschrittenen Karzinomen (T3/T4) gingen nahezu gleich häufig mit dem Erhalten einer neoadjuvanten chemotherapeutischen Behandlung einher. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Patienten mit Tumoren, deren Tiefenausdehnung eine neoadjuvante Chemotherapie erfordert hätte, diese abgelehnt haben. Weiterhin stellt sich die Feststellung der exakten Tiefenausdehnung präoperativ oftmals als schwierig heraus, sodass es hierbei zu einer Fehleinschätzung des T-Status kommen kann. Des Weiteren zeigte sich in diesem Kollektiv ein Zusammenhang zwischen Alter und neoadjuvanter chemotherapeutischer Behandlung ($p=0,01$). Patientin ≤ 65 Jahren wurden vorwiegend neoadjuvant behandelt, während bei älteren Patienten eher auf die zytostatische Therapie vor der Operation verzichtet wurde. Dies könnte auf mit steigendem Lebensalter zunehmend auftretenden Komorbiditäten und damit einhergehender abnehmender Therapiefähigkeit zurückzuführen sein. Von den 80 Patienten, die im hier untersuchten Kollektiv eine neoadjuvante Chemotherapie erhielten, wurden 29 (36,3%) mit FLOT behandelt und folgten damit den aktuell gültigen Leitlinienempfehlungen (3). Diese basieren auf der FLOT 4 Studie, welche die Anwendung von FLOT mit dem ECF/ECX-Schema verglich und einen weiteren Vorteil für FLOT hinsichtlich Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben herausarbeiten konnte (59). 40 Patienten (50%) wurden neoadjuvant mit PLF/ECX/ECF und somit Cisplatin-beinhaltend therapiert, was dem vor FLOT vorherrschendem, der MAGIC-Studie folgendem, Therapiestandard entsprach (4). In diesem Kollektiv wurden Patienten eingeschlossen, die im Zeitraum von September 2003 bis April 2015 behandelt wurden. Dementsprechend erklärt sich die Aufteilung auf die verschiedenen Therapieregime mit jeweils der entsprechenden Leitlinienempfehlung angepassten Therapieauswahl.

Bei 57 Patienten (71,2%), die in diesem Kollektiv neoadjuvant therapiert wurden, wurde die Chemotherapie im Rahmen des perioperativen Therapiekonzepts auch

postoperativ fortgesetzt. So zeigte sich, dass in knapp 30% der Fälle auf die adjuvanten Behandlungen verzichtet werden musste. Dies steht im Einklang mit der MAGIC Studie, im Rahmen derer nur etwa 50% der Patienten postoperativ eine Chemotherapie erhielten. Gründe für das Abweichen vom Therapieprotokoll stellten unter anderem postoperative Komplikationen sowie der Patientenwunsch dar (4). Im hier vorliegenden Kollektiv könnte auch ein weiterer Grund in der schwierigen Nachvollziehbarkeit adjuvanter Therapiegaben liegen. Viele Patienten entscheiden sich für erfahrene Operateure und Universitätskliniken als Ort der chirurgischen Therapie, führen adjuvante Chemotherapien darauffolgend jedoch aus Gründen der Praktikabilität heimatnah bei niedergelassenen Onkologen durch. Weiterhin könnte eine Erklärung für das Ausbleiben der adjuvanten Chemotherapie ein unzureichendes Ansprechen auf die neoadjuvanten Therapiegaben oder Tod des Patienten sein.

Auch wenn sich durch das Abweichen vom Therapieprotokoll die abschließende Evaluation der prognostischen Bedeutung adjuvanter Therapiegaben als schwierig erweist, nimmt die perioperative Chemotherapie eine zentrale Rolle in der Behandlung des lokal fortgeschrittenen Magenkarzinoms ein (3). Rein adjuvante Therapiekonzepte haben mit Etablierung perioperativer Behandlungsstrategien an Bedeutung verloren. Es konnte gezeigt werden, dass die Durchführung einer perioperativen Chemotherapie der alleinigen postoperativen chemotherapeutischen Behandlung überlegen ist (57, 58). In diesem Kollektiv wurden 18 Patienten (19,4%) ohne vorhergehende neoadjuvante Therapie adjuvant chemotherapeutisch behandelt. Gründe hierfür könnten in der Ablehnung neoadjuvanter Behandlungen durch den Patienten, erst intraoperativ erkennbarer Tumorausdehnung oder chemotherapeutischer Behandlung nach Auftreten eines Progresses liegen. So zeigt sich, dass, folgend den Leitlinienempfehlungen, es dennoch bei jedem Patienten eine individuelle Entscheidung bleibt, welche Behandlungsstrategie sich als die passendste erweist.

5.1.4 Überlebenszeitanalyse und Prognose

Insgesamt ließ sich im untersuchten Kollektiv aus 173 Patienten, welche an einem Magenkarzinom oder Karzinom des gastroösophagealen Übergangs erkrankt sind, ein medianes Gesamtüberleben von 46 Monaten beobachten. Dies scheint als Erkrankung, welche mit einer schlechten Prognose einhergeht, von in der Literatur häufig deutlich kürz angegebenen Überlebenszeiten abzuweichen. So schätzten

beispielsweise Digkha et al. das mediane Gesamtüberleben auf 10-12 Monate (110). Zu bedenken gilt jedoch, dass in der Literatur häufig Kollektive mit Patienten untersucht werden, deren Tumorstadium sich bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose als fortgeschritten erweist und welches oftmals bereits die Grenzen der Kurabilität überschritten hat. So gaben Power et al. die mittlere Überlebenszeit des metastasierten Magenkarzinoms mit 8-10 Monaten an (5). In dem hier untersuchten Kollektiv wurden Patienten ausgewählt, die sich einer chirurgischen Therapie unterzogen und damit einer potenziell kurativen Therapieintention folgten. Durch den damit im Verhältnis vermeintlich unterrepräsentierten Anteil primär metastasierter oder inoperabler Patienten ergibt sich eine Erklärung für das von Literaturangaben abweichende lange Gesamtüberleben. Der Einfluss, den Resektabilität auf das Gesamtüberleben nimmt, wird weiterhin in der AIO-FLOT 3 Studie verdeutlicht, die herausarbeitete, dass Patienten mit limitierter metastasierter Magenkreberkrankung oder Kreberkrankung des gastroösophagealen Übergangs, welche nach neoadjuvanter Chemotherapie einer chirurgischen Therapie zugeführt werden konnten, dadurch ein verbessertes Gesamtüberleben erreichen konnten. So zeigte sich bei Patienten, welche keine Fernmetastasierung aufwiesen, die mediane Überlebenszeit als nicht bestimmbar, da zum Zeitpunkt des Beobachtungsendes bei 50% der Kohorte der Endpunkt Tod nicht erreicht wurde. Patienten, welche eine limitierte Metastasierung zeigten, hatten eine mediane Überlebenszeit von 22,9 Monaten. Jedoch erreichten Patienten, die innerhalb dieser Gruppe einer chirurgischen Therapie zugeführt werden konnten, eine mediane Überlebenszeit von 31,3 Monaten, während jene Patienten, bei denen dies nicht möglich war, im Median 15,9 Monate überlebten. Bei Patienten, welche an einer ausgedehnten Metastasierung litten, reduzierte sich die mediane Überlebenszeit auf 10,7 Monate (111).

Hinsichtlich des *Geschlechts* zeigten in diesem Kollektiv Frauen eine statistisch nachweisbare längere Überlebenszeit als Männer ($p=0,03$). Dies steht in Einklang mit Daten des deutschen Krebsregisters, die Frauen mit 34% eine leicht höhere relative 5-Jahres-Überlebensrate als Männern mit 32% zuspricht (9). Die Studienlage hingegen bietet keinen eindeutigen Nachweis des Einflusses des Geschlechts auf die Überlebenszeit (112, 113). Es gilt jedoch zu beachten, dass in diesem Kollektiv das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Operation der Frauen rund 5 Jahre unter dem mittleren Alter der Männer lag. Dies bietet durch mit zunehmendem Alter einhergehenden

Komorbiditäten und dadurch entstehenden Risikofaktoren, auch in Hinblick auf die Operationsfähigkeit, einen weiteren Erklärungsansatz für hier vorliegende geschlechterdifferierende Überlebenszeiten.

Bezüglich des *Tumorstadiums* war in diesem Kollektiv ein statistisch relevanter Einfluss von Tumorgroße ($p=0,00$), Nodalstatus ($p=0,01$) sowie Fernmetastasierung ($p=0,00$) auf die Überlebenszeit erkennbar und bestätigt den in der Literatur vielfach beschriebenen Effekt, dass ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit einer schlechteren Prognose einhergeht (2, 3, 112, 113).

Auch die *Lokalisation des Primärtumors* konnte in diesem Kollektiv als Prognosefaktor identifiziert werden. So zeigte sich, dass Karzinome des gastroösophagealen Übergangs mit einer deutlich kürzeren Überlebenszeit einhergingen ($p=0,01$). Dieser Einfluss der Lokalisation des Primarius auf das Gesamtüberleben wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnten einige Autoren keinen prognostischen Einfluss der Lokalisation des Primärtumors finden (114, 115), während andere Studien diesen postulierten (116–119). Es gilt jedoch zu beachten, dass die bereits zuvor beschriebenen Diskrepanzen bezüglich der klaren Abgrenzung und Einteilung zwischen Magenkarzinomen und Karzinomen des gastroösophagealen Übergangs auch hier ihre Anwendung finden. Häufig erfolgt lediglich eine Unterteilung in proximale und distale Anteile des Magens. Eine scharfe Definition und Klassifikation der Tumorlokalisierung stellt jedoch ein wichtiges Grundelement der Subgruppenanalyse dar, deren Umsetzung in zukünftig durchgeführten Studien angestrebt werden sollte. Bezüglich des *Gradings* zeigte sich im untersuchten Kollektiv kein statistisch nachweisbarer Einfluss des Differenzierungsgrades auf die Überlebenszeit ($p=0,08$). Dennoch ließ sich ein Trend erkennen, der aufzeigt, dass Patienten mit gut (G1) oder mäßig (G2) differenzierten Tumoren im Median 38 Monate länger überlebten als Patienten mit schlecht (G3) differenzierten Tumoren (83 vs. 45 Monate). Dieser Trend steht im Einklang mit der von Liu et al. durchgeführten Metaanalyse, die den Einfluss histopathologischer Faktoren auf die Prognose untersuchte. Eingeschlossen wurden 21 Studien mit insgesamt 11.073 Magenkarzinompatienten mit dem Ergebnis, dass Patienten, deren Karzinome einen schlechten Differenzierungsgrad zeigen, eine signifikant kürzere 5-Jahres-Überlebensrate aufweisen (120).

