

Aus dem Institut für Pathologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Expressionsanalyse und prädiktive Wertigkeit von Biopsien der Karzinome des  
oberen gastrointestinalen Traktes vor neoadjuvanter Therapie**

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

Vorgelegt von

Michelle Schulz  
aus Berlin

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand:

Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

04. Juli 2025

## Meinen Großeltern

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	IX
1 Einleitung und Ziel der Dissertation.....	- 1 -
2 Theoretischer Hintergrund.....	- 3 -
2.1 Epidemiologie.....	- 3 -
2.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	- 3 -
2.3 Pathogenese.....	- 4 -
2.4 Lokalisation.....	- 4 -
2.5 Diagnostik.....	- 5 -
2.5.1 TNM-Klassifikation.....	- 5 -
2.5.2 Einteilung nach Laurén.....	- 7 -
2.5.3 Grading zur Bestimmung des Differenzierungsgrades.....	- 8 -
2.5.4 Klassifikation nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO).....	- 8 -
2.6 Neoadjuvante Therapie.....	- 9 -
2.7 Regressionsgrad.....	- 10 -
2.8 Prognose und Prädiktion.....	- 11 -
2.9 Molekularpathologie der Karzinome des oberen Gastrointestinaltraktes.....	- 12 -
2.9.1 Biomarker für gezielte Therapien.....	- 13 -
2.10 Neue Sequenzierungstechniken in der Diagnostik.....	- 15 -
3 Material und Methoden.....	- 16 -
3.1 Studiendesign.....	- 16 -
3.2 Material.....	- 18 -
3.2.1 Geräte.....	- 18 -
3.2.2 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien.....	- 18 -
3.2.3 Verwendete Kits.....	- 19 -
3.2.4 Rezepte und Lösungen.....	- 19 -
3.2.5 Software.....	- 20 -
3.3 Methoden.....	- 20 -
3.3.1 Histologie.....	- 20 -
3.3.2 Immunhistochemie.....	- 20 -
3.3.3 Extraktion der Ribonukleinsäuren.....	- 21 -
3.3.4 NGS-Amplikon-basierte RNA-Sequenzierung.....	- 22 -
3.3.5 Statistik.....	- 25 -
4 Ergebnisse.....	- 27 -
4.1 Überlebenszeitanalysen.....	- 27 -

4.2	Betrachtung des Regressionsgrades.....	- 36 -
4.3	Cox-Regressionsanalysen.....	- 40 -
4.3.1	Univariate Cox-Regressionsanalysen.....	- 40 -
4.3.2	Multivariable Cox-Regressionsanalyse.....	- 40 -
4.4	Auswertung des RNAseq-Datensatzes.....	- 42 -
4.4.1	Subtypisierung der Entitäten.....	- 42 -
4.4.2	Prognostische Wertigkeit.....	- 47 -
4.4.3	Analyse der prädiktiven Wertigkeit.....	- 51 -
5	Diskussion.....	- 55 -
5.1	RNAseq-Daten bieten ungenutztes Potential.....	- 56 -
5.2	Repräsentativität des Kollektivs.....	- 59 -
5.3	Klinische Implikation der Analysen.....	- 61 -
5.4	Limitationen der Studie.....	- 63 -
6	Zusammenfassung.....	- 65 -
7	Literaturverzeichnis.....	- 66 -
8	Anhang.....	- 73 -
9	Selbstständigkeitserklärung.....	- 77 -
10	Danksagung.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
11	Curriculum Vitae.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## Abkürzungsverzeichnis

(F)ISH	(Fluoreszenz-) In-situ-Hybridisierung
5-FU	5-Fluorouracil, Pyrimidin-Antagonist, Zytostatikum
5-JÜ	5-Jahresüberlebensrate, 5-Jahresüberleben = Maß für das Überleben von Tumorpatienten ab dem Tag der Diagnose
AC	Adenocarcinoma (Adenokarzinom); EAC = ösophageales Adenokarzinom
AEG	Adenokarzinom des ösophagogastralen Übergangs
CA	Karzinom
CPS	Combined Positive Score = Quotient aus PD-L1 positiven- und Tumorzellen in einem mikroskopischen Präparat
CR	Complete Response, beim Regressionsgrading
CROSS	Radiochemotherapie bei EAC und AEG
DAB	3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride/3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonucleinacid/Desoxyribonukleinsäure
EAC	Esophageal Adenocarcinoma/Adenokarzinom des Ösophagus
EBV	Ebstein-Barr-Virus, Humanes-Herpes-Virus 4
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol 96 %
FAP	Familiäre adenomatöse Poliposis
FFPE	Formalin fixiertes, Paraffin-eingebettetes (Gewebe)
FLOT	Chemotherapieschema bei Ösophaguskarzinomen
FOLFOX	Chemotherapieschema bei Karzinomen.
<i>g</i>	Maßeinheit für die Zahl der Umdrehungen der Zentrifuge
G (1-3)	histopathologisches Grading
HDGC	hereditary diffuse gastric cancer, hereditäres diffuses Magenkarzinom
HE	Hämatoxylin- Eosin- Färbung
HHV-4	Humanes Herpesvirus Typ 4, Epstein-Barr-Virus
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
HPV	Humane Papillomaviren
HRP	Horseradish Peroxidase/Meerrettichperoxidase für Immunfärbung
IHC	Immunhistochemie
L	Lymphgefäßinvasion, TNM-Klassifikation
LA	Lymphadenektomie
LK	Lymphknoten
Lot.	Lotnummer
M	Fernmetastasen, TNM-Klassifikation
MMR	Mismatch-Reparaturstatus
MR	Minimale Response, beim Regressionsgrading
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität „Nodus“, Bestandteil der TNM-Klassifikation, beschreibt regionale Lymphknotenmetastasen
N	Lymphknotenmetastasen
NEB	New England BioLabs® Inc.
NGS	Next Generation Sequenzierung
NR	Nonresponse, beim Regressionsgrading
<i>p</i>	1.) p-Wert bei statistischer Betrachtung; 2.) pathologisch, i. S. der pathologischen Bestimmung der TNM-Klassifikation
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polymerase-Kettenreaktion
PEG	perkutane endoskopische Gastrostomie, Zugang von außen durch die Bauchdecke in den Magen, i.d.R zu Ernährungszwecken

PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	Gegenzahl des dekadischen Logarithmus der freien Wasserstoffionenkonzentration einer Lösung
PR	Partiel Response, beim Regressionsgrading
R	Residualtumor nach Behandlung
REF	Referenz(nummer)
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase, Enzym
rtu	ready to use/direkt nutzbar
SCC	Squamous cell carcinoma/Plattenepithelkarzinome des Ösophagus (PEC)
SR	subtotale Response, beim Regressionsgrading
SRC	Siegelringzellkarzinom, Sonderform eines Adenokarzinoms
STD	Standard, i. S. einer Standardlösung
T	Ausdehnung des Primärtumors, TNM-Klassifikation
TMB	Tumor Mutational Burden/Tumormutationslast
TRG	Tumorregressionsgrad
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	5-Eicosa(ethylenglycol)oxy-1-dodecyl-sorbitan, nichtionisches Tensid
TZ	Tumorzellen
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
V	Veneninvasion, TNM-Klassifikation
v	Version
WHO	World Health Organization
y	Klassifikation nach initialer multimodaler Therapie, neoadjuvant vorbehandelte Tumore „Ora serrata“, beschreibt den Übergang des Plattenepithels zur Magenschleimhaut der Cardia
Z-Linie	Cardia

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1	Schematische Darstellung des Magens .....	- 5 -
Abbildung 3-1	Studiendesign.....	- 16 -
Abbildung 4-1	Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben des Kollektivs .....	- 27 -
Abbildung 4-2	Kaplan-Meier-Kurve für das entitätsspezifische Gesamtüberleben .....	- 28 -
Abbildung 4-3	Kaplan-Meier-Kurve für das lokalisationsabhängige Gesamtüberleben .....	- 29 -
Abbildung 4-4	Kaplan-Meier-Kurve für das Grading-spezifische Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs .....	- 30 -
Abbildung 4-5	Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit des T-Stadiums .....	- 31 -
Abbildung 4-6	Kaplan-Meier-Kurve des N-Status-abhängigen Gesamtüberlebens .....	- 32 -
Abbildung 4-7	Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit vom M-Status .....	- 33 -
Abbildung 4-8	Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit vom L-Status .....	- 34 -
Abbildung 4-9	Kaplan-Meier-Kurve nach Regressionsgrad nach Becker et al.....	- 35 -
Abbildung 4-10	Abhängigkeit des Regressionsgrades von Zeitdifferenz zwischen Biopsie und Operation.....	- 36 -
Abbildung 4-11	Absolute Anzahl der Entitäten nach Regressionsgrad Becker et al. ....	- 37 -
Abbildung 4-12	Relative Anzahl der Entitäten nach Regressionsgrad Becker et al. ....	- 38 -
Abbildung 4-13	Verteilung des Tumorgradings auf die Regressionsgrade nach Becker et al. ....	- 39 -
Abbildung 4-14	Principal Component Analysis zwischen ACs (inkl. SRCs) und PECs.....	- 42 -
Abbildung 4-15	Vulcano Plot mit differentiell exprimierten Genen des untersuchten Kollektivs.....	- 43 -
Abbildung 4-16	<i>Heatmap</i> der differentiellen Expression zwischen ACs und PECs.....	- 44 -
Abbildung 4-17	Verteilung RNAseq-Cluster nach Lokalisation der Biopsieprobe .....	- 45 -
Abbildung 4-18	ROC-Kurve und Kreuzvalidierung einer elastischen Netz Regressionsanalyse zur Differenzierung (AC vs. PEC) mittels RNAseq .....	- 46 -
Abbildung 4-19	Trainingsset prognostisch relevanter Gene auf Basis von RNAseq-basierter Genexpression.....	- 47 -
Abbildung 4-20	Analyse der extrahierten prognostischen Expressionssignatur im Testset ....	- 48 -
Abbildung 4-21	Nicht-Null-Koeffizienten mit Gen-Namen .....	- 49 -
Abbildung 4-22	Genexpression von <i>CLD18</i> in Adeno- vs. Plattenepithelkarzinomen .....	- 51 -
Abbildung 4-23	Genexpression von <i>CD274</i> in Adeno- vs. Plattenepithelkarzinomen .....	- 52 -
Abbildung 4-24	Genexpression von <i>ERBB2</i> in Adeno- vs. Plattenepithelkarzinomen .....	- 53 -
Abbildung 4-25	ROC-Kurve und Multinomial Deviance für multinominale Regression anhand TRG .....	- 54 -

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1	Siewert-Klassifikation der ACs des ösophagogastralen Übergangs.....	- 4 -
Tabelle 2-2	TNM-Klassifikation des Ösophagus.....	- 6 -
Tabelle 2-3	TNM-Klassifikation der Karzinome des Magens .....	- 7 -
Tabelle 2-4	Grading ösophagealer Adenokarzinome nach dem ACJJ .....	- 8 -
Tabelle 2-5	Regressionsgradeinteilung für Plattenepithelkarzinome nach Mandard.....	- 10 -
Tabelle 2-6	Regressionsgradeinteilung für Adenokarzinome nach Becker .....	- 10 -
Tabelle 3-1	Charakteristik der untersuchten Patient:innen und des Karzinomgewebes.....	- 17 -
Tabelle 3-2	Geräteliste.....	- 18 -
Tabelle 3-3	Arbeits- und Verbrauchsmaterialien.....	- 18 -
Tabelle 3-4	Verwendete Kits.....	- 19 -
Tabelle 4-1	Ergebnisse univariate Cox-Regressionsanalyse .....	- 40 -
Tabelle 4-2	Ergebnisse multivariable Cox-Regressionsanalyse.....	- 41 -
Tabelle 4-3	Exemplarische Auswahl von prognostisch relevanten Genen .....	- 50 -

## 1 Einleitung und Ziel der Dissertation

„Ein Punkt nur ist es, kaum ein Schmerz, nur ein Gefühl, empfunden eben; und dennoch spricht es stets darein, und dennoch stört es Dich zu leben. [...] Und leis verläßt Dich alles Hoffen, bis Du es endlich, endlich weißt, daß Dich des Todes Pfeil getroffen.“ Auf diese Weise beschrieb Theodor Fontane (1819–1898) in seinem Gedicht „Beginn des Endes“ sein Leiden. Fontane litt vermutlich an einem Magentumor, der im 19. Jahrhundert sein Todesurteil bedeutete (1).

Da Lebensmittel damals zur Haltbarmachung geräuchert, gepökelt oder getrocknet werden mussten, trugen diese Verfahren zur Exposition gegenüber Karzinogenen bei, die auch heute eine wesentliche Rolle in der Karzinogenese von Tumoren des oberen Gastrointestinaltraktes spielen (2). Die Prognose ist jedoch weiterhin mäßig bis schlecht, denn die Symptome sind unspezifisch und die Diagnose erfolgt in der Regel erst im fortgeschrittenen Tumorstadium. Es gibt mittlerweile Ansätze, die Therapie zu verbessern, etwa mit einer der Operation vorangestellten Radio-/Chemotherapie, um ein *Downsizing* zu generieren und die Operabilität mittels einer R<sub>0</sub>-Resektion möglich und vor allem wahrscheinlicher zu machen. Die neoadjuvante Therapie verlängert das Überleben um einige Monate (3, 4). Nach Erhalt der Diagnose sind die Patient:innen jedoch nach wie vor mit einer großen Ungewissheit konfrontiert, denn aktuell mangelt es an prädiktiven und prognostischen Faktoren, um den weiteren Verlauf der Erkrankung positiv zu beeinflussen.

Zielgerichtete Therapieansätze auf Basis von molekularen Veränderungen, insbesondere sogenannter onkogener Treiber Mutationen, besitzen daher eine zunehmende klinische Bedeutung bei der Behandlung zahlreicher Tumorerkrankungen, einschließlich der Karzinome des oberen gastrointestinalen Traktes. Als exemplarisch kann in diesem Kontext die HER2-gerichtete Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab im Falle einer Überexpression oder Amplifikation von *ERBB2* angesehen werden, die zu einem entscheidenden Überlebensvorteil in der jeweiligen Patientengruppe geführt hat (5).

Bereits heute ist bekannt, dass insbesondere die Kombinationsansätze mit verschiedenen Therapeutika und damit Substanzklassen den Patient:innen zu Gute kommt. Für das Magenkarzinom haben neue Zielstrukturen wie Claudin18.2 in die Behandlungskonzepte Einzug erhalten (6). Es scheint unabdingbar, dass in Zukunft die zielgerichtete und individualisierte Therapie in der klinischen Versorgung Einzug halten wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung des Nutzens von Transkriptom-basierten Analysen in klinisch routinemäßig und im Regelfall zur primären Diagnosestellung genutztem Biopsiematerials. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Frage, ob diese verhältnismäßig umfassenderen Analysen mit dem oft begrenzten Untersuchungsmaterial zur Diagnosestellung durchführbar sind und inwieweit die gewonnenen Informationen wegweisend für die Therapie und den Behandlungserfolg der Patient:innen sein können.

Im Rahmen der Bewertung soll hierbei insbesondere der Zusammenhang zwischen spezifischen Biomarkern mit dem Gesamtüberleben und dem typischerweise nach neoadjuvanter Therapie untersuchten Regressionsgrad erfolgen. Die Transkriptom-basierte Untersuchung der Genexpression Protein-kodierender Gene wird mittels gezielter RNA-Sequenzierung durchgeführt. Diese basiert auf der Illumina Hochdurchsatzsequenzierung, einem NGS-Verfahren, welches es möglich macht kleinste Mengen cDNA zu vervielfältigen. Um eine Bewertung der Validität der gewonnenen Ergebnisse zu ermöglichen, erfolgen ergänzende immunhistochemische Untersuchungen. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf die vergleichende Analyse der beiden Tumorentitäten – Adeno- und Plattenepithelkarzinome – gelegt. Hierbei sollen nicht nur die bereits etablierten Kenntnisse über Karzinome des oberen Gastrointestinaltraktes bestätigt, sondern auch neue Erkenntnisse zu relevanten Genexpressionen gewonnen werden.

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Epidemiologie

Das Ösophaguskarzinom stellte 2020 mit einer Inzidenz von rund 604'000 Fällen weltweit die siebthäufigste Krebserkrankung da. Über zwei Drittel entfielen hiervon auf das männliche Geschlecht. Die Anzahl der Sterbefälle umfasste circa 544'000. In Deutschland ist in den letzten Jahren ein Anstieg der Adenokarzinome (AC) zu verzeichnen, wohingegen die Raten für Plattenepithelkarzinome (PEC) bei Frauen stagnierten und bei Männern rückläufig waren (7, 8). Das mittlere Erkrankungsalter lag 2020 in Deutschland für Männer bei 68 Jahren und bei Frauen bei 72 Jahren. Insgesamt entfallen etwa 90 % der malignen Tumore des Ösophagus auf die Karzinome, die restlichen 10 % verteilen sich auf Lymphome sowie auf mesenchymale, neuroendokrine und sekundäre Tumore (9). (7)

2020 belief sich die Zahl der Magenkarzinome auf etwa 1 Million (10), wobei die durch das Magenmalignom bedingte Mortalität weltweit an dritter Stelle steht. In den Jahren 2019 bis 2020 erkrankten in Deutschland 5'370 Frauen und 9'120 Männer neu, wobei laut RKI im Vergleich zu den Vorjahren von einem mäßigen Abfall auszugehen ist. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei Frauen bei 75 Jahren und bei Männern bei 71 Jahren. Rund 10 % der Fälle traten zwischen dem 30. und dem 40. Lebensjahr auf. In knapp 40 % wurde der Tumor erst im fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert (7).

### 2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie des Ösophagus- und Magenkarzinoms ist durch multiple Faktoren geprägt, die sowohl umweltbedingte als auch genetische Einflüsse umfassen. Ösophageale Adenokarzinome (EAC) entwickeln sich meist aufgrund von chronischer Säureexposition aus einem Barrett-Ösophagus, wobei Adipositas und die gastroösophageale Refluxkrankheit zentrale Risikofaktoren darstellen (11). PECs des Ösophagus korrelieren stark mit Tabak- und Alkoholkonsum, welche synergistisch wirken (7, 11). Weitere Risikofaktoren sind laut Literatur thermische Irritationen, Strahlenexposition und prädisponierende Erkrankungen wie etwa die Achalasie (11-13). Bei Adenokarzinomen des Magens spielt die Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* eine zentrale ätiologische Rolle (6). Weitere Risiken umfassen eine Epstein-Barr-Virus-Infektion, Ernährungsfaktoren wie nitritreiche Speisen, Rauchen und Alkohol sowie genetische Syndrome (z. B. Lynch-Syndrom) (14).

Die Prävalenz beider Karzinomtypen variiert signifikant nach geographischen und sozioökonomischen Faktoren (15, 16). Präventionsstrategien fokussieren sich auf Ernährungsmodifikation und körperliche Aktivität (11, 17).

## 2.3 Pathogenese

Der Barrett-Ösophagus stellt die wichtigste Vorläuferläsion auf dem Weg zum EAC dar (9). Im Zuge der Intestinalisierung kommt es initial zu einer Entzündung, welcher sich eine Umwandlung des Plattenepithels zu intestinale Epithel mit Becherzellen anschließt. Es folgen hoch proliferative Dysplasien durch multiple Mutationen. Ein weiterer Entstehungsweg für EAC führt über die Dysplasie zur Entstehung von drüsigem Epithel des Magentyps mit Parietal- und Belegzellen. Beim PEC kommt es im Zuge von kumulierten genetischen Mutationen zunächst im Sinne einer intraepithelialen low-grade Neoplasie über eine high-grade Dysplasie dann zum tatsächlichen Karzinom (9).

Die Pathogenese der Magenkarzinome ist multifaktoriell bedingt. Für das Verständnis tiefergehender Pathogenese der Karzinomentwicklung durch *H. pylori* sei auf die aktuelle Literatur verwiesen. Als Vorstufen zum Übergang der Magenschleimhaut in Karzinome können Metaplasien der Schleimhaut und Adenome >2 cm gesehen werden (9).

## 2.4 Lokalisation

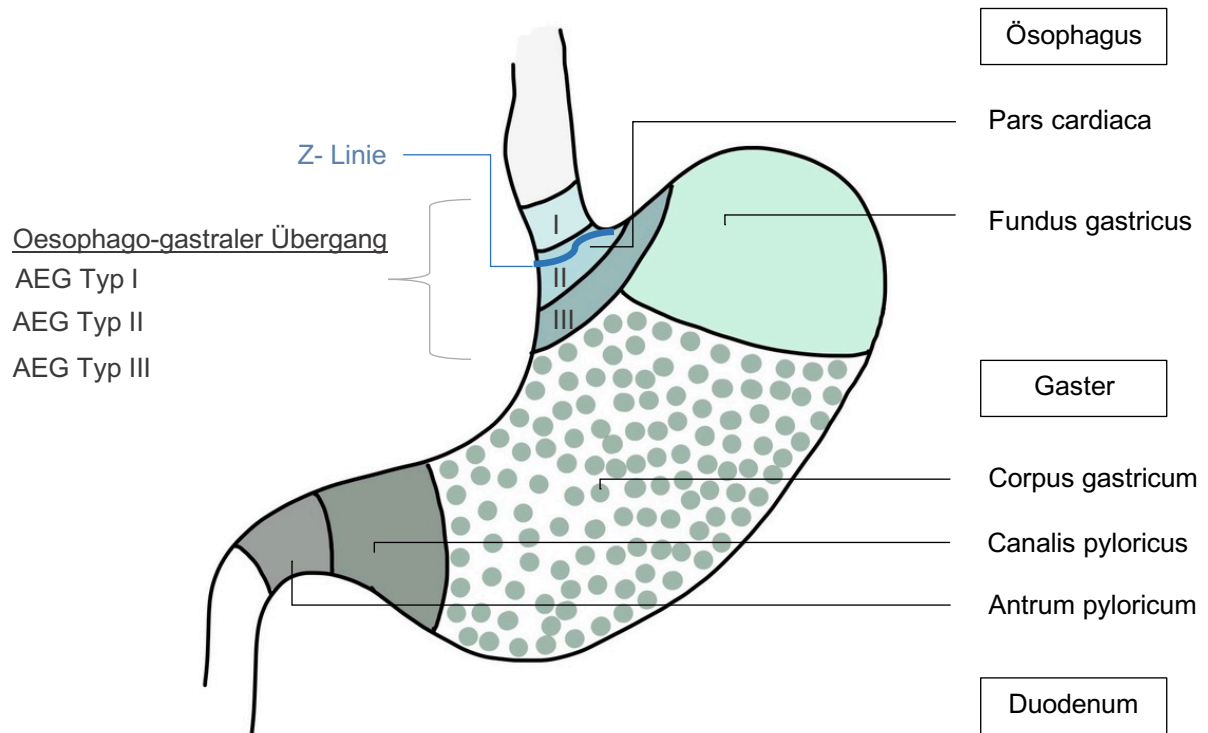
41 % aller Krebserkrankungen der Speiseröhre sind dem Plattenepithelkarzinom zuzuordnen (7). Das PEC findet sich in erster Linie im mittleren und proximalen Anteil des Ösophagus (18). Die drei physiologischen Engen der Speiseröhre sind prädisponierend für die Tumorentstehung: An der *Constrictio phrenica*, welche den Übertritt des Ösophagus in die Bauchhöhle am *Hiatus oesophagus* darstellt, treten in über 95 % der Fälle ACs auf (7). Diese Entität findet sich generell vorwiegend im unteren Anteil des Ösophagus, im mittleren oder oberen Drittel nur zu 25 % (9, 19).

**Tabelle 2-1 Siewert-Klassifikation der ACs des ösophagogastralen Übergangs (AEG) (20)**

Stadium	Beschreibung	Lokalisation
Typ I	AC des distalen Ösophagus	Tumorzentrum zw. 1 und 5 cm oberhalb der Z Linie
Typ II	Cardiakarzinom (im engeren Sinne)	Tumorzentrum 1 cm oral bis 2 cm aboral der Z Linie
Typ III	subkardiales Magenkarzinom	Tumorzentrum zw. 2 und 5 cm aboral der Z Linie

Zusätzlich kristallisierte sich in der Vergangenheit eine alleinstellende Entität heraus. Dabei handelt es sich um Adenokarzinome des ösophagogastralen Übergangs (AEG), deren zusätzliche Klassifikation 2019 durch die WHO eingeführt wurde. Dieses ist definiert als epitheliales Malignom mit muzinöser oder glandulärer Differenzierung, wobei sich das Epizentrum innerhalb von 2 cm im ösophagogastralen Übergang mit Ausläufern in Richtung des Ösophagus befindet (9)(vgl. Abb. 2-2).

Diese lassen sich unter der Siewert-Klassifikation zusammenfassen (vgl. Tab. 2-3, Abb. 2-2). In Anbetracht der molekularpathologischen Entwicklungen könnten sich an dieser Stelle zukünftig neue Differenzierungs- und Behandlungskonsequenzen ergeben (21).



**Abbildung 2-1 Schematische Darstellung des Magens**

Die häufigste Lokalisation eines Magenkarzinoms wird distal beschrieben. Dabei sind vor allem *Antrum* und *Pylorus* betroffen (9). In Nordeuropa und den USA konnten in über der Hälfte der Fälle Tumore in der *Cardia* oder dem *Fundus* festgestellt werden. In Japan hingegen ist die Inzidenz vor allem im proximalen Magen angestiegen (9). Der *Corpus* zeigt sich führend in den Niederlanden und auch in den USA betroffen. (vgl. Abbildung 2-2)

## 2.5 Diagnostik

Das diagnostische Vorgehen bei Tumoren des Ösophagus entspricht nahezu dem des Magens. In jedem Fall wird eine Ösophagogastroduodenoskopie durchgeführt. Neben der makroskopischen Beurteilung ist eine Biopsieentnahme aus suspekten Läsionen unabdingbar. Bezüglich der Anzahl ist man sich nicht abschließend einig, eine Anzahl von > 6–8 erscheint jedoch repräsentativ (19). Bei vorliegendem Barrett-Ösophagus erfolgt eine 4-Quadranten-Biopsie (11). Dem Magen werden obligat 5 bis 8 Biopsien der suspekten Läsionen entnommen (9, 22). Zur Beurteilung der Tiefeninfiltration schließt sich eine Endosonographie an. Es folgen weitere allgemein bekannte Staging-Untersuchungen nach Standards und Leitlinien (11, 13, 22).

Die gewonnene Biopsieprobe wird nach Formalinfixierung in der Pathologie weiter aufbereitet. Es erfolgt das Anfertigen von Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten (FFPE)-Blöcken, welche der Gewebekonservierung und besseren Verarbeitbarkeit dienen. Die histomorphologische Beurteilung an Hämatoxylin-Eosin Schnitten ist obligat für die Diagnosesicherung und Therapieentscheidungen. Diese werden standardmäßig um

immunhistochemische Untersuchungen ergänzt, sie bilden die Basis der Therapieentscheidung. Bezüglich der detaillierten Abläufe und weiterführenden Informationen sei auf das nachfolgende Kapitel „Material und Methoden“ der vorliegenden Arbeit verwiesen.

### 2.5.1 TNM-Klassifikation

Um eine konkrete und vergleichbare Vorstellung eines Tumors zu erlangen, hat sich die Klassifikation nach dem einheitlichen TNM-System bewährt (20, 23). Es handelt sich um eine anatomisch-pathologische Einstufung. Das „T“ beschreibt dabei die Ausdehnung des Primarius. Durch den Buchstaben „N“ werden die lokalen Lymphknotenmetastasen erfasst. „M“ steht für die Anzahl der fernen Tumorherde in anderen Organen. Ist ein Status nicht beurteilbar, wird dies mit einem „X“ gekennzeichnet.

**Tabelle 2-2 TNM-Klassifikation des Ösophagus (20)**

TNM - Klassifikation des Ösophagus	
T0	kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ/high-grade dysplasie, intraepithelialer Tumor
T1	Tumor wächst oberflächlich infiltrierend in
T1a	... die lamina propria oder lamina muscularis mucosae
T1b	...die submucosa
T2	Tumor infiltriert die muscularis propria
T3	Tumor infiltriert die adventitia
T4	Tumor umliegende Strukturen
T4a	...infiltriert Peritoneum/Pleura/Pericard/Diaphragma
T4b	...infiltriert benachbarte Organe wie Aorta, Wirbelkörper oder Trachea
N0	keine regionalen Lymphknoten (LK) -metastasen
N1	Metastasen in 1-2 regionalen LK
N2	Metastasen in 3-6 regionäre LK
N3	Metastasen in 7 oder mehreren regionäre LK
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Zusätzliche Angaben können mittels folgenden Buchstaben vermerkt werden:

- Pn<sub>(0/1)</sub> - perineurale Infiltration (nicht- /vorhanden)
- V<sub>(0/1/2)</sub> - Veneninvasion (keine /mikro- /makroskopisch vorhanden)
- L<sub>(0/1)</sub> - Lymphgefäßinvasion (nicht- /vorhanden)
- R<sub>(0/1/2)</sub> - Residualtumor nach Operation (nicht /mikro- /makroskopisch vorhanden)

Die Einteilung der lokalen Ausbreitung des Magenkarzinoms und der Nah- bzw. Fernmetastasierung hat wie auch beim Ösophaguskarzinom eine klinisch therapeutische Konsequenz.

**Tabelle 2-3 TNM-Klassifikation der Karzinome des Magens (20)**

<b>TNM- Klassifikation der Karzinome des Magens</b>	
T0	kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ/high-grade Dysplasie, intraepithelialer Tumor
T1	Tumor wächst oberflächlich infiltrierend in die
T1a	... die lamina propria oder lamina muscularis mucosae
T1b	... submucosa
T2	Tumor infiltriert die muscularis propria
T3	Tumor infiltriert die subserosa
T4	Tumor perforiert serosa o. angrenzende Strukturen
T4a	...infiltriert serosa (viszerales Peritoneum)
T4b	...infiltriert benachbarte Organe: Milz, Pankreas, Leber, Colon transversum, Diaphragma, Niere, Dünndarm usw.
N0	keine regionalen Lymphknoten (LK) -metastasen
N1	Metastasen in 1-2 regionalen LK
N2	Metastasen in 3-6 regionäre LK
N3	Metastasen in 7 oder mehreren regionäre LK
N3a	7- 15 regionäre LK befallen
N3b	≥ 16 regionäre LK befallen
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

### **2.5.2 Einteilung nach Laurén**

Die Laurén-Klassifikation aus dem Jahre 1965 erfasst die Wachstumsmuster der Magenkarzinome. Es wird dabei neben einer Mischform (ca. 14 %) zwischen einem intestinalen (ca. 54 %) und einem diffusen (ca. 32 %) Typ unterschieden. Letzterer zeigt sich infiltrativ wachsend, schlecht begrenzt und frühzeitig in Lymphknoten metastasierend. Der Intestinale Typ hingegen wächst polypös, expansiv und erscheint gut begrenzt (24). Während der diffuse Typ eher bei weiblichen und Patient:innen des jüngeren Lebensalters auftritt, findet sich die intestinale Wuchsform vorwiegend im höheren Lebensalter bei Assoziation mit *H. pylori*-Infektion und intestinaler Metaplasie.

