

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. C. Röcken)
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel,
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Untersuchung der tumorbiologischen Bedeutung von VISTA im perioperativ/neoadjuvant behandelten Magenkarzinom

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
GEORG HAUKE SCHOOP
aus Burgwedel

Kiel 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Röcken

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Christiane Pott

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2021

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 30.11.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1	
Tabellenverzeichnis	2	
Abbildungsverzeichnis	3	
1	Einleitung	4
1.1	Das Magenkarzinom	4
1.1.1	Epidemiologie	4
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese	5
1.1.3	Pathologische Klassifikation des Magenkarzinoms	6
1.1.4	Prävention, Diagnostik und Therapie des Magenkarzinoms	9
1.2	Immun-Checkpoint-Regulatoren	11
1.2.1	B7 Membranproteine	11
1.2.2	VISTA	12
1.3	Fragestellung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Kollektiv	15
2.1.2	Geräte	15
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	16
2.1.4	Antikörper	16
2.1.5	Software	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Herstellung der Schnittpräparate	17
2.2.2	Immunhistochemie	17
2.2.3	Mikroskopische Auswertung	19
2.2.4	Genotypische Analyse	20

2.2.5	Statistische Auswertung.....	20
3	Ergebnisse	22
3.1	Mikroskopischer Nachweis von VISTA	22
3.1.1	VISTA im Primärtumor	23
3.1.2	VISTA in regionären Lymphknotenmetastasen	25
3.1.3	VISTA in Fernmetastasen	27
3.2	Korrelationen mit klinisch-pathologischen Charakteristika.....	28
3.2.1	Überlebenszeitanalyse und prognostische Signifikanz.....	30
3.2.2	Assoziation mit genetischen Alterationen	31
3.2.3	Assoziation mit Tumorregression	31
3.2.4	Assoziation mit dem Nachweis von PD-L1.....	32
3.2.5	Vergleich mit therapienaiven Magenkarzinomen	33
4	Diskussion und Interpretation	35
4.1	Rekonstruktion chemotherapeutischer Effekte auf das Vorliegen von VISTA im Magenkarzinom	35
4.1.1	Vergleich der perioperativ/neoadjuvant behandelten Kohorte dieser Arbeit und der Kohorte einer früheren Untersuchung am therapienaiven Magenkarzinome	35
4.1.2	Vergleich der Nachweisfrequenz von VISTA gegenüber therapienaiven Magenkarzinomen	36
4.1.3	Vergleich der Assoziationen mit klinisch-pathologischen Charakteristika gegenüber therapienaiven Magenkarzinomen	38
4.2	VISTA als potenzielles Ziel eines immuntherapeutischen Ansatzes	40
4.2.1	Erhebung des VISTA-Status in Biopsien und Metastasen.....	40
4.2.2	VISTA als Teil einer augmentierten adjuvanten Therapie	41
4.2.3	Kombinierte Anti-Immun-Checkpoint-Regulator Therapie im Magenkarzinom	42

Zusammenfassung.....	46
Literatur	49
Anhang	56
Publikationen	57
Erklärung	58
Danksagung	59

Abkürzungsverzeichnis

H. pylori	Helicobacter pylori
HDGC	Hereditäres diffuses Magenkarzinom
HNPCC	Nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom
EBV	Epstein-Barr-Virus
MSI	Mikrosatelliteninstabil
CIN	Chromosomal instabil
GS	Genomisch stabil
UICC	Unio internationalis contra cancrum
TNM-Klassifikation	Klassifikation maligner Tumoren
T	Status der Primärtumorausdehnung nach TNM-Klassifikation
pT	Durch einen Pathologen erhobener Status der Primärtumorausdehnung nach TNM-Klassifikation
N	Status regionärer Lymphknotenmetastasen nach TNM-Klassifikation
M	Status der Fernmetastasierung nach TNM-Klassifikation
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
ECF	Chemotherapieschema (Epirubicin, Cisplatin und 5-Fluoruracil)
FLOT	Chemotherapieschema (Docetaxel, Oxaliplatin, Fluorouracil)
Her2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2
VEGFR-2	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 2
MET	Mesenchymal-epithelial Translationsfaktor
FGFR-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor 2
APC	Antigenpräsentierende Zellen
CTLA-4	T-Lymphozyten assoziiertes Protein 4 (CD152)
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death 1 Ligand 1</i>
VISTA	<i>V-domain immunoglobulin(Ig)-containing suppressor of T-cell activation (B7-H5, PD1 homolog (PD1H), DD1α, C10orf54 oder Gi24)</i>
PSGL-1	P-Selectin-Glycoprotein-Ligand-1
IRS	Immunreaktivitäts-Score

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms (ICD-O C16).....	7
Tabelle 1.2 UICC-Stadien des Magenkarzinoms.....	8
Tabelle 1.3 Nomenklatur der B7-Membranproteinfamilie.....	12
Tabelle 2.1 Immunreaktivitäts-Score (IRS).....	21
Tabelle 3.1 Vierfeldertafel des VISTA-Status von Tumorzellen des Primärtumors gegenüber Tumorzellen in Lymphknotenmetastasen.....	26
Tabelle 3.2 Nachweis von VISTA in Fernmetastasen mit Vergleich zum Primärtumor.	27
Tabelle 3.3 Korrelation des VISTA-Nachweises in Tumor und Lymphknoten mit klinisch- pathologischen Charakteristika.....	29
Tabelle 3.4 Korrelation des VISTA-Nachweises in Tumor und Lymphknoten mit Parametern der Tumorregression.....	32
Tabelle 3.5 Korrelation des VISTA-Nachweises in Tumor und Lymphknoten mit PD-L1 in Tumor und Lymphknoten.....	33
Tabelle 3.6 Vergleich des Nachweises von VISTA in therapienaiver und neoadjuvant/perioperativ behandelter Kohorte.	34
Anhang Tabelle 1 Korrelation von HER2, MET und MSI mit klinisch-pathologischen Charakteristika und Regression.....	56

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1 Immunhistochemischer Nachweis von VISTA.....	22
Abbildung 3.2 Häufigkeitsverteilung des Nachweises von VISTA in Tumorzellen des Primärtumors.	24
Abbildung 3.3 Häufigkeitsverteilung des Anteils VISTA-positiver Immunzellen an der Gesamtzahl der Immunzellen im Primärtumor.	24
Abbildung 3.4 Verteilung des Anteils VISTA-positiver Immunzellen im Primärtumor nach dem IRS von Tumorzellen im Primärtumor.....	24
Abbildung 3.5 Häufigkeitsverteilung des Nachweises von VISTA in Tumorzellen regionärer Lymphknotenmetastasen.....	26
Abbildung 3.6 Vergleich des VISTA-Nachweises in Primärtumor und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen.....	26
Abbildung 3.7 Anteil der in Tumorzellen positiven Fälle in % gegenüber Stadium nach UICC.	28
Abbildung 3.8 Kaplan-Meier Kurven des Gesamt- und tumorspezifischen Überlebens in Abhängigkeit des VISTA-Satus der Tumorzellen im Primärtumor.	30
Abbildung 3.9 Kaplan-Meier Kurven des Gesamt- und tumorspezifischen Überlebens in Abhängigkeit des Anteils VISTA-positiver Immunzellen im Primärtumor.	30
Abbildung 3.10 Becker-Regressionsgrade.....	31
Abbildung 4.1 Anteile des Nachweises von VISTA in Tumor- und Immunzellen nach Tumorregression als Becker-Regressionsgrad.	38
Abbildung 4.2 Mengendiagramm der Überschneidung von Becker-Regressionsgrad 3 und dem Nachweis von VISTA und PD-L1.	45
Abbildung 4.3 Mengendiagramm der Überschneidungen zwischen PD-L1-, VISTA-, MSI- und EBV-positiven Tumoren.....	45

1 Einleitung

1.1 Das Magenkarzinom

Unter der Überschrift maligner Tumoren des Magens sind mehrere Tumorentitäten zusammengefasst. Das Adenokarzinom ist neben Lymphomen, Sarkomen und anderen Tumoren mit einem Anteil von mehr als 90% der häufigste maligne Tumor des Magens [1]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Adenokarzinome des Magens untersucht. Dem allgemeinen Sprachgebrauch entsprechend werden die Begriffe „Adenokarzinom des Magens“ und „Magenkarzinom“ im Folgenden weitestgehend synonym verwendet.

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit ist das Magenkarzinom mit etwa 783.000 Todesfällen und mehr als einer Millionen Neuerkrankten in 2018 die dritthäufigste tumorbedingte Todesursache und das fünfthäufigste neudiagnostizierte Tumorleiden [2]. Besonders auffällig ist die Abhängigkeit der Prävalenz von Geschlecht, sozioökonomischem Status und geographischer Verteilung. So sind Männer etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen und Menschen in Ländern mit einem geringeren sozioökonomischen Status ebenfalls etwa doppelt so häufig wie Menschen in Ländern mit einem höheren sozioökonomischen Status [2,3]. Eine erhebliche Häufung der Fallzahlen lässt sich außerdem in ostasiatischen Ländern und Osteuropa beobachten [2]. Im globalen Vergleich besonders selten ist das Magenkarzinom hingegen in Nordamerika und Afrika [2]. In Deutschland ist das Magenkarzinom mit 9.632 Sterbefällen und 15.630 Neuerkrankungen im Jahr 2016 auf Platz 5 der Tumorerkrankungen bei Männern und Platz 6 bei Frauen [4,5]. Innerhalb Europas liegt Deutschland mit Neuerkrankungen und Sterbefällen im mittleren Bereich, knapp oberhalb des Durchschnitts. Die niedrigsten Zahlen finden sich dabei in skandinavischen Ländern und die höchsten in den baltischen Staaten [4]. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt in Deutschland geschlechtsunabhängig bei etwa 30% [4]. Zwar hat sich die Zahl der Erkrankten im Vergleich zu 1970 halbiert und die Zahl der Sterbefälle sogar auf ein Drittel reduziert [4], trotzdem stellt das Magenkarzinom noch immer eine der häufigsten Tumorentitäten mit zugleich hoher Sterberate dar.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des Magenkarzinoms ist komplex und multifaktoriell. Umwelt- und Ernährungsfaktoren spielen darin ebenso eine Rolle wie Rauchverhalten, genetische Dispositionen und die Besiedlung des Magens durch das gramnegative mikroaerophile Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) [1,6–8]. Die zuletzt genannte Besiedelung mit *H. pylori* stellt dabei den wichtigsten Einzelfaktor dar und wird weltweit mit etwa 65-80% aller Inzidenzen eines Magenkarzinoms in Verbindung gebracht [9].

Ein Modell der Pathogenese des sporadischen Magenkarzinoms wurde 1988 von Correa beschrieben. Dabei führt eine chronische Gastritis zum Auftreten intestinaler Metaplasien und der Entstehung von Epitheldysplasien bis hin zum Karzinom [10]. Zunächst wurden besonders eine salzhaltige Ernährung und vitaminarme Kost für diese Prozesse verantwortlich gemacht. Nach der Entdeckung von *H. pylori* durch Barry Marshall und Robin Warren wurde das Bakterium bald als Verursacher der chronischen bakteriellen Gastritis identifiziert und in das bereits bestehende Correa-Modell integriert [11,12]. 1994, zwölf Jahre nach der Erstbeschreibung, klassifizierte die *International Agency for Research on Cancer* *H. pylori* als Typ I Karzinogen [13].

Pathogenetisch nutzt *H. pylori* das Enzym Urease um sich mit einem basischen Film vor Magensäure zu schützen und sucht zusätzlich die Nähe zu Mucin-produzierenden Epithelien des Magens [14,15]. Die Freisetzung von Proteasen und anderen zytotoxischen Substanzen stört dabei *tight junctions* und induziert Apoptose in Zellen des Magenepithels [16]. In Abhängigkeit der Lokalisation führt eine Besiedelung mit *H. pylori* zu unterschiedlichen Entzündungsverläufen. So ist die Antrum-prädominante Gastritis mit Magen- und Duodenalulzera nicht mit einem erhöhten Entartungsrisiko assoziiert, während die Korpus-prädominante Gastritis mit Schleimhautatrophien, Hypazidität und Entartungsneigung einhergeht [17]. Weltweit wird von einer Infektionsprävalenz von mehr als 50% ausgegangen [18]. In westlichen Ländern liegt die geschätzte Prävalenz bei etwa 25% [19]. Der Infektionsverlauf ist für 80% der Menschen asymptomatisch und in diesen Fällen nicht mit einem erhöhten Entartungsrisiko assoziiert [20,21]. Dennoch ist bei Nachweis einer Infektion mit einem Lebenszeitrisiko von etwa 1-2% für die Entstehung eines Magenkarzinoms zu rechnen [22,23].

Im Rahmen alimentärer Ursachen fördern besonders geräuchertes und gepökeltes Fleisch, aber auch andere salz-, nitrit- oder nitratreiche Lebensmittel durch proinflammatorische Effekte die Karzinogenese [7,23]. Eine mediterrane Diät scheint hingegen zu einem Rückgang des Krebsrisikos beizutragen [24]. Der Konsum von Tabak erhöht das Lebenszeitrisiko an einem Magenkarzinom zu erkranken zwischen 40% und 82% in Abhängigkeit der Dauer und Intensität der Exposition [6].

Neben den weitaus häufigeren bisher besprochenen sporadischen Magenkarzinomen können auch genetische Faktoren die Entstehung eines Magenkarzinoms begünstigen. Eine positive Familienanamnese ist dabei in 5-10% der Fälle zu beobachten [25]. Für die im engeren Sinne hereditären Magenkarzinome, gelten als bisher sicher identifizierte Ursachen eine Keimbahnmutationen im *CDH1*-Gen für die Gruppe der Magenkarzinomen vom diffusen Typ (HDGC) und Defekte verschiedener DNA-Mismatch-Reparaturgene wie sie beispielsweise im Rahmen des hereditären, nicht-polypösen Kolonkarzinoms (HNPCC) oder anderen hereditären Tumorleiden zu finden sind [26,27].

