

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

Analyse der Expression des Stammzellmarkers CD133 beim Magenkarzinom inner-
halb des Patientenkollektives der EXPAND-Studie

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

Vorgelegt von
Philipp Friedrich Fumi
aus Bonn

Mainz, 2022

Tag der Promotion: 06.12.2022

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
2 Literaturdiskussion.....	2
2.1 Magenkarzinom.....	2
2.2 Der Tumorstammzellmarker CD133, Cluster of differentiation 133	21
3 Material und Methoden	29
3.1 EXPAND-Studie	29
3.2 Material	33
3.3 Methoden	35
4 Ergebnisse.....	40
4.1 Deskriptive Statistik des Gesamtkollektivs	40
4.2 Deskriptive Statistik der Histologie	43
4.3 Auswertung und deskriptive Statistik der Färbungen	48
4.4 Überlebenszeitanalysen	63
5 Diskussion	77
5.1 Einleitung	77
5.2 Präsentation der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur	79
5.3 Limitationen der Arbeit	88
5.4 Ausblick in der Therapie des Magenkarzinom.....	92
6 Zusammenfassung und Wertung.....	93
7 Literaturverzeichnis.....	99
8 Anhang	V
8.1 Ausschlusskriterien der EXPAND-Studie	V
8.2 Tabellen	VI

8.3 Abbildungen IX

Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-1-Fetoprotein
AK	Antikörper
ALDH1	Aldehyde dehydrogenase 1 family
APC-Gen	Adenomatöse Polyposis coli Gen
BMI	Bodymaßindex
bzw.	beziehungsweise
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
ca.	circa
CA 72-4	Carbohydrate-Antigen 72-4
CD44	Cluster of diifferentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CT	Computertomographie
CTX	Chemotherapie
EBV	Epstein-Barr-Virus
EMR	Endoskopische Mukosaresektion
ESD	Endoskopische Submukosadisektion
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
ggf.	gegebenenfalls
H.pylori	Helicobacter pylori
HDAC1	Histondeacetylase 1
HER-2neu	human epidermal growth factor receptor 2
HIF1 α	Hypoxie-induzierter Faktor
HMBOX1	Homeobox-Telomer-bindendes Protein 1
HNPCC	Hereditäres Nicht-Polypöses Colorektales Carcinom
LLGL1-Protein	letale Riesenlarvenprotein Homolog 1
Os	Overall survival

Abkürzungsverzeichnis

PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
STK11	Serine/Threonine kinase 11
T-DXd	Trastuzumab-Deruxtecan
u.a.	unter anderem
UICC	Union internationale contre le cancer
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation Magenkarzinom	13
Tabelle 2: UICC Stadium Magenkarzinom	14
Tabelle 3: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - Geschlecht	40
Tabelle 4: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - Alter.....	40
Tabelle 5: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv – Therapie	41
Tabelle 6: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - Vorangegangene Tumorresektion	42
Tabelle 7: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - Histologische Klassifikation	44
Tabelle 8: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - Grading	44
Tabelle 9: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - T-Klassifikation.....	45
Tabelle 10: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - N-Klassifikation	46
Tabelle 11: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - M-Klassifikation	47
Tabelle 12: Auswertung Färbungen - Art der Färbung GP und Biopsie	53
Tabelle 13: Auswertung Färbungen - Art der Metastase	54
Tabelle 14: Auswertung Färbungen - Art der Färbung Metastasen.....	54
Tabelle 15: Auswertung Färbungen - Art der Färbung Subkollektiv ohne Metastasen	55
Tabelle 16: Korrelationen CD133 Färbung – Laurén-Klassifikation.....	55
Tabelle 17: Korrelationen CD133 Färbung – Laurén-Klassifikation negativ u. zytoplasmatisch.....	56
Tabelle 18: Korrelationen CD133 Färbung - Grading	57
Tabelle 19: Korrelationen CD133 Färbung - Grading G1/2 u. G3.....	58
Tabelle 20: Korrelationen CD133 Färbung - Alter <45 bis >60.....	59
Tabelle 21: Korrelationen CD133 Färbung - Alter <45 u. >45	60
Tabelle 22: Korrelationen CD133 Färbung - Alter <60 u. >60	60
Tabelle 23: Korrelationen CD133 Färbung - Geschlecht.....	61
Tabelle 24: Korrelationen CD133 Färbung - Geschlecht negativ u. zytoplasmatisch	61
Tabelle 25: Korrelationen CD133 Färbung - EGFR-Status	62
Tabelle 26: Korrelationen CD133 Färbung - EGFR-Status negativ u. zytoplasmatisch	62
Tabelle 27: Korrelationen CD133 Färbung - Therapie CTX u. CTX+Cetuximab	62
Tabelle 28: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Laurén-Klassifikation.....	65
Tabelle 29: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 – Grading.....	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 30: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - T-Klassifikation.....	68
Tabelle 31: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - N-Klassifikation	70
Tabelle 32: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Therapie CTX u. CTX+Cetuximab	71
Tabelle 33: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 – Geschlecht	73
Tabelle 34: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 – Alter	75
Tabelle 35: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - Herkunftsländer.....	VI
Tabelle 36: Korrelationen CD133 Färbung – T-Klassifikation T1/T2 und T3/T4	VII
Tabelle 37: Korrelationen CD133 Färbung – N-Klassifikation N0/N1 und N2/N3	VII
Tabelle 38: Korrelationen CD133 Färbung – M-Klassifikation M0 und M1	VIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle nach Geschlecht, Deutschland 1999-2016/2017	3
Abbildung 2: Altersspezifische Erkrankungsraten nach Geschlecht, Deutschland 1999-2016/2017	8
Abbildung 3: Verteilung der UICC-Stadien bei Erstdiagnose nach Geschlecht, Deutschland 2015-2016	10
Abbildung 4: Therapie nach UICC-Stadium.....	16
Abbildung 5: Deskriptive Statistik - Material	43
Abbildung 6: CD133 Färbung - normales Gewebe angefärbt.....	48
Abbildung 7: CD133 Färbung - zytoplasmatische Färbung I.....	49
Abbildung 8: CD133 Färbung - zytoplasmatische Färbung II	49
Abbildung 9: CD133 Färbung - luminale und zytoplasmatische Färbung I.....	49
Abbildung 10: CD133 Färbung - luminale und zytoplasmatische Färbung II.....	50
Abbildung 11: CD133 Färbung - luminale Färbung I	50
Abbildung 12: CD133 Färbung - luminale Färbung II	51
Abbildung 13: CD133 Färbung - nicht angefärbter Tumor.....	51
Abbildung 14: CD133 Färbung - GIST I	52
Abbildung 15: CD133 Färbung - GIST II	52
Abbildung 16: CD133 Färbung - Siegelringzellkarzinoms I	52
Abbildung 17: CD133 Färbung - Siegelringzellkarzinoms II	52
Abbildung 18: Häufigkeiten Färbungen – Laurén-Klassifikation	56
Abbildung 19: Korrelationen CD133 Färbung - Grading.....	57
Abbildung 20: Korrelationen CD133 Färbung - Alter in Jahren	59
Abbildung 21: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133.....	64
Abbildung 22: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Laurén-Klassifikation intestinal	66
Abbildung 23: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Laurén-Klassifikation diffus/gemischt	66
Abbildung 24: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Grading G1/G2.....	68
Abbildung 25: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Grading G3	68
Abbildung 26: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - T-Klassifikation T1/T2 ..	69
Abbildung 27: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - T-Klassifikation T3/T4 ..	69
Abbildung 28: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - N-Klassifikation N0/N1 ..	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 29: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - N-Klassifikation N2/N3	71
Abbildung 30: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Therapie CTX.....	73
Abbildung 31: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Therapie CTX + Cetuximab	73
Abbildung 32: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Geschlecht weiblich	74
Abbildung 33: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Geschlecht männlich...	74
Abbildung 34: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Alter <60 Jahre.....	76
Abbildung 35: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Alter >60 Jahre.....	76
Abbildung 36: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung T0/T1/T2 gegen T3/T4	IX
Abbildung 37: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu luminalen Fällen	IX
Abbildung 38: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu zytoplasmatischen Fällen	X
Abbildung 39: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu luminalen Fällen nach Laurén-Klassifikation	X
Abbildung 40: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu luminalen Fällen nach N-Klassifikation.....	XI
Abbildung 41: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu luminalen Fällen nach Behandlung	XI
Abbildung 42: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu luminalen Fällen nach männlichen Geschlecht	XII
Abbildung 43: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu zytoplasmatischen Fällen nach weiblichen Geschlecht	XII
Abbildung 44: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu luminalen Fällen nach Alter <60 Jahre .	XIII
Abbildung 45: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu zytoplasmatischen Fällen nach Alter >60 Jahre	XIII

1 Einleitung

Das Magenkarzinom zählte mit einer weltweiten Inzidenz von ca. 1 Millionen Neuerkrankungen zu den fünf häufigsten Krebserkrankungen. Hinsichtlich seiner Letalität ist es zu den drei häufigsten Tumorentitäten einzuordnen. (1) Bereits aus dieser Erkenntnis folgt die Notwendigkeit einer intensiven Erforschung des Magenkarzinoms mit der Option zur Entwicklung möglicher Therapien.

Bei der Bewältigung dieser Aufgabe kommt der Analyse von Tumorstammzellmarker ein interessanter, neuer und wichtiger Stellenwert zu. Denn unbestritten liefern die Stammzellenmarker einen nicht zu unterschätzenden Nutzen in der Diagnostik von Karzinomen. Gleichwohl spielen Tumorstammzellmarker speziell für das Magenkarzinom in der Forschung bislang nur eine untergeordnete Rolle.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die Relevanz des Tumorstammzellmarkers CD133 im Magenkarzinom zu klären. Hierzu werden innerhalb des Patientenkollektives der EXPAND-Studie, insgesamt 504 histopathologische Präparate hinsichtlich des Tumorstammzellmarker analysiert und folgende Zusammenhänge erörtert:

- Beeinflusst die Expression von CD133 sowie die Kombination mit bestimmten klinischen Parametern das Überleben bestimmter Patientenkollektive?
- Bestehen Korrelationen zwischen der unterschiedlichen Expression von CD133 und klinischen Parametern?

Zur Beantwortung der Fragen im Zusammenhang mit diesen Fragestellungen wird das Patientenkollektiv nach immunhistochemischer Anfärbung histologisch begutachtet und die Tumore in Untergruppen klassifiziert und ausgewertet. Die Ergebnisse werden sowohl anhand klinischer Parameter als auch hinsichtlich ihres medianen Überlebens analysiert.

2 Literaturdiskussion

2.1 Magenkarzinom

2.1.1 Definition

Das Magenkarzinom wird definiert als Karzinom des Magens- und des gastroösophagealen Übergangs. Es handelt sich um eine maligne Tumorerkrankung der Magenschleimhaut und ist zu ca. 90% ein Adenokarzinom, ausgehend vom Drüsengewebe. Bei der Definition des Magenkarzinoms ist darüber hinaus - entsprechend den unterschiedlichen Zelltypen des Magens - zwischen endokrinen Tumoren, Leiomyosarkomen und Lymphomen zu unterscheiden (2).

2.1.2 Epidemiologie

Im Jahr 2012 präsentierte sich das Magenkarzinom mit einer Inzidenz von weltweit ca. 1 Millionen Neuerkrankungen und stellt damit die fünft häufigste Krebserkrankung da. Vergleicht man die Letalität der Krebserkrankungen, so ist das Magenkarzinom mit weltweit 738.000 Toten an Platz 3 zu positionieren (1).

Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland erfasste für das Jahr 2016 9.300 neuerkrankte Männer, sowie 5.840 neuerkrankte Frauen. Mit einer Mortalität von 5.370 Sterbefällen beim männlichen, und 3.861 Sterbefällen beim weiblichen Geschlecht ergab sich eine absolute 5 Jahres-Überlebensrate von 27% bzw. 29% (3).

Bei genauer Betrachtung der Inzidenz zeigt sich jedoch eine große Variabilität in Faktoren wie Geschlecht oder Nationalitäten. So ist im Vergleich der Geschlechter eine 2- bis 3-mal höhere Inzidenz beim männlichen Geschlecht zu beobachten (4). Darüber hinaus wurden ca. 70% der Fälle in Industrieländern beobachtet (1). Trotz nach wie vor hoher Inzidenzraten lässt sich ein Rückgang der Neuerkrankungen verzeichnen. Beispielsweise wurde in den USA im Zeitraum 1992 bis 2010 ein Rückgang von 1,7% für Männer und 0,8% für Frauen verzeichnet (4). Im Jahre 1975 hingegen war das Magenkarzinom noch die häufigste Tumorerkrankung (1, 5). Ein ähnlicher Trend lässt sich anhand der Daten der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland erkennen. Hier ist ein deutlicher Rückgang der absoluten Neuerkrankungen sowohl bei Männern, als auch bei Frauen beobachten (3, siehe Abbildung 1).

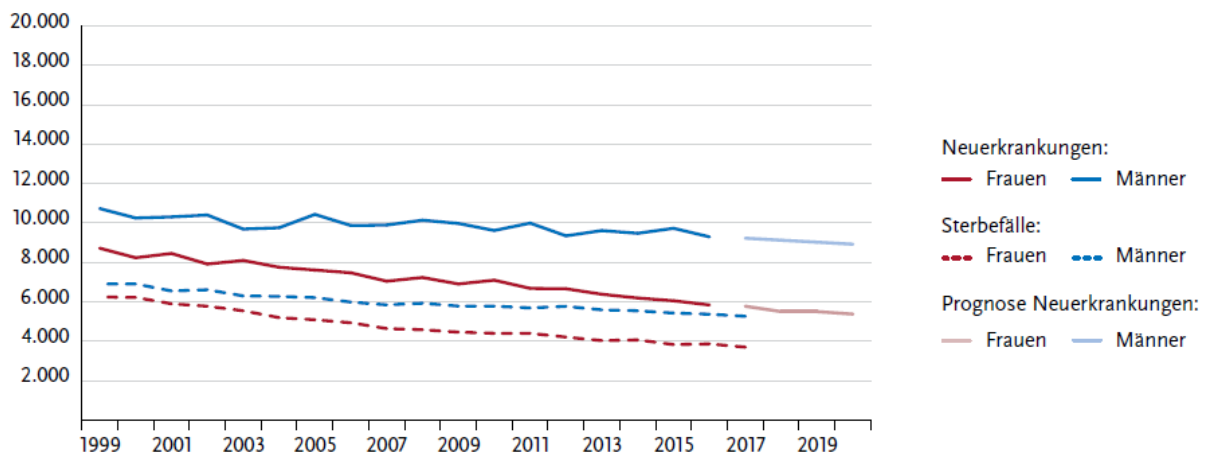


Abbildung 1: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle nach Geschlecht, ICD-10 C16, Deutschland 1999-2016/2017

Quelle: Krebs in Deutschland für 2015/2016 12. Ausgabe, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (3)

2.1.3 Pathogenese

Das Magenkarzinom kann histologisch in einen intestinalen und einen diffusen Typ unterteilt werden. Der intestinale Typ bildet drüsenähnliches Gewebe - häufig mit Ulzerationen - und hat einen längeren Entstehungsweg. Die diffus wachsenden Tumore befinden sich bevorzugt in der Kardia des Magen und betreffen vor allem junge Patienten (6, 7).

Im Rahmen der Diagnostik lassen sich histologisch keine Vorläuferzellen eines Magenkarzinoms identifizieren. Jedoch sind eine Reihe von histologischen Auffälligkeiten bei der Begutachtung des Gewebes mit einem erhöhten Risiko assoziiert. Zu diesen Auffälligkeiten zählen u.a. fokale Atrophie, intestinale Metaplasie, Riesenfaltengastritis und adenomatöse Polypen. Bei besagten Veränderungen im Gewebe handelt es sich jedoch nicht um obligat maligne Formationen, sondern vielmehr um Präkanzerosen (2).

Die Lokalisation kann, wie oben bereits angesprochen, eingeteilt werden in Tumoren der Kardia und nicht-Kardia Tumore. Tumore der Kardia sind häufig mit einer Reflux-Krankheit assoziiert und in den letzten Jahren, vor allem unter hellhäutigen Menschen mit zunehmenden Erkrankungsraten, zu beobachten (8).

Man kann in Bezug auf die Diagnostik eines Magenkarzinoms zwischen einem frühen und einem späten Stadium unterscheiden. Das frühe Karzinom ist noch lokal beschränkt auf die Mukosa und Submukosa. Dabei hat das frühe Karzinom mit einer 5-Jahres Überlebenschance von 85-100% eine gravierend bessere Prog-

nose als das fortgeschrittene mit lediglich 5-20% (9,8). Beim fortgeschrittenen Karzinom ist die Submukosa durchbrochen und die Metastasierung schreitet fort. Eine Metastasierung durch ein invasives Karzinom betrifft zunächst die regionalen Lymphknoten an der großen Kurvatur, regionalen Gefäßen, paraaortal und, im voran weitergeschrittenen Stadium, ebenfalls die Leber (2).

2.1.4 Risikofaktoren

Die bekannten Risikofaktoren, welche die Entstehung eines Karzinoms im Magen begünstigen, lassen sich in mikrobiologische, exogene und endogene Auslöser einteilen. Dabei sind endogene Auslöser vor allem genetische Dispositionen. Die exogenen Auslöser sind beispielsweise die Nahrungsaufnahme oder das Konsumverhalten.

2.1.4.1 Mikrobiologische Risikofaktoren

In der aktuellen S3 Leitlinie zum Magenkarzinom aus dem Jahr 2019 heißt es „*Helicobacter pylori* ist der wesentliche Risikofaktor für das Magenkarzinom“. Weiter wurde das *H. pylori* bereits 1994 durch die WHO als Klasse I Karzinogen eingestuft. (10) Die Karzinome, welche sich nicht auf die Kardia beschränken, werden laut aktueller Studienlage zu 89% durch *H. pylori* mit verursacht (11).

Das Bakterium *H. pylori* ist ein gram-negatives Bakterium, welches bei Infektion ohne Therapie dauerhaft im Wirt verweilt. Unter anderem die lebenslange Persistenz führt zu einer Durchseuchung der adulten Bevölkerung weltweit von ca. 50% (12).

Die Pathogenese des hohen karzinogenen Verhalten von *H. pylori* beruht vermutlich zum einen auf einer chronisch-aktiven Gastritis, welche über Jahrzehnte fortbestehen kann und im Verlauf das Potential zu einer karzinogenen atrophischen Gastritis zu entarten birgt (13). Zum anderen konnten somatische Mutationen in Geweben mit *H. pylori* nachgewiesen werden, welches auf eine genetische Komponente schließen lässt (14). Hierbei bildet die Infektion ein Risiko sowohl für den intestinalen, als auch den diffusen Typ nach Laurén-Klassifikation (12).

Eine noch ausgeprägtere Durchseuchung der Weltbevölkerung ist bei dem Epstein-Barr-Virus (EBV) zu beobachten. Ungefähr 90% der Weltbevölkerung sind dauerhaft mit dem EBV infiziert (15). Eine positive Assoziation mit Magenkarzinomen konnten

von Zhou et al. nachgewiesen werden. Hier ließ sich in ca. 10% der maligne veränderten Gewebeprobe das Epstein-Barr-Virus nachweisen (16). Eine Infektion erhöht das Risiko für solch eine maligne Erkrankung auf eine Prävalenz von ca. 8%, wobei diese abhängig von Faktoren wie Geschlecht, Alter sowie geographischer Lage ist. In einer Studie von Moore et al. konnte dabei ein besonders hohes Risiko für junge Patienten gezeigt werden (17). Darüber hinaus fallen vor allem die lymphoepithelialen Tumoren mit einer EBV-Positivität von ungefähr 90% auf (2).

2.1.4.2 Endogene Risikofaktoren

In der Diskussion von Risikofaktoren, welche zu einer Entstehung von Magenkrebs führen können, rücken auch genetische Faktoren zunehmend in den Fokus. So ist beispielsweise ein wichtiger Teil der Aktualisierung der Leitlinie, die ausführlichere Beschreibung von HNPCC-Patienten, sowie die Aufnahme der Cancer Genome Atlas TCGA Klassifikation in die Empfehlungen (10).

Die aktuelle S3-Leitlinie postuliert: „Verwandte ersten Grades von Patienten mit einem Magenkarzinom haben ein im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöhtes Risiko, ebenfalls an einem Magenkarzinom zu erkranken.“ Nicht zuletzt daraus lässt sich der hohe Stellenwert einer genetischen Komponente erahnen (2). Es folgt eine Auswahl von genetisch assoziierten Erkrankungen, welche ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms zeigen.

Hereditäres diffuses Magenkarzinom

Im Falle dieser autosomal dominant vererbten Erkrankung kommt es zu einer Mutation im E-Cadherin-Gen. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle im Zell-Zell-Kontakt sowie der Signaltransduktion (2, 18). Neben E-Cadherin wird das LLGL1-Protein exprimiert. Auch dieses Protein ist am Zell-Zell-Kontakt beteiligt (19). Desuki et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass sowohl der Verlust von E-Cadherin, als auch der des LLGL-1-Gens mit einem diffus wachsenden Magenkarzinom, sowie Peritonealmetastasen assoziiert ist (20).

HNPCC Lynch-Syndrom

Das Lynch-Syndrom wird ebenfalls autosomal dominant vererbt und führt im Genotyp zu einer Mikrosatelliteninstabilität (2, 18).

Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)

Diese autosomal dominant vererbte Mutation ist positiv assoziiert mit der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms. Dies gilt ebenso für die Entstehung eines Magenkarzinoms. Molekularbiologische Grundlage für dieses erhöhte Risiko liegt in der Keimbahnmutation im APC-Gen (2, 21).

Peutz-Jeghers-Syndrom

Im Rahmen dieser autosomal dominant vererbten Erkrankung der Polypen liegt eine Mutation im STK11 Gen vor, welche eine Störung der Serin-Threonin-Kinase und damit der Regulation des Zellzyklus verursacht (2, 18).

Spezifische Gene

In der aktuellen humangenetischen Forschung gelang es, bestimmte in der Karzinogenese des Magens relevante Gene zu identifizieren. Die Genloci 5p13 und 8q24 konnten sowohl in asiatischer Population (22), als auch in der europäischen Population (23, 24) in Zusammenhang mit dem Magenkarzinom gebracht werden (25). Grundsätzlich ist auffallend, dass unterschiedliche Bevölkerungsgruppen ein abweichendes Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms haben. So hat beispielsweise Japan ein vier Mal höheres Risiko für die Magenkrebsentstehung als Großbritannien (26).

Blutgruppe A

Vergleicht man die Inzidenz des Magenkarzinoms unterhalb der Blutgruppen im ABO-System, so ergibt sich für die Blutgruppe A ein signifikant höheres Risiko zur erkranken im Vergleich zur restlichen Bevölkerung. Die Blutgruppe 0 hingegen ist mit einem niedrigeren Risiko assoziiert (27).

2.1.4.3 Exogene Risikofaktoren

Lebensstil

Bei der Erforschung und Beschreibung maligner Entartungen werden exogene Einflüsse auf den menschlichen Organismus genauer betrachtet, um Risikofaktoren der Karzinogene zu definieren und die Inzidenz der Erkrankung zu senken.

Hierbei lassen sich ggf. mittels einfacher Handlungsempfehlungen Risiken signifikant senken. So lässt sich der übermäßige Konsum von Alkohol als eindeutiger Risikofaktor für die Entstehung eines Magenkarzinoms benennen (28). Dieser wird als solcher auch in der aktuellen S3 Leitlinie Magenkarzinom beschrieben (10). Ein weiterer eindeutiger Risikofaktor ist das Rauchen von Tabak (29). Etwa 18% der Magenkarzinome lassen sich dem Rauchen als Ursache zuordnen (30). Die Kombination dieser beider Risikofaktoren führt zu einem 5-fach erhöhtem Risiko zu erkranken (31).

Sozioökonomischer Status

Ein weiterer Aspekt des Risikoprofils eines Magenkarzinoms ist der sozioökonomische Status. Grundsätzlich lässt sich in Europa ein signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorinzidenz sowie Mortalität und dem sozioökonomischen Status beobachten. Menschen aus sozial schlechter gestellten Schichten haben eine deutlich erhöhte Inzidenz sowie Mortalität für spezielle Tumoridentitäten (32).

Menschen aus einer niedrigeren sozialen Schicht leiden deutlich häufiger an Tumoren, welche mit einer entsprechenden Lebensstilführung assoziiert sind. Konkret lassen sich Faktoren wie Genussmittelkonsum, speziell Alkohol und Nikotin, aber auch Wohnsituation bzw. Vermögen sowie Bildung oder Berufsstand benennen. Hierbei ist eine unterschiedlich starke Gewichtung dieser Faktoren zu beachten. Darüber hinaus leiden Menschen mit besagtem Status häufig an mehreren Begleiterkrankungen, welche die Diagnose erschweren können. Zusätzlich konsultieren Patienten mit niedrigen sozioökonomischen Status trotz Symptomatik häufig erst später den Arzt.

Somit haben Personen mit einem niedrigen sozioökonomischen Status ein erhöhtes Risiko an Tumoren des Gastrointestinaltraktes, sowie des respiratorischen Systems zu erkranken (32). Im Gegensatz dazu leiden Personen aus höheren sozialen Schichten häufiger an Tumoren, welche in Screening-Programmen erkannt werden, wie Mamma-, oder Prostata-Karzinome (32).

Alter und Geschlecht

Das Alter ist bereits als eindeutiger Risikofaktor in der aktuellen Literatur bekannt (33). Dieses spiegelt sich auch in den Daten des Deutschen Krebsregisters wider. Hier zu sehen ist eine eindeutige Zunahme der Inzidenz des Magenkarzinoms mit zunehmendem Alter (3). (siehe Abbildung 2)

Neben dem Alter gilt auch das männliche Geschlecht als Faktor für erhöhte Erkrankungsraten. Männer haben ein etwas doppelt so hohes Risiko an Magenkrebs zu erkranken wie Frauen (34). Auch diese Eigenschaft zeigt sich in der deutschen Population (3).

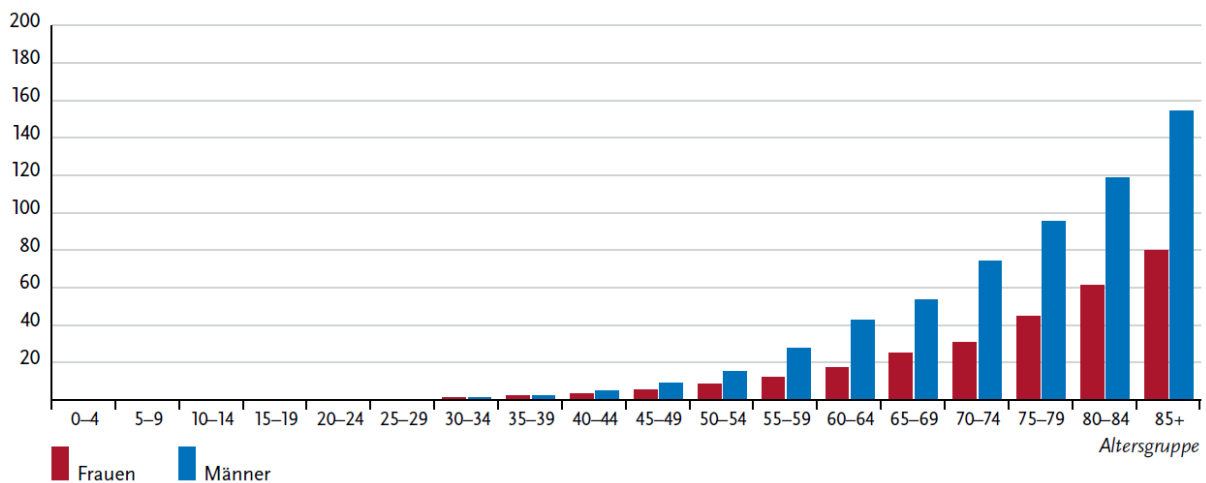


Abbildung 2: Altersspezifische Erkrankungsraten nach Geschlecht, ICD-10 C16, Deutschland 1999-2016/2017
Quelle: Krebs in Deutschland für 2015/2016 12. Ausgabe, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (3)

Übergewicht und Ernährung

Ein weiterer, noch nicht abschließend beurteilter Risikofaktor ist Übergewicht. Hierzu ist die Studienlage uneinheitlich. So konnten Turati et al. in ihrer Metaanalyse für Patienten mit überdurchschnittlich hohem BMI ein signifikant erhöhtes Risiko für die Ausprägung eines Magenkarzinoms, vor allem im Bereich des gastroösophagealen Übergangs feststellen (35). Im Gegensatz dazu konnten Steffen et al. keine positive Assoziation von BMI und beiden besagten Tumoridentitäten feststellen (36).

Operationen

Patienten, welche sich im Rahmen der chirurgischen Therapie einer Magenteilresektion unterzogen haben, weisen im Verlauf ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv eines Magenkarinoms auf (10).

Perniziöse Anämie

Ein weiterer Risikofaktor ist das Vorliegen einer perniziösen Anämie. Patienten mit dieser Blutarmut weisen ein erhöhtes Risiko für Nicht-Kardiakarzinome auf. Zusätzlich dazu steigt das Risiko für diverse andere Tumoridentitäten wie Tonsillarkarzinom, Hypopharyngealkarzinom, Oesophageales Plattenepithelkarzinom, Leberkarzinom, Neuroendokrine Magenkarzinome sowie myeloische Malignitäten (37).

Reflux

Die gastroösophageale Refluxkrankheit, sowie der Reflux an sich sind ein diskutierter Risikofaktor. Im Rahmen der Karzinogenese des Oesophaguskarzinoms ist ein eindeutiger positiver Zusammenhang bewiesen. Zur Assoziation mit dem Magenkarzinom der Kardia konnten Wu et al. eine signifikante Assoziation feststellen (38).

2.1.5 Klinik des Magenkarzinoms

2.1.5.1 Symptome

Die Symptome des Magenkarzinoms lassen sich grob in unspezifische und relativ spezifische unterteilen. Zum einen kann sich eine unspezifische Trias der B-Symptomatik zeigen, welche bei diversen malignen Prozessen zu beobachten ist. Zum anderen sind sogenannte „Alarmsymptome“ durch die S3-Leitlinie definiert worden. Bereits eines der folgenden Symptome bedarf, so der Expertenkonsens der Leitlinie, einer frühzeitigen Diagnostik in Form einer Biopsie: Dysphagie, rezidivierendes Erbrechen, Inappetenz, unklarer Gewichtsverlust, Gastrointestinale Blutungen, unklare Eisenmangelanämie (10). Grundsätzlich sind die beschriebenen Symptome jedoch nur wenig sensitiv und wenig spezifisch (2).

2.1.5.2 Vorsorge

Bedeutung von Test- und Screeningverfahren

Bei malignen Neoplasien treten Symptome häufig unspezifisch und erst in vorangeschrittenem Stadium auf. Dies hat zur Folge, dass diese Veränderungen in ihrem fortgeschrittenen Stadium meist schwerer zu therapieren sind. Daher werden Test- bzw. Screeningverfahren und deren Nutzen untersucht.

Das Magenkarzinom wird häufig erst in einem fortgeschrittenen und damit schwierig kurativ zu therapierenden Stadium erkannt. Dieses spiegeln auch die vom Robert Koch-Institut für Deutschland erhobenen Daten wieder (3). (siehe Abbildung 3)

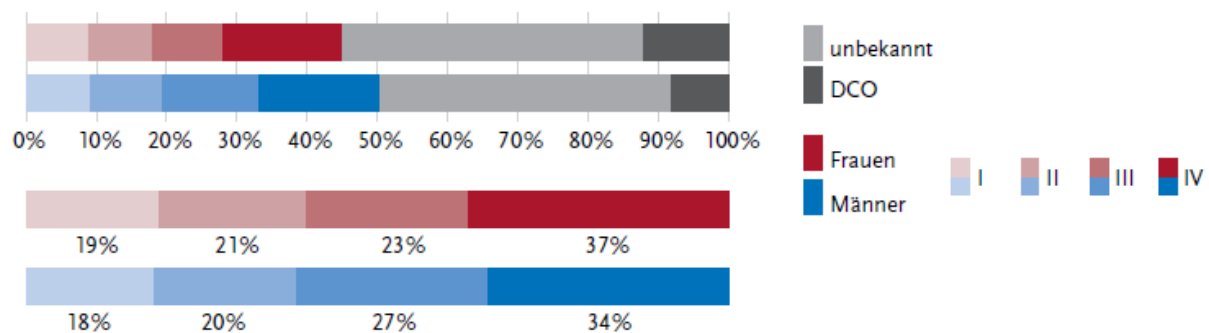


Abbildung 3: Verteilung der UICC-Stadien bei Erstdiagnose nach Geschlecht, ICD-10 C16, Deutschland 2015-2016

Quelle: Krebs in Deutschland für 2015/2016 12. Ausgabe, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (3)

Beispiel Darmkrebsvorsorge

Ein Beispiel für eine weit etablierte Krebs-Screeningmethode ist das Darmkrebs-screening. Darmkrebs zählt zu den häufigsten Krebserkrankungen mit weltweit ca. 1,4 Millionen Todesopfern. Auf der Basis der Daten der Epidemiologischen Krebsregister und der Todesursachenstatistik konnte das Ärzteblatt einen Rückgang der Darmkrebsinzidenz um 17-26% im Alter ab 55 Jahren feststellen. Im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung wird jedem Pateinten, der älter als 55 Jahre ist, eine Vorsorgekoloskopie angeboten. Diese Maßnahme detektiert nicht nur ein bereits bestehendes Karzinom, sondern erfasst auch einen Teil der Präkanzerosen und potenziell entartungsfähigen Befunde (39).

Screening des Magenkarzinom

Das diagnostische Mittel der Wahl beim Magenkarzinom ist die endoskopische Untersuchung. Ein flächendeckendes Screening mit dieser Untersuchungsmethode wird aktuell von der S3 Leitlinie für Deutschland nicht empfohlen. Anders ist die Empfehlung bei Patienten mit erhöhtem Risiko (10). Dem gegenüber wird besagtes Verfahren in Hochrisikopopulationen wie Japan routinemäßig durchgeführt (40).