Im Rahmen dieser Metaanalyse wurde ebenfalls der Einfluss des nach *Laurén* klassifizierten Tumortyps untersucht. So wurde für Patienten mit einem diffusen Tumortyp eine signifikant erhöhte Sterberate beschrieben (120). Dies steht im

Gegensatz zum hier untersuchten Kollektiv, in welchem die Art der Tumordifferenzierung nach Laurén keinen Einfluss auf die Überlebenszeit zu nehmen schien ($p=0,88$).

In Bezug auf den Erhalt einer *neoadjuvanten Chemotherapie* konnte in diesem Kollektiv kein Einfluss der neoadjuvanten Chemotherapie auf das Gesamtüberleben gezeigt werden ($p=0,88$). Dies steht im Gegensatz zur MAGIC Studie, die einen Überlebensvorteil der perioperativen Therapie im Vergleich zur alleinigen Operation erwies (4). Es gilt zu beachten, dass in diesem Kollektiv keine getrennte Analyse von rein neoadjuvanter oder vollständiger perioperativer Chemotherapie erfolgte. Aber auch in der MAGIC Studie konnte bei 50% der Patienten die adjuvante Therapie nicht fortgesetzt werden, sodass auch hier der tatsächliche Stellenwert der adjuvanten Therapien mit Unklarheiten behaftet blieb (4). Yang et al. hingegen postulierten in ihrer Metaanalyse, dass die neoadjuvante Chemotherapie keinen Vorteil gegenüber einer alleinigen Operation bringt, sondern erst in Kombination mit adjuvanten Therapien eine Verbesserung der Prognose erreicht wird (57).

Zur weitergehenden Analyse wurde das hier untersuchte Kollektiv in Abhängigkeit des Erhaltens einer neoadjuvanten Chemotherapie in zwei Gruppen aufgeteilt und das Gesamtüberleben nach Tumoreigenschaften untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Patienten mit kleinen Tumoren (T0/T1/T2) sowohl mit ($p=0,00$), als auch ohne ($p=0,00$) neoadjuvanter Behandlung, länger überlebten als Patienten mit fortgeschrittener Tumorgöße (T3/T4). Bezüglich der lokoregionären Lymphknotenmetastasierung sowie der Fernmetastasierung ließen sich hierbei Unterschiede erkennen. In der Gruppe der nicht neoadjuvant therapierten Patienten überlebten Patienten ohne oder mit geringgradiger Lymphknotenmetastasierung (N0/N1) bzw. ohne Fernmetastasierung (M0) länger als mit fortgeschrittenem Lymphknotenbefall (N2/N3) bzw. mit Fernmetastasierung (M1) (je $p=0,00$), was in der Gruppe der neoadjuvant therapierten Patienten nicht der Fall war ($p=0,19$ für Lymphknotenmetastasierung, $p=0,09$ für Fernmetastasierung). Daraus scheint sich ein Hinweis zu ergeben, dass in diesem Kollektiv das Gesamtüberleben von Patienten, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben, nicht von dem Grad der Lymphknotenmetastasierung oder Fernmetastasierung abzuhängen scheint. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür könnten eine schlechte Therapieverträglichkeit mit Verschlechterung des Allgemeinzustands sein, die das Gesamtüberleben sowohl der Patienten ohne oder mit geringgradiger Lymphknotenmetastasierung bzw. ohne Fernmetastasierung als

auch mit fortgeschrittener lokoregionärer Lymphknotenmetastasierung bzw. Fernmetastasierung beeinflusst. Es gilt jedoch zu beachten, dass aufgrund der Kollektivauswahl alle Patienten eine operative Therapie mit einhergehendem potenziell kurativem Therapieansatz erhalten haben, sodass sich Fallzahlen mit fortgeschrittener Metastasierung in einem Bereich befinden, der eine kritische Hinterfragung dieses Trends erforderlich macht.

5.2 Diskussion der Ergebnisse des Stammzellmarkers CD133

Tumorstammzellen rücken zunehmend in den Fokus zahlreicher Forschungsarbeiten. Auch in Hinblick auf Möglichkeiten der gezielten Tumorthherapie gilt es molekulare Strukturen zu identifizieren, deren Rolle in Tumorentstehung und -wachstum zu evaluieren und gegebenenfalls als Angriffspunkt moderner Therapiemöglichkeiten zu nutzen. Auch der Vorhersagewert als Prognosefaktor könnte an klinischer Relevanz gewinnen und ein wichtiger Bestandteil moderner Diagnostik und Therapie werden. Einer der am häufigsten verwendeten Marker zur Identifikation von Tumorstammzellen stellt das Oberflächenprotein CD133 dar, auf dessen Färbeergebnisse in dieser Arbeit eingegangen und dessen Bedeutung im Folgenden diskutiert werden soll.

In dem hier untersuchten Kollektiv aus 173 Patienten lag bei 162 Patienten eine CD133 Färbung des Tumorgewebes vor. 129 Fälle (74,6%) zeigten eine positive Färbung auf CD133 mit einem Anteil gefärbter Tumorzellen $\geq 5\%$. Die Häufigkeitsverteilung von Färbeergebnissen hinsichtlich CD133 in Magenkarzinomen präsentiert sich in der aktuellen Studienlage heterogen. So fanden Hashimoto et al. bei 67,7% der Patienten eine positive Färbung auf CD133 im Tumorgewebe, jedoch wurde eine Positivität, wie in der hier vorliegenden Arbeit, erst bei einem Anteil von 5% definiert, sodass diese bei 29,6% vorlag (100). Wie auch in dieser Arbeit, erfolgte die Detektion des Oberflächenproteins CD133 anhand des Epitops AC133 in Gastrektomiepräparaten der Tumorpatienten, verwendet wurde jedoch ein Antikörper, welcher der Maus entstammt, während in der hier vorliegenden Arbeit der Antikörper aus Kaninchenserum gewonnen wurde. Auch Wakamatsu et al. verwendeten einen der Maus entstammenden Primärantikörper, welcher auf das Epitop AC133 chirurgischer Exzidate ansprach und konnten so bei 9% der untersuchten Proben den Stammzellmarker nachweisen. Es gilt jedoch zu beachten, dass eine Positivität, im Vergleich zu der hier vorliegenden Studie erst bei 10% definiert wurde (97). Wang et

al. verwendeten ebenfalls das zuvor genannte Epitop in Resektaten mit einem der Maus entstammenden Antikörper und etablierten ein Scoringssystem, welches auf der Multiplikation der Färbungsintensität mit dem Anteil der gefärbten Tumorzellen im Präparat basierte. Hierbei wurde mittels einer ROC-Kurve ein Cutoff-Wert ermittelt, welcher eine vorliegende Positivität definierte, die bei 44% der Fall eintrat (98). Es gilt zu beachten, dass diese abweichende Auswertungsmethodik Auswirkungen in Bezug auf die Vergleichbarkeit der Studien mit sich bringt. Ishigami et al. nutzten ebenfalls das Epitop AC133 zur Detektion von CD133 mittels eines Antikörpers aus der Maus und fanden bei 28% der Fälle eine Expression von CD133 im Tumorgewebe. Definiert wurde Positivität hier somit nicht anhand eines Cutoff-Wertes, sondern lediglich durch das Vorhandensein mindestens einer gefärbten Tumorzelle in Gastrektomiepräparaten mit kurativer Therapieintention (99).

Im Vergleich zur aktuellen Studienlage liegt der Anteil der positiven immunhistochemischen Färbungen auf CD133 in diesem Kollektiv zwar hoch, jedoch lässt sich auch in der Literatur eine weite Spanne des prozentualen Färbeanteils erkennen. Zudem erfolgte eine ungleiche Definition, welcher Anteil an Tumorzellen angefärbt sein muss, um als positiv zu gelten. Des Weiteren wurde zwar in allen zuvor genannten Studien ebenfalls das Epitop AC 133 sowie die indirekte Methode zur immunhistochemischen Färbung an chirurgischen Resektaten verwendet, jedoch wurde ein der Maus entstammender Antikörper gewählt, während in der hier vorliegenden Arbeit ein Antikörper, welcher aus Kaninchenserum extrahiert wurde, zum Einsatz kam und somit ein abweichendes Färbemuster denkbar wäre. Zudem macht die Vielzahl durch mRNA produzierter unterschiedlicher Proteine und somit Epitope eine lückenlose Detektion durch Antikörper und damit einhergehend eine vollständige Vergleichbarkeit nahezu unmöglich. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz, warum die Studienergebnisse tendenziell eher geringere Färbeanteile beinhalten, könnte darin liegen, dass die aufgeführten Studien dem asiatischen Raum entstammen und regionale Unterschiede die ätiologische Ausprägung beeinflussen und somit zu unterschiedlichen Tumorcharakteristika führen könnten. In dem hier untersuchten Kollektiv erfolgte weiterhin eine tiefere Charakterisierung der positiven Färbungen. So wurde die Lokalisation der Färbung näher betrachtet und die Gruppen apikal, zytoplasmatisch sowie apikal und zytoplasmatisch im Sinne eines Mischtyps etabliert. In der hier vorliegenden Studie zeigte sich bei 65,9% eine apikale Färbung, eine zytoplasmatische Färbung kam bei