1.1.3 Pathologische Klassifikation des Magenkarzinoms

Für die Klassifikation der Adenokarzinome des Magens werden verschiedene Schemata angewandt. Das bekannteste und am häufigsten verwendete ist die phänotypische Klassifikation nach Laurén. Diese unterscheidet einen intestinalen Typ gut differenzierter Karzinome von einem diffusen Typ undifferenzierter Karzinome [1]. Als dritte Variante wird ein Mischtyp beschrieben, welcher auf Grund seiner morphologischen Eigenschaften weder dem intestinalen noch diffusen Typ klar zuordnen lässt [1,3]. Epidemiologisch tritt der intestinale Typ mit drüsenartigem Wachstum eher bei Männern und alten Patienten auf, der diffuse Typ mit infiltrativem, diskohäsiven Wachstum und entsprechend schlechterer Prognose hingegen eher bei Frauen und jungen Patienten [3].

Eine ebenfalls morphologische, in dieser Arbeit aber nicht weiter behandelte Klassifikation wird von der WHO vorgeschlagen. Diese unterscheidet tubuläre, papilläre, muzinöse und gering kohäsive Wachstumstypen [28].

Mit Voranschreiten des Verständnisses der Tumorgenetik wird nun auch eine molekulare Klassifikation des Magenkarzinoms vorgeschlagen. So zerfällt das Magenkarzinom nach einer Arbeit des *Cancer Genome Atlas Research Network* in vier genetische Subtypen: Epstein-

Barr-Virus (EBV)-assoziiert, mikrosatelliteninstabil (MSI), chromosomal instabil (CIN) und genomisch stabil (GS) [29]. Hierbei handelt es sich um eine Klassifikation entsprechend der Assoziation dieser Typen mit der Prävalenz tumorgenetischer Eigenschaften wie charakteristischen Genmutationen oder -aktivierungen [29]. Aber auch morphologische Eigenschaften sind in dieser Klassifikation teilweise abgebildet. So ist ein intestinaler Wachstumstyp mit chromosomaler Instabilität und diffuser Wachstumstyp mit genomischer Stabilität assoziiert [29].

Die Klassifikation des Tumorstadiums erfolgt anhand der TNM-Klassifikation der *Unio internationalis contra cancerum* (UICC). Diese wurde zuletzt 2017 in der 8. Auflage herausgegeben [30]. Die Unterteilung erfolgt hierbei nach Eindringtiefe des Primärtumors (T), dem Status regionärer Lymphknoten (N) und dem Vorliegen von Fernmetastasen (M) (Tabelle 1.1) [30]. Durch Kombination dieser Kriterien lassen sich in an der Krankheitskliniken orientierte Stadien von 0 bis IV nach Vorschlag der UICC definieren [30] (Tabelle 1.2).

T - Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der Lamina propria, hochgradige Dysplasie
T1	Tumor infiltriert Lamina propria, Muscularis mucosae oder Submukosa
T1a	Tumor infiltriert Lamina Propria oder Muscularis mucosae
T1b	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Subserosa
T4	Tumor perforiert Serosa (viscerales Peritoneum) oder infiltriert benachbarte Strukturen
T4a	Tumor perforiert Serosa
T4b	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen
N - Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 bis 2 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 3 bis 6 regionären Lymphknoten
N3	Metastasen in 6 oder mehr regionären Lymphknoten
N3a	Metastasen in 7 bis 15 regionären Lymphknoten
N3b	Metastasen in 16 oder mehr regionären Lymphknoten
M - Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1.1 TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms (ICD-O C16). Entsprechend der 8. Auflage TNM: Klassifikation maligner Tumoren [30].

UICC-Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
IIIB	T4b	N0/1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
IIIC	T4b	N2/3	M0
	T4a	N3	M0
IV	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 1.2 UICC-Stadien des Magenkarzinoms. Entsprechend der 8. Auflage TNM: Klassifikation maligner Tumoren [30]. Für eine Erläuterung der Abkürzungen siehe Tabelle 1.1.

1.1.4 Prävention, Diagnostik und Therapie des Magenkarzinoms

Mit einem geringen mittleren 5-Jahres-Überleben von nur etwa 30% hat das Magenkarzinom noch immer eine schlechte Prognose [5]. Besonders Verantwortlich ist die oft fortgeschrittene Tumorinvasion von Stadium T3 bis T4 [5]. Im Folgenden soll die klinische Umsetzung von Prävention, Diagnostik und Therapie dargestellt werden. Eine evidenzbasierte Grundlage bietet hierzu die S3 Leitlinie zu Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs des Leitlinienprogrammes Onkologie [31].

Präventiv konnten sich bisher kaum Optionen in der Klinik bewähren. Der Gebrauch von Medikamenten wie nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) wird nicht empfohlen und auch ein serologisches oder endoskopisches Screening ist nicht angezeigt [31,32]. Als einzige Maßnahme der Prophylaxe ist die medikamentöse Eradikation des kanzerogenen *H. pylori* für Risikopatienten etabliert [31].

In der Primärdiagnostik wird die endoskopische Untersuchung mit Entnahme von mindestens acht Biopsien aus allen verdächtigen Läsionen empfohlen [31]. Anlass für eine solche Diagnostik sind Alarmsymptome wie Dysphagie, rezidivierendes Erbrechen, Inappetenz, Gewichtsverlust und gastrointestinale Blutungen im klinischen Zusammenhang mit dem Verdacht auf ein Karzinom des Magens oder Ösophagus [31].

Auf die Mukosa begrenzte Prozesse können unter Umständen endoskopisch abgetragen werden [31,33]. Als Ergebnis eines fortgeschrittenen Tumorgeschehens ist jedoch oftmals eine radikalere Chirurgie mit Lymphadenektomie und teil- oder vollständiger Gastrektomie erforderlich [31,34].

Eine Chemotherapie soll perioperativ für T3 und resektable T4 Stadien durchgeführt werden und ist bei T2 Stadien in Abhängigkeit der individuellen Gegebenheiten möglich [31]. Erste Evidenz für eine perioperative Chemotherapie lieferte die MAGIC-Studie 2006 mit einer Kombination von Epirubicin, Cisplatin und 5-Fluoruracil (ECF) [35]. Der Ansatz einer neoadjuvanten Radiochemotherapie ist dabei eine gleichermaßen empfehlenswerte Alternative für T3 und T4 Tumoren [31,34]. Beide Ansätze konnten einen Vorteil gegenüber einer rein chirurgischen Therapie zeigen, haben seit ihrer Etablierung jedoch auch einen nur geringen Einfluss auf die Gesamtsterblichkeit des Magenkarzinoms [35,36]. Aktuell wird das ursprüngliche ECF-Schema in Folge der FLOT4-AIO-Studie von 2017 durch eine Kombination

aus Docetaxel, Oxaliplatin und Fluorouracil/Leucovorin (FLOT) abgelöst [37]. Dies spiegelt sich auch in den 2019 aktualisierten Empfehlungen der S3-Leitlinie zur Therapie des Magenkarzinoms wieder, welche eine perioperative/neoadjuvante Therapie mit FLOT ab T2 empfiehlt [31].

Die Therapie mit Antikörpern oder „small molecules“ wird bislang nicht außerhalb klinischer Studien empfohlen [31]. In solchen Studien konnten bisher der anti-Her2/neu (humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2)-Antikörper Trastuzumab und der anti-VEGFR-2 (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 2)-Antikörper Ramucirumab, jeweils in Kombination mit einer Chemotherapie einen Überlebensvorteil für fortgeschrittene Magenkarzinome zeigen [38,39]. Weitere Biomarker mit bislang unklarer klinischer Evidenz sind unter anderem MET (mesenchymal-epithelial Translationsfaktor) und FGFR-2 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor 2) [40].

Tumorimmunologische Eigenschaften und Immunevasionsmechanismen liefern nun viel versprechende und dringlich benötigte neue Ziele in der Therapie des Magenkarzinoms [41].

1.2 Immun-Checkpoint-Regulatoren

Die Gruppe der Immun-Checkpoint-Regulatoren besteht aus Proteinen, welche in der Interaktion von Immunzellen als Kofaktoren die Aktivierung eines Signalweges hemmen oder fördern können [42]. Im Fokus steht hierbei die Interaktion von T-Zellen mit Antigenpräsentierenden Zellen (APC). Tumoren können sich die immunsuppressive Wirkung hemmender Kofaktoren als Mechanismus der Immunevasion zu Nutzen machen und exprimieren diese oft selbst [42,43]. Ein solcher Vorgang wird durch die Ausbildung eines Tumormikromilieus, in welchem sich Nester von Tumorzellen vor einer Immunantwort schützen, verstärkt [44].

1.2.1 B7 Membranproteine

Die B7 Familie ist eine Gruppe membranständiger Proteine mit immunregulatorischer Wirkung als Immun-Checkpoint-Regulatoren [43,45]. Die ersten entdeckten Mitglieder sind B7-1 und B7-2, besser bekannt als CD80 und CD86, welche auf APCs exprimiert werden und abhängig von ihrem Interaktionspartner als Kofaktor bei der T-Zell-Rezeptorinteraktion zur Stimulation oder Hemmung der T-Zell-Aktivierung beitragen [43,45]. Diese möglichen Interaktionspartner sind CD28 für eine Stimulation und das T-Lymphozyten assoziierte Protein 4 (CTLA-4, CD152) oder *Programmed Death 1 Ligand 1* (PD-L1) für eine Inhibition [43,46]. Weiterer Interaktionspartner von PD-L1 ist *Programmed Cell Death Protein 1* (PD-1), welches Apoptose in T-Helferzellen induziert [43,45]. Das vierte Protein vom B7-Typ ist der Induzierbare T-Zell Kostimulator Ligand (ICOS-L) [43]. Erst kürzlich sind fünf weitere Proteine der B7 Gruppe identifiziert worden. Diese sind B7-H3, B7-H4 (VTCN1), B7-H5 (VISTA), B7-H6 (NCR3LG1) und B7-H7 (HHLA2) [45] (Tabelle 1.3).

Für viele der B7-Familienmitglieder konnte bereits eine tumorbiologische Relevanz gezeigt werden [45]. Eine Überexpression von PD-L1 ist beispielsweise besonders in den molekularen Gruppen der EBV- und MSI-assoziierten Magenkarzinome zu beobachten [47].

Als Zielstrukturen mit klinischer Relevanz sind beispielsweise Inhibitoren von PD-1 oder kombiniert von PD-1 und CTLA-4 im Melanom und Inhibitoren von PD-L1 im Lungenkarzinom nach den jeweiligen S3-Leitlinien etabliert [48,49].

In Zukunft gilt es besonders die Relevanz von Immun-Checkpoint-Regulatoren als Immunevasionsmechanismen verschiedener Tumoren zu verstehen, betroffene Patienten zu identifizieren und diese einer geeigneten gezielten Therapie zuzuführen.

Nomenklatur der B7-Familie	Alternativer Name
B7-1	CD80
B7-2	CD86
B7-DC	PD-L2
B7-H1	PD-L1
B7-H2	ICOS-L
B7-H3	CD276
B7-H4	VTCN1
B7-H5	VISTA
B7-H6	NCR3LG1
B7-H7	HHLA2

Tabelle 1.3 Nomenklatur der B7-Membranproteinfamilie. Nach Collins et al. [43] und Ni et al. [45].

1.2.2 VISTA

V-domain immunoglobulin(Ig)-containing suppressor of T-cell activation (VISTA), auch bekannt unter den alternativen Namen B7-H5, PD1 homolog (PD1H), DD1 α , Gi24 oder dem Namen des Gens *Dies1* (C10orf54), ist Mitglied der B7 Familie der Immun-Checkpoint-Regulatoren [50,51]. Nach aktuellem Kenntnisstand ist für VISTA sowohl die Interaktion mit dem Liganden VSIG-3 und dem P-Selectin-Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), als auch die Funktion als homophiler Rezeptor beschrieben [52–54].

Regulär wird VISTA als Typ I Membranprotein auf hämatopoetischen Zellen, wie Granulozyten, T-Zellen und myeloischen Zellen exprimiert [55]. Aber auch embryonale Epithelien zeigen eine Expression im Stammzellstadium mit zunehmendem Verlust im Verlauf der epithelialen Differenzierung [52]. In diesem Zusammenhang ist auch die Aktivierung des Gens über den BMP-Signalweg beschrieben [52]. Außerdem besitzt VISTA eine P53-Bindungsstelle im Promotor und begünstigt durch Expression im Rahmen der Apoptose die Interaktion und Phagozytose von Zellen durch Makrophagen [56]. Die verminderte Expression von VISTA hingegen bewirkt ein negatives Feedback im BMP-Signalweg über BMP4-assoziierte Aktivierung von miR-125a-5p und die Methylierung des Promotors [52].

Im erwachsenen Menschen sind die immunregulatorischen Aufgaben von VISTA vordringlich relevant. Hier gilt eine allgemein immunrestriktive Wirkung, weshalb VISTA wie PD-L1 und CTLA-4 zu den Immun-Checkpoint-Inhibitoren gerechnet wird [52,57]. Im speziellen ist eine Expression auf APCs, naiven T-Zellen und regulatorischen T-Zellen zu beobachten. In der Interaktion von APCs und naiven T-Zellen führt eine gleichzeitige Interaktion über VISTA zur Hemmung der T-Zelle und zur Aktivierung der Differenzierung in Richtung regulatorischer T-Zelle [58,59]. Auf einer regulatorischen T-Zelle führt eine Interaktion über VISTA zu einer Aktivierung der Zelle [59]. So fördert jede Interaktion über VISTA eine Selbstrestriktion des Immunsystems.