### 2.5.3 Grading zur Bestimmung des Differenzierungsgrades

Das Grading (G) der PECs erfolgt nach Mitoseaktivität, nuklearen Atypien und Differenzierungsgrad des Plattenepithels (9). Die Adenokarzinome werden nach Anteil der formierten Drüsenanteile differenziert. (vgl. Tab. 2-1)

**Tabelle 2-4 Grading ösophagealer Adenokarzinome nach dem ACJJ (9)**

<b>Grading</b>	<b>Beschreibung</b>
G1	gut differenziert, >95 % gut erkennbare Drüsenformationen
G2	mäßig differenziert, 50- 95 % Drüsenformationen
G3	schlecht differenziert, <50 % Drüsenformationen

Das Grading der Magenkarzinome beschreibt anders als beim Ösophaguskarzinom eine Einteilung nach Differenzierungsgrad des Gewebes. Von G<sub>1</sub>- (hohe Differenzierung) beginnend weist ein G<sub>4</sub>-Karzinom hinsichtlich des Grundgewebes keine Differenzierung mehr auf. (9, 22)

### 2.5.4 Klassifikation nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO)

Die Subtypisierung der Magenkarzinome ist komplex. Das Wuchsmuster des Drüsenepithels stellt hierbei das Hauptunterscheidungskriterium dar (9). Es werden maßgeblich vier Typen voneinander unterschieden. Hierzu zählen tubuläre, papilläre, muzinöse und gering kohäsive prädominant vorliegende Wuchsformen, welche oftmals mit weiteren Formen koexistieren und ein histologisches Mischbild ergeben. Aufgrund seiner Aggressivität ist im Besonderen das siegelringzellige Karzinom von den weiteren Subtypen der Adenokarzinome abzugrenzen.

## 2.6 Neoadjuvante Therapie

Die neoadjuvante Therapie beschreibt eine der Hauptbehandlungen des Tumors vorangestellte Radio-/Chemotherapie, um eine bessere Operabilität des Tumors und des Langzeit-*Outcomes* für die Patient:innen zu generieren. Konkret strebt man dadurch eine Erhöhung der kurativen Resektionsrate (R0-Situation) an. Dabei kann ein vorab nicht operabler Tumor im Sinne einer Konversionstherapie in einen resektablen Zustand überführt werden. Eine initiale Radiochemotherapie zielt sowohl auf ein *Downsizing* als auch auf ein *Downstaging* des Tumorstadiums ab (25). Weiterhin reduziert man die Wahrscheinlichkeit auf ein Lokalrezidiv und eine hämatogene Aussaat (25, 26).

In Deutschland existieren unterschiedliche Therapieregime als Initialbehandlung der Karzinome des oberen gastrointestinalen Traktes vor der Operation. Eine weit verbreitete Kombination wird durch FOLFOX beschrieben. Die Patient:innen werden hierbei mittels Oxaliplatin, Folinsäure und 5-FU behandelt.

Ein bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus gängig angewandtes Regime ist die CROSS-Therapie. Diese umfasst 5-wöchige Zyklen intravenöser Carboplatin- und Paclitaxel-Gaben in Kombination mit Bestrahlung am Beginn des jeweiligen Zyklus. Eine chirurgische Intervention schließt sich innerhalb von vier bis sechs Wochen nach Beendigung der Radiochemotherapie an (4).

Eine weitere Behandlungskombination stellt das FLOT-Regime da. Es umfasst eine 4-wöchige präoperative sowie eine 2-wöchige postoperative Behandlung mittels Fluorouracil und Leucovorin, Oxaliplatin und Docetaxel. Hierbei konnten Al-Batran et al. in der FLOT4-Studie eine Unterlegenheit der ECF (Epirubicin, Cisplatin, 5-Fluorouracil)-Behandlung in Hinblick auf das Gesamtüberleben zeigen (27). Letzteres findet nur noch eingeschränkt Anwendung. Neueste Daten aus der PHASE III ESOPEC-Studie zeigen eine Überlegenheit der perioperativen Chemotherapie nach dem FLOT-Protokoll gegenüber jener nach CROSS. Für die lokal fortgeschrittenen AEG-Tumore könnte hier zukünftig ein Therapieregimewechsel vollzogen werden (13, 28).

Parallel zu jeder dieser (Poly-) Chemotherapien erfolgt die Durchführung der Strahlentherapie, welche in der Regel über mehrere Wochen hinweg in intermittierenden oder täglichen Sitzungen Anwendung findet.

Wichtig für eine Beurteilung des Therapieerfolges ist die in vorangegangenen Kapiteln bereits beschriebene TNM-Klassifikation. Diese wird nach neoadjuvanter Therapie mittels eines vorangestellten „y“ gekennzeichnet. Die Beurteilung seitens der Patholog:innen erfolgt am Tumorresektat. Hoch relevant für das *Outcome* der Patient:innen ist dabei das Vorhandensein von vitalen Tumorzellen.

## 2.7 Regressionsgrad

Der Regressionsgrad beschreibt das Ansprechen des Tumorgewebes auf eine neoadjuvante Therapie. Er wird durch das Verhältnis vitaler Tumorzellen gegenüber der umgebenden Fibrose und Nekrose gebildet. Ein Zusammenhang zwischen der Überlebensprognose und dem Ansprechen auf neoadjuvante Therapie gemessen am Tumorregressionsgrad (TRG) konnte in der Vergangenheit wiederholt gezeigt werden (11, 26, 29-31). Bestimmt wird der Regressionsgrad anhand des mit Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten aufgearbeiteten Tumorsektates. Verlaufsbiopsien sind für eine Beurteilung nicht geeignet (26, 32). Es ist entscheidend, dass die TNM-Klassifikation und Regression unabhängig voneinander zu werten sind. Demnach kann ein hochgradig regressiv verändertes Karzinom dennoch einem ypT3- oder ypT4-Stadium entsprechen und vice versa (26).

**Tabelle 2-5 Regressionsgradeinteilung für Plattenepithelkarzinome nach Mandard et al. (33)**

Regressionsgrad	Beschreibung
Grad 1	kein Tumorgewebe nachweisbar, komplette Regression, nur Fibrose mit oder ohne Granulome im früheren Tumorbereich
Grad 2	nur Fibrose mit vereinzelten verstreuten Tumorzellen (TZ)
Grad 3	Fibrose und namhafte Menge an TZ, Fibrose > TZ
Grad 4	Fibrose und Tumorgewebe mit überwiegend vitalem Tumoranteil
Grad 5	keine regressiven Veränderungen

Bezüglich der Karzinome des oberen Gastrointestinaltraktes gibt es weltweit kein einheitliches Gradingssystem. Einig ist man sich in der vorab beschriebenen Beurteilung über den vitalen Tumorzellgehalt vs. Fibrose. In Deutschland haben sich einerseits das Regressionsgrading nach Mandard et al. (11, 33) für die Plattenepithelkarzinome und andererseits das nach Becker et al. von der TU München (34) für die Adenokarzinome des Magens und des Ösophagogastralen Übergangs etabliert.

**Tabelle 2-6 Regressionsgradeinteilung für Adenokarzinome nach Becker et al. (34)**

Regressionsgrad	Beschreibung
Grad 1a	Komplette Response (CR)
Grad 1b	Subtotale Response (SR), vitale TZ weniger als 10 %
Grad 2	Partielle Response (PR), vitale TZ in 10–50%
Grad 3	Minimale/keine Response (MR, NR), vitale TZ > 50% oder keine regressiven Veränderungen

Es wird diskutiert, die Regressionsgradeinteilung nach Becker et al. vereinheitlicht auf Ösophagus- und Magenkarzinome anzuwenden (34, 35). International haben sich noch

weitere Einteilungen wie etwa jene der Japanischen Gesellschaft für Ösophaguserkrankungen (35) oder die der Japanischen Gesellschaft für Magenkarzinome (32) entwickelt, welche jedoch keinen Vorteil gegenüber der in Deutschland verwendeten Regressionsgradeinteilungen zu bieten scheinen (30) (vgl. Abb. 8-4 und 8-5, Anhang).

## 2.8 Prognose und Prädiktion

In seinem Bericht „Krebs in Deutschland“ aus den Jahren 2019/2020 verzeichnet das RKI bezüglich der malignen Speiseröhrenerkrankungen eine relative 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜ) von 24 % für Frauen und von 25 % für Männer, während Magenmalignome Überlebensraten von 38 % bei Frauen und 33 % bei Männern aufweisen (7).

Die Prognose der genannten Tumorentitäten ist seit Jahren schlecht. Insbesondere sind fortgeschrittene Stadien mit einem schlechten Überleben assoziiert (10, 19). Früh diagnostizierte Tumore, wie etwa das Carcinoma in situ oder pT1-Tumore des Magens zeigen nach vollständiger Resektion (R0) eine Überlebensrate von über 90 %. Demgegenüber ist eine unvollständige Resektion (R1/R2) mit schlechteren Überlebenschancen assoziiert (9-11).

Zu den die Prognose beeinflussenden Faktoren zählen der pathologische N-/L-/V-Status, das Grading, die Lokalisation und die Entität des Tumors (11). Hinzu kommen die patientenbezogenen Faktoren wie Allgemeinzustand, Alter und Komorbiditäten (22). Als unabhängiger Prognosefaktor nach neoadjuvanter Therapie kann die histologische Tumorregression betrachtet werden (9).

Die Responseprädiktion nach neoadjuvanter Radio-/Chemotherapie stellt weiterhin eine Herausforderung dar. Auch mit einem etwas höheren 5-JÜ nach neoadjuvanter Kombinationstherapie zeigen sich nach wie vor *Non-Responder*. In diesen Fällen bleibt es bei einem schlechten postoperativen *Outcome* (17, 36). Der klinische Nutzen eines PET-Scans in diesem Zusammenhang wird diskutiert. Aufgrund der starken Regressionsveränderung nach neoadjuvanter Therapie liefern die bildgebenden Verfahren wie (PET-)CT, EUS und MRT aktuell nur unbefriedigende Ergebnisse (22).

## 2.9 Molekularpathologie der Karzinome des oberen gastrointestinalen Traktes

Ösophagus- und Magenkarzinome teilen molekulare Merkmale. Dazu gehört die häufige Mutation im *TP53*-Gen, welchem eine Schlüsselrolle in der genomischen Instabilität zugesprochen wird. Charakteristisch für beide Gruppen sind chromosomale Instabilität (CIN), die mit der Eigenschaft zu Amplifikationen von Onkogenen wie etwa *ERBB2*, *MET* und *ERBB1* vergesellschaftet sind (23, 37). Letztere beschreiben eine der vier Hauptgruppen der Einteilung der Adenokarzinome des Magens nach den Untersuchungen des Cancer Genome Atlas Research Network aus dem Jahre 2014. Neben CIN werden die Gruppen weiter in EBV (Epstein-Barr-Virus)-Assoziation, Mikrosatelliteninstabilität (MSI high) und genomisch stabile (GS) Tumoren eingeteilt. Je nach Lokalisation im Magen treten diese Subtypen mehr oder weniger häufig auf (23).

Die EBV-positiven Tumore weisen eine hohe DNA-Hypermethylierungsrate, insbesondere von *CDKN2A* auf. Besonders anfällig zeigt sich diese Untergruppe für *PIK3CA*-Mutationen (38, 39). PD-L1/PD-L2 können häufiger überexprimiert sein. Die MSI high-Kohorte ist durch Defekte in DNA-Reparaturmechanismen und eine hohe Mutationslast gekennzeichnet. Die genomisch stabilen Tumore sind durch einer eher geringere Mutationsrate geprägt, jedoch auffällig häufig mit gestörter Zelladhäsion assoziiert, die durch Veränderungen von *CDH1* oder *RHOA* hervorgerufen wird (23). Epigenetische Modulationen wie DNA-Methylierung oder Histonmodifikation tragen neben den genetischen Veränderungen zur Tumorerheterogenität bei (40).

Die Gruppe der Ösophaguskarzinome wird vor allem von den beiden Entitäten der Plattenepithel- und Adenokarzinome geprägt, welche sich molekular signifikant voneinander unterscheiden (37, 41). PECs sind häufiger durch Mutationen von Tumorsuppressorgenen wie etwa *TP53* oder *CDKN2A* geprägt, Genamplifikationen *SOX2* und *FGFR1* kennzeichnen diese Entität (37, 42). EAC hingegen weisen Aberrationen in den RTK/RAS/P13K- Signalwegen und Genamplifikationen von *ERBB2* (HER2) auf, häufige Genveränderungen in *SMAD4*, *CDK2A* und *ARID1A* sind beschrieben und mit höherer Tumorprogression assoziiert (40, 43). Des Weiteren ist VEGF häufig überexprimiert (17, 44). Auch die Überexpression der Zellzyklusregulatoren wie *CCND1* und *CDK4/6* unterstützen das progrediente Tumorstadium (9, 37, 42).

Lymphknotenstatus und Regressionsgrad nach neoadjuvanter Therapie beschreiben auch hier wichtige prognostische Faktoren. Mikrosatelliteninstabilität und PD-L1-Überexpression erscheinen als relevante Biomarker für eine Reaktion auf eine Immuntherapie (9).

### 2.9.1 Biomarker für gezielte Therapien

Aktuell finden sich bereits einige gut verstandene prädiktive Biomarker. Einen Überblick gibt die Veröffentlichung von Mukherji et al. aus dem Jahre 2022. Als targetierbare molekulare Merkmale der Karzinome des Ösophagus und Magens zeigen sich HER2, PD-L1, MSI, NTRK 1/2/3 (45).

Aus der Therapie des Mamakarzinoms bereits wohlbekannt ist die Zielstruktur des epidermalen Tyrosinkinase-Rezeptors ERBB2/HER2. Liegt eine Überexpression vor, so fördert dies die Zellproliferation ohne Ligandenbindung und reduziert die Apoptose. Überexpression von *ERBB2* wird mit erhöhter Invasivität und Metastasierungsrate in Verbindung gebracht. Additiv stellt der HER2-Status beim Magenkarzinom für die Auswahl und Wirksamkeit einer zielgerichteten Therapie einen prädiktiven Marker dar. Die therapeutische Behandlung mit Trastuzumab hat bereits eine signifikante Verbesserung des tumorfreien Überlebens gezeigt (11, 46).

PD-L1 beschreibt ein transmembranes Oberflächenglykoprotein, welches nicht nur auf verschiedenen Immunzellen, sondern auch auf der Tumorzelloberfläche zu finden ist. Ein Andocken des Liganden PD-1 induziert eine reduzierte T-Zell-Immunantwort. So gelingt es den Tumorzellen, das Immunsystem zu unterwandern (47). Folgerichtig fußen viele Forschungsbestrebungen auf der Anwendung von *Immunecheckpoint*-Inhibitoren, um die Tumorzellen für die Immunantwort zugänglicher zu machen. Die PD-L1-Expressionen beschreiben einen unabhängigen prädiktiven Faktor, welcher mit dem Gesamtüberleben korreliert (48). Für alle in der vorliegenden Arbeit betrachteten Entitäten zeigte sich der PD-L1 Combined Positive Score (CPS) als relevante Information über die PD-L1 Expression. Hierbei handelt es sich um den 100-fachen Quotienten aus PD-L1 positiven Zellen und der Gesamtzahl der Tumorzellen (49). Additiv werden der Tumorproportion Score (TPS) und der Immune Cell Score (IC) zur Erhebung des PD-L1 Status genutzt. Der TPS beschreibt den prozentualen Anteil der PD-L1 positiven Tumorzellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der vitalen Tumorzellen. Wohingegen der IC die PD-L1 Expression auf Immunzellen im Stroma des Tumors bewertet. In Kombination stellen sie das aktuelle Mittel zur Responseprädiktion auf Immuntherapie dar (50).

In 10 bis 20 % der Magenkarzinome liegt MSI high vor (23). Bei vorliegender DNA-Mismatch-Reparatur-Defizienz/Mikrosatelliteninstabilität (MMR/MSI) in der Biopsieprobe konnte in verschiedenen Studien bereits der Vorteil für das Patient:innen überleben bei einem Einsatz von modulierenden -Inhibitoren in Kombination mit der neoadjuvanten Radio-/Chemotherapie gezeigt werden (51). Eine hohe Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Tumormutationslast (TMB) können prädiktiv für das Ansprechen auf *Immunecheckpoint*-Inhibitoren sein (52).

Claudin18.2 beschreibt ein Protein, welches als spezifische Isoform des Tight Junction Proteins Claudin-18 an der apikalen Zelladhäsion der Magenepithelzellen beteiligt ist. Bisher

wurde die Überexprimierung insbesondere bei verschiedenen Karzinomentitäten detektiert. Es wird vornehmlich im Magen exprimiert (53). Bezugnehmend auf das TCGA sind es vor allem GS- und CIN-Tumore, die von *CLDN18* geprägt sind (23). Jüngst wurde eine Verlängerung des Gesamtüberlebens bei irresektablem, fortgeschrittenen Magenkarzinomen oder solchen des AEGs durch ein Therapieregime mit FOLFOX in Kombination mit einem monoklonalen Antikörper gegen Claudin18.2 gezeigt (54).

Molekulare Analysen sind Gegenstand aktueller Forschung. Neben den bereits länger bekannten Nomogrammen zur Verwendung mehrerer Variablen, um eine individuelle Prognose zu berechnen, finden zunehmend die molekularen *Profiling*-Tests Einzug in die Therapie. Dabei handelt es sich um die Analyse genetischer und molekularer Merkmale eines Tumors mit der Zielsetzung einer individuellen personalisierten Therapieempfehlung.

## 2.10 Neue Sequenzierungstechniken in der Diagnostik

Die in 1977 erstmals beschriebene Sanger-Sequenzierung legte den Grundstein für die präzise DNA-Analyse. (55). Sie beschreibt einen linearen Prozess, bei dem nur eine DNA-Sequenz pro Ansatz analysiert werden kann. Das Prinzip der Kettenabbruch-Technik mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden bot die Grundlage für weitere Entwicklungen in der Genomanalyse. Es findet heute immer noch Anwendung in der Routinediagnostik und zur Verifizierung von NGS-Datenerhebung.

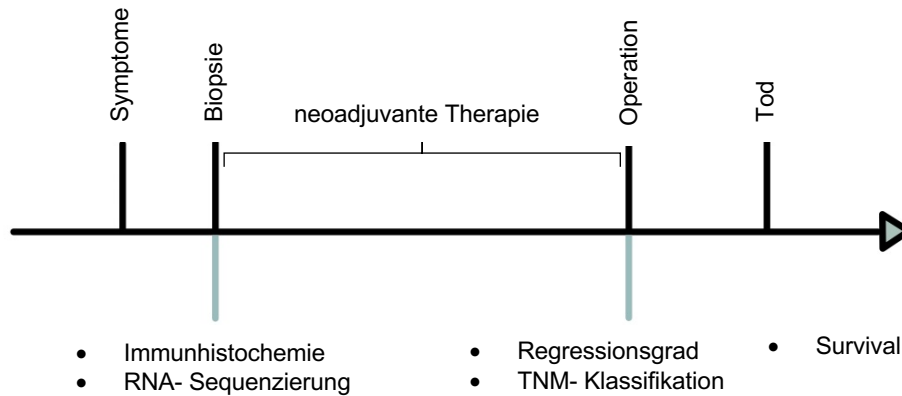
2005 erschien in der Zeitschrift Nature eine Veröffentlichung über eine neue Sequenzierungsmethode, welche eine neue Entwicklung in der molekularen Genomanalyse mit sich brachte (56). Bei dem Next Generation Sequencing (NGS) handelt es sich um eine fortschrittliche Sequenzierungsmethode, die es ermöglicht viele kleine bzw. kurze cDNA- Stränge zur selben Zeit zu sequenzieren. Für die vorliegende Analyse wurde AmpliSeq von Illumina genutzt. Es handelt sich um eine Hochdurchsatz RNA-Sequenzierungstechnologie, die auf der *sequencing-by-synthesis* Methode beruht. Dadurch ergibt sich über Verarbeitung der Information das ursprünglich zu analysierende Transkriptfragment und kann im Anschluss dem exprimierten Gen in Datenbanken zugeordnet werden. Bis zu 10 Millionen cDNA Fragmente können parallel zueinander analysiert werden. (57, 58)

Die Geschwindigkeit und Effizienz der Genomanalyse hat sich durch die Parallelsequenzierung drastisch erhöht. In einem Bruchteil der Zeit und bei geringeren Kosten ist es möglich cDNA zu sequenzieren. Einen ganz entscheidenden Vorteil bringt dabei die Skalierbarkeit. NGS bietet die Chance einerseits die Anzahl der zu analysierenden Proben und andererseits die Sequenzierungsdaten flexibel an das jeweilige Experiment zu adaptieren. Der bestechende Vorteil dieser neuen Methode ist das Generieren von enormen Datenmengen von kleinen Mengen Gigabasen bis hin zu mehreren Terrabasen pro Lauf. Die Anwendbarkeit ist sehr flexibel. Neben Sequenzierung ganzer Genome können Transkriptomanalysen und zielgerichtete Fragestellungen etabliert werden. (58)

Insbesondere bietet die Sequenzierung von RNA aus dem begrenzten Material einer Biopsie einen hohen nutzbaren Informationsgewinn in Hinblick auf das Herausstellen neuer Gene und Transkripte sowie Quantifizierung eben dieser (59-61). Dabei ist es notwendig diese Experimente mit robusten, effizienten und statistisch fundierten Algorithmen zu analysieren (62). Die Integration mehrerer prognostischer und prädiktiver Faktoren hat zur Entwicklung komplexer Modelle und Algorithmen geführt. Die Expressionsanalyse bietet umfassende Einblicke in die Genexpression und ermöglicht zudem ein tiefergehendes Verständnis biologischer Prozesse.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Studiendesign



**Abbildung 3-1 Studiendesign**

Unterteilung nach klinischem Behandlungsablauf (oben) und durchgeführten Analysen (unten)

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine retrospektive Analyse. Insgesamt wurden 192 Fälle mit neoadjuvanter Therapie und gleichermaßen vorliegender Biopsie und Operationspräparat bis zum Jahre 2018 im Archiv des Instituts für Allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz identifiziert. Das Biopsiematerial diente der Transkriptom-basierten RNA-Sequenzierung und den ergänzend durchgeführten immunhistochemischen Färbungen. Die Regressionsgradanalyse und TNM-Klassifizierung erfolgten am Operationspräparat nach neoadjuvanter Therapie (vgl. Abb. 3-1). Vor Beginn der Datenerhebung wurde die ethische Unbedenklichkeit der Studie von der zuständigen Ethikkommission geprüft und bestätigt. Eine Kollektivübersicht stellt Tabelle 3-1 da. In der Gesamtheit umfasst dieses 192 Biopsieproben von Patient:innen, von denen 41 weiblichen und 151 männlichen Geschlechts waren. Da es sich um eine Pilotstudie zur Beurteilung der Durchführbarkeit im teilweise limitierenden Biopsiematerial handelt, wurde die Sequenzierung in der vorliegenden Studie in 72 repräsentativen Fällen durchgeführt. Die *Follow-up* Daten waren bis auf wenige Ausnahmen bei allen Patient:innen bekannt.

**Tabelle 3-1 Charakteristik der untersuchten Patient:innen und des Karzinomgewebes.**  
 Die Klammer ( ) bezeichnet den Anteil der Gesamtsumme der jeweiligen Auswertungskohorte in %. Gesamtkollektiv: 192 Proben; Gesamtanzahl RNA-Proben: 72; Gesamtanzahl der Proben mit Follow-up: 181.

<b>Variable</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Absolut</b>	<b>Follow-up</b>	<b>RNA-Probe</b>	
Alter	< 50 y	21 (10.9)	21 (11.6)		
	50- 59 y	50 (26.0)	47 (26.0)		
	60- 69 y	69 (35.9)	64 (35.4)		
	>= 70 y	52 (27.2)	49 (41.5)		
Tumorentität	AC	141 (73.4)	118 (65.2)	48 (66.7)	
	SRC	21 (10.9)	19 (10.5)	0 (0.0)	
	PEC	51 (26.6)	44 (24.3)	24 (33.3)	
Organ	Magen	88 (45.8)	80 (44.2)	26 (36.1)	
	Ösophagus	104 (54.2)	101 (55.8)	45 (62.5)	
TNM	T	pT <sub>0</sub>	38 (22.0)	35 (5.3)	16 (22.2)
		pT <sub>1</sub>	23 (12.0)	5 (7.3)	13 (17.8)
		pT <sub>1a</sub>	6 (3.1)	6 (3.3)	3 (4.2)
		pT <sub>1b</sub>	9 (4.7)	8 (4.4)	6 (8.5)
		pT <sub>2</sub>	30 (15.6)	7 (10.1)	8 (11.2)
		pT <sub>3</sub>	90 (46.9)	43 (62.3)	31 (43.1)
		pT <sub>4</sub>	7 (3.7)	4 (5.8)	3 (4.2)
		pT <sub>4a</sub>	4 (2.1)	4 (2.2)	2 (2.8)
		pT <sub>4b</sub>	2 (1.0)	2 (1.1)	1 (1.4)
	N	0	87 (45.3)	27 (39.1)	34 (47.3)
		1	41 (21.4)	14 (20.3)	16 (22.5)
		2	30 (15.6)	12 (17.4)	9 (12.5)
		3	29 (15.1)	16 (8.3)	12 (16.7)
		3 <sub>a</sub>	10 (5.2)	10 (5.5)	5 (7.0)
		3 <sub>b</sub>	2 (1.0)	2 (1.1)	2 (2.8)
		X	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)
M	0	60 (31.3)	57 (31.5)	28 (38.9)	
	1	9 (4.7)	6 (3.3)	3 (4.2)	
	X	30 (15.6)	26 (14.4)	5 (6.9)	
Regressionsgrad	Grad 1a	38 (19.8)	34 (18.8)	13 (18.1)	
	Grad 1b	31 (16.2)	29 (16.0)	17 (23.6)	
	Grad 2	42 (21.8)	41 (22.6)	17 (23.6)	
	Grad 3	62 (32.2)	62 (34.2)	19 (26.4)	
<b>Gesamt</b>		<b>192</b>	<b>181</b>	<b>72</b>	

## 3.2 Material

### 3.2.1 Geräte

**Tabelle 3-2 Geräteliste**

<b>Technische Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Bioanalyzer	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, D
Captair <sup>®</sup> bio	erlab D.F.S.S.A.S., Köln, D
DakoCytomation Autostainer Plus	Dako Agilent Technologies Company, Santa Clara CA, USA
Eppendorf Research plus Einkanalpipette	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Eppendorf ThermoMixer <sup>®</sup> comfort	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Heidelberger Pinzette	Vogel GmbH & Co KG, Gießen, D
Heraeus Function Line UT6	Heraeus, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D
Hyrax M 55	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, D
Qubit <sup>™</sup> Fluorometer	Invitrogen <sup>™</sup> , ThermoFisher Scientific, Dreieich, D
Leica Eindeckautomat CV 5030	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
LeicaST4040 LinearStainer	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Mastercycler x50a	Eppendorf AG, Hamburg, D
Medite OTS 40	MEDITE GmbH, Burgdorf, D
Medite TKF 22	MEDITE GmbH, Burgdorf, D
Mikrozentrifuge VWR Micro Star 17R	VWR International BV Researchpark Haasrode 2020, Leuven, B
MultiGourmet	Braun, Kronberg im Taunus, D
Nano Zoomer 2. OHT	HAMAMATSU PHOTONICS K.K., Systems Devisions, 812 Joko-cho, Higashi-ku, Hamatsu City, J
NextSeq <sup>™</sup> 500 Sequenzierer	Illumina <sup>®</sup> Solutions, Berlin, D
Nikon Eclipse 80i	Nikon Instruments Europe B.V., Amsterdam, NL
Paraffineinbettssystem TES 99	MEDITE GmbH, Burgdorf, D
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
Tissue-Tek VIP Sakura 5 300 Tissue Processor	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, D
Tube Racks	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, D
Vortex-Genie <sup>®</sup> 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA

### 3.2.2 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3-3 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien**

<b>Technische Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Cover Slips (24 mm x 50 mm)	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, D
Edelstahlgießformen (10 mm x 10 mm x 5 mm)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D
Einbettkassette	Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, D

Eppendorf Safe Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf Quality, farblos	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Eppendorf Safe Lock Tubes 2,0 ml, Eppendorf Quality, farblos	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Eppendorf Research plus Einkanalpipettenspitzen	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
FEATHER® disposable scalpell No. 15 pfm	Feather Safety Razor Co. LTD., Osaka, J
FREUDENBERG Filtrations Vlies (90 cm x 25 cm)	FREUDENBERG Filtration Technologies SE & Co. KG, Weinheim, D
Menzel- Gläser Superfrost® Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D

### 3.2.3 Verwendete Kits

Tabelle 3-4 Verwendete Kits

Kit	Hersteller/Lieferant
AllPrep® DNA/RNA FFPE Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, D
AmpliSeq CD Indexes SET A	Illumina, San Diego, Kalifornien 92122, USA
AmpliSeq LibraryPlus	Illumina, San Diego, Kalifornien 92122, USA
AmpliSeq Transcriptome Human Gene	Illumina, San Diego, Kalifornien 92122, USA
EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH, (Link) Kit	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
NextSeq 500/550 High Output Kit 2.5	Illumina, San Diego, Kalifornien 92122, USA
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Qubit™ RNA HS Assay Kit	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D

### 3.2.4 Rezepte und Lösungen

Tabelle 3-5 Rezepte und Lösungen

Reagenz	Hersteller/Lieferant	Bestellnummer
Aqua dest. Spüllösung	Delta Klinikinterne Leitung für HAT	8771079
Ethanol 70%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, D	nicht vorhanden
Ethanol 96%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, D	nicht vorhanden
Ethanol abs.	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, D	nicht vorhanden
Isopropanol	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, D	nicht vorhanden
1 N NaOH, molecular biology-grade	Klinikinterne Lösung	
Paraffin 4 %	Klinika Medical GmbH, Usingen, D	2501008
Tris-HCL, pH 7.0, 1M	Fisher Scientific	
Xylol	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, D	nicht vorhanden

### 3.2.5 Software

Tabelle 3-6 Software

Programm	Version	Firma
Bioanalyzer	B.02.08.SI648	2100 Expert Software, Agilent Technologies
Inkscape	Inkscape 1.1	GNU General Public Lic.
Salmon	1.2.0	Patro R et al. (63)
Dseq2	1.3	Love et al. (64)
R Studio	2022.07.2	Open Source, Rstudio, PBC
Endnote	21.4	Open Source
Excel, Word	16.78.3	Microsoft®

### 3.3 Methoden

Die Benutzung des Gewebes ab Schnitt des Paraffinblocks mit bereits eingebettetem Gewebe erfolgte nach den routinemäßig durchgeführten Protokollen des Institutes für Allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz. Um jedoch die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten werden im Folgenden die für die Einbettung des Biopsiegewebes verwendeten Materialien ebenfalls aufgeführt.

#### 3.3.1 Histologie

Für Biopsieentnahme und Tumoroperation lagen vereinheitlichte Standardprotokolle vor. Nach Entnahme der Biopsien wurden diese bis zur Einbettung in einer Pufferlösung nach dem Protokoll der Universitätsmedizin Mainz eingelegt, die Filterung mittels eines Vlieses und die Probenablage in einzelne Einbettkassetten schlossen sich an. Bis zur Weiterverarbeitung verblieben die Drahtkörbe in 4 %iger Formalinlösung. Nach automatisierter Dehydrierung und Paraffintränkung über Nacht wurde mittels modularem Paraffin-Einbettsystem der Paraffinblock zur Lagerung und Schnitterstellung produziert. Zur Vorbereitung auf die Weiterverarbeitung wurde dieser zunächst auf einer Eisplatte bei -12 °C gekühlt. Anschließend erfolgte die Herstellung von 2 µm dünnen Scheiben mittels Rotationsmikrotom.

#### 3.3.2 Immunhistochemie

Zur Darstellung der Expression von PD-L1, HER2 und Claudin18.2 wurden die Schnitte immunhistochemisch gefärbt.