5,2% zum Vorschein, der Mischtyp ließ sich bei 3,5% finden. Keine Färbung war in 19,1% der Fälle zu detektieren. Auch Hashimoto et al. etablierten eine nähergehende Analyse der Färbungslokalisationen. Sie fanden eine apikale Färbung in 17,4% der Fälle, zu einer zytoplasmatischen Lokalisation der CD133 Färbungen kam es bei 12,1% der untersuchten Tumorgewebeproben, eine Kategorie des Mischtyps wurde nicht eigens definiert, sondern es erfolgte eine Eingruppierung nach dem überwiegenden Lokalisationstyp (100). Diese Verteilung der Färbungslokalisation steht im Gegensatz zu dem in diesem Kollektiv deutlich vorherrschendem apikalen Lokalisationstyp. Zu beachten gilt auch hier, dass die Studienpopulation dem asiatischen Raum entstammte und damit regionale Unterschiede eine Rolle spielen könnten. Des Weiteren wurde für weitere Analysen auch in diesem Kollektiv aufgrund geringer Fallzahlen ein Zusammenschluss der Subgruppen zytoplasmatisch sowie apikal und zytoplasmatisch durchgeführt, sobald der Tumor eine zytoplasmatische Färbung oder Anteile dessen zeigte. Dementsprechend ergibt sich für die zytoplasmatische Färbung ein Anteil von 8,7%, was sich den Studienergebnissen von Hashimoto et al. tendenziell annähert. Auch Ishigami et al. beschreiben in ihrer Studie das Auftreten zytoplasmatischer Färbungsanteile von CD133, charakterisieren dies jedoch lediglich als vereinzelt (99). Wang et al. konnten ebenfalls CD133 im Zytoplasma finden und assoziierten dies mit einem diffusem Tumortyp, eine tiefergehende Beschreibung der Häufigkeitsverteilung erfolgte nicht (98). Wakamatsu et al. führen lediglich das apikale Auftreten von CD133 an, auch im diffusen Tumortyp zeige sich dieser in Bereichen mit partieller glandulärer Formation (97).

CD133 wird physiologisch mit Funktionen der Zellpolarität und zur Orientierung der Zelle im Gewebe in Verbindung gebracht (78, 121). Demnach stünde eine apikale Lokalisationsausprägung im Einklang mit Drüsenepithelien, welche sich ausreichend differenziert sowie hinsichtlich der Polarität orientiert präsentieren (122). Indem sich CD133, wie hier gezeigt, an unterschiedlichen Lokalisationen der Zelle manifestieren kann, sind zum einen unterschiedliche zelluläre Funktionen denkbar, zum anderen könnte eine zytoplasmatische Ausprägung durch eine Entdifferenzierung des Gewebes im Rahmen der Karzinogenese begründet sein. Weiterhin unterliegt das Epitop AC133 verschiedenen Glykosylierungsstatus, während sich die Bindungsmöglichkeit häufig verwendeter monoklonaler Antikörper auf die glykosylierte Variante beschränkt (123). Folglich stellt sich die Frage des Einflusses intrazellulärer

Glykosylierungsvorgänge auf die Detektierbarkeit durch Antikörper und damit einhergehender Maskierung und Verzerrung des Ausprägungstyps von CD133.

Hinsichtlich einer möglichen Korrelation der Färbung mit klinisch-pathologischen Patientenparametern, wurde zur weiteren Analyse ein Vergleich fehlende gegen apikale Färbungen sowie fehlende gegen zytoplasmatische Färbungen durchgeführt. Die Subgruppenanalyse apikale gegen fehlende Färbungen zeigte, dass die Variablen Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung, Lokalisation des Primärtumors, Laurénklassifikation, Siegelringkarzinom sowie Grading unabhängig von der CD133 Expression waren. Auch beim Vergleich fehlende gegen zytoplasmatische Färbungen ließ sich für die Charakteristika Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung sowie Lokalisation des Primärtumors keine Abhängigkeit zur Expression von CD133 erkennen. Dies steht im Gegensatz zur Studie von Hashimoto et al., welche die zytoplasmatische Ausprägung von CD133 mit einer Lymphknotenmetastasierung, peritonealer Dissemination sowie einem fortgeschrittenem Tumorstadium einhergehend vorfanden (100). Auch eine Metaanalyse aus 8 Studien von Yiming et al. eruierte eine Assoziation zwischen fortgeschrittenen Tumorstadien, lymphogener Metastasierung sowie Fernmetastasierung mit einer CD133 Expression (96). Eine nähergehende Exploration der Färbungslokalisierung des Gesamtkollektivs erfolgte hingegen nicht, was Einfluss auf die Analogie zu dem hier untersuchten Kollektiv nehmen könnte. Zudem beinhaltete dieses, verglichen mit der Metaanalyse aus 603 Magenkarzinompatienten, einen deutlich geringeren Patientenumfang, welcher aus einem einzigen Krankenhaus rekrutiert wurde. Demnach sind weitere Korrelationen zwischen klinischen und prognostischen Parametern und der CD133 Expression durchaus möglich.

Beim Vergleich fehlende gegen zytoplasmatische Färbungen stellte sich jedoch ein Zusammenhang hinsichtlich Laurénklassifikation ($p=0,01$), Siegelringkarzinom ($p=0,01$), und Grading ($p=0,03$) heraus. Daraus ließ sich schließen, dass eine zytoplasmatische, verglichen mit einer fehlenden Färbung, häufiger mit einem diffusen Tumortyp nach Laurén, mit der Ausbildung von Siegelringzellen, sowie einer geringgradigen Tumordifferenzierung einherging. Letzteres steht im Einklang mit Studienergebnissen von Hashimoto et al., die ebenfalls undifferenziertes Tumorgewebe mit einer zytoplasmatischen Färbung assoziiert vorfanden (100). Bezüglich der Klassifikation nach Laurén, beschrieben Wang et al., wie in diesem Kollektiv, die zytoplasmatische Färbungslokalisierung mit einem diffusen Tumortyp

einhergehend. Ein diffuser Tumortyp nach Laurén, Siegelringzellen sowie ein Grading, welches dem Stadium G3 entspricht, sind Merkmale eines Tumors, die sich von der physiologischen, drüsenhaltigen Morphologie des Magens entfernt haben. Auch hinsichtlich der Ausprägung von CD133 scheint ein Zusammenhang mit einer Dedifferenzierung des Tumors denkbar. Es stellt sich nun die Frage, ob und inwiefern CD133, in seiner Funktion als Stammzellmarker, Einfluss auf die Tumordifferenzierung nimmt. Diese Fragestellung war auch Gegenstand der Studie von Jiang et al., welche das Auftreten von Krebsstammzellen sowohl in humanen Adenokarzinomen des Magens als auch in xenotransplantierten Krebszelllinien und daraus etablierten Tumoren des Magens in Mäusen untersuchten. Dabei fanden sie heraus, dass CD133 mit zunehmendem Malignitätsgrad vermehrt zu detektieren war, ebenso gingen geringer differenzierte Tumore mit einer höheren CD133 Expression einher, sowohl im humanen Tumorgewebe als auch im xenotransplantierten Äquivalent der Maus. Daraus schlossen sie, dass Tumore mit aggressivem Malignitätsverhalten mehr Tumorstammzellen enthalten, welche den Tumor in einem geringen Differenzierungsgrad verharren lassen und somit das biologische Verhalten beeinflussen (124).

In dem hier vorliegenden Kollektiv erfolgte weiterhin eine Analyse des Einflusses einer neoadjuvanten Chemotherapie auf die Ausprägung von CD133. Hierbei stellte sich heraus, dass beim Vergleich neoadjuvant vorbehandelter und therapie-naiver Patienten in deren Gastrektomiepräparaten kein Unterschied in der Verteilung der Färbungslokalisation zu finden war. Generell wird das Einwirken einer chemotherapeutischen Behandlung auf Tumorstammzellpopulationen kontrovers diskutiert. So untersuchten Li et al. das Verhalten von CD44 positiven und gleichzeitig CD24 negativen Mammakarzinomen vor und nach Erhalt einer neoadjuvanten Chemotherapie. Dabei stellte sich die Therapie bezüglich der Stammzellmarker als ineffektiv heraus, da keine Reduktion der Population erreicht werden konnte (125). Dies steht im Gegensatz zur Studie von Aulmann et al., welche die gleiche Konstellation der Stammzellmarker in Mammakarzinomen vor und nach neoadjuvanter Behandlung untersuchte. Aulmann et al. fanden heraus, dass sich die Anzahl der Tumorstammzellmarker nach neoadjuvanter Chemotherapie deutlich reduzierte (126). Zu beachten gilt hierbei, dass bei diesen Untersuchungen zum einen eine andere Tumorentität mit einhergehender abweichender Tumorbiologie und zum anderen andere Stammzellmarker verwendet wurden. Auch Abweichungen bezüglich der

chemotherapeutischen Therapiekonzepte könnten eine Rolle spielen. Hongo et al. untersuchten den Einfluss von 5-FU auf die Ausprägung von CD133 in Kolonkarzinomen *in vitro*. Hierbei stellten sie fest, dass CD133 positive Zellen sich nicht als resistenter gegen chemotherapeutische Einflüsse erwiesen als CD133 negative Zellen (127). Auch hier gilt es zu beachten, dass es sich, im Unterschied zur hier vorliegenden Studie, um eine *in vitro* Studie handelt sowie eine abweichende Tumorentität mit unterschiedlichem Behandlungskonzept untersucht wurde. Bezüglich des Magenkarzinom betrachteten auch Wang et al. den wechselseitigen Einfluss von CD133 und neoadjuvanter Therapien. So fanden sie zum einen heraus, dass nach einer neoadjuvanten Behandlung die Ausprägung von CD133 abzunehmen scheint, zum anderen stellten sie ein besseres Ansprechen des Tumors auf die neoadjuvante Chemotherapie bei vermehrter CD133 Expression fest (98). Aufgrund des geringen Umfangs des Subkollektivs von acht neoadjuvant behandelten Patienten in dieser Studie, gilt es jedoch diese Erkenntnisse kritisch zu hinterfragen. Im Unterschied zur hier vorliegenden Arbeit fand im Rahmen der zuvor genannten Studien ein Vergleich prä- und posttherapeutischer Tumorgewebeproben statt mit sich daraus ergebenden Möglichkeiten der Interpretation neoadjuvanter Therapiekonzepte. In der hier vorliegenden Studie erfolgte in der Gruppe der neoadjuvant therapierten Patienten lediglich die Evaluation der Gastrektomiepräparate nach Abschluss der neoadjuvanten Chemotherapie. Demnach ist hierbei kein direkter Vergleich möglich, dennoch umfasste die Gruppe der neoadjuvant behandelten Patienten einen deutlich größeren Umfang als bei Wang et al., sodass der Aussage, dass sich therapienaive und neoadjuvante Präparate bezüglich der Verteilung von CD133 nicht unterscheiden, trotzdem eine Bedeutung zukommen könnte.