Ein Forschungsgebiet zu VISTA liegt in der Entzündungsmedizin. Hier wird besonders die Rolle in inflammatorischen Prozessen wie der Arthritis und Th2-vermittelten Allergien untersucht [60–62]. Dabei sind bereits mehrere Ansätze mit VISTA-Agonisten in Entwicklung, um dessen immunregulatorische Wirkung zu nutzen [63].

In der onkologischen Forschung sind die Prozesse der Immunevasion unter Beteiligung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie VISTA relevant. Im Mausmodell ist der durch VISTA vermittelte Signalweg zu denen von PD-1 und anderen Mitgliedern der B7 Familie vermittelten Signalwegen redundanzfrei [64]. Diese Eigenschaft macht eine VISTA-Blockade besonders attraktiv als Kombinationspartner mit klinisch erprobten PD-1-Blockern oder als Ziel neuer gegen PD-1 und VISTA gerichteter Substanzen. Aktuell wird ein „small molecule“ gegen PD-L1/2 und VISTA in einer Phase 1 Studie untersucht (CA-170; NCT02812875).

Im Magenkarzinom konnte eine Assoziation des Nachweises von VISTA in Tumorzellen mit dem Laurén-Phänotyp, Tumorlokalisation, EBV-Infektion, *KRAS*- und *PIK3CA*-Mutationsstatus und PD-L1 gezeigt werden [65].

1.3 Fragestellung

Bisherige Untersuchungen präsentieren VISTA als neuen Immun-Checkpoint-Regulator mit Beteiligung an Immunevasionsprozessen des Magenkarzinoms. Basierend auf diesen Erkenntnissen beruht die vorliegende Arbeit auf der Hypothese, dass VISTA auch nach durchgeführter perioperativer/neoadjuvanter platinbasierter Chemotherapie eine tumorimmunologische Bedeutung für das Magenkarzinom hat und so ein potenzielles Ziel für künftige Therapiestrategien darstellt.

Um diese Hypothese zu prüfen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist VISTA im Magenkarzinom nach stattgehabter perioperativer/neoadjuvanter Chemotherapie nachweisbar?
2. Wie verhält sich VISTA im Vergleich zu therapienaiven Magenkarzinomen?
3. Wie könnte VISTA nach perioperativer/neoadjuvanter Therapie als Ziel individualisierter Medizin genutzt werden?

Die Untersuchungen des in dieser Arbeit herangezogenen Kollektivs sind zur Beantwortung oben genannter Fragen einer 2017 durch Böger et al. veröffentlichten Untersuchung an therapienaiven Magenkarzinomen nachempfunden. So soll der Vergleich mit dieser historischen Kohorte Effekte stattgehabter Chemotherapie auf die Tumorbiologie beleuchten.

Die Charakterisierung von VISTA in einer Kohorte neoadjuvant/perioperativ behandelter Magenkarzinome soll zudem das derzeit nur wenig publizierte Wissen um die Rolle dieses Immun-Checkpoint-Regulators in klinischen Fällen humaner Tumoren ergänzen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Kollektiv

Alle von 1998 bis April 2017 am Institut für Pathologie des UKSH (Campus Kiel) verfügbaren Präparate von Adenokarzinomen des Magens und des gastroösophagealen Übergangs nach perioperativer oder neoadjuvanter Chemotherapie wurden als Kollektiv zusammengefasst. Diese Gewebeproben wurden im Rahmen der chirurgischen Therapie gewonnen. Zuvor wurde das individuelle Einverständnis eingeholt. Alle identifizierenden Patientendaten wurden für den Verlauf der Auswertung pseudonymisiert. Die Klassifikation des morphologischen Typs nach Laurén, T-, N-, M-, L-, V-, Pn- Kategorie, R-Status, Stadium nach UICC und Tumorregression erfolgte durch einen erfahrenen Pathologen. Sterbedaten wurden dem Krebsregister Schleswig-Holstein entnommen. Follow-Up-Daten noch lebender Patienten wurden von behandelnden Ärzten und Kliniken bereitgestellt. Die Genehmigung der Untersuchung wurde durch die Ethikkommission des UKSH (Campus Kiel) erteilt (D525/15; D453/10).

2.1.2 Geräte

Die folgenden Geräte wurden in der Durchführung der vorliegenden Arbeit als Hilfsmittel verwendet: Promounter® RCM 2000 Coverslipping Machine (Medite GmbH, Burgdorf), See-Saw Rocker SSL4 (Stuart Equipment, Staffordshire, UK), COP 30 Cooling Plate (Medite GmbH, Burgdorf), Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg), Rotationsmikrotom RM2245 (Leica Microsystems, Wetzlar), Tissue Flotation Bath TFB 45 (Medite GmbH, Burgdorf), Lab dancer vario (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen), Druckkochtopf Pascal (DakoCytomatin Denmark, Glostrup, DK), Gefrierschrank VIP Series -86 °C (Sanyo Biomedical, Wood Dale IL, USA), HP Officejet Pro 8000 (Hewlett-Packard, Palo Alto CA, USA), Mitsubishi P93D (Mitsubishi Electric Europe B.V., Ratingen), Hand Tally Counter (Ecandy, China), Leica DM1000 Lichtmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar), Leica SCN400 Scanner (Leica Microsystems, Wetzlar).

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Im Rahmen der Laborarbeit kamen folgende Reagenzien zum Einsatz: Antibody Diluent (Zytomed Systems GmbH, Berlin), 99% Äthanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), Xylol (Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen), Aqua dest. (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), Zitronensäure-Monohydrat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), Hämalaunlösung sauer nach Mayer (Dr. K. Hollborn und Söhne, Leipzig), UltraVision Protein Block (Thermo Scientific, Runcorn, UK), UltraVision Hydrogen Peroxide Block (Thermo Scientific, Runcorn, UK), EZ-Mount™ (Thermo Scientific, Runcorn, UK). Die Herstellung verschiedener Verdünnungen von Äthanol und TBS-Puffer erfolgte durch Hinzugabe von destilliertem Wasser in entsprechenden Mengen. Als Peroxidase Substrat Kit kam ImmPACT™ NovaRED™ von Vector Labs (Burlingame CA, USA) zum Einsatz. Zusätzlich wurden folgende Verbrauchsmaterialien benutzt: Leica BOND™ Plus Slides (Leica Biosystems Richmond Inc., Richmond IL, USA), Deckgläser 24 x 50 mm (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), ART® Pipettenspitzen (Molecular Bio Products, San Diego CA, USA).

2.1.4 Antikörper

Für die immunhistochemische Färbung wurde als Primärantikörper der VISTA (D1L2G™) XP® Rabbit mAb von Cell Signaling Technology (Danvers MA, USA) in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Sekundärantikörper war ImmPRESS™ Reagent Peroxidase Universal Anti-Mouse/Rabbit Ig MP-7500 von Vector Labs (Burlingame CA, USA).

2.1.5 Software

Folgende Software wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzt: Microsoft® Windows 7 und 10 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim), IBM SPSS Statistics 24 für Windows (IBM Deutschland GmbH, Ehningen), Microsoft® Word 2016 MSO (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim), Microsoft® Excel 2016 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim), Citavi 5.7 für Windows (Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH), Leica SCN400 Client (Leica Microsystems, Wetzlar).

2.2 Methoden

Die folgenden Methoden der Anfertigung und Auswertung erfolgten in Anlehnung an eine frühere Untersuchung von VISTA an Fällen therapienaiver Magenkarzinome durch Böger et al, veröffentlicht im Jahr 2017 [65]. Abweichungen werden an den entsprechenden Stellen hervorgehoben.

2.2.1 Herstellung der Schnittpräparate

Nach chirurgischer Entnahme wurden die Gewebeproben zugeschnitten und in 10% neutral gepuffertem Formalin fixiert. Anschließend erfolgten Entwässerung und Einbettung in Paraffin in einem Gewebeeinbettautomaten.

259 auf diese Art hergestellte Gewebelöcke wurden für diese Arbeit verwendet. 141 enthielten Anteile eines Primärtumors, 93 enthielten korrespondierende regionäre Lymphknotenmetastasen und 15 enthielten Fernmetastasen.

Schnittpräparate von 2 μm Dicke wurden auf beschichtete Superfrost 2+-Objektträger aufgebracht und bei 53 °C für etwa 12 Stunden getrocknet. Anschließend erfolgte die Lagerung dieser Gewebeschnitte bei 4-8°C bis sie der immunhistochemischen Färbung zugeführt wurden.

2.2.2 Immunhistochemie

Grundlage des Nachweises von VISTA in dieser Arbeit ist die Immunhistochemie auf Basis der Polymerkonjugat-Methode. Hierzu wird in einem ersten Schritt ein unkonjugierter Primärantikörper gegen das zu untersuchende Epitop gebunden. In einem zweiten Schritt erfolgt die Bindung eines Polymers über anti-Spezies-Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper. An dieses Polymer ist neben dem Sekundärantikörper auch repetitiv ein Enzym, in diesem Fall Peroxidase, gekoppelt. Der dritte Schritt ist die Hinzugabe eines Chromogens, welches durch Peroxidase in ein farbiges Produkt umgesetzt wird [66].

Die färbetechnischen Arbeitsabläufe fanden immer an zwei aufeinander folgenden Tagen statt. Im Folgenden wird die Durchführung dieser Laborarbeit beschrieben:

Am ersten Tag der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnittpräparate rehydriert. Hierzu wurden sie durch eine absteigende Alkoholreihe mit 5 Stufen und zwei Bädern pro Stufe geführt. Die Stufen waren: Xylol, 96% Äthanol, 70% Äthanol, 50% Äthanol und destilliertes Wasser. In den Bädern verblieben die Schnitte jeweils 5 Minuten, im Xylolbad jeweils 12 Minuten. Nach der Rehydrierung erfolgte eine Vorbehandlung zur Antigendemaskierung. Hierzu wurden die Schnitte in Plastikküvetten sortiert, mit 100 ml eines 1x Citratpuffers befüllt und in einen Druckkochtopf gestellt. Dieser wurde mit 500 ml destilliertem Wasser befüllt und auf eine Zieltemperatur von 125°C für 1 Minute und eine Abkühltemperatur von 90°C für 10 Sekunden eingestellt. Der Demaskierungsvorgang dauerte etwa 40 Minuten, woraufhin die noch warmen Schnitte mit Leitungswasser über einen Zeitraum von 10 Minuten von warm zu kalt werdend abgekühlt wurden. Abschließend wurden die Plastikküvetten mit 1x TBS-Puffer befüllt und für 5 Minuten auf einem Rühr Tisch bei 40 Wiederholungen pro Minute gespült. Der nächste Arbeitsschritt war die Blockierung unerwünschter Färbeinteraktionen. Diese erfolgte zunächst mit 3 Tropfen UltraVision Hydrogen Peroxide Block (Thermo Scientific) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Als Zwischenschritt wurde nun drei Mal je 5 Minuten in 1x TBS-Puffer auf dem Rühr Tisch gespült und danach mit der Blockierung unspezifischer Proteinantigene fortgefahren. Diese erfolgte mit 3 Tropfen UltraVision Protein Block (Thermo Scientific) für 5 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von 3 Spülgängen mit je 2 Minuten auf dem Rühr Tisch in 1x TBS-Puffer. Als vierter und letzter Schritt des ersten Tages folgte nun die Applikation des Primärantikörpers (VISTA (D1L2G™) XP® Rabbit mAb von Cell Signaling Technology). Hierzu wurde von diesem mit Antibody Diluent (Zytomed Systems GmbH) eine Verdünnung von 1:500 angefertigt. Diese Verdünnung wurde zu je etwa 150 µl auf alle Präparate aufgebracht, für 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für etwa 12 Stunden über Nacht bei 4-8°C inkubiert.

Der zweite Tag hat jeweils mit der Entnahme aus dem Kühlschrank und dreimaligem Spülen auf dem Rühr Tisch je 5 Minuten in 1x TBS-Puffer begonnen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper auf die Schnitte getropft und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von weiteren drei Spülgängen je 5 Minuten in 1x TBS-Puffer. Das NovaRED™ Substrat (Vector Labs) wurde aus seinen 4 Lösungen neu hergestellt, auf die Schnitte pipettiert und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Die anschließende Spülung erfolgte für 5 Minuten in destilliertem Wasser. Letzter Färbeschritt war die

Kernfärbung mittels Hämalaunlösung (sauer nach Mayer, Dr. K. Hollborn und Söhne) für 1 Minute mit folgendem bläuen unter fließendem warmem Leitungswasser für 10 Minuten. Mit Abschluss der Färbung wurden die Schnitte nun wieder dehydriert. Hierzu diente eine Überführung in je zwei Bädern von destilliertem Wasser, 70% Äthanol, 96% Äthanol und Xylol für 2 Minuten pro Bad. Die dehydrierten Schnitte wurden dann mit Hilfe von EZ-Mount Eindeckmittel (Thermo Scientific) an einem Eindeckautomaten (Promounter® RCM 2000, Medite GmbH) mit Deckgläsern versehen.