##### 3.3.2.1 Vorbereitung der Schnitte

Die gewonnenen Schnitte wurden mit Objektträger auf der Wärmeplatte bei einer Temperatur von 43 °C über eine Dauer von 15 min platziert. Es folgte das Trocknen im Brutschrank bei 37 °C. Zunächst liefen die Schnitte über 20 min bei 66 °C ab. Im Anschluss wurde der Ständer mit den Objektträgern in drei aufeinander folgenden Xylol Küvetten mit absteigendem Verschmutzungsgrad je 5 min getunkt. Es schloss sich die Waschung in einer absteigenden

Alkoholreihe von 100 %, 96 %, 80 %, 70 % und 50 % Ethanol zweimalig pro Konzentration für je 3 min an. Parallel dazu wurde der Low pH (pH 6) Target Retrieval Puffer (EnVision™ FLEX) im Dampfgarer bei 94–99 °C erhitzt. Bevor die Objektträger für 35 min hier ihren Platz fanden, erfolgte über 5 min die Spülung mit Aqua dest. Die Abkühlung fand in einem Wasserbad unter laufendem kaltem Leitungswasser für 15 min statt. Es schloss sich eine 5-minütige Phase im Waschpuffer (EnVision™ FLEX Wash Buffer, 1:20) mit einem pH von 6,1 an.

### **3.3.2.2 Immunhistochemische Färbung mittels Autostainer**

Genutzt wurde u.a. das Dako EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH, (Link) Kit in der 5. Ausgabe. Zunächst wurden Schnitte und Reagentien in den Autostainer überführt. Das Tropfvolumen betrug 100 µl. An die Waschung mittels Waschpuffer (WP) schloss sich die endogene Peroxidase-Blockierung über 5 min an. Es erfolgte eine erneute Waschung mit WP. Die Inkubation mit dem Primärantikörper dauerte 20 min bevor erneut mit WP gereinigt wurde. Nachfolgend kam es zur 15-minütigen Benetzung mit Sekundärreagenz (Flex+ Mouse). Auch die erneute Waschung mit WP blieb nicht aus. Es schloss sich die Inkubation mit dem Tertiärreagenz (HRP) über 20 Minuten an. Eine erneute Waschung mit WP folgte. Anschließend kam es zur zweimaligen je 5 min andauernden DAB Chromogen Farbstoffbenetzung mit darauffolgenden WP Waschungen, bevor die Objektträger mit Hematoxylin (Dako REAL™ Hematoxylin, Ref. S 2020) über 3 Minuten inkubiert wurden. Im Anschluss folgte die Spülung mittels Aqua dest. Über 3 min bevor sich eine Dehydrierung der Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 2 min und ein dreimalig 3 minütiges Xylol Bad anschlossen. Abschließend wurde das Gewebe unter Verwendung von Entellan (rtu) eingedeckelt.

### **3.3.3 Extraktion der Ribonukleinsäuren**

Für die Isolation von Nukleinsäuren wurde das AllPrep® DNA/RNA FFPE Kit (50) (Qiagen, Hilden) genutzt. Verwendete Reagenzien sind in den Tabellen 3-3 bis 3-6 aufgeführt.

#### **3.3.3.1 Gewebegewinnung**

Zur Gewinnung des Gewebes der ungefärbten Biopsien von den Objektträgern wurden eben diese 8 µm Schnitte über 20 min bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablaufen des Paraffins erfolgte das Abkratzen in Xylol mittel Skalpell. Aufgefangen wurde das gewonnene Gewebe in 1,5 ml Eppendorfgefäßen und jeweils mit 1 ml Xylol aufgefüllt. Es schloss sich die Zentrifugation über 1 bei 17'000 g an. Als weitere zweimalige Fällungsreaktion wurde 1 ml Ethanol angewandt mit erneuter Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit. Die Trocknung des Gewebes fand bei Raumtemperatur über 15 min statt.

#### **3.3.3.2 Trennung der Ribo- von der Desoxyribonukleinsäure**

Zunächst wurde das entstandene Pellet in 150 µl PKD Puffer aufgelöst. Hinzugegeben wurden 10 µl Proteinase K. Die Vermischung erfolgte durch vortexen. Eine Inkubation von 1 Stunde

bei 56 °C schloss sich mit einer drei minütigen Kühlung auf Eis an. Die Zentrifugation dauerte 15 min bei Maximalgeschwindigkeit. Der Überstand mit der RNA wurde in ein 2 ml Collection Tube überführt und für den nächsten Schritt der RNA- Isolation verwendet. Das DNA Pellet verblieb im 1,5 ml Eppendorfgefäß.

### **3.3.3.3 Isolation der Ribonukleinsäuren**

Der im Vorfeld getrennte Überstand inkubierte 15 min lang bei 80 °C. Hinzugefügt wurden 320 µl RLT und 1120 µl Ethanol. Es schloss sich die Vermischung an. Die Suspension wurde auf eine von der Fa. Quiagen bereitgestellte RNA-Isolationssäule übertragen. Dies erfolgte in mehreren Schritten, um ein Überführen der gesamten Probe zu gewährleisten. Für die Filtration wurde die Zentrifuge mit 8'000 g für 15 s genutzt, der Durchfluss jeweils verworfen. Nach Hinzugeben von 350 µl FRN wurde der Durchfluss erneut verworfen. Je 10 µl DNase I plus 70 µl RDD wurden zu den Proben additiert und wirkten 15 min bei Raumtemperatur ein. Zur Säulenwaschung fanden 500 µl FRN je Probe Anwendung, welche anschließend bei 8'000 g zentrifugiert wurden. Der Durchfluss wurde erneut auf die jeweilige Säule in einem unbenutzten 2 ml Auffangreaktionsgefäß gegeben. Es schloss sich eine wiederholte Zentrifugation über 15 s an. Der Durchfluss wurde verworfen.

Zweimalig folgte die Säulenwaschung mit je 500 µl RPE und eine Zentrifugation über 15 s. Zur Säulentrocknung schloss sich eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min an. Die Säule wurde in das endgültige 1,5 ml Eppendorfgefäß übertragen, mittels 30 µl RNase-freies Wasser bei Raumtemperatur inkubiert und nach einer Minute bei Maximalgeschwindigkeit für 60 s zentrifugiert, um die RNA herauszulösen.

### **3.3.3.4 Quantitative RNA und cDNA-Bestimmung**

Zur Bestimmung der unspezifischen Nukleinsäurekonzentrationen der Biopsien wurde ein photometrisches Messverfahren angewandt. Dies erfolgte mittels Qubit® Fluorometer unter Verwendung des Qubit® RNA HS Assay. Genutzt wurde jeweils 1 µl Probe auf 199 µl Puffer inklusive der Probe entsprechenden Menge Reagenz. Vor der quantitativen Messung wurden die zu untersuchenden Mikroreaktionsgefäße jeweils gevortext und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### **3.3.4 NGS-Amplikon-basierte RNA-Sequenzierung**

Dieser Arbeit wurde die Hochdurchsatz-sequenzierung von Illumina zu Grunde gelegt. Zunächst wurden die FFPE-fragmentierten RNA-Abschnitte in cDNA umgeschrieben und vermehrt. Für die Erstellung der cDNA als auch bei der nachfolgenden Erstellung der Library für die Bioanalyse wurde das Verfahren der Multiplex-Polymerasekettenreaktion (PCR) angewendet (65). Hierbei handelt es sich um eine Technik zur Vervielfältigung spezifischer Gensequenzen. Grundsätzlich folgt das Prinzip immer den Schritten der Denaturierung,

Annealing und Elongation. In Abhängigkeit des jeweiligen Prozessschrittes fanden unterschiedliche PCR-Bedingungen in der vorliegenden Arbeit Anwendung.

### 3.3.4.1 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Aus einer isolierten RNA kann cDNA synthetisiert werden. Dieser Vorgang beschreibt die Reverse Transkription. Der vorliegenden Arbeit wurde das NEB Standard Protocol zu Grunde gelegt. Dabei konnten bis zu 1 µg der aufgereinigten RNA pro Ansatz umgeschrieben werden.

**Tabelle 3-7 Mastermix I**

Komponente	Volumen
Random Primer Mix [60 µM]	2 µl
dNTPs [10 mM]	1 µl
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	bis 10 µl

**Tabelle 3-7.1 Mastermix II**

Komponente	Volumen
5x ProtoScript II Buffer	4 µl
Nuklease free H <sub>2</sub> O	2,8 µl
DTT [0,1 M]	2 µl
ProtoScript II RT [200 U/µl]	1 µl
Rnase Inhibitor [40 U/µl]	0,2 µl

Aufgrund variierender Konzentrationen extrahierter Ribonukleinsäuren in den Proben wurden jeweils unterschiedliche Volumina RNase freies Wasser verwendet. Nach Zugabe von 3 µl Mastermix I (Tabelle 3-8) wurde die Probe für 5 min bei 65 °C denaturiert, zentrifugiert und unmittelbar auf Eis gestellt.

Der Denaturierungsansatz wurde mit 10 µl Mastermix II (Tabelle 3-8.1) versetzt, kurz zentrifugiert, im Anschluss 5 min bei 25 °C und folgend 60 min bei 42 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, schloss sich eine Bebrütung über 20 min bei 65 °C an. Die Lagerung der cDNA-Probe erfolgte bei -20 °C.

### 3.3.4.2 AmpliSeq PCR

Der Ampliseq Hifi Mix und das Ampliseq Transcriptome Human Gen Expression Panel wurden auf Eis vorbereitet. Von der im Vorfeld aufgetauten cDNA wurden je Probe 10 ng ehemaliger FFPE RNA genutzt. Daraufhin wurde AmpliSeq HiFi Master Mix 4 µl mit AmpliSeq Transcriptome Human Gex Panel 8 µl und 3 µl Nuclease free water gut vermischt, im Anschluss das Gesamtvolumen von 20 µl in den Thermocycler überführt. Es vollzogen sich 14 Zyklen der Amplifikation nach Tabelle 3-9.

**Tabelle 3-8 PCR-Programm Amplify Targets**

	Zeit	Temperatur	Wdh.
Initiale Denaturierung	2 min	99 °C	
Denaturierung	15 sec	99 °C	14
Annealing und Elongation	16 min	60 °C	14
Hold		4 °C	

### 3.3.4.3 Verdauung der Primer-Anteile

Mittels Zugabe von 2 µl FuPa Reagent (enthält eine Exonuklease) wurden im nächsten Schritt die für den weiteren Prozess nicht von Bedeutung seienden Primer Anteile entfernt. Das angewandte Thermocyclerprogramm beschreibt zunächst eine Inkubation von 50 °C über 10 min. Dem schloss sich über den gleichen Zeitraum eine zweite Inkubation von 55 °C an. Zur Reaktionsinaktivierung bebrüteten die Proben bei 62 °C über 20 min. Zuletzt folgte die Kühlung über 1 Stunde bei 10 °C. Die Weiterverarbeitung erfolgte unmittelbar im Anschluss hieran.

### 3.3.4.4 Adapter- und Barcode-Ligation

Zur Vorbereitung der zeitgleichen Sequenzierung von Proben der verschiedenen Patient:innen wurden diese einzeln mit einer probenspezifischen Barcodesquenz markiert. Zusätzlich erfolgte in diesem Arbeitsschritt die Adapterligation in Vorbereitung auf die Sequenzierung.

Zu der 22 µl Lösung aus den vorangegangenen Prozessschritten wurden additiv 4 ml Switch Solution für die Inaktivierung der Exonuklease hinzugefügt. Anschließend erfolgte das Hinzusetzen von 2 µl CD Indexes und 2 µl des Enzyms der dann-Ligase sowie eine gute Durchmischung. Im Thermocycler schloss sich eine Ligationsphase bei 22 °C über 30 min mit einer nachfolgenden Inaktivierung bei 72 °C über 10 min an.

Am Ende des Arbeitsschrittes wurden die entstandenen *Libraries* bei 10 °C über Nacht im Kühlschrank gelagert und am nächsten Tag weiterverarbeitet.

### 3.3.4.5 Aufreinigung der *Libraries*

Durch die Ligation von Adapter und Barcode wurden die cDNA<sub>R</sub>-Proben zu *Libraries*. Das Aufreinigen erfolgte bei Raumtemperatur unter Nutzung von Agencourt AMPure XP Magnetpartikeln und 70 % Ethanol. Für den detaillierten Ablauf sei an dieser Stelle auf das AmpliSeq for Illumina Transcritome Human Gene Expression Panel Script verwiesen.

### 3.3.4.6 Amplifikation der *Libraries*

Der zweite Amplifikationsschritt bestand darin die entstandenen *Libraries* zu vervielfältigen, um eine bessere Quantifizierung und Analyse der cDNA<sub>R</sub> Stränge gewährleisten zu können.

Tabelle 3-9 PCR-Programm Amplify *Libraries*

	Zeit	Temperatur	Wdh.
Initiale Denaturierung	2 min	98 °C	
Denaturierung	15 sec	98 °C	7
Annealing und Elongation	1 min	64 °C	7
Hold	24 h	10 °C	

Als Vorbereitung des Amplifikation Master Mix wurden 45 µl Lib Amp Mix und 5 µl Library Amp Primers benötigt. Mit den insgesamt 50 µl erfolgte die Beimpfung und Vermischung mit den

Proben, es schloss sich die Platzierung im Thermocycler mit in der Tabelle 3-10 aufgeführten PCR-Programm an.

#### **3.3.4.7 Aufreinigung der amplifizierten *Libraries***

Um eine gute Probenqualität vor Sequenzierung gewährleisten zu können schloss sich eine erneute Aufreinigung der amplifizierten *Libraries* an. Hierbei kamen erneut die Agencourt AMPure XP Magnetpartikeln und das 70 %-Ethanol zum Einsatz. Zusätzlich wurde Low-TE Puffer eingesetzt, um die aufgereinigte cDNA zu resuspendieren.

Dies beschreibt einen zweiseitigen Prozess, der im Detail dem AmpliSeq for Illumina Transcriptome Human Gene Expression Panel Script zu entnehmen ist. Formal erfolgt zunächst die Überführung der *Libraries* auf eine neue Platte, woran sich das Entfernen der Primer aus vorangegangener Amplifikation anschließt. Nach Auswaschung der Magnetpartikeln und überschüssiger Materialien der Vorsritte bleiben die cDNA-Sequenzen auf der neuen *Low Bind* PCR Platte zurück.

#### **3.3.4.8 Quantifizierung**

Die Quantifizierung der *Library*-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe des Bioanalyzers der Fa. Agilent Technologies durchgeführt. Dafür wurden die Proben auf den HS Chip überführt und für die sich anschließende Amplifikation quantifiziert.

#### **3.3.4.9 Denaturierung der *Libraries***

Zu den Grenzen der Sequenzierungen zählt die Länge der cDNA-Proben. In der Konsequenz muss bereits zu Beginn der Überführung sichergestellt werden, dass die zu sequenzierenden *Library*-Präparate klein genug sind. Der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegt wurde die *Standard Normalization Method* nach Protocol A des Illumina NextSeq 500 Sequenzierung System.

Gestartet wurde in der vorliegenden Untersuchung mit einer *Library*-Konzentration von 1 nM auf 20 µl. Darauf folgend wurde mit 20 µl 0.2 N Natriumhydroxid vermischt und im Anschluss für 1 min bei 280 g zentrifugiert, eine Inkubation bei Raumtemperatur über 5 min schloss sich an. Zusätzlich wurden 200 mM Tris-HCL und pH 7-Puffer zugesetzt. Nach erneutem Zentrifugieren über eine Minute bei 260 g wurde in der vorliegenden Studie 940 µl HAT1 Puffer zur Hybridisierung der denaturierten *Libraries* genutzt. Zur abschließenden Vorbereitung wurde eine Suspension mit einer Konzentration von 1.8 pM *Library*-Konzentrat auf 1.3 ml hergestellt und abzentrifugiert.

#### **3.3.4.10 Sequenzierung mittels Illumina NextSeq500**

Die Sequenzierung erfolgte auf einem Illumina NexSeq500 mit 1x 75 bp *read*-Längen. Das *Clustering* erfolgt auf einer speziellen Membran, die auf ihrer Oberfläche zu denen im Vorschritt adaptierten DNA-Fragmenten komplementäre Sequenzen vorpräpariert hat. Nach Bindung an eben diese wird mittels DNA-Polymerase ein komplementärer cDNA-Strang

produziert. Es schließt sich die Denaturierung des Doppelstrangs mit anschließender Waschung an.

Der nächste Schritt beschreibt die klonale Amplifikation mittels des Verfahrens der Brückenbildung. Dabei „beugt“ sich der einsträngige cDNA-Strang mit seinem freien Ende zu dem nächsten komplementären Ligandenstück auf der Clustermembran. Erneut wird ein komplementärer Strang durch die Polymerase erzeugt. Es entsteht eine Brücke durch das DNA-Doppelstrang Fragment. Die Denaturierung in zwei jeweils an die Clustermembran gebundene Einzelstränge und anschließende Waschung schließen sich an. Die Wiederholung des Prozesses folgt. Als Resultat finden sich vielzählige Kopien desselben ursprünglich zu analysierenden cDNA-Fragmentes. Dieser Prozess beschreibt damit eine Brücken-PCR.

### **3.3.5 Statistik**

Die Statistik und Abbildungen wurden mithilfe von Microsoft Excel und des Open Source Programmes R Studio erstellt. Die Abbildungen der deskriptiven Statistik wurden unter Nutzung der R-Pakete *lubridate* (66), *survival* (67) und *ggplot2* (68) generiert, als Farbpalette der Diagramme das Paket *RColorBrewer* (Version 1.1-3) (69) zu Grunde gelegt. Bezüglich Analyse der RNAseq-Daten siehe folgenden Absatz. Die angewandten statistischen Tests und Analysen werden bei den entsprechenden Auswertungen aufgeführt. Ab einem p-Wert von  $<0.05$  wird statistische Signifikanz angenommen.

### **Bioinformatische Analyse der Expressionsdaten**

Die quantitativen Transkriptionsdaten wurden mithilfe von *Salmon* (Version 1.2) vorprozessiert, einer Pseudoalignment-basierten Quantifizierung (63, 70). Anschließend wurden die Daten mit dem R-Paket *tximport* transformiert, um eine Gen-basierte Analyse zu ermöglichen (71).

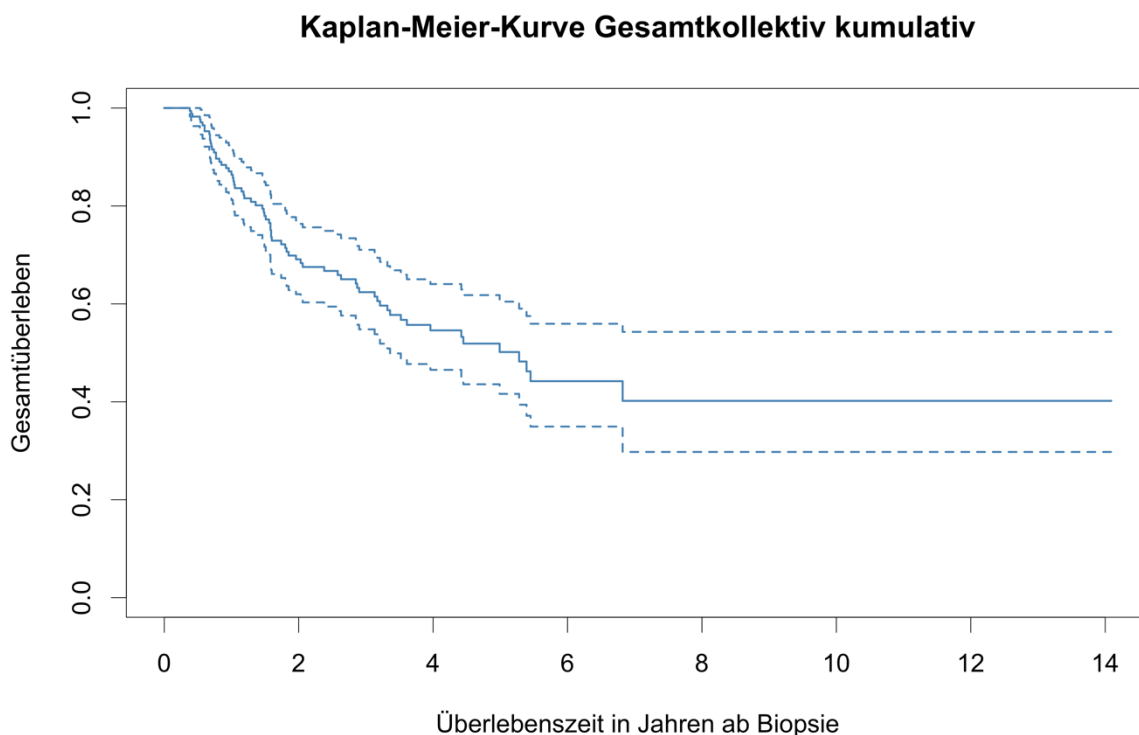
Die differentielle Expression wurde mit *DESeq2* (Version 1.3) durchgeführt (64). Zusätzlich wurde eine Normalisierung auf Basis von CPM (counts per million) durchgeführt, um eine vergleichbare Skalierung der Daten aus den *targeted multiplex* RNA-Seq-Experimenten zu erreichen. Zur Korrektur batch-spezifischer Effekte, die durch unterschiedliche Sequenzierstage verursacht wurden, erfolgte eine Batch-Korrektur mit dem *sva*-Paket (72).

Für die Visualisierung komplexer Datenstrukturen wurde das R-Paket *ComplexHeatmap* verwendet (73). Zur Differenzierung von Tumortypen wurde auf Basis der standardisierten Expressionsdaten eine binomial-logistische Regression unter Nutzung eines elastischen Netzes mit dem R-Paket *glmnet* implementiert (74). Weiterhin wurde eine Cox-Regressionsanalyse mit *training*- und *test*-Sets durchgeführt, um eine prognostische Expressionssignatur zu erstellen (75). Abschließend wurde eine multinomiale Regression angewandt, um die Vorhersage des histologischen Regressionsgrades zu bewerten und die klinische Wertigkeit der Modelle zu untersuchen (76).

## 4 Ergebnisse

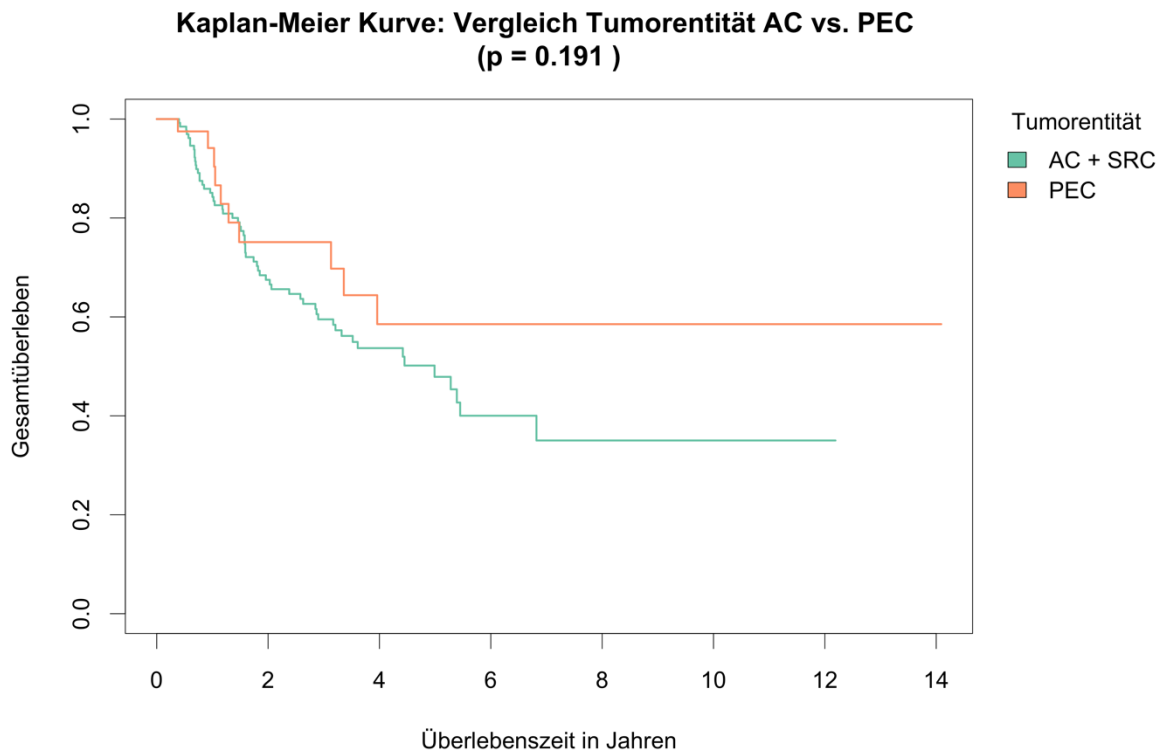
### 4.1 Überlebenszeitanalysen

Folgend dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven des untersuchten Kollektivs. Dabei wird das Gesamtüberleben auf der Y- Achse auf einer Skala von 0 bis 1.0. Letzteres entspricht dabei 100% Überleben zum Startzeitpunkt der Beobachtungen. Die Zeit in Jahren ab Biopsieentnahme ist auf der X- Achse dargestellt. Jede der folgenden Kaplan-Meier-Kurven untersucht dabei Überlebenswahrscheinlichkeiten für unterschiedliche Einflussfaktoren über einen Zeitraum von rund 10 Jahren. Um Unterschiede zwischen den jeweiligen Einflussfaktoren zu testen wurde jeweils der logrank-Test angewendet.



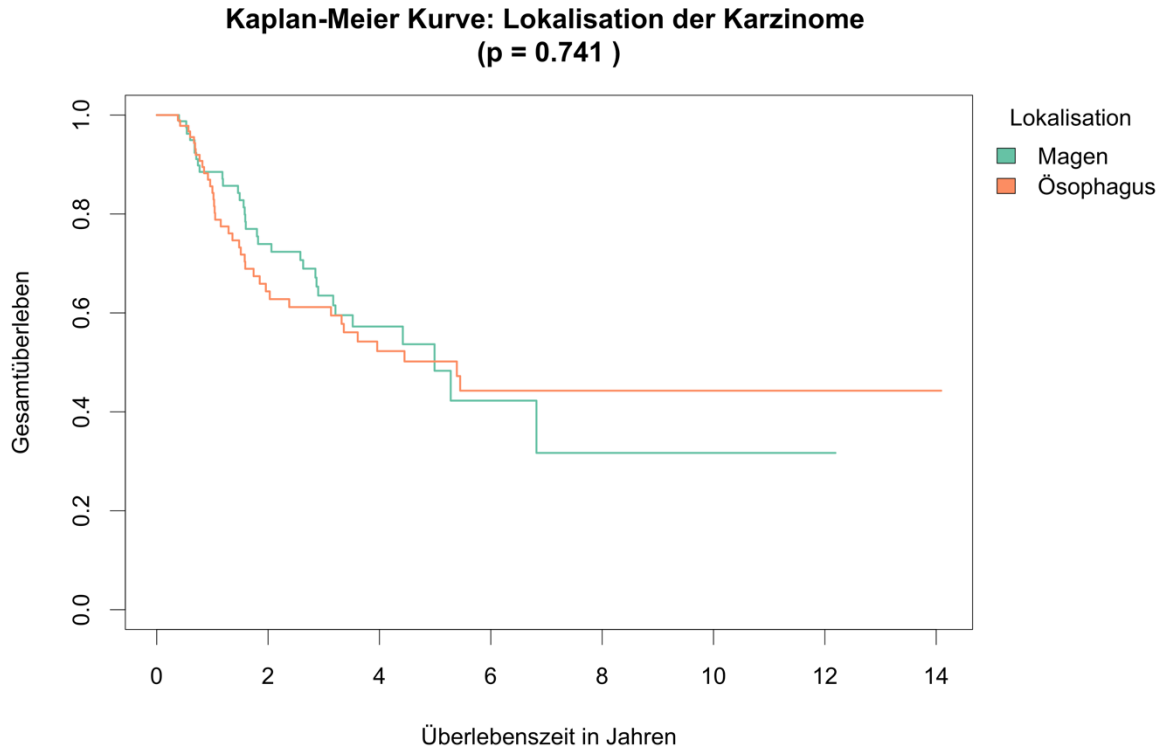
**Abbildung 4-1 Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben des Kollektivs mit Konfidenzintervall**

Eine Übersicht der Überlebenswahrscheinlichkeit für das Kollektiv ist in Abbildung 4-1 dargestellt. Dabei wurden 172 Fälle mit einbezogen. Von diesen verstarben 69 während des Beobachtungszeitraumes. Die Überlebenswahrscheinlichkeit nach 3 Jahren beträgt 62,4% (95 %-KI: [54,8 %; 71,0 %]). Die 5-JÜ beträgt im vorliegenden Kollektiv 50,2% (95 %-KI: [41,6 %; 60,5 %]). Das mediane Überleben liegt bei 5,28 Jahren. Gerade in den ersten 3 Jahren ab Diagnosestellung ist der größte Rückgang der Überlebenswahrscheinlichkeit zu vermerken.



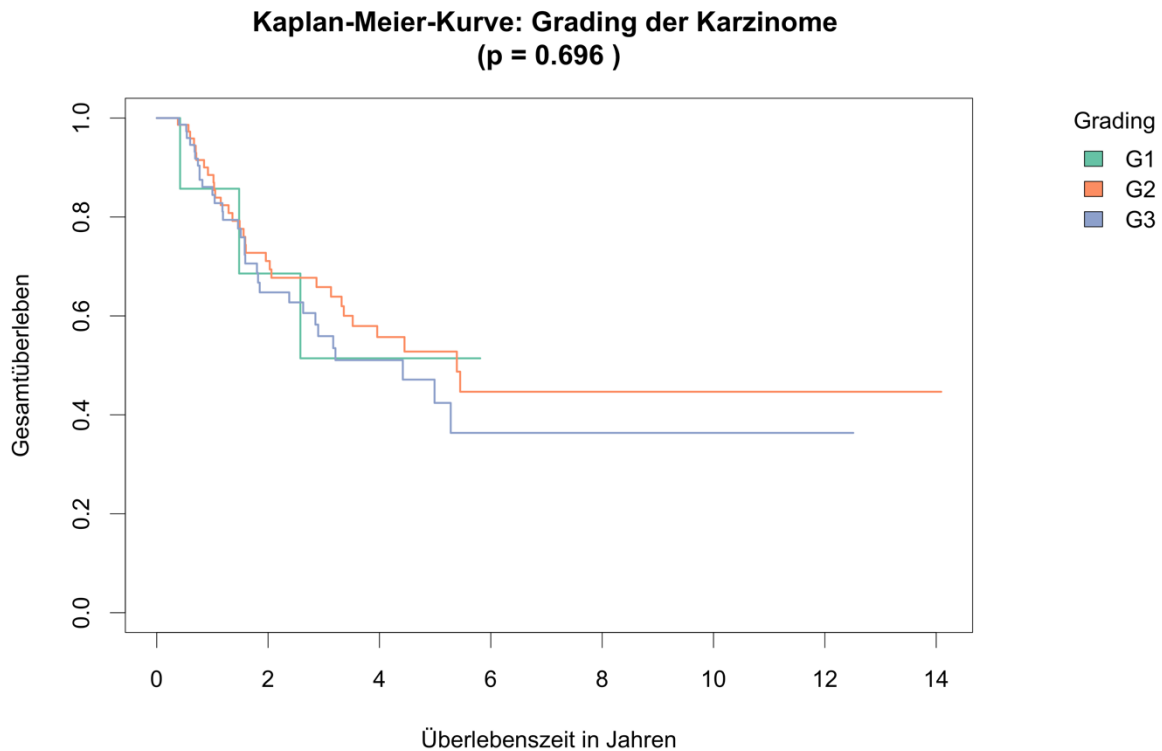
**Abbildung 4-2 Kaplan-Meier-Kurve für das entitätsspezifische Gesamtüberleben**  
ACs inkl. SRCs (grün) – Adenokarzinome inklusive Siegelringzellkarzinome, n=141;  
PECs (orange) – Plattenepithelkarzinome, n=51.