Eine weitere, weniger invasive Maßnahme ist das serologische Screening. Im Rahmen der Blutuntersuchung werden unter anderem Pepsinogene und mikrobiologische Marker untersucht. So auch das Pepsinogen I und II, sowie Gastrin 17. Diese können als Marker für eine fortgeschrittene Atrophie im Rahmen einer Gastritis genutzt werden und damit als Hinweis auf eine Präkanzerose gewertet werden (41). Darüber hinaus kann ein Quotient aus Pepsinogen I und Pepsinogen II gebildet werden. Mittels des Verhältnisses dieser beiden Pepsinogene kann ebenfalls in eingeschränktem Maße ein Rückschluss auf eine Atrophie geschlossen werden (42).

Ebenfalls ist die Bestimmung einer *H.pylori*-Serologie als Marker zur Abschätzung des Magenkarzinom-Risikos nutzbar. Wie bereits im Abschnitt der Risikofaktoren angesprochen lässt sich ein großer Teil der malignen Neoplasien auf eine Infektion mit diesem Erreger zurückführen. So konnten Teraswa et al. in ihrer Metaanalyse einen signifikanten Zusammenhang zwischen positiven Serumpepsinogentest in Kombination mit *H.pylori*-Antikörpern und dem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms zeigen (43).

In Japan erfolgt anhand der Serumanalyse eine Klassifizierung in Risikogruppen mit angeschlossener weitergehender Diagnostik und Behandlung. Somit konnten Magenkrebs assoziierte Mortalitäten deutlich gesenkt werden (44). Jedoch rät die S3 Leitlinie von einem „serologischen Screening der asymptotischen Bevölkerung auf *H.pylori*, EBV sowie pathologische Serumpepsinogene“ ab (10).

2.1.5.3 Diagnostik

Endoskopie

Trotz ihrer geringen Sensitivität und Spezifität sind in Deutschland das Vorhandensein von Alarmsymptomen ausschlaggebend für die Indikation einer weiterführenden Magenkrebsdiagnostik (10). Dabei ist die Endoskopie das Standardverfahren (45,46). Dieses kann zur Verbesserung der Sensitivität durch die Chromoendoskopie ergänzt werden (47). Um die Diagnose zu sichern sollten darüber hinaus Biopsien entnommen werden (10).

Tumormarker

Neben der Endoskopie spielen Tumormarker eine untergeordnete Rolle in der Diagnostik. In einer Metanalyse mit insgesamt 14651 Patienten konnte CEA als potenzieller unabhängiger prognostischer Faktor für das Magenkarzinom erfasst werden (48). Song et al. konnten eine Korrelation mit dem Serum Spiegel des Tumormarkers CA 19-9 und einer schlechten Prognose für das Magenkarzinom zeigen. Jedoch sieht ein Konsens der Wissenschaftler aktuell darin noch keinen ausreichenden Beweis für die Erfolgchancen einer darauf beruhenden Therapie (49). Auch konnte ein erhöhter AFP Spiegel im Serum als potenziell negativer Faktor bei der Abschätzung des Verlaufs eines Magenkarzinoms nicht bestimmt werden (50, 51). Tumormarker wie CEA, CA 19-9 und CA 72-4 zeigten sich in mehreren Studien in der Gruppe der Magenkarzinom Patienten erhöht gegenüber den Kontrollgruppen (52, 53). Darüber hinaus konnten Zusammenhänge zwischen benannten Tumormarkern und den fortgeschrittenen Stadien der Tumore gezeigt werden (53-55).

Zum aktuellen Zeitpunkt lässt sich kein einzelner Tumormarker sinnvoll in der frühen Diagnostik einsetzen. Zur Diskussion steht die Kombination aus mehreren Tumormarkern wie CEA, CA 19-9 und CA 72-4. Diese wurden von Chen et al. in einer chinesischen Population untersucht mit dem Ergebnis, dass ein kombinierter Test die Sensitivität in der Diagnostik erhöhen kann (56). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen ebenfalls Liang et al. (53).

Die aktuelle S3 Leitlinie empfiehlt keine routinemäßige Bestimmung von Tumormarkern, weder in der Früherkennung noch in der Nachsorge. Für die Autoren der Leitlinie besteht zum aktuellen Zeitpunkt keine ausreichende Evidenz für deren klinischen Nutzen (10).

2.1.5.4 Staging

Zur Klassifizierung des Magenkarzinoms werden neben der Endoskopie noch weitere Diagnostik genutzt: Ultraschall, Endosonographie, CT, PET-CT und die Laparoskopie.

Um Tumore international einheitlich zu beschreiben und klassifizieren zu können wurde die TNM-Klassifikation eingeführt. Diese umfasst drei Dimensionen des Tumorwachstums:

- T: Größe sowie Ausbreitung des Tumors
- N: Metastasierung des Primärtumors über eine lymphogene Streuung in regionale Lymphknoten
- M: Metastasierung des Primärtumors in andere Gebiete.

TNM Klassifikation Magenkarzinom

Tabelle 1: TNM-Klassifikation Magenkarzinom, eigene Darstellung nach Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind Ch. TNM Classification of Malignant Tumours. Wiley-Blackwell 2009

T-Kategorie	
T1	Oberflächlich infiltrierender Tumor
T1a	Tumor infiltriert Lamina propria oder Muscularis Mucosae
T1b	Tumor infiltriert Submucosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Subserosa
T4	Tumor perforiert Serosa (viszerales Peritoneum) oder infiltriert benachbarte Strukturen
T4a	Tumor perforiert Subserosa (viszerales Peritoneum)
T4b	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen
N-Kategorie	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-2 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 3-6 regionären Lymphknoten

Literaturdiskussion

N3	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
N3a	7-15 Lymphknoten
N3b	≥ 16 Lymphknoten
M-Kategorie	
M0	Keine Metastasen
M1	Fernmetastasen

Eigene Darstellung nach Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind Ch. TNM Classification of Malignant Tumours. Wiley-Blackwell 2009

Ferner werden Tumore anhand ihres Progresses und Morphologie der TNM-Klassifikation mittels der UICC-Einteilung in 5 Stadien gegliedert. Hierbei werden Eigenschaften des Tumors unterschiedlich gewichtet. Dies ist vor allem in der Planung der Therapie von elementarer Bedeutung.

Tabelle 2: UICC Stadium Magenkarzinom, eigene Darstellung nach Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind Ch. TNM Classification of Malignant Tumours. Wiley-Blackwell 2009

UICC Stadium	Primärtumor T	Lymphknoten N	Fernmetastasen M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0

Literaturdiskussion

	T1	N3	M0
IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
IIIB	T4b	N0/1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
IIIC	T4b	N2/3	M0
	T4a	N3	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

2.1.5.5 Therapie

2.1.5.5.1 Therapie nach UICC-Stadium

Die Therapie des Magenkarzinom richtet sich nach dem UICC-Stadium des Tumors. Hier wird u.a. zwischen kurativer und palliativer Therapie, Chemotherapie oder Immuntherapie unterschieden. Die Behandlungsstrategien des Magenkarzinom sind in folgender Abbildung 4 visualisiert:

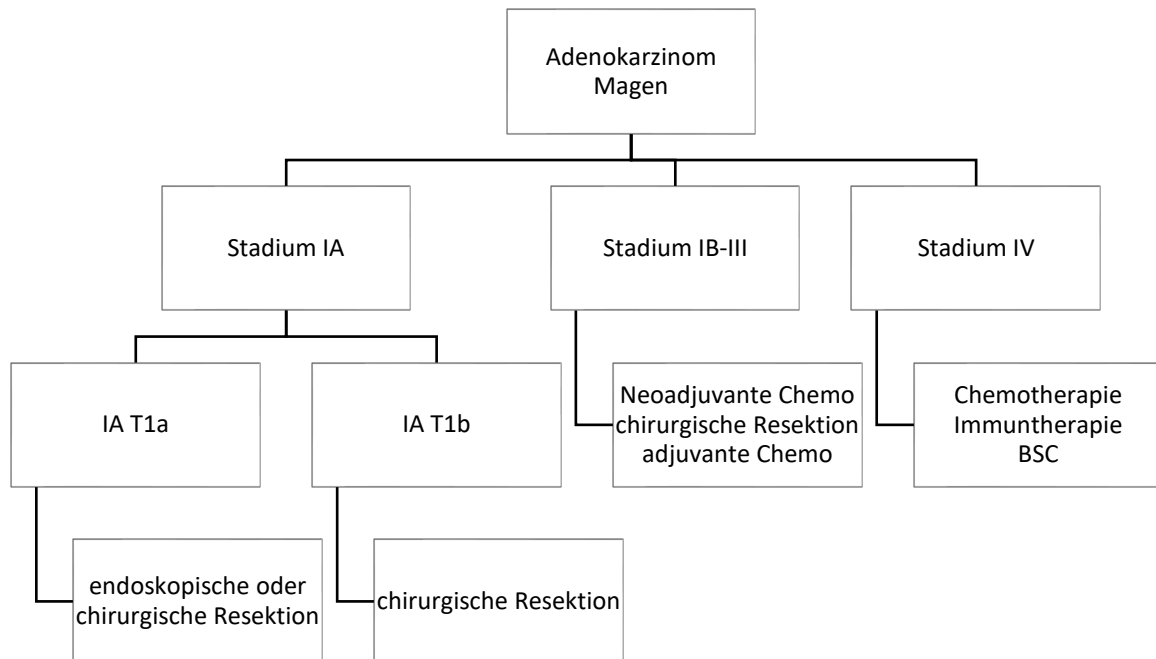


Abbildung 4: Therapie nach UICC-Stadium, eigene Darstellung nach www.onkopedia.com/guidelines/magenkarzinom (57)

2.1.5.5.2 Therapiemethoden

Operative Verfahren

Nach aktueller Studienlage stellt die chirurgische Resektion des Magenkarzinoms die einzige Therapie mit kurativem Behandlungsziel dar. Diese kann in einer Teilresektion oder der vollständigen Gastrektomie bestehen (10). Bei einer Resektion handelt es sich um ein Verfahren, in dessen Durchführung Teile eines Organs bzw. Gewebetyps entnommen werden. Im Gegensatz dazu wird bei der Ektomie jenes vollständig entfernt.

Endoskopische Resektion

Einem therapeutischen endoskopischen Eingriff geht immer eine diagnostische Untersuchung zum Tumor-Staging vor. Grund dafür liegt darin, dass die Indikation für eine therapeutische Endoskopie abhängig von der histologischen Beschaffenheit des Tumors ist. Voraussetzung ist die Tiefe der Infiltration, welche nur die Mukosa betreffen sollte, was einem T1a Staging entspricht. Darüber hinaus sollten nur Tumore mit Grading G1 bis G2 endoskopisch reseziert werden (58, 59). Daraus ergibt sich auch die Notwendigkeit eines N0 Stagings, welches andernfalls eine Kontraindikation für die endoskopische Operation darstellt (60).

Eine weitere Indikation ist die Palliativ-chirurgische Versorgung. Diese kann beeinträchtigte Funktionalität durch beispielsweise maligne Obstruktionen wiederherstellen (59).

In der aktuellen deutschen Leitlinie zum Magenkarzinom wird im Falle eines Magenfrühkarzinoms oder einer Dysplasie die endoskopische en-bloc Resektion empfohlen (61). Als Voraussetzung für die Durchführung dieser muss

- der Befund kleiner als 2cm im Durchmesser,
- nicht ulzeriert,
- ausschließlich auf die Mukosa begrenzt und
- dem Grading G1 oder G2 entsprechen.

Erfüllt der Befund nicht die histologischen Voraussetzungen wird ggf. eine chirurgische Nachresektion notwendig (10).

Endoskopische Mukosaresektion (EMR)

Im Rahmen dieses Eingriffes kommt eine Schlingenresektion zum Einsatz. Diese wird ähnlich wie bei der Behandlung einer Varize über die zuvor angesaugte Läsion gestülpt. Das so fixierte Gewebe wird mittels elektrischer Schlinge abgetrennt und geborgen. Jedoch können mit dieser Technik nur Gewebestücke bis zu einer bestimmten Größe an einem Stück entfernt werden. Hieraus ergibt sich eine Limitation des Verfahrens im Vergleich zu herkömmlichen Resektionsverfahren (59, 62).

Endoskopische Submukosadissektion (ESD)

Die Technik der ESD wurde in Japan entwickelt. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass dort ungefähr die Hälfte aller Magenkarzinome bereits im Frühstadium behandelt werden (59). Ziel ist es die ausschließlich in der Mukosa lokalisierte Läsion an einem Stück zu entfernen. Dazu wird die Stelle zunächst markiert und unterspritzt. Anschließend erfolgt ein zirkulärer Schnitt und eine Abtragung auf Höhe der Submukosa (63).

Der große Vorteil gegenüber der EMR ist die bessere R0 Resektion durch das vollständige Abtragen einer histologischen Schicht. Somit können deutlich häufiger en bloc Resektionen des Tumors gelingen (63, 64). Dies ermöglicht zum einen eine bessere histopathologische Bewertung, zum anderen höhere Heilungschancen (65).

Chirurgische Gastrektomie

Die chirurgische Resektion stellt die einzige kurative Behandlung eines metastasierten Tumors dar (60). Dabei stehen Operationsverfahren zur Verfügung wie die atypische Magenteilresektion oder die subtotale bzw. totale Gastrektomie. Die Auswahl eines entsprechenden Verfahrens erfolgt anhand mehrerer Kriterien wie Lokalisation, Tumorstadium, sowie histologischer Klassifikation nach Laurén. Dabei wird in der S3-Leitlinie die laparoskopische Operation der offenen vorgezogen (10).

Bestrahlung

In einer randomisierten Phase 3 Studie verglichen Cats et al. Patienten mit neoadjuvanter Chemotherapie und chirurgischer Behandlung zum einen mit adjuvanter Chemotherapie, und zum anderen mit adjuvanter Radiochemotherapie. Im Rahmen dieser CRITICS-Studie konnte kein Überlebensvorteil für die bestrahlten Patienten festgestellt werden (66).

Soon et al. kamen in einer Metaanalyse zu dem Ergebnis, dass nach chirurgischer Intervention eine Radiochemotherapie gegenüber der alleinigen neoadjuvanten Chemotherapie einen Überlebensvorteil bringt. Jedoch waren diese Patienten im Gegensatz zur CRITICS-Studie nicht neoadjuvant mit Chemotherapie behandelt worden (67).

In ihrer Beobachtungsstudie von Patienten mit D2 Lymphknotenentfernung, konnten Kim et al. einen deutlichen Überlebensvorteil für Patienten mit adjuvanter Radiochemotherapie nachweisen (68).

Die S3-Leitlinie nimmt als Schlussfolgerung der komplexen Datenlage bei neoadjuvanter Therapie und R0-Resektion sowie D2-Lymphadenektomie eine Radio- oder Radiochemotherapie nicht als Standardprozedere.

Jedoch sollte bei Ausbleiben einer neoadjuvanten Therapie eine adjuvante Radio- oder Radiochemotherapie erwogen werden. Im Falle einer Lymphadenektomie mit fortbestehendem Risiko sollte die Radiochemotherapie als mögliche adjuvante Therapie im Tumorboard entschieden werden (10).

Medikamentöse Behandlung

Die rein Medikamentöse Behandlung ist nach aktueller Datenlage nur in der palliativen Behandlung des Magenkarzinoms angebracht. Die Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Magenkarzinoms ist eine Kombinationstherapie aus Platin und Fluoropyrimidin haltiger Chemotherapie. Eine mögliche Alternative ist die Kombination aus Irinotecan und Fluoropyrimidin. Diese Kombination kann im Rahmen einer Platinunverträglichkeit in Off-Label-Use eingesetzt werden (57, 69, 70).

Als Alternative zu den Doublet-Chemotherapien, steht eine Triplet-Therapie aus Docetaxel mit Platinhaltiger, sowie Fluoropyrimidinhaltiger Zytostatika zur Verfügung. Diese erweiterte Kombination führt zu einem besseren Überleben, jedoch auf Kosten der Nebenwirkungen (57, 71, 72).

Bei allen Magenkarzinomen sollte der HER-2neu Status erhoben werden (73). Patienten mit positiven HER-2neu Status erhalten als Konsequenz eine Therapie mit platinhaltiger und fluoropyrimidinhaltiger Chemotherapie, ergänzt durch Trastuzumab (57, 74). Diese Ergänzung führte zu einem signifikant besseren Ansprechen auf die Therapie, sowie eine Verbesserung des Überlebens (75, 76).

Im Rahmen eines Rezidives, welches nach mehr als 3 Monaten nach Beendigung der Erstlinientherapie eintritt, ist eine Wiederholung der Erstlinientherapie in Betracht zu ziehen (77). Alternativ kann eine Zweitlinientherapie eingeleitet werden, wenn es innerhalb von 3 Monaten nach Ersttherapie zu einem Rezidiv kommt. Im Rahmen dieser steht eine Monotherapie mit Docetaxel, Paclitaxel und Irinotecan zur Verfü-

gung, welche ein besseres Überleben der Patienten begünstigt. (78) Als weitere Option ist Ramucirumab, ein VEGFR-2-Antikörper, eine effektive zugelassene Monotherapie (79, 57).

2.1.6 Klassifikation

2.1.6.1 Grading

Der Grad der histologischen Differenzierung wird in 4 Kategorien eingeteilt:

- G1: hoch differenziert
- G2: mäßig differenziert
- G3: gering differenziert
- G4: undifferenziert / kleinzellig (2).

2.1.6.2 Klassifikation nach WHO

Die WHO Klassifikation nimmt die histologische Differenzierung zur Grundlage ihrer Einteilung. Dabei orientiert sich die Einschätzung an der dominant vorliegenden Histologie. Unterschieden werden tubulär, papillär, muzinös und gering kohäsiv bzw. das Siegelringzellkarzinom (57, 80).

2.1.6.3 Adenocarcinoma oft he Esophagogastric Junction

Eine Einteilung des Magenkarzinoms ist nach mehreren Kategorien üblich. Zum einen nach der Lokalisation des Befundes. Dafür wird die „Adenocarcinoma oft he Esophagogastric Junction“ Klassifikation genutzt. Zum anderen ist die Unterteilung anhand histologischer Kriterien möglich (2).

2.1.6.4 Laurén-Klassifikation

Dabei werden die Adenokarzinome, welche einen Anteil von ungefähr 90% aller Magentumore ausmachen, mittels der Laurén-Klassifikation anhand ihres Wachstumsmusters unterteilt. Hier unterscheidet man ein intestinales Wachstum mit Häufung bei Präkanzerosen, von dem diffusen Typ mit vermutlich ausgeprägter genetischer Komponente sowie einen Mischtyp (2, 81).

2.2 Der Tumorstammzellmarker CD133, Cluster of differentiation 133

2.2.1 Tumorentstehung

Über die Entstehung von Krebs gibt es nach aktueller Lehrmeinung zwei Theorien. Auf der einen Seite steht das monoklonale Modell nach Nowel. Nach dieser Theorie haben alle Tumorzellen die gleichen Fähigkeiten und Eigenschaften. Folglich hat jede Zelle das Potential zur Ausbildung einer malignen Neoplasie und damit zur Krebsentstehung. (82) Im Gegensatz dazu steht das Tumorstammzell-Modell. In dieser Annahme geht man davon aus, dass der Ursprung der malignen Neoplasie von einigen einzelnen Tumorstammzellen ausgeht. (83) Diese Theorie postuliert ein hierarchisches Modell, in dem lediglich die Tumorstammzellen zur Ausbildung des Tumors befähigt sind. Gestützt wird diese Theorie durch die daraus resultierende mögliche Erklärung für Rezidive nach einer Therapie. So kann sich trotz Chemotherapie und/oder chirurgischer Intervention aus einigen wenigen verbliebenen, und womöglich gegen Zytostatika resistenten, Stammzellen erneut eine maligne Neoplasie bilden (84).

Induziert werden kann die Ausbildung eines Karzinoms durch äußere Umwelteinflüsse auf die entsprechenden Zellen. Beispiele hierfür sind ionisierende Strahlung, Viren, chemische Noxen oder Gewebsverletzungen. Diese können darüber hinaus ebenfalls die Malignität des Tumors beeinflussen (85).

2.2.2 Stammzellen vs. Tumorstammzellen

Nahezu alle Gewebe im menschlichen Organismus unterliegen einem Art Verschleiß. Daher ist es nötig, dass sich Zellen erneuern können. Ein prominentes Beispiel sind die Zellen der Darmschleimhaut. Diese stehen unter chemischer wie auch physikalischer Belastung und sind auf eine Neoplasie angewiesen. Voraussetzung dafür sind Stammzellen. Diese sind dazu befähigt sich stetig zu teilen und neue spezialisierte Zellen zu bilden (86).

Tumorstammzellen haben ähnlich Eigenschaften wie gesunde Stammzellen. Sie sind in der Lage sich selbst zu erneuern, wodurch sie über eine lange Lebenszeit verfügen. Weiter haben sie - wie auch die gesunde Stammzelle - die Fähigkeit sich in spezialisierte Zellen zu differenzieren. Dies befähigt die Tumorstammzellen zur Ausbildung neuer Zellpopulationen. (86)

Normale Stammzellen und Tumorstammzellen weisen ebenfalls in ihren Oberflächenproteinen große Ähnlichkeiten auf. Dies spricht für eine Entstehung von Tumorstammzellen aus normalen Stammzellen durch eine Transformation, beeinflusst durch genetische sowie epigenetische Faktoren (87).

Tumorgewebe stellt sich sehr heterogen dar (88). Dies liegt zum einen an der Vielfalt verschiedener phänotypischer Ausprägungen und zum anderen an der zuvor beschriebenen Fähigkeit der Differenzierung (89, 90). Besonders das Magenkarzinom ist von solch einer Heterogenität betroffen, was die Identifizierung von Tumormarkern oder anderen Angriffspunkten für eine gezielte Krebstherapie zusätzlich erschwert (91, 92).

Eine weitere relevante Eigenschaft ist die vielfältige Ausprägung von Resistenzen und Abwehrmechanismen gegen Zytostatika. Dabei handelt es sich u.a. um folgende Mechanismen:

- **Membrantransporter:** Pumpen, wie das Multi-Drug-Resistance-Protein 1 (MDRP-1 oder ABCB1) an der Zellmembran, ermöglichen es der Tumorzelle aufgenommene Substanzen wieder aus der Zelle hinauszubefördern (93).
- **Immunität gegen freie Sauerstoffradikale (ROS):** mit steigendem Zellalter reichern sich toxische Sauerstoffradikale in Zellen an und schädigen die DNA. In Tumorstammzellen konnte, im Vergleich zu ähnlich alten Zellen eine erniedrigte Konzentration an Radikalen gemessen werden (94).
- **Quieszenz:** Wenn andere Abwehrmechanismen gegen Zytostatika versagen, kann die Tumorzelle vorübergehend ihren Stoffwechsel herunter regulieren. Sie befindet sich für diesen Zeitraum in der G0-Phase des Zellzyklus (95).
- **Hohe Plastizität:** Normale Tumorzellen können durch Umweltfaktoren zur Wandlung in Tumorstammzellen induziert werden (96, 97).

In Experimenten an Mauszelllinien konnte gezeigt werden, dass Tumorstammzellen aus Teratomen, welche in Blastozysten eingebracht wurden, diese zur Bildung von neuen Geweben induzierten (98).

2.2.3 Tumorstammzellmarker

Ein Großteil der bis heute beschriebenen Stammzellmarker sind Proteine. Lediglich ein geringer Anteil sind glykierte Proteine oder glykierte Lipide (99). Die an Oberflächenstrukturen anhängenden Polysaccharide sind in malignen Stammzellen häufig verschieden zu denen der normalen Stammzellen (100). Folglich tragen Tumorstammzellen eigene spezifische Glykierungen, welche als Tumorstammzellmarker dienen können (99).

Einzelne Tumorstammzellmarker haben sich als nicht ausreichend spezifisch für bestimmte Tumorentitäten erwiesen (82). Jedoch zeigte sich die Kombination mehrerer Tumormarker als valider Nachweis bestimmter Tumorphänotypen (101). So konnte anhand von Ovar-Karzinomen der diagnostische Mehrwert durch Bestimmung von ALDH1 und CD133 gezeigt werden (102).

Obwohl es viele Gemeinsamkeiten in der Expression von Stammzellmarkern in malignen und normalen Stammzellen gibt, lassen sich in malignen Stammzellen gewisse Variationen der Marker erkennen (99). Es zeigt sich beispielsweise eine vermehrt Ausprägung von Stammzellmarkern (103), bestimmter Mutationen (103), oder es werden gleiche Strukturen in abgewandelter Form präsentiert (Isotypen) (104, 105).

Wegen der grundsätzlich bestehenden großen Ähnlichkeit von Stammzellen und Tumorstammzellen in ihrem Phänotyp und deren Eigenschaften ist eine Unterscheidung zwischen diesen nicht immer möglich. Ansätze in der Krebstherapie sind gezielt gegen Tumorstammzellen gerichtete Substanzen. Somit ergibt sich ein bedeutendes wissenschaftliches Interesse an der Detektion von Stammzell- und speziell von Tumorstammzellmarkern. Besagte dienen als Angriffspunkt für einige Therapien, unter anderem zur Vermeidung von Rezidiven. In den letzten Jahren wurden bereits einige Möglichkeiten detektiert, um Tumorstammzellen zu identifizieren, wie beispielsweise im kolorektalen Karzinom (83, 106). Zu erwähnen ist in diesem Kontext die Plastizität der Tumorzellen. Diese befähigt nicht-Stammzellen die Transition in Tumorstammzellen. Daher vermutet man die therapeutische Elimination von nicht-Stammzellen und Stammzellen als elementaren Therapieansatz (96).

Zusätzlich zum möglichen therapeutischen Nutzen ist bei bestimmten Karzinomen anhand von Tumorstammzellmarkern eine Prognose über die Tumordignität vorhersehbar. So konnten beispielsweise Wakamatsu et al. in ihren Forschungen über das Magenkarzinom für Tumoren mit Expression von CD133 und CD44 ein signifikant

schlechteres Überleben im Vergleich zu Geweben ohne besagte Marker zeigen (107). Auch in Pankreaskarzinomen konnte bei Vorliegen von CD133 ein erhöhtes tumoröses, sowie Metastasierungspotential gezeigt werden (108).

Besagte Erkenntnisse qualifizieren Tumorstammzellmarker zu potentiell wichtigen prognostischen aber auch therapierelevanten Gegenständen der aktuellen Forschung (106).

2.2.4 Das CD133 Molekül

Das „Cluster of differentiation 133“ (CD133), auch bekannt als Prominin-1, ist ein immunphänotypisches Oberflächenantigen aus Glykoproteinen. Entdeckt und beschrieben wurde es das erste Mal 1997 von Yin et al. in hämatopoetischen Stammzellen (109). Kodiert wird dieses durch ein Gen auf Chromosom vier (4p15.33). CD133 ist ein 5-Multipass-Transmembranprotein aus 865 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 120kDa. Der Amino-Terminus ist extrazellulär lokalisiert, der Carboxy-Terminus befindet sich intrazellulär (110).

Darüber hinaus besitzt das Molekül unter anderem die Epitope AC133 und AC141. Diese sind extrazellulär gelegene Epitope, welche potenziell glykosyliert werden können. Diese Epitope sind häufig genutzte Marker, um Tumorstammzellen in Gewebeproben zu identifizieren, darunter auch solide Tumore (111).

Erwähnenswert ist darüber hinaus die Entdeckung eines Proteins, welches dem CD133 in seiner Morphologie sehr stark ähnelt. Dieses wird jedoch in einem anderen Gen codiert. Daher bekam dieses Protein den Namen „prominin related protein“ (112).

2.2.4.1 Physiologie des CD133

Die Expression von CD133 ist variabel und unterliegt intra- und extrazellulären Signalen. Hierbei ist ein elementarer Trigger die Hypoxie. In Tumorgewebe ist, im Vergleich zu gesundem Gewebe, ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck messbar (113). Weiter ist eine erhöhte Lactatkonzentration festzustellen. Daraus resultieren paradoxer Weise ein gesteigertes Tumorwachstum, sowie eine zunehmende Metastasierung (114, 115). Durch beschriebene Hypoxie kommt es zu einer vermehrten Expression von CD133, sowie zu einer Induktion der Stammzeleigenschaften (116).

Dies geschieht unter anderem über den Transkriptionsfaktor HIF1 α . Dieser aktiviert Signalkaskaden welche die Selbsterneuerung der Tumorstammzellen steigern (116-118).

Neben der Steigerung von HIF1 α und dem CD133 selbst, liegt durch den niedrigen Sauerstoffgehalt das Epitop AC133 vermehrt vor. Die Modulation dieses Epitops kann ohne mRNA oder Translation ablaufen, und somit neben der Transkription auch nicht-transkriptional erfolgen. In der Untersuchung von Gliom-Tumoren konnte bereits frühzeitig anhand des vermehrten Vorliegens von AC133 eine erhöhte Malignität, eine erhöhte Therapieresistenz und damit auch ein schlechteres Überleben bestimmt werden (119). Durch die Hypoxie ergibt sich eine veränderte mitochondriale Aktivität. Als Schlussfolgerung daraus lässt sich die CD133 Expression in Glioblastomen als Marker für zellulären Stress bestimmen (120).

Ein weiterer Regulationsmechanismus der CD133 Expression ist das Tumorsuppressorprotein p53. Dieses beeinflusst die Ausbildung bereits auf transkriptionaler Ebene. Dort bindet es zum einen selbst an dem entsprechenden Promotor, zum anderen induziert es die Histondeacetylase 1 (HDAC1), welche ihrerseits den Promotor und die Transkription beeinflusst (121). Zusätzlich wirken auch klassische Transkriptionsfaktoren auf die Expression. Hierbei ist der Faktor „Ikaros“ hervorzuheben, welcher als Inhibitor durch direkte Bindung an den CD133 Promotor P1 wirkt (122).

Neben der HDAC1 wirken noch andere epigenetische Faktoren durch Veränderung der Histone auf die Transkription. So konnten Min et al. anhand von Ovarialkarzinomen einen Zusammenhang zwischen der Menge an exprimierten CD133 und der Methylierung des CD133 Promotors P2 feststellen (123). In Gastrointestinalen Stromatumoren konnten Gedert et al. die Hypomethylierung der CD133 Gene als negativen prognostischen Faktor erarbeiten (124).

Die Wirkung von CD133 als Ziel einer Therapie konnte bereits in mehreren Arbeiten als potenziell wirksam nachgewiesen werden. So gelang es Smith et al. *in vitro* Tumorzellen (Magenkarzinom und hepatozellulären Karzinom) mit Anti-CD133-AK zu behandeln und dadurch ein Tumorwachstum zu hemmen, sowie Apoptose zu induzieren (125).

Darüber hinaus konnte in verschiedenen Studien erarbeitet werden, dass die Expression von CD133 nicht auf Stammzellen beschränkt ist. Außerdem konnte sowohl in CD133 positiven als auch in CD133 negativen metastasierten Kolonkarzinomen

die Fähigkeit zur Ausbildung maligner Neoplasien gezeigt werden (126-128). Auch in normalen Geweben des Magens konnten in drüsenhaltigen Arealen gesunde Stammzellen mit CD133 nachgewiesen werden (129, 130).

2.2.5 CD133 in verschiedenen Tumoren

2.2.5.1 Kolon

In Kolorektalen-Adenokarzinomen konnte ein Zusammenhang zwischen CD133 Expression, Tumordifferenzierung und Größe gezeigt werden. (131) Darüber hinaus ist der Nachweis von CD133 in Kolonkarzinomen ein aussagekräftiger Faktor über das Rezidivrisiko, sowie die Ansprechrate auf Chemotherapie, welche bei Positivität sinkt (132).

Jedoch fanden Shmelkov et al. im Rahmen ihrer Arbeit an Kolonkarzinomen sowohl CD133 positive als auch negative Zellen, welche das Potential hatten, maligne Neoplasien zu bilden. Folglich ist zu vermuten, dass CD133 allein kein zuverlässiges Merkmal zu Identifizierung von Tumorstammzellen zu sein scheint (126).

2.2.5.2 Leber

Im hepatozellulären Karzinom ist ebenfalls eine schlechtere Ansprechrate auf Chemo- und Radiotherapie in CD133 positiven Geweben beschrieben. Erhöhter oxidativer Stress führt zu einer gesteigerten Expression von CD133 und erhöht die Resistenz der Tumorzellen gegen ROS. Daraus ergibt sich eine verringerte Ansprechrate auf Zytostatika (133).

2.2.5.3 Schilddrüse

Auffallend ist die Assoziation von CD133 Expression in adulten Schilddrüsenkarzinomen mit Tumorgöße, Lymphknotenmetastasen und BRAF-Mutationen, welche im Gegensatz dazu bei juvenilen Karzinomen in keiner Korrelation zu stehen scheint (134).

2.2.5.4 Plattenepithelkarzinome

Ähnlich wie beim Kolorektalen Karzinom ist auch das Plattenepithelkarzinom in Kombination mit CD133 Expression durch eine schlechte Differenzierung und ungünstigen Prognose gekennzeichnet (135).

2.2.5.5 Magen

Die Korrelation von CD133 positiven Tumoren und klinischen Parametern war im Fall des Magens bereits Gegenstand verschiedener Studien.

Ishigami et al. untersuchten eine Population mit 28% CD133 positiven Tumoren. In dieser Arbeit wurde keine Differenzierung in Färbemustern durchgeführt. Erfasst wurde neben dem CD133- auch der des CD44-Status. Als Ergebnis präsentierten die Autoren ein erhöhtes Risiko für Tumorprogression, eine tiefere Invasion von umliegenden Strukturen sowie vermehrte Lymphknotenmetastasen. Zusammenfassend gehen Ishigami et al. von einer schlechteren Prognose bei CD133 positiven Tumoren aus (136).

Ebenso wie Ishigami et al. erfassten auch Nosrati et al. in ihrer Studie neben CD133 auch CD44. Ungefähr 50% der Patienten waren positiv auf CD133. Als Ergebnis präsentierten die Autoren eine signifikante Assoziation von Tumorgroße, sowie Differenzierung. Jedoch konnte in dieser Arbeit keine Assoziation mit vaskulärer oder lymphogener Invasion gezeigt werden (137).

Eine weitere Arbeit von Hashimoto et al. untersuchte neben Korrelationen zu klinischen Parametern auch das Auftreten von HIF1 α . In ihrem Kollektiv wurden 30% der Patienten als positiv gewertet, wobei die Autoren eine Unterteilung von zytoplasmatischer und luminaler Färbung vornahmen. Für die als zytoplasmatisch bewerteten Tumore konnte eine intensivere Progression, höhere Metastasierung, gesteigerte Vaskularisierung sowie erhöhte Chemotherapieresistenzen beobachtet werden (138).