2.2.3 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopischen Auswertungen erfolgten für Tumor- und Immunzellen (Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen, etc.). Kriterien für Tumorzellen waren der prozentuale Anteil positiver vitaler Tumorzellen an allen vitalen Tumorzellen und die Einordnung der Färbeintensität der vitalen Tumorzellen in 0 (nicht angefärbt), 1+ (schwach gefärbt), 2+ (mäßig gefärbt) und 3+ (stark gefärbt). Diese Werte wurden abgeschätzt und untereinander zur Prüfung der Plausibilität verglichen. Immunzellen wurden bewertet in dem ein hochauflösendes Gesichtsfeld (400x Vergrößerung) so gewählt wurde, dass es dem Bereich des Tumormikromilieus durch direkte Nähe zu vitalem Tumor oder, im Falle einer vollständigen Regression nach Chemotherapie, der verbleibenden Narbe zuzuordnen war. In diesem Gesichtsfeld wurden mit Hilfe eines Handzählers die Anzahl aller Immunzellen und die Anzahl positiv gefärbter Immunzellen erfasst. Durch Kenntnis der Sehfeldzahl des verwendeten Mikroskops (Leica DM 1000; 20 mm Sehfeldzahl) konnten mit diesem Wert, bei Verwendung eines 40x Objektivs, auch Surrogate wie die Anzahl positiver Immunzellen pro 200 oder Anzahl positiver Immunzellen pro Quadratmillimeter bestimmt werden. Die hierbei nötige Fläche in einem Gesichtsfeld ergibt sich nach der Formel für die Kreisfläche $A = \pi r^2$. Die Rechnung lautet wie folgt:

$$A = \pi \left(\frac{20\text{mm}}{40} \right)^2 = 0,196\text{mm}^2$$

Als interne Positivkontrolle wurde die Färbung von Endothelien und ein Grundniveau positiver Immunzellen untersucht.

Der genannte Auswertungsalgorithmus wurde auf alle Schnittpräparate angewandt. Eine Ausnahme bildeten Lymphknoten- und Fernmetastasen, bei denen die geringe Menge oder Verteilung der Immunzellen eine Auszählung pro Gesichtsfeld schwierig und wenig aussagekräftig gemacht hätte. In diesen Fällen wurden nur Tumoranteile bewertet. Schnitte ohne vitalen Tumor wurden im Gegensatz dazu nur auf Immunzellen im Narbenbereich hin untersucht. Die Einordnung in Intensitätsstufen wurde nach Durchsicht aller Schnitte im Vergleich mit hierbei als repräsentativ befundenen Schnitten überprüft.

2.2.4 Genotypische Analyse

Die Erfassung des HER2- und MET-, MSI- und EBV-Satus in Primärtumoren dieses Kollektivs erfolgte freundlicherweise durch Frau Anna Bregenzer im Rahmen ihrer Promotionsarbeit in Zusammenarbeit mit einer medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin. HER2- und MET-Status wurden mittels Immunhistochemie (anti-Her2/neu Antikörper, Klon SP3; Thermo Fisher Scientific) und in situ-Hybridisierung (ZytoDot 2C SPEC HER2/CEN17 Gensonde, ZytoDot 2C SPEC MET/CEN7 Gensonde und ZytoDot 2C CISH Implementierungskit; ZytoVision GmbH) erhoben. Der EBV-Status wurde mittels EBER-Gensonde (Novocastra; Leica Microsystems GmbH) und dem BondMax-Detektionssystem untersucht. Feststellung des MSI-Status erfolgte über immunhistochemische Färbungen gegen MLH1 (Klon G168-15; BD Biosciences), PMS2 (Klon MRQ-28; Cell Marque Corporation), MSH2 (Klon FE11; Calbiochem, Merck KGaA) und MSH6 (Klon 44, BD Biosciences). In Fällen unklarer Färbung erfolgte der zusätzliche Vergleich allelischer Profile der Marker BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, und NR-27 in Tumor- und zugehörigem Normalgewebe.

2.2.5 Statistische Auswertung

Mikroskopisch erhobene Daten wurden in Microsoft® Excel festgehalten und für die statistische Aufarbeitung in IBM SPSS Statistics 24 übertragen. Ein Immunreaktivitäts-Score (IRS) wurde für Tumorzellen festgelegt. Dieser ergab sich aus der Summe einer Kategorie A und einer Kategorie B. Kategorie A repräsentiert den Anteil immunreaktiver Tumorzellen am gesamten Tumor und Kategorie B die Intensität der immunhistochemischen Färbung. Anders als Böger et al. wurde hier für die weitere Statistik eine dreistufige und keine vierstufige

Graduierung der Intensität gewählt, da nur ein Fall (mit drei Präparaten) der Intensität 3+ zugeordnet werden konnte. Die Intensitäten 2+ und 3+ wurden entsprechend für die weitere statistische Analyse als 2+/3+ zusammengefasst. Die Intensitäten der Kategorie B ergeben sich daher wie folgt: 0 (keine Färbung), 1 (1+, schwach), 2 (2+/3+, stark). So ließen sich mögliche Werte des IRS von 0 bis 6 Punkten errechnen, wobei jeder negative Tumor den Wert 0 und jeder positive Tumor einen Wert ≥ 2 haben muss (Tabelle 2.1).

Tumorregression wurde als Becker-Regressionsgrad unterteilt [67]. Grad 0 steht hierbei für die Abwesenheit vitaler Tumorresiduen, Grad 1a für $\leq 10\%$ vitale Tumorresiduen, Grad 1b für 10 bis 50% vitale Tumorresiduen und Grad 3 für $\geq 50\%$ vitale Tumorresiduen. Außerdem wurde der Anteil vitaler Tumorresiduen sowohl an dessen Median in eine Gruppe $< 55\%$ und eine Gruppe $\geq 55\%$, als auch in Quartile (Q1 $< 6\%$; Q2 6-55%; Q3 56-85%; Q4 $> 85\%$) unterteilt. Korrelationen mit klinisch-pathologischen Daten wurden mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher und des Rangkorrelationskoeffizienten Kendall's Tau untersucht. Kumulatives Überleben wurde als Kaplan-Meier Kurve visualisiert und Unterschiede mit dem Log-Rank-Test untersucht. Die Assoziation von Immunzellendichte und dem Anteil positiver Immunzellen wurde mit der Pearson-Korrelation überprüft. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Korrektur für multiple Tests erfolgte mittels der Simes (Benjamini-Hochberg) Prozedur [68].

IRS	Kategorie A (Anteil immunreaktiver Tumorzellen)	Kategorie B (Intensität)
0	0 (keine immunreaktiven Zellen)	0 (keine Färbung)
2	1 ($\leq 1\%$ immunreaktive Zellen)	1 (1+, schwach)
3	1 2 ($> 1\%$ bis $\leq 10\%$ immunreaktive Zellen)	2 (2+/3+, stark) 1
4	2 3 ($> 10\%$ bis $\leq 50\%$ immunreaktive Zellen)	2 1
5	3 4 ($> 50\%$ immunreaktive Zellen)	2 1
6	4	2

Tabelle 2.1 Immunreaktivitäts-Score (IRS). Der hier verwendete Immunreaktivitäts-Score bezieht sich auf Tumorzellen und ist zusammengesetzt aus dem Anteil immunreaktiver Tumorzellen, mit Werte von 0 bis 5 (0 = keine immunreaktiven Zellen; 1 = $\leq 1\%$ immunreaktive Zellen; 2 = $> 1\%$ bis $\leq 10\%$ immunreaktive Zellen; 3 = $> 10\%$ bis $\leq 50\%$ immunreaktive Zellen; 4 = $> 50\%$ immunreaktive Zellen) und der Intensität der Immunreaktion mit Werten von 0 bis 2 (0 = keine Immunreaktion, 1 = schwache Immunreaktion, 2 = starke Immunreaktion).

3 Ergebnisse

3.1 Mikroskopischer Nachweis von VISTA

Mikroskopisch wurden 141 Fälle neoadjuvant behandelter Magenkarzinome mit 93 korrespondierenden regionären Lymphknoten- und 15 Fernmetastasen immunhistochemisch auf das Vorliegen des Membranproteins VISTA hin untersucht.

Eine positive Immunreaktion zeigte sich in Tumorzellen für alle Intensitätsstufen stets zytoplasmatisch (Abbildung 3.1; A-C). Endothelzellen zeigten unabhängig von Tumorzellen eine Immunreaktion (Abbildung 3.1; E und F). Immunzellen zeigten stets eine Färbung starker Intensität (Abbildung 3.1; D). In einzelnen Fällen konnte außerdem eine Immunreaktion im Gewebe enthaltener Histiozyten beobachtet werden.

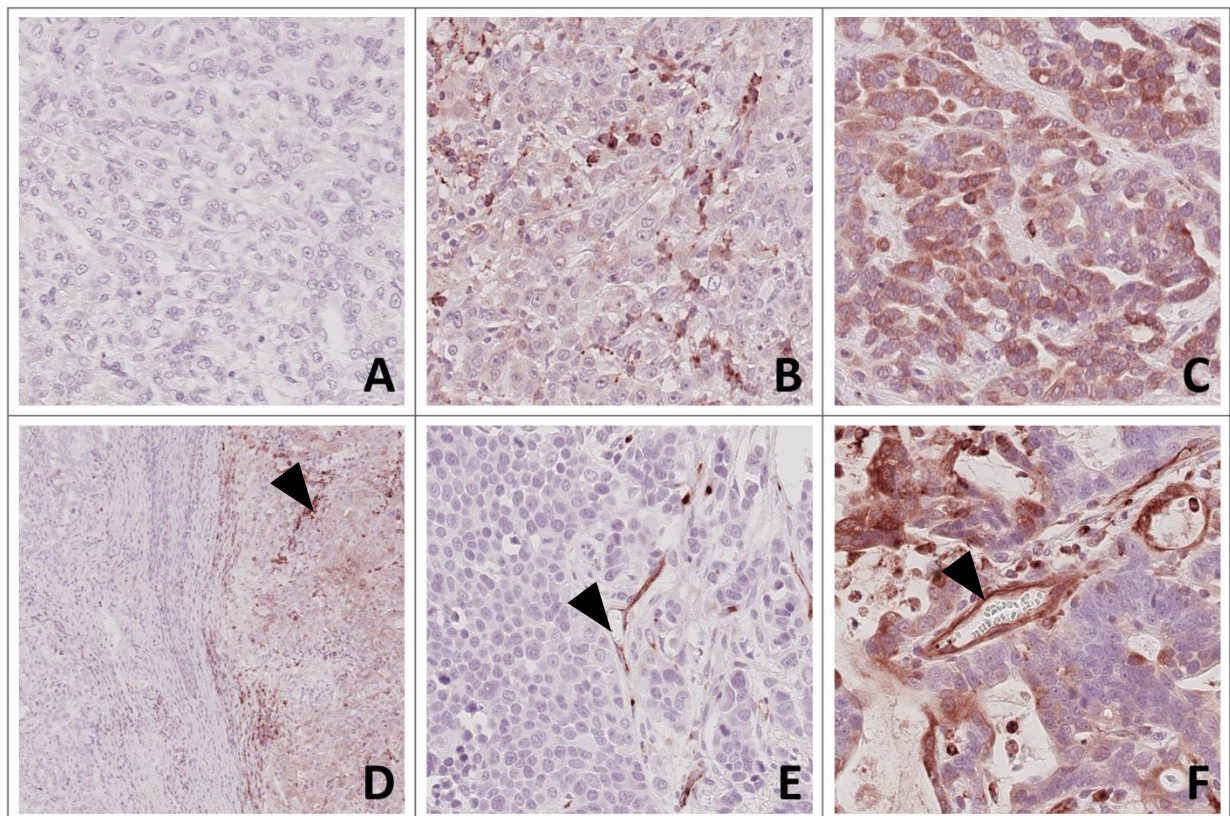


Abbildung 3.1 Immunhistochemischer Nachweis von VISTA. Bild A zeigt Tumorzellen der Intensität 0 (keine Färbung) in 400x Vergrößerung. Bild B zeigt Tumorzellen der Intensität 1 (schwach) in 400x Vergrößerung. Bild C zeigt Tumorzellen der Intensität 2 (stark) in 400x Vergrößerung. Bild D zeigt die Grenzfläche eines VISTA-positiven Tumoranteils (rechts, schwache Intensität) und eines negativen Tumoranteils (links) in einer Übersichtsvergrößerung (etwa 100x). Zu erkennen sind stark gefärbte Immunzellen auf der VISTA-positiven Seite (Pfeilspitze in Bild D). Bild E und F zeigen immunreaktive Endothelzellen sowohl innerhalb eines negativen Tumors (Pfeilspitze in Bild E), als auch innerhalb eines positiven Tumors (Pfeilspitze in Bild F), jeweils in 400x Vergrößerung.

3.1.1 VISTA im Primärtumor

Für Tumorzellen des Primärtumors wurden der Anteil positiver Tumorzellen an der Gesamtheit der Tumorzellen und die stärkste beobachtete Färbungsintensität festgehalten. In 18 Fällen konnten diese Werte nicht erhoben werden, da in 16 Fällen eine vollständige Regression des Tumors und in 2 Fällen eine ungenügende Beurteilbarkeit vorlag. In 38 (30,9%) Fällen konnte VISTA nachgewiesen werden. Der immunreaktive Anteil erreichte Werte von 0% bis maximal 80%, wobei 110 (89,4%) aller auswertbaren Fälle einen Anteil von $\leq 10\%$ erreichten (Abbildung 3.2; A). 25 (20,3%) Fälle zeigten eine schwache, 13 (10,6%) eine starke Immunreaktion (Abbildung 3.2; B). Bei überwiegend VISTA-negativen Fällen lag der Median für beide Parameter bei 0. Die Verrechnung zu einem IRS hatte Höchstwerte von 5 und ebenfalls einen Median von 0 (Abbildung 3.2; C).