Die vergleichende Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeiten zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen wird in Abbildung 4-2 dargestellt. Die Siegelringzellkarzinome werden dabei als Teil der ACs betrachtet. Die ACs beschreiben dabei ein 5-JÜ von 47,9% (95 %-KI: [38.4 %; 59.7 %]), die PECs hingegen 58,5 % (95 %-KI: [41.0 %; 83.6 %]). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenswahrscheinlichkeiten der ACs und der PECs (logrank-Test:  $p = 0.191$ ).



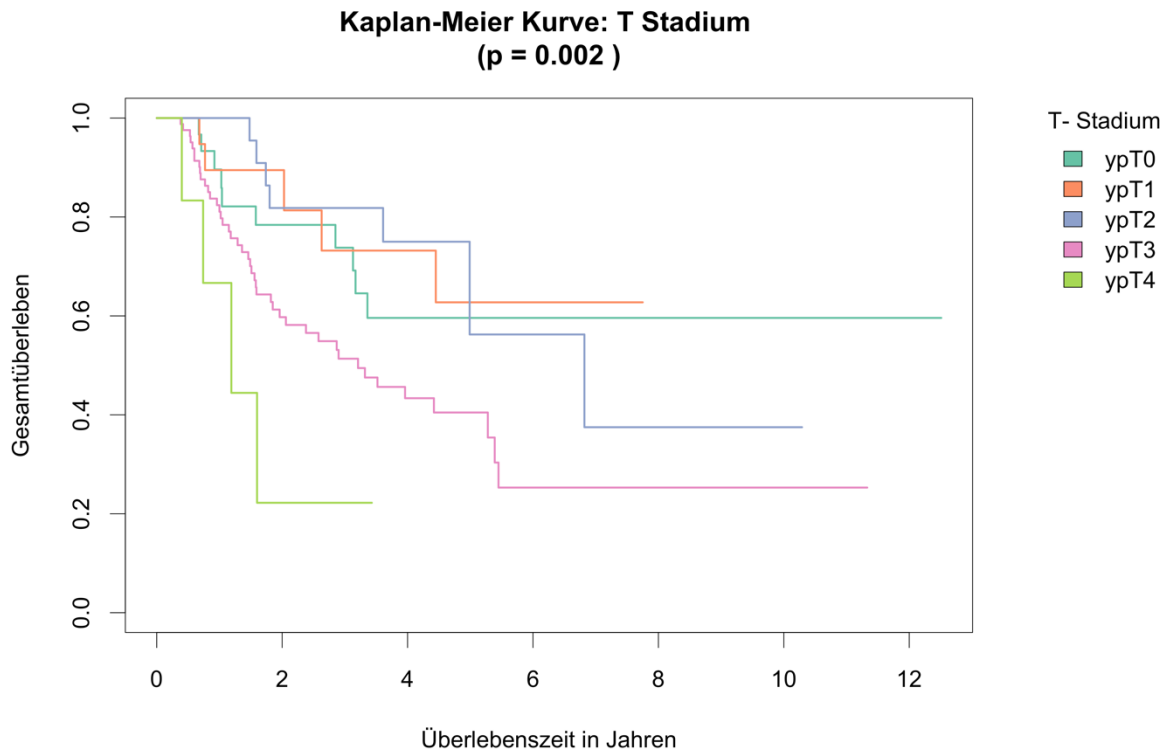
**Abbildung 4-3** Kaplan-Meier-Kurve für das lokalisationsabhängige Gesamtüberleben Magen (grün,  $n = 84$ ) vs. Ösophagus (orange,  $n = 97$ );  $n = 181$ .

Die Überlebenskurven für Magen- oder Ösophaguskarzinome weisen eine ähnlich niedrige Überlebenswahrscheinlichkeit in den ersten 2 Krankheitsjahren auf. Das 5-Jahresüberleben liegt für die Ösophaguskarzinome bei 50,2 % (95 %-KI: [39,3 %; 64,05 %]) und für die Magenkarzinome bei 48,3 % (95 %-KI: [34,8 %; 66,9 %]). Der Unterschied zwischen den Überlebenskurven zeigt sich als nicht signifikant (logrank-Test,  $p = 0.741$ ) (vgl. Abb. 4-3).



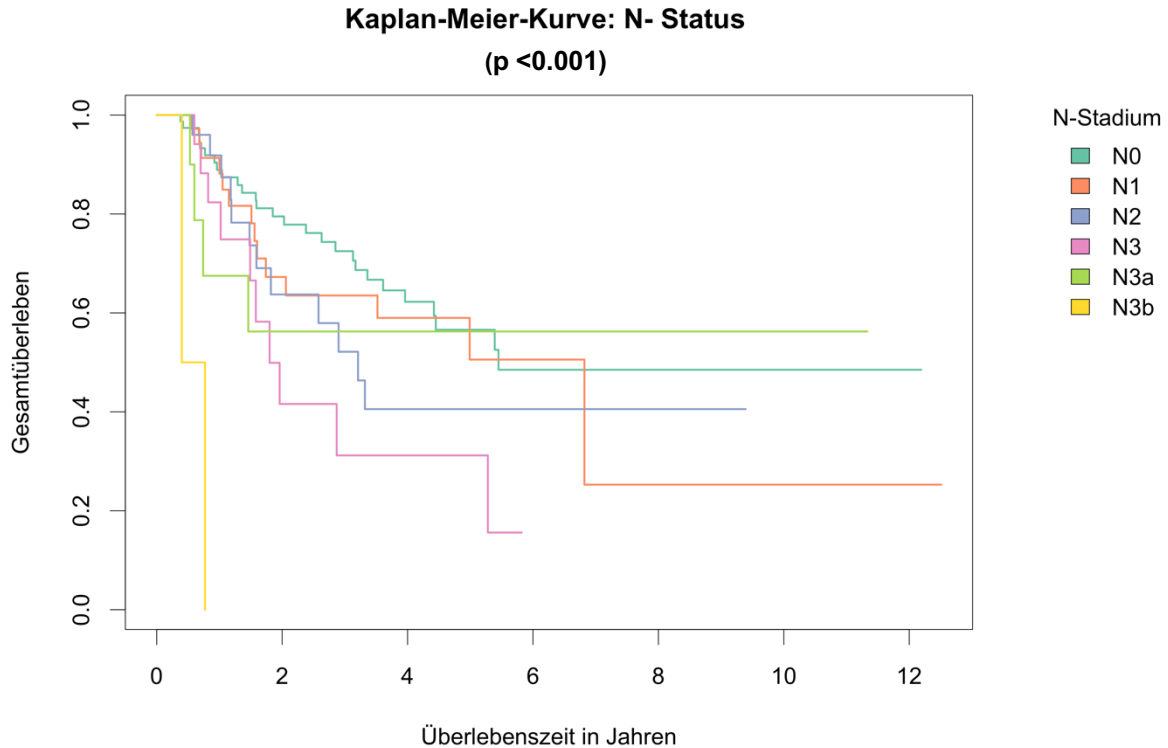
**Abbildung 4-4** Kaplan-Meier-Kurve für das Grading-spezifische Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs  $n = 165$ , logrank-Test:  $p = 0.696$ .  
 G1 (grün) – gut differenziert, >95% gut erkennbare Drüsenformen),  $n = 7$ ;  
 G2 (orange) – mäßig differenziert, 50-96% Drüsenformation,  $n = 78$ ;  
 G3 (violett) – schlecht differenziert, <50% Drüsenformation,  $n = 80$ .

Abbildung 4-4 zeigt das Gesamtüberleben der Patient:innen mit Karzinomen des gastrointestinalen Traktes in Abhängigkeit des Gradings. Alle drei Kurven weisen einen ähnlich steil abfallenden Verlauf über den Beobachtungszeitraum und damit ein ähnliches Gesamtüberleben auf. Dabei liegt die 5-JÜ für G1- und G2-Tumore bei rund 51 % (G1: 95 %-KI: [40,95 %; 68,05 %]; G2: 95 %-KI: [40,9 %; 68,1 %]), für G3-Tumore bei 42,4 % (95 %-KI: [29,2 %; 61,6 %]). Das Ergebnis zeigt sich nicht signifikant (logrank-Test,  $p = 0.696$ ).



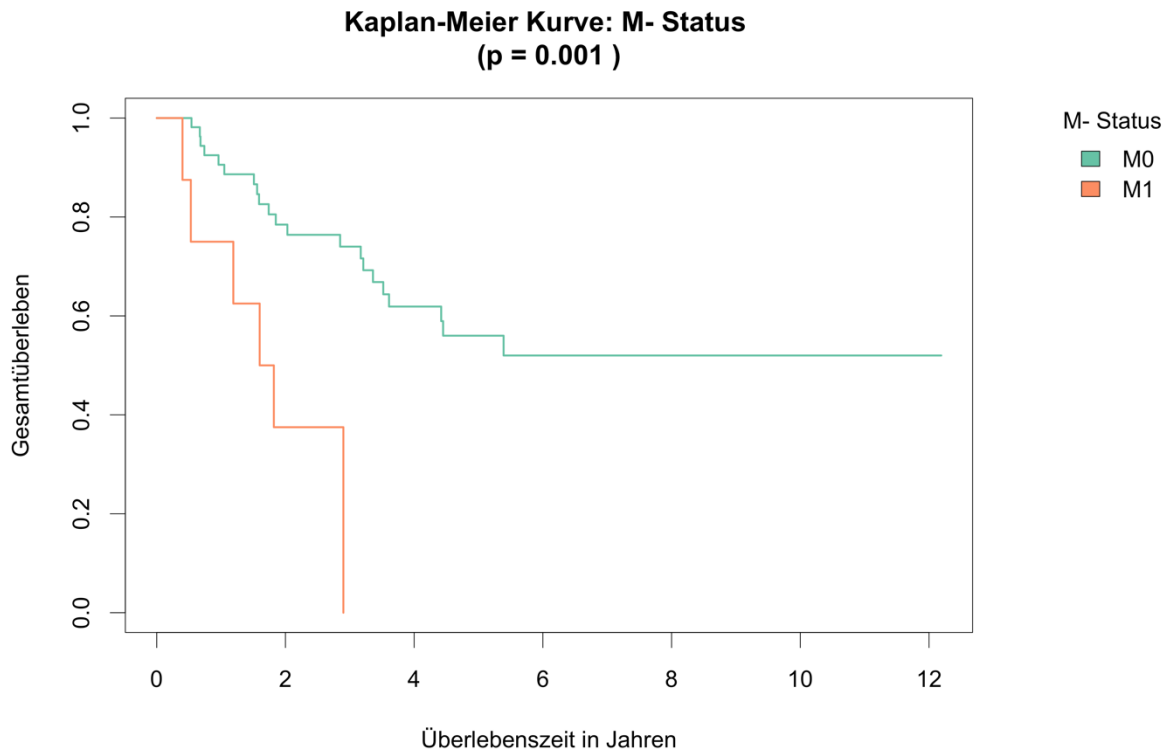
**Abbildung 4-5 Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit des T- Stadiums**  
Zur besseren Darstellbarkeit wurden T<sub>1</sub> a/b und T<sub>4</sub> a/b unter ypT1 (n = 21) bzw. ypT4 (n = 7) zusammengefasst, ypT0 (n = 35), ypT2 (n = 29), ypT3 (n = 87) n = 179, logrank-Test: p = 0.002.

Abbildung 4-5 zeigt die Überlebenswahrscheinlichkeit in Jahren nach Biopsieentnahme unterteilt nach dem T-Stadium des Tumors. Karzinome der ypT0- bis ypT2-Stadien weisen einen ähnlichen Verlauf der Überlebenswahrscheinlichkeiten auf. Die 3-JÜ nach der Diagnose eines ypT4-Tumors liegt bei 22 % (95 %-KI: [4,0 %; 100 %]). Das 5-JÜ liegt bei dem ypT0/ypT1-Tumoren bei 59,6% (95 %-KI: [42,7 %; 83,2 %]) und 62,7% (95 %-KI: [40,4 %; 97,3 %]), für ypT3-Tumore hingegen bei 40,5 % (95 %-KI: [29,5 %; 55,49 %]). Ein Unterschied zwischen den einzelnen Überlebenskurven ist darstellbar und damit statistisch signifikant (logrank-Test,  $p < 0.01$ ).



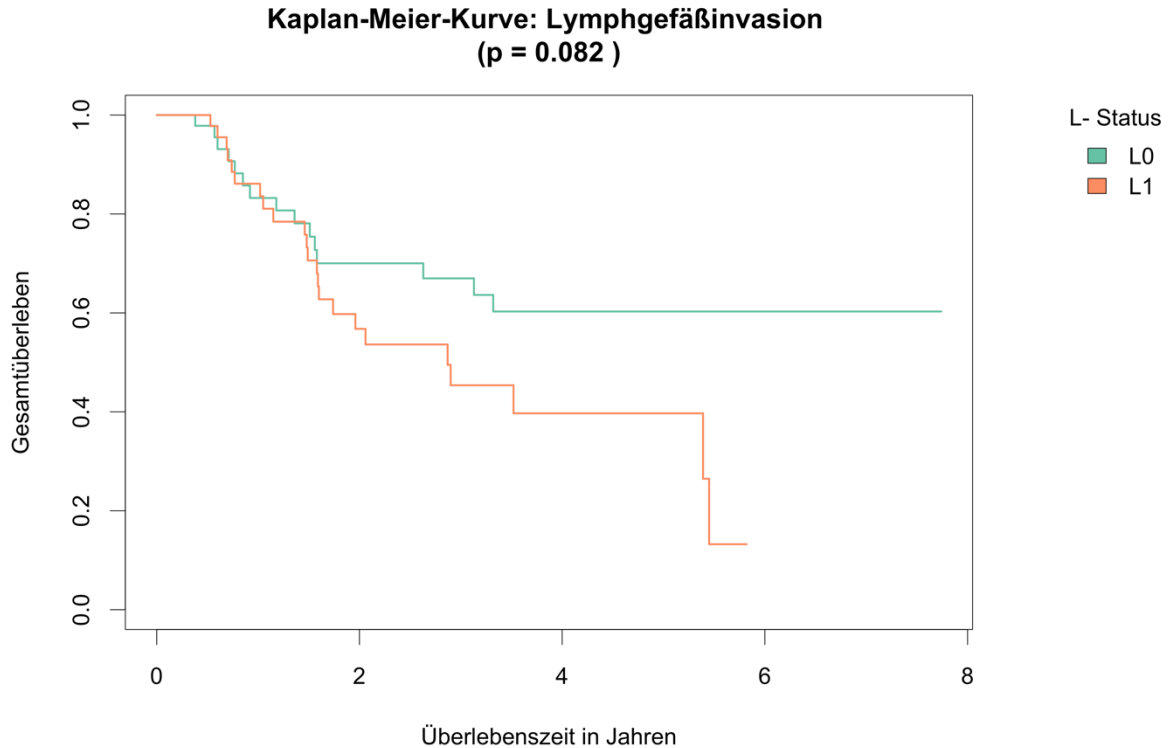
**Abbildung 4-6 Kaplan-Meier-Kurve des N-Status-abhängigen Gesamtüberlebens**  
N Status beschreibt die Lymphknotenmetastasierung (vgl. Kapitel 2),  $n = 178$ ;  
logrank-Test:  $p = 7e-070$ .

Abbildung 4-6 zeigt die Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit vom N-Stadium. Dabei zeigen vor allem N3b-Tumore die höchste Sterblichkeit in den ersten 2 Jahren. Dem gegenüber zeigen Tumore mit N0-Status ein 5-JÜ von 57 % (95 %-KI: [44,4 %; 72,1 %]). Die Überlebenskurven von N1- bis N2-Tumore zeigen vorliegend ein ähnliches Gesamtüberleben. Karzinome mit N3-Status weisen im vorliegenden Kollektiv ein 5-JÜ von 31% (95 %-KI: [13,2 %; 73,9 %]) auf. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der 6 Gruppen unterscheiden sich signifikant voneinander (logrank-Test,  $p < 0.001$ ).



**Abbildung 4-7 Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit vom M-Status**  
M0 (grün) – keine Fernmetastasen, n = 57;  
M1 (orange) – Fernmetastasen vorhanden, n = 8;  
n = 65, logrank-Test: p = 0.001.

Abbildung 4-7 stellt die Überlebenswahrscheinlichkeiten unterteilt nach dem Status der Fernmetastasen dar. Das 1-JÜ der Karzinome mit M1-Status liegt bei 75% (95 %-KI [50 %; 100 %]). Tumore mit Fernmetastasen (3-JÜ: 0%) weisen ein schlechteres Überleben als solche ohne Metastasen (3-JÜ: 74% (95 %-KI [62,7 %; 87,3 %])) auf. Das 5-JÜ der Karzinome ohne Fernmetastasen zeigt sich mit 56% (KI [42,8 %; 73 %]). Das Ergebnis zeigt einen signifikanten Unterschied der Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit des Metastasierungsstatus des Tumors (logrank-Test, p = 0.001).



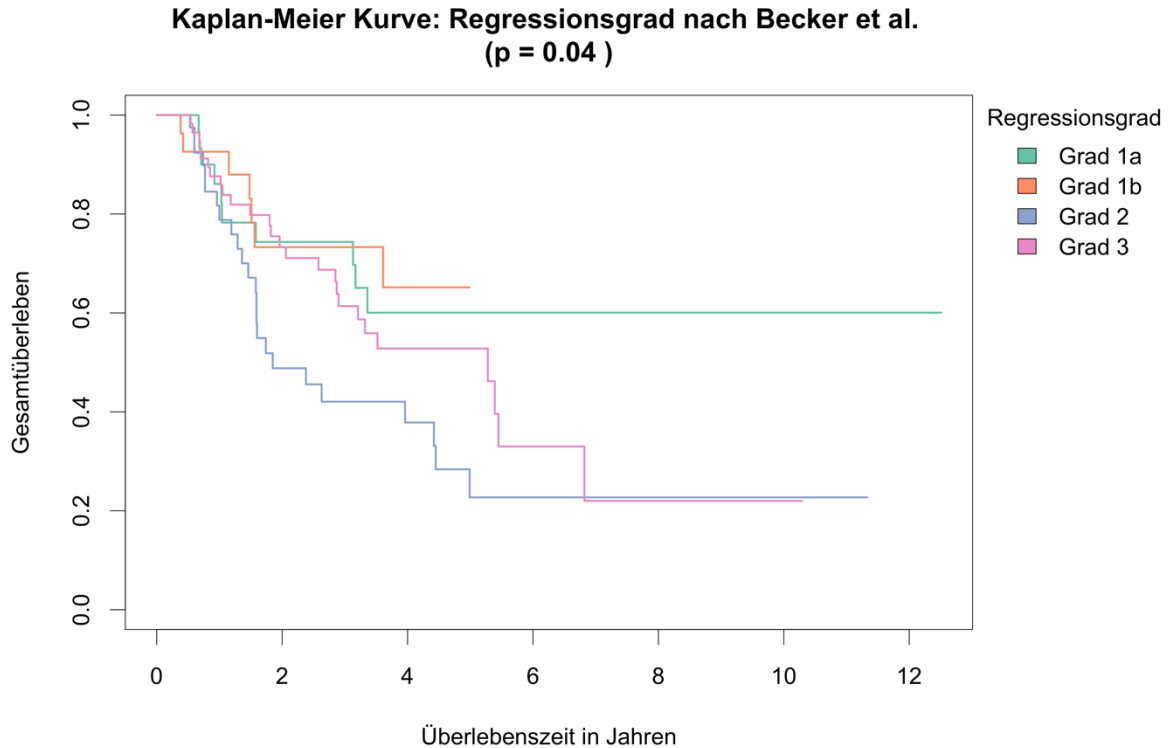
**Abbildung 4-8** Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit vom L- Status

L0 (grün) – keine Lymphgefäßinvasion,  $n = 51$ ;

L1 (orange) – Lymphgefäßinvasion,  $n = 47$ ;

$n = 98$ .

Abbildung 4-8 zeigt die Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Überlebenszeit in Jahren ab Biopsieentnahme mit (orangener Graph) oder ohne (grüner Graph) Lymphgefäßinvasion des Primärtumors. Das 5-JÜ beschreibt bei Karzinomen mit L1-Status im vorliegenden Kollektiv 39,7% (95 %-KI: [25 %; 62,9 %]) und mit L0-Status 60,3% (95 %-KI: [46,2 %; 78,6 %]). Das Ergebnis zeigt sich als knapp nicht signifikant (logrank-Test:  $p = 0.082$ ).



**Abbildung 4-9 Kaplan-Meier Kurve nach Regressionsgrad nach Becker et al. (34)**

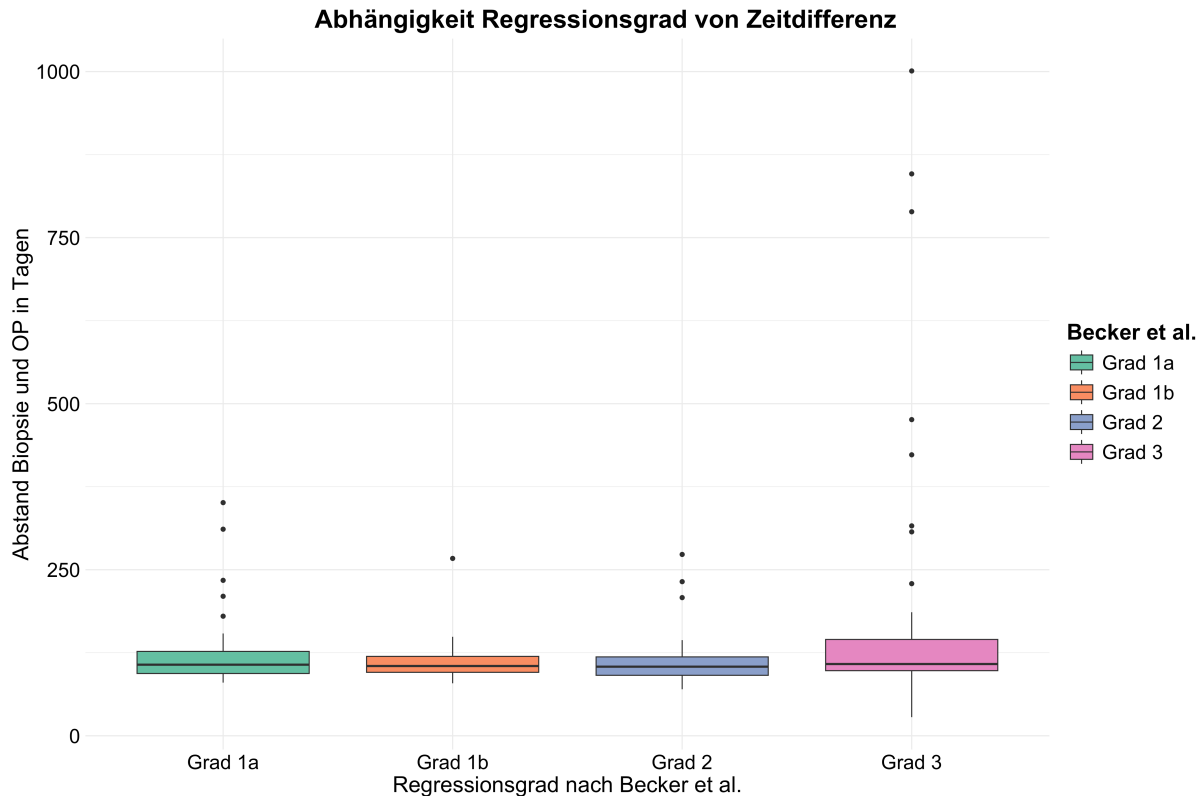
Grad 1a (grün) – komplette Response (R),  $n = 34$ ;  
 Grad 1b (orange) – subtotale R, weniger als 10% vitale TZ,  $n = 29$ ;  
 Grad 2 (violett) – partielle R: vitale TZ in 10-50% der Fälle,  $n = 41$ ;  
 Grad 3 (pink) – minimale R: >50 vitale TZ,  $n = 62$ ;  
 $n = 166$ , logrank-Test:  $p = 0.04$ .

Zur besseren Vergleich- und Auswertbarkeit wurde einheitlich die Regressionsgradeinteilung nach Becker et al. (34) verwendet. Dabei konnte die Klassifikation nach Mandard et al. (33) für die PECs auf die nach Becker übertragen werden. Ein TRG 1a nach Becker et al. entspricht demnach einem Grad 1 nach Mandard, TRG 1b dem Grad 2, TRG 2 dem Grad 3 und abschließend entfallen auf TRG 3 nach Becker sowohl Grad 4 als auch Grad 5 nach Mandard. (vgl. Tab. 2-5, 2-6)

Abbildung 4-9 zeigt das Überleben unterteilt nach Regressionsgrad nach Becker et al. an. Nach 5 Jahren weisen Patient:innen mit einem TRG 1a (60 %, 95 %-KI: [43,2 %; 83,5 %]) oder 1b (65,2 %, 95 %-KI: [46,2 %; 91,8 %]) eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit als solche mit einem Regressionsgrad 2 (22,7 %, 95 %-KI: [10,78 %; 47,85 %]) oder 3 (52,8 %, 95 %-KI: [39,72 %, 70,2 %]) auf. Patient:innen mit einem TRG 3 zeigen im vorliegenden Kollektiv ein besseres Gesamtüberleben als solche mit TRG 2. Der Unterschied zwischen den Überlebenswahrscheinlichkeiten der unterschiedlichen Regressionsgrade ist knapp signifikant (logrank-Test,  $p < 0.05$ ).

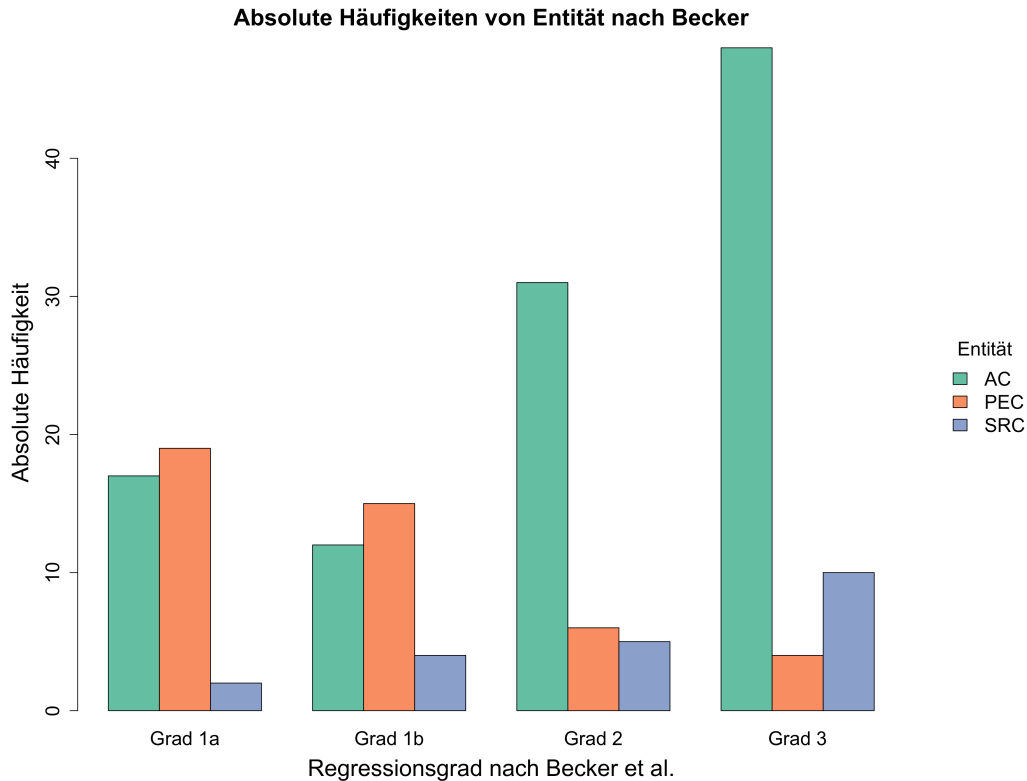
## 4.2 Betrachtung des Regressionsgrades

Der Tumorregressionsgrad nach neoadjuvanter Therapie wird regelhaft bestimmt. Es liegt daher nahe, die Zusammenhänge am vorliegenden Kollektiv genauer zu evaluieren.



**Abbildung 4-10** Abhängigkeit des Regressionsgrades von Zeitdifferenz zwischen Biopsie und Operation: Regressionsgrade nach Becker et al. (34), mediane Zeitabstand: 106 Tage, Grad 1a (grün) – komplette Response (R), n = 38; Grad 1b (orange) – subtotale R, weniger als 10% vitale TZ, n = 31; Grad 2 (violett) – partielle R: vitale TZ in 10-50% der Fälle, n= 42; Grad 3 (pink) – minimale R: >50 vitale TZ, n =62; n = 192.

In Abbildung 4-10 ist der Regressionsgrad der Zeitdifferenz zwischen Biopsie und Operation gegenübergestellt. Dabei repräsentieren die Boxen den Interquartilsabstand für den jeweiligen TRG, die Ausreißer sind als Punkte dargestellt. Betrachtet man das gesamte Kollektiv, so beträgt die mediane Zeitdifferenz zwischen Biopsieprobe und Operation 106 Tage. Die Mediane der einzelnen TRG-Kohorten spiegeln dies wider (Grad 1a: 107 d, Grad 1b: 105 d, Grad 2: 104 d, Grad 3: 108 d). Die Kohorte des TRG 3 zeigt dabei die größte Streuung bei einem Mittelwert von rund 167 Tagen (95 %-KI: [121.42 d; 212.90 d]). Der Kruskal-Wallis-Test wurde zur Analyse von Unterschieden in der Zeitdifferenz zwischen den vier Regressionsgraden nach Becker verwendet. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kohorten (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0.2308$ ). Eine tabellarische Übersicht der deskriptiven Statistik hierzu ist dem Anhang beigelegt (vgl. Tab. 8-6).



**Abbildung 4-11 Absolute Anzahl der Entitäten nach Regressionsgrad Becker et al. (34)**

AC (grün) – Adenokarzinome n = 120; PEC (orange) – Plattenepithelkarzinome n = 51; SRC (violett) – Siegelringzellkarzinome n = 21.

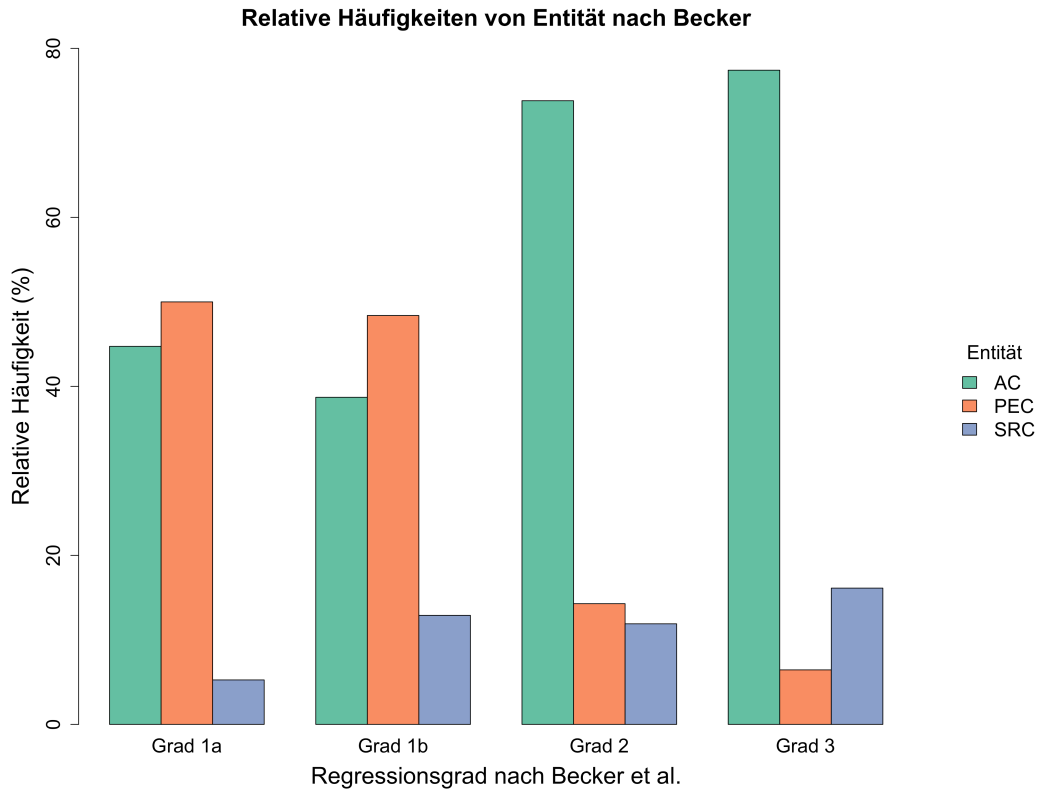
Regressionsgrading: Grad 1a – Komplette Regression (n = 38);

Grad 1b - <10 % Residualtumor (n = 31); Grad 2 – 10- 50 % Residualtumor (n = 42);

Grad 3 - >50 % Resttumorgehalt (n = 62)

Chi-Quadrat-Test:  $\chi^2(36.39) = 6, p = 2.32e-06$ .