Mit einem Anteil von 57% CD133 positiven Neoplasien konnten Zhao et al. CD133 als möglichen prognostischen Faktor erarbeiten. In ihrer Studie beschrieben die Forscher eine wahrscheinliche Korrelation von Tumorgroße, tieferer Invasion, sowie einem ungünstigeren Grading mit einer geringeren Überlebensrate (139).

In einer Metaanalyse von 8 Studien - darunter auch Zhao, Hashimoto, Ishigami - konnten Yiming et al. schließlich Korrelationen von CD133 positiven Tumoren und klinischen Parametern herausarbeiten. Bei diesen klinischen Parametern handelte es sich um ein gesteigertes Metastasierungspotentials (Lymphknoten und Fernmetastasen), niedrigere Fünf-Jahres-Überlebensraten, erhöhte Resistenzen gegen Chemotherapien, sowie höheren Rezidivraten (140).

3 Material und Methoden

3.1 EXPAND-Studie

Bei der sog. "EXPAND"-Studie handelt es sich um eine open-label randomisierte und kontrollierte Phase III Studie. Ziel der Studie war es, den Unterschied zwischen der herkömmlichen Therapie mit Capecitabin und Cisplatin und einer erweiterten Therapie mit Cetuximab mit Chemotherapie (Capecitabin und Cisplatin) zu untersuchen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 504 Patienten aus der EXPAND-Studie mittels ihrer klinischen Daten sowie anhand von Gewebeproben auf das Anspringen von Tumormarkern untersucht.

3.1.1.1 Organisation Arbeitsschutz

Die EXPAND-Studie wurde im Zeitraum von Juni 2008 bis Dezember 2010 durchgeführt.

Die Patienten wurden gemäß Datenschutzrichtlinien aufgeklärt und bestätigten dies mit einer schriftlichen Einverständniserklärung. Unter Berücksichtigung ethischer Aspekte, wurde die EXPAND-Studie durch die Ethikkommission überprüft und legitimiert. Zur Überwachung der Patientensicherheit wurde ein unabhängiges Gremium installiert.

3.1.2 Gewinnung des Patientenkollektiv

3.1.2.1 Einschlusskriterien

In der Auswahl des Patientenkollektivs wurden nur Erwachsene (Alter über 18 Jahren) beider Geschlechter in weltweit verteilten Krankenhäusern, wie auch Universitätskliniken rekrutiert.

Die pathologischen Voraussetzungen waren ein histologisch gesichertes Adenokarzinom in Magen oder am gastroösophagealen Übergang. Jene Tumore mussten entweder als lokal fortschreitend und damit unter Ausschluss einer Resektabilität eingestuft sein, ohne Metastasierung (M0), oder nach TMN-Klassifikation als bereits metastasiert (M1) diagnostiziert sein. Des Weiteren war das Vorhandensein von Tumormaterial für weitere molekularbiologische Untersuchungen, wie unter anderem die Bestimmung des EGFR-Rezeptors, zwingend erforderlich. Weiter musste in der

radiologischen Untersuchung eine definierbare Läsion des Magens vorhanden sein, um darüber eine Verlaufskontrolle durchführen zu können. Der physische Zustand der Patienten wurde anhand des ECOG Performance Status eingeschätzt und auf 0-1 mit adäquater Organfunktion festgelegt.

Vorbehandelte Patienten durften im Voraus keine Chemotherapie auf Grund eines metastasierten oder nicht resektablen lokal fortgeschrittenen Magenkarzinoms erhalten haben. Bei anderen Tumorentitäten, welche mittels Chemotherapie behandelt wurden, musste jene Behandlung mindestens 1 Jahr von Beginn der Studie zurückliegen. Auch durfte im Rahmen dieser vorangegangenen Therapie eine Dosis von 300 mg/m² Cisplatin nicht überschritten worden sein. Zusätzlich durften die potenziellen Teilnehmer zu keinem Zeitpunkt eine medikamentöse Therapie gegen den EGF-Rezeptor oder VEGF-Rezeptor erhalten haben.

3.1.2.2 Ausschlusskriterien

Die Ausschlusskriterien dieser Studie waren vielfältig. Zum Ausschluss führten z.B. kardiale Vorerkrankungen wie koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz, Kardiomyopathie, Arrhythmien oder das Erleiden eines Herzinfarktes in den vergangenen 12 Monaten. Weitere Kriterien waren Hirnmetastasen oder maligne Erkrankungen in den vergangenen 5 Jahren. Ebenfalls zum Ausschluss führte eine immunologische oder hormonelle Behandlung. Das Vorliegen oder der Verdacht auf eine Schwangerschaft, sowie Stillen führten zum Ausschluss. (Eine detaillierte Auflistung befindet sich im Anhang.)

3.1.2.3 Patienten in der Studie

Insgesamt konnten 904 Patienten in die Studie eingeschlossen und behandelt werden.

3.1.3 Randomisierung

Die Probanden wurden aus der Gruppe der Patienten durch eine zufällige Auswahl bestimmt. Diese Randomisierung erfolgte computergestützt 1:1 mittels einer Blockauswahl. Hierbei wurden folgende Variablen definiert:

- Krankheitsstadium M1 oder M0,
- Vorliegen einer adjuvanten/neoadjuvanten Radio und/oder Chemotherapie: ja oder nein,
- Gastrektomie / Ösophagektomie: ja oder nein.

3.1.4 Behandlung

Die Behandlung der randomisierten Patienten erfolgte in 2 Kategorien.

Therapie A beinhaltete eine orale Applikation von 1000 mg/m² Capecitapin zweimal täglich für die ersten 15 Tage. Zusätzlich erhielten die Patienten dieser Gruppe eine einmalige intravenöse Applikation von 80 mg/m² Cisplatin am ersten Tag.

Therapie B erfolgte in der Chemotherapie exakt gleich wie Therapie A, jedoch wurde diese durch die wöchentliche Gabe von 400 mg/m² Cetuximab in der ersten und 250 mg/m² in den folgenden Wochen ergänzt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 504 Patienten aus der EXPAND-Studie mittels ihrer klinischen Daten sowie anhand von Gewebeproben untersucht.

3.1.5 Therapieende

Ein Therapieende erfolgte zu jeder Zeit auf Patientenwunsch.

Weitere Kriterien waren die radiologisch gesicherte Tumorprogression. Hierzu erfolgte beginnend mit dem ersten Tag der Behandlung eine radiologische Untersuchung mittels bildgebender Verfahren des Thorax sowie des Abdomens im Intervall von 6 Wochen.

Ebenfalls zum Abbruch der Therapie führte das Auftreten von klinisch gravierenden Nebenwirkungen. In diesem Fall war gemäß Studienprotokoll eine Dosisreduktion möglich. Zeigte diese keine Wirkung oder schlossen andere Faktoren eine Weiterbehandlung gemäß Therapie der entsprechenden Gruppe aus, so war für Therapieschema A eine Monotherapie mit Cetuximab möglich.

Ebenfalls konnten Patienten aus Therapie B eine Behandlung ausschließlich mit Chemotherapie fortsetzen. In beschriebenen Szenarien galten die gleichen Abbruchkriterien wie bei geplanter Therapie.

Weitere Endpunkte der EXPAND-Studie waren:

- Primär: Progressionsfreies Überleben
- Sekundär: Gesamtüberleben, bestes Gesamtüberleben, Best Overall Response, Lebensqualität, Sicherheit.

3.1.6 Bewertung

Die Bewertung des Therapieerfolges, bzw. des Tumoransprechens erfolgte anhand der „Response Evaluation Criteria In Solid Tumors“ (RECIST) Kriterien. Die Nutzung dieser international anerkannten Leitlinie sollte eine Objektivität der Auswertung gewährleisten. Eine Bewertung erfolgte 4 Wochen nach Ansprechen des Tumors auf die jeweilige Therapie.

(141)

3.2 Material

3.2.1 Immunhistochemie

- Merck: Rabbit anti-CD-133 (Anti-PROM1 antibody), HPA004922 Sigma, pH 7,2
- Dako: EnVision™ Flex Peroxidase-Blocking Reagent, DM821
- Dako: EnVision™ Flex DAB + Chromogen DM827
- Dako: EnVision™ Flex Substrate Buffer, DM823
- Dako: EnVision™ Flex Target Retrieval Solution, Low pH K8005 (verdünnt mit Aqua dest.)
- Dako: EnVision™ Flex Wash Buffer, DM831
- Dako: EnVision™ Flex Antibody Diluent, K8006
- Dako: EnVision™ Flex + Rabbit (LINKER), K8019
- Dako: REAL™ Hematoxylin, S2020
- SAV Liquid Production GmbH: Ethanol 99%, 96%, 70%, 50%
- SAV Liquid Production GmbH: Xylol
- Medizintechnik Universitätsmedizin Mainz: Aqua dest.
- VWR International: Entellan

3.2.2 Laborgerät

- Eppendorf: Pipetten Eppendorf Reference® 0,5-10 µl, 10-1000 µl, 100-1000 µl
- VWR: Messzylinder 250 ml, 1000 ml
- VWR: Glasküvetten
- VWR: Metallbügel
- VWR: Hitzebeständige Küvetten

3.2.3 Laborgerät - Elektrogeräte

- Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co.KG: Brutschrank Heraeus Function Line B6 / Heraeus T 6060
- Braun GmbH Kronberg: Dampfgarar Braun 3216
- Dako: Färbeautomat für Immunhistochemie DAKO Cytomation Autostainer Plus
- Mediate GmbH: Kühlplatte Tissue Cool Plate COP 30
- Liebherr: Kühlschrankschrank FKS 3600

3.2.4 Mikroskopie

- Olympus: Lichtmikroskop Olympus BX 52
- SuperFrost®: Objektträger
- Knittel Glass: Deckgläser 24x50 mm

3.3 Methoden

3.3.1 Immunhistochemische Färbung allgemein

Eine immunhistochemische Färbung kann zur Markierung oder dem Nachweis eines bestimmten Antigens genutzt werden. Das zu untersuchende Material kann u.a. in Form einer Gewebeprobe oder als Zellkultur vorliegen. Grundsätzlich basiert benannte Färbung auf dem Prinzip der Reaktion zwischen spezifischen Antikörper und entsprechenden Antigenen. Bei einer solchen Bindung kann anschließend mittels eines Detektionssystems eine Färbung bestimmter Zellen durchgeführt werden. Die Durchführung einer solchen Färbung verlangt einige spezifische Prozesse.

Sollten die zu untersuchenden Zellen fixiert sein, so muss diese Fixierung zunächst entfernt werden, um das Gewebe aufnahmefähig zu machen. Eine gängige Methode der Fixierung ist die Paraffin-Fixierung. Solch eine Fixierung muss mittels Lösungsmittel bzw. Alkohol entfernt werden, und das Gewebe wieder rehydriert werden.

Abhängig von dem zu detektierenden Antigen, kann eine Demaskierung nötig sein. Ein Antigen kann beispielsweise im Zellkern vorliegen und dort dem Antikörper unzugänglich sein. In diesem Fall wäre bei Zugabe des Antikörpers keine auswertbare Färbung zu erwarten. Abhängig von dem zu untersuchenden Antigen, kann eine Behandlung mit Citratpuffer, Proteinkinase K, Trypsin, Pepsin oder ähnlichen Substanzen das Antigen dem Antikörper zugänglich machen.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle stellen endogene Peroxidasen im zu untersuchenden Gewebe dar. Diese können mit dem Chromogen reagieren und eine unspezifische Färbung des gesamten Gewebes verursachen. Es kommt zu einer Hintergrundfärbung. Daher ist es vor allem bei Zellen welche reich an Enzymen sind, wie beispielsweise Hepatozyten, notwendig eine Blockierung der endogenen Peroxidasen durchzuführen. Dies erfolgt durch eine Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid.

Ein weiterer notwendiger Prozess ist die spezifische Blockierung. Ein Antikörper bindet mit seinem Paratop an Sequenzen von ungefähr 10-12 Aminosäuren. Dadurch kann ein Antikörper auch an andere Proteine binden, wenn jene zufällig eine gleich, oder zumindest sehr ähnliche Aminosäuresequenz haben. Um diese ungewollten Bindungen zu vermeiden, erfolgt eine Blockierung derer Antigene, welche nicht detektiert werden sollen. In dieser Arbeit wurde eine solche Blockierung mittels „Flex

Block“ durchgeführt. Derartige Lösungen werden von Firmen gemeinsam mit den entsprechenden Antikörpern verkauft, und sind auf jenen angepasst.

Zur Auswahl eines passenden Antikörpers ist es zwingend notwendig das zu detektierende Antigen zu kennen. Weiter sind primäre von sekundären Antikörpern zu unterscheiden. Ein primärer Antikörper bindet mit seinem Paratop unmittelbar an das definierte Antigen. Der F_c -Teil entspricht dem Spenderorganismus, wie beispielsweise Hase oder Ziege. Der Sekundärantikörper bindet mit seinem F_{ab} -Abschnitt an den F_c -Teil des primären AK spezifisch. So ist ein Sekundärantikörper in diesem Beispiel spezifisch gegen Hasen- oder Ziegen-Antikörper gerichtet.

In der eigentlichen Immunhistochemischen Färbung unterscheidet man eine direkte Form von der Indirekten.

Bei der direkten Methode sind die Enzyme der Nachweisreaktion direkt mit dem Primärantikörper konjugiert. Nach Zugabe des Substrates erfolgt eine Anfärbung der Epitope an die der Antikörper gebunden hat. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit in einem Durchgang mehrere verschiedene Antigene anzufärben.

Die indirekte Methode nutzt neben dem Primärantikörper noch mindestens einen weiteren Sekundärantikörper. In dieser Methode sind die Enzyme der Nachweisreaktion an den sekundären Antikörper gebunden. Somit kommt es zunächst zu einer Bindung des Primärantikörpers an das zu detektierende Antigen und einer Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper. Durch die Färbung des indirekt bindenden Antikörpers kann dieser mit weiteren Sekundärantikörpern oder Tertiärantikörpern zu Polymeren verbunden werden, um eine Intensivierung der Färbung zu erreichen und damit die Sensitivität zu steigern.

In dieser Arbeit wurde die indirekte Färbemethode angewandt.

Zur kontrastreicheren und anschaulicheren Darstellung erfolgt eine Gegenfärbung mit Hämalan. Dies färbt vor allem Zellkern, sowie Mitochondrien an und ermöglicht eine bessere Auswertung des Färbeergebnisses.

Im letzten Arbeitsprozess erfolgten eine Dehydrierung und Eindeckung des Gewebes. Dadurch werden die Präparate haltbar und resistent gegen Umwelteinflüsse. Die Zellen samt Färbung sind folglich wieder fixiert.

3.3.2 Immunhistochemische CD-133 Färbung

Im Rahmen der Auswertung der EXPAND-Studie, wurden der Arbeitsgemeinschaft „Translationale Forschung“ von Herrn Prof. Dr. Markus Möhler Objektträger mit Gewebeschnitten zur Verfügung gestellt. Diese Präparate waren in auf eine Dicke von 3µm geschnitten und in Paraffin fixiert.

Für die weiteren immunhistochemischen Aufarbeitungen wurden diese Präparate zunächst auf 37°C erhitzt, um die Fixierung zu erweichen.

Anschließend erfolgte die eigentliche Entparaffinierung mittels einer Auswaschung mit Xylol. Dieser Schritt erfolgte drei Mal über einen Zeitraum von jeweils 3 Minuten.

Im nächsten Schritt wurde das Gewebe mit einer absteigenden Alkoholreihe von 100%, 96%, 80%, 70%, 60%, 50% und einer abschließenden Bearbeitung mit Aqua dest. behandelt. All diese Schritte wurden über jeweils 3 Minuten durchgeführt.

Im darauffolgenden Prozess der Demaskierung wurden die Objektträger in einem Dampfgarer auf 96°C erhitzt. Im Verlauf wurden jene mittels 0,01 M TRS-Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6 für 35 Minuten weiter behandelt.

Im nächsten Schritt erfolgte eine Blockade endogener Peroxidasen. Dieser Prozess und weitere wurden mittels Autostainer durchgeführt. Für die Enzymblockierung wurde eine Flex Block Lösung verwendet. Ebenfalls mittels Flexblock Lösung erfolgte eine spezifische Blockierung von Antigenen.

Nun wurde dem Präparat die Primärantikörper hinzugefügt. Diese wurden zuvor mit Antibody Diluent auf eine Konzentration von 1:100 verdünnt. Im nachfolgenden Schritt wurde eine Inkubation über 120 Minuten durchgeführt. Abschließend wurde eine Waschung mit Dako Waschpuffer und Aqua dest. 1:20 durchgeführt.

Anschließend wurde der Sekundärantikörper „Anti-Rabbit-AK“ mit gebundener „Horse-Rabbit-Peroxidase“ hinzugefügt. Dies erfolgte durch Behandlung der Präparate mit der „Flex Envision“-Lösung. Um eine Intensivierung der Färbung zu erreichen, wurde ein Linker aus Polymer-Anti-Rabbit-AK verwendet. Auch nach diesem Prozess erfolgte abschließend eine Waschung mittels Dako Waschpuffer und Aqua dest.

Im darauffolgenden Schritt wurde als Chromogen „Flex DAB“ hinzugefügt, welches in Reaktion mit der HRP eine braune Färbung herbeiführte. Daraufhin erfolgte eine erneute Waschung.

Anschließend wurde eine Gegenfärbung mit zehnpromigen Hämalaun Chromogen durchgeführt. Dies war mit abschließender Waschung mittels Dako Waschpuffer der letzte Schritt im Autostainer.

Darauf folgte der Prozess der Dehydrierung. Hierzu wurde der Prozess der Rehydrierung in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Beginnend mit Aqua dest., mit aufsteigender Alkoholreihe von 50%-100% und anschließender Behandlung mit Xylol. All diese Schritte erfolgten wieder jeweils für 3 Minuten.

Im letzten Arbeitsschritt wurde das Präparat mit „Entellan“ eingedeckt und fixiert.

3.3.3 Bewertung der immunhistochemischen Färbung

Im Rahmen der vorangegangenen Recherche relevanter Publikationen, findet sich die Veröffentlichung „Prognostic Impact of CD133 Expression in Gastric Carcinoma“ von Sumiya Ishigami et al. In dieser Arbeit erfolgte eine Einteilung bzw. Auswertung der Präparate nach luminaler oder zytoplasmatischer Expression. Eine Skalierung der Intensität der Färbung wurde nicht vorgenommen.

Die Auswertung der Färbung erfolgt in dieser Arbeit angelehnt an die oben beschriebene Veröffentlichung. Angewandt wurde zunächst die Unterscheidung zwischen negativen und positiven Präparaten. Dabei wurden Präparate erst ab einer Färbung von mindestens 5% der Zellen als positiv gewertet. Bei zu erkennendem Tumor und keiner bzw. kleiner 5% Anfärberate der Zellen, wurde das Präparat als negativ eingeordnet.

Zusätzlich dazu, erfolgte eine Differenzierung der positiven Präparate anhand des Färbemusters in:

- überwiegend luminale Expression
- überwiegend zytoplasmatische Expression
- luminale und zytoplasmatische Expression.

Die Unterteilung der Präparate anhand der Intensität der Färbung konnte nicht durchgeführt werden. Die zusätzliche Beurteilung der Färbung erfolgte durch einen unabhängigen. Für die Patientendaten verblindeten Pathologen.

3.3.4 Statistische Auswertung

Die bei der histologischen Begutachtung erhobenen Daten wurden in einer Tabelle mit der Software Microsoft Excel erfasst. Jene Daten wurden im nächsten Schritt in eine SPSS Datenbank überführt. Hinzu kamen die entsprechenden klinischen Parameter. Die erhobenen Patientendaten waren mittels einer ID anonymisiert.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Statistikanalysesoftware „IBM SPSS Statistics“. Hierbei wurden mit Hilfe der Software die deskriptive Statistik, Kreuztabellen, sowie Korrelationen mittels exakten Test nach Fisher erstellt.

Darüber hinaus wurde im Rahmen von Überlebenszeitanalysen Kaplan-Meier-Diagramme erstellt. Die Überlebenszeit wurde definiert mit einem Startpunkt bei Einschluss in die Studie und Endpunkt mit dem Ableben bzw. dem letzten Kontakt des Patienten.

Statistische Zusammenhänge wurden durch Log-Rank-Testungen eruiert.

Bei allen statistischen Testungen galt ein p-Wert von kleiner 0,05 als relevant.

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik des Gesamtkollektivs

Im Rahmen der EXPAND Studie, welche weltweit mit 904 Teilnehmern durchgeführt wurde, stand in dieser Arbeit das Tumormaterial von 504 Patienten zur Verfügung. Von diesen 504 Präparaten konnten auf Grund von fehlendem Material, Metastasen statt des Primarius oder mangelhaften Tumorzellen bei 403 Präparaten eine CD133 Färbung evaluiert werden (siehe Kapitel 4.3).

Wie im Folgenden beschrieben, sind die 904 Patienten des Gesamtkollektivs in den gängigen klinischen-pathologischen Patientenparametern zum ausgewerteten Subkollektiv der CD133 gefärbten Magenkarzinomen identisch (siehe Tabelle 3).

Betrachtet man in diesem Subkollektiv die Altersverteilung, so findet man die früheste Manifestation eines Tumors mit 23 Jahren. Die späteste Diagnose erfolgte im Alter von 84 Jahren. Es ergibt sich ein mittleres Erkrankungsalter von ca. 59 Jahren. Dieser entspricht dem Altersmittelwert des Gesamtkollektivs der EXPAND-Studie, welcher mit 60 (18-84) Jahren angegeben ist (siehe Tabelle 4).

Tabelle 3: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - Geschlecht

Geschlecht	EXPAND-Kollektiv (n=904, Häufigkeit in Prozent)	Material-Kollektiv (n=504, Häufigkeit in Prozent)	Subkollektiv (n=403, Häufigkeit in Prozent)
weiblich	231 (25,5%)	137 (27,2%)	103 (25,6%)
männlich	673 (74,5%)	367 (72,8%)	300 (74,4%)

Tabelle 4: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - Alter

Alter	EXPAND-Kollektiv (n=904)	Material-Kollektiv (n=504)	Subkollektiv (n=403)
Minimum	18 Jahre	18 Jahre	23 Jahre
Maximum	84 Jahre	84 Jahre	84 Jahre
Mittelwert	58,7 Jahre	58,9 Jahre	59,1 Jahre
Standart-abweichung	11,5 Jahre	11,2 Jahre	11 Jahre

4.1.1 Herkunft

Ein Risikofaktor des Magenkarzinoms ist die Zugehörigkeit zu einer Risikopopulation wie beispielsweise die japanische Bevölkerung (26). Da es sich bei der EXPAND Studie um eine multizentrische, internationale Untersuchung handelt, besteht das Patientenkollektiv aus unterschiedlichen Nationalitäten. Dabei hat Deutschland mit 20% rekrutierten Patienten (im Subkollektiv) den höchsten Anteil. Den zweitgrößten Anteil haben Russland, Chile und Ungarn mit jeweils ca. 10%. Unterteilt man das Subkollektiv in die potenzielle Risikogruppe Asien und die restlichen Nationen, so ergibt sich ein Anteil aus Asien stammender Patienten von ca. 22%. Eine genauere Auflistung der Herkunftsländer der Patienten befindet sich im Anhang.

4.1.2 Chemotherapie

Die medikamentöse Behandlung der Patienten bildet einen weiteren Parameter der Studie, die insoweit zwischen Patienten mit reiner Chemotherapie (Capecitabin und Cisplatin) und Patienten mit einer kombinierten Therapie aus Capecitabin, Cisplatin und Cetuximab unterscheidet. Sowohl im Gesamt-, als auch im Subkollektiv ergibt sich eine Verteilung in die unterschiedlichen Therapiearme von ungefähr 50%. In 6 Fällen fehlte die Einteilung in eines der Therapieregime (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv – Therapie (CTX – Chemotherapie, Cap – Capecitabin, Cis – Cisplatin)

Therapie	EXPAND-Kollektiv (n=904)	Material-Kollektiv (n=504)	Subkollektiv (n=403)
CTX (Cap+Cis)	449 (49,7%)	246 (48,8%)	195 (48,4%)
Cetuximab + CTX	455 (50,3%)	250 (49,6%)	202 (50,1%)

4.1.3 Vorangegangene Operation

Schließlich wurde berücksichtigt, ob die eingeschlossenen Patienten bereits voroperiert waren. Hierbei wurden speziell lokal rezidierbare Adenokarzinome im oesophagealen und gastralen Bereich erfasst. Im Gesamtkollektiv belief sich der Anteil derart vorbehandelter Teilnehmer auf knapp 25%. In der immunhistochemisch untersuchten Gruppe betrug der Anteil ungefähr 23% (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - Vorangegangene Tumorresektion (OP – Operation)

Vorangegangene Tumorresektionen	EXPAND-Kollektiv (n=904)	Material-Kollektiv (n=504)	Subkollektiv (n=403)
OP nein	722 (79,9%)	381 (75,6%)	312 (77,4%)
OP ja	182 (20,1%)	123 (24,4%)	91 (22,6%)

4.2 Deskriptive Statistik der Histologie

4.2.1 Großpräparate und Biopsien

Für die experimentelle Untersuchung des Patientenkollektivs wurden sowohl Großpräparate als auch Biopsien zur Verfügung gestellt. Um diesen Parameter in die Auswertung der Ergebnisse einbeziehen zu können, wurde dieser für jedes Präparat erfasst. Daraus resultiert, sowohl im Material-Kollektiv als auch im Subkollektiv ein Anteil von ca. 65% für Biopsien. Der Anteil der Großpräparate liegt folglich in beiden Kollektiven bei etwa 35% (siehe Abbildung 5).

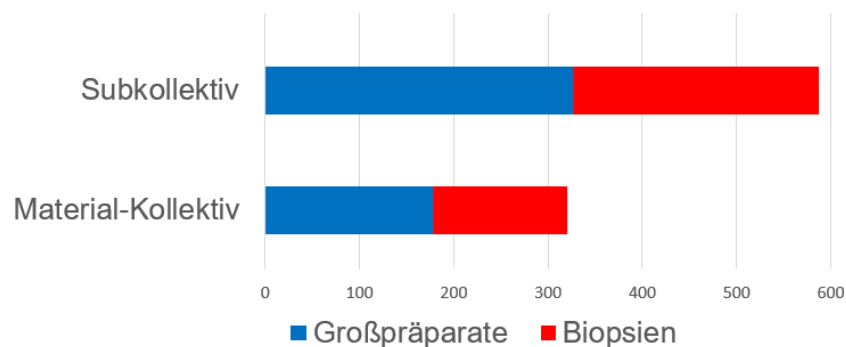


Abbildung 5: Balkendiagramm Deskriptive Statistik - Material

4.2.2 Primarius und Metastase

Die Gewebeproben wurden auf Ihren Phänotyp untersucht und in die Kategorien „Primarius“ und „Metastase“ aufgeteilt. Dabei ergab sich eine Gruppe von 383 (95%) Primarien. Folglich hatte die Gruppe der Metastasen mit 20 Fällen einen Anteil von 5% am Subkollektiv.

4.2.3 Histologische Klassifikation

Die Tumore wurden im Rahmen der Studie nach ihrer histologischen Klassifikation eingeteilt. Darunter erfolgte ebenfalls die Einteilung nach Laurén in den intestinalen, diffusen und gemischten Typen. Nach der Kategorisierung in Gesamt- und Subkollektiv ergab sich ein ähnliches Verteilungsmuster. So waren ca. 42% der Tumore dem intestinalen Typ zuzuordnen, 14% dem diffusen und 7% dem gemischten Typen. Bereits in der Datenerhebung der EXPAND-Studie konnten einige Tumore nicht in ein entsprechendes histologisches Wachstumsmuster eingeteilt werden. So fehlte auch in der Auswertung des Subkollektivs der CD133-Färbung bei 37% der untersuchten Materialien eine derartige Bestimmung (siehe Tabelle 7).

Ergebnisse

Tabelle 7: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - Histologische Klassifikation

Histologische Klassifikation	EXPAND-Kollektiv (n=904)	Material-Kollektiv (n=504)	Subkollektiv (n=403)
intestinaler Typ	311 (34,4%)	207 (41,1%)	169 (41,9%)
diffuser Typ	170 (18,8%)	80 (15,9%)	58 (14,4%)
gemischter Typ	50 (5,5%)	33 (6,5%)	27 (6,7%)

4.2.4 Grading

Ebenfalls erfolgte eine Abstufung nach Differenzierungsgrad in Form eines Gradings. Auch hier zeigten sich beide Kollektive mit sehr ähnlichen Zahlen. Somit ließen sich Grade 1 auf ca. 4% festlegen, Grade 2 auf 26% und Grade 3 auf 37%. Etwa 1/3 der Präparate waren keinem Tumor-Grading zuzuordnen. Diese Daten fehlten bereits in der Erfassung der EXPAND-Studie (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - Grading

Tumor-Grading	EXPAND-Kollektiv (n=904)	Material-Kollektiv (n=504)	Subkollektiv (n=403)
Grade 1	27 (3%)	17 (3,4%)	15 (3,7%)
Grade 2	200 (22%)	127 (25,2%)	106 (26,3%)
Grade 3	316 (35%)	193 (38,3%)	150 (37,2%)

Differenzierte man die Grading-Daten in Untergruppen mit Grade 1/2 und Grade 3, so ergab sich eine Verteilung von 121 Fällen und damit 30% in der Gruppe 1/2 im Gegensatz zu 150 und 37% in der anderen Gruppe.

4.2.5 Staging

4.2.5.1 T-Klassifikation

Im Zuge der Beurteilung der Infiltrationstiefe wurden die Tumore in die entsprechenden T-Stadien nach TNM-Klassifikation eingeteilt. Auch hier zeigten sich keine gravierenden Unterschiede im Verteilungsmuster zwischen dem Gesamt- und dem Subkollektiv. Dabei zeigte sich die Gruppe der Tumore mit Perforation der Subserosa und Infiltration benachbarter Strukturen (T4) mit knapp 26%. 29% der Tumore infil-

Ergebnisse

trierten die Subserosa, lediglich ohne diese zu durchbrechen. Die Muscularis propria befallend und damit Klassifikation T2 waren 7%. Klassifikation T1 bekamen 1%, als T0 wurden 9% eingestuft. Im Subkollektiv konnten zwei Fälle keiner T-Klassifikation zugeteilt werden (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - T-Klassifikation

T-Klassifikation	EXPAND-Kollektiv (n=904)	Material-Kollektiv (n=504)	Subkollektiv (n=403)
T0	65 (7,2%)	47 (9,3%)	36 (8,9%)
T1	10 (1,1%)	5 (1%)	4 (1%)
T2	71 (7,9%)	41 (8,1%)	28 (6,9%)
T3	269 (29,8%)	148 (29,4%)	118 (29,3%)
T4	199 (22%)	123 (24,4%)	103 (25,6%)
Tx	284 (31,4%)	132 (26,2%)	108 (26,8%)

Fasst man verschiedene T-Stadien in Gruppen, so ließen sich 71 Fälle (18%) als kleine Tumore (T1/T2) einteilen, wohingegen 222 (55%) im fortgeschrittenen T3 und T4 Stadium waren.

4.2.5.2 N-Klassifikation

Zur weiteren Beurteilung der Tumorausbreitung wurde der Lymphknotenstatus erhoben. Bei 14% der Patienten wurden mehr als 7 regionale Lymphknoten (N3) als befallen diagnostiziert. 3 bis 6 Lymphknotenmetastasen (N2) wurden bei 19% festgestellt. 1 bis 2 besagter Metastasen (N1) wurden bei 27% der Patienten erkannt. 11% waren frei von Lymphknotenmetastasen und damit als N0 beschrieben. Im Rahmen des Stagings konnten bei 28% keine Aussage über den Lymphknotenstatus getroffen werden (Nx). Vier Fälle im Subkollektiv konnten keiner N-Klassifikation zugeordnet werden (siehe Tabelle 10).

Ergebnisse

Tabelle 10: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - N-Klassifikation

N-Klassifikation	EXPAND-Kollektiv (n=904)	Material-Kollektiv (n=504)	Subkollektiv (n=403)
N0	82 (9,1%)	60 (11,9%)	46 (11,4%)
N1	206 (22,8%)	127 (25,2%)	108 (26,8%)
N2	166 (18,4%)	97 (19,2%)	77 (19,1%)
N3	147 (16,3%)	71 (14,1%)	56 (13,9%)
N3a	1 (0,1%)	1 (0,2%)	0 (0%)
Nx	296 (32,7%)	143 (28,4%)	112 (27,8%)

In Folge der weiteren Differenzierung ließen sich Untergruppen erstellen. Zum einen eine Untergruppe bestehend aus Fällen ohne Lymphknotenmetastasen (N0) bzw. nur geringer lymphogener Metastasierung (N1), und zum anderen diese mit fortgeschrittener lymphogener Metastasierung (N2/N3). Die Gruppe der nicht bzw. gering metastasierten Tumore (N0/N1) hatten mit 154 Fällen einen Anteil von ungefähr 38%. Ähnlich verhielt sich der Anteil der fortgeschrittenen Metastasierung (N2/N3) welche mit 133 einen Anteil von 33% ausmachten. So wiesen auch diese unterschiedlichen Kollektive keine bedeutsamen Unterschiede auf.

4.2.5.3 M-Klassifikation

Im Rahmen der klinischen Diagnostik wurde die hämatogene Aussaat in Form von manifestierten Metastasen beurteilt. In der direkten Gegenüberstellung zeigten Gesamtkollektiv und Subkollektiv keine beachtungswürdigen Unterschiede. Bei ca. 4% der Patienten konnten keine Metastasen entdeckt werden. 95% hatten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasierungen des Primärtumors (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - M-Klassifikation

M-Klassifikation	EXPAND-Kollektiv (n=904)	Material-Kollektiv (n=504)	Subkollektiv (n=403)
M0	28 (3,1%)	19 (3,8%)	17 (4,2%)
M1	875 (96,8%)	484 (96%)	385 (95,5%)

4.3 Auswertung und deskriptive Statistik der Färbungen

4.3.1 Qualitative Auswertung der Färbungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 504 Tumorpräparate aus der EXPAND Studie immunhistochemisch angefärbt. Im Folgenden werden exemplarisch die Kategorien der Färbemuster dargestellt.