Immunzellen des Primärtumors wurden in einem Gesichtsfeld ausgezählt. Ein Fall war dabei nicht beurteilbar. 2 Fälle wiesen keine Immunreaktion in solchen Immunzellen auf, entsprechend konnte in 98,6% der Primärtumoren eine VISTA-Positivität in Immunzellen nachgewiesen werden. Gezählte Immunzellen reichten von 42 bis 600 mit VISTA-positiven von 0 bis 290. Die hieraus errechnete Immunzellendichte betrug 214 bis 3214 Zellen pro mm^2 (Median 946) und die Zelldichte VISTA-positiver Immunzellen 0 bis 1479 pro mm^2 (Median 229). Für den errechneten Anteil positiver Immunzellen in Prozent ergaben sich Werte von 0% bis 89% bei einem Median von 26,3%, welcher folgend der Unterteilung in eine Gruppe hohen VISTA-Nachweises und eine Gruppe niedrigen VISTA-Nachweises diente (Abbildung 3.3). Die Zelldichte VISTA-positiver Immunzellen pro mm^2 und der Anteil VISTA-positiver Immunzellen waren signifikant miteinander assoziiert ($p < 0.001$; $r = 0.822$).

VISTA-positive Endothelzellen konnten in 124 (88%) von 141 Fällen beobachtet werden.

Der IRS von Tumorzellen des Primärtumors zeigte proportionale Zusammenhänge mit dem Anteil positiver Immunzellen und der Menge pro mm^2 (p jeweils $< 0,001$) (Abbildung 3.4).

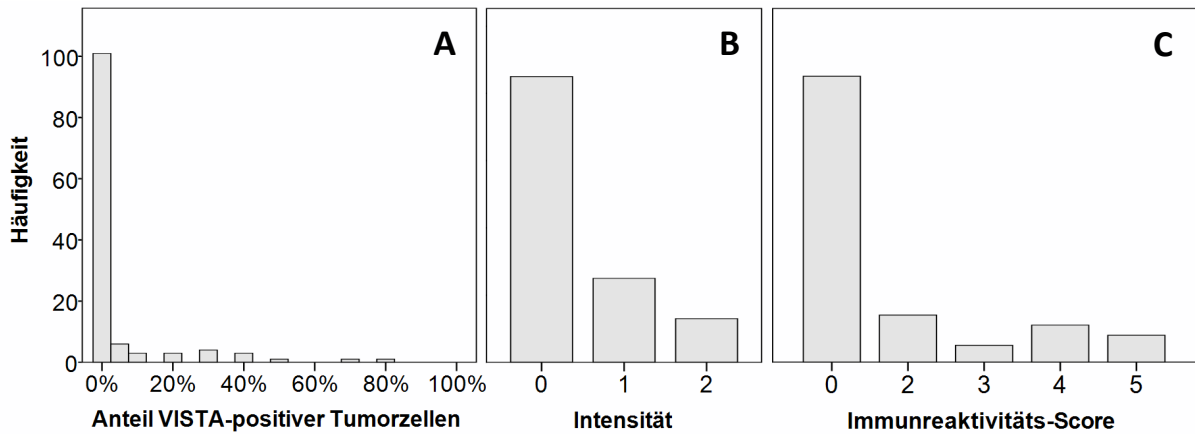


Abbildung 3.2 Häufigkeitsverteilung des Nachweises von VISTA in Tumorzellen des Primärtumors. Darstellung der absoluten Häufigkeit nach Anteil VISTA-positiver Tumorzellen (A), Intensität (B) und resultierendem Immunreaktivitäts-Score (C) in Tumorzellen des Primärtumors.

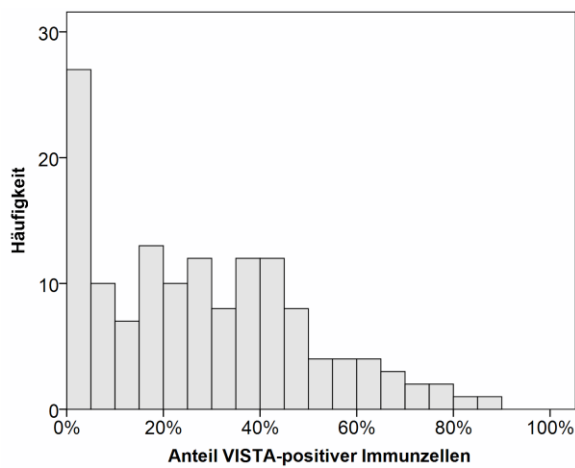


Abbildung 3.3 Häufigkeitsverteilung des Anteils VISTA-positiver Immunzellen an der Gesamtzahl der Immunzellen im Primärtumor.

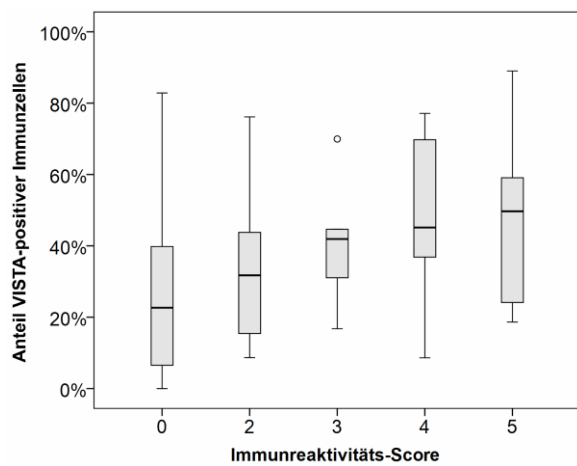


Abbildung 3.4 Verteilung des Anteils VISTA-positiver Immunzellen im Primärtumor nach dem IRS von Tumorzellen im Primärtumor. ($p < 0,001$)

3.1.2 VISTA in regionären Lymphknotenmetastasen

Tumorzellen in Regionären Lymphknotenmetastasen wurden analog zu Primärtumoren auf positiven Tumorzellanteil und Intensität der Immunreaktion untersucht. In 10 Fällen wurden diese Werte nicht erhoben, da keine genügende Beurteilbarkeit vorlag. In 18 (21,7%) Fällen ließ sich VISTA nachweisen. Der immunreaktive Anteil der Tumorzellen reichte von 0% bis 80% (Abbildung 3.5; A). 14 (16,9%) wiesen eine schwache und 4 (4,8%) eine starke Immunreaktion auf (Abbildung 3.5; B). Auch hier wurde ein IRS gebildet, welcher Werte bis maximal 5 erreichte (Abbildung 3.5; C). Der Median lag für beide Parameter, wie auch für den IRS bei 0. Es gab 15 Lymphknoten mit geeignet großem Tumorbett, um zusätzlich Immunzellen in einem Gesichtsfeld zu bewerten. Die Anzahl gezählter Immunzellen reichte von 95 bis 431 bei 3 bis 291 VISTA-positiven Zellen. Der geringste Anteil positiver Immunzellen war 1,1% und der höchste Anteil 60,5%.

Im direkten Vergleich mit korrespondierenden Primärtumoren fanden sich von 16 Fällen, in denen der Primärtumor eine vollständige Regression aufweist, 7 Fälle mit vitalen Tumorresiduen in den Lymphknotenmetastasen. Außerdem lag eine Diskordanz der VISTA-Positivität von Tumorzellen in 22 Fällen vor, wobei entweder nur im Primärtumor oder nur in der Lymphknotenmetastase VISTA-positive Tumorzellen zu finden waren (Abbildung 3.6). Dem gegenüber standen 53 Fälle mit konkordantem Nachweis, von denen 42 Fälle gleichermaßen VISTA-negativ und 11 Fälle gleichermaßen VISTA-positiv waren. Der positiv prädiktive Wert lag für VISTA in Tumorzellen der Lymphknotenmetastase bezogen auf die Vorhersage eines VISTA-Nachweises in Tumorzellen des Primärtumors mit 17 positiven Metastasen mit verfügbarem Status des Primärtumors und 11 richtig vorhergesagten Fällen bei 64,7% (Tabelle 3.1).

Statistisch signifikante Zusammenhänge des Nachweises von VISTA in Primärtumor und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen bestanden für die Werte des jeweiligen IRS ($p=0,001$), die Gesamtzahl der Immunzellen pro mm^2 ($p=0,026$), positive Immunzellen pro mm^2 ($p=0,004$) und den Anteil positiver Immunzellen ($p=0,009$).

VISTA-positive Endothelzellen konnten in 76 (81,7%) von 93 Lymphknotenmetastasen beobachtet werden.

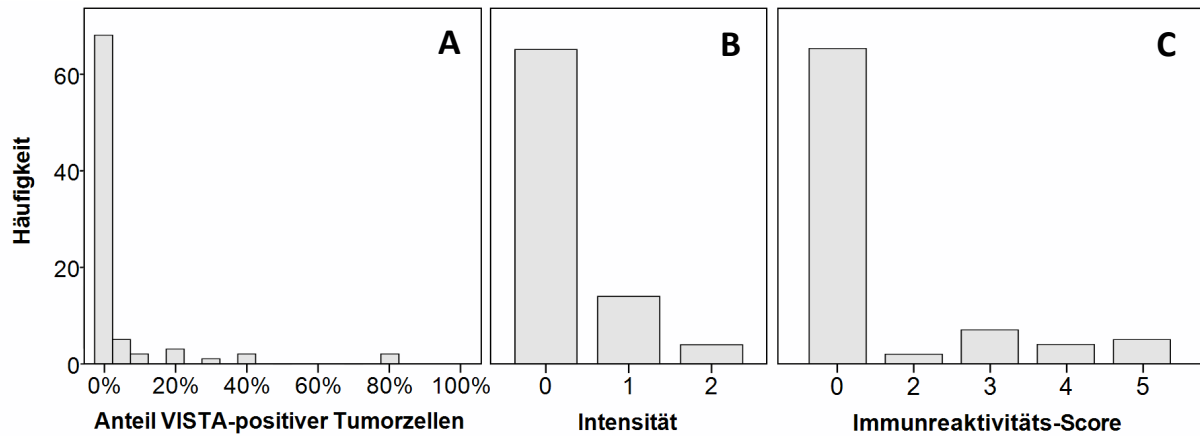


Abbildung 3.5 Häufigkeitsverteilung des Nachweises von VISTA in Tumorzellen regionärer Lymphknotenmetastasen. Darstellung der absoluten Häufigkeit nach Anteil VISTA-positiver Tumorzellen (A), Intensität (B) und resultierendem Immunreaktivitäts-Score (C) in Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen.

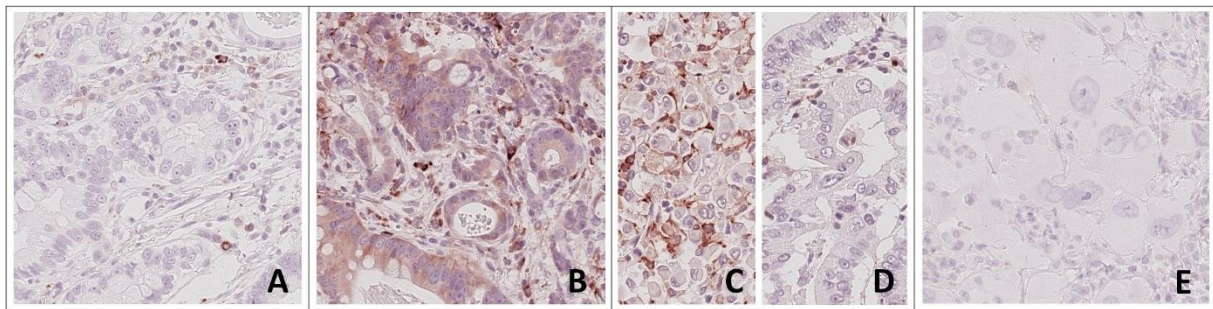


Abbildung 3.6 Vergleich des VISTA-Nachweises in Primärtumor und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen. Bild A zeigt VISTA-negative Tumorzellen eines Primärtumors. Bild B zeigt VISTA-positiv Tumorzellen in einer Lymphknotenmetastase des in Bild A gezeigten Primärtumors. Bild C zeigt einen phänotypisch diffusen, VISTA-positiven Tumoranteil eines Primärtumors. Bild D zeigt in demselben Primärtumor des Bildes C einen phänotypisch intestinalen, VISTA-negativen Tumoranteil. Bild E zeigt VISTA-negative Tumorzellen in einer Lymphknotenmetastase des in Bild C und D gezeigten Primärtumors.

		Tumorzellen der Lymphknotenmetastase	
		negativ	positiv
Tumorzellen des Primärtumors	negativ	42	6
	positiv	16	11

Tabelle 3.1 Vierfeldertafel des VISTA-Status von Tumorzellen des Primärtumors gegenüber Tumorzellen in Lymphknotenmetastasen. Die dichotome Einteilung in negativ und positiv entspricht der Teilung am Median des IRS von 0. (p=0.090)

3.1.3 VISTA in Fernmetastasen

Fernmetastasen wurden wie Primärtumoren untersucht. Insgesamt waren für 21 Fälle Fernmetastasen bekannt, jedoch waren nur in 11 Fällen mit 15 Präparaten Fernmetastasen verfügbar (Tabelle 3.2).

Drei Fälle waren in den Metastasen VISTA-positiv, wobei in keinem Fall der zugehörige Primärtumor VISTA-positiv war. Ein Fall mit positivem Primärtumor zeigte außerdem keine Immunreaktion in der zugehörigen Fernmetastase. Der Anteil positiver Immunzellen reichte von 0% bis 36,2% in VISTA-negativen Fernmetastasen und 8,9% bis 58,2% in VISTA-positiven Fernmetastasen.

Mit Blick auf eine geringe Fallzahl von 11 erfolgte keine weitere statistische Auswertung.