5.2.1 CD133 als Prognosefaktor beim Magenkarzinom und Karzinom des gastroösophagealen Übergangs

In dem hier untersuchten Kollektiv wurde der Einfluss des Stammzellmarkers CD133 auf das Gesamtüberleben untersucht. Es zeigte sich, dass Patienten, unabhängig von ihrer Behandlungsstrategie, mit Tumoren ohne CD133 Expression im Median 83 Monate überlebten, während bei Patienten, deren Tumore CD133 apikal ausbildeten, die Überlebenszeit im Median 56 Monate betrug. Die kürzeste Überlebenszeit mit 37 Monaten zeigte sich bei Patienten, deren Tumore eine zytoplasmatische Expression

von CD133 aufwiesen. Jedoch ergab sich hierfür nach statistischer Analyse kein nachweisbarer Zusammenhang ($p=0,38$). Auch der Vergleich der Subgruppen fehlende gegen apikale Färbung sowie fehlende gegen zytoplasmatische Färbung blieb unterhalb des Signifikanzniveaus. Es ließ sich lediglich eine statistische Tendenz eines Überlebensvorteils von Patienten mit Tumoren ohne CD133 Expression gegenüber Patienten mit Karzinomen, welche CD133 zytoplasmatisch ausbildeten, erkennen. Dieser Trend steht im Einklang mit den Studienergebnissen von Hashimoto et al. (100). Diese eruierten ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben für Patienten mit zytoplasmatischer CD133 Expression. Auch hinsichtlich anderer Krebsentitäten wie dem hepatozellulären Karzinom erwies sich eine zytoplasmatische Expression von CD133 mit einer schlechteren Prognose einhergehend (128). Auch in dieser Studie erfolgte, wie in der hier vorliegenden, eine immunhistochemische Färbung auf CD133 in Tumoren von Patienten, welche sich einer primären Hepatektomie unterzogen. Somit ergibt sich mit dem kurativen Therapieansatz eine Analogie zu dem hier untersuchten Kollektiv der vorliegenden Studie. Yiming et al. postulierten in ihrer Metaanalyse, welche 603 Magenkarzinompatienten einschloss, ein deutlich schlechteres Gesamtüberleben von Patienten mit CD133 positiven Tumoren. Die Autoren fanden im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Überexpression von CD133 bei Patienten mit einem Magenkarzinom. Weiterhin fand sich eine Auswirkung der CD133 Überexpression auf eine Lymphknotenmetastasierung, Fernmetastasierung sowie das Tumorstadium nach TNM mit einhergehenden Auswirkungen auf die Prognose (96). Wie zuvor bereits dargestellt, kam es, im Vergleich zu der hier vorliegenden Studie, jedoch nicht zu einem Subgruppenvergleich nach Lokalisation der CD133 Expression.

Einen möglichen Erklärungsansatz bezüglich der schlechteren Prognose von Patienten mit Tumoren, welche CD133 exprimieren sahen Wang et al. in einer Hemmung der mTOR Signalübertragung mit daraus resultierender Hochregulation der CD133 Expression (98). Diesen zugrundeliegenden Mechanismus untersuchten Matsumoto et al. *in vitro*, indem sie den Hypoxie-induzierbaren-Faktor-1-alpha (HIF1 α) als ein dem mTOR Signalweg zugehöriges Molekül in ihre Forschungsanstrengungen integrierten. Dabei stellte sich heraus, dass HIF1 α die Expression von CD133 herunterreguliert, sodass bei einer Hemmung des mTOR Signalwegs vermindert vorhandenes HIF1 α eine Hochregulation von CD133 in Magenkarzinomen zur Folge hat (129). Die Rolle des Tumormikromilieus wird kontrovers diskutiert. Auch Soeda et

al. beleuchteten den Einfluss von Hypoxie sowie HIF1 α vermittelter Prozesse auf CD133. Sie kamen zu dem Schluss, dass Hypoxie zu einer HIF1 α vermittelten Selbsterneuerung sowie zur Proliferation von CD133 positiver Tumorstammzellen in Gliomen führt (85). Im Gegensatz zu Matsumoto et al, sehen Soeda et al. HIF1 α somit als Agonist protektiver Effekte auf die Expression von CD133 im Gliom.

Auch hinsichtlich anderer gastrointestinaler Tumore ließ sich ein prognostischer Einfluss der CD133 Expression auf das Gesamtüberleben nachweisen. So bewerteten Shimada et al. CD133 als einen prognostischen Marker des intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms, welcher sich vermehrt mit einer intrahepatischen Metastasierung assoziiert zeigte (130). Zu bemerken gilt, dass sich CD133 im Zytoplasma der Tumorzellen manifestierte. Dies steht im Gegensatz zum Magenkarzinom, bei dem, wie auch in der hier vorliegenden Studie, eine weite Verbreitung der apikalen Expression beschrieben wird. Zu beachten gilt jedoch, dass in der Literatur oftmals keine nähergehende Charakterisierung der Färbungslokalisation erfolgt und somit dahingehende Interpretationen, auch im Hinblick auf das Vorliegen einer anderen Tumorentität mit abweichender Morphologie, nur eingeschränkt möglich sind. Shimada et al. konnten in ihrer Studie keinen Zusammenhang zwischen dem Grad der Tumordifferenzierung und der CD133 Expression finden. Auch dies steht im Gegensatz zu der hier vorgestellten Studie und wirft die Frage auf, inwiefern eine zytoplasmatische Expression, welche sich unabhängig von Entdifferenzierungsvorgängen manifestiert, Rückschlüsse auf eine potenziell primäre Aggressivität des Tumors mit einhergehender schlechter Prognose zulässt. Denkbar wäre jedoch auch, dass sich zelluläre Funktionen von CD133, beispielsweise in Hinblick auf die Polarität, aufgrund abweichender Physiologie und Morphologie verschiedener Tumorentitäten unterscheiden.

Auch Huang et al. fanden in einer Metaanalyse aus 37 Studien bezüglich des Kolorektalen Karzinoms die Expression von CD133 mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert. Hinsichtlich klinischer Parameter konnte herausgearbeitet werden, dass CD133 mit einem fortgeschrittenen T-Stadium, einer Fernmetastasierung, sowie dem Befall des Lymph- und Gefäßsystems einhergeht und CD133 wird als wichtiger prognostischer und prädiktiver Marker charakterisiert (93, 94). Zu bemerken gilt hier, dass eine Subgruppenanalyse Unterschiede zwischen asiatischen und amerikanisch-europäischen Bevölkerungsgruppen aufdeckte. Während für die asiatische Subpopulation die klinisch- pathologischen Einflüsse von

CD133 mit der Analyse des Gesamtkollektivs übereinstimmten, ließ sich für die amerikanisch- europäische Subpopulation kein Einfluss von CD133 auf klinisch-pathologische Parameter aufzeigen. Dies macht deutlich, dass auch ethnische Unterschiede die Heterogenität bezüglich der Ausprägung und klinischen Bedeutsamkeit von CD133 begründen können. Dies könnte auch in dem hier untersuchten Kollektiv Anwendung finden, welches überwiegend europäischer Bevölkerungsgruppen entstammte.

Bezüglich des hepatozellulären Karzinoms zeigte sich eine schlechtere Ansprechrate und Chemoresistenz in CD133 positivem Gewebe. Song et al. führen dies auf eine durch oxidativen Stress vermehrte CD133 Expression zurück, welche die Resistenz der Tumorzellen gegen reaktive Sauerstoffspezies erhöht und somit zu gesteigerten Abwehrmechanismen gegen Zytostatika befähigt. Daher etablierten sie einen Therapieansatz mit Sulfasalazin, welches zur Neutralisierung reaktiver Sauerstoffspezies beitragen kann. *In vitro* sowie *in vivo* konnten Song et al. somit eine Verbesserung der Effektivität zytostatischer Therapien bei CD133 positiven hepatozellulären Karzinomen erreichen, während dies für CD133 negative Tumore nicht zutraf (95).