4.3.1.1 Normales Magengewebe

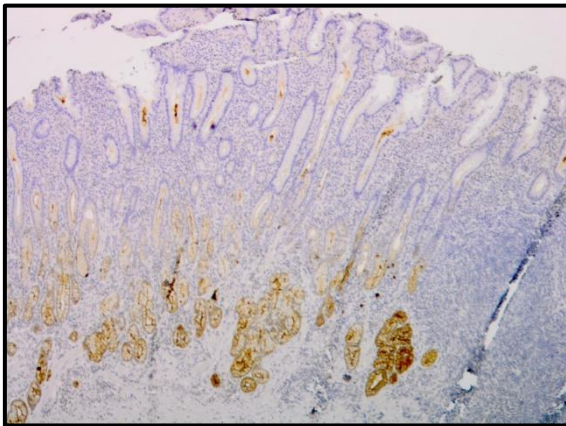


Abbildung 6: CD133 Färbung - normales Gewebe angefärbt, 40fache Vergrößerung

Abbildung 6 zeigt normales Gewebe des Magens mit der immunhistochemischen Färbung von CD133. Zu sehen ist die deutliche Anfärbung des Drüsengewebes. Die extrazellulär vorliegende Färbung könnte eine Anfärbung des Muzins darstellen.

4.3.1.2 Zytoplasmatische Färbung

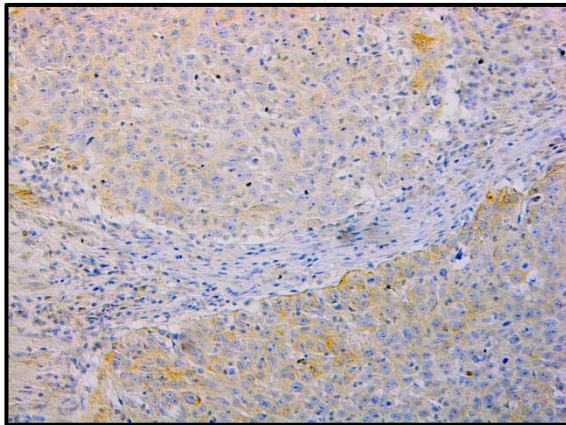


Abbildung 7: CD133 Färbung - zytoplasmatische Färbung I, 100fache Vergrößerung

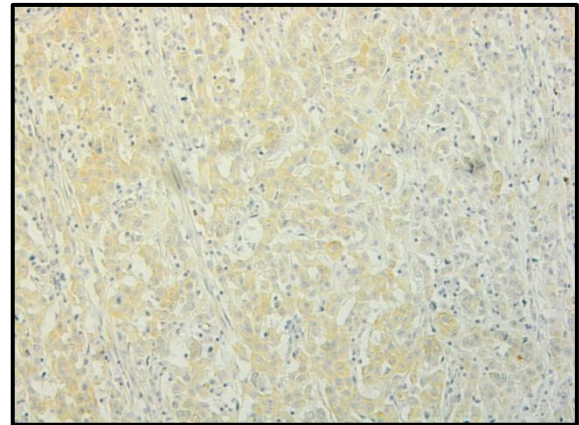


Abbildung 8: CD133 Färbung - zytoplasmatische Färbung II, 100fache Vergrößerung

Abbildung 7 und Abbildung 8 zeigen die zytoplasmatische Anfärbung eines Magenkarzinoms. Es ist eine Färbung beschränkt auf das Zytoplasma der Zellen zu erkennen. Das Wachstumsmuster des Tumors ist als diffus bzw. unorganisiert einzuschätzen.

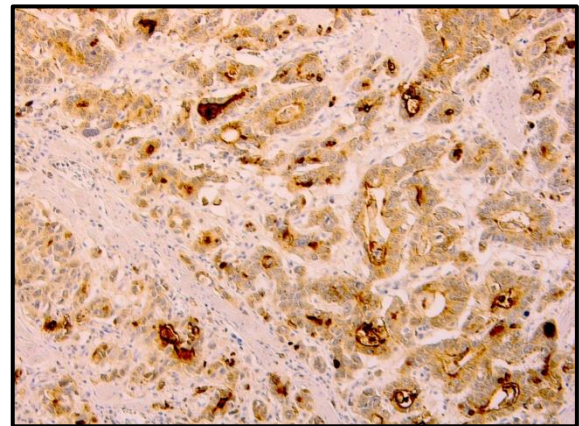
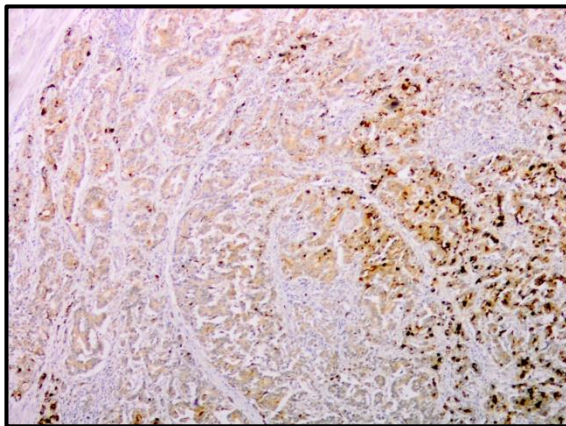


Abbildung 9: CD133 Färbung - luminal und zytoplasmatische Färbung I, links 40fache Vergrößerung, rechts 100fache Vergrößerung

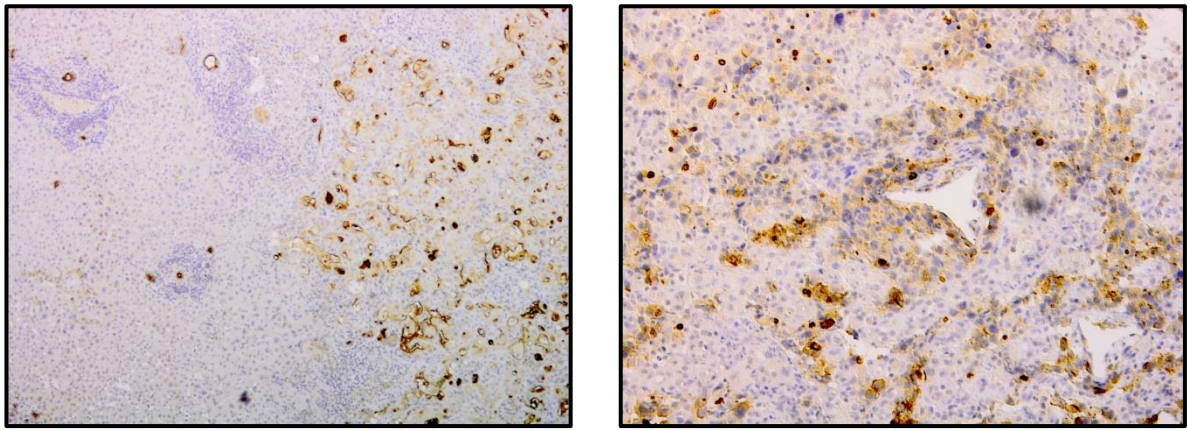


Abbildung 10: CD133 Färbung - luminaire und zytoplasmatische Färbung II, links 40fache Vergrößerung, rechts 100fache Vergrößerung

In Abbildung 9 und Abbildung 10 präsentiert sich eine Anfärbung sowohl im Bereich des Zytoplasmas der Tumorzellen als auch im apikalen Bereich der Drüsen. Das Lumen der Drüsen ist angefärbt.

4.3.1.3 Luminale Färbung

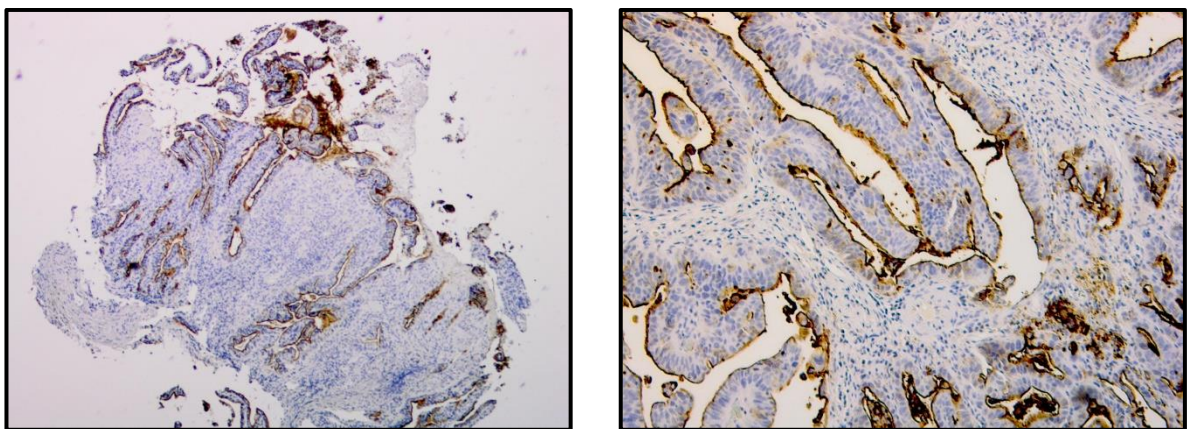


Abbildung 11: CD133 Färbung - luminale Färbung I, links 40fache Vergrößerung, rechts 100fache Vergrößerung

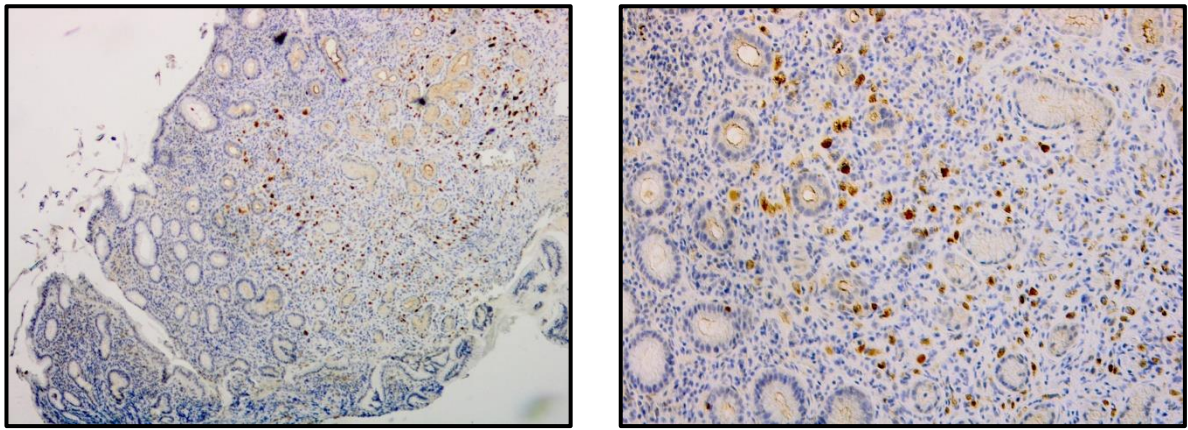


Abbildung 12: CD133 Färbung - luminale Färbung II, links 40fache Vergrößerung, rechts 100fache Vergrößerung

In Abbildung 11 und Abbildung 12 zeigt sich eine streng luminale bzw. apikale Färbung. Das Zytoplasma der Tumorzellen weist keine Anfärbung auf. Der Tumor erscheint in seinem Wachstumsmuster organisierter.

4.3.1.4 Tumor ohne CD133 Färbung

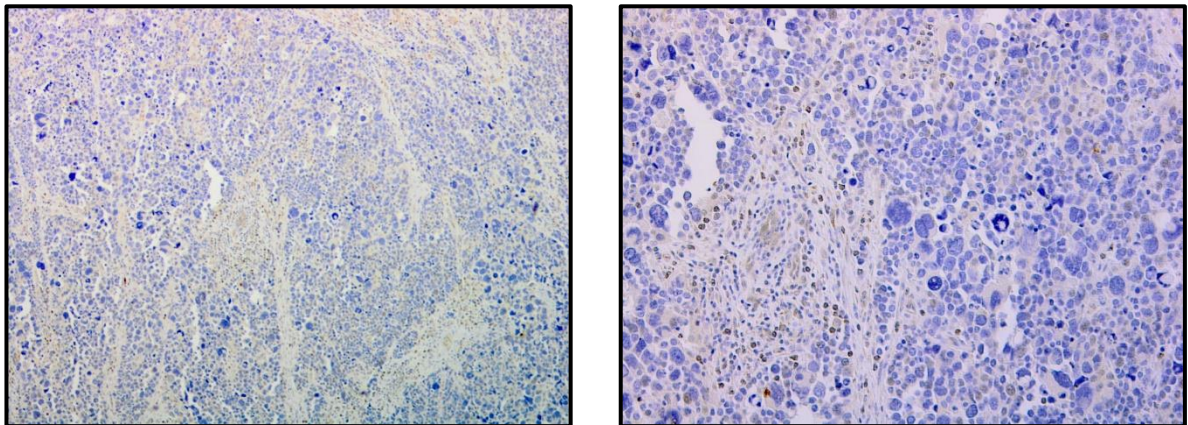


Abbildung 13: CD133 Färbung - nicht angefärbter Tumor, links 40fache Vergrößerung, rechts 100fache Vergrößerung

Abbildung 13 zeigt einen Tumor des Magens ohne Anfärbung mit der immunhistochemischen CD133-Färbung.

4.3.1.5 GIST-Tumor

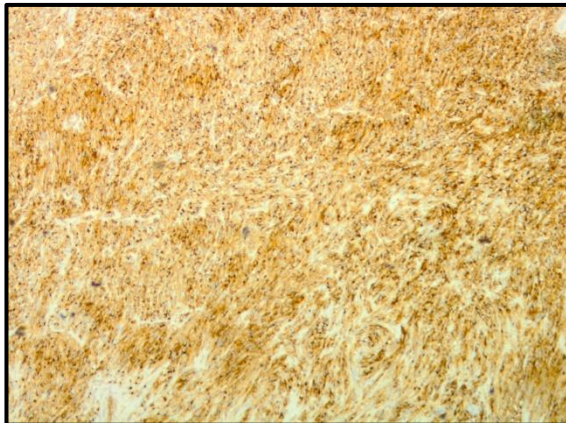


Abbildung 14: CD133 Färbung - GIST I in 40facher Vergrößerung

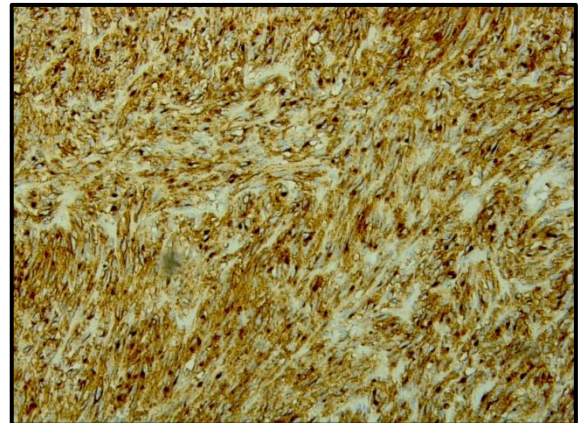


Abbildung 15: CD133 Färbung - GIST II in 100facher Vergrößerung

Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen Gastrointestinale Stromtumoren. Hier präsentiert sich ein Färbemuster, das deutlich von den zuvor beschriebenen abweicht. Das Gewebe färbt sich intensiv und flächig an.

4.3.1.6 Siegelringzellkarzinom

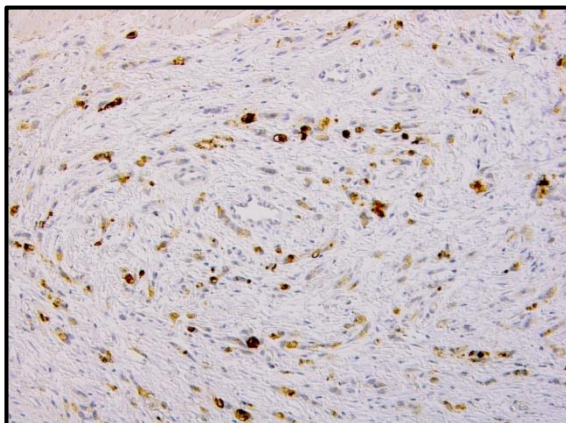


Abbildung 16: CD133 Färbung - Siegelringzellkarzinoms I in 40facher Vergrößerung



Abbildung 17: CD133 Färbung - Siegelringzellkarzinoms II in 40facher Vergrößerung

Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen das Färbemuster eines Siegelringzellkarzinoms. Es färben sich, in den wenigen Exemplaren, vereinzelte solitäre Tumorzellen an.

4.3.2 Häufigkeiten

4.3.2.1 Großpräparate und Biopsien

Für die experimentelle Untersuchung des Patientenkollektivs wurden sowohl Großpräparate (35%), als auch Biopsien (65%) zur Verfügung gestellt.

Die Verteilung der unterschiedlichen Färbungen wird im Folgenden, aufgeteilt nach Großpräparat und Biopsie, dargestellt. Auffallend ist der Anteil an nicht-gefärbten (negativ bewerteten) Präparaten. Dieser betrug bei Großpräparaten 18% und bei Biopsien 29%. Die Verteilung der luminal bzw. zytoplasmatisch gefärbten Präparate war zwischen Großpräparaten und Biopsien ähnlich. Die rein zytoplasmatischen Präparate waren in Großpräparate mit 5% vertreten und bei Biopsien mit 1,5% (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Auswertung Färbungen - Art der Färbung GP und Biopsie

Art der Färbung	Großpräparat	Biopsie
negativ	25 (17,6%)	76 (29,1%)
zytoplasmatisch	37 (26,1%)	54 (20,7%)
luminal	80 (56,3%)	131 (50,2%)

4.3.2.2 Metastasen

Die Gewebeproben wurden auf Ihren Phänotyp untersucht und in die Kategorien Primarius und Metastase aufgeteilt. Dabei ergab sich eine Gruppe von 95% Primarien- und 5% Metastasen.

Differenzierte man die auswertbaren Metastasen nach ihrer Organlokalisierung, so ließ sich ein Großteil auf Lymphknoten (63%) festlegen. Mit 15% hatten die Peritonealkarzinosen den zweitgrößten Anteil. Jeweils ein Präparat war der Niere bzw. der Leber zuzuordnen (siehe Tabelle 13).

Ergebnisse

Tabelle 13: Auswertung Färbungen - Art der Metastase

Art der Metastase	Metastasen auswertbar
nicht beurteilbar	2 (10,5%)
Lymphknoten	12 (63,2%)
Peritonealkarzinose	3 (15,8%)
Leber	1 (5,3%)
Niere	1 (5,3%)

Die auswertbaren Metastasen zeigten untereinander eine ähnliche Verteilung der Färbeergebnisse. Zu berücksichtigen war die geringe Fallzahl. Diese Verteilung entsprach nicht denen, die primär aus dem Magen stammender Gewebeproben (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Auswertung Färbungen - Art der Färbung Metastasen

Art der Färbung	Metastasen auswertbar
negativ	7 (36,8%)
luminal	5 (26,3%)
zytoplasmatisch	7 (36,8%)

Aus jener Verteilung ergab sich die Konsequenz die Metastasen aus der weiteren Auswertung zu extrahieren. Diese fielen durch abweichende Färbeverteilungen und geringe Fallzahl auf.

Durch die Herausnahme der Metastasen, fehlendem Tumormaterial auf dem Schnitt bzw. die zu geringe Anzahl von vitalen Tumorzellen im Gewebe, reduzierte sich das gefärbte, auswertbare Kollektiv von 504 auf 403 Präparate.

4.3.2.3 CD133 Subkollektiv (ohne Metastasen), n=403

In folgender Übersicht sind die auswertbaren Primären des Subkollektives anhand ihrer Färbungen aufgeschlüsselt. In diesem Verteilungsmuster nimmt die luminal Färbung mit 54% den größten Anteil ein, gefolgt von den als negativ bewerteten Präparaten. Die gleichzeitig zytoplasmatisch und luminal gefärbten Präparate veranschlagten 19%. Als kleinste Gruppe zeigten sich die rein zytoplasmatischen Färbungen mit knapp 22% (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Auswertung Färbungen - Art der Färbung Subkollektiv ohne Metastasen

Art der Färbung	Subkollektiv (n=403)
negativ	94 (24,5%)
zytoplasmatisch	84 (21,9%)
luminal	206 (53,6%)

4.3.3 Korrelationen der CD133 Färbung mit den klinisch-pathologischen Parametern

4.3.3.1 Laurén-Klassifikation

Vergleicht man die Einteilung nach Laurén mit den verschiedenen Färbeergebnissen, so ließen sich bei den intestinalen Tumoren der luminal Typ mit 58% am häufigsten beobachten. Dahingegen zeigten sich im diffusen Wachstumsmuster, mit einem Anteil von 40% luminaler Färbung und 39% zytoplasmatischer Färbung, eine ausgeglichene Verteilung. Der gemischte Typ war mit 52% am häufigsten bei den luminalen Färbungen vertreten und zeigte sich bei 32% der zytoplasmatisch Gefärbten (siehe Tabelle 16, Abbildung 18).

Tabelle 16: Korrelationen CD133 Färbung – Laurén-Klassifikation

Laurén-Klassifikation	negativ	zytoplasmatisch	luminal
intestinal	42 (25,6%)	27 (16,5%)	95 (57,9%)
diffus	12 (21,1%)	22 (38,6%)	23 (40,4%)
gemischt	4 (16%)	8 (32%)	13 (52%)

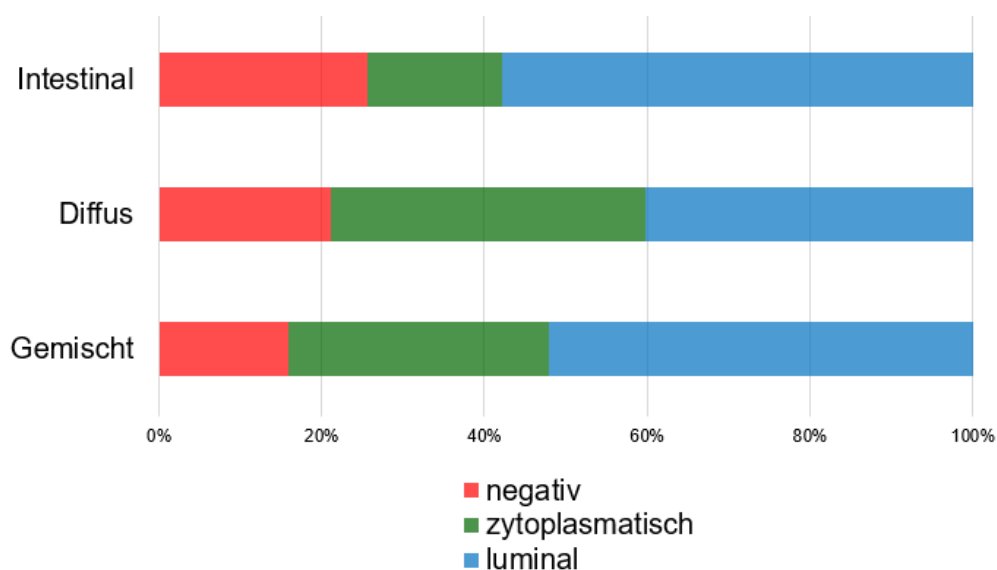


Abbildung 18: Balkendiagramm Häufigkeiten Färbungen – Laurén-Klassifikation

Betrachte man mögliche Korrelationen, so ließ sich lediglich in den Gruppen negativ gegen zytoplasmatisch eine unterschiedliche Verteilung beobachten (siehe Tabelle 17). Zur besseren Auswertung wurde die Gruppe der diffus wachsenden Tumoren mit der, der gemischt bewerteten zusammengefasst. Hierbei zeigten sich 42% der intestinalen Tumore mit einer zytoplasmatischen Färbung. Dagegen waren 58% als negativ kategorisiert. In der Kategorie der diffus/gemischten ergab sich eine Verteilung von 33% negativ und 67% zytoplasmatisch gefärbt ($p=0,008$). Eine solche Korrelation zeigt sich in der Gegenüberstellung von Negativen zu Luminalen nicht. Hier ließ sich ein gleichmäßiges Verteilungsmuster registrieren ($p=0,574$, siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Korrelationen CD133 Färbung – Laurén-Klassifikation negativ u. zytoplasmatisch

Laurén-Klassifikation	negativ	zytoplasmatisch
intestinal	42 (58,3%)	27 (41,7%)
diffus/gemischt	16 (33,3%)	30 (66,7%)

4.3.3.2 Grading - G1/G2 gegen G3

In dem klinischen Parameter des Gradings zeigte sich in der Abstufung Grade 1 und 2 eine relativ gleiche Verteilung. Die luminal gefärbten Präparate nahmen mit ca. $\frac{3}{4}$ der Tumoren den größten Anteil ein. Zytoplasmatische und Negative verteilten sich in Grade 1 gleichmäßig auf 13%. In Grade 2 machten die Negativen 17% aus. In Grade 3 kam es jedoch zu einer Umverteilung. In dieser Gruppe waren die luminalen Tumore nur noch mit 35% repräsentiert, wohingegen die zytoplasmatischen Tumore einen Zuwachs auf 36% erhielten. Hieraus resultierte eine ungefähre Verteilung von 1/3 pro Kategorie (siehe Tabelle 18, Abbildung 19).

Tabelle 18: Korrelationen CD133 Färbung - Grading

Grading	negativ	zytoplasmatisch	luminal
G1	2 (13,3%)	2 (13,3%)	11 (73,3%)
G2	17 (16,7%)	9 (8,8%)	76 (74,5%)
G3	43 (29,9%)	51 (35,4%)	50 (34,7%)

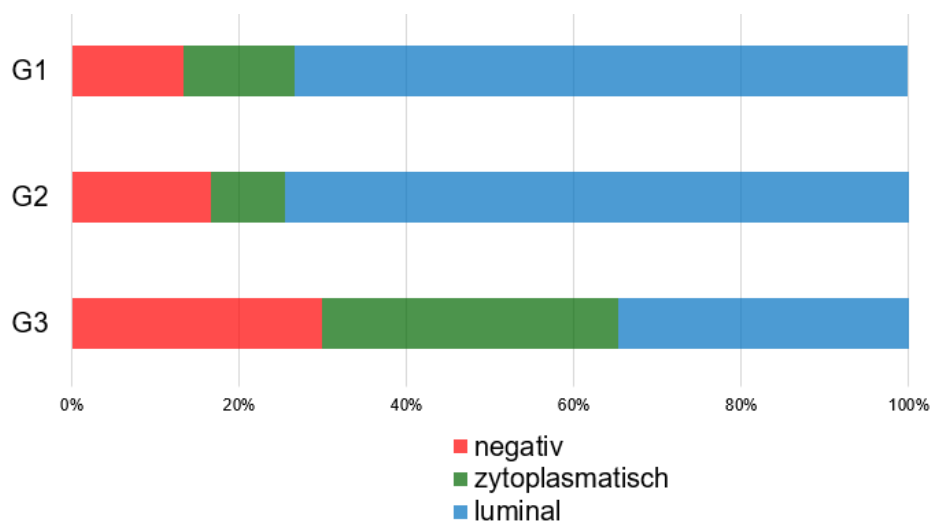


Abbildung 19: Balkendiagramm Korrelationen CD133 Färbung - Grading

Fasste man nun das Grading 1 und 2 in eine, und Grading 3 in eine andere Gruppe, so ließ sich aus der Darstellung in einer Kreuztabelle, eine ungleichmäßige Verteilung entnehmen. Die Gruppe der G1 und G2 teilte sich in 18% negativ und 82% luminal gefärbte Tumore auf. In der Gruppe der G3 Tumore waren die Negativen mit

Ergebnisse

46% und die der luminalen mit 54% vertreten. Diese Verteilung zeigte sich als aussagekräftig ($p=0$). In der Gegenüberstellung von Negativen und Zytoplasmatischen ließ sich lediglich ein Trend beobachten. So betrug der Anteil der Gruppe G1 und G2 der Negativen 63%. Dagegen nahmen die der Zytoplasmatischen einen Anteil von 37% ein. In den G3 eingestuften Tumoren waren 46% negativ und 54% zytoplasmatisch (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Korrelationen CD133 Färbung - Grading G1/2 u. G3

Grading	negativ	luminal
G1/2	19 (18%)	87 (82%)
G3	43 (46,2%)	50 (53,8%)
	negativ	zytoplasmatisch
G1/2	19 (63,3%)	11 (36,7%)
G3	43 (45,7%)	51 (54%)

4.3.3.3 TNM

Im Tumorstaging zeigten sich Großteiles ähnliche Verteilungsmuster. Sowohl bei der Betrachtung der einzelnen Kategorien als auch bei der sinnvollen Zusammenfassung von Gruppen ließ sich kein statistisch relevanter Unterschied feststellen (siehe Tabelle 36,

Tabelle 37, Tabelle 38 im Anhang).

4.3.3.4 Alter

Betrachtete man das Subkollektiv in Bezug auf Alter und Geschlecht, so zeigten sich einige potenziell relevante Verteilungen. Zur besseren Veranschaulichung wurden zwei Altersgruppen gebildet. In der Gruppe der unter 45-Jährigen zeigte sich ein Anteil von 38% der luminal gefärbten Tumore. In der Population im Alter über 45 Jahren lag der Anteil bei 55%. Der Anteil der Zytoplasmatischen nahm von 32% bei den unter 45-Jährigen auf 21% bei den über 45-Jährigen zu (siehe Tabelle 20).

Ergebnisse

Setzte man die Altersgruppen etwas höher, um insbesondere ältere Patienten abzubilden, ließ sich bei Patienten im Alter unter 60 Jahren eine Zunahme bei den luminal gefärbten Tumoren auf 48% feststellen. Bei den über 60-jährigen Patienten belief sich der Anteil auf 58%. Die zytoplasmatisch eingestuften Fälle zeigten, im Vergleich der Altersgruppen unter und über 45 Jahren, eine Abnahme von 32% auf 21%. Bei den negativ bewerteten Fällen war nur ein geringer Unterschied von 30% auf 24% zu beobachten. Anders bei den Gruppen um 60 Jahre. Dort stagnierte der Anteil von zytoplasmatischen Tumoren bei 22%. Der Anteil der Negativen sank von 30% bei unter 60 Jahren auf 20% bei den über 60-Jährigen (siehe Tabelle 20, Abbildung 20).

Tabelle 20: Korrelationen CD133 Färbung - Alter <45 bis >60

Alter in Jahren	negativ	zytoplasmatisch	luminal
<45	11 (29,7%)	12 (32,4%)	14 (37,8%)
>45	83 (23,9%)	72 (20,7%)	192 (55,3%)
<60	54 (30%)	39 (21,7%)	87 (48,3%)
>60	40 (19,6%)	45 (22,1%)	119 (58,3%)

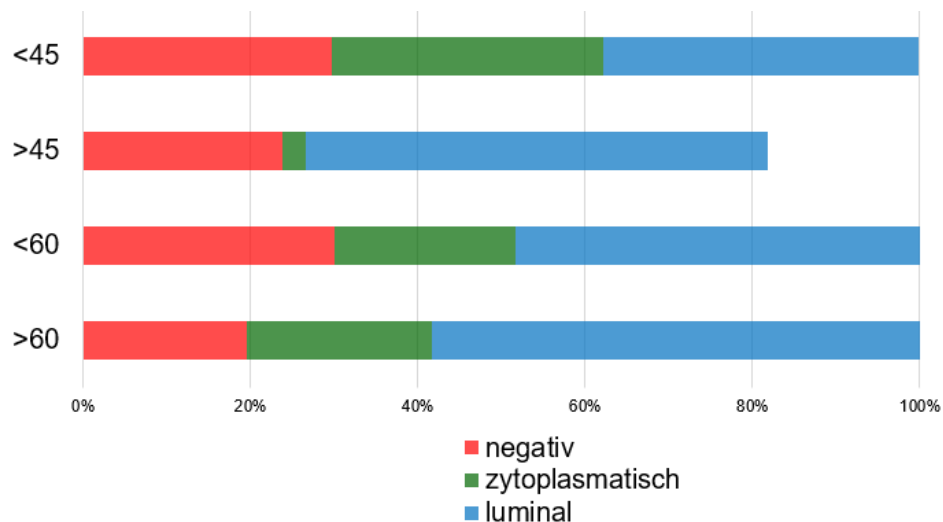


Abbildung 20: Balkendiagramm Korrelationen CD133 Färbung - Alter in Jahren

Ergebnisse

Im Rahmen der weiteren statistischen Auswertung wurden die unterschiedlichen Altersgruppen in Kreuztabellen gegenübergestellt. In der Gruppe der unter 45-Jährigen zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung zwischen negativen und luminalen Präparaten von 44% zu 56%. Dagegen ergab sich bei dem Kollektiv der über 45-Jährigen eine Aufteilung von 30% negativen und 70% luminalen Färbungen (siehe Tabelle 21). Im Gegensatz zu dieser potenziell statistisch relevanten Verteilung, ließ sich in der Gruppe der Negativen und Zytoplasmatischen eine gleichmäßige Verteilung von ca. 50% erkennen. Im Kollektiv mit dem Cut-off bei 60 Jahren konnte in der Gegenüberstellung der negativen zu den luminalen Präparaten bei den jüngeren Patienten ein Anteil von 62% bei den luminalen und 38% bei den negativ gefärbten bestimmt werden. Bei den über 60-jährigen Patienten ergab sich eine Verteilung von 25% negativen zu 75% luminal gefärbten Tumoren (siehe Tabelle 22). Im Gegensatz dazu weniger statistisch relevant zeigte sich das Verteilungsmuster der negativ und zytoplasmatischen Präparaten von ungefähr 50% in allen Kategorien.