Fallnummer	IRS (Primärtumor)	Lokalisation der Fernmetastase	Anteil positiver Tumorzellen (Metastase)	Intensität (Metastase)	Positive IZ / gesamte IZ pro Gesichtsfeld (Metastase)
1	0	Leber	1	1	54/606 (8,9%)
		Leber	1	1	41/141 (29,1%)
		Leber	0	0	112/309 (36,2%)
		Leber	1	2	52/155 (33,5%)
2	0	Peritoneum	0	0	43/130 (33,1%)
3	0	Peritoneum	0	0	57/204 (11,3%)
4	0	-	50	2	85/146 (58,2%)
5	0	Kolon	0	0	N.A.
6	0	Peritoneum	0	0	17/311 (5,5%)
7	0	Peritoneum	0	0	7/90 (7,8%)
8	0	Peritoneum	0	0	0/394 (0%)
		Peritoneum	0	0	61/218 (28%)
9	3	Peritoneum	0	0	3/87 (3,4%)
10	0	Peritoneum	0	0	N.A.
11	0	-	20	2	173/316 (54,7%)

Tabelle 3.2 Nachweis von VISTA in Fernmetastasen mit Vergleich zum Primärtumor. Die Tabelle zeigt nach Fallnummer sortiert den Immunreaktivitäts-Score (IRS) des Primärtumors, Lokalisation der Fernmetastase (sofern verfügbar), den Anteil VISTA-positiver Tumorzellen an Tumorzellen der Fernmetastase, die höchste beobachtete Intensität dieser Immunreaktion und Immunzellen (IZ) als positiv gefärbte Immunzellen in einem Gesichtsfeld (400x Vergrößerung) und Gesamtimmunzellen in diesem Gesichtsfeld, sowie den Anteil positiver Immunzellen in Prozent (%).

3.2 Korrelationen mit klinisch-pathologischen Charakteristika

Klinisch-pathologische Patientencharakteristika des Kollektivs umfassten Daten zu Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Tumorlokalisierung, morphologischem Typ nach Laurén, T-, N-, M-, L-, V-, Pn- Kategorie, R-Status, Stadium nach UICC, MSI, EBV-Status, MET-Satus und HER2-Satus. Für alle Charakteristika wurde die Häufigkeit sowohl in den Gruppen VISTA-positiver und -negativer Tumorzellen jeweils im Primärtumor und in Lymphknotenmetastasen als auch in den Gruppen anteilig und flächenbezogen hoher versus niedriger Anzahl VISTA-positiver Immunzellen im Primärtumor untersucht (Tabelle 3.3).

Kein klinisch-pathologisches Charakteristikum korrelierte nach der Korrektur für multiples Testen mit dem Nachweis von VISTA in Tumorzellen und Immunzellen des Primärtumors oder Tumorzellen regionärer Lymphknotenmetastasen.

Das Tumorstadium nach UICC zeigte im Progress von 0 bis IV keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Vorliegen von VISTA. Allerdings zeigt die Trennung in den Progress von I bis III und den Progress von II zu IV, dass diese Spannen jeweils statistisch signifikant mit dem VISTA-Nachweis in Tumorzellen des Primärtumors assoziiert waren ($p=0,028$; $p=0,013$; Abbildung 3.7).

Es konnten keine Zusammenhänge des Nachweises von VISTA mit Parametern des Tumorprogresses wie T-, N-, M-, L-, V-, Pn- Kategorie ermittelt werden. Geschlecht und Alter zeigten ebenfalls keine Korrelation mit dem VISTA-Status.

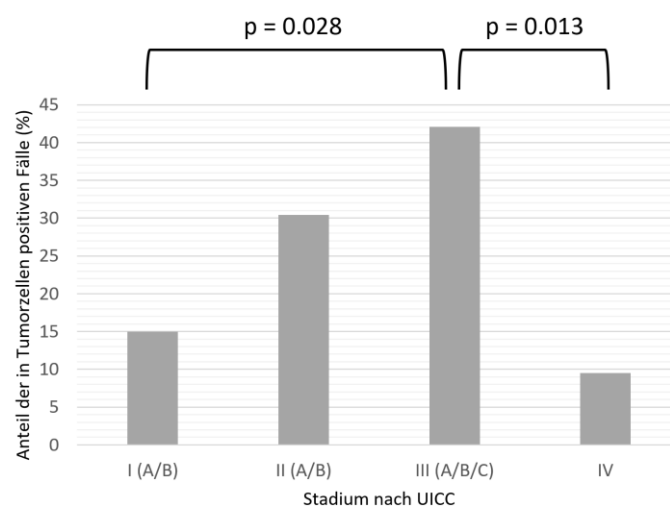


Abbildung 3.7 Anteil der in Tumorzellen positiven Fälle in % gegenüber Stadium nach UICC. Die angegebenen p-Werte wurden mit dem Rangkorrelationskoeffizienten Kendall's Taub bestimmt.

	Gültig		VISTA in Tumorzellen des Primärtumors		Anteil VISTA-positiver Immunzellen		VISTA-positive Immunzellen pro mm ²		VISTA in Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen	
	n	(%)	Gültig	p-Wert	Gültig	p-Wert	Gültig	p-Wert	Gültig	p-Wert
			negativ	positiv	niedrig	hoch	niedrig	hoch	negativ	positiv
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Geschlecht	141		123	,999*	140	,669*	140	,999*	83	,509*
Weiblich	28	(19,9)	15	(71,4)	6	(28,6)	15	(55,6)	12	(70,6)
Männlich	113	(80,1)	70	(68,6)	32	(31,4)	55	(48,7)	53	(80,3)
Alter	141		123	,173*	140	,866*	140	,866*	83	,426*
< 66 Jahre	70	(49,6)	37	(62,7)	22	(37,3)	36	(51,4)	31	(73,8)
≥ 66 Jahre	71	(50,4)	48	(75,0)	16	(25,0)	34	(48,6)	34	(82,9)
Lokalisation	141		123	,004*	140	,860*	140	,999*	83	,406*
Proximal	90	(63,8)	48	(60)	6	(40)	44	(48,9)	45	(50)
Distal	51	(36,2)	37	(86)	6	(14)	26	(52)	25	(50)
Laurén	141		123	,027*	140	,521*	140	,351*	83	,517*
Intestinal	63	(44,7)	42	(70)	18	(30)	33	(53,2)	29	(46,8)
Diffus	26	(18,4)	23	(88,5)	3	(11,5)	13	(50)	14	(87,5)
Gemischt	26	(18,4)	14	(56)	11	(44)	11	(42,3)	15	(57,7)
Unklass.	14	(9,9)	6	(50)	6	(50)	5	(35,7)	9	(64,3)
Vollständige Regression	12	(8,5)	N.A.	N.A.	8	(66,7)	4	(33,3)	8	(66,7)
T-Kategorie	141		123	,662*	140	,218*	140	,388*	83	,999*
T0	16	(11,3)	N.A.	N.A.	12	(75)	4	(25)	12	(75)
T1(a/b)	20	(14,2)	17	(89,5)	2	(10,5)	10	(50)	8	(40)
T2	20	(14,2)	12	(63,2)	7	(36,8)	9	(47,4)	11	(57,9)
T3	75	(53,2)	46	(61,3)	29	(38,7)	33	(44)	42	(56)
T4(a/b)	10	(7,1)	10	(100)	0	(0)	6	(60)	4	(40)
N-Kategorie	141		123	,814*	140	,276*	140	,643*	83	,815*
N0	51	(36,2)	30	(78,9)	8	(21,1)	29	(56,9)	22	(43,1)
N1	33	(23,4)	17	(54,8)	14	(45,2)	15	(45,5)	18	(48,5)
N2	32	(22,7)	19	(63,3)	11	(36,7)	15	(48,4)	16	(51,6)
N3(a/b)	25	(17,7)	19	(79,2)	5	(20,8)	11	(44)	14	(56)
M-Kategorie	141		123	,020*	140	,817*	140	,487*	83	,491*
M0	119	(84,4)	66	(64,7)	36	(35,3)	60	(50,8)	58	(49,2)
M1	22	(15,6)	19	(90,5)	2	(9,5)	10	(45,5)	12	(54,5)
UICC-Stadium	139		121	,952*	138	,143*	138	,779*	83	,618*
0/N+	15	(10,8)	N.A.	N.A.	11	(73,3)	4	(26,7)	11	(73,3)
I(A/B)	21	(15,1)	17	(85)	3	(15)	11	(52,4)	10	(47,6)
II(A/B)	24	(17,3)	16	(69,6)	7	(30,4)	11	(47,8)	12	(52,2)
III(A/B/C)	57	(41)	33	(57,9)	24	(42,1)	26	(45,6)	31	(54,4)
IV	22	(18,8)	19	(90,5)	2	(9,5)	10	(45,5)	12	(54,5)
L-Kategorie	141		123	,063*	140	,196*	140	,357*	83	,999*
L0	99	(70,2)	62	(74,7)	21	(25,3)	53	(54,1)	45	(45,9)
L1	42	(29,8)	23	(57,5)	17	(42,5)	17	(40,5)	25	(59,5)
V-Kategorie	141		123	,999*	140	,745*	140	,745*	83	,999*
V0	131	(92,9)	78	(69)	5	(31)	66	(50,8)	64	(49,2)
V1	10	(7,1)	7	(70)	3	(30)	4	(40)	6	(60)
Pn-Kategorie	141		123	,113*	140	,537*	140	,063*	83	,247*
Pn0	111	(78,7)	68	(73,1)	25	(26,9)	57	(51,8)	53	(48,2)
Pn1	30	(21,3)	17	(56,7)	13	(43,3)	13	(43,3)	17	(56,7)
R-Status	141		123	,776*	140	,999*	140	,618*	83	,301*
R0	126	(89,4)	73	(67,6)	35	(32,4)	62	(49,6)	63	(50,4)
R1	13	(9,2)	10	(76,9)	3	(23,1)	7	(53,8)	6	(46,2)
RX	2	(1,4)	2	(100)	0	(0)	1	(50)	0	(0,0)
MSI-Status	121		118	,711*	120	,281*	120	,277*	77	,210*
MSS	113	(93,4)	75	(68,2)	35	(31,8)	54	(48,2)	58	(51,8)
MSI	8	(6,6)	5	(62,5)	3	(37,5)	2	(25,0)	6	(75)
EBV-Status	122		117	,999*	121	,246*	121	,245*	78	,999*
negativ	119	(97,5)	77	(67,5)	37	(32,5)	57	(48,3)	61	(51,7)
positiv	3	(2,5)	2	(66,7)	1	(33,3)	0	(0)	3	(100)
MET-Status	124		119	,081*	123	,999*	123	,999*	78	,298*
negativ	118	(95,2)	79	(69,9)	34	(30,1)	56	(47,9)	61	(52,1)
positiv	6	(4,8)	2	(33,3)	4	(66,7)	3	(50)	3	(50)
HER2-Status	122		119	,265*	121	,473*	121	,478*	77	,041*
negativ	114	(93,4)	77	(69,4)	34	(30,6)	52	(46,0)	61	(54,0)
positiv	8	(6,6)	4	(50)	4	(50)	5	(62,5)	3	(37,5)

Tabelle 3.3 Korrelation des VISTA-Nachweises in Tumor und Lymphknoten mit klinisch-pathologischen Charakteristika. Die Tabelle zeigt VISTA in Tumor- und Immunzellen des Primärtumors und Tumorzellen in Lymphknotenmetastasen gegenüber klinisch-pathologischen Parametern und genetischen Alterationen des Primärtumors. p-Werte unterhalb des 0,05% Signifikanzniveaus sind grau unterlegt. Die Art des statistischen Tests ist jeweils an den angegebenen p-Werten vermerkt (*=exakter Test nach Fisher; °=Kendalls Tau). VISTA in Tumorzellen des Primärtumors und der Lymphknotenmetastase wurden dem Median des IRS (jeweils IRS=0) entsprechend in negativ und positiv geteilt. Der Anteil VISTA-positiver Immunzellen wurde an seinem Median (26,3%; 52 pro 200) in niedrigen und hohen Nachweis geteilt. VISTA-positive Immunzellen wurden am Median (229) in niedrigen und hohen Nachweis geteilt. Die Abkürzung „Unklass.“ repräsentiert Fälle mit unklassifiziertem Phänotyp nach Laurén. Die Abkürzung „N.A.“ kennzeichnet Felder als „nicht anwendbar“, sofern diesem kein Wert zugewiesen werden konnte.

3.2.1 Überlebenszeitanalyse und prognostische Signifikanz

Der Nachweis von VISTA in Tumorzellen des Primärtumors als IRS am Median geteilt korrelierte nicht mit dem Gesamtüberleben ($n=118$; $p=0,794$) oder dem tumorspezifischen ($n=118$; $p=0,579$) Überleben (Abbildung 3.8). Ebenso zeigte auch der Anteil von VISTA in Immunzellen am Median geteilt keine Korrelation mit dem Gesamtüberleben ($n=135$; $p=0,396$) oder dem tumorspezifischen ($n=135$; $p=0,569$) Überleben (Abbildung 3.9).