Abbildung 4-11 und 4-12 zeigen einander ergänzend die Verteilung der Tumorentitäten des untersuchten Kollektivs auf die Regressionsgrade nach Becker et al. sowohl in absoluten als auch in relativen Werten. Es sind alle Regressionsgrade im Kollektiv repräsentiert. Etwas mehr als die Hälfte zeigen Residual- und Resttumorgehalt nach neoadjuvanter Therapie. Betrachtet man die relative Häufigkeitsverteilung, so zeigen die PECs eine überwiegende Verteilung über die Regressionsgrade 1a/1b mit abnehmender Tendenz Richtung Regressionsgrad 3. Die ACs weisen einen ansteigenden Verlauf mit Hauptanteil in den Regressionsgraden 2 und 3 auf. SRCs zeigen sich über alle Regressionsgrade hinweg ähnlich verteilt. Das Ergebnis zeigt sich hoch signifikant (Chi-Quadrat-Test,  $p < 0.001$ ).



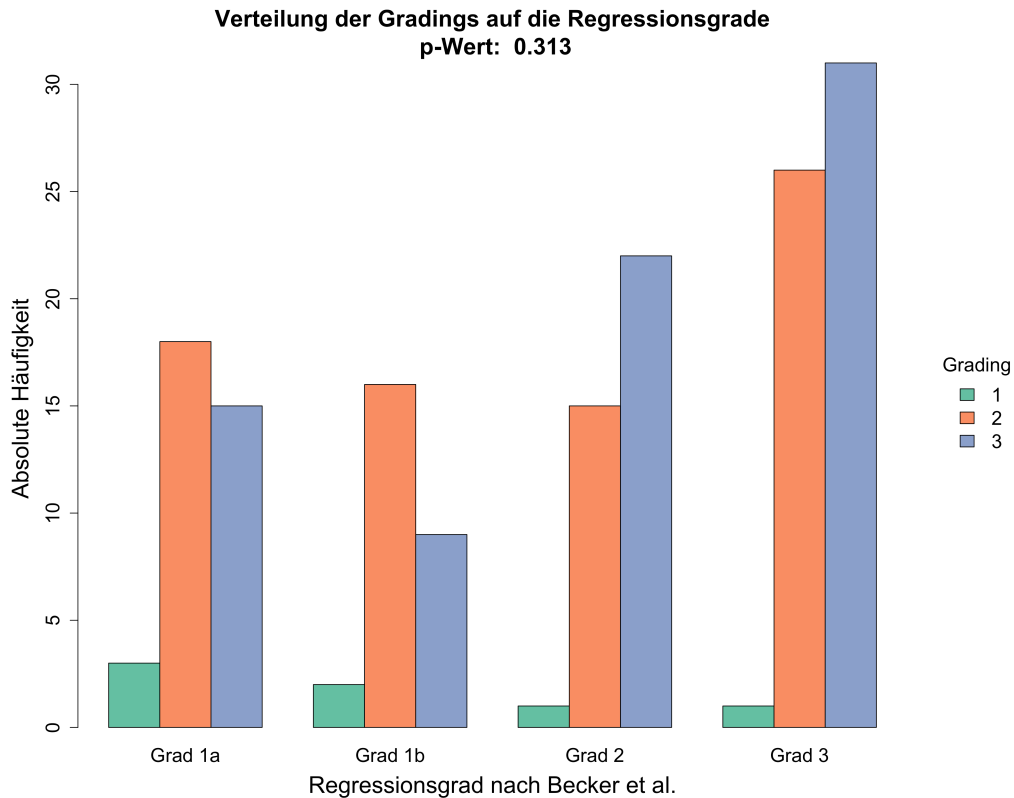
**Abbildung 4-12 Relative Anzahl der Entitäten nach Regressionsgrad Becker et al. (34)**

AC (grün) – Adenokarzinome;

PEC (orange) – Plattenepithelkarzinome;

SRC (violett) – Siegelringzellkarzinome.

Grad 1a- Komplette Regression (22 %); Grad 1b- <10 % Residualtumor (18 %); Grad 2- 10-50 % Residualtumor (24 %); Grad 3- >50 % Resttumorgehalt (36 %). n = 192.



**Abbildung 4-13 Verteilung des Tumorgradings auf die Regressionsgrade nach Becker et al. (34)**

G1 (grün) – gut differenziert: n = 7;  
 G2 (orange) – mäßig differenziert: n = 83;  
 G3 (violett) – schlecht differenziert: n = 86.  
 n = 176, Chi-Quadrat-Test:  $\chi^2(7.09) = 6$ , p = 0.313.

In Abbildung 4-13 sind die absoluten Häufigkeiten der Grading Kategorien (G1, G2, G3) innerhalb der Regressionsgrade nach Becker et al. dargestellt. Karzinome mit guter Differenzierung zeigen eine tendenziell abnehmende Verteilung mit steigendem Regressionsgrad. G2-Tumore verteilen sich nahezu homogen über alle Regressionsgrade. Hervorzuheben ist die überwiegende Verteilung der G3-Tumore auf die Regressionsgrade mit >10 % Resttumorgehalt. Das Ergebnis zeigt sich nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test, p = 0.313).

## 4.3 Cox-Regressionsanalysen

### 4.3.1 Univariate Cox-Regressionsanalysen

Es wurden univariate Cox-Regressionsanalysen in Bezug auf das Überleben in Tagen durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss folgender unabhängiger Parameter auf das Gesamtüberleben mit einbezogen: die Zeitdifferenz zwischen Biopsie- und OP- Präparat in Tagen, der Regressionsgrad, das T-Stadium, M-, N-, L-Klassifikation, das Alter, das Tumorigrad, die Lokalisation, das Organ und das Geschlecht. Das Cox-Proportional-Hazard-Modell wurde dabei nach Tumorentität stratifiziert. Die Hazard Ratio (HR) beschreibt das Risiko des Events „Tod“ zu erleiden.

**Tabelle 4-1 Ergebnisse univariate Cox-Regressionsanalyse**  
HR (Exp(B))– Hazard Ratio, Risiko  
Signifikanz bei Resektionsstatus ( $p = 0,004$ ), T- ( $p = 0,008$ ) und N-Stadium ( $p = 0,021$ )

Parameter	n	p-Wert	HR (Exp(B))	lower95CI	upper95CI
Zeitdifferenz Biopsie & OP	181	0.780	1.000	0.998	1.002
Regressionsgrad	166	0.260	1.141	0.903	1.443
T- Stadium	179	0.008	1.217	1.052	1.408
M- Stadium	91	0.160	1.299	0.901	1.873
N- Stadium	179	0.021	1.206	1.028	1.414
L- Stadium	98	0.101	1.784	0.894	3.560
Resektionsstatus	159	0.004	2.598	1.362	4.958
Alter	181	0.108	1.019	0.996	1.044
Grading	165	0.489	1.181	0.737	1.892
Lokalisation	172	0.544	0.916	0.690	1.216
Organ	181	0.319	1.318	0.766	2.266
Geschlecht	181	0.542	0.831	0.457	1.509

Es konnten mehrere statistisch signifikante Prädiktoren für die Überlebenswahrscheinlichkeit herausgestellt werden. Das T-Stadium erwies sich als Risikofaktor, der bei fortgeschrittenem Stadium mit erhöhter Mortalität assoziiert ist ( $p = 0,008$ , HR = 1.217). Als ungünstig die Prognose beeinflussend sind das N- Stadium ( $p = 0,021$ , HR = 1.206) und der Resektionserfolg ( $p = 0,004$ , HR = 2.598) anzuführen. Die Zeitdifferenz zwischen Biopsie und Operation und die Lymphgefäßinvasion zeigen sich als nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

### 4.3.2 Multivariable Cox-Regressionsanalyse

In der multivariablen Cox-Regressionsanalyse wurden folgende unabhängige Einflussfaktoren auf das Überleben der Patient:innen mit einbezogen: die T- und N- Klassifikation, der Regressionsgrad und der Resektionserfolg. Das Ergebnis ist in Tabelle 4-2 dargestellt. Diese

zeigt anschaulich, dass der Resektionsstatus ( $p < 0.05$ ) und T-Status ( $p < 0.01$ ) des Tumors einen signifikanten Einfluss auf das Überleben ganz unabhängig der Entität haben.

**Tabelle 4-2** Ergebnisse multivariable Cox-Regressionsanalyse  
n = 147, Signifikanz bei Resektionsstatus ( $p = 0.023$ ) und T- Stadium ( $p = 0.007$ )

Parameter	p-Wert	HR (Exp(B))	lower95CI	upper95CI
T-Stadium	0.007	1.293	1.073	1.558
N-Status	0.427	1.082	0.891	1.312
Regressionsgrad	0.084	0.736	0.521	1.041
Resektionsstatus	0.023	2.189	1.113	4.307

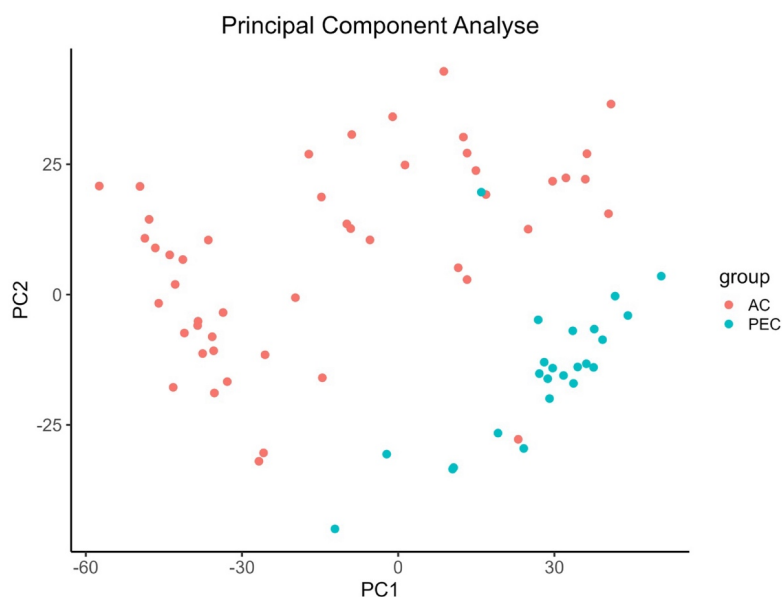
Ein höheres T-Stadium weist auf ein erhöhtes Sterberisiko hin (HR = 1.293), ebenso eine unvollständige Tumoresektion auf ein erhöhtes Risiko für schlechteres Überleben (HR = 2.189). Der Einfluss des Regressionsgrades zeigt sich knapp nicht signifikant ( $p > 0.05$ ).

## 4.4 Auswertung des RNAseq-Datensatzes

Insgesamt wurde im Rahmen des Pilot-Charakters der vorliegenden Studie aus 72 der 192 Biopsieproben RNA isoliert und sequenziert. Dabei entfielen 48 Fälle auf Adenokarzinome und 24 Fälle auf Plattenepithelkarzinome, eine separate Betrachtung von Siegelringzellkarzinomen wurde aufgrund der insgesamt geringen Fallzahlen und damit reduzierter Aussagekraft nicht durchgeführt.

### 4.4.1 Subtypisierung der Entitäten

Es erfolgte zunächst eine unsupervidierte *Principal Component Analysis*. Die Verteilung der Fälle im Koordinatensystem erfolgt dabei auf die am stärksten ausgeprägten Hauptkomponenten, also Eigenschaften, in denen sich die einzelnen Fälle voneinander unterscheiden. Die erste Hauptkomponente besitzt die größte Varianz und ist gegenüber der zweiten Hauptkomponente dargestellt. Einzelne Punkte repräsentieren die untersuchten Fälle aufgeteilt nach Tumorentitäten und ordnen sich unbeeinflusst in Abhängigkeit der eigenen Charakteristika im Raum an. Die ACs weisen innerhalb der eigenen Kohorte eine größere Streuung auf als die PECs. Die Abgrenzung beider Entitäten voneinander zeigt sich deutlich (vgl. Abb. 4-14).



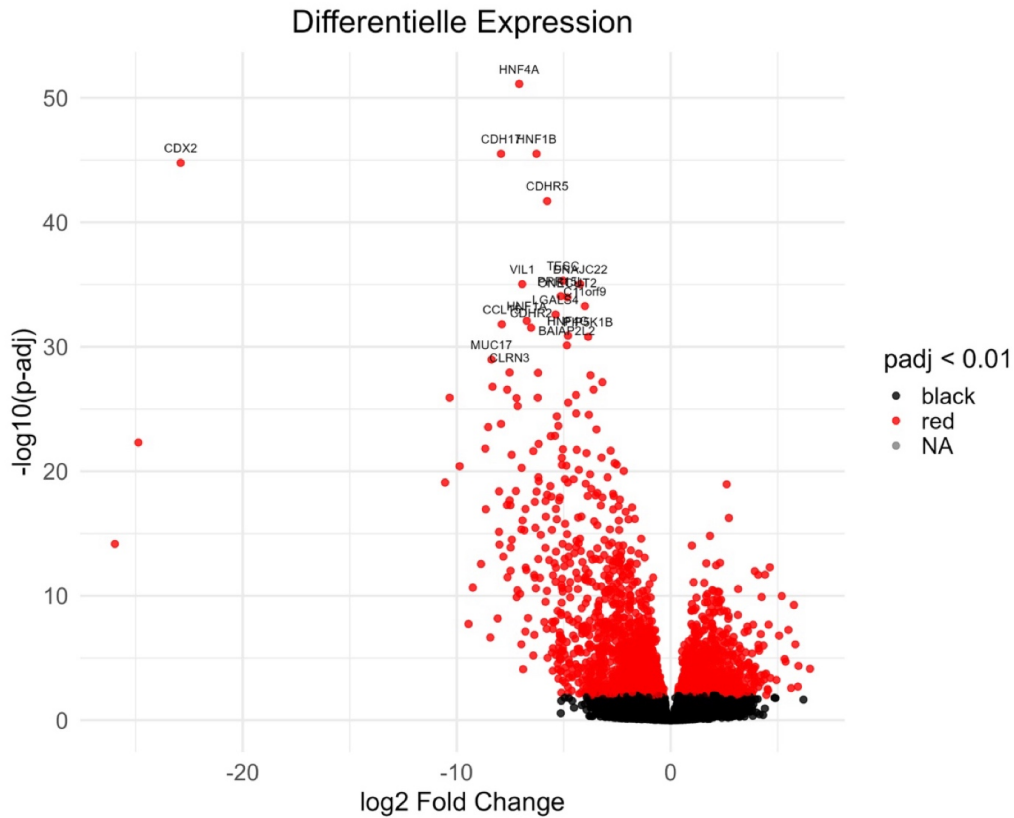
**Abbildung 4-14** *Principal Component Analysis* zwischen ACs (inkl. SRCs) und PECs

AC (rot) – Adenokarzinome inkl. Siegelringzellkarzinome, n = 48;

PEC (türkis) – Plattenepithelkarzinome, n = 24

Interessant war zu dem die Frage, auf Grundlage welcher Gene und deren Expressionslevel der Unterschied zwischen beiden Kohorten basiert. Betrachtet man diese Fragestellung mittels differentieller Genexpression, zeigen sich zahlreiche signifikante Gene (Abb 4.15, rot markiert), die zur Abgrenzung beider Entitäten beitragen. Als besonders signifikant regulierte

Gene sind u. a. *CDX2*, *MUC17* und *CDH17* mit einer vergleichsweise hochsignifikanten Überexpression in ACs erkennbar (vgl. Abb. 4-15).



**Abbildung 4-15** *Volcano Plot* mit differentiell exprimierten Genen des untersuchten Kollektivs  
rot – statistisch signifikante regulierte Gene;  
schwarz – statistisch nicht signifikant regulierte Gene;  
p-adj < 0.01

Die Auftrennung erfolgt entlang der Expression einzelner Gene. Interessant ist jedoch die Verteilung der in Abbildung 4-15 gezeigten ACs und PECs, sodass sich die Betrachtung mittels *Heatmap* anschloss, um ein umfänglicheres Bild des Datensatzes zu gewinnen.

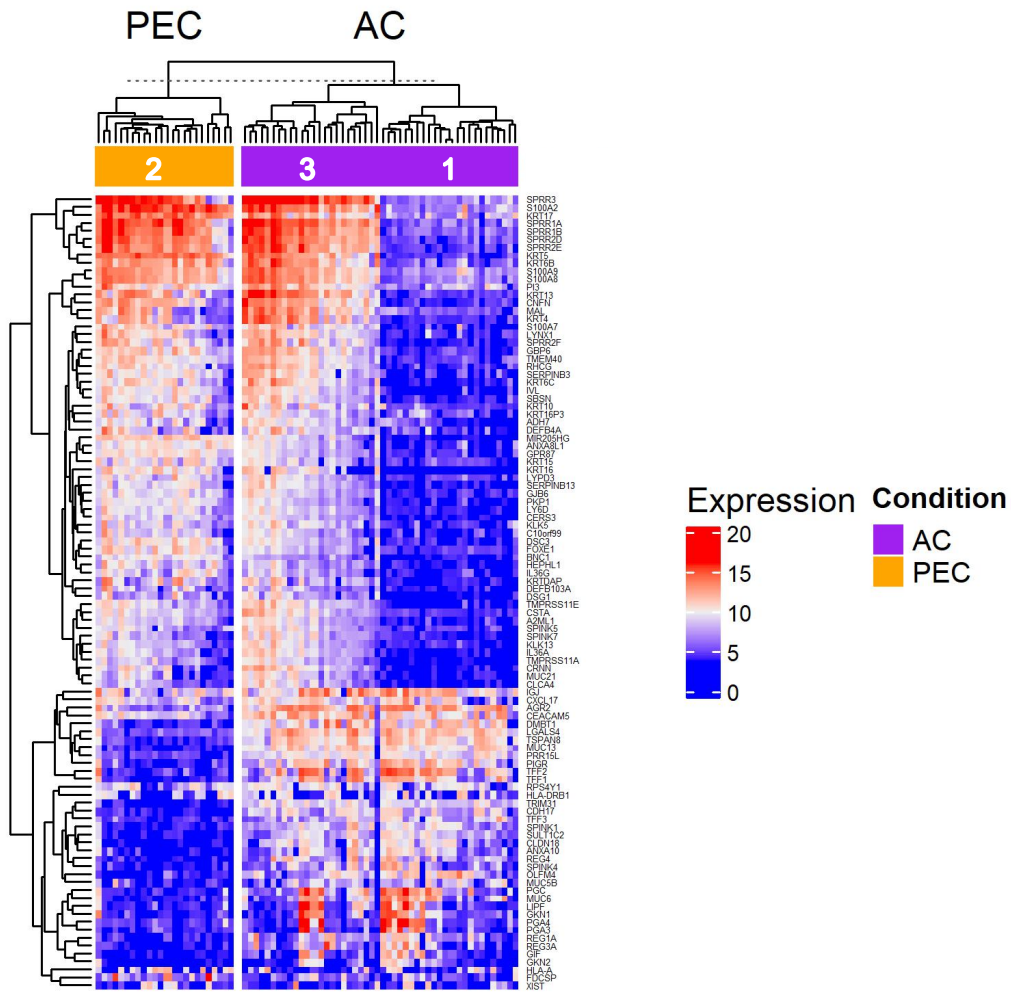
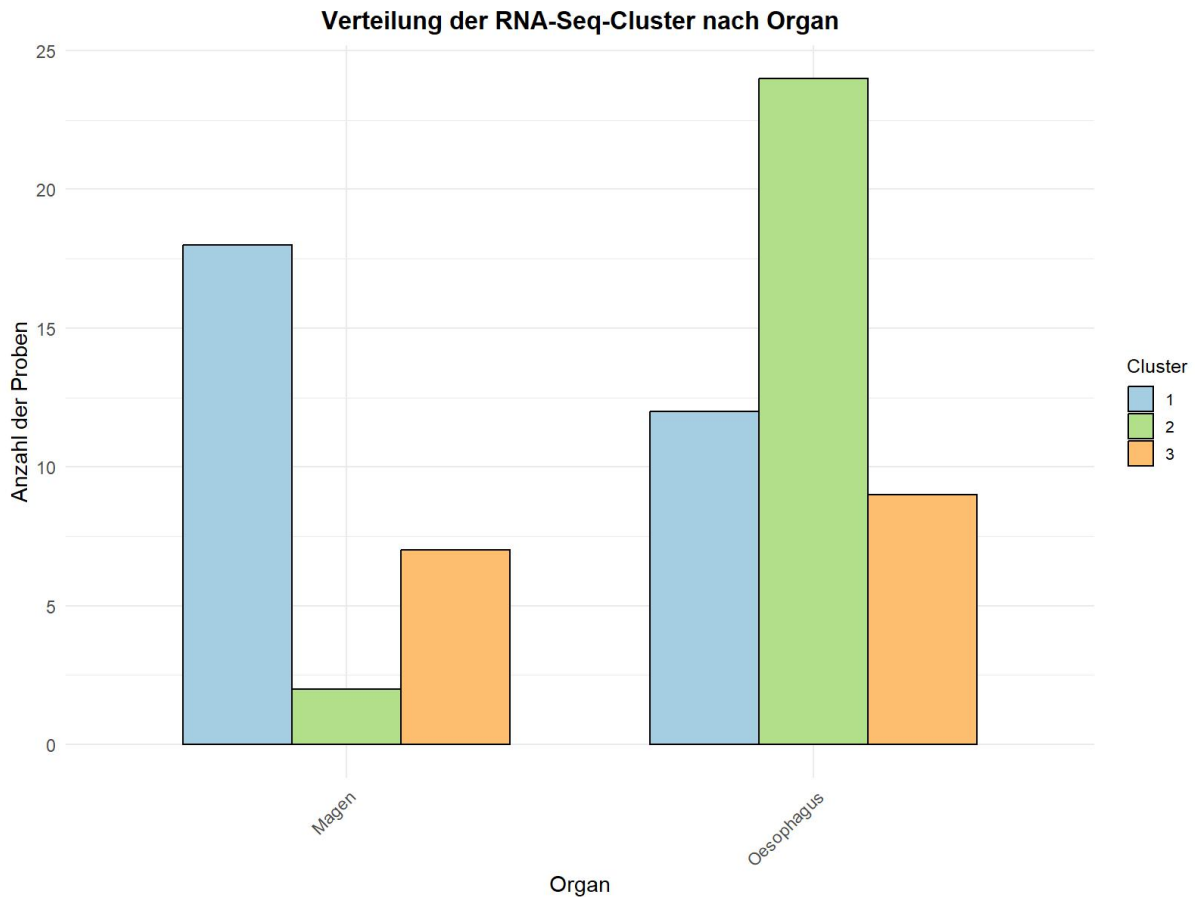


Abbildung 4-16 *Heatmap* der 100 signifikantesten Gene aus der differentiellen Expression zwischen ACs und PECs

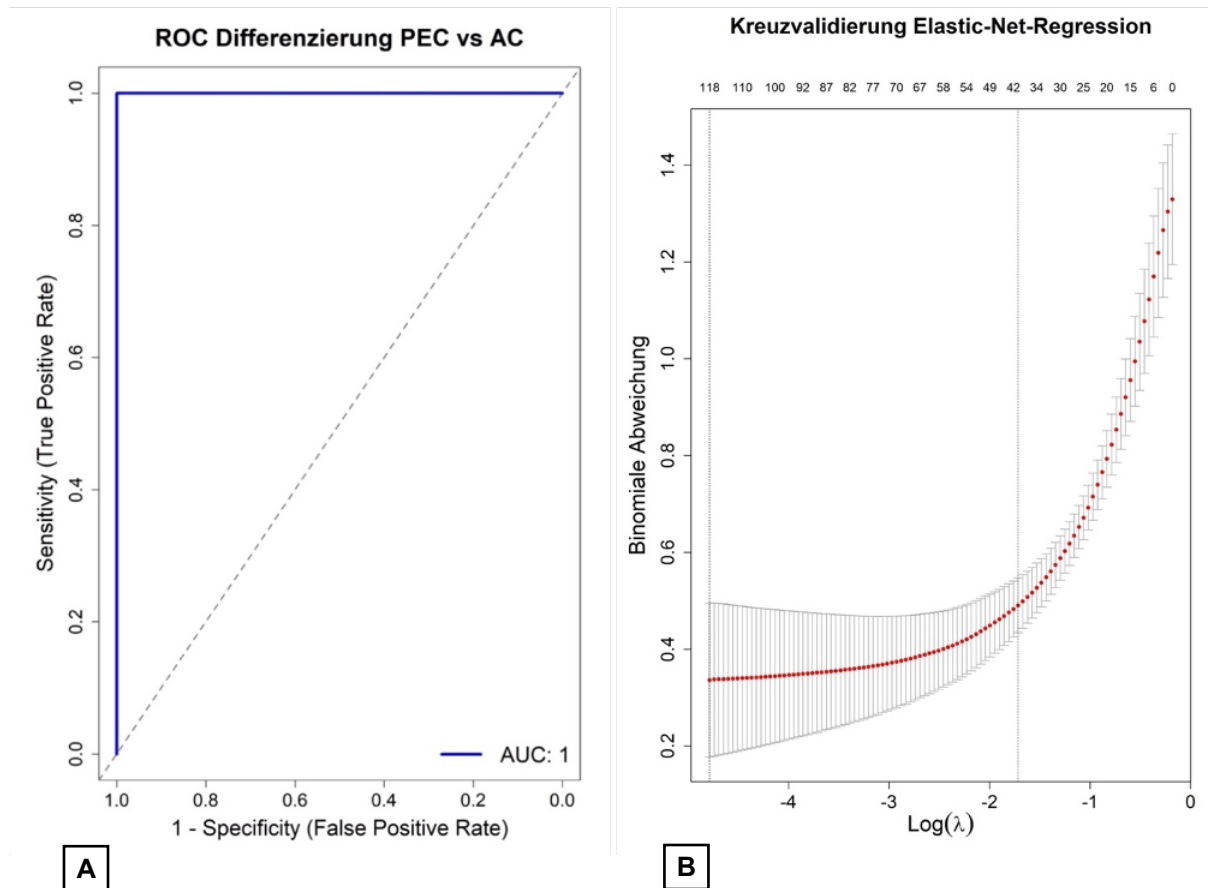
Abbildung 4-16 zeigt eine *Heatmap* die auf einer hierarchischen Clusteranalyse (Ward.D2) und damit einer Transkriptom-basierten Subgruppierung sowohl auf Ebene der Proben als auch auf Ebene der 100 am signifikantesten regulierten Gene beruht. Entsprechend zeigen die Gene eine differentielle Expression in PECs und ACs. Dies weist die Differenzierbarkeit der Tumortypen durch quantitative RNAseq und der beidermaßen *unsupervised* durchgeführten Analyseformen hier durch Clusteranalyse und zuvor durch *Principal Component Analysis* auf.



**Abbildung 4-17** Verteilung RNAseq-Cluster nach Lokalisation der Biopsieprobe

Im Balkendiagramm in Abbildung 4-17 dargestellt ist die RNAseq-Clusterverteilung in absoluten Zahlen aufgeteilt nach Organlokalisierung. Es zeigt sich eine klare organ-spezifische Verteilung der RNAseq-Cluster. Cluster 2 dominiert im Ösophagus im Sinne der zuvor in der *Heatmap* dargestellten Plattenepithelkarzinome (PECs), Cluster 1 erwartungsgemäß mit einem AC-Profil im Magen, Cluster 3 mit einem Mischprofil aus Cluster 1 und 3 (vgl. Abb. 4-16 und 4-17).

Die Ergebnisse stellen klar heraus, dass es mittels RNAseq möglich ist, zwischen den beiden Entitäten ACs vs. PECs zu differenzieren. Um die Differenzierungsfähigkeit der transkriptionellen Analyse zu überprüfen, wurde eine klassische ROC-Kurve generiert und zusätzlich ein *machine-learning* Modell mittels elastischem Netz zur Differenzierung der Tumorentität erstellt (vgl. Abb. 4-18).



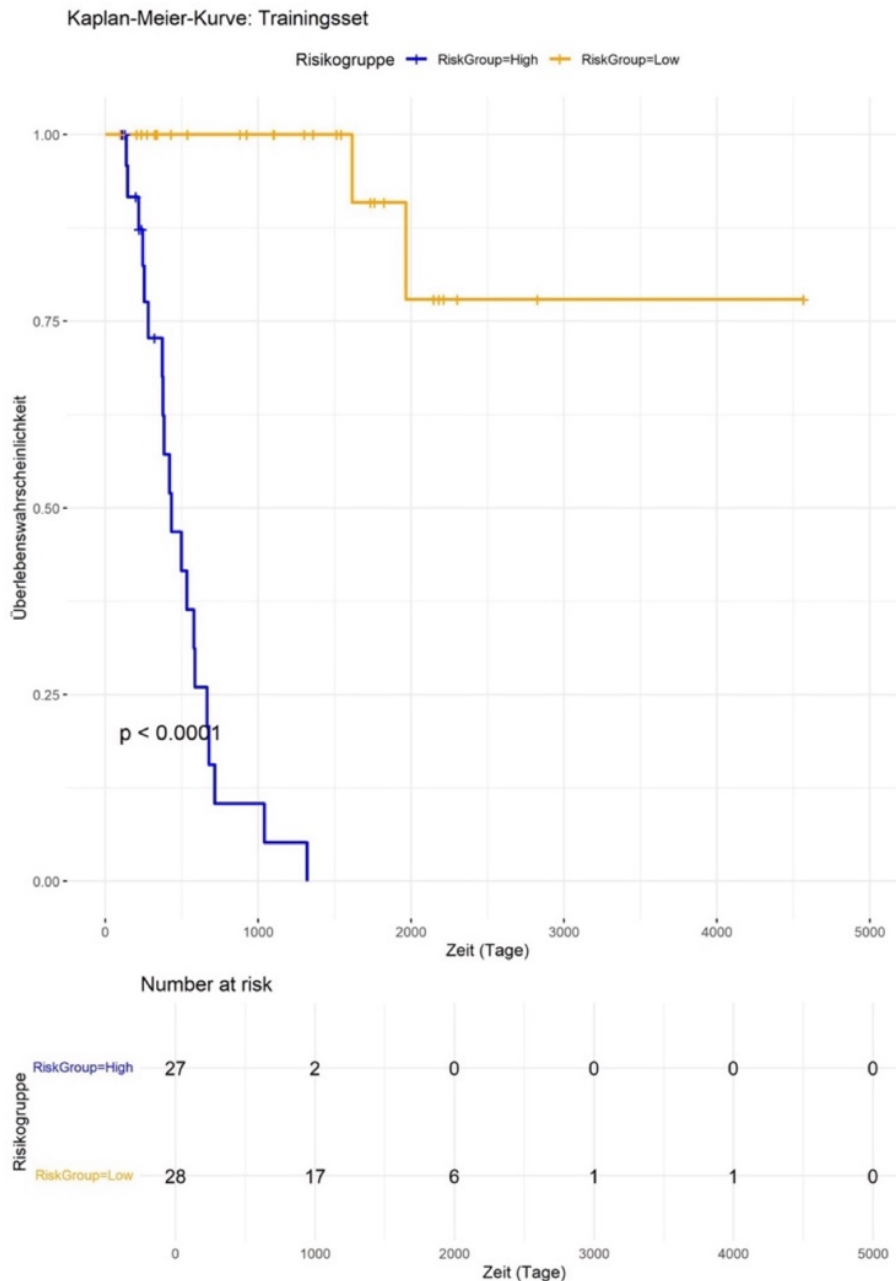
**Abbildung 4-18 ROC-Kurve (A) und Kreuzvalidierung einer elastischen Netz Regressionsanalyse (B) zur Differenzierung der Tumorentität (AC vs. PEC) mittels RNAseq**

Die ROC-Kurve (A) beschreibt eine Möglichkeit der Überprüfung, ob das angewendete Modell (Analyse von exprimierten Genen mittels RNAseq) für die Unterscheidung der Entitäten (AC vs. PEC) geeignet ist. Dabei wird die Spezifität der Testung der Sensitivität gegenübergestellt. In der vorliegenden Exploration fiel das Ergebnis wiederholt auf 1.0. Damit besitzt die durchgeführte Methode eine sehr hohe Trennschärfe, um die beiden Entitäten voneinander zu unterscheiden (vgl. Abb. 4-18).