Tabelle 21: Korrelationen CD133 Färbung - Alter <45 u. >45

Alter in Jahren	negativ	luminal
<45	11 (44%)	14 (56%)
>45	83 (30,2%)	192 (69,8%)

Tabelle 22: Korrelationen CD133 Färbung - Alter <60 u. >60

Alter in Jahren	negativ	luminal
<60	54 (38,3%)	87 (61,7%)
>60	40 (25,1%)	119 (74,9%)

4.3.3.5 Geschlecht

Die Verteilung der Färbungen anhand des Geschlechts stellte sich wie in folgender Tabelle 23 dar: bei den weiblichen Patienten waren 24% negativ, 31% zytoplasmatisch und 46% luminal gefärbt. Im Kollektiv des männlichen Geschlechts waren ebenfalls ca. 25% negativ gefärbt, jedoch 19% zytoplasmatisch und 56% als luminal bewertet (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Korrelationen CD133 Färbung - Geschlecht

Geschlecht	negativ	zytoplasmatisch	luminal
weiblich	24 (23,5%)	33 (30,6%)	45 (45,9%)
männlich	71 (24,8%)	54 (18,9%)	161 (56,3%)

Ein statistischer Trend im Rahmen der Fisher-Testung ergab sich lediglich im Vergleich der zytoplasmatischen und negativen Färbungen. Dort waren bei den weiblichen Patienten 42% negativ und 58% zytoplasmatisch gefärbt ($p=0,081$), hingegen bei den männlichen Patienten 57% negativ und 43% zytoplasmatisch ($p=0,772$, siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Korrelationen CD133 Färbung - Geschlecht negativ u. zytoplasmatisch

Geschlecht	negativ	zytoplasmatisch
weiblich	24 (42,1%)	33 (57,9%)
männlich	71 (56,8%)	54 (43,2%)

4.3.3.6 EGFR

Durch die ursprüngliche Intention der EXPAND-Studie stand als klinischer Parameter ebenfalls der EGFR-Rezeptor-Status zur Auswertung zur Verfügung. In Anbetracht dieses Parameters ergab sich eine Verteilung bei negativen Rezeptorstatus von 24% negativ, 25% zytoplasmatisch und 52% luminal konfigurierten Präparaten. Dagegen waren bei Vorhandensein des EGFR 27% negativ, 16% zytoplasmatisch und 57% luminal (siehe Tabelle 25).

Ergebnisse

Tabelle 25: Korrelationen CD133 Färbung - EGFR-Status

EGFR	negativ	zytoplasmatisch	luminal
negativ	69 (23,6%)	67 (24,3%)	144 (52,2%)
positiv	32 (26,9%)	17 (15,7%)	62 (57,4%)

In der weiteren statistischen Bewertung konnte lediglich im Kollektiv der negativen gegenüber den zytoplasmatischen Präparaten ein gewisser Trend erahnt werden. Dabei ergab sich eine Verteilung auf ca. 50% negativ und zytoplasmatisch bei einem negativen Status. In Anwesenheit von EGFR waren 65% negativ und 35% zytoplasmatisch (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Korrelationen CD133 Färbung - EGFR-Status negativ u. zytoplasmatisch

EGFR	negativ	zytoplasmatisch
negativ	69 (50,7%)	67 (49,3%)
positiv	32 (65,3%)	17 (34,7%)

Wie vorab bereits beschrieben, wurden im Rahmen der EXPAND-Studie die Patienten in zwei Therapiearme eingeteilt. Diese Einteilung erfolgte zufällig. Um daraus potenzielle resultierende Fehler zu vermeiden, wurde die Verteilung in Bezug auf die Färbeergebnisse beurteilt.

Tabelle 27: Korrelationen CD133 Färbung - Therapie CTX u. CTX+Cetuximab (CTX – Chemotherapie)

Therapie	negativ	zytoplasmatisch	luminal
CTX	49 (25,1%)	52 (26,7%)	94 (48,2%)
CTX + Cetuximab	52 (25,7%)	36 (17,8%)	114 (56,4%)

Es konnte auch in Bezug auf CD133 Färbung von einer zufälligen bzw. ungefähr gleichen Verteilung der Fälle ausgegangen werden (siehe Tabelle 27).

4.4 Überlebenszeitanalysen

Im folgenden Kapitel werden sowohl die unterschiedlichen Kollektive (EXPAND-Kollektiv, Materialkollektiv, Subkollektiv CD133), als auch Subgruppen innerhalb des Subkollektivs CD133 in Bezug auf ihre Überlebenszeit verglichen. Dabei beziehen sich die angegebenen Werte für die Überlebenszeit auf den Zeitraum von Aufnahme in die Studie bis hin zum Versterben der Patienten. Die ermittelten Werte stellen die mediane Überlebenszeit in Monaten der einzelnen Gruppen dar.

4.4.1 Gesamtkollektiv

Das mediane Überleben der Patienten des EXPAND-Kollektivs (n=904) lag für die Teilnehmer des Cetuximab-Therapiearms bei 9,4 Monaten, das derer mit der konventionellen Chemotherapie bei 10,7 Monaten. Das Materialkollektiv (n=504) lag bei 10 Monaten ab dem Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie.

Patienten, deren Tumor eine tiefere Infiltrationstiefe hatte, nämlich T3 bzw. T4, hatten dabei ein deutlich kürzeres Überleben von 9,5 Monaten gegenüber 13,6 Monaten bei T1 bzw. T2 (log Rank p=0,000, siehe Abbildung 36).

Die Tumoren, welche lymphogen bereits fortgeschritten metastasiert waren (N2/N3) führten mit 9,7 Monaten zu einem kürzeren Überleben als bei denen mit N0 bzw. N1, welche 11 Monate überlebten. Statistisch ist hier jedoch lediglich ein Trend zu beobachten.

Im Rahmen der Analyse der M0 und M1 Patienten wurde die niedrige Fallzahl von 17 Patienten ohne Metastasierung im Subkollektiv berücksichtigt. Somit ließ sich keine repräsentative Aussage über das Überleben beider Subgruppen treffen.

Wie in der EXPAND-Studie postuliert, konnte bei der Auswertung der Daten kein Unterschied in der Überlebenszeit bei den verschiedenen Therapiearmen mit und ohne Cetuximab entdeckt werden.

4.4.2 Subkollektiv CD 133, n=403

Innerhalb des Subkollektivs CD133 (n=403) ließ sich zunächst, unabhängig von klinischen Parametern, die mediane Überlebenszeit der anhand der unterschiedlichen Färbungen klassifizierten Fälle miteinander vergleichen.

Ergebnisse

Vollzog man den direkten Vergleich der luminalen Fälle gegenüber den negativen Fällen, so ließ sich ein Zusammenhang vermuten. Dabei hatten die luminalen Tumore eine höhere mediane Überlebenszeit von 11 Monaten gegenüber den Negativen mit 8,7 Monaten. Dieser konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht statistisch signifikant nachgewiesen werden (log Rank $p=0,073$, siehe Abbildung 37). Eine genauere Betrachtung ggf. mit einem größeren Patientenkollektiv ist denkbar.

In der Gegenüberstellung der negativen Fälle mit denen der zytoplasmatisch gefärbten zeigte sich kein statistisch relevanter Unterschied (log Rank $p=0,917$, siehe Abbildung 38). Die Zeitspanne der Überlebenszeit der Zytoplasmatischen lag mit 9,4 Monaten lediglich 0,7 Monaten über der der negativen mit 8,7 Monaten.

Die Abbildung 21 veranschaulicht die zuvor thematisierte unzureichende statistische Signifikanz der unterschiedlichen Überlebenszeiträume.

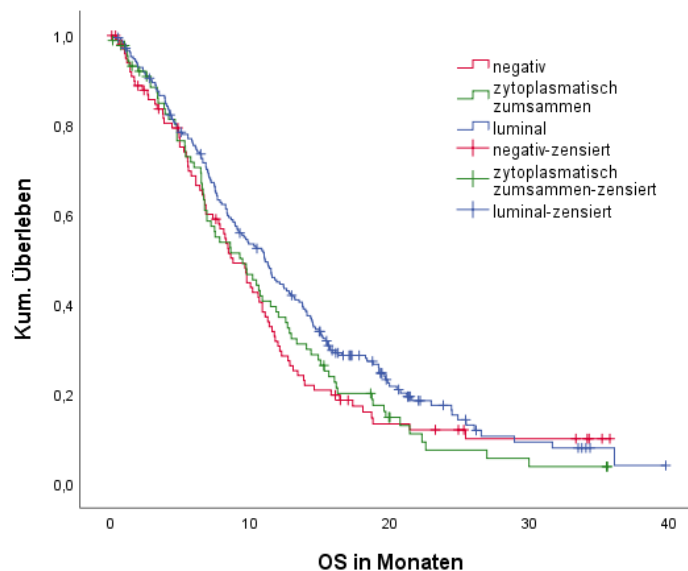


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

4.4.2.1 Laurén-Klassifikation

Tabelle 28: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Laurén-Klassifikation, eine Darstellung der medianen Überlebenszeit

Laurén-Klassifikation	negativ	luminal
intestinal	8,4 Monate (n=42)	11,9 Monate (n=95)
diffus/gemischt	9,7 Monate (n=16)	8,3 Monate (n=36)
	negativ	zytoplasmatisch
intestinal	8,4 Monate (n=42)	7,2 Monate (n=27)
diffus/gemischt	9,7 Monate (n=16)	10,9 Monate (n=30)

Die Analyse der Laurén-Klassifikation bezüglich der unterschiedlichen Färbungen zeigte eine deutlich höhere Überlebenszeit der intestinalen luminalen Fälle. Diese hatten mit 11,9 Monaten eine ca. ¼ Jahr längere mediane Überlebenszeit als die der negativen Fälle. Hierbei konnte im Vergleich der negativen gegen die luminalen Fälle eine Korrelation vermutet werden. Diese konnte jedoch in der hier durchgeführten Analyse nicht als statistisch signifikant bewiesen werden (log Rank $p=0,058$, siehe Abbildung 39). Möglicherweise könnte diese Korrelation durch weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen bewiesen werden.

Dieser Unterschied kam in der Subgruppe, der nach Laurén-Klassifikation als diffus/gemischte Tumore einzuordnenden, nicht zum Tragen. Hier war auf Grund der geringen Zeitdifferenz zwischen negativ gefärbten und luminalen kein Zusammenhang zu erwarten (siehe Tabelle 28).

Befasste man sich mit der Gegenüberstellung der negativen und der zytoplasmatischen Färbungen in Bezug auf die Laurén-Klassifizierung, so ließ sich sowohl bei intestinalen als auch beim diffus/gemischtem Tumortyp kein eindeutiger Trend beobachten. Auch hier lag bei der zytoplasmatischen und bei der negativen Gruppe kein statistisch relevanter Unterschied in der medianen Überlebenszeit vor (siehe Tabelle 28).

Ergebnisse

Die Abbildung 22 zeigt die Unterschiede in der intestinalen Laurén-Klassifikation. Hieraus ist der oben bereits beschriebene statistische Trend der luminalen Fälle ersichtlich, jedoch auch die fehlende Aussagekraft der zytoplasmatischen und negativen Fälle. Die Abbildung 23 veranschaulicht das mediane Überleben bei diffus/gemischten Tumoren. Auch hier ist eine mangelnde statistische Relevanz erkennbar.

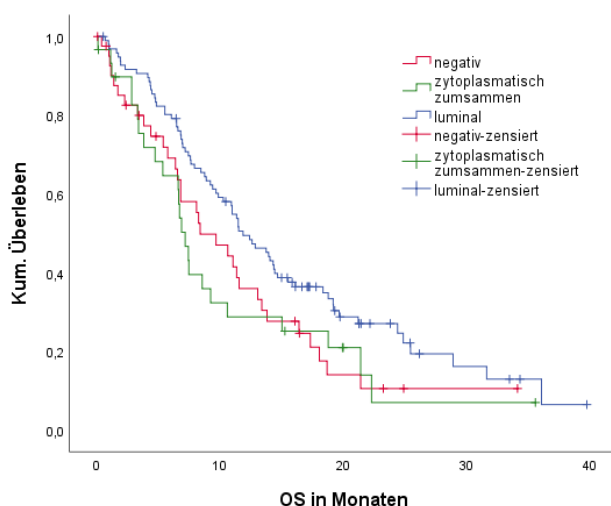


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Laurén-Klassifikation intestinal, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

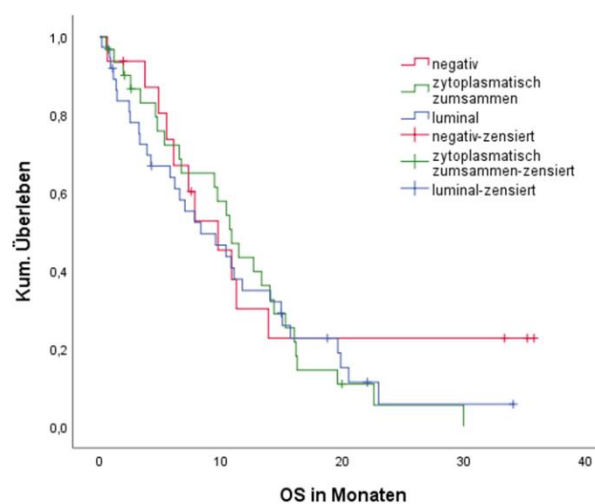


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Laurén-Klassifikation diffus/gemischt, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

4.4.2.2 Grading

Tabelle 29: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 – Grading, eine Darstellung der medianen Überlebenszeit

Grading	negativ	luminal
G1/G2	6,7 Monate (n=19)	12,1 Monate (n=87)
G3	10,9 Monate (n=43)	10,4 Monate (n=50)
	negativ	zytoplasmatisch
G1/G2	6,7 Monate (n=19)	15,3 Monate (n=11)
G3	10,9 Monate (n=43)	11,4 Monate (n=51)

Die nähere Betrachtung des Gradings G1/G2 in Bezug auf die Färbeergebnisse, ließ in der Gegenüberstellung von luminal Gefärbten zu negativer Färbung einen Zusammenhang vermuten. Hier zeigte sich ein Zugewinn an medianer Überlebenszeit von 5,4 Monaten für die luminal gefärbten Fälle (siehe Tabelle 29). Zu beachten ist jedoch die geringe Fallzahl von nur 21 negativen Tumoren in der G1/G2 Gruppe. Folglich gelang der statistische Nachweis einer Korrelation nicht. In der G3 Gruppe zeigten sich keine sichtbaren Unterschiede zwischen den negativen und den luminalen Tumoren (siehe Tabelle 29).

Ähnliches gilt für die Auswertung des Vergleiches von zytoplasmatischen gegenüber negativen Fällen in Grade 1/2. Hier liest sich zwar ein Mehrwert von 8,6 Monaten für die zytoplasmatisch gefärbten Tumore ab, dieser war jedoch als nicht signifikant einzuschätzen. Darüber hinaus lag auch hier mit 11 Patienten nur eine sehr geringe Fallzahl vor. In der G3 Gruppe zeigten sich in der Gegenüberstellung negativ gegen zytoplasmatisch keine statistisch relevanten Unterschiede in der medianen Überlebenszeit (siehe Tabelle 29).

Die Abbildung 24 veranschaulicht die unterschiedlichen medianen Überlebenszeiten der drei Färbungen in Bezug auf Grade 1/2. Auch hier ließ sich ein möglicher Zusammenhang, im Vergleich der luminalen und negativen Tumore, erahnen. Ebenfalls auffällig war die geringe Fallzahl der zytoplasmatischen Tumore und die damit verbundene fehlende Aussagekraft.

Daneben positioniert zeigt Abbildung 25 die drei Färbeergebnisse in der klinischen Subgruppe der G3 Tumore. Auch hier wird eine mangelnde statistische Relevanz deutlich.

Ergebnisse

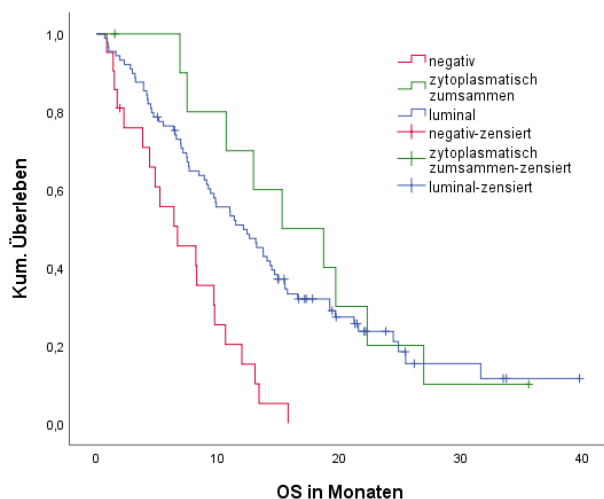


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Grading G1/G2, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

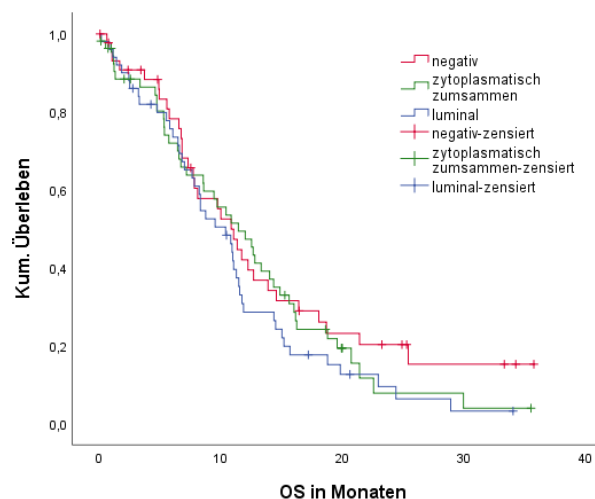


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Grading G3, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

4.4.2.3 T-Klassifikation

Die statistische Auswertung der Färberegebnisse in Bezug auf die Tumorgöße bei den negativen und luminalen Fällen ergab keine relevanten statistischen Zusammenhänge. Gleiches gilt für die Gegenüberstellung von negativen zu zytoplasmatischen Tumoren (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - T-Klassifikation, eine Darstellung der medianen Überlebenszeit

T-Klassifikation	negativ	luminal
T1/T2	11 Monate (n=21)	13,5 Monate (n=34)
T3/T4	8,4 Monate (n=52)	10,4 Monate (n=119)
	negativ	zytoplasmatisch
T1/T2	11 Monate (n=21)	9,4 Monate (n=16)
T3/T4	8,4 Monate (n=52)	8,6 Monate (n=51)

Lediglich ein Trend ließ sich bei großen Tumoren erahnen (T3/T4). Diese hatten bei einer negativen Klassifikation gegenüber den Luminalen einen Nachteil in der medi-

Ergebnisse

anen Überlebenszeit. Dieser lag jedoch mit 2 Monaten Differenz lediglich 1,6 Monaten unter dem Durchschnitt und fiel somit gering aus (siehe Tabelle 30).

Bei kleinen Tumoren (T1/T2) mit zytoplasmatischer Färbung ließ sich der Trend erahnen, dass jene einen Nachteil im Überleben hatten. Dieser war jedoch mit 1,6 Monaten gegenüber den zytoplasmatischen Fällen als gering einzuschätzen. Weiter gelang in der statistischen Testung kein Nachweis einer Signifikanz. In größeren Tumoren (T3/T4) zeigte sich kein nennenswerter Unterschied (siehe Tabelle 30).

Die Abbildung 26 zeigt die Unterschiede in kleinen Tumoren (T1/T2). Die Abbildung 27 veranschaulicht das mediane Überleben bei großen Tumoren (T3/T4). Auch hier ist eine mangelnde statistische Relevanz erkennbar.

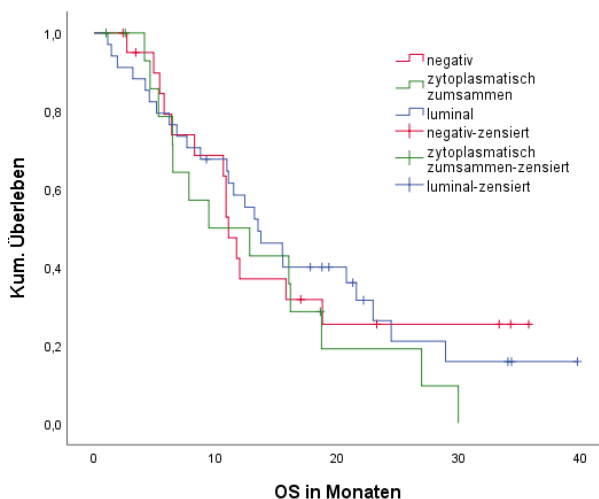


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - T-Klassifikation T1/T2, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

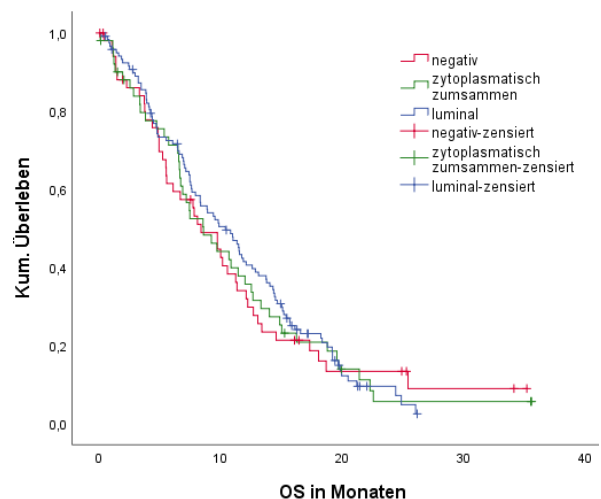


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - T-Klassifikation T3/T4, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

4.4.2.4 N-Klassifikation

Die Analyse der Färbeergebnisse zeigte in Bezug auf den Lymphknotenstatus der Tumorpatienten ein besseres Überleben von luminal gefärbten Tumoren gegenüber Tumoren mit fehlender Färbung. Bei N0/N1 Patienten konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede erfasst werden (log Rank $p=0,151$, siehe Abbildung 40). Lediglich unter klinischen Aspekten ließ sich ein Trend erahnen. Hier lagen die nicht gefärbten Fälle mit 9,7 Monaten ungefähr im Durchschnitt. Die luminal gefärbten Fälle präsentierten sich hingegen mit 13,2 Monaten (siehe Tabelle 31). Möglicherweise kann eine Korrelation durch weitere Untersuchungen nachgewiesen werden.

Tabelle 31: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - N-Klassifikation, eine Darstellung der medianen Überlebenszeit

N-Klassifikation	negativ	luminal
N0/N1	9,7 Monate (n=37)	13,2 Monate (n=83)
N2/N3	9,7 Monate (n=27)	10,9 Monate (n=73)
	negativ	zytoplasmatisch
N0/N1	9,7 Monate (n=37)	10,9 Monate (n=34)
N2/N3	9,7 Monate (n=27)	6,7 Monate (n=33)

Bei fortgeschrittener Lymphknotenmetastasierung (N3/N4) ließ sich dieser Trend zwischen luminalen und negativen Fällen nicht beobachten (siehe Tabelle 31).

In der Gegenüberstellung der zytoplasmatisch und der nicht gefärbten Tumoren ließ sich lediglich für wenige bzw. keine vorhandenen Lymphknotenmetastasierungen (N0/N1) ein Zusammenhang erahnen. Hier lagen die zytoplasmatischen Fälle mit knapp 11 Monaten leicht über dem Durchschnitt (siehe Tabelle 31).

In fortgeschrittenen Stadien (N2/N3) ließ sich in Betracht ziehen, ob zytoplasmatisch gefärbte Tumoren im Vergleich zu negativen Tumoren ein besonders schlechtes Überleben haben. Diese zeigten sich mit 6,7 Monaten Überlebenszeit besonders nachteilig im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (siehe Tabelle 31).

Ergebnisse

Die Abbildung 28 zeigt die Unterschiede für gering metastasierte Tumoren (N0/N1). Die Abbildung 29 veranschaulicht das mediane Überleben fortgeschrittener, metastasierter Tumoren (N2/N3). In beiden Gegenüberstellungen ist eine mangelnde statistische Relevanz erkenntlich.

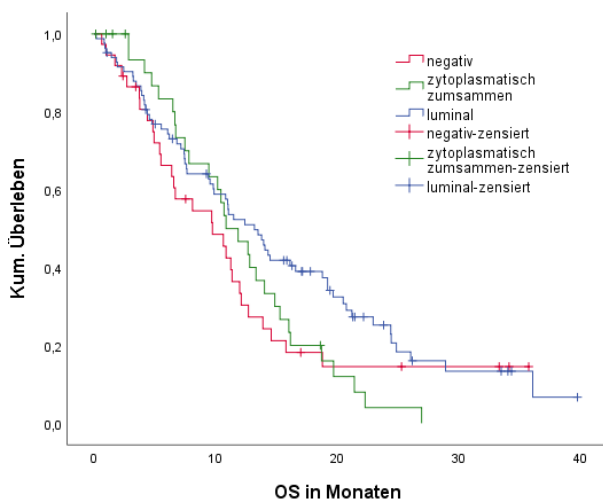


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - N-Klassifikation N0/N1, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

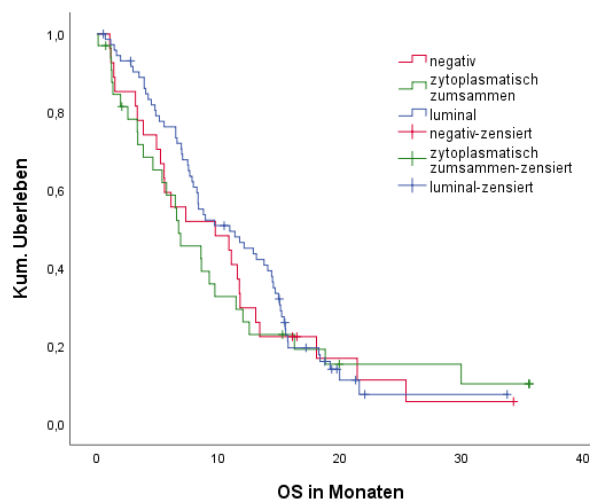


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - N-Klassifikation N2/N3, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

4.4.2.5 Therapie

Tabelle 32: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Therapie CTX u. CTX+Cetuximab, eine Darstellung der medianen Überlebenszeit

Therapie	negativ	luminal
CTX	10,6 Monate (n=49)	11,3 Monate (n=94)
CTX + Cetuximab	8,1 Monate (n=52)	11 Monate (n=114)
	negativ	zytoplasmatisch
CTX	10,6 Monate (n=49)	9,2 Monate (n=52)
CTX + Cetuximab	8,1 Monate (n=52)	10,2 Monate (n=36)

Durch den Datensatz der EXPAND-Studie stand ebenfalls die Betrachtung der Auswirkung einer Antikörpertherapie mittels Cetuximab gegenüber einer klassischen Chemotherapie zur Verfügung.

Die Auswertung ließ den Trend erkennen, dass eine Therapie mit CTX+Antikörper bei luminal konfigurierten Tumoren einen geringen Vorteil gegenüber negativen Tumoren liefern könnte. So lagen Patienten mit CTX und Antikörper-Therapie bei negativer Färbung mit einem Überleben von 8,1 Monaten deutlich unter dem Durchschnitt, wohingegen luminale Fälle mit 11 Monaten leicht über dem Durchschnitt positioniert waren. Es ließen sich jedoch keine nachweisbaren Unterschiede auf Grund der Behandlung festhalten, eventuell war eher die Kombinationstherapie schlechter als die reine CTX-Therapie, sowie die Luminale tendenziell besser als die nicht Gefärbten (log Rank $p=0,092$, siehe Abbildung 41).

In der klassischen Chemotherapie (Capecitabin + Cisplatin) ließ sich in der Gegenüberstellung luminale und fehlende Färbung für die luminale Färbung ein geringer Vorteil von 0,7 Monaten längere mediane Überlebenszeit feststellen (siehe Tabelle 32).

Die Betrachtung der zytoplasmatischen Fälle gegenüber den negativen Fällen zeigte bei klassischer Chemotherapie (CTX) keine Erkenntnisse über Überlebensvorteile. Derselbe Vergleich in Bezug auf die Ergänzung der Therapie mit Cetuximab ergab einen geringen, jedoch statistisch nicht signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 32).

Die Abbildung 30 zeigt die Unterschiede für den Therapiearm mit herkömmlicher Chemotherapie (CTX). Die Abbildung 31 veranschaulicht das mediane Überleben für die Patientengruppe, welche zusätzlich mit Cetuximab therapiert wurde. In beiden Abbildungen ist eine fehlende Signifikanz erkennbar.

Ergebnisse

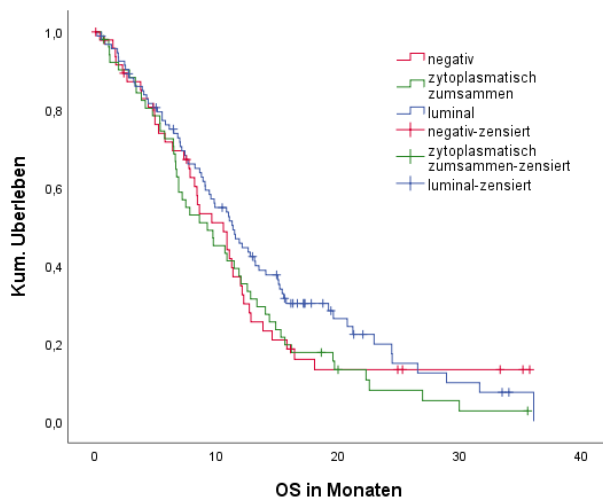


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Therapie CTX, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

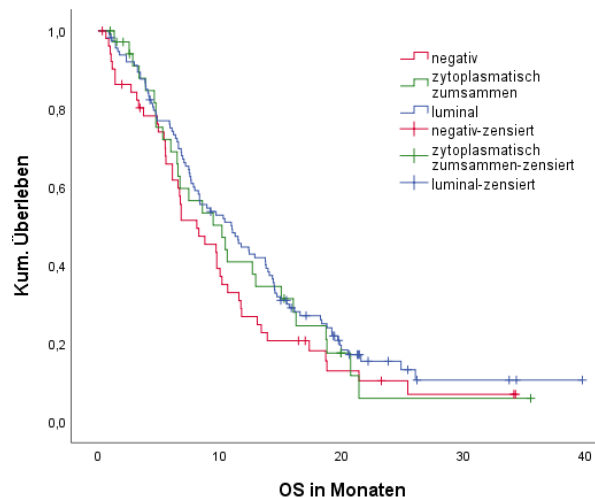


Abbildung 31: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Therapie CTX+Cetuximab, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

4.4.2.6 Geschlecht

Die Betrachtung von Geschlecht und Färbergebnis in Bezug auf das Überleben, ließ bei der Gegenüberstellung von luminalen zu negativen Tumoren in der Gruppe der männlichen Patienten mit luminaler Färbung einen Zusammenhang vermuten (log Rank $p=0,037$, siehe Abbildung 42). So lebten Männer mit luminaler Färbung gegenüber Männern ohne Färbung fast 3 Monate länger. Bei dieser Gegenüberstellung ließ sich im weiblichen Geschlecht kein nennenswerter Unterschied beobachten (siehe Tabelle 33).

Tabelle 33: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 – Geschlecht, eine Darstellung der medianen Überlebenszeit

Geschlecht	negativ	luminal
weiblich	10,6 Monate (n=24)	9,4 Monate (n=46)
männlich	8,6 Monate (n=77)	11,3 Monate (n=165)
	negativ	zytoplasmatisch
weiblich	10,6 Monate (n=24)	6,9 Monate (n=33)
männlich	8,6 Monate (n=77)	9,7 Monate (n=58)

Ergebnisse

Im Rahmen der Analyse der Patienten mit zytoplasmatischen Färbung gegenüber einer fehlenden Färbung ergab sich für Frauen mit zytoplasmatischen Tumor eine mediane Überlebenszeit von 6,9 Monaten. Diese Überlebenszeit war als deutlich schlechteres Ergebnis als das der Frauen mit negativem Tumor mit 10,6 Monaten einzuschätzen. Hier ließ sich ein Zusammenhang vermuten (log Rank $p=0,153$, siehe Abbildung 43).

Bei den männlichen Patienten mit zytoplasmatisch konfigurierten Tumoren ließen sich keine relevanten Zusammenhänge bzw. Unterschiede zu jenen mit negativem Tumor feststellen (siehe Tabelle 33).

Die Abbildung 32 präsentiert die Unterschiede für weibliche Tumorpatientinnen. Die Abbildung 33 zeigt das mediane Überleben für männliche Tumorpatienten. Die zuvor angemerkte mangelnde statistische Signifikanz wird aus den Abbildungen ersichtlich.

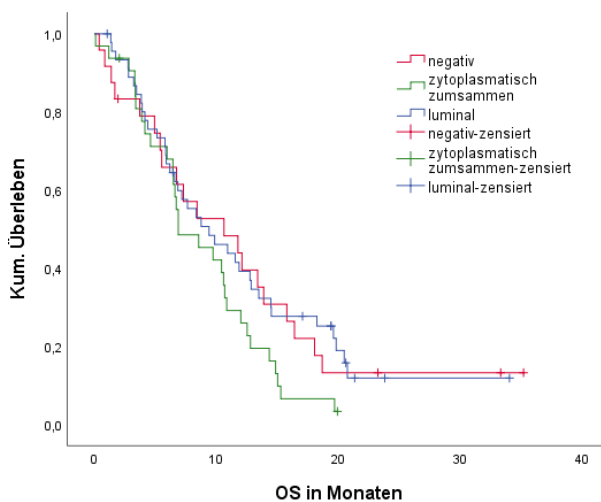


Abbildung 32: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeit-analyse Subkollektiv CD133 - Geschlecht weiblich, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

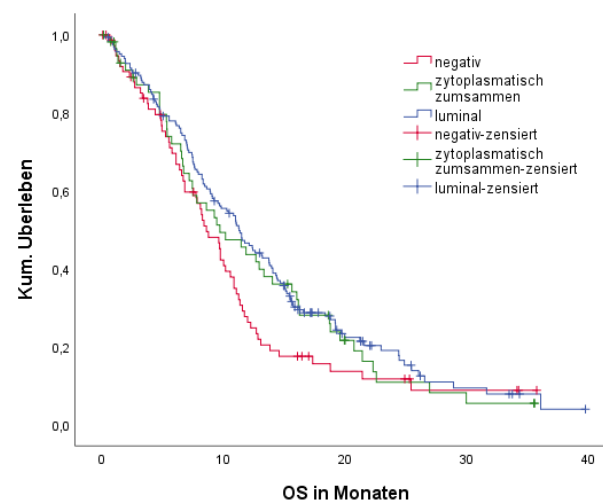


Abbildung 33: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeit-analyse Subkollektiv CD133 - Geschlecht männlich, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

4.4.2.7 Alter

Tabelle 34: Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 – Alter, eine Darstellung der medianen Überlebenszeit

Alter	negativ	luminal
jünger als 60	10 Monate (n=60)	11,5 Monate (n=89)
älter als 60	6,8 Monate (n=41)	10,4 Monate (n=122)
	negativ	zytoplasmatisch
jünger als 60	10 Monate (n=60)	9,2 Monate (n=45)
älter als 60	6,8 Monate (n=41)	9,7 Monate (n=46)

Die Auswertung der Daten, bezogen auf Alter und Färbeergebnisse, ließ in der Gruppe der über 60-Jährigen für die nicht gefärbten Tumoren ein schlechteres Überleben gegen über den luminalen Tumoren vermuten. So überlebten die luminal gefärbten Tumoren über 60-Jährigen mit 11,5 Monaten länger als der Durchschnitt, wohingegen die CD133 negativen nur 6,8 Monate lebten (log Rank $p=0,039$, siehe Tabelle 34).