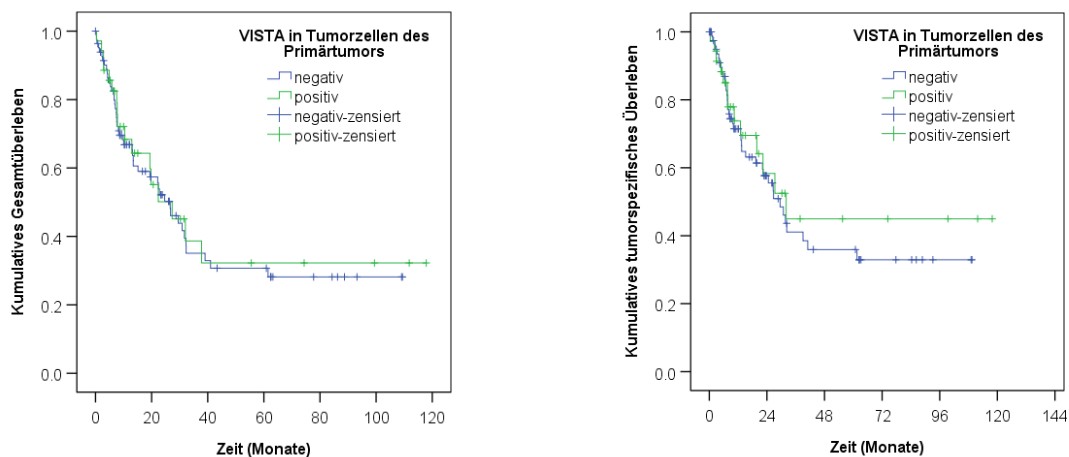


Abbildung 3.8 Kaplan-Meier Kurven des Gesamt- und tumorspezifischen Überlebens in Abhängigkeit des VISTA-Satus der Tumorzellen im Primärtumor. Der IRS von VISTA in Tumorzellen des Primärtumors wurde am Median (0) in negativ und positiv geteilt. Unterschiede wurde jeweils mit Hilfe des Log-Rank-Tests untersucht.

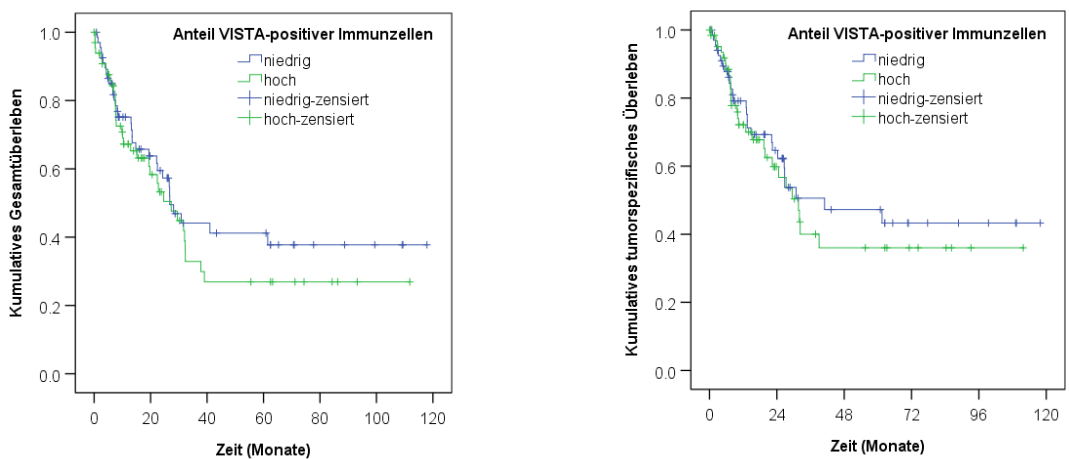


Abbildung 3.9 Kaplan-Meier Kurven des Gesamt- und tumorspezifischen Überlebens in Abhängigkeit des Anteils VISTA-positiver Immunzellen im Primärtumor. Der Anteil VISTA-positiver Immunzellen des Primärtumors wurden am Median (26,3%; 52 pro 200) in niedrig und hoch unterteilt. Unterschiede wurde jeweils mit Hilfe des Log-Rank-Tests untersucht.

3.2.2 Assoziation mit genetischen Alterationen

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von VISTA in Tumor- oder Immunzellen und den genetischen Gruppen der MSI (n=8), EBV-positiven (n=3), MET-positiven (n=6) oder HER2-positiven (n=8) Tumoren nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 3.3, S. 29).

HER2-Positivität korrelierte mit intestinalem Phänotyp nach Laurén, niedriger T-Kategorie, der Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen und niedrigem UICC-Stadium. MET-Positivität korrelierte mit diffusem Phänotyp nach Laurén, Lymphgefäßinvasion und R1-Resektion. MSI korrelierte mit weiblichem Geschlecht (Anhang Tabelle 2).

3.2.3 Assoziation mit Tumorregression

Der Anteil vitaler Tumorresiduen war sowohl als Becker-Regressionsgrad ($p=0,002$), als auch am Median (55%) dichotomiert ($p=0,003$) signifikant mit dem Nachweis von VISTA im Primärtumor vergesellschaftet (Tabelle 3.4; Abbildung 3.10). Ebenso verhielt es sich für den Anteil positiver Immunzellen, welcher mit steigendem Becker-Regressionsgrad ($p<0,001$), $\geq 55\%$ vitalen Residuen ($p=0,001$) und höheren Quartilen ($p=0,001$) zunahm. Die Zelldichte positiver Immunzellen pro mm^2 korrelierte signifikant mit dem am Median geteilten Wert vitaler Tumorresiduen ($p=0,002$) (Tabelle 3.4).

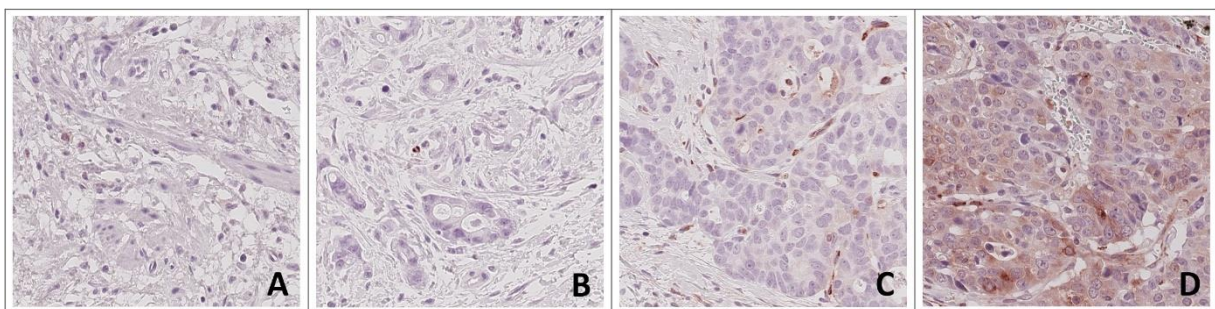


Abbildung 3.10 Becker-Regressionsgrade. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Tumorbett in 400x Vergrößerung je Becker-Regressionsgrad. Bild A zeigt Narbengewebe bei Becker-Regressionsgrad 1a (keine vitalen Tumorresiduen). Bild B zeigt Narbengewebe mit einzelnen Tumorzellen bei Becker-Regressionsgrad 1b ($\leq 10\%$ vitale Tumorresiduen). Bild C zeigt Narben- und Tumorgewebe bei Becker-Regressionsgrad 2 (10% bis 50% vitale Tumorresiduen). Bild D zeigt Tumor- und wenig Narbengewebe bei Becker-Regressionsgrad 3 ($\geq 50\%$ vitale Tumorresiduen).

	Gültig		VISTA in Tumorzellen des Primärtumors		Anteil VISTA-positiver Immunzellen		VISTA-positive Immunzellen pro mm ²		VISTA in Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen	
	n	(%)	Gültig	p-Wert	Gültig	p-Wert	Gültig	p-Wert	Gültig	p-Wert
			negativ n (%)	positiv n (%)	niedrig n (%)	hoch n (%)	niedrig n (%)	hoch n (%)	negativ n (%)	positiv n (%)
Regression (Becker)	141		123	,002°	140	<,001*	140	,005°	83	,837*
1a	16 (11,3)	N.A.		N.A.	12 (75,0)	4 (25,0)	12 (75,0)	4 (25,0)	6 (85,7)	1 (14,3)
1b	29 (20,6)	23 (85,2)	4 (14,8)		18 (64,3)	10 (35,7)	16 (57,1)	12 (42,9)	11 (78,6)	3 (21,4)
2	22 (15,6)	19 (86,4)	3 (13,6)		13 (59,1)	9 (40,9)	13 (59,1)	9 (40,9)	9 (75,0)	3 (25,0)
3	74 (52,5)	43 (58,1)	31 (41,9)		27 (36,5)	47 (63,5)	29 (39,2)	45 (60,8)	39 (78,0)	11 (22,0)
Residuen (dichotom)	140		122	,003*	139	,001*	139	,002*	83	,999*
<55%	70 (50)	44 (84,6)	8 (15,4)		45 (65,2)	24 (34,8)	44 (63,8)	25 (36,2)	27 (79,4)	7 (20,6)
≥55%	70 (50)	41 (58,6)	29 (41,4)		25 (35,7)	45 (64,3)	26 (37,1)	44 (62,9)	38 (77,6)	11 (22,4)
Residuen (Quartile)	140		122	,007*	139	,001*	139	,008*	83	,978*
Q1 (<6%)	39 (27,9)	17 (81,0)	4 (19,0)		25 (65,8)	13 (34,2)	25 (65,8)	13 (34,2)	17 (85,0)	3 (15,0)
Q2 (6-55%)	31 (22,1)	27 (87,1)	4 (12,9)		20 (64,5)	11 (35,5)	19 (61,3)	12 (38,7)	10 (71,4)	4 (28,6)
Q3 (56-85%)	32 (22,9)	19 (59,4)	13 (40,6)		12 (37,5)	20 (62,5)	10 (31,3)	22 (68,8)	15 (71,4)	6 (28,6)
Q4 (>85%)	38 (27,1)	22 (57,9)	16 (42,1)		13 (34,2)	25 (65,8)	16 (42,1)	22 (57,9)	23 (82,1)	5 (17,9)

Tabelle 3.4 Korrelation des VISTA-Nachweises in Tumor und Lymphknoten mit Parametern der Tumorregression. Die Tabelle zeigt VISTA in Tumor- und Immunzellen des Primärtumors und Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen gegenüber vitalen Tumorresiduen als Becker-Regressionsgrad, am Median (55%) dichotom geteilt und als Teilung in Quartile. p-Werte unterhalb des 0,05% Signifikanzniveaus sind grau unterlegt. P-Werte deren Signifikanz nach der Korrektur für multiple Tests nach Simes erhalten blieben sind schwarz unterlegt. Die Art des statistischen Tests ist jeweils an den angegebenen p-Werten vermerkt (*=exakter Test nach Fisher; °=Kendalls Tau). VISTA in Tumorzellen des Primärtumors und der Lymphknotenmetastase wurden dem Median des IRS (jeweils IRS=0) entsprechend in negativ und positiv geteilt. Der Anteil VISTA-positiver Immunzellen wurde am Median (26,3%; 52 pro 200) in niedrigen und hohen Nachweis geteilt. VISTA-positive Immunzellen wurden am Median (229) in niedrigen und hohen Nachweis geteilt.

3.2.4 Assoziation mit dem Nachweis von PD-L1

Unabhängig von dieser Arbeit erfolgte parallel die Untersuchung des verwandten Proteins PD-L1 für dasselbe Kollektiv durch Frau Anna Bregenzer im Rahmen ihrer Promotionsarbeit. Diese Daten wurden analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit an ihrem Median geteilt und dichotom mit VISTA korreliert (Tabelle 3.5).

Als signifikant stellte sich der Zusammenhang eines hohen Nachweises von VISTA in Immunzellen des Primärtumors und PD-L1 in Tumorzellen ($p=0,004$) und Immunzellen ($p<0,001$) des Primärtumors heraus. Zusätzlich war auch die Assoziation einer hohen Zahl VISTA-positiver Immunzellen pro mm² mit hohem PD-L1-Nachweis in Immunzellen für Primärtumoren signifikant ($p=0,005$).

	Gültig		VISTA in Tumorzellen der Primärtumoren		Anteil VISTA-positiver Immunzellen		VISTA-positive Immunzellen pro mm ²		VISTA in Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen	
	n	(%)	Gültig	p-Wert	Gültig	p-Wert	Gültig	p-Wert	Gültig	p-Wert
			negativ	positiv	niedrig	hoch	niedrig	hoch	negativ	positiv
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
PD-L1 (Tu)	119		118	,057*	118	,004*	118	,016*	74	,496*
niedrig	92 (77,3)	67 (73,6)	24 (26,4)		49 (53,8)	42 (46,2)	48 (52,7)	43 (47,3)	44 (74,6)	15 (25,4)
hoch	27 (22,7)	14 (51,9)	13 (48,1)		6 (22,2)	21 (77,8)	7 (25,9)	20 (74,1)	13 (86,7)	2 (13,3)
PD-L1 (IZ)	139		121	,236*	138	<,001*	138	,005*	83	,794*
niedrig	88 (63,3)	53 (73,6)	19 (26,4)		54 (62,1)	33 (37,9)	52 (59,8)	35 (40,2)	37 (77,1)	11 (22,9)
hoch	51 (36,7)	31 (63,3)	18 (36,7)		15 (29,4)	36 (70,6)	17 (33,3)	34 (66,7)	28 (80,0)	7 (20,0)
PD-L1 (LK)	73		68	,048*	72	,185*	72	,282*	69	,193*
niedrig	54 (74)	34 (68,0)	16 (32,0)		27 (50,9)	26 (49,1)	26 (49,1)	27 (50,9)	42 (82,4)	9 (17,6)
hoch	19 (26)	7 (38,9)	11 (61,1)		6 (31,6)	13 (68,4)	6 (31,6)	13 (68,4)	12 (66,7)	6 (33,3)

Tabelle 3.5 Korrelation des VISTA-Nachweises in Tumor und Lymphknoten mit PD-L1 in Tumor und Lymphknoten. Die Tabelle zeigt VISTA in Tumor- und Immunzellen des Primärtumors und Tumorzellen in Lymphknotenmetastasen gegenüber PD-L1 in Tumor- (Tu) und Immunzellen (IZ) des Primärtumors und Tumorzellen in Lymphknotenmetastasen (LK). p-Werte unterhalb des 0.05% Signifikanzniveaus sind grau unterlegt P-Werte deren Signifikanz nach der Korrektur für multiple Tests nach Simes erhalten blieben sind schwarz unterlegt. Die Art des statistischen Tests ist jeweils an den angegebenen p-Werten vermerkt (*=exakter Test nach Fisher; °=Kendalls Tau). VISTA in Tumorzellen des Primärtumors und der Lymphknotenmetastase wurden dem Median des IRS (jeweils IRS=0) entsprechend in negativ und positiv geteilt. Der Anteil VISTA-positiver Immunzellen wurde an seinem Median (26,3%/52 pro 200) in niedrigen und hohen Nachweis geteilt. VISTA-positive Immunzellen wurden am Median (229) in niedrigen und hohen Nachweis geteilt. Der Nachweis von PD-L1 in Tumorzellen in Primärtumor und Lymphknotenmetastase wurde am Median des von Frau Bregenzer in ihrer Promotionsarbeit etablierten PD-L1-IRS von 2 in hoch und niedrig geteilt. PD-L1 in Immunzellen wurde anhand einer statischen 10% Grenze in niedrigen und hohen Nachweis geteilt.