Beim elastischen Netz handelt sich um ein Modell des maschinellen Lernens, das für eine Anpassung der Merkmalselektion einer durchgeführten Methode benutzt wird. Im konkreten Fall und unter Nutzung einer Kreuzvalidierung basiert die Genauswahl auf den exprimierten Genen in Abhängigkeit der verwendeten Proben und inwiefern sich die durchgeführte Methode (Analyse von exprimierten Genen mittels RNAseq) auf neue Proben reproduzieren lässt. Es dient zur Vermeidung der Überanpassung (*Overfitting*) bei kleinem Datensatz. Im vorliegenden Ergebnis weist es auf die Möglichkeit eines robusten Testmodells hin (vgl. (B) Abb. 4-18).

#### 4.4.2 Prognostische Wertigkeit

Im Vordergrund der klinischen Tätigkeit steht in erster Linie die Prognose für die Patient:innen. Entsprechend schloss sich im nächsten Schritt eine Analyse der RNAseq-Daten auf Ihre prognostische Wertigkeit an.



**Abbildung 4-19 Trainingsset prognostisch relevanter Gene auf Basis von RNAseq-basierter Genexpression (logrank-Test,  $p < 0,0001$ )**

Das in Abbildung 4-19 dargestellte Modell bzw. die extrahierte prognostische Expressionssignatur im Trainingsset zeigt eine deutliche Trennung zwischen den zwei modellierten Risikogruppen in der Kaplan-Meier-Kurve. Die unabhängig im Testset

durchgeführte Vorhersage der Prognose in den zwei modellierten Risikogruppen auf Basis des zuvor im Trainingsset extrahierten prognostischen Expressionssignatur zeigt im kleinen Kollektiv eine Tendenz der Gültigkeit, die hier jedoch als nicht signifikant zu werten ist (logrank-Test,  $p = 0.12$ ).

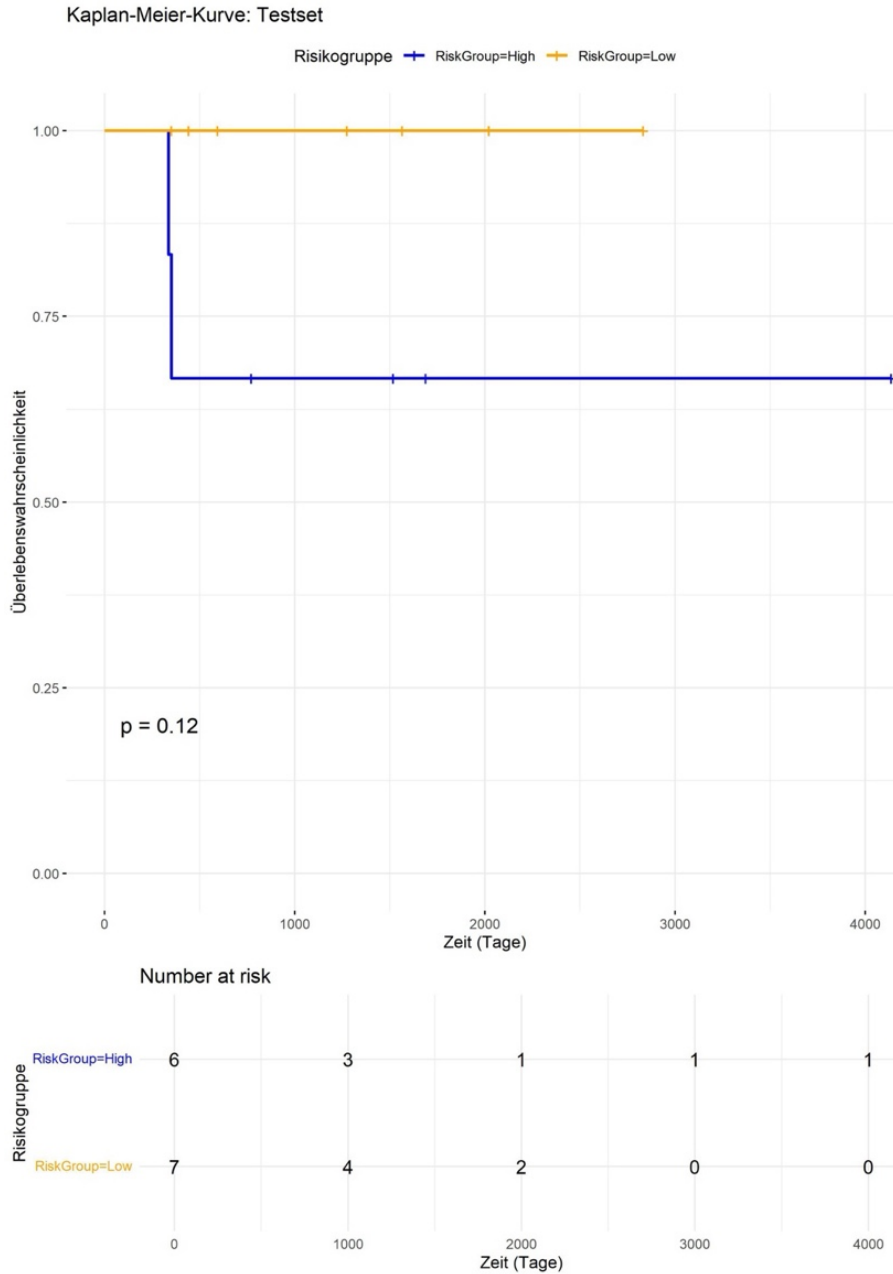
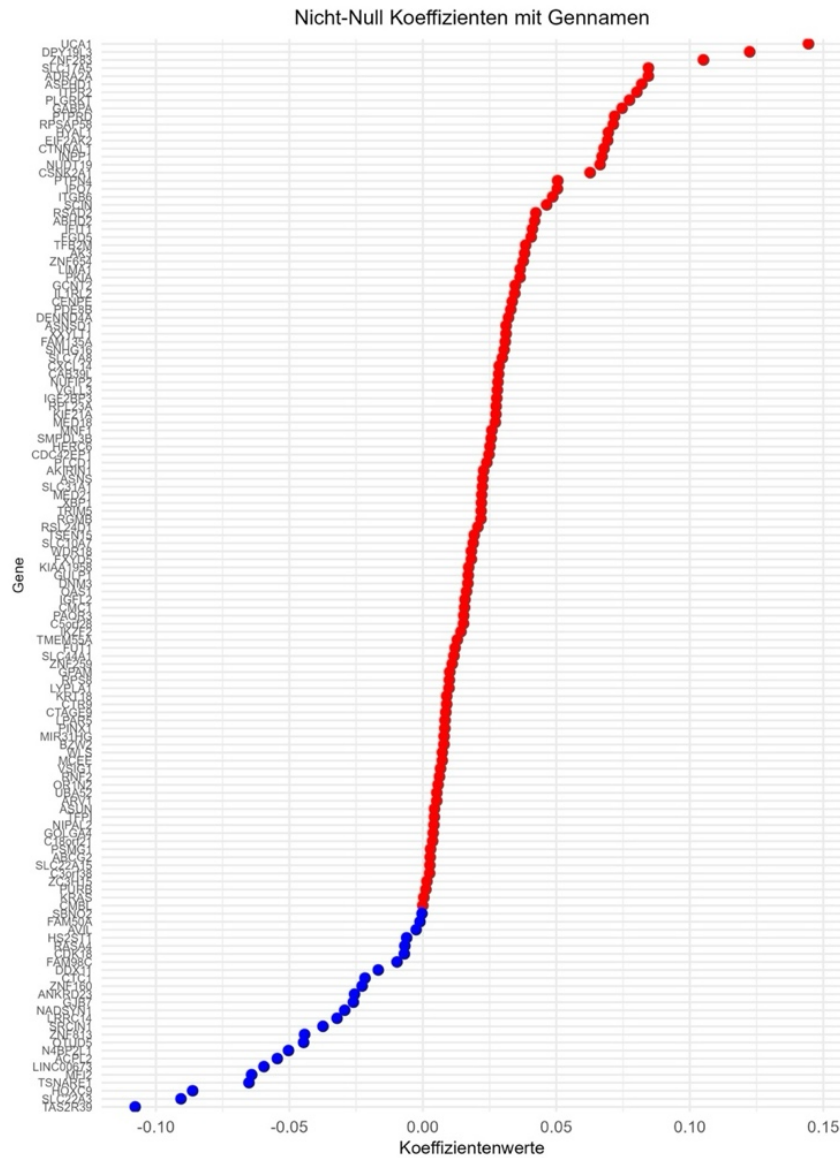


Abbildung 4-20 Analyse der extrahierten prognostischen Expressionssignatur im Testset



**Abbildung 4-21 Nicht-Null-Koeffizienten mit Gen-Namen**

rote Punkte – prognostisch positiven Einfluss, erhöhtes Risiko

blauer Punkt – prognostisch negativer Einfluss, reduziertes Risiko

Basierend auf der standardisierten quantifizierten Expression der Einzelgene zeigen sich die im Model extrahierten und damit relevanten Gene, die das Risikoprofil der prognostischen Wertigkeit beschreiben. Alle abgebildeten Koeffizienten sind dabei wichtig für die Modellprognose. Die Prognose wird von denen mit Rot gekennzeichneten Genen verstärkend beeinflusst und ist mit einem erhöhten Risiko oder schlechteren Prognose für den Krankheitsverlauf assoziiert. Gene mit negativem Koeffizienten zeigen sich hingegen prognostisch verbessernd und deuten damit auf ein reduzierteres Risiko und damit bessere Prognose hin (vgl. Abb. 4-21).

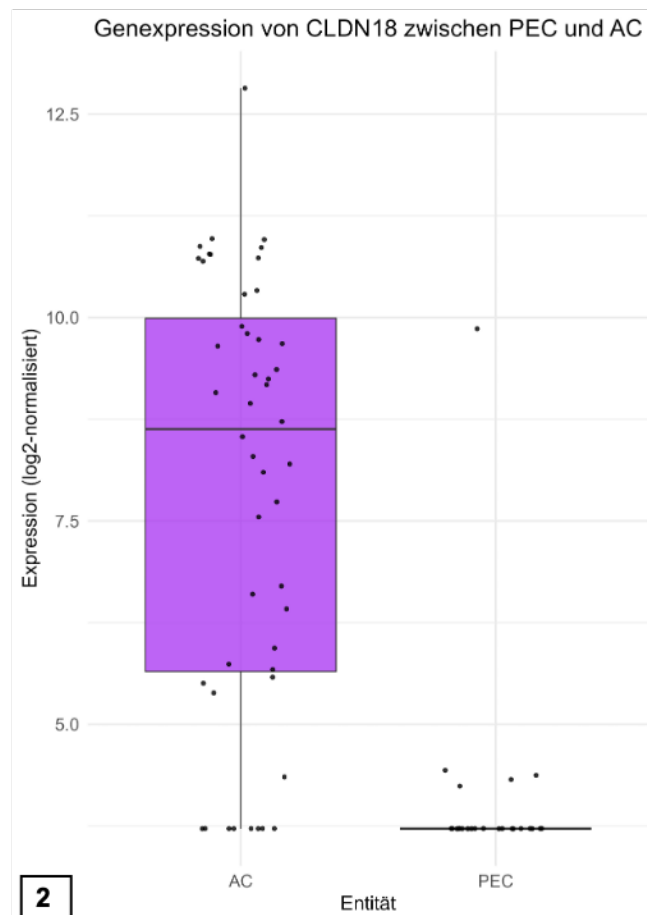
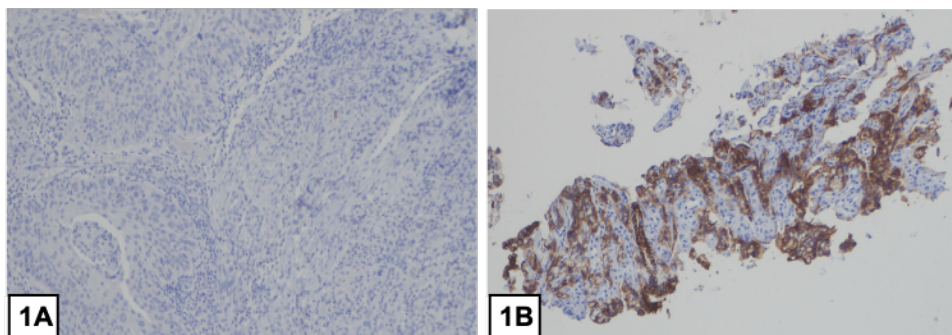
Tabelle 4-3 Exemplarische Auswahl von prognostisch relevanten Genen

Gene	HR	lower95CI	upper95CI	p-value
<i>NRG4</i>	1.825	1.169	2.847	0.008
<i>CTAGE9</i>	2.125	1.215	3.716	0.008
<i>TMED3</i>	1.673	1.046	2.678	0.032
<i>USMG5</i>	1.648	1.043	2.606	0.033
<i>SLC22A3</i>	0.635	0.418	0.966	0.034
<i>KRAS</i>	1.439	1.002	2.068	0.049
<i>MET</i>	1.491	1.002	2.219	0.049

Exemplarisch zeigt Tabelle 4-3 einen kleinen Ausschnitt der prognostisch relevanten Gene aus dem explorierten Kollektiv. Neben bekannten Genen wie etwa *KRAS* und *MET* können weitere signifikante Gene wie *SLC22A3* deutlich herausgestellt werden. Besonderes Augenmerk ist dabei auf die Hazard Ratio zu legen, wobei gerade im vorliegenden Datensatz ein weit über 1 liegender Wert eine hohe Genexpression mit einem massiv erhöhten Risiko für Krankheitsprogression oder Tod einhergeht. Demgegenüber ist bspw. *SLC22A3* (HR = 0.635, p = 0.034) eher als protektiv anzusehen.

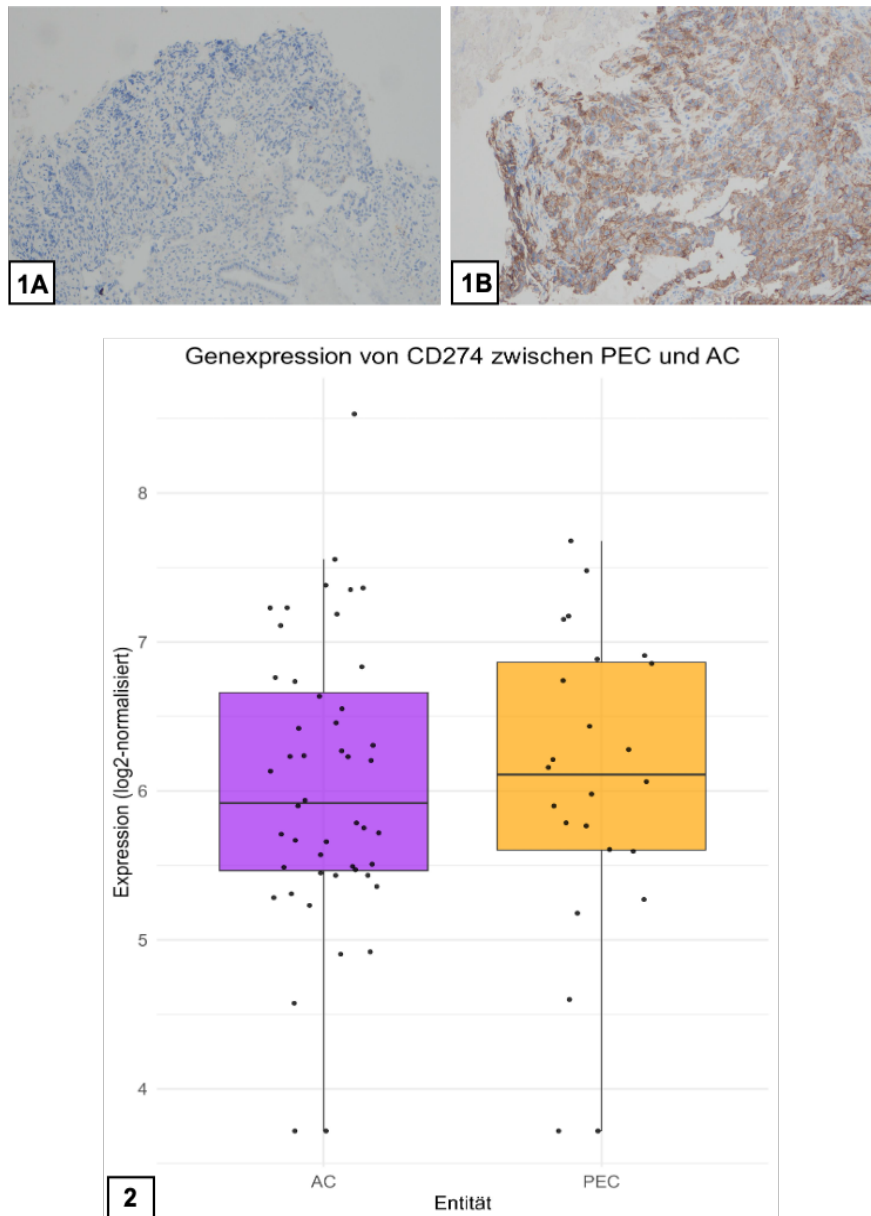
#### 4.4.3 Analyse der prädiktiven Wertigkeit

Im nächsten Schritt galt es die Möglichkeit der prädiktiven Wertigkeit aktuell routinemäßig genutzter Biomarker auf Basis der RNAseq-Daten zu betrachten. Dafür wurden die Biomarker *ERBB2*, *CLDN18*, *CD274* mittels RNAseq bestimmt und zusätzlich mit der etablierten Methode der Immunhistochemie verifiziert. Die Boxplots beschreiben dabei die Genexpression (y-Achse: log<sub>2</sub>-normalisierte Expressionswerte) unterteilt nach Tumorentität (x-Achse: ACs vs. PECs). Je ein Fall pro Biomarker mit niedriger und mit hoher Expression wurden zusätzlich mittels Immunhistochemie analysiert und nachfolgend dargestellt.



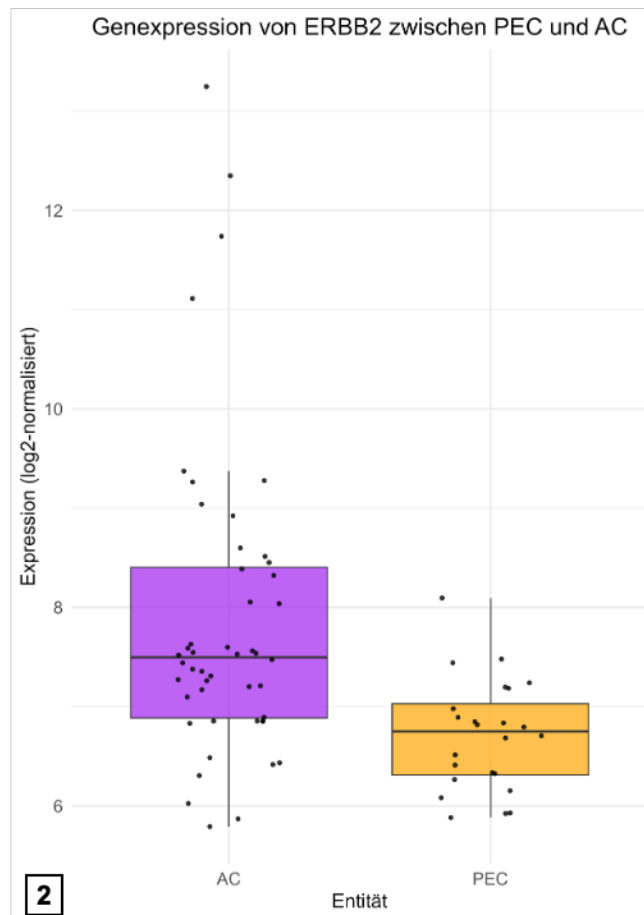
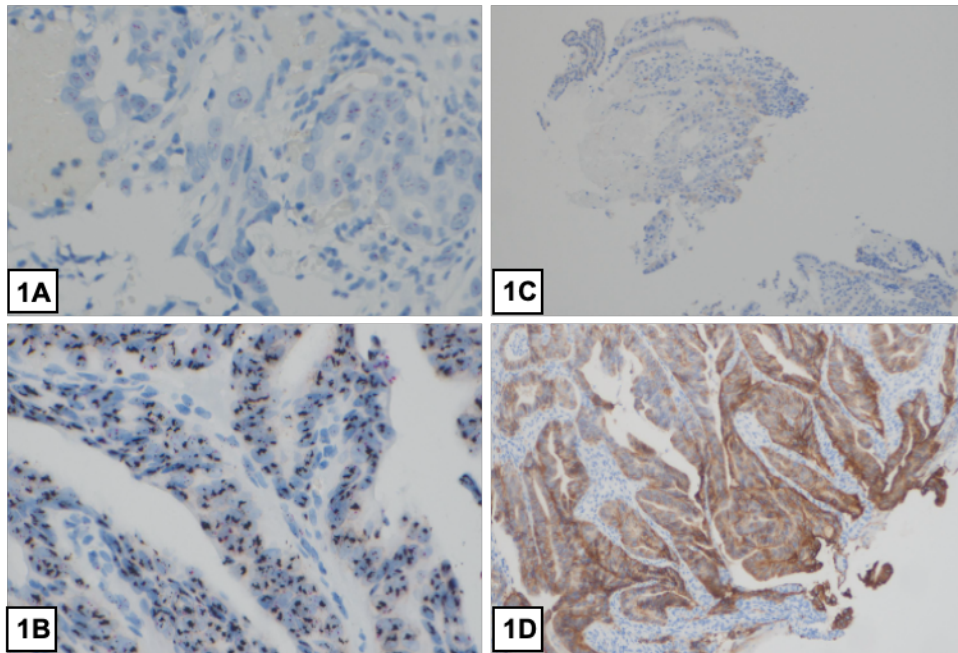
**Abbildung 4-22 Genexpression von *CLDN18* in Adeno- vs. Plattenepithelkarzinomen**  
 1A IHC: Claudin18-2 schwach positiv, B IHC: Claudin18-2 stark positiv (Vergrößerung 400x)  
 2 RNAseq-basierte Expression von *CLDN18* in ACs (violett) und PECs (orange)

Die *CLDN18*-Expression zeigt sich vornehmlich in den ACs, kaum nachweisbar in den PECs. Die Variabilität ist in der Kohorte der Adenokarzinome hoch. Der Unterschied zwischen beiden Entitäten ist klar herausgestellt. Es liegt eine hoch signifikante *CLDN18*-Expression in der Gruppe der ACs vor (vgl. 2, Abb. 4-22). Der immunhistochemische Nachweis von Claudin18.2 zeigt bei hoher *CLDN18*-Expression eine ausgeprägte und spezifische Positivität (vgl. 1B, Abb. 4-22).



**Abbildung 4-23 Genexpression von *CD274* in Adeno- vs. Plattenepithelkarzinomen**  
 1A IHC PD-L1 schwach positiv B IHC PD-L1 stark positiv (Vergrößerung 400x)  
 2 RNAseq-basierte Expression von *CD274* in ACs (violett) und PECs (orange)

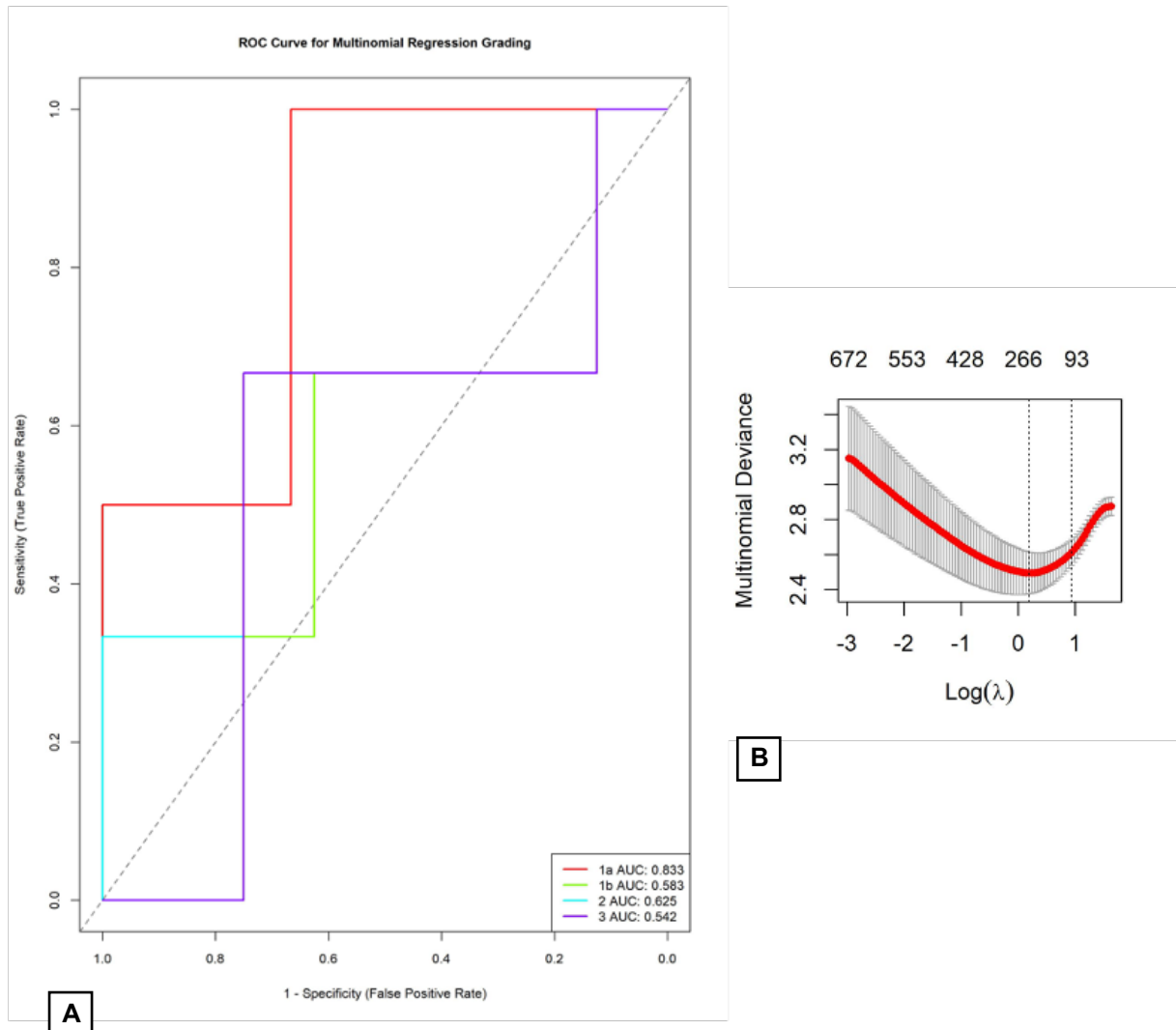
Die Genexpression von *CD274* in ACs vs. PECs ist in Abbildung 4-23 dargestellt. Sowohl PECs als auch ACs weisen eine heterogene und sehr variable *CD274*-Expression auf (vgl. 2). Immunhistochemisch zeigt sich der exemplarische Fall mit hoher Genexpression mit eindeutiger immunhistochemischer PD-L1-Positivität im Vergleich zum negativen Fall (vgl. 1B).



**Abbildung 4-24 Genexpression von *ERBB2* in Adeno- vs. Plattenepithelkarzinomen**  
 1 CISH: von HER2 **A** niedrige Expression **B** hohe Expression (Vergrößerung 50x)  
 IHC: HER2 Positivität **C** schwach **D** stark positiv (Vergrößerung 400x)  
 2 RNAseq-basierte Expression von *ERBB2* in ACs (violett) und PECs (orange)

In Abbildung 4-24 zeigt sich deutlich eine hohe *ERBB2*-Expression in den ACs gegenüber den PECs (vgl. 2). Zusätzlich stechen einige Fälle in der Kohorte der Adenokarzinome heraus, die

eine außerordentlich hohe *ERBB2*-Amplifikation aufweisen. Zur Validierung auf Proteinebene wurde einer der *ERBB2* hoch amplifizierten Fälle immunhistochemisch auf HER2-Expression untersucht (vgl. 1D) und stellt sich HER2 Cluster-amplifiziert (vgl. CISH in (1B)) dar. Im Vergleich dazu wurde ein Fall mit niedriger HER2-Clusteramplifikation (vgl. 1A) und IHC mit niedriger HER2-Positivität (vgl. 1B) dargestellt. Die untersuchten Entitäten weisen klare Unterschiede in der *ERBB2*-Amplifikation auf.



**Abbildung 4-25 ROC-Kurve (A) und Multinomial Deviance (B) für multinominale Regression anhand TRG**

In Abbildung 4-25 ist eine ROC-Kurve des entwickelten multinominalen Regressionsmodells dargestellt. Für Tumore mit Regressionsgrad 1a zeigt sich eine gute Sensitivität und Spezifität (AUC = 0.833) im extrahierten Modell. Für die anderen Regressionsgrade (1b, 2, 3) besteht eine geringere prädiktive Testwertigkeit (vgl. (A) und (B) Abb. 4-25).

## 5 Diskussion

Krebserkrankungen beschreiben weltweit weiterhin eine der führenden Todesursachen. Neoplasien beeinflussen seit Jahrzehnten mit ihren Krankheits- und Nebenwirkungen nicht nur die Patient:innen individuell sondern zeigen hinsichtlich Therapiekosten, Arbeitskraftverlust und Pflegebetreuung der Betroffenen auch eine Herausforderung für die Gesellschaft. Es gilt daher eine Verbesserung der Tumorthherapie anzustreben, da hieraus nicht nur ein persönlicher Nutzen für die Betroffenen, sondern auch in Bezug auf Wirtschaft und Wissenschaft entsteht.

Im Fokus der Tumorforschung der letzten Jahrzehnte steht die personalisierte Therapie. Die zunehmend genauere Untersuchung der Malignome erfolgt dabei nicht nur zur Entitätszuordnung, sondern auch zur individualisierten Therapiegestaltung. Den Biomarkern wird hier eine anwachsende Rolle zugesprochen (77). Im Zuge des Tumorstagings haben diese in fortgeschrittenen Stadien einiger Entitäten routinemäßig Einzug in aktuelle Therapieregime gefunden (78).