Neben Sulfasalazin existieren zahlreiche andere Forschungsanstrengen, um CD133 als Angriffspunkt möglicher Tumortherapien zu integrieren. Viele etablierte Behandlungsoptionen zeigen sich unwirksam gegen Krebsstammzellen, welche wiederum die Ausbildung medikamentenresistenter Tumorrezidive vorantreiben, sodass die Detektion neuer Therapiemöglichkeiten an Bedeutung gewinnt. Hierbei nimmt der Krebsstammzellmarker CD133 als mögliches Target eine zentrale Rolle ein. Skubitz et al. untersuchten ein anti-CD133 gerichtetes Toxin in Ovarialkarzinomen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach Transfer einer Zelllinie in die Maus. Dabei zeigte sich *in vitro* sowie *in vivo* ein reduziertes Tumorstadium mit einhergehender verminderter Tumorstadiumprogression (131). Auch bezüglich des Glioblastoms verwendeten Vora et al. CD133 als Zielstruktur in Kombination mit moderner Immunotherapie. Dabei etablierten sie drei Techniken und untersuchten die Wirkung in Patientenmodellen humaner Glioblastome sowie nach Xenotransplantation in die Maus. Zum einen wurde ein IgG Antikörper gegen CD133 verwendet, zum anderen kam ein bispezifischer T-Zell-Antikörper zum Einsatz, welcher mittels zweier Antikörperfragmente Krebs- und körpereigene Immunzellen in Kontakt bringt. Als dritten Forschungsansatz etablierten die Autoren eine CD133 spezifische chimäre Antigenrezeptor-T-Zelle, CART133, eine

Form von Immunotherapie, welche sich auf gentechnisch veränderten T-Zellen mit spezifischen antigenspezifischen Rezeptoren begründet. Alle drei Möglichkeiten CD133 als Target zu nutzen, zeigte *in vitro* eine Aktivität gegen CD133 positive Zellen humaner Glioblastome. CART133 zeigte des Weiteren eine Aktivität im Xenotransplantationsmodell der Maus ohne mit einhergehender systemische Toxizität (132). Andere immuntherapeutische Ansatzpunkte zur gezielten Antikörpertherapie stellen die Immuncheckpoints dar, welche durch Checkpointinhibitoren gehemmt werden können. So hat sich zur Behandlung des HER2-negativen fortgeschrittenen oder metastasierten Magenkarzinoms 2021 mit Nivolumab der erste PD-1-Inhibitor in Kombination mit einer fluorpyrimidin- und platinbasierten Chemotherapie als adjuvante Erstlinientherapie für Patienten, deren Tumore PD-L1 exprimieren, etabliert (65, 66). In Anbetracht der Tatsache, dass auch Krebsstammzellen PD-L1, welches an PD-1 binden kann, umfangreich exprimieren können, scheint eine Wirksamkeit der PD-1-Inhibitoren wie Nivolumab auch auf Krebsstammzellen denkbar (133). Hieraus wird deutlich, dass die CD133 umfassende Immunotherapie, auch in Kombination zu bereits etablierten Behandlungsmöglichkeiten, Grundlage moderner Therapieoptionen der Zukunft sein könnte.

Neben prognostischen Aussagen und therapeutischen Möglichkeiten spielt auch die prädiktive Aussage von CD133 eine bedeutsame Rolle. So konnten Lin et al. anhand zirkulierender mRNA im Blut von Kolonkarzinompatienten Rückschlüsse auf das Rezidivrisiko des Tumors treffen und stellten bei erhöhten CD133 mRNA Spiegeln eine erhöhte Rezidivrate fest (134). Auch Mehra et al. untersuchten Blutproben auf CD133 mRNA und erfassten, dass sich diese bei einer metastasierenden Erkrankung als erhöht erwies und dass anhand der mRNA in peripheren Blutproben auch prognostische Aussagen etabliert werden können (135). In dem hier untersuchten Kollektiv erfolgte die Bewertung der Expression von CD133 anhand immunhistochemischer Färbungen der Resektate. Da keine Detektion des mRNA Spiegels von CD133 im peripheren Blut erfolgte, lassen sich diesbezüglich keine Rückschlüsse ziehen. Dennoch könnte die Berücksichtigung in zukünftigen Studien dazu beitragen, CD133 als prädiktiven Marker klinisch vermehrt einsetzbar zu machen.

Zusammenfassend suggeriert die aktuelle Studienlage die prädiktive sowie prognostische Bedeutsamkeit des Stammzellmarkers CD133. Auch in diesem Kollektiv

ließ sich eine Tendenz erkennen, die etwaige Einflüsse auf die Überlebenszeit abzeichnet, die jedoch keine statistische Nachweisgrenze erlangen konnte.

Ursächlich für abweichende Ergebnisse im Vergleich zur Literatur könnten diverse Faktoren eine Rolle spielen. Zunächst handelt es sich bei der hier vorliegenden Arbeit um eine retrospektive Datensammlung eines Patientenkollektivs, welches einem einzigen Zentrum mit entsprechend geringen Fallzahlen entstammt. Da es sich hierbei um eine Universitätsklinik mit entsprechender Expertise handelt, könnte dies zu einer unbeabsichtigten Selektion, besonders in Bezug auf Patienten mit Tumoren, deren Grenzen der kurativen Behandlungsmöglichkeiten umstritten sind, führen. Weiterhin erfolgte die Datensammlung nach keinem einheitlichem Dokumentationsprinzip, sodass sich zum Teil lückenhafte Angaben ergaben. Insbesondere führte eine häufig ambulant bei einem niedergelassenen Onkologen durchgeführte Chemotherapie zur mangelnden Nachvollziehbarkeit der Therapieverabreichung und der Ansprechrate. Das Patientenkollektiv entstammte überwiegend dem europäischen Raum, wodurch sich Unterschiede zu weit verbreiteten Studien asiatischer Bevölkerungsgruppen ergeben können, zudem würde bei einem größeren Studenumfang auch die Datensammlungen mehrerer Ethnien berücksichtigt. Bezüglich des Stammzellmarkers CD133 wurde, im Vergleich zur Literatur, in diesem Kollektiv eine nähergehende Beschreibung der Färbungslokalisierung mit einhergehenden Einflüssen auf Klinik und Prognose durchgeführt. Dies wirkte sich auf die Äquivalenz und Vergleichbarkeit zur bestehenden Studienliteratur aus. Weiterhin reduzierte sich durch diese Subgruppenbildung die Fallzahl, sodass die Analyse lediglich eine Abschätzung von Tendenzen erlaubt und ein Vorhersagewert kritisch hinterfragt werden muss. Auch wurde in vorhergehenden Studien häufig auf eine genauere Beschreibung der Einflüsse einer neoadjuvanten Chemotherapie auf die Ausprägung von CD133 verzichtet und ein Vergleich zu anderen Tumorentitäten barg die Schwierigkeit, dass diese therapeutische Möglichkeit sich nicht als Teil des Therapiekonzepts zahlreicher Tumorerkrankungen etablierte.

Abschließend gilt zu beachten, dass Tumorstammzellen durch eine Reihe von Markern detektiert werden können. In der hier vorliegenden Arbeit wurde CD133 als alleiniger Tumorstammzellmarker verwendet, sodass bei einer alleinigen Färbung auf CD133 Rückschlüsse auf das Vorliegen von Tumorstammzellen mit Vorsicht gewertet werden müssen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Magenkarzinom stellt mit 780.000 Todesfällen als zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache trotz rückläufiger Inzidenzen weiterhin ein globales Problem dar (1). Durch den langen asymptomatischen Verlauf wird die Diagnose häufig erst in fortgeschrittenen und teilweise nicht mehr kurativ zu behandelnden Stadien gestellt. Aufgrund der klinischen Relevanz gilt es Therapieoptionen zu optimieren und neue Therapieansätze zu etablieren. Dabei rücken Tumorstammzellen als Biomarker zunehmend in den Fokus der Forschungsanstrengungen, deren Rolle in Tumorentstehung und -wachstum wegweisend für neue Angriffspunkte moderner Therapiemöglichkeiten sein können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Kollektiv aus 173 Patienten, welche sich einer Operation eines Magenkarzinoms oder Karzinoms des gastroösophagealen Übergangs unterzogen, erstellt sowie auf klinische und prognostische Parameter untersucht. Die in der aktuellen Studienlage vielfach erörterten Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben wie Tumorgröße, Lymphknotenmetastasierung sowie Fernmetastasierung konnten auch in dieser Studie bestätigt werden. Insgesamt zeichnete sich in diesem Kollektiv ein mit 46 Monaten im Vergleich zur Literatur lang erscheinendes Gesamtüberleben ab, was durch die Auswahl von Patienten, welche sich einer potenziell kurativen chirurgischen Therapie unterzogen und damit einhergehende Unterrepräsentation primär metastasierter sowie inoperabler Patienten zu begründen ist. Somit findet sich der Einfluss, den Resektabilität auf das Gesamtüberleben nimmt, auch in dieser Studie bestätigt.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit Tumormaterial der Patienten auf die Expression des Tumorstammzellmarkers CD133 untersucht und drei Subgruppen der Färbungslokalisation etabliert. Diesbezüglich ergab sich beim Vergleich fehlende gegen zytoplasmatische Färbung ein Zusammenhang zwischen einem diffusen Tumortyp nach Laurén, der Ausprägung von Siegelringzellen sowie einer geringgradiger Tumordifferenzierung und der zytoplasmatischen Expression von CD133. Die Überlebenszeitanalyse zeigte eine Tendenz des prognostischen Vorteils von Patienten mit Tumoren ohne CD133 Expression gegenüber Patienten, deren Karzinome CD133 zytoplasmatisch exprimierten. Dies scheint im Einklang mit der aktuellen Studienlage zu stehen, die die Expression von CD133 mit einer kürzeren

Überlebenszeit assoziiert, in vielen Fällen jedoch auf eine Subgruppendifferenzierung nach Färbungslokalisation verzichtet. Um Studien in Zukunft vergleichbar zu machen und somit präzisere Aussagen über die CD133 Expression treffen zu können, wären standardisierte Rahmenbedingungen zur Färbung und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wünschenswert. Dieser Schritt könnte der Grundstein eines tiefergehenden Verständnisses von CD133 und seiner Rolle als potenzielles Target sein, das neue Wege in Hinblick auf Diagnostik, Therapie und Prognose des Magenkarzinoms eröffnet.

7 Literatur

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019; 144(8):1941–53. doi: 10.1002/ijc.31937.
2. Herold G. Innere Medizin: Unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und im Stichwortverzeichnis ; eine vorlesungsorientierte Darstellung. Köln: Gerd Herold; 2019.
3. Moehler M, Al-Batran S-E, Andus T, Arends J, Arnold D, Baretton G et al. S3-Leitlinie Magenkarzinom – Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und des ösophagogastralen Übergangs – Langversion 2.0 – August 2019. AWMF-Registernummer: 032/009OL. *Z Gastroenterol* 2019; 57(12):1517–632. doi: 10.1055/a-1018-2516.
4. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, van de Velde CJH, Nicolson M et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *New England Journal of Medicine* 2006; 355(1):11–20. doi: 10.1056/NEJMoa055531.
5. Power DG, Kelsen DP, Shah MA. Advanced gastric cancer--slow but steady progress. *Cancer Treatment Reviews* 2010; 36(5):384–92. doi: 10.1016/j.ctrv.2010.01.005.
6. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23(5):700–13. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-1057.
7. Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, Praud D, Ferlay J, Negri E et al. Recent patterns in gastric cancer: a global overview. *Int J Cancer* 2009; 125(3):666–73. doi: 10.1002/ijc.24290.
8. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2):87–108. doi: 10.3322/caac.21262.
9. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland | 2015/2016.
10. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61:1–241.
11. Correa P. Gastric cancer: overview. *Gastroenterol Clin North Am* 2013; 42(2):211–7. doi: 10.1016/j.gtc.2013.01.002.
12. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48(13):3554–60.
13. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52(24):6735–40.

14. Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R et al. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 1995; 63(1):94–8. doi: 10.1128/iai.63.1.94-98.1995.
15. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; 40(3):297–301. doi: 10.1136/gut.40.3.297.
16. Fuccio L, Zagari RM, Eusebi LH, Laterza L, Cennamo V, Ceroni L et al. Meta-analysis: can *Helicobacter pylori* eradication treatment reduce the risk for gastric cancer? *Ann Intern Med* 2009; 151(2):121–8. doi: 10.7326/0003-4819-151-2-200907210-00009.
17. Wong BC-Y, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE et al. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291(2):187–94. doi: 10.1001/jama.291.2.187.
18. Fischbach W, Malfertheiner P, Lynen Jansen P, Bolten W, Bornschein J, Buderus S et al. S2k-Leitlinie *Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit. *Z Gastroenterol* 2016; 54(4):327–63. doi: 10.1055/s-0042-102967.
19. Goddard AF, Badreldin R, Pritchard DM, Walker MM, Warren B. The management of gastric polyps. *Gut* 2010; 59(9):1270–6. doi: 10.1136/gut.2009.182089.
20. Kamal MU, Tariq H, Mehak V, Azam S, Kumar K, Niazi M et al. A Rare Etiology of Abnormally Large Gastric Folds: Menetrier's Disease. *Case Rep Gastrointest Med* 2019; 2019:7927083. doi: 10.1155/2019/7927083.
21. Viste A, Opheim P, Thunold J, Eide GE, Bjørnstad E, Skarstein A et al. RISK OF CARCINOMA FOLLOWING GASTRIC OPERATIONS FOR BENIGN DISEASE. *The Lancet* 1986; 328(8505):502–5. doi: 10.1016/S0140-6736(86)90368-5.
22. Song P, Wu L, Guan W. Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Nutrients* 2015; 7(12):9872–95. doi: 10.3390/nu7125505.
23. Turati F, Tramacere I, La Vecchia C, Negri E. A meta-analysis of body mass index and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2013; 24(3):609–17. doi: 10.1093/annonc/mds244.
24. Steffen A, Huerta J-M, Weiderpass E, Bueno-de-Mesquita HBA, May AM, Siersema PD et al. General and abdominal obesity and risk of esophageal and gastric adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2015; 137(3):646–57. doi: 10.1002/ijc.29432.
25. Ma K, Baloch Z, He T-T, Xia X. Alcohol Consumption and Gastric Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit* 2017; 23:238–46. doi: 10.12659/msm.899423.

26. Li Y, Eshak ES, Shirai K, Liu K, Dong JY, Iso H et al. Alcohol Consumption and Risk of Gastric Cancer: The Japan Collaborative Cohort Study. *J Epidemiol* 2021; 31(1):30–6. doi: 10.2188/jea.JE20190304.
27. Steevens J, Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Alcohol consumption, cigarette smoking and risk of subtypes of oesophageal and gastric cancer: a prospective cohort study. *Gut* 2010; 59(1):39–48. doi: 10.1136/gut.2009.191080.
28. Engel LS, Chow W-H, Vaughan TL, Gammon MD, Risch HA, Stanford JL et al. Population attributable risks of esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(18):1404–13. doi: 10.1093/jnci/djg047.
29. Yaghoobi M, McNabb-Baltar J, Bijarchi R, Hunt RH. What is the quantitative risk of gastric cancer in the first-degree relatives of patients? A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2017; 23(13):2435–42. doi: 10.3748/wjg.v23.i13.2435.
30. Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *The Lancet Oncology* 2015; 16(2):e60-e70. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25638682/>.
31. Oliveira C, Senz J, Kaurah P, Pinheiro H, Sanges R, Haegert A et al. Germline CDH1 deletions in hereditary diffuse gastric cancer families. *Hum Mol Genet* 2009; 18(9):1545–55. doi: 10.1093/hmg/ddp046.
32. Hansford S, Kaurah P, Li-Chang H, Woo M, Senz J, Pinheiro H et al. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA Oncol* 2015; 1(1):23–32. doi: 10.1001/jamaoncol.2014.168.
33. Grundmann RT, Hölscher AH, Bembenek A, Bollschweiler E, Drognitz O, Feuerbach S et al. Diagnostik und Therapie des Magenkarzinoms--Workflow. *Zentralbl Chir* 2009; 134(4):362–74. doi: 10.1055/s-0029-1224534.
34. Zhao Z, Yin Z, Wang S, Wang J, Bai B, Qiu Z et al. Meta-analysis: The diagnostic efficacy of chromoendoscopy for early gastric cancer and premalignant gastric lesions. *J Gastroenterol Hepatol* 2016; 31(9):1539–45. doi: 10.1111/jgh.13313.
35. Dietrich CF, Kratzer W, Strobe D, Danse E, Fessl R, Bunk A et al. Assessment of metastatic liver disease in patients with primary extrahepatic tumors by contrast-enhanced sonography versus CT and MRI. *World J Gastroenterol* 2006; 12(11):1699–705. doi: 10.3748/wjg.v12.i11.1699.
36. Oldenburg A, Albrecht T. Sonografische Leberdiagnostik bei Tumorpatienten ohne und mit Kontrastmittel. *Ultraschall Med* 2008; 29(5):488–98. doi: 10.1055/s-2008-1027195.
37. Mocellin S, Pasquali S. Diagnostic accuracy of endoscopic ultrasonography (EUS) for the preoperative locoregional staging of primary gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; (2):CD009944. doi: 10.1002/14651858.CD009944.pub2.

38. Puli S-R, Batapati Krishna Reddy J, Bechtold ML, Antillon MR, Ibdah JA. How good is endoscopic ultrasound for TNM staging of gastric cancers? A meta-analysis and systematic review. *World J Gastroenterol* 2008; 14(25):4011–9. doi: 10.3748/wjg.14.4011.
39. LAUREN P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64:31–49. doi: 10.1111/apm.1965.64.1.31.
40. Chen Y-C, Fang W-L, Wang R-F, Liu C-A, Yang M-H, Lo S-S et al. Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer. *Pathol Oncol Res* 2016; 22(1):197–202. doi: 10.1007/s12253-015-9996-6.
41. Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Miwa S et al. Pathobiological characteristics of intestinal and diffuse-type gastric carcinoma in Japan: an immunostaining study on the tissue microarray. *J Clin Pathol* 2007; 60(3):273–7. doi: 10.1136/jcp.2006.038778.
42. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology* 2020; 76(2):182–8. doi: 10.1111/his.13975.
43. Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, van Grieken NCT, Lordick F. Gastric cancer. *The Lancet* 2020; 396(10251):635–48. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31288-5.
44. Wittekind C. TNM-System 2010 : Zur 7. Auflage der TNM-Klassifikation maligner Tumoren. *Pathologie* 2010; 31(5):331–2. doi: 10.1007/s00292-010-1349-3.
45. Wittekind C. The development of the TNM classification of gastric cancer. *Pathol Int* 2015; 65(8):399–403. doi: 10.1111/pin.12306.
46. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C, Hrsg. TNM classification of malignant tumours. Eighth edition. Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2017.
47. Kardiakarzinom: Versuch einer therapeutisch relevanten Klassifikation; 1987.
48. Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* 1998; 85(11):1457–9. doi: 10.1046/j.1365-2168.1998.00940.x.
49. Gotoda T, Yanagisawa A, Sasako M, Ono H, Nakanishi Y, Shimoda T et al. Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers. *Gastric Cancer* 2000; 3(4):219–25. doi: 10.1007/pl00011720.
50. Watanabe K, Ogata S, Kawazoe S, Watanabe K, Koyama T, Kajiwara T et al. Clinical outcomes of EMR for gastric tumors: historical pilot evaluation between endoscopic submucosal dissection and conventional mucosal resection. *Gastrointest Endosc* 2006; 63(6):776–82. doi: 10.1016/j.gie.2005.08.049.