In der Analyse der Patienten, welche jünger als 60 Jahre sind, ließ sich bei den luminalen Fällen ein Vorteil mit 11,5 Monaten OS im Vergleich zu den nicht gefärbten Tumoren erahnen (log Rank $p=0,369$, siehe Abbildung 44, siehe Tabelle 34).

Ein ähnlicher Zusammenhang ließ sich dabei auch in der Gegenüberstellung der CD133 negativen mit den zytoplasmatischen Expression vermuten. Hier überlebten die Patienten im Alter von über 60 Jahren mit zytoplasmatisch gefärbten Tumoren ungefähr 10 Monate, hingegen die nicht exprimierenden nur 6,8 Monate. (log Rank $p=0,343$, siehe Abbildung 45, siehe Tabelle 34).

In der Gruppe der unter 60-Jährigen zeigten sich negative und zytoplasmatische Färbungen im direkten Vergleich ähnlich. Eine statistische Relevanz ergab sich nicht (siehe Tabelle 34).

Abbildung 34 und Abbildung 35 zeigen eine Gegenüberstellung der drei Färbungen. Hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil am kumulativen Überleben aufgetragen. Die Abbildung 34 erläutert Differenzen

Ergebnisse

für Tumorpatienten mit einem Alter von über 60 Jahren zum Randomisierungszeitpunkt. Die Abbildung 35 veranschaulicht die Überlebenszeit für die Studienteilnehmer im Alter von über 60 Jahren.

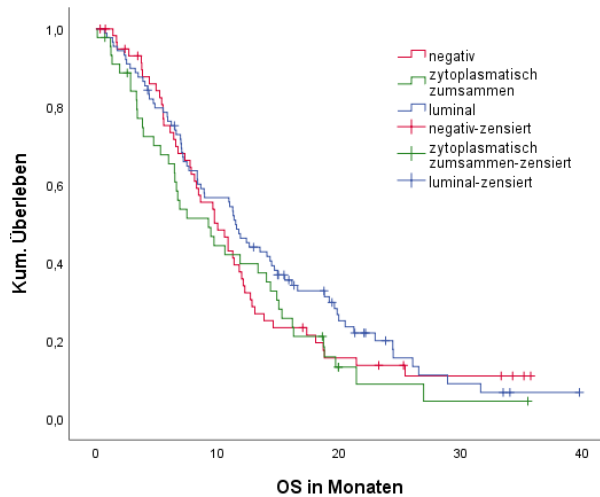


Abbildung 34: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Alter <60 Jahre, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

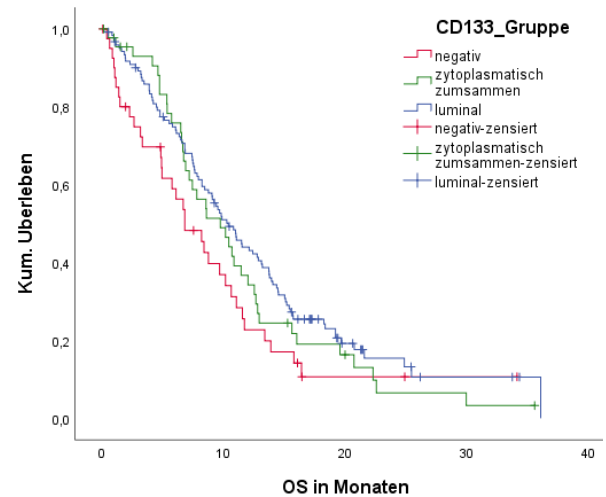


Abbildung 35: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133 - Alter >60 Jahre, eine Gegenüberstellung der drei Färbungen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

5 Diskussion

5.1 Einleitung

Das Magenkarzinom ist trotz rückläufiger Inzidenz nach wie vor die fünfthäufigste Krebserkrankung weltweit. In seiner Letalität belegt es den dritten Platz im internationalen Vergleich (1).

Ein frühes Erkennen des Tumors hat gerade beim Karzinom des Magens einen großen Stellenwert. So können beispielsweise kleine, die Mukosa betreffende Befunde minimalinvasiv über eine endoskopische Resektion entfernt werden (58, 59). Andererseits erzwingt das bereits metastasierte und damit fortgeschrittene Magenkarzinom die chirurgische Gastrektomie als aktuell noch immer einzige kurative Behandlungsoption (60).

Eine ausschließlich medikamentöse zytostatische Therapie wird aktuell nur in palliativen Behandlungskonzepten vorgesehen. Hier stehen neben klassischen Chemotherapeutika wie Taxanen, Fluoropyrimidinen und Platinhaltigen auch neue Therapieoptionen zur Verfügung (57, 69-72). So kann bei positiven HER-2neu Status (mind. 2+, FISH) eine klassische Chemotherapie mit Trastuzumab ergänzt werden. Diese Kombination führte zu einer signifikanten Verbesserung des Überlebens innerhalb der TOGA-Studie (57, 74, 76). Alternativ ist der Einsatz eines VEGFR-2-Antikörpers, wie Ramucirumab, möglich (57, 78, 79). Die innovativen Checkpoint-Inhibitoren, wie Nivolumab, stellen einen neuen Angriffspunkt in der Therapie dar. Hier wurde in den letzten Jahren die Zulassung für die Kombination aus dem immunsystemregulierenden Nivolumab mit Chemotherapie beim fortgeschrittenen oder metastasierten Magenkarzinom und Karzinom am Ösophagogastralen Übergang erteilt (142).

Gegenstand weiterer aktueller Forschung sind Tumorstammzellen und ihre Funktion in der Entstehung von Tumoren und deren Überleben trotz zytotoxischer Therapien. Stammzellen könnten zum einen als diagnostisches und prognostisches Werkzeug genutzt werden, wie bereits bekannte Tumormarker (99). Zum anderen bieten sie mögliche Angriffspunkte für die gezielte Krebstherapie. Tumorstammzellen besitzen diverse Abwehrmechanismen gegen Zytostatika, wie beispielsweise die Nutzung von Membrantransportern, Quieszenz oder hohe Plastizität (93, 95-97).

5.1.1 CD133 Biochemie

Das in dieser Arbeit thematisierte CD133 (AC133, Promin-1) ist ein immunphänotypisches Oberflächenantigen aus Glykoproteinen (109). Es ist ein populärer Marker zum Nachweis von Tumorstammzellen, wie unter anderem in soliden Tumoren (111).

Seine Expression ist variabel und wird beispielsweise durch Hypoxie hochreguliert. Durch die Hochregulation von, unter anderem CD133, werden Stammzeleigenschaften induziert und es kommt zu einem gesteigerten Tumorwachstum, sowie zunehmender Metastasierung (114-116). Diese Expression wird zum einen durch Steigerung von HIF-1 α (116-118) als auch durch den Sauerstoffgehalt selbst induziert (119). Weitere wichtige Regulationsmechanismen sind das Tumorsuppressorprotein p53 (121), der Transkriptionsfaktor Ikaros (122) und epigenetische Veränderung der Methylierung des CD133 Promotors (123, 124).

5.1.2 CD133 und das Magenkarzinom

Das Oberflächenprotein CD133 erlangte bereits in einigen Tumorentitäten Popularität. So konnte beispielsweise in Studien über das Kolon ein Zusammenhang zwischen Tumordifferenzierung, das Rezidivrisiko und das Ansprechen auf Chemotherapie beobachtet werden (131, 132). Über den Stellenwert von CD133 im Magenkarzinom herrscht hingegen zum jetzigen Zeitpunkt noch keine eindeutige Lehrmeinung. So wird CD133 häufig als möglicher prognostischer Marker, oder die Assoziation mit fortgeschrittenen Tumorstadien diskutiert (140, 143). Bisherige Ergebnisse führten jedoch noch zu keiner klinischen Anwendung wie beispielsweise in Form von Prognosen oder Therapien.

5.2 Präsentation der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur

Intention dieser Arbeit war es die Korrelation von histopathologischen Ergebnissen mit klinischen Parametern zu untersuchen und zusätzlich das Gesamtüberleben bestimmter einzelner Kollektive zu analysieren. Hieraus ergeben sich Hinweise auf die Relevanz des Tumorstammzellmarkers CD133 im Magenkarzinom.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit präsentiert und mit aktuell vorliegender Literatur verglichen. Zu den präsentierten Ergebnissen über die unterschiedliche Ausprägungen der CD133-Färbung in Kombination mit klinischen Parametern und deren Überlebenszeitanalysen gibt es zum aktuellen Zeitpunkt noch keine vergleichbare Literatur. Dies wäre für eine bessere Bewertung im wissenschaftlichen Kontext jedoch wünschenswert gewesen.

5.2.1 Klinische Parameter und Überlebenszeitanalyse

5.2.1.1 IHC-Subkollektiv CD133

In der Auswertung der medianen Überlebenszeiten der unterschiedlich kategorisierten Fälle lässt sich kein statistisch nachweisbarer Überlebensvorteil für eines der Färbemuster beobachten. Im direkten Vergleich der luminal gefärbten Tumore gegenüber den negativ klassifizierten Fällen lässt sich ein Zusammenhang lediglich vermuten. Dabei hatten Patienten mit luminaler CD133 Ausprägung eine mediane Überlebenszeit von 11 Monaten gegenüber denen mit ungefärbten Tumoren mit 8,7 Monaten.

Im Vergleich dazu konnten Lu et al. in ihrer Meta-Analyse ein schlechteres 5-Jahres-Überleben für die Gruppe der CD133 positiven Patienten nachweisen. Die Autoren schlussfolgern daraus eine schlechtere Prognose in Bezug auf die Überlebenszeit für CD133 positive Patienten. Hierbei wurde nicht zwischen unterschiedlichen Färbemustern unterschieden (143).

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Diao et al., welche in ihrer Studie für CD133 positive Patienten in Kombination mit der Expression von HMBOX1 ein schlechteres Überleben beobachteten als bei CD133 negativen Patienten (144).

Yiming et al. konnten in ihrer Meta-Analyse lediglich in 3 von 8 behandelten Studien eine signifikante Korrelation zwischen einem schlechteren 5-Jahresüberleben und der CD133 Ausprägung feststellen (140).

Ähnlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit kommen Kim et al. zu der Schlussfolgerung, dass die Expression bzw. der Nachweis von CD133 einen vorteilhaften Einfluss auf die Prognose der Patienten nimmt (145).

5.2.1.2 Laurén-Klassifikation / Histologie

In der Auswertung der Laurén-Klassifikation bzw. des histologischen Wachstumsmuster zeigte sich die Gruppe der luminal gefärbten Tumore mit 58% am häufigsten als intestinales Wachstum. Eine mögliche Korrelation ergab sich lediglich in der Kategorie der diffus/gemischten Tumoren, welche zu 67% zytoplasmatisch gefärbt waren. Es ist zu vermuten, dass ein diffuses Wachstum zu der unorganisierten zytoplasmatischen Färbung führen kann. Eine statistisch nachweisbare Korrelation für organisiert konfiguriertes Drüsenwachstum und damit Ausprägung einer luminalen Färbung konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

In der aktuellen Literatur finden sich unterschiedliche Ergebnisse. So konnten Hashimoto et al. in ihrer Arbeit an 189 untersuchten Patienten eine Korrelation zwischen luminal gefärbten und differenziert ausgeprägtem Tumorwachstum nachweisen. Ebenfalls die Korrelation von zytoplasmatischer Färbung und diffus konfigurierten Tumoren konnte gezeigt werden (138).

Im Gegensatz dazu konnten Ishigami et al. in ihrer Arbeit keine signifikanten Korrelationen in Histologie und CD133 Ausprägung feststellen. Beschrieben wird eine CD133 Färbung sowohl in differenziertem als auch in undifferenziertem Tumorwachstum. Anzumerken ist jedoch, dass im Rahmen dieser Arbeit zwar unterschiedliche Färbemuster erkannt wurden, diese aber nicht im Einzelnen ausgewertet wurden (136).

Nosrati et al. Zeigten ebenfalls eine Korrelation zwischen einer CD133-Färbung (jedoch nicht näher differenziert) und dem intestinalen Typ nach Laurén (137).

Lu et al. konnten in ihrer Meta-Analyse mit insgesamt 4729 asiatischen Patienten keine Korrelation von CD133 Färbung und histologischen Wachstumsmustern zeigen (143). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch Attai et al. in ihrer kleiner angelegten Studie 2019 mit 77 Patienten (146).

So ist anhand der hier präsentierten Ergebnisse und der Literaturrecherche keine eindeutige Aussage über eine Korrelation unterschiedlicher Laurén-Klassifikationen

und dem Nachweis von CD133 zu treffen. Ein Zusammenhang zwischen einem unorganisierten Wachstum in Form eines, nach Laurén als „diffus“ klassifizierten, Tumors und eines zytoplasmatischen Färbemusters kann lediglich klinisch vermutet werden. Gleiches gilt für die Annahme eines differenzierten Tumorwachstums in Korrelation mit dem luminalen Färbemuster.

Die Überlebenszeitanalyse der Tumore anhand der Laurén-Klassifikation sowie der histologischen Färbung ergab für die Gruppe der Tumore mit intestinalem Wachstum und luminaler Färbung ein deutlich längeres medianes Überleben von 3 Monaten gegenüber den negativ klassifizierten Tumoren. In der statistischen Bewertung kann jedoch lediglich von einem starken Trend gesprochen werden. Somit ist ein Zusammenhang zwischen der Art des Tumorwachstums und dem Färbemusters zu vermuten.

5.2.1.3 Grading

In der Auswertung des Tumor-Gradings, wurde in dieser Arbeit Grade 1 und Grade 2 zusammengefasst, um ein größeres repräsentativeres Kollektiv zu erhalten. Ein möglicher relevanter Zusammenhang präsentierte sich lediglich in Grade 3 in der Gegenüberstellung von nicht- und luminal gefärbten Tumoren. Die Beobachtung, dass ein Großteil der G1/2 Tumore luminal gefärbt war, ließ sich statistisch nicht verifizieren.

In Bezug auf das Tumor-Grading lassen sich im Rahmen der Literaturrecherche wenige Arbeiten finden. Analysiert wurde dieser Parameter von Attai et al., welche in ihren Forschungen keine Korrelation zwischen dem Grading und einem CD133 Nachweis feststellen konnten (146). Zhao et al. hingegen beobachteten einen Zusammenhang zwischen einem hohen Intensitätsscore der CD133-Färbung und einem hohen Grading (139).

Auf Grundlage der aktueller, jedoch in sich nicht widerspruchsfreien Literatur, sowie den Erkenntnissen dieser Arbeit können abschließend keine Korrelation beobachtet werden.

Die Überprüfung der unterschiedlichen Färbungen und dem Tumor-Grading in Bezug auf das mediane Überleben ergab keine statistisch relevanten Ergebnisse. Zwar zeigte sich in der Gruppe der G1/G2 für die luminalen Fälle ein Überlebensvorteil von 5,4 Monaten gegenüber den Tumoren ohne Färbung, jedoch ist hier die geringe Fallzahl zu berücksichtigen.

5.2.1.4 TNM

Innerhalb der Untersuchungen und Auswertungen der Ergebnisse konnten in dieser Arbeit keine statistisch relevanten Korrelationen in Bezug auf die TNM-Klassifikation beobachtet werden.

Zu einem vergleichbaren Ergebnis kommen auch Attai et al. Hier konnten ebenfalls keine signifikanten Korrelationen beobachtet werden (146).

Im Gegensatz dazu konnten Yiming et al. im Rahmen ihrer Meta-Analyse von 8 Studien an asiatischen Patienten folgende Korrelationen erarbeiten: in hohen TNM-Stadien (T3/T4) war eine größere Ausprägung von CD133 festzustellen. Auch wiesen nach Dafürhalten der Autoren Patienten mit einer Lymphknoten-Metastasierung eine höhere CD133 Ausprägung auf (140). Ebenso beschrieben Lu et al. in ihrer Meta-Analyse eine Korrelation von hohen TNM-Stadien und der CD133-Färbung. Darüber hinaus beobachteten die Autoren eine Korrelation mit Metastasen in Lymphknoten und Fernmetastasen (143).

Abschließend lässt sich ein Zusammenhang zwischen fortgeschrittenen TNM-Stadien und einer CD133 Färbung lediglich vermuten. Grundlage dafür liefern große Meta-Analysen von Lu et al. und Yiming et al., jedoch konnte jene Vermutung in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Bei den genannten Meta-Analysen ist anzumerken, dass zum einen lediglich die asiatische Population untersucht wurde und zum anderen in der Art der Färbung nicht differenziert wurde. Interessant wären Studien mit hoher Teilnehmerzahl und einer westlichen Population.

Im Rahmen der genaueren Betrachtung von Korrelation in Tumorgöße, Färbemuster und dem medianen Überleben konnten keine statistisch relevanten Zusammenhänge erfasst werden. Lediglich bei großen Tumoren (T3/T4) ließ sich ein Trend erahnen. So hatten Tumore mit luminaler Färbung einen Vorteil im medianen Überleben gegenüber den ungefärbten Tumoren. Dieser fällt jedoch sehr gering aus, gerade in Bezug auf das durchschnittliche mediane Überleben.

Bei der Prüfung von möglichen Zusammenhängen zwischen N-Klassifikation, Färbemuster und der medianen Überlebenszeit ließ sich lediglich für die Gegenüberstellung „luminal“ und „negativ“ in der Untergruppe N0/N1 Tumore ein möglicher Zusammenhang vermuten. Negativ bewertete Fälle zeigten ein durchschnittliches medianes Überleben von 9,7 Monaten, wohingegen bei luminal gefärbten Tumoren ein längeres Überleben von 13,2 Monaten beobachtet werden konnte. In fortgeschritte-

ner Metastasierung war jener vermutete Vorteil nicht zu beobachten. Bei N2/N3 Tumoren lässt sich in Betracht ziehen, ob zytoplasmatisch Tumore ein besonders schlechtes Überleben haben.

5.2.1.5 Alter

Zur besseren Vergleichbarkeit bzw. besserer Übersicht wurden in der Kategorie des Alters 4 Gruppen gebildet. In der Gruppe der Patienten welche älter als 45 Jahre waren zeigte sich im Vergleich zwischen fehlender und luminaler Färbung eine potenziell relevante Verteilung mit 70% luminal gefärbten Tumoren. Ein ähnlicher Trend zeigte sich auch im Kollektiv der über 60-jährigen. Hier waren in der Gegenüberstellung luminal und negativ, $\frac{3}{4}$ der Patienten luminal gefärbt. Aus den Daten lässt sich ein Zusammenhang zwischen höherem Alter und luminal gefärbten Tumoren vermuten. Für die zytoplasmatisch gefärbten oder den ungefärbten Präparaten konnten keine Zusammenhänge nachgewiesen werden.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt auch Nosrati et al. Wobei hier lediglich das Vorliegen einer nicht näher unterschiedenen CD133-Färbung mit einem Alter über 65 Jahren assoziiert war (137).

Gegensätzlich dazu präsentierten sich in der Meta-Analyse von Lu et al. keine Korrelation zwischen positiver CD133 Färbung und dem Alter (143). Jedoch ist hier zu berücksichtigen, dass nur zwischen CD133 positiv bzw. negativ unterschieden wurde. Eine Differenzierung in der Art der Färbung wurde nicht durchgeführt. Möglicherweise liegt der Grund für die fehlende Korrelation in der nicht durchgeführten Differenzierung in den Färbemustern.

Die Auswertung des medianen Überlebens in Bezug auf Altersgruppen lässt für bestimmte Konstellationen einen Zusammenhang vermuten. So hatte die Gruppe der über 60-Jährigen und luminaler Tumorfärbung mit 10,4 Monaten ein deutlich längeres Überleben als die negativ klassifizierten Tumore dieser Gruppe (6,8 Monate). Im direkten Vergleich zeigte sich dies als möglich statistisch relevant. Weniger statistisch relevant zeigte sich diese Konstellation auch bei der Gruppe der unter 60-Jährigen. In der Gegenüberstellung der über 60-Jährigen mit zytoplasmatischer oder ausbleibender Färbung präsentierten sich die zytoplasmatischen Fälle mit einem besseren medianen Überleben von 9.7 Monaten. Hier ist jedoch lediglich ein statistischer Trend zu vermuten.

5.2.1.6 Geschlecht

Die Auswertung der Daten anhand des Geschlechts ließ bei den weiblichen Patienten im Vergleich zytoplasmatische gegen fehlende Färbung einen Trend vermuten. In den anderen Konstellationen waren keine Hinweise auf einen Zusammenhang festzustellen.

In ihrer Studie konnten Hashimoto et al. eine signifikante Verteilung im Färbemuster abhängig vom Geschlecht zeigen. Dabei präsentierten sich männliche Patienten mit 94% luminal. Bei der zytoplasmatischen Färbung zeigte sich eine signifikante Verteilung von 61% Männern und 39% Frauen (138). Diese Zahlen entsprechen in etwa der Verteilung in der hier vorliegenden Arbeit (42% der Frauen waren zytoplasmatisch) und bestätigen die hier erfassten Ergebnisse.

Ishigami et al. beschrieben mehr Männer als CD133 positiv, jedoch ohne Signifikanz. Es erfolgte keine genauere Differenzierung des Färbemusters (136).

Die Meta-Analyse von Lu et al. ergab keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Geschlecht und einer CD133 Färbung (wie bereits beschrieben, nicht näher differenziert) (143).

Grundsätzlich haben Frauen und Männer ein unterschiedlich hohes Risiko für Tumorerkrankungen. Berücksichtigt man die Tumore der geschlechterspezifischen Drüsen, so lässt sich ein grundsätzlich erhöhtes Krebsrisiko für Männer beobachten. Dies konnten Edgren et al. in ihrer Studie bestätigen. Hier hatten von 35 Tumorentitäten das männliche Geschlecht bei 32 die höhere Inzidenz. (147) Dies spiegelt sich auch in der Inzidenz des Magenkarzinoms wider (4). Es lässt sich vermuten, dass neben epigenetischen Faktoren wie Ernährung oder Risikofaktoren auch weitere Faktoren eine Rolle spielen. In dieser Arbeit konnte die CD133 Ausprägung nicht als Erklärung für die unterschiedliche Inzidenz dienen.

Betrachtet man die Überlebenszeitanalyse der unterschiedlichen Geschlechter in Kombination mit unterschiedlichen Färbemustern, so können lediglich Vermutungen über Korrelationen aufgestellt werden. Der Vergleich luminale Färbung und negative Klassifikation zeigt beim männlichen Geschlecht für die Luminale einen Überlebensvorteil im medianen Überleben von 3 Monaten. Dagegen lässt sich beim weiblichen Kollektiv in der Gegenüberstellung zytoplasmatische Färbung gegen keine Färbung ein statistischer Trend nachweisen. Zytoplasmatische Fälle überlebten dabei

deutlich schlechter als negative Fälle bzw. lagen mit ihrer medianen Überlebenszeit deutlich unter dem Durchschnitt.

5.2.1.7 CD 133 und EGFR

Die ursprüngliche Intention der EXPAND-Studie als eine Phase-3-Studie war einen Vorteil in der Behandlung von Patienten mit Magenkarzinom durch ergänzende Gabe von Cetuximab zu bestätigen.

Im Rahmen der Studie wurde der EGFR-Rezeptor-Status der Probanden erhoben. Daher standen in der Analyse der Daten auch die Auswertung von Korrelationen zwischen CD133 Expression und EGFR-Status bzw. das Ansprechen auf eine Antikörpertherapie zur Verfügung.

In ihrer Arbeit zu hepatozellulären Karzinomen betrachteten Jang et al. den Zusammenhang zwischen CD133 und EGFR. Als Material wurden verschiedene bestehende Zellkulturen genutzt. Als Ergebnis ihrer Arbeit postulierten Jang et al., dass Zellen mit einem hohen CD133-Level auch eine erhöhte Expression von EGFR zeigten. Nach Erkenntnis der Autoren verhielten sich die Level von CD133 und EGFR proportional zueinander. Darüber hinaus vermuten die Autoren *in vitro* eine, auf CD133 basierende ausgeprägter Resistenz gegenüber zytostatischer Therapie durch CD133 geförderte Stammzelleigenschaften mit überexprimierten EGFR (148).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine relevanten Korrelationen zwischen CD133 und EGFR gezeigt werden. Zwar ließ sich ein gewisser Trend in der Verteilung der negativen und zytoplasmatischen Färbungen erkennen, dieser war jedoch statistisch nicht nachzuweisen. Hier präsentierten sich EGFR negative Tumore in gleichermaßen zytoplasmatisch und nicht gefärbt. Weiter zeigten sich EGFR positive Tumore häufiger negativ bewertet. Dies führte jedoch in der weiteren Analyse zu keinem Einfluss auf das Überleben dieser Patientengruppe. Auch lässt sich anhand dieser Daten die Theorie von Jang et al. nicht bestätigen.

Des Weiteren hatten die verschiedenen Therapiearme und damit der Einsatz von Cetuximab keinerlei bedeutsame Einflüsse auf das Überleben. Ein zuvor vermuteter Zusammenhang ließ sich nicht bestätigen. Hinsichtlich der Behandlung mittels Antikörper konnte, wie auch in der ursprünglichen EXPAND-Studie, kein Überlebensvorteil gezeigt werden (141). Auch in der genaueren Betrachtung bestimmter Subgrup-

pen in Kombination mit EGFR bzw. Antikörper-Therapie ließ sich kein Zusammenhang feststellen.

Die Analyse der Patienten in den unterschiedlichen Therapiearmen und den unterschiedlichen Färbemustern lässt in Bezug auf das mediane Überleben Korrelationen höchstens vermuten. So zeigten CD133 negativ klassifizierte Tumore mit der Kombinationstherapie aus CTX und Antikörper ein deutliches schlechteres Überleben als der Durchschnitt der Patienten, sowie ein schlechteres Überleben als luminal Fälle mit besagter Therapie. Ein ähnliches Bild ist im Vergleich luminal gegen ungefärbte Fälle bei herkömmlicher CTX-Therapie zu beobachten. Hier lässt sich ebenfalls ein geringer Überlebensvorteil für die luminalen Fälle erahnen. Dennoch lassen sich keine nachweisbaren Unterschiede auf Grund der Behandlung festhalten. Eventuell ist die Kombinationstherapie schlechter als die reine CTX-Therapie, und luminal CD133 exprimierende Tumore tendenziell mit einem besseren Überleben als die nicht gefärbten assoziiert.

5.2.2 Gastrointestinale Stromatumoren

Das ausgewertete Kollektiv wies zwei Fälle von Gastrointestinalen Stromatumoren auf. Diese färbten sich alle auffallend prägnant mit der verwendeten IHC-Färbung (siehe Abbildung 14, Abbildung 15). In einigen Studien konnte CD133 eine wichtige Rolle in GIST zugeschrieben werden. Beispielsweise konnten Studien eine schlechtere Prognose für GIST mit CD133 Expression nachweisen (149, 150). Weiter konnten Geddert et al. in ihrer Studie zeigen, dass in GIST CD133 Genabschnitte demethyliert werden und folglich hochreguliert sind. Die Autoren sprechen von einem möglichen Marker für Malignität von Tumoren, sowie einem möglichen Angriffspunkt für „targeted therapies“ (124).

5.3 Limitationen der Arbeit

5.3.1 Diskussion der Auswertung der Färbung

Es wurde ein Bewertungssystem angewandt, in dem zum einen über die Positivität der Fälle entschieden wurde. Zum anderen wurden Präparate kategorisiert in „luminal“, „zytoplasmatisch“, „luminal und zytoplasmatisch“, „keine Färbung“ und „nicht gewertet“. Hierbei war der Großteil der Präparate eindeutig zuzuordnen, jedoch gab es dabei auch weniger eindeutige Fälle. Dies ist nicht zuletzt durch die histologische Heterogenität des Magengewebes bedingt.

In Teilanalysen wurde die Kategorie der zytoplasmatisch gefärbten Tumore mit denen der „luminal und zytoplasmatisch“ zusammengefasst. Grund hierfür war die geringe Fallzahl und die ähnliche Morphologie. In einem größeren Kollektiv hingegen, hätte das weitere Fortbestehen der 4 Kategorien erwogen werden können.

5.3.2 Differenzierung der Färbungen

In Anlehnung an die Studie von Hashimoto et al. erfolgte in dieser Arbeit die Kategorisierung der CD133 Färbung.

Hashimoto et al. nutzten neben dem monoklonalen anti-CD-133 Antikörper in zytoplasmatisch kategorisierten Fällen einen weiteren Antikörper gegen Cytokeratin. Solch ein zusätzlicher Antikörper wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht genutzt. Dennoch ähnelte sich der prozentuale Anteil an zytoplasmatischen Fällen in beiden Untersuchungen.

Die Einteilung in die Kategorie der luminal gefärbten Tumore erfolgt meist eindeutiger als die der zytoplasmatischen Färbungen.

Der Großteil der aktuell vorhandenen Studien differenziert die CD133 Färbung nicht näher. Es erfolgt lediglich die Unterteilung nach „positiv“ und „negativ“. Dies erleichtert die Bewertung der Präparate, jedoch ist zu diskutieren, ob hier ein wichtiges Differenzierungsmerkmal verloren geht. Der Stellenwert einer Differenzierung wird unter Berücksichtigung der Theorie von unterschiedlichen histologischen Wachstumsmustern und damit verbundenen unterschiedlichen Färbungen deutlich. Möglicherweise hat CD133 in unterschiedlicher Lokalisation (zytoplasmatisch oder luminal) unterschiedliche Funktionen.

5.3.3 Diskussion des Studiendesigns

Das Studiendesign der EXPAND-Studie beinhaltet die Sammlung von histologischen Gewebeproben weltweit. Dabei bestand der Anteil von Geweben aus Europa bei ca. 75%. Dies steht im Gegensatz zu den meisten anderen Studien zum Magenkarzinom und CD133. Ein Großteil der bereits publizierten Studien beschäftigt sich mit der asiatischen Population. Hier ist, wie bereits in der Literatordiskussion thematisiert, noch einmal die Herkunft bzw. die Zugehörigkeit zur asiatischen Population als einer der Herkunftsländer mit einem erhöhten Risikofaktor für die Entwicklung eines Magenkarzinoms zu erwähnen (151).

Darüber hinaus sind bereits in der EXPAND-Studie in der Kategorie „Histologische Klassifikation nach Laurén“ und dem „Grading“ einige Fälle nicht definiert. Wahrscheinlich wurden diese Daten von den teilnehmenden Zentren nicht erfasst, bzw. übermittelt. Dies führt in entsprechenden statistischen Auswertungen zu geringen Fallzahlen und entsprechend geringer Aussagekraft.

5.3.4 Diskussion Antikörper und IHC Färbung

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung hat neben seiner hohen Praktikabilität und weiten Verbreitung auch einige mögliche Schwachstellen. Diese werden im Folgenden genauer betrachtet als kritische Auseinandersetzung mit möglichen Fehlerquellen.

Auswahl des Antikörpers

Die Auswahl des Antikörpers könnte Auswirkungen auf das Ergebnis von CD133 Studien haben. So nutzen unterschiedliche Forschungsgruppen häufig verschiedene Antikörper. Zu diskutieren wäre, ob alle Antikörper an denselben Epitopen binden, oder ob es hier bei bekannten Polymorphismen des CD133-Moleküls zu unterschiedlichen Bindungsverhalten kommt.

Färbung Muzin

Ein weiterer beobachteter möglicher Störfaktor ergab sich aus der Tatsache, dass sich auch gesundes Drüsengewebe des Magens mitanfärbte (siehe Abbildung 6). Ähnliche Beobachtungen machten auch Wu et al., dessen Arbeitsgruppe in normaler Magenmukosa neben anderen Tumorstammzellmarkern auch CD133 nachwies. Ferner beobachteten die Forscher CD133 häufiger in normalem Gewebe als in Adenokarzinomen (129).

Neben gesundem Drüsengewebe konnte im EXPAND-Kollektiv die IHC-Färbung auch außerhalb des Drüsengewebes beobachtet werden. Hier liegt der Verdacht nahe, dass sich Muzin ebenfalls mit dem verwendeten Marker anfärben lässt. Eine Anfärbung des Muzins konnte jedoch nicht in allen Präparaten beobachtet werden.

Polymorphismus des CD133

Wang et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass unterschiedliche Polymorphismen von CD133 mit entsprechend verschiedenen miRNA-Bindungsstellen große Unterschiede in dem Risiko ein Magenkarzinom zu entwickeln zeigen. So konnte das Team um Wang et al. Veränderungen identifizieren, welche ein vermindertes Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms zeigten und wiederum andere welche mit einem signifikant besseren Überleben assoziiert waren. Andere Polymorphismen hingegen waren assoziiert mit schlechterem Überleben, mehr Metastasen und erhöhte Malignität bei vorliegenden Risikofaktoren wie Rauchen oder Alkoholkonsum (152).

Diese Art des Polymorphismus von CD133 wurde in dieser, wie auch in einem Großteil der anderen Arbeiten in diesem Gebiet nicht berücksichtigt. Die IHC-Färbung liefert keinen Rückschluss auf Polymorphismen. Hier liegt ein möglicher Erklärungsansatz für die häufig noch recht uneinigen Aussagen in der Literatur. Wie auch von Wang et al. empfohlen, kann eine Differenzierung bei der CD133 Bestimmung sinnvoll sein, um die Funktionsfähigkeit des Proteins zu charakterisieren. Gegebenenfalls ist der immunhistochemische Nachweis von CD133 nicht ausreichend.

Die immunhistochemische Färbung beruht auf der Bindung eines Antikörpers an einem Antigen. Somit kann unter der Annahme der Antikörper binde lediglich am gewünschten zu untersuchenden Protein davon ausgegangen werden, dass besagtes Protein im Gewebe vorliegt. Allerdings gibt diese Form des Nachweises keine Aus-

kunft über die Funktionsfähigkeit eines Proteins oder aufgetretenen Polymorphismen im CD133 Gen.