Die Erhöhung der *Outcome*-Prädiktion aufgrund vom initialen Biopsiematerial konnte bereits für andere FFPE-Proben wie etwa in einer Arbeit von Rade et al. für Prostatakarzinome gezeigt werden (79). Es liegt demnach Nahe die prädiktive und prognostische Relevanz für Karzinome des oberen Gastrointestinaltraktes ebenfalls nutzen zu können.

Methodisch erweist sich die Bestimmung der Tumorentität mittels Mikroskopie als Goldstandard. Histologische Klassifikationen der Magenkarzinome wie die nach Laurén oder der WHO bieten eine gute Grundlage der Diagnosefindung, reichen jedoch für eine präzise Behandlungsstrategie nur bedingt aus. Die Entwicklung der molekularpathologischen Methoden gewinnt in diesem Kontext immer mehr Bedeutung. Folglich gilt es daher die Reliabilität von molekularpathologischen Methoden wie die Hochdurchsatz-Sequenzierung in die klinische Routine zu integrieren, hierfür die generierten Daten der Expressionsanalytik und ihrer prädiktiven Wertigkeit zu verifizieren.

## 5.1 RNAseq-Daten bieten ungenutztes Potential

Im wachsenden Verständnis der molekulargenetischen Grundlagen stellt sich die Notwendigkeit einer tiefergehenden Analyse der Tumore unmittelbar dar. In den Schritten der Genexpression sind mRNAs ergänzt die Genexpression die routinemäßig fokussiert durchgeführte immunhistochemische Analyse der Proteinexpression, wodurch sie somit direkter vorgelagerte Prozesse wie Transkriptionsfaktoraktivität, epigenetische Regulations- und RNA-Verarbeitungsereignisse widerspiegelt (80). Hansen et al. beschreiben die Möglichkeit des Erkenntnisgewinns mittels RNAseq aus kleinen Proben (81). Die Stimmen aus anderen medizinischen Fachbereichen, die in ihrem Gebiet Sequenzierungen durchführen, bestätigen die Wertigkeit der umfassenden quantitativen Bewertung des Ribonukleinsäuregehaltes im Gewebe und implizieren hier die zukünftigen Chancen für ein besseres Verständnis der Tumorgenetik (82).

Adenokarzinome des Ösophagus und Magens unterscheiden sich in ihrem molekularen Profil (46). Im Jahre 2016 konnten Van der Weyden et. al. mittels Genomanalyse zeigen, dass die Unterschiede zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinome des Ösophagus größer sind als bis dahin vermutet (83). Am vorliegenden Kollektiv ist eine eindeutige Abgrenzung zwischen ACs und PECs mittels RNAseq-Daten möglich. Die Methodik zeigt im relativ kleinen Kollektiv eine 100%ige Testschärfe und spiegelt damit einen perfekten Test wider. Die durchgeführte Hauptkomponentenanalyse zeigt die grundlegende Differenzierbarkeit anhand struktureller Unterschiede im *unsupervised* Ansatz. Die Auftrennung der Tumorentitäten erfolgt hier ohne jegliche weitere Information durch den Untersucher. Es zeigen sich einzelne Fälle in der jeweils anderen Kohorte, die jedoch im *supervised* Ansatz unter Anwendung des elastischen Netzes und damit einer komplexeren Vorgehensweise maschinellen Lernens eindeutig differenziert werden konnten.

Wirft man einen Blick auf die mittels *Heatmap* dargestellt hierarchische Clusteranalyse basierend auf den differentiell exprimierten Genen der Kohorte, so ist anhand der Clusterverteilung der Gene und nach Entität ganz eindrücklich die molekulare Trennung erkennbar. Dies untermauert die Aussagekraft der RNAseq-Daten hinsichtlich der Differenzierungsfähigkeit zwischen den Tumorentitäten.

Besonders interessant zeigt sich die in diesem Kontext der Organlokalisierung gesetzte Clusterverteilung basierend auf den RNAseq-Daten (vgl. Abb. 4-16 und 4-17). In ihrer Publikation aus 2019 beschreiben Suntsova et al. die eindeutige Organzuordnung von Biopsieproben aus gesundem Epithelgewebe mittels RNAseq (84). Betrachtet man die Pathogenese der untersuchten Karzinome, so zeigt sich auch hier eine mögliche eindeutige Zuteilung.

Mittels differentieller Expression gelang entsprechend des eindeutigen Nachweises von signifikant hoch- und runterregulierten Genen und damit eine klare Trennung der Entitäten.

Einzelne hoch signifikante Gene wie *CDX2* und *HFNA4* stachen dabei besonders hervor. *p63* ist mit einer Tumorprogression in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen vergesellschaftet (85). *CDX2* hingegen wird bei hoher Expression in Magenkarzinomen als prognostisch günstig angesehen (86). Interessanterweise handelt es sich insbesondere bei *CDX2* aber auch bei *p63* um Gene, die aus der immunhistochemischen Routinediagnostik bekannt sind. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen sich valide, um PECs und ACs eindeutig voneinander abgrenzen zu können und sollten prospektiv in größeren Kollektiven untersucht werden.

Es stellt sich weitergehend die Frage, ob und inwiefern die RNAseq-Analyse geeignet ist, um prognostische Aussagen treffen zu können. Die univariate Cox-Regressionsanalyse ergab mehrere hunderte signifikant mit dem Überleben assoziierte Gene im *trainings*-Set. Die Modellierung der prognostischen Bedeutung mittels elastischen Netzes auf Basis der Cox-Regressionsanalyse im *trainings*-Set zeigt, dass die Expressionsanalyse ein hochsignifikantes Modell im hier untersuchten, relativ kleinen Kollektiv ableiten kann ( $p < 0.001$ ). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Prädiktoren (Gene) in Ihrer Anzahl viel größer als die zu testenden Proben sind und damit mit einem *Overfitting* zu rechnen ist. Auch wenn dieser Aspekt aufgrund der Größe des Kollektivs nicht abschließend zu beurteilen ist, ist in dem vollständig unabhängigen *test*-Set zumindest eine Tendenz hinsichtlich einer prognostischen Wertigkeit zu erkennen. Entsprechend kann die explorativ angelegte Studie durchaus als positiv für eine weiterführende Untersuchung in einem größeren Kollektiv mit Verifizierung und Beurteilung der Reliabilität und Reproduzierbarkeit angesehen werden.

Exemplarisch wurde das Kollektiv auf die Expression von HER2, Claudin18.2 und PD-L1 hin untersucht. Dabei zeigt sich ebenfalls eine klare Abgrenzung zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen. Die ACs zeigten den PECs gegenüber einen signifikant höheren *ERBB2*-Status. Es konnten einzelne Fälle mit hoher *ERBB2*-Amplifikation dargestellt werden. Der repräsentativ ausgewählte Fall eines HER2-überexprimierenden AC zeigte sich in der CISH eindeutig als Cluster-amplifiziert. Ein mikroskopisch positiver HER2-Score ist definiert als ein Immunhistochemischer SCORE 3+ oder 2+ bei zusätzlich positiver in-situ Hybridisierung (71). Die Häufigkeit der HER2-Überexpression in den Karzinomen des oberen Gastrointestinaltrakts variiert je nach Literatur stark zwischen 4.4 und 53.4% (87, 88). In Magenkarzinomen stellt sich in 10-20% der Fälle eine HER2-Überexpression dar (89). Dabei wird eine höhere Expression in Karzinomen des oesophagogastralen Übergangs als in denen des Magens beobachtet sowie auch eher im intestinalen als im diffusen Typ nach Laurén (71, 90). Die Daten weisen darauf hin, dass RNAseq als ergänzende Methodik zur Bestimmung des HER2-Status eingesetzt werden kann.

PD-L1 gehört mit zu den meist bestimmten prädiktiven Biomarker in unterschiedlichen Tumorentitäten. Die initiale Bestimmung erfolgte mittels IHC. Für alle in der vorliegenden Arbeit betrachteten Entitäten zeigte sich der PD-L1 Combined Positive Score (CPS) als ein

prädiktiver Biomarker für die Immuntherapie (49, 91). Nach den Literaturangaben beläuft sich die PD-L1 Expression in Magenkarzinomen auf 30- 60 % (92, 93) Die Darstellung der Genexpression von *CD274* mittels RNAseq war möglich. Es zeigt eine signifikant hohe Expression in beiden Entitäten. Die aktuelle Herausforderung besteht in der Interpretation des Expressionslevels. CPS, TPS und IC beschreiben die Verteilung der PD-L1 Expression im Schnitt über alle Gewebetypen hinweg. Auch wenn im Fall des CPS eine relativ gute Übereinstimmung zu erwarten ist, muss berücksichtigt werden, dass im Fall von TPS und IC die RNAseq-Analyse nicht aus der extrahierten RNA zwischen Stroma und Tumorzellen zu unterscheiden vermag. Hier bedürfte es einer Einzelzell-RNA-Analyse oder einer räumlich differenzierenden sog. *spatial* Sequenzierung.

Claudin18.2 zeigt sich in der RNA-Sequenzierung eindeutig mit großer Variabilität in den ACs. In der Literatur ist *CLDN18* in etwa 60-70% der Magenkarzinome überexprimiert (6). Eine erhöhte Expression wird dabei mit fortgeschrittenem Tumorstadium und aggressiveren Verlauf assoziiert (94). Die RNAseq-basierte Quantifizierung der prädiktiven Biomarker lies bezüglich Claudin18.2 eine Unterteilung zwischen ACs und PECs zu. Jüngst wurde eine Verlängerung des Gesamtüberlebens in irresektablen fortgeschrittenem Magenkarzinom oder solchen des AEGs durch ein Therapieregime mit FOLFOX in Kombination eines monoklonalen Antikörpers (Zolbetuximab) gegen Claudin18.2. gezeigt (54).

In der durchgeführten univariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich eine signifikante Assoziation des Tumorregressionsgrades und dem Überleben. In Ihrer Publikation aus dem Jahr 2003 beschreiben Becker et al. dies ebenfalls (34). Vorliegend weist die ROC-Kurve zwar eine gute AUC für die Regressionsgrade 1a nach Becker et al. (0.833) auf, nicht jedoch für die anderen 3 Gruppen (vgl. Abb. 4-25). Das Modell der multinominalen Analyse weist hier eine geringe prädiktive Genauigkeit und geringe Trennschärfe auf. Bei sehr kleiner Fallzahl muss hier entsprechend der Situation in Analyse der prognostischen Gensignatur ebenfalls ein *Overfitting* bedacht werden.

## 5.2 Repräsentativität des Kollektivs

Kumagai et al. zeigten an lokal fortgeschrittenen Magenkarzinomen ein 5-JÜ von 45 bis 75 % in Abhängigkeit von der Tumorresponse (95). Mandard et al. beschrieben bereits 1984 ganz unspezifisch einen Zusammenhang zwischen dem Tumorregressionsgrad und der Überlebensrate der Patient:innen (96). Alle hier betrachteten Entitäten zeigen grundsätzlich ein Ansprechen auf neoadjuvante Radio-/Chemotherapie und ein damit verbundenes besseres Überleben (33, 97-99). Eine komplette Regression ist mit einem längeren Überleben assoziiert als eine partielle Regression. Komplette Regressionen der Ösophagus- und Magenkarzinome nach neoadjuvanter Therapie schwanken je nach Literaturangabe zwischen 12,5 und 50 % (34, 100-102). Im Schnitt liegt ein Grad 1a nach Becker et al. bei 30 % der Patient:innen vor (31, 32). In der durchgeführten Analyse reihen sich die Ergebnisse mit rund 20 % bestätigend in die Literatur ein. Kumulativ mit signifikantem Unterschied fand sich vorliegend ein 5-JÜ bei einem Regressionsgrad 1a/1b nach Becker et al. von 60-65 %, wohingegen das 5-JÜ eines TRG 2 um 23 % und eines TRG 3 bei 53 % liegt. Dieser Unterschied könnte einerseits auf einen Stichprobenfehler bei sehr kleinem Kollektiv oder aber auf eine abweichende Therapie der Tumorstadien voneinander zurückzuführen sein. Der durchgeführte logrank-Test und die Kaplan-Meier-Kurve weisen dennoch auf prognostische Signifikanz des Regressionsgrades der Karzinome des oberen Gastrointestinaltrakts hin und bestätigten damit die Literatur.

In der Untersuchung von 48 lokal fortgeschrittenen Magenkarzinomen zeigten Kumagai et al. ein 5-JÜ von 74 % bei guter Tumorresponse auf neoadjuvante Therapie gegenüber einer 45 %igen Überlebenschance bei *Non-Responder* (95) und bestätigten damit unser Ergebnis. In ihrer retrospektiven Analyse von Datensätzen von über 150 Patient:innen beschreiben Qiu et al. ein vergleichendes 1-JÜ in allen Regressionsgraden bei lokal fortgeschrittenem Ösophaguskarzinom von 95 % (31). Das in dieser Arbeit betrachtete Kollektiv umfasst eine ähnliche Fallgruppengröße, sodass hier grundsätzlich eine Vergleichbarkeit angenommen werden kann. TRG-Kohorten übergreifend konnte das 1-JÜ bei über 90 % gezeigt werden, Ösophaguskarzinome allein betrachtet bei über 95 %. Es konnte ein signifikant besseres Ansprechen der PEC's auf neoadjuvante Therapie als das der ACs gezeigt werden. Möglicherweise ist dies auf eine höhere Strahlen- und Chemosensitivität der PECs gegenüber den ACs zurückzuführen (97).

Weiterhin wird die Tumorlokalisierung als prognostisch relevant vorbeschrieben (11, 13). In der Betrachtung der Überlebenszeitanalysen konnte vorliegend kein signifikanter Unterschied zwischen dem Überleben bei Magen- vs. dem Überleben bei Ösophaguskarzinomen dargestellt werden.

D'ugo et al. beschreiben die hohe prognostische Relevanz der R0-Resektion sowohl in der uni- als auch multivariaten Analyse. Die R0-Resektion allein ist als unabhängige Variable für

ein 3-JÜ bei lokal fortgeschrittenem Magenkarzinom zu werten (102). Bestätigt wird dies durch diverse weitere Langzeit- und Kohortenanalysen (36, 101).

Der signifikante Einfluss auf das Patient:innen-*Outcome* bezüglich der Lymphgefäßinvasion wurde vorliegend in der univariaten Cox-Regressionsanalyse ( $p = 0.093$ ) knapp verpasst, ebenso in der Untersuchung der Überlebenswahrscheinlichkeit ( $p = 0.083$ ). Ursächlich könnte die Fallzahl von 98 für diese Fragestellung sein, da diese mutmaßlich zu klein ist. Jedoch konnte in der Vergangenheit die prognostische Relevanz für Adenokarzinome des Magens, des ösophagogastralen Übergangs und auch für die Plattenepithelkarzinome des Ösophagus wiederholt aufgezeigt werden (44, 103, 104).

Initial kam die Idee auf, dass die Zeitdifferenz zwischen dem Zeitpunkt der Biopsie im Bezug zur OP-Präparat-Untersuchung einen signifikanten Einfluss auf den Regressionsgrad der Tumore zeigen könnte. Durchschnittlich lag in der durchgeführten Studie der zeitliche Abstand bei 106 Tagen. In der Literatur zeigen Berger et al. eine durchschnittliche Zeitspanne zwischen Biopsie und Tumorentnahme unter neoadjuvanter Therapie von 43 Tagen (32 bis 319 Tage) (101). Es wird deutlich, dass die Varianz hier sehr stark ausgeprägt ist und sich einer zielführenden Aussagekraft entzieht. Die Untersuchung der Zeitdifferenz erwies sich als nicht signifikant.

Alter, Tumorgrading, -lokalisierung, Organ, Geschlecht und der Metastasierungsstatus zeigten in der durchgeführten univariaten Cox-Regressionsanalyse keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben. Auf eine weitere Diskussion dieser Parameter sei an dieser Stelle verzichtet, da sie vorliegend nicht zur Gesamtaussage beitragen. Es muss jedoch erwähnt werden, dass all diese deskriptiven Faktoren wissenschaftlich bereits gut untersucht sind.

Der Großteil der multivariablen Analysen in der Literatur zeigt einen prognostisch relevanten Einfluss von Regressionsgrad und Lymphknotenstatus in Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs und denen des Magens (105, 106). In der vorliegenden Kollektivbetrachtung konnte zwar in der univariaten Cox-Regressionsanalyse eine Signifikanz für den N- Status ( $p = 0.021$ ) gezeigt werden, nicht jedoch in der multivariablen Analyse ( $p = 0.427$ ). Die Signifikanz für den Einfluss des Regressionsgrades wurde vorliegend knapp verpasst und spricht damit gegen den aktuellen Kenntnisstand (105, 106). Zusätzlich sind die vor allem aus klinischer Sicht bereits vorbekannten signifikanten prognostischen Aspekte des T- Stadiums ( $p = 0.006$ , HR = 1.219) und der R0-Resektion (HR = 2.15) klar herausgestellt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten sich auch hier repräsentativ (102).

### 5.3 Klinische Implikation der Analysen

Die RNAseq in der Routinediagnostik der Magen- und Ösophaguskarzinome zu etablieren erscheint erstrebenswert und stellt durchaus auch einen Mehrwert dar. Unter Berücksichtigung der bislang routinemäßig durchgeführten Diagnostik besitzen die Verfahren der Massensequenzierung einen technologisch ableitbaren unabhängigen Charakter, der durch die hohe Dimensionalität insb. den *unsupervised* Ansatz stärken kann. Entsprechend können diese neuen molekularen Diagnostikmethoden ergänzend angewendet werden, um eine präzisere therapeutisch relevante Typisierung zu erreichen.

Zu den großen Vorteilen der RNAseq-Analyse zählen sicherlich die auch in der vorliegenden Arbeit gut gezeigte hohe Sensitivität des Verfahrens selbst bei limitierendem Biopsiematerial. Der im Vergleich zur Einzelanalyse hervorzuhebende explorative Charakter stellt sich dabei durch die umfassende Analyse aller potentiell möglichen Expressions-Veränderungen dar. Die Entwicklung zielt darauf ab vom Großen ins Kleine zu denken – aus einer großen Anzahl an Genen gilt es zukünftig die richtigen auszuwählen, um im Sinne der Patient:innen die günstigsten Entscheidungen zu treffen.

Ganz klar fehlt jedoch zum aktuellen Zeitpunkt der Umgang mit der Expression der relevanten Biomarker. Die *Cut-off*-Werte eines „positiven Status“ für die mittels Immunhistochemie bestimmten Biomarker sind bereits gut untersucht, die Werte für die quantifizierten Expressionsergebnisse zum aktuellen Zeitpunkt noch gänzlich unbekannt. Hier bedarf es ganz klar groß angelegter Untersuchungen an unterschiedlichen Entitäten, um eine allgemeingültige Aussage treffen zu können.

Die Bestrebungen zielen auf eine zunehmende klinische Einführung der zielgerichteten Therapien ab. Die Spitze der angreifbaren Zielstrukturen bildet der bis hierhin gut untersuchte PD-L1-Rezeptor. Die Phase III Studie KEYNOTE-590 führte Pembrolizumab zusätzlich zur Chemotherapie als First-Line-Therapie ein und zeigte eine signifikante Steigerung der Ansprechrates in fortgeschrittenen Ösophaguskarzinomen. Das progressionsfreie und Gesamtüberleben erwies sich als verlängert (107). Auch in der MATTERHORN Phase III Studie wird die Anwendung von Durvalumab plus FLOT als neoadjuvante Therapie in ACs des ösophagogastralen Übergangs in Hinblick auf den Überlebensvorteil zu einer Chemotherapie allein getestet (108). Demgegenüber fanden einige Studien keinen Benefit darin, einen PD-1 Inhibitor neben der Chemotherapie in ACs des oberen Gastrointestinaltraktes mit niedriger PL-L1 Expression einzusetzen (107, 109). Nach aktuellem Stand beschreiben die Empfehlungen den Einsatz des *Immunecheckpoint*-Inhibitors Nivolumab bzw. Tislelizumab bei PECs unabhängig des PD-L1 Status mindestens als Zweitlinientherapie, sofern dieser nicht als Erstlinie bereits eingesetzt wurde (13, 110).

Dass sich das Überleben von Patient:innen mit HER2-positiven Adenokarzinomen des Magens durch bereits zur neoadjuvanten Radio-/Chemotherapie eingesetzten Immuntherapie

verbessert hatte, wurde wiederholt gezeigt (5, 9). Wie bei allen anderen molekularen Biomarkern bleibt die intra- und intertumorale Heterogenität des Tumors eine Herausforderung. Darüber hinaus kann auch bei initialer zielgerichteter Therapie nicht immer ein Benefit generiert werden (111). Kaito et al. fanden in ihrer auf immunhistochemisch mikroskopischen Untersuchungen basierenden Probenanalyse rund 80 % intratumorale Homogenität bezüglich der HER2-Expression. Letztere war auch mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert, sodass die intratumorale Heterogenität als ein die Prognose verschlechternder Marker gewertet werden kann (112). Ein weiterer gedanklicher Ansatz im ausbleibenden Ansprechen auf die Antikörper-Therapie besteht in einer Änderung im HER2-Signalweg (113, 114). Auch Janjigian et al. sehen im prospektiven genomischen Profiling die Chance, Patient:innen, die von einer Immuntherapie profitierten, zu identifizieren sowie Anleitungsstrategien zur Überwindung von Arzneimittelresistenzen entwickeln zu können (115). Umso interessanter wird auch in diesem Zusammenhang zukünftig die Analyse von RNA-Sequenzierungsdaten sein.

Zu den klaren Vorteilen der Etablierung der RNAseq in der Diagnostik ist zusätzlich die Übertragbarkeit auf andere Bereiche anzuführen. Es wird viel über die Tumordiagnostik gesprochen. Es sei jedoch angemerkt, dass andere Fachbereiche wie etwa die Mikrobiologie oder Infektiologie von einer routinemäßigen Entwicklung ebenfalls profitieren. So nutzen beispielsweise die Kolleg:innen der Rheumatologie RNAseq zum besseren Verständnis der Gen-Gen-Interaktionen und *Outcome*-Prädiktion bei rheumatoider Arthritis (116).

Ferner fehlt es an einer routinemäßigen Unterstützung im Gesundheitssystem. Zwar sinken die Kosten zunehmend für die Anwendung der NGS-Methoden, jedoch müssen diese abrechenbar und der Nutzen bewiesen sein. Dabei gilt es weiter eine adäquate Vergütung und flächendeckende Implementierung anzustreben (77). Betrachtet man die Verhältnismäßigkeit des Aufwandes und der Kosten der RNAseq so könnte man hier Anstoß daran nehmen. Geschätzt kostet die Extraktion und Sequenzierung einer Biopsieprobe rund 100 Euro. Die Immunhistochemie liefert dem gegenüber weniger Information. Außerdem ist der zeitliche Gewinn – parallel – viele RNAseq durchführen zu können ein enormer Fortschritt. Diese Faktoren werden die RNAseq zukünftig noch attraktiver für den Routinebetrieb machen.

Generell stellen sich bei Sequenzierungsanalysen immer die Fragen nach der Handhabung der genetischen Informationen bei vorliegenden Prädispositionen für Krankheiten oder bezüglich des Datenschutzes. Hinzufügend bietet das Generieren der großen Datenmengen bezüglich technischer Voraussetzungen und Speicherung nach wie vor eine Herausforderung (117, 118). Fortführend müssen wir uns auch als klinisch tätige Ärzt:innen mit der Bedeutung und Einordnung der Daten in den Gesamtkontext auseinandersetzen und diese anwendbar machen. Es gilt hier für unsere Patient:innen und deren *Outcome* eine enge Zusammenarbeit zwischen Kolleg:innen der Pathologie und Kliniker:innen zu generieren und langfristig

beizubehalten. Denn der Prozess des Identifizierens, Beheben und Re-Evaluieren hört niemals auf.

#### **5.4 Limitationen der Studie**

Aus vergangenen Forschungen, wie exemplarisch etwa bei der Untersuchung der PD-L1 Expression in Lungenkarzinomen, wissen wir bereits, dass die Expression innerhalb eines Tumors sehr heterogen sein kann (119). Die Publikationen von Alsina et al. (2017) und von Kuwata (2024) beschreiben anschaulich die Herausforderung der intratumoralen Tumorheterogenität bei Magenkarzinomen (120, 121). Die Kolleg:innen um Böger et al. aus Kiel fanden eine falsche Bestimmung des PD-L1 Status bei Abweichung des Biopsates um 2,5mm von der Tumorfläche entfernt. Der wahre Wert kann demnach annähernd nur im oder in unmittelbarer Nähe des Tumorzentrums entfernt bestimmt werden (48). Vorliegende Analysen wurden ausschließlich an einer initialen Tumorbiopsie mit je 200 bis 1000 Tumorzellen je Karzinom durchgeführt. Abschließend kann das Argument der Tumorheterogenität durch die durchgeführte Kollektivexploration weder ausgeräumt noch bestätigt werden.

Interessant ist zudem die von Zou et al. durchgeführte Metaanalyse. Sie beschreibt eine Konversion des Biomarkerstatus zwischen Primärtumor und gepaarten Metastasen in verschiedenen Tumorentitäten. Dabei wurden Konversionen von einem positiven PD-L1 Status zu einem negativen und vice versa unter Therapie beobachtet (122). Dies legt nahe, dass eine alleinige Erhebung des Biomarkerstatus einer ersten Biopsieprobe unter Umständen nicht ausreichend ist, um die prädiktive Wertigkeit abschließend beurteilen und einen verlässlichen individuellen Therapieplan für Patient:innen erstellen zu können.

In ihrer Übersichtsarbeit zeigen Baretton et al. Anforderungen an Biopsieproben am Beispiel der qualitätsgesicherten prädiktiven PD-L1-Testung in Karzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes auf (50). Hierbei werden vor allem unzureichendes Biopsiematerial, Tumorgewebeheterogenität und die damit einhergehende Möglichkeit eines Stichprobenfehlers angeführt. In der logischen Konsequenz stellen sie den Expertenkonsortiumswunsch zur Qualitätssteigerung und Verminderung der fehlerhaften Biomarkerbestimmung durch die Entnahme von mehreren Biopsaten aus verschiedenen zufällig gewählten Arealen des erreichbaren Tumormaterials (50). Dem gegenüber sind klar die klinischen Grenzen anzuführen, da auch eine Biopsieentnahme Risiko behaftet ist. Umso wichtiger ist ein hoher Informationsgehalt des Primärtumors. Die RNAseq-Analyse scheint dies problemlos leisten zu können.

Die für die Analyse gewählten Tumorentitäten erscheinen rückblickend grundsätzlich sinnvoll. Unterstützt wird dies durch die bestehend gleichsame Analyse der Karzinome von Ösophagus, Magen und solche des ösophagogastralen Übergangs in der Literatur. Vorliegend konnte nicht nur in Hinblick auf das Ansprechen auf neoadjuvante Therapie sondern auch bezüglich eines

molekularen Profils relevante Unterschiede zwischen Plattenepithel- und Adenokarzinomen der untersuchten Entitäten gezeigt werden. Es sei jedoch an dieser Stelle erwähnt, dass erst jüngste Entwicklungen das Adenokarzinom des Ösophagogastralen Überganges als eigene Entität abgrenzen. Die vorliegend untersuchten Biopsieproben wurden bis zum Jahre 2018 entnommen. Zu jener Zeit war diese Unterscheidung noch nicht gesetzt und rückblickend nicht mehr vollumfänglich eruiert. Für zukünftige Forschungsfragen sollte daher eine Unterscheidung getroffen werden, zudem nicht zuletzt die vorliegende Exploration mittels RNAseq die Unterschiede der betrachteten Entitäten klar herausstellt.

Die analysierte Stichprobenmenge der vorliegenden Untersuchung kann hinterfragt werden. Es handelt sich gerade bezüglich der RNA-Sequenzierung um eine kleine Kohorte von 72 Fällen. Mit einer Gesamtkohorte von über 192 beschreibt unser Kollektiv eine überschaubare Anzahl an Proben. Die Tests der RNAseq-Analyse zeigen eine Tendenz und sollten in prospektiven Untersuchungen Anwendung finden, um einerseits Generalgültigkeit für eine größere Probenmenge und andererseits die Verlässlichkeit der Analysen zu verifizieren.

Zu bedenken sei die Nutzung von FFPE-Proben. Es könnte hier ein methodenbedingter Nachteil vorliegen. Der direkte Proteinnachweis mittels IHC bei archivarischem Paraffin-eingebettetem Gewebe kann methodisch problematisch sein. Insbesondere bei älteren Paraffinblöcken kann die Intensität der Immunfärbung der Tumormarker beeinträchtigt sein (123). Einige Arbeiten wiesen auch eine Variation in Sensitivität und Spezifität der im Handel befindlichen Antikörper bei Anwendung an Paraffinmaterial auf (124, 125). Äquivalent könnten auch Ribonukleotide anfällig für die Probenalterung sein. Für Glioblastome konnten Esteve-Codina et al. zeigen, dass sich archiviertes FFPE-Material auch für RNAseq-Analysen bei ausreichendem Material eignet (126). Heedegaard et al. verglichen Expressionsprofile in frisch gefrorenen Proben mit gepaarten FFPE-Proben und konnten eine hohe Korrelation der Expressionsprofile darstellen, welche unabhängig der Lagerungsdauer (bis zu 244 Monate) und des Gewebetypen zu werten sind (127). Demnach wird die Validität der erhobenen RNAseq-Daten aus FFPE-Biopsien untermauert.

Ob die Forschungsergebnisse auch auf weitere Tumorentitäten anwendbar sind, bleibt abzuwarten. In Anbetracht der nun mehr rasanten Entwicklung der molekularanalytischen Pathologie, der Erstellung und Auswertbarkeit von großen Datenmengen und der fortschreitenden Entwicklung der künstlichen Intelligenz erscheint eine neue Ära der Diagnostik ihren Weg zu finden.

## 6 Zusammenfassung

Wissenschaftler:innen und Kliniker:innen aus aller Welt arbeiten weiterhin daran, die Prognose für Patient:innen mit Karzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes zu verbessern. Hierbei werden nicht nur Techniken zur früheren Diagnosestellung und Präventivmaßnahmen diskutiert. Man macht sich die rasante Entwicklung der molekularen Analyse unter Zuhilfenahme der Künstlichen Intelligenz und der *Big Data Science* zu Nutze, um eine noch zielgerichtetere Therapie für die betroffenen Patient:innen aufstellen zu können.

Ziel dieser Arbeit war es, den Nutzen der RNAseq zur Tumorcharakterisierung und primärer Diagnosestellung aufzuzeigen. Wir kommen zu dem Konsens, dass die RNAseq aus Biopsieproben des oberen gastrointestinalen Traktes das Potential birgt, um primär in der Diagnostik Anwendung zu finden. Eine Differenzierung zwischen Tumorentitäten anhand der RNAseq-Daten von Biopsieproben ist möglich. Die routinemäßig angewandten mikroskopischen und immunhistochemischen Untersuchungen bleiben unerlässlich, die Ergänzung um RNA- Sequenzierungsdaten sollte jedoch immer erwogen werden. Vor der flächendeckenden Einführung bedarf es weiterer Analysen an größeren und multizentrischen Kollektiven, um belastbarere Diagnostik zu verifizieren und etablieren zu können. Trotz des begrenzten Materials war es möglich bereits herausgestellte Merkmale der Adeno- und Plattenepithelkarzinome des oberen gastrointestinalen Traktes zu verifizieren, typische prädiktive Biomarker zu bestimmen, zu quantifizieren und mittels der bereits etablierten Methoden wie etwa der Immunhistochemie zu bestätigen. Darüber hinaus konnten durch das Aufzeigen signifikant regulierter prognostischer Gene neue Anknüpfungspunkte weiterführender Forschung geschaffen werden. Eine höhere Informationsausbeute aus Biopsien muss zukünftig angestrebt werden. Die RNAseq stellt eine Grundlage für neue Ansatzpunkte der zielgerichteten Therapie dar.