51. Chiu PWY, Teoh AYB, To KF, Wong SKH, Liu SYW, Lam CCH et al. Endoscopic submucosal dissection (ESD) compared with gastrectomy for treatment of early gastric neoplasia: a retrospective cohort study. *Surgical endoscopy* 2012; 26(12):3584–91. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22678176/>.
52. Ryu SJ, Kim B-W, Kim BG, Kim JH, Kim JS, Kim JI et al. Endoscopic submucosal dissection versus surgical resection for early gastric cancer: a retrospective multicenter study on immediate and long-term outcome over 5 years. *Surgical endoscopy* 2016; 30(12):5283–9. doi: 10.1007/s00464-016-4877-y.
53. Siewert JR, Böttcher K, Stein HJ, Roder JD. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg* 1998; 228(4):449–61. doi: 10.1097/00000658-199810000-00002.
54. Edwards P, Blackshaw GRJC, Lewis WG, Barry JD, Allison MC, Jones DRB. Prospective comparison of D1 vs modified D2 gastrectomy for carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 90(10):1888–92. doi: 10.1038/sj.bjc.6601790.
55. Lam S, Tan E, Menezes A, Martin D, Gallagher J, Storey D et al. A comparison of the operative outcomes of D1 and D2 gastrectomy performed at a single Western center with multiple surgeons: a retrospective analysis with propensity score matching. *World J Surg Oncol* 2018; 16(1):136. doi: 10.1186/s12957-018-1422-6.
56. Ychou M, Boige V, Pignon J-P, Conroy T, Bouché O, Lebreton G et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. *J Clin Oncol* 2011; 29(13):1715–21. doi: 10.1200/JCO.2010.33.0597.
57. Yang Y, Yin X, Sheng L, Xu S, Dong L, Liu L. Perioperative chemotherapy more of a benefit for overall survival than adjuvant chemotherapy for operable gastric cancer: an updated Meta-analysis. *Sci Rep* 2015; 5:12850. doi: 10.1038/srep12850.
58. Zhao J-H, Gao P, Song Y-X, Sun J-X, Chen X-W, Ma B et al. Which is better for gastric cancer patients, perioperative or adjuvant chemotherapy: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2016; 16:631. doi: 10.1186/s12885-016-2667-5.
59. Al-Batran S-E, 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. *The Lancet* 2019; 393(10184):1948–57. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32557-1.
60. Wagner AD, Syn NL, Moehler M, Grothe W, Yong WP, Tai B-C et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 8:CD004064. doi: 10.1002/14651858.CD004064.pub4.
61. Glimelius B, Ekström K, Hoffman K, Graf W, Sjödén PO, Haglund U et al. Randomized comparison between chemotherapy plus best supportive care with

- best supportive care in advanced gastric cancer. *Ann Oncol* 1997; 8(2):163–8. doi: 10.1023/a:1008243606668.
62. Wagner AD, Unverzagt S, Grothe W, Kleber G, Grothey A, Haerting J et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (3):CD004064. doi: 10.1002/14651858.CD004064.pub3.
63. van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C et al. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol* 2006; 24(31):4991–7. doi: 10.1200/JCO.2006.06.8429.
64. Bang Y-J, van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet* 2010; 376(9742):687–97. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X.
65. Kelly RJ, Ajani JA, Kuzdzal J, Zander T, van Cutsem E, Piessen G et al. Adjuvant Nivolumab in Resected Esophageal or Gastroesophageal Junction Cancer. *New England Journal of Medicine* 2021; 384(13):1191–203. doi: 10.1056/NEJMoa2032125.
66. Janjigian YY, Shitara K, Moehler M, Garrido M, Salman P, Shen L et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* 2021; 398(10294):27–40. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00797-2.
67. Dawood S, Austin L, Cristofanilli M. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park)* 2014; 28(12):1101-7, 1110.
68. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194(4260):23–8. doi: 10.1126/science.959840.
69. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414(6859):105–11. doi: 10.1038/35102167.
70. Roesch A, Vogt T. Minireview: Melanom-Stammzellen. *Akt Dermatol* 2011; 37(01/02):9–11. doi: 10.1055/s-0030-1256099.
71. Karsten U, Goletz S. What makes cancer stem cell markers different? *Springerplus* 2013; 2(1):301. doi: 10.1186/2193-1801-2-301.
72. Islam F, Qiao B, Smith RA, Gopalan V, Lam AK-Y. Cancer stem cell: fundamental experimental pathological concepts and updates. *Exp Mol Pathol* 2015; 98(2):184–91. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.02.002.
73. Aghajani M, Mansoori B, Mohammadi A, Asadzadeh Z, Baradaran B. New emerging roles of CD133 in cancer stem cell: Signaling pathway and miRNA regulation. *J Cell Physiol* 2019; 234(12):21642–61. doi: 10.1002/jcp.28824.

74. Li W, Ma H, Zhang J, Zhu L, Wang C, Yang Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci Rep* 2017; 7(1):13856. doi: 10.1038/s41598-017-14364-2.
75. Silva IA, Bai S, McLean K, Yang K, Griffith K, Thomas D et al. Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival. *Cancer Res* 2011; 71(11):3991–4001. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3175.
76. Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 2008; 214(1):3–9. doi: 10.1002/path.2283.
77. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90(12):5002–12.
78. Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(23):12425–30. doi: 10.1073/pnas.94.23.12425.
79. Kemper K, Sprick MR, Bree M de, Scopelliti A, Vermeulen L, Hoek M et al. The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res* 2010; 70(2):719–29. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1820.
80. Campos B, Zeng L, Daotrong PH, Eckstein V, Unterberg A, Mairbörl H et al. Expression and regulation of AC133 and CD133 in glioblastoma. *Glia* 2011; 59(12):1974–86. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21901757/>.
81. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(1):38–47. doi: 10.1038/nrc704.
82. Semenza GL. Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2010; 2(3):336–61. doi: 10.1002/wsbm.69.
83. Sun X, Lv X, Yan Y, Zhao Y, Ma R, He M et al. Hypoxia-mediated cancer stem cell resistance and targeted therapy. *Biomed Pharmacother* 2020; 130:110623. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110623.
84. Barnhart BC, Simon MC. Metastasis and stem cell pathways. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26(2):261–71. doi: 10.1007/s10555-007-9053-3.
85. Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene* 2009; 28(45):3949–59. doi: 10.1038/onc.2009.252.
86. Park EK, Lee JC, Park JW, Bang SY, Yi SA, Kim BK et al. Transcriptional repression of cancer stem cell marker CD133 by tumor suppressor p53. *Cell Death Dis* 2015; 6:e1964. doi: 10.1038/cddis.2015.313.

87. Zhang L, Li H, Ge C, Li M, Zhao F, Hou H et al. Inhibitory effects of transcription factor Ikaros on the expression of liver cancer stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2014; 5(21):10621–35. doi: 10.18632/oncotarget.2524.
88. Min K-J, So KA, Ouh Y-T, Hong J-H, Lee J-K. The effects of DNA methylation and epigenetic factors on the expression of CD133 in ovarian cancers. *J Ovarian Res* 2012; 5(1):28. doi: 10.1186/1757-2215-5-28.
89. Geddert H, Braun A, Kayser C, Dimmler A, Faller G, Agaimy A et al. Epigenetic Regulation of CD133 in Gastrointestinal Stromal Tumors. *American Journal of Clinical Pathology* 2017; 147(5):515–24. doi: 10.1093/ajcp/aqx028.
90. Lee HJ, You DD, Choi DW, Choi YS, Kim SJ, Won YS et al. Significance of CD133 as a cancer stem cell markers focusing on the tumorigenicity of pancreatic cancer cell lines. *J Korean Surg Soc* 2011; 81(4):263–70. doi: 10.4174/jkss.2011.81.4.263.
91. Kazama S, Kishikawa J, Kiyomatsu T, Kawai K, Nozawa H, Ishihara S et al. Expression of the stem cell marker CD133 is related to tumor development in colorectal carcinogenesis. *Asian Journal of Surgery* 2018; 41(3):274–8. doi: 10.1016/j.asjsur.2016.12.002.
92. Nagata H, Ishihara S, Kishikawa J, Sonoda H, Murono K, Emoto S et al. CD133 expression predicts post-operative recurrence in patients with colon cancer with peritoneal metastasis. *Int J Oncol* 2018; 52(3):721–32. doi: 10.3892/ijo.2018.4240.
93. CD133 expression correlates with clinicopathologic features and poor prognosis of colorectal cancer patients: An updated meta-analysis of 37 studies: Erratum. *Medicine* 2018; 97(32):e11956. doi: 10.1097/MD.0000000000011956.
94. Huang R, Mo D, Wu J, Ai H, Lu Y. CD133 expression correlates with clinicopathologic features and poor prognosis of colorectal cancer patients: An updated meta-analysis of 37 studies. *Medicine* 2018; 97(23):e10446. doi: 10.1097/MD.0000000000010446.
95. Song Y, Jang J, Shin T-H, Bae SM, Kim J, Kim KM et al. Sulfasalazine attenuates evading anticancer response of CD133-positive hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; 36(1):38. doi: 10.1186/s13046-017-0511-7.
96. Yiming L, Yunshan G, Bo M, Yu Z, Tao W, Gengfang L et al. CD133 overexpression correlates with clinicopathological features of gastric cancer patients and its impact on survival: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2015; 6(39):42019–27. doi: 10.18632/oncotarget.5714.
97. Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ, Naito Y, Uraoka N, Anami K et al. Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathol Int* 2012; 62(2):112–9. doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02760.x.

98. Wang T, Ong CW, Shi J, Srivastava S, Yan B, Cheng CL et al. Sequential expression of putative stem cell markers in gastric carcinogenesis. *Br J Cancer* 2011; 105(5):658–65. doi: 10.1038/bjc.2011.287.
99. ISHIGAMI S, UENO S, ARIGAMI T, UCHIKADO Y, SETOYAMA T, ARIMA H et al. Prognostic impact of CD133 expression in gastric carcinoma. *Anticancer Research* 2010; 30(6):2453–7. Verfügbar unter: <https://ar.iijournals.org/content/30/6/2453.short>.
100. Hashimoto K, Aoyagi K, Isobe T, Kouhiji K, Shirouzu K. Expression of CD133 in the cytoplasm is associated with cancer progression and poor prognosis in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2014; 17(1):97–106. doi: 10.1007/s10120-013-0255-9.
101. Immunhistochemie; 2014 [Stand: 21.06.2021].
102. Kim HW, Kim J-H, Lim BJ, Kim H, Kim H, Park JJ et al. Sex Disparity in Gastric Cancer: Female Sex is a Poor Prognostic Factor for Advanced Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* 2016; 23(13):4344–51. doi: 10.1245/s10434-016-5448-0.
103. Robert Koch-Institut. *Journal of Health Monitoring* | 2017/2 | Rauchen bei Erwachsenen.
104. Li W-Y, Han Y, Xu H-M, Wang Z-N, Xu Y-Y, Song Y-X et al. Smoking status and subsequent gastric cancer risk in men compared with women: a meta-analysis of prospective observational studies. *BMC Cancer* 2019; 19(1):377. doi: 10.1186/s12885-019-5601-9.
105. Kahnert S. *Alkoholatlas Deutschland* 2017.
106. Ferro A, Peleteiro B, Malvezzi M, Bosetti C, Bertuccio P, Levi F et al. Worldwide trends in gastric cancer mortality (1980-2011), with predictions to 2015, and incidence by subtype. *Eur J Cancer* 2014; 50(7):1330–44. doi: 10.1016/j.ejca.2014.01.029.
107. Bollschweiler E, Wolfgarten E, Gutschow C, Hlscher AH. Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males. *Cancer* 2001; 92(3):549–55. doi: 10.1002/1097-0142(20010801)92:3<549::AID-CNCR1354>3.0.CO;2-L.
108. Hosoda K, Yamashita K, Katada N, Watanabe M. Overview of multimodal therapy for adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2015; 63(10):549–56. doi: 10.1007/s11748-015-0575-2.
109. Siewert JR, Stein HJ, Feith M. Adenocarcinoma of the esophago-gastric junction. *Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society* 2006; 95(4):260–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17249275/>.