Biopsien

Das in dieser Arbeit analysierte Material bestand aus Großpräparaten und Biopsien. Während bei Großpräparaten in der Regel intakte Gewebsabschnitte vorlagen, so wurden bei Biopsien lediglich Zellverbände entnommen. Die Biopsie bringt dabei einige Nachteile mit sich. Dabei muss zunächst der Tumor punktiert werden. Weiter müssen repräsentative Areale getroffen sein, da Tumore in der Regel inhomogen sind. Dabei ist die mögliche geringe Anzahl von Tumorzellen kritisch in ihrer Aussagekraft zu beurteilen. Die Probe wird aus dem Gewebe ausgestanzt, wodurch zumindest am Rand liegende Zellen zerstört werden können. Jene zerstörten Zellen weisen folglich eine defekte Zellmembran und Zellschäden auf, wodurch sie sich vermutlich im Kontakt mit der IHC-Färbung anders verhalten. So ist denkbar, dass das Auswaschen der Färbung bei zerstörter Zellmembran häufiger vorkommt und als Randartefakte gewertet werden müssen.

Auffällig war im Rahmen der Auswertung, dass unter den Biopsien keine zytoplasmatischen Fälle zu beobachten waren.

Überfärbte Präparate

Im Rahmen der IHC-Färbungen kam es vereinzelt zu stark überfärbten Präparaten. Dabei war das Gesamtpräparat unabhängig von Zellstrukturen gefärbt und eine differenzierte Beurteilung der Zellen nicht mehr möglich. Diese Präparate wurden aus der Auswertung entfernt.

5.4 Ausblick in der Therapie des Magenkarzinom

In der Therapie von malignen Tumoren bekommt die zielgerichtete, individuelle Therapie einen zunehmend größeren Stellenwert. So werden stetig neue Immun-Checkpoint-Inhibitoren entwickelt und deren Nutzen, meist in Kombination mit etablierter klassischer Chemotherapie, getestet.

Eine bereits etablierte Therapie bei Patienten mit Her2-positiven Status sowie einem fortgeschrittenen Karzinom ist die Kombination aus einem Her-2 Antikörper und klassischer Chemotherapie. Als Her-2 Antikörper wurde in der Vergangenheit Trastuzumab gewählt. Aktuelle Studien analysieren den Nutzen der zusätzlichen Kombination mit PD-1/PD-L1 Antikörpern (Nivolumab, Pembrolizumab, Ipilimumab. (153,154)

Darüber hinaus gibt es das Kollektiv der Her-2 positiven Patienten ohne entsprechendes Ansprechen auf eine Therapie mit Trastuzumab. Hier wird aktuell eine Kombination aus Trastuzumab-Deruxtecan (T-DXd) erprobt. (159) Ein weiterer Ansatz ist der neu entwickelte Her-2-Antikörper Margetuximab. Dieser konnte bereits einen potenziellen Nutzen in Kombination mit dem PD-1-Antikörper Pembrolizumab zeigen. (153,155)

Ein weiteres Patientenkollektiv ist die Gruppe der Patienten mit resektablen und damit lokal begrenzten Karzinomen. Hier wird im Rahmen der DANTE-Studie im perioperativen Setting die Kombination aus der etablierten Chemotherapie FLOT und dem PD-L1-Antikörper Atezolizumab erprobt. (160) Einen ähnlichen Ansatz verfolgt die KEYNOTE-585-Studie in der Chemotherapie und der Antikörper Pembrolizumab getestet werden. (153,156)

Neben der üblichen Kombination aus Checkpointinhibitoren und klassischer Chemotherapie ist Gegenstand der aktuellen Forschung eine Behandlung ohne Chemotherapie im Rahmen eines palliativen Konzeptes. Die CHECKMATE-649-Studie verglich eine solche chemotherapiefreie Behandlung mittels Nivolumab und Ipilimumab mit der Kombination aus Chemotherapie und Nivolumab und einer Monochemotherapie. Als Ergebnis der Studie ist ein klarer Nutzen der Kombinationstherapie aus Immun- und Chemotherapie festzuhalten. Einen Nutzen im OS ergab sich für eine chemotherapiefreie Behandlung nicht. (153,157,158)

6 Zusammenfassung und Wertung

Der Stellenwert von dem Tumorstammzellmarker CD133 in Magenkarzinomen ist noch unklar; die Nützlichkeit ist auch in der Literatur nicht abschließend geklärt. Die Notwendigkeit der Optimierung der Therapie des Magenkarzinoms ergibt jedoch aus der hohen Mortalität sowie der hohen Inzidenz.

Neben der eigentlichen Therapie spielt ebenfalls die Prävention bzw. Früherkennung eine elementare Rolle. Erfreulicher Weise sank die Inzidenz des Magenkarzinoms bereits durch die Meidung von Risikofaktoren wie gepökeltes Fleisch oder die Aufklärung über Alkohol- und Tabakkonsum in den letzten Jahren.

Von großem Stellenwert in der Tumorthherapie ist die frühzeitige Intervention bei Diagnose. So korrespondiert die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit mit dem Zeitpunkt der Intervention. In frühen Stadien, in denen womöglich die Magenschleimhaut lediglich oberflächlich infiltriert ist, können maligne Neoplasien minimalinvasiv chirurgisch resiziert werden. Bei fortgeschrittenen Tumoren hilft hingegen häufig lediglich die Gastrektomie sowie Chemotherapie. Es ergibt sich ein Unterschied in der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 85-100% für das frühe und lediglich 5-20% für das fortgeschrittene Karzinom (8, 9). Vor diesem Hintergrund hat sich die deutsche Fachgesellschaft in ihrer Leitlinie dennoch gegen ein routinemäßiges gastroscopisches Screeningverfahren ausgesprochen; dies steht im Gegensatz zum Verfahren beispielsweise in Japan (10).

Hinsichtlich der medikamentösen Chemotherapie blieben in der Vergangenheit große Erfolge in kurativen Behandlungskonzepten aus. So kommen rein medikamentöse Behandlungsstrategien lediglich in palliativen Konzepten zum Einsatz. Neue Ansätze in der Therapie gegenüber den alten Chemotherapeutika sind eine Ergänzung mit dem VEGFR-2-Antikörper oder dem immunmodulatorischen Checkpointinhibitor.

Der Stellenwert von dem Tumorstammzellmarker CD133 in Magenkarzinomen ist anhand der vorliegenden Literatur aktuell nicht abschließend diskutiert. So ergibt sich zum einen ein mögliches diagnostische Potential, zum anderen therapeutische Möglichkeiten durch gezielte Krebstherapie.

In dieser Arbeit wurden histopathologische Ergebnisse mit klinischen Parametern verglichen. Darüber hinaus wurde das Gesamtüberleben verschiedener Subkollektive analysiert. Eine Unterteilung der CD133-Färbung in entsprechende Subgruppen des Färbemusters wird in der vorliegenden Literatur lediglich vereinzelt durchgeführt. Der Großteil der gegenwärtigen Literatur unterscheidet lediglich in CD133 positiv oder negativ.

Die Betrachtung des gesamten CD133 Subkollektiv ließ sich für luminal gefärbte Tumore mit 11 Monaten Überlebenszeit gegenüber ungefärbten Tumoren mit 8,7 Monaten eine Überlebensvorteil vermuten. Die aktuelle Literatur zeigt sich hierzu uneindeutig. So konnten Yiming et al. in ihrer Metaanalyse lediglich in drei von acht erfassten Studien eine Korrelation zwischen CD133-Positivität und einem schlechteren Überleben erkennen (140). Zu ähnlichen Ergebnissen wie in dieser Arbeit kamen ebenfalls Kim et al (145).

In der Überlebenszeitanalyse der histologischen Subgruppen ergab sich für Patienten mit einem intestinalen Wachstum und luminaler Färbung ein Überlebensvorteil von 3 Monaten gegenüber den Fällen ohne Färbung. In der statistischen Bewertung konnte lediglich von einem starken Trend gesprochen werden.

Hinsichtlich des histologischen Wachstumsmuster (Klassifikation nach Laurén) zeigte sich der Anteil der Tumore mit intestinalen und damit einem organisierten Wachstum am häufigsten luminal (58%). Mögliche statistisch relevante Zusammenhänge zeigte die Kategorie der diffus/gemischten Tumore, welche sich zu 67% zytoplasmatisch gefärbt präsentierten. Hier kann ein Zusammenhang zwischen unorganisiertem Wachstum und zytoplasmatischer Färbung vermutet werden. Eine ähnliche Differenzierung in der Art der CD133-Färbung wurde durch Hashimoto et al. durchgeführt. Diese zeigte ähnliche Ergebnisse wie diese Arbeit (138). Nosrati et al. führten keine genauere Differenzierung in der Art der Färbung durch und zeigten so lediglich eine Korrelation für CD133 positive Tumore und den intestinalen Typ nach Laurén (137). Dem gegenüber stehen die Arbeit von Ishigami et al. sowie die Metaanalyse von Lu et al. in denen keine Zusammenhänge in CD133 Färbung und Wachstumsmuster nachgewiesen werden konnten (136,143).

Die genauere Betrachtung des Gradings ergab in dieser Arbeit keine relevanten Zusammenhänge. Darüber hinaus ist zum aktuellen Zeitpunkt wenig eindeutige Literatur vorliegend. Die Überprüfung der unterschiedlichen Färbungen und dem Tumor-

Grading in Bezug auf das mediane Überleben ergab keine statistisch nachweisbaren Zusammenhänge.

Ein ähnliches Ergebnis ergab die Analyse der TNM-Klassifikation anhand des EXPAND-Kollektivs. Die Aufarbeitung aktueller Literatur zeigt einerseits in Arbeiten wie von Attai et al. ebenfalls keine nachweisbaren Korrelationen (146). Andererseits konnten Lu et al. in ihrer Metaanalyse einen Zusammenhang zwischen fortgeschrittenen TNM-Stadien und einer vorliegenden CD133-Färbung nachweisen (143). Ein Zusammenhang ist auf Grundlage der Literatordiskussion zu vermuten.

Im Rahmen der genaueren Betrachtung von Korrelation in Tumorgroße, Färbemuster und dem medianen Überleben konnten keine statistisch relevanten Zusammenhänge erfasst werden. Lediglich bei großen Tumoren (T3/T4) ließ sich für Tumore mit luminaler Färbung ein geringer Vorteil im medianen Überleben gegenüber den ungefärbten Tumoren erkennen. Bei der Analyse der N-Klassifikation ergab sich für luminal gefärbte und wenig metastasierte Tumore (N0/N1) ein Überlebensvorteil gegenüber gleich metastasierten Tumoren ohne CD133 Färbung. Bei N2/N3 Tumoren lässt sich in Betracht ziehen, ob zytoplasmatisch Tumore ein besonders schlechtes Überleben haben.

In Bezug auf mögliche Korrelationen von Alter und CD133-Färbung lässt sich ein Zusammenhang zwischen luminal gefärbten Tumoren und einem höheren Alter vermuten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Nosrati et al (137). Dem gegenüber steht die Metaanalyse von Lu et al. Hier konnten keine Korrelationen zwischen positiver CD133 Färbung und dem Alter beobachtet werden (143). Möglicherweise liegt der Grund für die fehlende Korrelation in der nicht durchgeführten Differenzierung in den Färbemustern.

Die Auswertung des medianen Überlebens lässt für die Gruppe der über 60-Jährigen mit luminaler Tumorfärbung mit 10,4 Monaten ein deutlich längeres Überleben als die negativ klassifizierten Tumore dieser Gruppe (6,8 Monate) beobachten. In den übrigen Subgruppen ließen sich keine relevanten Korrelationen erfassen.

Die Auswertung der Daten anhand des Geschlechts ließ bei den weiblichen Patienten im Vergleich zytoplasmatische gegen fehlende Färbung nur einen Trend vermuten. In den anderen Konstellationen waren keine Hinweise auf einen Zusammenhang

festzustellen. Zu einer ähnlichen Verteilung kommen auch Hashimoto et al (138). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der Metaanalyse von Lu et al. in denen keine Korrelationen nachzuweisen waren (143). Zu beachten ist die Tatsache, dass das männliche Geschlecht statistisch das höhere Risiko hat eine maligne Erkrankung zu entwickeln (147). Es lässt sich vermuten, dass neben epigenetischen Faktoren wie Ernährung oder Risikofaktoren auch weitere Faktoren eine Rolle spielen. Sowohl im Rahmen der Literaturrecherche als auch in dieser Arbeit konnte die CD133 Ausprägung nicht als möglicher Faktor für die unterschiedliche Inzidenz erarbeitet werden.

Betrachtet man die Überlebenszeitanalyse der unterschiedlichen Geschlechter in Kombination mit unterschiedlichen Färbemustern, so können beim männlichen Geschlecht für die luminale CD133 Expression ein Überlebensvorteil im medianen Überleben von 3 Monaten beobachtet werden. Dagegen lässt sich für das weibliche Kollektiv mit zytoplasmatischer Färbung eine deutlich schlechtere mediane Überlebenszeit als der Durchschnitt erkennen (3,1 Monate).

Durch die Auswertung der EXPAND-Studie stand unter anderem auch der EGFR-Rezeptorstatus zur Auswertung zur Verfügung. Die Analyse dieses klinischen Parameters in Bezug auf die unterschiedlichen Färbungen ergab keine relevanten Korrelationen. Die von Jang et al. postulierte Theorie einer Korrelation von erhöhtem CD133-Level und einer erhöhten Expression von EGFR (in hepatozellulären Karzinomen) konnte in dieser Arbeit anhand des Magenkarzinoms nicht bestätigt werden (148).

Die Analyse des medianen Überlebens zeigte für CD133 negativ klassifizierte Tumore mit der Kombinationstherapie aus Chemotherapie und Antikörper ein deutliches schlechteres Überleben als der Durchschnitt der Patienten, sowie ein schlechteres Überleben als luminale Fälle mit besagter Therapie. Bei herkömmlicher Therapie zeigte sich ebenfalls ein geringer Überlebensvorteil für die luminal gefärbten Fälle. Dennoch lassen sich keine nachweisbaren Unterschiede auf Grund der Behandlung festhalten. Eventuell ist die Kombinationstherapie schlechter als die reine Chemotherapie, und luminal CD133 exprimierende Tumore tendenziell mit einem besseren Überleben als die nicht gefärbten assoziiert.

Unter Zusammenschau der hier durchgeführten Untersuchungen sind Limitationen dieser Arbeit zu eruieren.

Zum einen sah das in dieser Arbeit angewandte Bewertungssystem eine Unterteilung der Färbemuster in 4 Kategorien (keine CD133 Färbung, luminal, zytoplasmatisch, luminal und zytoplasmatisch) vor. Nicht zuletzt durch die Heterogenität von Karzinomen wie dem Magenkarzinom ist die Einteilung vereinzelt nicht eindeutig durchzuführen. Darüber hinaus wurde in der weiteren Analyse auf Grund der geringen Fallzahl die Gruppe der „zytoplasmatischen“ sowie der „zytoplasmatischen und luminalen“ Färbungen zusammengefasst. Im Falle eines größeren Patientenkollektives wäre eine stringente Unterteilung in diesen durchzuführen.

Der Großteil der aktuell vorhandenen Studien differenziert die CD133 Färbung nicht näher. Es erfolgt lediglich die Unterteilung nach „positiv“ und „negativ“. Es ist zu diskutieren, ob damit wichtiges Differenzierungsmerkmal verloren geht. Der Stellenwert einer Differenzierung wird unter Berücksichtigung der Theorie von unterschiedlichen histologischen Wachstumsmustern und damit verbundenen unterschiedlichen Färbungen deutlich. Eine reine Unterscheidung von positiv und ungefärbten Tumoren zeigte in dieser Arbeit keine relevanten Unterschiede.

In der Diskussion des Studiendesigns ist zu berücksichtigen, dass im Rahmen der weltweit durchgeführten EXPAND-Studie ein Großteil (75%) der untersuchten Patienten aus Europa stammen. Dies steht im Gegensatz zu den restlichen, überwiegend in Asien durchgeführten Studien zu Magenkarzinom und CD133. Hier ist, wie bereits in der Literaturdiskussion thematisiert, noch einmal die Herkunft aus asiatischen Populationen als Risikofaktor zu erwähnen (151).

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung hat neben seiner hohen Praktikabilität und weiten Verbreitung auch einige mögliche Schwachstellen. So zeigte sich in der histopathologischen Begutachtung der Präparate, dass sich auch gutartiges Drüsengewebe anfärbte (siehe Abbildung 6). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Wu et al. in ihrer Studie (129).

Weiter berücksichtigt das Prinzip der immunhistochemischen Färbung keine unterschiedlichen Polymorphismen des CD133-Gens. Hier konnten beispielsweise Wang et al. verschiedenen miRNA-Bindungsstellen des CD133-Moleküls erarbeiten welche ein vermindertes Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms mit sich bringen. Andere Varianten waren hingegen mit einem erhöhten Malignitätspotential und damit einem schlechteren Überleben assoziiert (152).

Ebenfalls zu berücksichtigen ist der Unterschied in den Auswertungen von Biopsien gegenüber Großpräparaten. Während bei Großpräparaten in der Regel intakte Gewebsabschnitte vorlagen, so wurden bei Biopsien lediglich Zellverbände entnommen. Hieraus ergibt sich die Frage ob entsprechende Zellverbände in repräsentativer Konfiguration entnommen wurden. Weiter kommt es durch die Art und Weise der Entnahme häufig zu Zerstörung der Zellmembranen, welches bei der Aufnahme der IHC-Färbung von Relevanz ist. In dieser Arbeit viel auf, dass unter den Biopsien keine CD133 zytoplasmatisch gefärbten Tumore waren.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass nach ausgiebiger Literaturrecherche sowie der Durchführung hier aufgeführter Forschungen keine eindeutige Aussage über den Stellenwert von CD133 im Magenkarzinom getroffen werden kann.

Der immunhistochemische Nachweis von CD133 in Magenkarzinomen scheint für sich keine eindeutige Pathogenität zu haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass Magenkarzinome mit einem luminalen Färbemuster und damit meist verbundenen intestinalen Wachstum ein besseres Überleben gegenüber denen mit gemischten Färbemuster und damit häufig diffusem Wachstumsmuster aufweisen.

Denkbar wären weitere weltweite Studien mit größerer Probandenzahl unter Berücksichtigung einer multizentrischen Durchführung. Hierbei ist die exaktere Differenzierung in den unterschiedlichen Färbemustern der IHC-Färbung ratsam.

7 Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
2. Kapitel 3 - Magentumoren. In: Deutsche K, editor. *Gastrointestinale Tumoren*. Munich: Urban & Fischer; 2018. p. 215-53.
3. Gesellschaft RK-IHud, (Hrsg) deKiDeV. *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. 12. Ausgabe. Berlin 2019:32-5.
4. 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.
5. Parkin DM, Stjernswärd J, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. *Bull World Health Organ*. 1984;62(2):163-82.
6. Fang C-L, Lin C-C, Chen H-K, Hseu Y-C, Hung S-T, Sun D-P, et al. Ubiquitin-specific protease 3 overexpression promotes gastric carcinogenesis and is predictive of poor patient prognosis. *Cancer Sci*. 2018;109(11):3438-49.
7. Fang CL, Uen YH, Chen HK, Hseu YC, Lin CC, Hung ST, et al. Loss of cyclin-dependent kinase-like 2 predicts poor prognosis in gastric cancer, and its overexpression suppresses cells growth and invasion. *Cancer Med*. 2018;7(7):2993-3002.
8. Piazuelo MB, Correa P. Gastric cáncer: Overview. *Colomb Med (Cali)*. 2013;44(3):192-201.
9. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer*. 2011;14(2):101-12.
10. Moehler M ea, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Magenkarzinom - Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs. 2019.
11. Plummer M, Franceschi S, Vignat J, Forman D, de Martel C. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer*. 2015;136(2):487-90.
12. Correa P. Gastric cancer: overview. *Gastroenterol Clin North Am*. 2013;42(2):211-7.
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. Shimizu T, Marusawa H, Matsumoto Y, Inuzuka T, Ikeda A, Fujii Y, et al. Accumulation of somatic mutations in TP53 in gastric epithelium with *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2014;147(2):407-17.e3.
15. Zhang L, Wu H, Sun G, Xu X, Sun X, Cao L. Trichloromethane fraction of *Incarvillea compacta* induces lytic cytotoxicity and apoptosis in Epstein-Barr virus-positive gastric cancer AGS cells. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):344.
16. Zhou H, Tan S, Li H, Lin X. Expression and significance of EBV, ARID1A and PIK3CA in gastric carcinoma. *Mol Med Rep*. 2019;19(3):2125-36.
17. Moore A, Hikri E, Goshen-Lago T, Barkan T, Morgenstern S, Brook E, et al. Young-onset gastric cancer and Epstein-Barr Virus (EBV) - a major player in the pathogenesis? *BMC Cancer*. 2020;20(1):34.
18. van der Post RS, Vogelaar IP, Carneiro F, Guilford P, Huntsman D, Hoogerbrugge N, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet*. 2015;52(6):361-74.
19. LLGL1 LLGL scribble cell polarity complex component 1 [Homo sapiens (human)] [updated 04.10.202027.10.2020]. Available from:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3996>.
20. Desuki A, Staib F, Gockel I, Moehler M, Lang H, Biesterfeld S, et al. Loss of LLGL1 Expression Correlates with Diffuse Gastric Cancer and Distant Peritoneal Metastases. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2019;2019:2920493.
 21. Lynch HT, Snyder C, Davies JM, Lanspa S, Lynch J, Gatalica Z, et al. FAP, gastric cancer, and genetic counseling featuring children and young adults: a family study and review. *Fam Cancer*. 2010;9(4):581-8.
 22. Shi Y, Hu Z, Wu C, Dai J, Li H, Dong J, et al. A genome-wide association study identifies new susceptibility loci for non-cardia gastric cancer at 3q13.31 and 5p13.1. *Nat Genet*. 2011;43(12):1215-8.
 23. Helgason H, Rafnar T, Olafsdottir HS, Jonasson JG, Sigurdsson A, Stacey SN, et al. Loss-of-function variants in ATM confer risk of gastric cancer. *Nat Genet*. 2015;47(8):906-10.
 24. Lochhead P, Frank B, Hold GL, Rabkin CS, Ng MT, Vaughan TL, et al. Genetic variation in the prostate stem cell antigen gene and upper gastrointestinal cancer in white individuals. *Gastroenterology*. 2011;140(2):435-41.
 25. Heinrichs SKM, Hess T, Becker J, Hamann L, Vashist YK, Butterbach K, et al. Evidence for PTGER4, PSCA, and MBOAT7 as risk genes for gastric cancer on the genome and transcriptome level. *Cancer Med*. 2018;7(10):5057-65.
 26. Naylor GM, Gotoda T, Dixon M, Shimoda T, Gatta L, Owen R, et al. Why does Japan have a high incidence of gastric cancer? Comparison of gastritis between UK and Japanese patients. *Gut*. 2006;55(11):1545-52.
 27. Aird I, Bentall HH, Roberts JA. A relationship between cancer of stomach and the ABO blood groups. *Br Med J*. 1953;1(4814):799-801.
 28. He Z, Zhao TT, Xu HM, Wang ZN, Xu YY, Song YX, et al. Association between alcohol consumption and the risk of gastric cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Oncotarget*. 2017;8(48):84459-72.
 29. Mao Y, Hu J, Semenciw R, White K. Active and passive smoking and the risk of stomach cancer, by subsite, in Canada. *Eur J Cancer Prev*. 2002;11(1):27-38.
 30. González CA, Pera G, Agudo A, Palli D, Krogh V, Vineis P, et al. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2003;107(4):629-34.
 31. Sjødahl K, Lu Y, Nilsen TI, Ye W, Hveem K, Vatten L, et al. Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. *Int J Cancer*. 2007;120(1):128-32.
 32. T.J. Hartung CJ. *Sozioökonomischer Status und Krebs*. Springer Medizin Verlag GmbH. 2017.
 33. Hudler P. Challenges of deciphering gastric cancer heterogeneity. *World J Gastroenterol*. 2015;21(37):10510-27.
 34. Marqués-Lespier JM, González-Pons M, Cruz-Correa M. Current Perspectives on Gastric Cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2016;45(3):413-28.
 35. 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.
 36. Steffen A, Huerta JM, Weiderpass E, Bueno-de-Mesquita HB, 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.
 37. Murphy G, Dawsey SM, Engels EA, Ricker W, Parsons R, Etemadi A, et al. Cancer Risk After Pernicious Anemia in the US Elderly Population. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(13):2282-9.e1-4.

38. Wu AH, Tseng CC, Bernstein L. Hiatal hernia, reflux symptoms, body size, and risk of esophageal and gastric adenocarcinoma. *Cancer*. 2003;98(5):940-8.
39. Brenner H S-KP, Holleccek B, Katalinic A, Hoffmeister M. Declining bowel cancer incidence and mortality in Germany—an analysis of time trends in the first ten years after the introduction of screening colonoscopy 2016 [24.10.2020].
40. Hamashima C, Shibuya D, Yamazaki H, Inoue K, Fukao A, Saito H, et al. The Japanese Guidelines for Gastric Cancer Screening. *Jpn J Clin Oncol*. 2008;38(4):259-67.
41. Cao Q, Ran ZH, Xiao SD. Screening of atrophic gastritis and gastric cancer by serum pepsinogen, gastrin-17 and Helicobacter pylori immunoglobulin G antibodies. *J Dig Dis*. 2007;8(1):15-22.
42. Kitahara F, Kobayashi K, Sato T, Kojima Y, Araki T, Fujino MA. Accuracy of screening for gastric cancer using serum pepsinogen concentrations. *Gut*. 1999;44(5):693-7.
43. Terasawa T, Nishida H, Kato K, Miyashiro I, Yoshikawa T, Takaku R, et al. Prediction of gastric cancer development by serum pepsinogen test and Helicobacter pylori seropositivity in Eastern Asians: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(10):e109783.
44. Yoshihara M, Hiyama T, Yoshida S, Ito M, Tanaka S, Watanabe Y, et al. Reduction in gastric cancer mortality by screening based on serum pepsinogen concentration: a case-control study. *Scand J Gastroenterol*. 2007;42(6):760-4.
45. Smyth EC, Committee obotEG, Verheij M, Committee obotEG, Allum W, Committee obotEG, et al. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2016;27(suppl_5):v38-v49.
46. Denzer U, Beilenhoff U, Eickhoff A, Faiss S, Huttl P, In der Smitten S, et al. [S2k guideline: quality requirements for gastrointestinal endoscopy, AWMF registry no. 021-022]. *Z Gastroenterol*. 2015;53(12):E1-227.
47. 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.
48. Deng K, Yang L, Hu B, Wu H, Zhu H, Tang C. The prognostic significance of pretreatment serum CEA levels in gastric cancer: a meta-analysis including 14651 patients. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124151.
49. Song YX, Huang XZ, Gao P, Sun JX, Chen XW, Yang YC, et al. Clinicopathologic and Prognostic Value of Serum Carbohydrate Antigen 19-9 in Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Dis Markers*. 2015;2015:549843.
50. Chen Y, Qu H, Jian M, Sun G, He Q. High level of serum AFP is an independent negative prognostic factor in gastric cancer. *Int J Biol Markers*. 2015;30(4):e387-93.
51. Zuo CT, Ju Q. An analysis of clinical characteristics and prognosis for patients with serum alpha-fetoprotein-positive gastric cancer. *Minerva Med*. 2015;106(4):185-91.
52. Yang AP, Liu J, Lei HY, Zhang QW, Zhao L, Yang GH. CA72-4 combined with CEA, CA125 and CA19-9 improves the sensitivity for the early diagnosis of gastric cancer. *Clin Chim Acta*. 2014;437:183-6.
53. Liang Y, Wang W, Fang C, Raj SS, Hu WM, Li QW, et al. Clinical significance and diagnostic value of serum CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with gastric cancer. *Oncotarget*. 2016;7(31):49565-73.
54. Jiexian J, Xiaoqin X, Lili D, Baoguo T, Ting S, Xianwen Z, et al. Clinical assessment and prognostic evaluation of tumor markers in patients with gastric cancer. *Int J Biol Markers*. 2013;28(2):192-200.

55. Shimada H, Noie T, Ohashi M, Oba K, Takahashi Y. Clinical significance of serum tumor markers for gastric cancer: a systematic review of literature by the Task Force of the Japanese Gastric Cancer Association. *Gastric Cancer*. 2014;17(1):26-33.
56. Chen XZ, Zhang WK, Yang K, Wang LL, Liu J, Wang L, et al. Correlation between serum CA724 and gastric cancer: multiple analyses based on Chinese population. *Mol Biol Rep*. 2012;39(9):9031-9.
57. Lordick F, Arnold D, Borner M, Bruns C, Eisterer W, Faber G, et al. Onkopedia: Magenkarzinom Onkopedia2020 [updated 12.2020. Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/magenkarzinom/@@guideline/html/index.html>.
58. Othman MO, Wallace MB. Endoscopic mucosal resection (EMR) and endoscopic submucosal dissection (ESD) in 2011, a Western perspective. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2011;35(4):288-94.
59. *Moderne Chirurgie des Magen- und Kardiakarzinoms*. In: Kreis ME, Seeliger H, editors. 1st ed. 2017 ed. Berlin, Heidelberg 2017.
60. Bollschweiler E, Berlth F, Baltin C, Mönig S, Hölscher AH. Treatment of early gastric cancer in the Western World. *World J Gastroenterol*. 2014;20(19):5672-8.
61. Moehler M, Baltin CT, Ebert M, Fischbach W, Gockel I, Grenacher L, et al. International comparison of the German evidence-based S3-guidelines on the diagnosis and multimodal treatment of early and locally advanced gastric cancer, including adenocarcinoma of the lower esophagus. *Gastric Cancer*. 2015;18(3):550-63.
62. Zhu L, Qin J, Wang J, Guo T, Wang Z, Yang J. Early Gastric Cancer: Current Advances of Endoscopic Diagnosis and Treatment. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:9638041.
63. Hochberger J, Kohler P, Kruse E, Huppertz J, Delvaux M, Gay G, et al. [Endoscopic submucosal dissection]. *Internist (Berl)*. 2013;54(3):287-301.
64. Oda I, Saito D, Tada M, Iishi H, Tanabe S, Oyama T, et al. A multicenter retrospective study of endoscopic resection for early gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2006;9(4):262-70.
65. Saito Y, Fukuzawa M, Matsuda T, Fukunaga S, Sakamoto T, Uraoka T, et al. Clinical outcome of endoscopic submucosal dissection versus endoscopic mucosal resection of large colorectal tumors as determined by curative resection. *Surg Endosc*. 2010;24(2):343-52.
66. Cats A, Jansen EPM, van Grieken NCT, Sikorska K, Lind P, Nordmark M, et al. Chemotherapy versus chemoradiotherapy after surgery and preoperative chemotherapy for resectable gastric cancer (CRITICS): an international, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(5):616-28.
67. Soon YY, Leong CN, Tey JC, Tham IW, Lu JJ. Postoperative chemoradiotherapy versus chemotherapy for resected gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Med Imaging Radiat Oncol*. 2014;58(4):483-96.
68. Kim S, Lim DH, Lee J, Kang WK, MacDonald JS, Park CH, et al. An observational study suggesting clinical benefit for adjuvant postoperative chemoradiation in a population of over 500 cases after gastric resection with D2 nodal dissection for adenocarcinoma of the stomach. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;63(5):1279-85.
69. Wagner AD, Syn NL, Moehler M, Grothe W, Yong WP, Tai BC, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;8:Cd004064.
70. Guimbaud R, Louvet C, Ries P, Ychou M, Maillard E, Andre T, et al. Prospective, randomized, multicenter, phase III study of fluorouracil, leucovorin, and

- irinotecan versus epirubicin, cisplatin, and capecitabine in advanced gastric adenocarcinoma: a French intergroup (Federation Francophone de Cancerologie Digestive, Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer, and Groupe Cooperateur Multidisciplinaire en Oncologie) study. *J Clin Oncol.* 2014;32(31):3520-6.
71. Cutsem EV, 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.
72. Kripp M, Al-Batran SE, Rosowski J, Pauligk C, Homann N, Hartmann JT, et al. Quality of life of older adult patients receiving docetaxel-based chemotherapy triplets for esophagogastric adenocarcinoma: a randomized study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Gastric Cancer.* 2014;17(1):181-7.
73. 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.
74. Bang YJ, 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. *Lancet.* 2010;376(9742):687-97.
75. Bang YJ, 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. *Lancet.* 2010;376(9742):687-97.
76. Moehler M ea. Aktuelle Diagnostik und Therapie des Magenkarzinoms. *Journal Onkologie.* 2006;Online-Ausgabe 6/2006: 48-55.
77. Okines AF, Asghar U, Cunningham D, Ashley S, Ashton J, Jackson K, et al. Rechallenge with platinum plus fluoropyrimidine +/- epirubicin in patients with oesophagogastric cancer. *Oncology.* 2010;79(1-2):150-8.
78. Janowitz T, Thuss-Patience P, Marshall A, Kang JH, Connell C, Cook N, et al. Chemotherapy vs supportive care alone for relapsed gastric, gastroesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma: a meta-analysis of patient-level data. *Br J Cancer.* 2016;114(4):381-7.
79. Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2014;383(9911):31-9.
80. O'Sullivan B, Brierley J, Byrd D, Bosman F, Kehoe S, Kossary C, et al. The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol.* 2017;18(7):849-51.
81. 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.
82. 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.
83. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med.* 2017;23(10):1124-34.

84. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(10):755-68.
85. Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today*. 2000;6(8):324-9.
86. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell stem cell*. 2014;14(3):275-91.
87. Islam F, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res*. 2015;335(1):135-47.
88. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1805(1):105-17.
89. Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*. 1977;197(4306):893-5.
90. Heppner GH. Tumor heterogeneity. *Cancer Res*. 1984;44(6):2259-65.
91. Jin Z, Jiang W, Wang L. Biomarkers for gastric cancer: Progression in early diagnosis and prognosis (Review). *Oncol Lett*. 2015;9(4):1502-8.
92. Wu HH, Lin WC, Tsai KW. Advances in molecular biomarkers for gastric cancer: miRNAs as emerging novel cancer markers. *Expert Rev Mol Med*. 2014;16:e1.
93. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(3):219-34.
94. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009;458(7239):780-3.
95. Stewart DJ, Chiritescu G, Dahrouge S, Banerjee S, Tomiak EM. Chemotherapy dose--response relationships in non-small cell lung cancer and implied resistance mechanisms. *Cancer Treat Rev*. 2007;33(2):101-37.
96. Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol*. 2012;22(5-6):396-403.
97. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*. 2011;146(4):633-44.
98. Mintz B, Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(9):3585-9.
99. Karsten U, Goletz S. What makes cancer stem cell markers different? *SpringerPlus*. 2013;2(1):301.
100. Cao Y, Merling A, Karsten U, Goletz S, Punzel M, Kraft R, et al. Expression of CD175 (Tn), CD175s (sialosyl-Tn) and CD176 (Thomsen-Friedenreich antigen) on malignant human hematopoietic cells. *Int J Cancer*. 2008;123(1):89-99.
101. 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.
102. Ruscito I, Cacsire Castillo-Tong D, Vergote I, Ignat I, Stanske M, Vanderstichele A, et al. Exploring the clonal evolution of CD133/aldehyde-dehydrogenase-1 (ALDH1)-positive cancer stem-like cells from primary to recurrent high-grade serous ovarian cancer (HGSOC). A study of the Ovarian Cancer Therapy-Innovative Models Prolong Survival (OCTIPS) Consortium. *Eur J Cancer*. 2017;79:214-25.
103. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:675-99.

104. Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, et al. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells*. 2011;29(1):32-45.
105. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*. 1991;65(1):13-24.
106. Walcher L, Kistenmacher AK, Suo H, Kitte R, Dluczek S, Strauß A, et al. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol*. 2020;11:1280.
107. 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.
108. 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.
109. 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.
110. Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(4):715-9.
111. Kemper K, Sprick MR, de Bree M, 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.
112. Fargeas CA, Florek M, Huttner WB, Corbeil D. Characterization of prominin-2, a new member of the prominin family of pentaspan membrane glycoproteins. *J Biol Chem*. 2003;278(10):8586-96.
113. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res*. 1989;49(23):6449-65.
114. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res*. 1996;56(19):4509-15.
115. Schwickert G, Walenta S, Sundfor K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer Res*. 1995;55(21):4757-9.
116. Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2000;35(2):71-103.
117. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):38-47.
118. 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.
119. Campos B, Zeng L, Daotrong PH, Eckstein V, Unterberg A, Mairbaur H, et al. Expression and regulation of AC133 and CD133 in glioblastoma. *Glia*. 2011;59(12):1974-86.
120. Griguer CE, Oliva CR, Gobin E, Marcocelles P, Benos DJ, Lancaster JR, Jr., et al. CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PLoS One*. 2008;3(11):e3655.
121. 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(11):e1964.

122. Zhang L, Li H, Ge C, Li M, Zhao FY, Hou HL, 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.
123. Min KJ, So KA, Ouh YT, Hong JH, Lee JK. The effects of DNA methylation and epigenetic factors on the expression of CD133 in ovarian cancers. *J Ovarian Res*. 2012;5(1):28.
124. Geddert H, Braun A, Kayser C, Dimmler A, Faller G, Agaimy A, et al. Epigenetic Regulation of CD133 in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Am J Clin Pathol*. 2017;147(5):515-24.
125. Smith LM, Nesterova A, Ryan MC, Duniho S, Jonas M, Anderson M, et al. CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. *Br J Cancer*. 2008;99(1):100-9.
126. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest*. 2008;118(6):2111-20.
127. LaBarge MA, Bissell MJ. Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells? *J Clin Invest*. 2008;118(6):2021-4.
128. Zhao P, Li Y, Lu Y. Aberrant expression of CD133 protein correlates with Ki-67 expression and is a prognostic marker in gastric adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2010;10:218.
129. Wu C, Xie Y, Gao F, Wang Y, Guo Y, Tian H, et al. Lgr5 expression as stem cell marker in human gastric gland and its relatedness with other putative cancer stem cell markers. *Gene*. 2013;525(1):18-25.
130. Zhao Y, Feng F, Zhou YN. Stem cells in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2015;21(1):112-23.
131. 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 J Surg*. 2018;41(3):274-8.
132. 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.
133. Song Y, Jang J, Shin TH, Bae SM, Kim JS, Kim KM, et al. Sulfasalazine attenuates evading anticancer response of CD133-positive hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):38.
134. Decaussin-Petrucci M, Deladoey J, Hafdi-Nejjari Z, Sassolas G, Borson-Chazot F, Abu-Khudir R, et al. Expression of CD133 in differentiated thyroid cancer of young patients. *J Clin Pathol*. 2015;68(6):434-40.
135. Xu R, Cai MY, Luo RZ, Tian X, Han JD, Chen MK. The Expression Status and Prognostic Value of Cancer Stem Cell Biomarker CD133 in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Dermatol*. 2016;152(3):305-11.
136. Ishigami S, Ueno S, Arigami T, Uchikado Y, Setoyama T, Arima H, et al. Prognostic impact of CD133 expression in gastric carcinoma. *Anticancer Res*. 2010;30(6):2453-7.
137. Nosrati A, Naghshvar F, Khanari S. Cancer Stem Cell Markers CD44, CD133 in Primary Gastric Adenocarcinoma. *Int J Mol Cell Med*. 2014;3(4):279-86.
138. 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.
139. Zhao P, Li Y, Lu Y. Aberrant expression of CD133 protein correlates with Ki-67 expression and is a prognostic marker in gastric adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2010;10(1):218.

140. 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.
141. Lordick F, Kang YK, Chung HC, Salman P, Oh SC, Bodoky G, et al. Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):490-9.
142. 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. *Lancet*. 2021;398(10294):27-40.
143. Lu L, Wu M, Sun L, Li W, Fu W, Zhang X, et al. Clinicopathological and prognostic significance of cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with gastric cancer: A comprehensive meta-analysis with 4729 patients involved. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(42):e5163.
144. Diao N, Li Y, Yang J, Jin C, Meng X, Jiao W, et al. High expression of HMBOX1 contributes to poor prognosis of gastric cancer by promoting cell proliferation and migration. *Biomed Pharmacother*. 2019;115:108867.
145. Kim TM, Ko YH, Ha SJ, Lee HH. Impact of in vitro driven expression signatures of CD133 stem cell marker and tumor stroma on clinical outcomes in gastric cancers. *BMC Cancer*. 2019;19(1):119.
146. Attia S, Atwan N, Arafa M, Shahin RA. Expression of CD133 as a cancer stem cell marker in invasive gastric carcinoma. *Pathologica*. 2019;111(1):18-23.
147. Edgren G, Liang L, Adami H-O, Chang ET. Enigmatic sex disparities in cancer incidence. *Eur J Epidemiol*. 2012;27(3):187-96.
148. Jang J-W, Song Y, Kim S-H, Kim J-s, Kim Km, Choi EK, et al. CD133 confers cancer stem-like cell properties by stabilizing EGFR-AKT signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*. 2017;389:1-10.
149. Arne G, Kristiansson E, Nerman O, Kindblom L-G, Ahlman H, Nilsson B, et al. Expression profiling of GIST: CD133 is associated with KIT exon 11 mutations, gastric location and poor prognosis. *Int J Cancer*. 2011;129(5):1149-61.
150. Lu C, Liu L, Wu X, Xu W. CD133 and Ki-67 expression is associated with gastrointestinal stromal tumor prognosis. *Oncol Lett*. 2013;6(5):1289-94.
151. Feng RM, Zong YN, Cao SM, Xu RH. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? *Cancer Commun (Lond)*. 2019;39(1):22.
152. Wang Q, Liu H, Xiong H, Liu Z, Wang LE, Qian J, et al. Polymorphisms at the microRNA binding-site of the stem cell marker gene CD133 modify susceptibility to and survival of gastric cancer. *Mol Carcinog*. 2015;54(6):449-58.
153. Högnér A, Moehler M. Immunotherapy in Gastric Cancer. *Curr Oncol*. 2022;29(3):1559-1574. Published 2022 Mar 2. doi:10.3390/curroncol29030131.
154. Janjigian Y.Y., Kawazoe A., Yanez P.E., Luo S., Lonardi S., Kolesnik O., Barajas O., Bai Y., Shen L., Tang Y., et al. Pembrolizumab plus trastuzumab and chemotherapy for HER2+ metastatic gastric or gastroesophageal junction (G/GEJ) Cancer: Initial findings of the global phase 3 KEYNOTE-811 study. *J. Clin. Oncol*. 2021;39:4013. doi: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.4013.
155. Catenacci D.V.T., Kang Y.-K., Park H., Uronis H.E., Lee K.-W., Ng M.C.H., Enzinger P.C., Park S.H., Gold P.J., Lacy J., et al. Margetuximab plus pembrolizumab in patients with previously treated, HER2-positive gastro-oesophageal adenocarcinoma (CP-MGAH22-05): A single-arm, phase 1b-2 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21:1066–1076. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30326-0.

156. Bang Y.-J., Van Cutsem E., Fuchs C.S., Ohtsu A., Tabernero J., Ilson D.H., Hyung W.J., Strong V.E., Goetze T.O., Yoshikawa T., et al. KEYNOTE-585: Phase III study of perioperative chemotherapy with or without pembrolizumab for gastric cancer. *Future Oncol.* 2019;15:943–952. doi: 10.2217/fon-2018-0581.
157. Janjigian Y.Y., Shitara K., Moehler M., Garrido M., Salman P., Shen L., Wyrwicz L., Yamaguchi K., Skoczylas T., Campos Bragagnoli A., 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. *Lancet.* 2021;398:27–40. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00797-2.
158. Lorenzen, S., Masetti, M. Immuntherapie von Tumoren im oberen Gastrointestinaltrakt. *Gastroenterologe* 16, 249–256 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11377-021-00533-3>
159. Ricci A.D., Rizzo A., Rojas Llimpe F.L., Di Fabio F., De Biase D., Rihawi K. Novel HER2-directed treatments in advanced gastric carcinoma: Another paradigm shift? *Cancers.* 2021;13:1664. doi: 10.3390/cancers13071664.
160. Al-Batran S.-E., Lorenzen S., Thuss-Patience P.C., Schenk M., Goekkurt E., Hofheinz R.D., Kretschmar A., Heuer V., Bolling C., Haag G.M., et al. 1494P updated safety data of the DANTE trial: Perioperative atezolizumab in combination with FLOT versus FLOT alone in patients with resectable esophagogastric adenocarcinoma—A randomized, open-label phase II trial of the German Gastric Group at the AIO and SAKK. *Ann. Oncol.* 2020;31:S927–S928. doi: 10.1016/j.annonc.2020.08.2000.

8 Anhang

8.1 Ausschlusskriterien der EXPAND-Studie

- kardiale Vorerkrankungen Bsp. koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz, Kardiomyopathie, Arrhythmien, oder das Erleiden eines Herzinfarktes in den vergangenen 12 Monaten.
- Hirnmetastasen, leptomeningeale Erkrankungen
- Andere maligne Neoplasien in den vergangenen 5 Jahren (ausgenommen Basaliom, Karzinome der Cervix bzw. Uterus)
- Radiotherapie (ausgenommen jene im Rahmen einer Analgesie)
- Große Operationen
- Dauerhafte systemische Immuno- oder Hormontherapie
- Aktive Hepatitis B
- Vorgegangene Gastrektomie bzw. Ösophagektomie
- Vorliegen oder der Verdacht auf eine Schwangerschaft bzw. Stillen

8.2 Tabellen

Tabelle 35: Deskriptive Statistik Gesamtkollektiv - Herkunftsländer

Herkunftsländer	Material-Kollektiv (n= 504)	Subkollektiv (n=403)
Argentinien	4 (0,8%)	3 (0,7%)
Australien	5 (1%)	2 (0,5%)
Österreich	4 (0,8%)	2 (0,5%)
Belgien	8 (1,6%)	8 (2%)
Brasilien	10 (2%)	9 (2,2%)
Bulgarien	23 (4,6%)	18 (4,5%)
Chile	51 (10,1%)	42 (10,4%)
Tschechien	19 (3,8%)	16 (4%)
Frankreich	10 (2%)	4 (1%)
Deutschland	99 (19,6%)	80 (19,9%)
Griechenland	3 (0,6%)	3 (0,7%)
Hong Kong	7 (1,4%)	7 (1,7%)
Ungarn	47 (9,3%)	40 (9,9%)
Israel	12 (2,4%)	10 (2,5%)
Italien	9 (1,8%)	6 (1,5%)
Japan	17 (3,4%)	12 (3%)
Korea	7 (1,4%)	6 (1,5%)
Polen	27 (5,4%)	24 (6%)
Portugal	5 (1%)	4 (1%)
Rumänien	43 (8,5%)	36 (8,9%)
Russland	49 (9,7%)	41 (10,2%)
Spanien	19 (3,8%)	16 (4%)

Herkunftsländer	Material-Kollektiv (n= 504)	Subkollektiv (n=403)
Taiwan	23 (4,6%)	11 (2,7%)
Verieinigtes Königreich	3 (0,6%)	3 (0,7%)

Tabelle 36: Korrelationen CD133 Färbung – T-Klassifikation T1/T2 und T3/T4

	negativ	luminal
T1/T2	21 (38,2%)	34 (61,8%)
T3/T4	52 (30,4%)	119 (69,6%)
	negativ	zytoplasmatisch
T1/T2	21 (38,2%)	16 (43,2 %)
T3/T4	52 (30,4%)	51 (49,5%)

Tabelle 37: Korrelationen CD133 Färbung – N-Klassifikation N0/N1 und N2/N3

	negativ	luminal
N0/N1	37 (30,8%)	83 (69,2%)
N2/N3	27 (27%)	73 (73%)
	negativ	zytoplasmatisch
N0/N1	37 (30,8%)	34 (47,9%)
N2/N3	27 (27%)	33 (55%)

Tabelle 38: Korrelationen CD133 Färbung – M-Klassifikation M0 und M1

	negativ	luminal
M0	6 (46,2%)	7 (53,8%)
M1	94 (31,5%)	204 (68,5%)
	negativ	zytoplasmatisch
M0	6 (46,2%)	4 (40%)
M1	94 (31,5%)	87 (48,1%)

8.3 Abbildungen

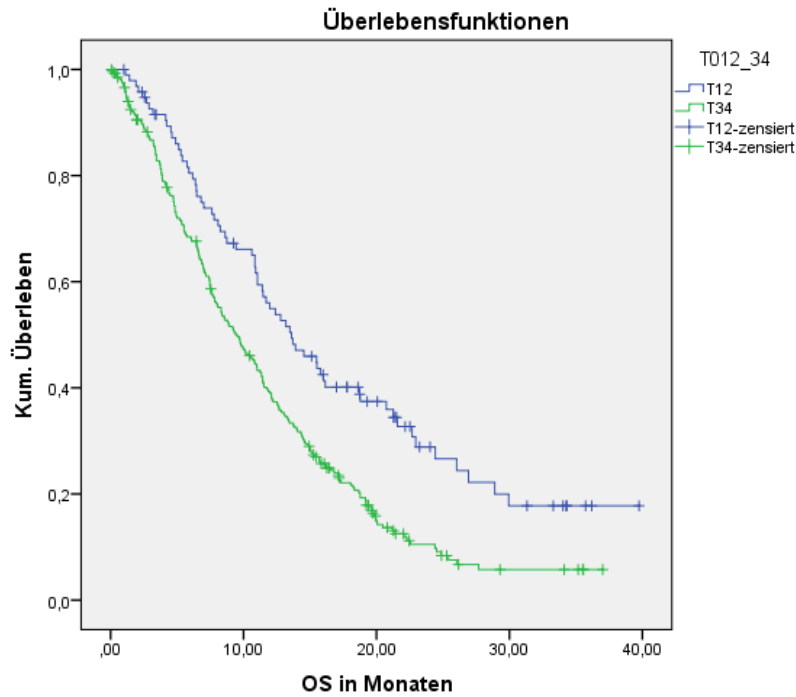


Abbildung 36: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung T0/T1/T2 gegen T3/T4; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

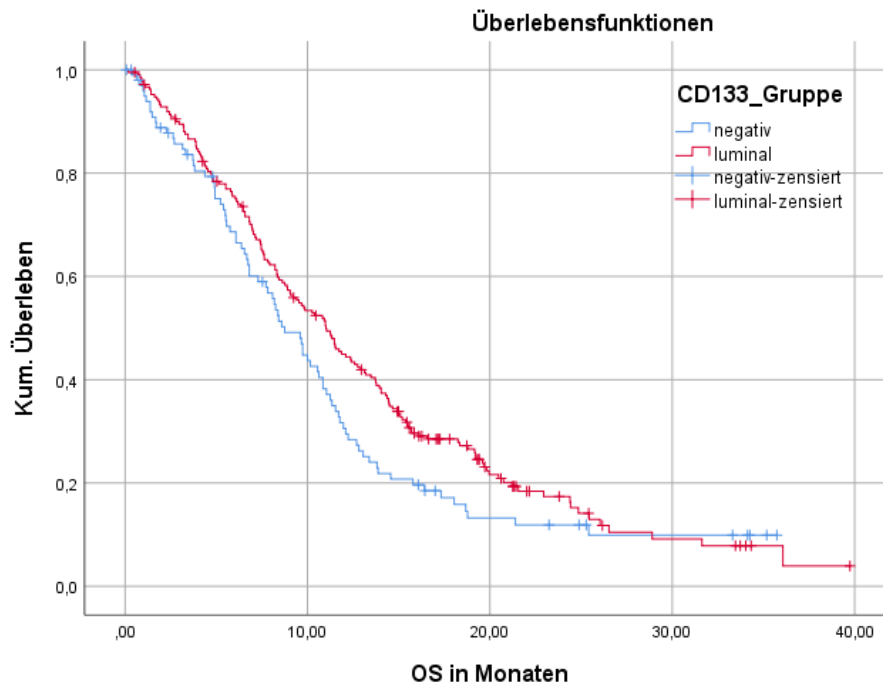


Abbildung 37: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu luminalen Fällen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

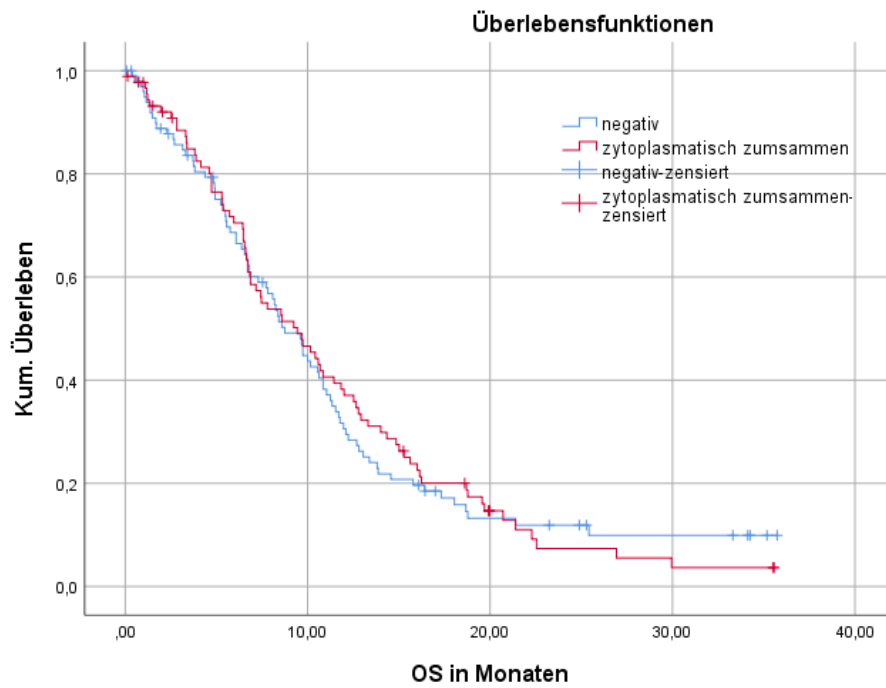


Abbildung 38: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu zytoplasmatischen Fällen; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

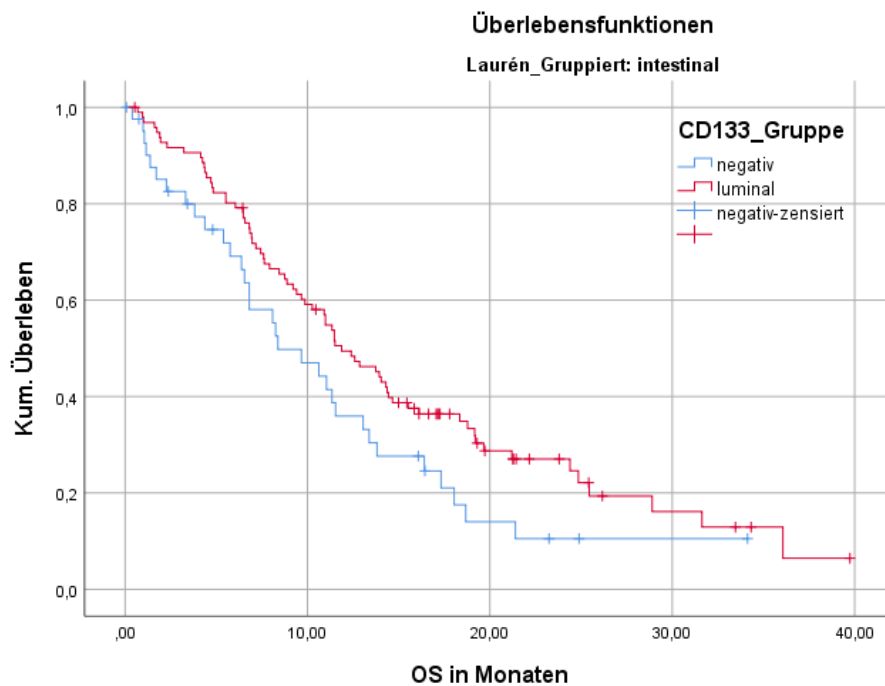


Abbildung 39: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu luminalen Fällen nach Laurén-Klassifikation; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

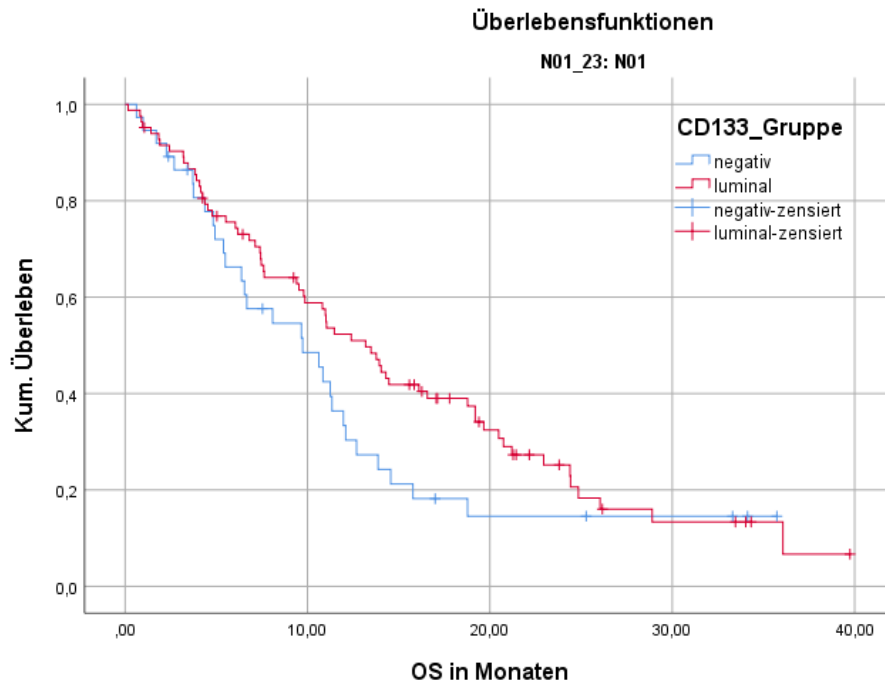


Abbildung 40: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu luminalen Fällen nach N-Klassifikation; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

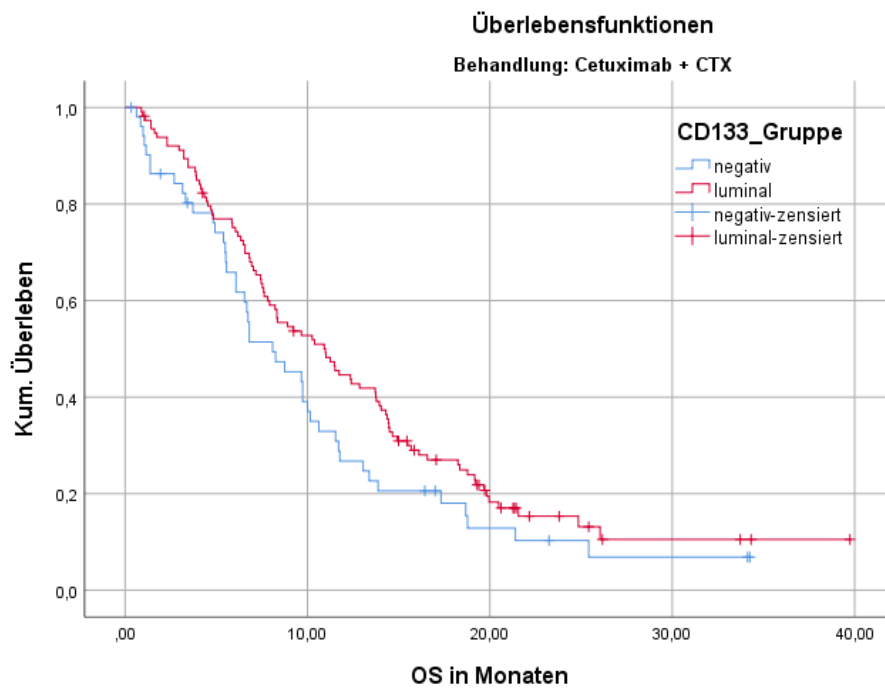


Abbildung 41: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu luminalen Fällen nach Behandlung; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

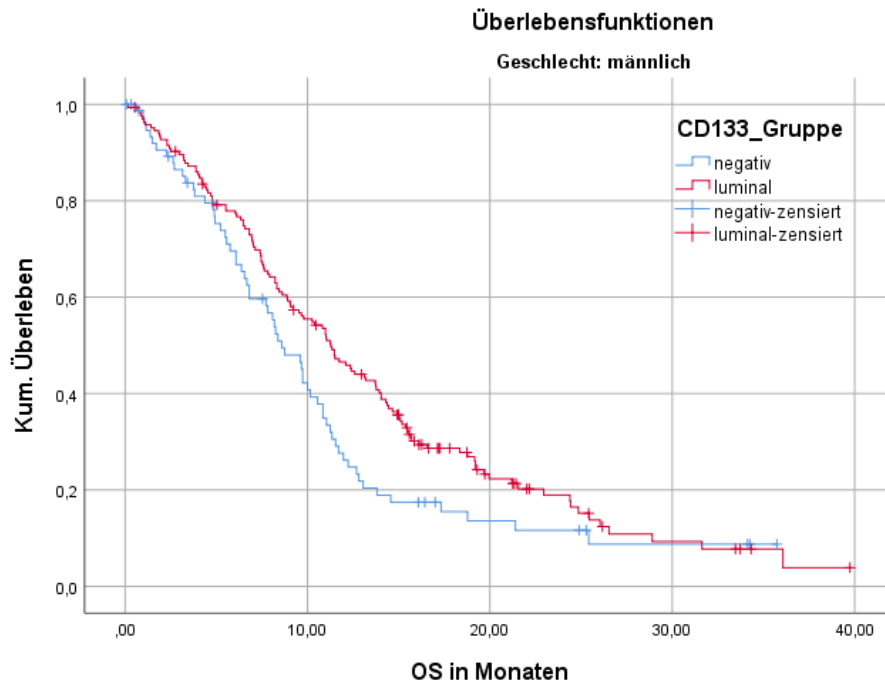


Abbildung 42: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu luminalen Fällen nach männlichen Geschlecht; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

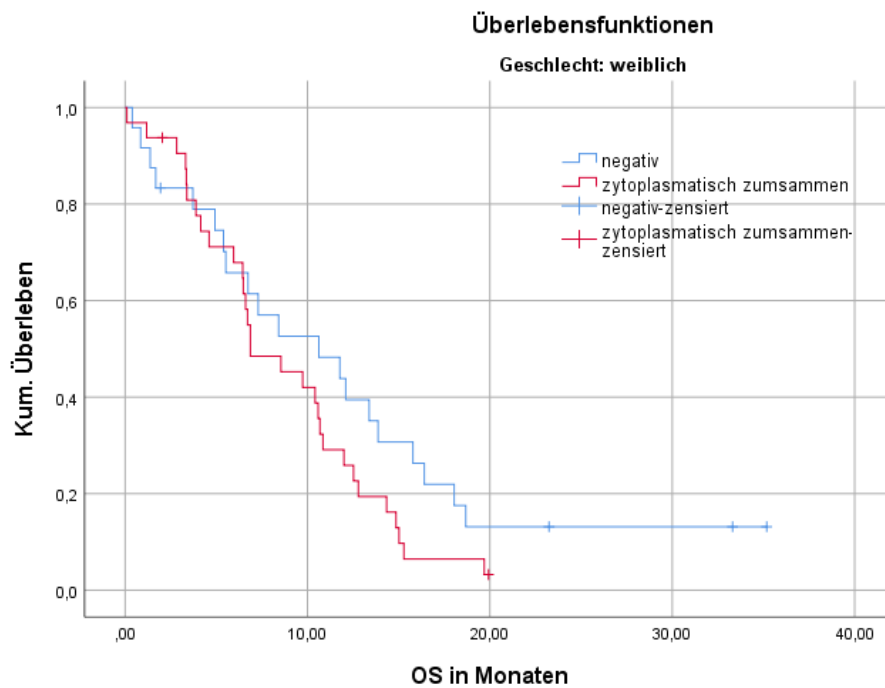


Abbildung 43: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu zytoplasmatischen Fällen nach weiblichen Geschlecht; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

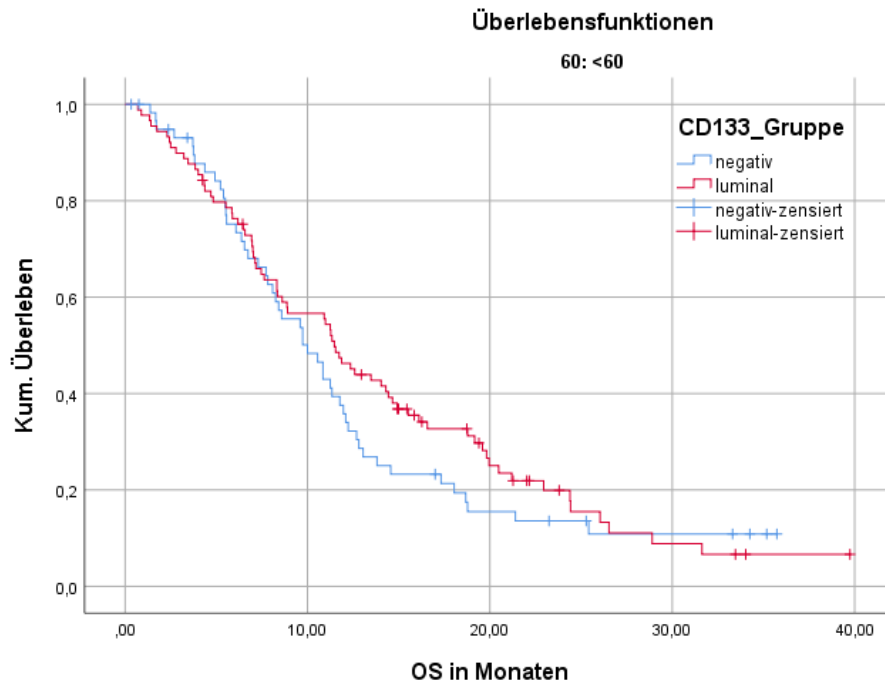


Abbildung 44: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu luminalen Fällen nach Alter <60 Jahre; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen

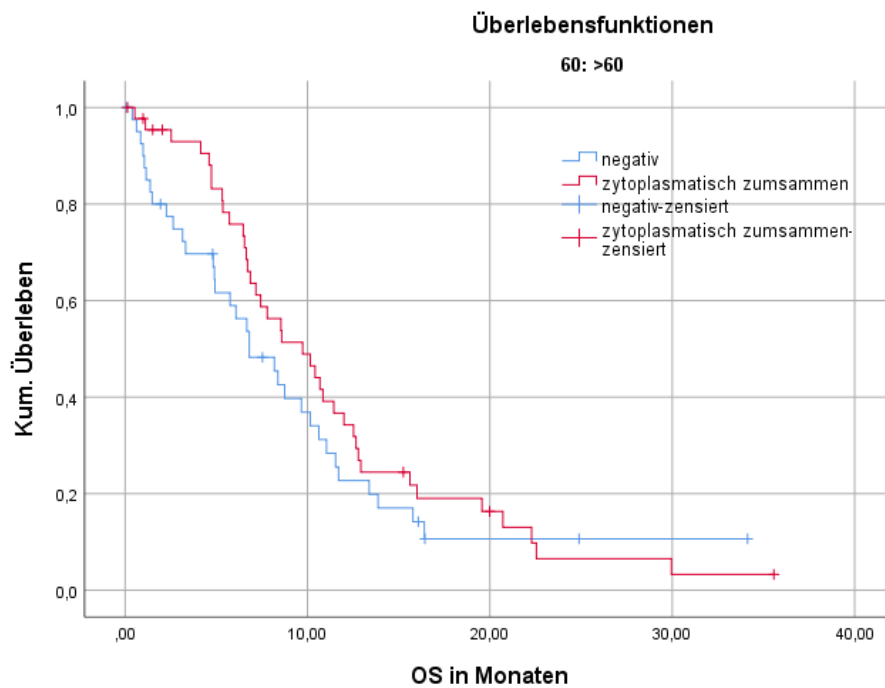


Abbildung 45: Kaplan-Meier-Diagramm Überlebenszeitanalyse Subkollektiv CD133, eine Gegenüberstellung negative Fälle zu zytoplasmatischen Fällen nach Alter >60 Jahre; hierbei ist die mediane Überlebenszeit in Monaten gegenüber dem prozentualen Anteil an kumulativen Überleben aufgetragen