Es liegen noch einige Herausforderungen wie etwa die intra- und intertumorale Heterogenität, die Auswertbarkeit der generierten Daten und die flächendeckende klinische Ein- und Durchführung vor uns. Jedoch ermöglichen Verfahren wie die RNAseq neue Wege die zukünftig einen Mehrwert erbringen können. Im Zuge der rasanten Entwicklungen der KI, dem wachsenden Verständnis für die generierten Analysedaten und die nun auch fortschreitende Etablierung in der Versorgung von Patient:innen macht es notwendig weitere Forschung hierzu voranzutreiben.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Storm T. „Beginn des Endes“: Heiner Wenk; [Available from: <https://bdsae.org/2019/01/28/theodor-storm-und-der-magenkrebs-heiner-wenk/>]. (abgerufen 27.09.2024)
2. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi FE, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.* 2015;16(16):1599-600.
3. Al-Batran SE, Hofheinz RD, Pauligk C, Kopp HG, Haag GM, Luley KB, et al. Histopathological regression after neoadjuvant docetaxel, oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin versus epirubicin, cisplatin, and fluorouracil or capecitabine in patients with resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4-AIO): results from the phase 2 part of a multicentre, open-label, randomised phase 2/3 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(12):1697-708.
4. Eyck BM, van Lanschot JJB, Hulshof M, van der Wilk BJ, Shapiro J, van Hagen P, et al. Ten-Year Outcome of Neoadjuvant Chemoradiotherapy Plus Surgery for Esophageal Cancer: The Randomized Controlled CROSS Trial. *J Clin Oncol.* 2021;39(18):1995-2004.
5. 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.
6. Sahin U, Koslowski M, Dhaene K, Usener D, Brandenburg G, Seitz G, et al. Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development. *Clin Cancer Res.* 2008;14(23):7624-34.
7. Krebs in Deutschland für 2019/2020. RKI. 2023. Report No.: 978-3-89606-323-6.
8. Codipilly DC, Sawas T, Dhaliwal L, Johnson ML, Lansing R, Wang KK, et al. Epidemiology and Outcomes of Young-Onset Esophageal Adenocarcinoma: An Analysis from a Population-Based Database. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2021;30(1):142-9.
9. Bosman F.T. CF, Hruban R.H., Theise N.D. (Eds.). WHO Classification of Tumours Editorial Board. Digestive System tumours. 2019.
10. F Lordick LCM, L Castelo-Branco, G Pentheroudakis, C Sessa and E Smyth, on behalf of the Clinical Practice Guideline author group. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. 2022; ESMO Gastric Cancer Living Guideline, v1.4 September 2024.
11. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus 2023 [AWMF Registriernummer: 021/30L]. Available from: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/oesophaguskarzinom/>. (abgerufen 27.03.2024)
12. Thun M, Linet MS, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D. Cancer epidemiology and prevention: Oxford University Press; 2017.
13. al. Le. Leitlinienreport Ösophaguskarzinom Stand 09/2024 <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/oesophaguskarzinom/@@guideline/html/index.html2024>, (abgerufen 05.10.2024)
14. Milne AN, Carneiro F, O'Morain C, Offerhaus GJ. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. *Hum Genet.* 2009;126(5):615-28.
15. Arnold M, Soerjomataram I, Ferlay J, Forman D. Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012. *Gut.* 2015;64(3):381-7.
16. Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Prz Gastroenterol.* 2019;14(1):26-38.
17. Domper Arnal MJ, Ferrandez Arenas A, Lanás Arbeloa A. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries. *World J Gastroenterol.* 2015;21(26):7933-43.
18. Rustgi AK, El-Serag HB. Esophageal carcinoma. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2499-509.
19. R. Obermannová MA, A. Cervantes, T. Leong, F. Lordick, M. Nilsson, N. C. T. van Grieken, A.

- Vogel & E. C. Smyth, on behalf of the ESMO Guidelines Committee\* Oesophageal cancer: . Oesophageal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. 2022.
20. Wittekind C. TNM Klassifikation maligner Tumore. Wiley-VCH2019.
  21. Nakauchi M, Walch HS, Nussenzweig S, Carr R, Vos E, Berger MF, et al. Genomic Landscape of Adenocarcinomas Across the Gastroesophageal Junction: Moving on from the Siewert Classification. *Ann Surg.* 2024.
  22. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Magenkarzinom 2019 [AWMF Registriernummer: 032/09OL].
  23. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513(7517):202-9.
  24. 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.
  25. Marica CD, Birla R, Marica R, Panaitescu E, Constantinoiu S. Neoadjuvant Radiochemotherapy for Patients with Locally Advanced Esophagogastric Junction Adenocarcinoma. *Chirurgia (Bucur).* 2018;113(2):192-201.
  26. Tischoff I, Tannapfel A. [Regression grading in gastrointestinal tumors]. *Pathologe.* 2012;33(1):53-60.
  27. Al-Batran SE, Homann N, Pauligk C, Goetze TO, Meiler J, Kasper S, et al. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet.* 2019;393(10184):1948-57.
  28. Hoepfner J, Lordick F, Brunner T, Glatz T, Bronsert P, Rothling N, et al. ESOPEC: prospective randomized controlled multicenter phase III trial comparing perioperative chemotherapy (FLOT protocol) to neoadjuvant chemoradiation (CROSS protocol) in patients with adenocarcinoma of the esophagus (NCT02509286). *BMC Cancer.* 2016;16:503.
  29. Lerttanatum N, Tharavej C, Chongpison Y, Sanpavat A. Comparison of tumor regression grading system in locally advanced esophageal squamous cell carcinoma after preoperative radio-chemotherapy to determine the most accurate system predicting prognosis. *J Gastrointest Oncol.* 2019;10(2):276-82.
  30. Langer R, Becker K. Tumor regression grading of gastrointestinal cancers after neoadjuvant therapy. *Virchows Arch.* 2018;472(2):175-86.
  31. Qiu J, Zhang Z, Liu J, Zhao Y, Li Y, Tang Z, et al. Nomograms to predict tumor regression grade (TRG) and ypTNM staging in patients with locally advanced esophageal cancer receiving neoadjuvant therapy. *World J Surg Oncol.* 2024;22(1):198.
  32. Munding J, Ziebarth W, Belyaev O, Uhl W, Tannapfel A. [Histological classification: evaluation of resection specimens of EMR/ESD--response evaluation after neoadjuvant therapy]. *Zentralbl Chir.* 2013;138 Suppl 2:e55-62.
  33. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer.* 1994;73(11):2680-6.
  34. Becker K, Mueller JD, Schulmacher C, Ott K, Fink U, Busch R, et al. Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer.* 2003;98(7):1521-30.
  35. Hermann RM, Horstmann O, Haller F, Perske C, Christiansen H, Hille A, et al. Histomorphological tumor regression grading of esophageal carcinoma after neoadjuvant radiochemotherapy: which score to use? *Dis Esophagus.* 2006;19(5):329-34.
  36. Allum WH, Stenning SP, Bancewicz J, Clark PI, Langley RE. Long-term results of a randomized trial of surgery with or without preoperative chemotherapy in esophageal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(30):5062-7.
  37. Song Y, Li L, Ou Y, Gao Z, Li E, Li X, et al. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer. *Nature.* 2014;509(7498):91-5.

38. Lee J, van Hummelen P, Go C, Palescandolo E, Jang J, Park HY, et al. High-throughput mutation profiling identifies frequent somatic mutations in advanced gastric adenocarcinoma. *PLoS One*. 2012;7(6):e38892.
39. Sukawa Y, Yamamoto H, Noshio K, Kunimoto H, Suzuki H, Adachi Y, et al. Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18(45):6577-86.
40. Sihag S, Nussenzweig SC, Walch HS, Hsu M, Tan KS, Sanchez-Vega F, et al. Next-Generation Sequencing of 487 Esophageal Adenocarcinomas Reveals Independently Prognostic Genomic Driver Alterations and Pathways. *Clin Cancer Res*. 2021;27(12):3491-8.
41. Hoadley KA, Yau C, Hinoue T, Wolf DM, Lazar AJ, Drill E, et al. Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell*. 2018;173(2):291-304 e6.
42. Lin DC, Hao JJ, Nagata Y, Xu L, Shang L, Meng X, et al. Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Genet*. 2014;46(5):467-73.
43. Janjigian YY, Maron SB, Chatila WK, Millang B, Chavan SS, Alterman C, et al. First-line pembrolizumab and trastuzumab in HER2-positive oesophageal, gastric, or gastro-oesophageal junction cancer: an open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(6):821-31.
44. Xie LX, Zhai TT, Yang LP, Yang E, Zhang XH, Chen JY, et al. Lymphangiogenesis and prognostic significance of vascular endothelial growth factor C in gastro-oesophageal junction adenocarcinoma. *Int J Exp Pathol*. 2013;94(1):39-46.
45. Mukherji R, Yin C, Hameed R, Alqahtani AZ, Kulasekaran M, He AR, et al. The current state of molecular profiling in gastrointestinal malignancies. *Biol Direct*. 2022;17(1):15.
46. Subasinghe D, Acott N, Kumarasinghe MP. Predictive Marker: HER2 in Esophageal Adenocarcinoma. *Methods Mol Biol*. 2018;1756:119-34.
47. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):467-77.
48. Boger C, Behrens HM, Mathiak M, Kruger S, Kalthoff H, Rocken C. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget*. 2016;7(17):24269-83.
49. Fuchs CS, Doi T, Jang RW, Muro K, Satoh T, Machado M, et al. Safety and Efficacy of Pembrolizumab Monotherapy in Patients With Previously Treated Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer: Phase 2 Clinical KEYNOTE-059 Trial. *JAMA Oncol*. 2018;4(5):e180013.
50. Baretton GB, Lordick F, Interdisciplinary Expert G, Gaiser T, Hofheinz R, Horst D, et al. Standardized and quality-assured predictive PD-L1 testing in the upper gastrointestinal tract. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023;149(17):16231-8.
51. Lorenzen S, Gotze TO, Thuss-Patience P, Biebl M, Homann N, Schenk M, et al. Perioperative Atezolizumab Plus Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin, and Docetaxel for Resectable Esophagogastric Cancer: Interim Results From the Randomized, Multicenter, Phase II/III DANTE/IKF-s633 Trial. *J Clin Oncol*. 2024;42(4):410-20.
52. Kohlruss M, Grosser B, Krenauer M, Slotta-Huspenina J, Jesinghaus M, Blank S, et al. Prognostic implication of molecular subtypes and response to neoadjuvant chemotherapy in 760 gastric carcinomas: role of Epstein-Barr virus infection and high- and low-microsatellite instability. *J Pathol Clin Res*. 2019;5(4):227-39.
53. Cao W, Xing H, Li Y, Tian W, Song Y, Jiang Z, et al. Claudin18.2 is a novel molecular biomarker for tumor-targeted immunotherapy. *Biomark Res*. 2022;10(1):38.
54. Shitara K, Lordick F, Bang YJ, Enzinger P, Ilson D, Shah MA, et al. Zolbetuximab plus mFOLFOX6 in patients with CLDN18.2-positive, HER2-negative, untreated, locally advanced unresectable or metastatic gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (SPOTLIGHT): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet*. 2023;401(10389):1655-68.
55. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.
56. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembgen LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437(7057):376-80.

57. Deshpande D, Chhugani K, Chang Y, Karlsberg A, Loeffler C, Zhang J, et al. RNA-seq data science: From raw data to effective interpretation. *Front Genet.* 2023;14:997383.
58. Illumina. Workflows for RNA Sequencing. A guide to Illumina solutions for next-generation RNA sequencing applications. 2023 [Available from: <https://emea.illumina.com/techniques/sequencing/rna-sequencing.html>.] (abgerufen 19.12.2024)
59. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods.* 2008;5(7):621-8.
60. Cloonan N, Forrest AR, Kolle G, Gardiner BB, Faulkner GJ, Brown MK, et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nat Methods.* 2008;5(7):613-9.
61. Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science.* 2008;320(5881):1344-9.
62. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc.* 2012;7(3):562-78.
63. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods.* 2017;14(4):417-9.
64. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
65. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990;262(4):56-61, 4-5.
66. Garrett Grolemond HW. Dates and Times Made Easy with lubridate. *Journal of Statistical Software.* 2011;40:1-25.
67. Terry M. Therneau PMG. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model: Springer Verlag, New York; 2000.
68. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York 2016.
69. Neuwirth E. RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. 2022.
70. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10(1):57-63.
71. Bartley AN, Washington MK, Colasacco C, Ventura CB, Ismaila N, Benson AB, 3rd, et al. HER2 Testing and Clinical Decision Making in Gastroesophageal Adenocarcinoma: Guideline From the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 2017;35(4):446-64.
72. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics.* 2012;28(6):882-3.
73. Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics.* 2016;32(18):2847-9.
74. Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *J Stat Softw.* 2010;33(1):1-22.
75. Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* 2016;17:13.
76. Zou H HT. Regularization and variable selection via the elastic net. *J R Stat Soc Series B.* 2005.
77. Pfarr N, K. Specht and W. Weichert. Bestimmung molekularer Biomarker in der Behandlung solider Tumoren. 2017.
78. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(11):845-56.
79. Rade M, Kreuz M, Borkowetz A, Sommer U, Blumert C, Fussel S, et al. A reliable transcriptomic risk-score applicable to formalin-fixed paraffin-embedded biopsies improves outcome prediction in localized prostate cancer. *Mol Med.* 2024;30(1):19.
80. Buccitelli C, Selbach M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat Rev Genet.* 2020;21(10):630-44.

81. Hansen KD, Wu Z, Irizarry RA, Leek JT. Sequencing technology does not eliminate biological variability. *Nat Biotechnol.* 2011;29(7):572-3.
82. Brooks MJ, Rajasimha HK, Roger JE, Swaroop A. Next-generation sequencing facilitates quantitative analysis of wild-type and Nrl(-/-) retinal transcriptomes. *Mol Vis.* 2011;17:3034-54.
83. van der Weyden L, Arends MJ, Campbell AD, Bald T, Wardle-Jones H, Griggs N, et al. Genome-wide in vivo screen identifies novel host regulators of metastatic colonization. *Nature.* 2017;541(7636):233-6.
84. Suntsova M, Gaifullin N, Allina D, Reshetun A, Li X, Mendeleeva L, et al. Atlas of RNA sequencing profiles for normal human tissues. *Sci Data.* 2019;6(1):36.
85. Ye S, Lee KB, Park MH, Lee JS, Kim SM. p63 regulates growth of esophageal squamous carcinoma cells via the Akt signaling pathway. *Int J Oncol.* 2014;44(6):2153-9.
86. Wang XT, Wei WY, Kong FB, Lian C, Luo W, Xiao Q, et al. Prognostic significance of Cdx2 immunohistochemical expression in gastric cancer: a meta-analysis of published literatures. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;31(1):98.
87. He C, Bian XY, Ni XZ, Shen DP, Shen YY, Liu H, et al. Correlation of human epidermal growth factor receptor 2 expression with clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2013;19(14):2171-8.
88. Jorgensen JT, Hersom M. HER2 as a Prognostic Marker in Gastric Cancer - A Systematic Analysis of Data from the Literature. *J Cancer.* 2012;3:137-44.
89. Kim IH. Emerging Targets for Systemic Treatment of Gastric Cancer: HER2 and Beyond. *J Gastric Cancer.* 2024;24(1):29-56.
90. Ajani JA, D'Amico TA, Bentrem DJ, Chao J, Cooke D, Corvera C, et al. Gastric Cancer, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2022;20(2):167-92.
91. Li JB, Lai MY, Lin ZC, Guan WL, Sun YT, Yang J, et al. The optimal threshold of PD-L1 combined positive score to predict the benefit of PD-1 antibody plus chemotherapy for patients with HER2-negative gastric adenocarcinoma: a meta-analysis. *Cancer Immunol Immunother.* 2024;73(7):132.
92. Janjigian YY, Ajani JA, Moehler M, Shen L, Garrido M, Gallardo C, et al. First-Line Nivolumab Plus Chemotherapy for Advanced Gastric, Gastroesophageal Junction, and Esophageal Adenocarcinoma: 3-Year Follow-Up of the Phase III CheckMate 649 Trial. *J Clin Oncol.* 2024;42(17):2012-20.
93. Rha SY, Oh DY, Yanez P, Bai Y, Ryu MH, Lee J, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for HER2-negative advanced gastric cancer (KEYNOTE-859): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2023;24(11):1181-95.
94. Wang C, Wang Y, Chen J, Wang Y, Pang C, Liang C, et al. CLDN18.2 expression and its impact on prognosis and the immune microenvironment in gastric cancer. *BMC Gastroenterol.* 2023;23(1):283.
95. Kumagai K, Ishibashi Y, Yasui A. Effects of preoperative chemotherapy on gastric carcinoma: the relationship between histopathologic response and prognosis. *Clin Ther.* 1995;17(5):936-45.
96. Mandard AM, Marnay J, Gignoux M, Segol P, Blanc L, Ollivier JM, et al. Cancer of the esophagus and associated lesions: detailed pathologic study of 100 esophagectomy specimens. *Hum Pathol.* 1984;15(7):660-9.
97. Stiles BM, Kamel MK, Harrison SW, Rahouma M, Lee B, Nasar A, et al. Neoadjuvant Therapy for Locally Advanced Esophageal Cancer Should Be Targeted to Tumor Histology. *Ann Thorac Surg.* 2019;107(1):187-93.
98. GebSKI V, Burmeister B, Smithers BM, Foo K, Zalcbberg J, Simes J, et al. Survival benefits from neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy in oesophageal carcinoma: a meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2007;8(3):226-34.
99. Faron M, Cheugoua-Zanetsie AM, Thirion P, Nankivell M, Winter K, Cunningham D, et al. Individual patient data meta-analysis of neoadjuvant chemotherapy followed by surgery versus

- upfront surgery for carcinoma of the oesophagus or the gastro-oesophageal junction. *Eur J Cancer*. 2021;157:278-90.
100. Urba SG, Orringer MB, Turrisi A, Iannettoni M, Forastiere A, Strawderman M. Randomized trial of preoperative chemoradiation versus surgery alone in patients with locoregional esophageal carcinoma. *J Clin Oncol*. 2001;19(2):305-13.
101. Berger AC, Farma J, Scott WJ, Freedman G, Weiner L, Cheng JD, et al. Complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal carcinoma is associated with significantly improved survival. *J Clin Oncol*. 2005;23(19):4330-7.
102. D'Ugo D, Persiani R, Rausei S, Biondi A, Vigorita V, Boccia S, et al. Response to neoadjuvant chemotherapy and effects of tumor regression in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2006;32(10):1105-9.
103. Ikeda K, Oki E, Saeki H, Ando K, Morita M, Oda Y, et al. Intratumoral lymphangiogenesis and prognostic significance of VEGFC expression in gastric cancer. *Anticancer Res*. 2014;34(8):3911-5.
104. Schoppmann SF, Jesch B, Zacherl J, Riegler MF, Friedrich J, Birner P. Lymphangiogenesis and lymphovascular invasion diminishes prognosis in esophageal cancer. *Surgery*. 2013;153(4):526-34.
105. Becker K, Langer R, Reim D, Novotny A, Meyer zum Buschenfelde C, Engel J, et al. Significance of histopathological tumor regression after neoadjuvant chemotherapy in gastric adenocarcinomas: a summary of 480 cases. *Ann Surg*. 2011;253(5):934-9.
106. Reim D, Novotny A, Friess H, Slotta-Huspenina J, Weichert W, Ott K, et al. Significance of tumour regression in lymph node metastases of gastric and gastro-oesophageal junction adenocarcinomas. *J Pathol Clin Res*. 2020;6(4):263-72.
107. Sun JM, Shen L, Shah MA, Enzinger P, Adenis A, Doi T, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for first-line treatment of advanced oesophageal cancer (KEYNOTE-590): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet*. 2021;398(10302):759-71.
108. Janjigian YY, Van Cutsem E, Muro K, Wainberg Z, Al-Batran SE, Hyung WJ, et al. MATTERHORN: phase III study of durvalumab plus FLOT chemotherapy in resectable gastric/gastroesophageal junction cancer. *Future Oncol*. 2022;18(20):2465-73.
109. Shitara K, Van Cutsem E, Bang YJ, Fuchs C, Wyrwicz L, Lee KW, et al. Efficacy and Safety of Pembrolizumab or Pembrolizumab Plus Chemotherapy vs Chemotherapy Alone for Patients With First-line, Advanced Gastric Cancer: The KEYNOTE-062 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6(10):1571-80.
110. Kato K, Cho BC, Takahashi M, Okada M, Lin CY, Chin K, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced oesophageal squamous cell carcinoma refractory or intolerant to previous chemotherapy (ATTRACTION-3): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(11):1506-17.
111. Stahl P, Seeschaaf C, Lebok P, Kutup A, Bockhorn M, Izbicki JR, et al. Heterogeneity of amplification of HER2, EGFR, CCND1 and MYC in gastric cancer. *BMC Gastroenterol*. 2015;15:7.
112. Kaito A, Kuwata T, Tokunaga M, Shitara K, Sato R, Akimoto T, et al. HER2 heterogeneity is a poor prognosticator for HER2-positive gastric cancer. *World J Clin Cases*. 2019;7(15):1964-77.
113. Sampera A, Sanchez-Martin FJ, Arpi O, Visa L, Iglesias M, Menendez S, et al. HER-Family Ligands Promote Acquired Resistance to Trastuzumab in Gastric Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2019;18(11):2135-45.
114. Kim ST, Banks KC, Pectasides E, Kim SY, Kim K, Lanman RB, et al. Impact of genomic alterations on lapatinib treatment outcome and cell-free genomic landscape during HER2 therapy in HER2+ gastric cancer patients. *Ann Oncol*. 2018;29(4):1037-48.
115. Janjigian YY, Sanchez-Vega F, Jonsson P, Chatila WK, Hechtman JF, Ku GY, et al. Genetic Predictors of Response to Systemic Therapy in Esophagogastric Cancer. *Cancer Discov*. 2018;8(1):49-58.

116. Sciacca E, Surace AEA, Alaimo S, Pulvirenti A, Rivellese F, Goldmann K, et al. Network analysis of synovial RNA sequencing identifies gene-gene interactions predictive of response in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2022;24(1):166.
117. Pop M, Salzberg SL. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends Genet.* 2008;24(3):142-9.
118. Schatz MC, Langmead B. The DNA Data Deluge: Fast, efficient genome sequencing machines are spewing out more data than geneticists can analyze. *IEEE Spectr.* 2013;50(7):26-33.
119. Kim H, Chung JH. PD-L1 Testing in Non-small Cell Lung Cancer: Past, Present, and Future. *J Pathol Transl Med.* 2019;53(4):199-206.
120. Alsina M, Gullo I, Carneiro F. Intratumoral heterogeneity in gastric cancer: a new challenge to face. *Ann Oncol.* 2017;28(5):912-3.
121. Kuwata T. Molecular classification and intratumoral heterogeneity of gastric adenocarcinoma. *Pathol Int.* 2024;74(6):301-16.
122. Zou Y, Hu X, Zheng S, Yang A, Li X, Tang H, et al. Discordance of immunotherapy response predictive biomarkers between primary lesions and paired metastases in tumours: A systematic review and meta-analysis. *EBioMedicine.* 2021;63:103137.
123. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(15):1054-9.
124. Busmanis I, Feleppa F, Jones A, McGrath KM, Reed R, Collins J, et al. Analysis of cerbB2 expression using a panel of 6 commercially available antibodies. *Pathology.* 1994;26(3):261-7.
125. Press MF, Jones LA, Godolphin W, Edwards CL, Slamon DJ. HER-2/neu oncogene amplification and expression in breast and ovarian cancers. *Prog Clin Biol Res.* 1990;354a:209-21.
126. Esteve-Codina A, Arpi O, Martinez-Garcia M, Pineda E, Mallo M, Gut M, et al. A Comparison of RNA-Seq Results from Paired Formalin-Fixed Paraffin-Embedded and Fresh-Frozen Glioblastoma Tissue Samples. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170632.
127. Hedegaard J, Thorsen K, Lund MK, Hein AM, Hamilton-Dutoit SJ, Vang S, et al. Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue. *PLoS One.* 2014;9(5):e98187.

## 8 Anhang

**Tabelle 8-1 Plattenepithelkarzinome des Ösophagus – klinische Stadieneinteilung nach UICC (20)**

<b>Plattenepithelkarzinome</b>			
<b>UICC- Stadium</b>	<b>Primärtumor</b>	<b>Lymphknoten</b>	<b>Fernmetastasen</b>
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0, N1	M0
II	T2	N0, N1	M0
	T3	N0	M0
III	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
IVA	T4a, T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
IVB	Jedes T	Jedes N	M1

**Tabelle 8-2 Adenokarzinome des Ösophagus – klinische Stadieneinteilung nach UICC (20)**

<b>Adenokarzinome</b>			
<b>UICC- Stadium</b>	<b>Primärtumor</b>	<b>Lymphknoten</b>	<b>Fernmetastasen</b>
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T1	N1	M0
IIB	T2	N0	M0
III	T1	N2	M0
	T2	N1, N2	M0
	T3, T4a	N0, N1	M0
IVA	T4b	N0, N1, N2	M0
	Jedes T	N3	M0
IVB	Jedes T	Jedes N	M1

**Tabelle 8-3 Adenokarzinome des Magens – klinische Stadieneinteilung nach UICC (20)**

<b>UICC- Stadium</b>	<b>Primärtumor</b>	<b>Lymphknoten</b>	<b>Fernmetastasen</b>
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T1, T2	N1, N2, N3	M0
IIB	T3, T4a	N0	M0
III	T3, T4a	N1, N2, N3	M0
IV	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	Jedes N	M

**Tabelle 8-4 Regressionsgrading nach der Japanischen Gesellschaft für Ösophaguserkrankungen (35)**

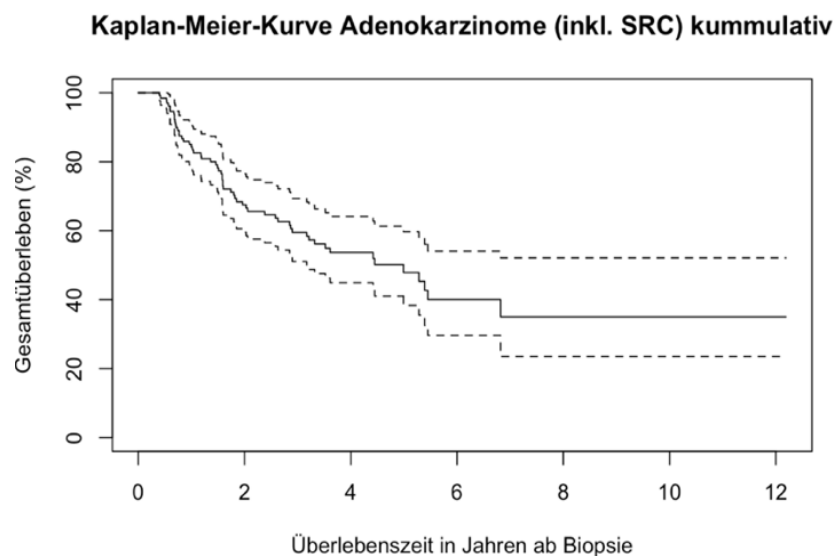
Regressionsgrad	Beschreibung
EF1	Keine oder nur geringe Regression: vitale Tumorzellen mit fehlenden oder geringen degenerativen Veränderungen in mehr als 1/3 des Tumors
EF2	Mäßige Regression: vitale Tumorzellen mit fehlenden oder geringen degenerativen Veränderungen in weniger als 1/3 des Tumors
EF3	Starke Regression, keine vitalen Tumorzellen nachweisbar

**Tabelle 8-5 Regressionsgrading nach der Japanischen Gesellschaft für Magenkarzinome (32)**

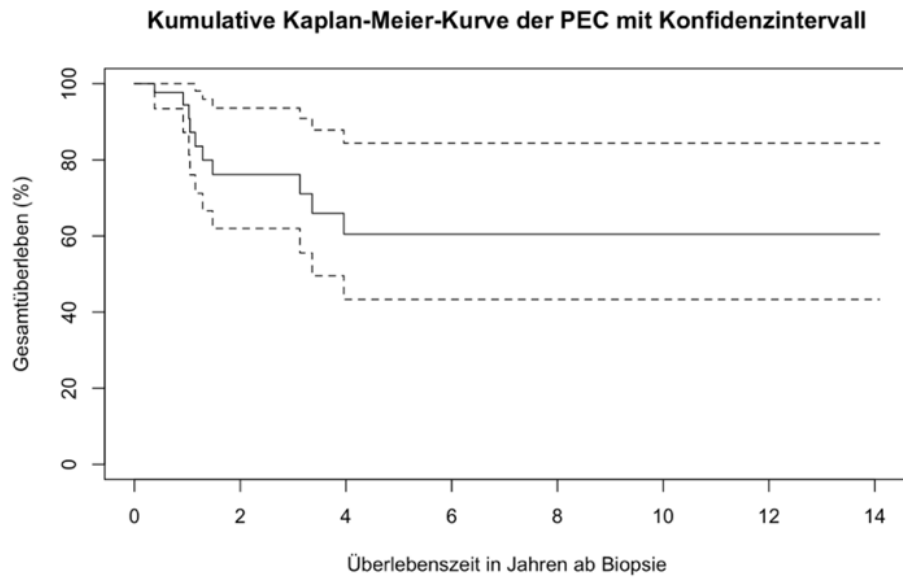
Regressionsgrad	Beschreibung
Grad 0	Keine Regression: Keine Veränderung des Tumors, weder Nekrosen noch zelluläre oder strukturelle Veränderungen
Grad 1	Geringe Regression: Nekrose oder Verschwinden des Tumors oder zelluläre oder strukturelle Veränderungen in weniger als 1/3 des Tumors = 1a, in mehr als 1/3 aber weniger als 2/3 = 1b
Grad 2	Mäßige Regression: Nekrose oder Verschwinden des Tumors in mehr als 2/3, aber noch vitale Tumoranteile erkennbar
Grad 3	Ausgeprägte Regression: Tumor komplett nekrotisch und oder komplett durch eine Fibrose mit oder ohne granulomatöse Veränderungen ersetzt, keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar.

**Tabelle 8-6 Deskriptive Statistik der Zeitdifferenz zwischen Biopsie und Operation für die unterschiedlichen TRG nach Becker et al.**

Becker	n	Mittelwert	Median	Varianz	Standardabweichung	Min.	Max.	95%-KI (untere Grenze)	95%-KI (obere Grenze)
<b>Grad 1a</b>	38	126.37	107	3514.56	59.28	80	351	106.88	145.85
<b>Grad 1b</b>	31	112.03	105	1148.37	33.89	79	267	99.60	124.46
<b>Grad 2</b>	42	112.93	104	1552.17	39.39	70	273	100.65	125.21
<b>Grad 3</b>	62	167.16	108	32438.4	180.10	28	1001	121.42	212.89



**Abbildung 8-1 Kaplan-Meier-Kurve der ACs des Gesamtkollektivs mit Konfidenzintervall (KI)**  
Die Siegelringzellkarzinome sind als histopathologische Teilgruppe der ACs in dieser Abbildung inkludiert.



**Abbildung 8-2** Kaplan-Meier-Kurve der PECs des Gesamtkollektivs mit Konfidenzintervall (KI)

8.1. Vorveröffentlichungen

E-Posterpräsentation beim Deutschen Krebskongress, 21- 24. Februar 2024, City Cube, Berlin

## **9 Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Michelle Schulz