110. Digkila A, Wagner AD. Advanced gastric cancer: Current treatment landscape and future perspectives. *World J Gastroenterol* 2016; 22(8):2403–14. doi: 10.3748/wjg.v22.i8.2403.
111. Al-Batran S-E, Homann N, Pauligk C, Illerhaus G, Martens UM, Stoeilmacher J et al. Effect of Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Surgical Resection on Survival in Patients With Limited Metastatic Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer: The AIO-FLOT3 Trial. *JAMA Oncol* 2017; 3(9):1237–44. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0515.
112. W. Reiter, Petra Stieber, H.-J. Krämling, C. Reuter, Dorothea Nagel, C. Cramer et al. Prognostische Faktoren bei Patienten mit Magenkarzinom - eine univariate und multivariate statistische Analyse klinischer und klinisch-chemischer Daten. *LaboratoriumsMedizin / Journal of Laboratory Medicine* 1996; (9):470–6. Verfügbar unter: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/labm.1996.20.9.470/html>.
113. Gretschel S, Kemmner W, Schlag PM. Prognosefaktoren beim Magenkarzinom. *Onkologe* 2001; 7(6):623–31. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s007610170090>.
114. Song S, Li C, Li S, Cong X, Xue Y. Clinicopathological features and prognoses in younger and older patients with gastric cancer. *OTT* 2017; 10:4795–802. doi: 10.2147/OTT.S144801.
115. Vošmik M, Laco J, Sirák I, Dvořák J, Lochman P, Hodek M et al. Histopathologic Features are more Important Prognostic Factors than Primary Tumour Location in Gastro-oesophageal Adenocarcinoma Treated with Preoperative Chemoradiation and Surgery. *Pathol. Oncol. Res.* 2018; 24(2):373–83. doi: 10.1007/s12253-017-0253-z.
116. Gardovskis J, Horstmann O, Ohmann C, Verreet PR, Yang Q, Wlasak R et al. Prognostische Faktoren beim kurativ resezierten Magenkarzinom. Eine uni- und multivariate Analyse. *Langenbecks Arch Chir* 1995; 380(2):75–81. doi: 10.1007/BF00186412.
117. Roder JD, Böttcher K, Siewert JR, Busch R, Hermanek P, Meyer H-J. Prognostic factors in gastric carcinoma. Results of the German gastric carcinoma study 1992. *Cancer* 1993; 72(7):2089–97. doi: 10.1002/1097-0142(19931001)72:7<2089::AID-CNCR2820720706>3.0.CO;2-H.
118. Sedef AM, Köse F, Sümbül AT, Doğan Ö, Beşen AA, Tatlı AM et al. Patients with distal intestinal gastric cancer have superior outcome with addition of taxanes to combination chemotherapy, while proximal intestinal and diffuse gastric cancers do not: does biology and location predict chemotherapy benefit? *Med Oncol* 2015; 32(2):476. doi: 10.1007/s12032-014-0476-8.
119. Yu X, Hu F, Li C, Yao Q, Zhang H, Xue Y. Clinicopathologic characteristics and prognosis of proximal and distal gastric cancer. *OTT* 2018; 11:1037–44. doi: 10.2147/OTT.S157378.

120. Liu L, Wang ZW, Ji J, Zhang JN, Yan M, Zhang J et al. A cohort study and meta-analysis between histopathological classification and prognosis of gastric carcinoma. *ACAMC* 2013; 13(2):227–34. doi: 10.2174/1871520611313020007.
121. Giebel B, Corbeil D, Beckmann J, Höhn J, Freund D, Giesen K et al. Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 2004; 104(8):2332–8. doi: 10.1182/blood-2004-02-0511.
122. Immervoll H, Hoem D, Sakariassen PØ, Steffensen OJ, Molven A. Expression of the "stem cell marker" CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2008; 8(1):48. doi: 10.1186/1471-2407-8-48.
123. Corbeil D, Röper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt SM et al. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(8):5512–20. doi: 10.1074/jbc.275.8.5512.
124. Jiang Y, He Y, Li H, Li H-N, Zhang L, Hu W et al. Expressions of putative cancer stem cell markers ABCB1, ABCG2, and CD133 are correlated with the degree of differentiation of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2012; 15(4):440–50. doi: 10.1007/s10120-012-0140-y.
125. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu M-F et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(9):672–9. doi: 10.1093/jnci/djn123.
126. Aulmann S, Waldburger N, Penzel R, Andrulis M, Schirmacher P, Sinn HP. Reduction of CD44(+)/CD24(-) breast cancer cells by conventional cytotoxic chemotherapy. *Hum Pathol* 2010; 41(4):574–81. doi: 10.1016/j.humpath.2009.08.023.
127. Hongo K, Tanaka J, Tsuno NH, Kawai K, Nishikawa T, Shuno Y et al. CD133(-) cells, derived from a single human colon cancer cell line, are more resistant to 5-fluorouracil (FU) than CD133(+) cells, dependent on the β 1-integrin signaling. *J Surg Res* 2012; 175(2):278–88. doi: 10.1016/j.jss.2011.03.076.
128. Sasaki A, Kamiyama T, Yokoo H, Nakanishi K, Kubota K, Haga H et al. Cytoplasmic expression of CD133 is an important risk factor for overall survival in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2010; 24(2):537–46. doi: 10.3892/or_00000890.
129. Matsumoto K, Arao T, Tanaka K, Kaneda H, Kudo K, Fujita Y et al. mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells. *Cancer Res* 2009; 69(18):7160–4. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1289.
130. Shimada M, Sugimoto K, Iwahashi S, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S et al. CD133 expression is a potential prognostic indicator in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol* 2010; 45(8):896–902. doi: 10.1007/s00535-010-0235-3.

131. Skubitz APN, Taras EP, Boylan KLM, Waldron NN, Oh S, Panoskaltsis-Mortari A et al. Targeting CD133 in an in vivo ovarian cancer model reduces ovarian cancer progression. *Gynecol Oncol* 2013; 130(3):579–87. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.05.027.
132. Vora P, Venugopal C, Salim SK, Tatari N, Bakhshinyan D, Singh M et al. The Rational Development of CD133-Targeting Immunotherapies for Glioblastoma. *Cell Stem Cell* 2020; 26(6):832-844.e6. doi: 10.1016/j.stem.2020.04.008.
133. Dai X, Guo Y, Hu Y, Bao X, Zhu X, Fu Q et al. Immunotherapy for targeting cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *Theranostics* 2021; 11(7):3489–501. doi: 10.7150/thno.54648.
134. Lin EH, Hassan M, Li Y, Zhao H, Nooka A, Sorenson E et al. Elevated circulating endothelial progenitor marker CD133 messenger RNA levels predict colon cancer recurrence. *Cancer* 2007; 110(3):534–42. doi: 10.1002/cncr.22774.
135. Mehra N, Penning M, Maas J, Beerepoot LV, van Daal N, van Gils CH et al. Progenitor marker CD133 mRNA is elevated in peripheral blood of cancer patients with bone metastases. *Clin Cancer Res* 2006; 12(16):4859–66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0422.

8 Anhang

8.1 Arbeitsablauf der immunhistochemischen Färbung

Probenvorbereitung

Einbettung Tumormaterial in Paraffin

Anfertigung Schnitte (3 µm)

Aufziehen auf Objektträger

Entparaffinisierung und Rehydrierung

3x Xylol	3 Minuten
Ethanol 100%	3 Minuten
Ethanol 96%	3 Minuten
Ethanol 80%	3 Minuten
Ethanol 70%	3 Minuten
Ethanol 50%	3 Minuten
Waschen in Aqua dest.	3 Minuten

Demaskierung / Denaturierung

Vollständige Bedeckung der Schnitte in Arbeitslösung Envision Flex Target Retrieval Solution

Inkubation in Dampfgerar bei 100 Grad und pH 6,1	35 Minuten
Abkühlung unter laufendem Wasser	7 Minuten
Waschen in Envision Flex Wash Buffer (Verdünnung mit Aqua dest. 1:20)	5 Minuten

Immunhistochemische Färbung mittels Autostainer

Verdünnung des Primärantikörpers rabbit Anti-hu CD133 antigen (= Anti-PROM1 antibody) mit Envision Flex Antibody Diluent im Verhältnis 1:100

Schnitte und Chemikalien dem Autostainer zuführen

Die Färbedurchläufe gemäß Herstellerangaben auf CD133 individualisiert durchführen

Folgende Schritte werden durchlaufen, nach jedem Schritt erfolgt eine Spülvorgang mit dem Flex Wash Buffer:

Enzymblockierung mit Flex Peroxidase-Blocking Reagent	5 Minuten
Inkubation mit Primärantikörper anti-CD133	120 Minuten
Inkubation mit Sekundärreagenz Envision Flex + Rabbit Linker	15 Minuten
Inkubation mit Tertiärreagenz EnvisionFLEX/HRP	20 Minuten
2x Aufbringung von EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen	5 Minuten
Gegenfärbung mit Hämalaun	3 Minuten

Probennachbereitung

Dehydrierung

Waschen mit Aqua dest.	3 Minuten
Ethanol 50%	3 Minuten
Ethanol 70%	3 Minuten
Ethanol 80%	3 Minuten
Ethanol 96%	3 Minuten
Ethanol 100%	3 Minuten
3x Xylol	3 Minuten
Eindecken in Entellan	

9 Danksagung

10 Lebenslauf