3.2.5 Vergleich mit therapienaiven Magenkarzinomen

Nachfolgend wird die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Zusammensetzung der Kohorte und Nachweishäufigkeiten von VISTA den Ergebnissen der Untersuchung von Böger et al. an therapienaiven Magenkarzinomen aus dem Jahr 2017 [65] gegenübergestellt (Tabelle 3.6).

464 Fälle therapienaiver Magenkarzinome aus dem Institut für Pathologie des UKSH (Campus Kiel) von 1997 bis 2009 standen der Untersuchung von Böger et al. zur Verfügung. Dem gegenüber steht die vorliegende Studie mit 141 Fällen neoadjuvant/perioperativ behandelter Tumoren aus demselben Institut von 1998 bis 2017.

In beiden Kohorten fanden sich vornehmlich Männer (80% neoadjuvant/perioperativ; 62% therapienaiv) im fortgeschrittenen Alter (Median: 66 Jahre neoadjuvant/perioperativ; 68 Jahre therapienaiv). Der vorherrschende Phänotyp nach Laurén war in beiden Fällen intestinal (44,7% neoadjuvant/perioperativ; 51,7% therapienaiv). Der Anteil proximaler Tumoren in der neoadjuvant/perioperativen Kohorte war mit 63,8% höher als therapienaiv mit 31,5%. Die Eindringtiefe des Tumors in Form der T-Kategorie war therapienaiv in 36% der Fälle pT4 und neoadjuvant/perioperativ in 7,1% ypT4. Der geringere Anteil in dieser Gruppe findet sich dabei gleichmäßig verteilt auf ypT0 bis ypT3.

Der Anteil in Tumorzellen des Primärtumors VISTA-positiver Fälle lag neoadjuvant/perioperativ bei 30,9% und therapienaiv bei 8,8%. In beiden Kohorten lag der median des IRS bei 0. Der Anteil in Immunzellen des Primärtumors VISTA-positiver Fälle lag neoadjuvant/perioperativ bei 98,6% gegenüber therapienaiven 83,6%. Als Maß der Immunzellendichte zeigte sich ein Anstieg des Medians von therapienaiven 272 Immunzellen pro mm² auf neoadjuvant/perioperative 946 pro mm². Der Median der Dichte VISTA-positiver Immunzellen stieg dabei von 35 auf 229 pro mm². Anteilig ergab sich eine Zunahme VISTA-positiver Immunzellen pro 200 von 36 therapienaiv auf 52 neoadjuvant/perioperativ. Der Nachweis von VISTA in Endothelzellen konnte therapienaiv in 23,7% und in dieser Studie in 88% der Primärtumoren und 81,7% der Lymphknotenmetastasen erbracht werden.

	VISTA in Tumorzellen des Primärtumors				Anteil VISTA-positiver Immunzellen pro 200				VISTA-positiv Immunzellen pro mm ²			
	<i>Cut-off</i>				<i>Cut-off</i>				<i>Cut-off</i>			
	negativ		positiv		niedrig		hoch		niedrig		hoch	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Therapienaiv (Böger et al.)	IRS 0 vs. >0				≤36 vs. >36				≤35 vs. >35 per mm²			
	423	(91,2)	41	(8,8)	232	(50)	232	(50)	229	(49,7)	235	(50,3)
Neoadjuvant/perioperativ (aktuelle Studie)	IRS 0 vs. >0				≤52 vs. >52				≤229 vs. >229 per mm²			
	85	(69,1)	38	(30,9)	70	(50)	70	(50)	70	(50)	70	(50)

Tabelle 3.6 Vergleich des Nachweises von VISTA in therapienaiver und neoadjuvant/perioperativ behandelte Kohorte. Die Tabelle zeigt die Gegenüberstellung der Nachweisfrequenzen in der therapienaiven Kohorte von Böger et al. [65] und der neoadjuvant/perioperativ behandelte Kohorte der vorliegenden Studie. Über den Werten ist jeweils der zur Dichotomisierung verwendete Cut-off (stets Median) angegeben.

4 Diskussion und Interpretation

4.1 Rekonstruktion chemotherapeutischer Effekte auf das Vorliegen von VISTA im Magenkarzinom

Diese Arbeit bestätigt den Nachweis von VISTA im neoadjuvant/perioperativ behandelten Magenkarzinom, wie schon durch Böger et al. im chemotherapienaiven Magenkarzinom beobachtet [65]. Zusätzlich ermöglicht sie einen Einblick in tumorimmunologische Prozesse als Ergebnis perioperativ/neoadjuvanter Chemotherapie. Im Folgenden sind Zahlenwerte mit Bezug auf die Untersuchung therapienaiver Magenkarzinome ohne direkte Zitation stets der Originalarbeit von Böger et al. [65] entnommen.

4.1.1 Vergleich der perioperativ/neoadjuvant behandelten Kohorte dieser Arbeit und der Kohorte einer früheren Untersuchung am therapienaiven Magenkarzinome

Das Vorliegen von VISTA im Adenokarzinom des Magens wurde 2017 durch Böger et al. erstmals beschrieben [65].

Die Untersuchung der vorliegenden Arbeit wurde dem Algorithmus von Böger et al. nachempfunden, um im Folgenden einen Vergleich einer therapienaiven mit der hier untersuchten neoadjuvant/perioperativ behandelten Kohorte zu erlauben. Zusätzlich entstammen beide Kohorten verfügbaren Patienten des Instituts für Pathologie des UKSH (Campus Kiel) innerhalb eines vergleichbaren Zeitrahmens. So sollen die Effekte platinbasierter Chemotherapie unter Einfluss möglichst geringer Störfaktoren nachvollzogen werden. Es handelt sich nicht um ein Follow-up, sondern um den Vergleich zweier separater Kohorten aus derselben geografischen Region und dem gleichen ethnischen Hintergrund. Aussagen über Dynamik oder Ursache beobachteter Unterschiede sind als Ergebnis dieses Designs nicht möglich. Auch ein interner Vergleich mit präoperativen Biopsien bot keinen zu erwartenden Mehrwert, da in der therapienaiven Kohorte untersuchte Biopsien als Ergebnis einer intratumoral heterogenen Verteilung von VISTA mit dem hohen Risiko auf Stichprobenfehler belegt waren [65].

Die neoadjuvant/perioperativ behandelte Kohorte und die historische, therapienaive Kohorte zeigen eine ähnliche Zusammensetzung in Bezug auf Geschlecht, Alter und Phänotyp des Magenkarzinoms (vgl. 3.2.5). Unterschiede finden sich in vermehrtem Auftreten proximaler Tumoren im neoadjuvant/perioperativ behandelten Kollektiv und in dem selteneren Vorkommen von Tumoren der Kategorie (y)pT4. Der geringere Anteil von Tumoren in der Kategorie ypT4 (7,1%) verglichen mit therapienaiven Tumoren der Kategorie pT4 (36%) ist dabei am ehesten als Folge der Tumorregression zu erklären, auch wenn die Verteilung der UICC Stadien stabil bleibt. Jenseits der Zusammensetzung stellt die Fallzahl der Kohorten einen zusätzlichen Faktor dar (464 therapienaive vs. 141 neoadjuvant/perioperative Fälle). Diese Differenz macht sich besonders in einigen Zusammenhängen bemerkbar, deren statistische Signifikanz bei kleiner Fallzahl in einzelnen Untergruppen nicht nachweisbar war.

4.1.2 Vergleich der Nachweisfrequenz von VISTA gegenüber therapienaiven Magenkarzinomen

VISTA wurde in der vorliegenden Arbeit in 27% (n=38) der 141 eingeschlossenen Fälle in Tumorzellen des Primärtumors nachgewiesen. Unter Ausschluss vollständiger Regression und ungenügender Auswertbarkeit liegt der Anteil bei 30,9% (n=38) von 123 Primärtumoren. So ist der Anteil VISTA-positiver Tumoren gegenüber der therapienaiven Kohorte von Böger et al. (8,8%) deutlich erhöht. Diese Zunahme ist besonders eindrucksvoll in Fällen geringer Tumorregression mit einem Becker-Regressionsgrad 3. In dieser Gruppe beträgt der Anteil VISTA-positiver Tumoren sogar 41,9%. Aber auch alle niedrigeren Regressionsgrade zeigen eine Nachweisfrequenz oberhalb des therapienaiven Durchschnitts (Abbildung 4.1, A). Allerdings zeigte sich in der therapienaiven Kohorte ein signifikanter Zusammenhang zwischen proximaler Tumorlokalisation und positivem VISTA-Status. Entsprechend muss die erhöhte Menge proximaler Tumoren in der neoadjuvant/perioperativ behandelten Kohorte berücksichtigt werden. Bei der therapienaiven Kohorte betrug der Anteil VISTA-positiver Fälle 5,1% bei distal gelegenen Tumoren und 17,1% bei proximal gelegenen Tumoren. Dem gegenüber wurde VISTA neoadjuvant/perioperativ in 14% (+175% gegenüber therapienaiv) der distal gelegenen Tumoren und 40% (+134% gegenüber therapienaiv) der proximal gelegenen Tumoren nachgewiesen. Die beobachtete Zunahme ist somit gleichermaßen in

den Lokalisationen zu finden und lässt sich nicht allein auf den höheren Anteil proximal gelegener Tumoren in der neoadjuvant/perioperativ behandelten Kohorte zurückführen, sondern muss als Folge der Therapie interpretiert werden.

Der Anteil VISTA-positiver Tumorzellen im neoadjuvant/perioperativ behandelten Magenkarzinom ist innerhalb eines Falls, wie auch therapienaiv, meist gering mit einem Anteil von $\leq 10\%$ in 89,4% der auswertbaren Fälle und zeigt so erneut die schon von Böger et al. beschriebene intratumorale Heterogenität des Vorkommens von VISTA [65].

Immunzellen zeigen sowohl in Bezug auf Gesamtimmunzellichte, als auch in Bezug auf VISTA-positive Immunzellichte und den Anteil VISTA-positiver Immunzellen eine starke Zunahme im neoadjuvant/perioperativ behandelten Magenkarzinom gegenüber therapienaiven Magenkarzinomen (vgl. 3.2.5, S. 36). So kann zum einen eine vermehrte Anwesenheit von Immunzellen im Tumorbett, und zum anderen eine über diese Vermehrung hinaus erhöhte Nachweisfrequenz von VISTA als Folge der Chemotherapie interpretiert werden. In Analogie zu Tumorzellen ist auch für Immunzellen eine Dynamik anhand der Tumorregression nachvollziehbar. Von Becker-Regressionsgrad 1a auf 3 findet sich dabei mehr als eine Verdopplung des Nachweises eines hohen Anteils von VISTA in Immunzellen (Abbildung 4.1, B).

Endothelzellen bilden im neoadjuvant/perioperativ behandelten Magenkarzinom wie auch im therapienaiven Magenkarzinom neben Tumor- und Immunzellen die dritte Zellpopulation mit Nachweis von VISTA. Bemerkenswert ist die Häufigkeit von Fällen mit einer positiven Immunreaktion im chemotherapeutisch behandelten Kollektiv (Primärtumoren: 88%; Lymphknotenmetastasen: 81,7%), verglichen mit einer eher moderaten Häufigkeit in therapienaiven Tumoren (23,7%). Generell ist der Nachweis von VISTA in Endothelzellen mit Blick auf Immun-, aber auch Tumorzellmigration bemerkenswert. Vereinzelt konnte außerdem der Nachweis von VISTA in Histiozyten geführt werden. Welche Rolle VISTA in diesen Zellpopulationen und dessen Zunahme nach Chemotherapeutika spielt, sollte im Rahmen weiterführender Studien evaluiert werden.

Insgesamt ist der Nachweis von VISTA in neoadjuvant/perioperativ behandelten Magenkarzinomen gegenüber therapienaiven Magenkarzinomen sowohl in Tumor- als auch in Immunzellen über alle untersuchten Parameter hinweg erhöht. Insbesondere die Entdeckung eines Zusammenhangs von erhöhtem VISTA-Nachweises in Tumor- und Immunzellen bei geringer Tumorregression spricht dabei für den tumorimmunologischen

Effekt platinbasierter Chemotherapie. VISTA scheint dabei an der Immunevasion in Fällen schlechten Ansprechens auf eine primäre Chemotherapie beteiligt zu sein.

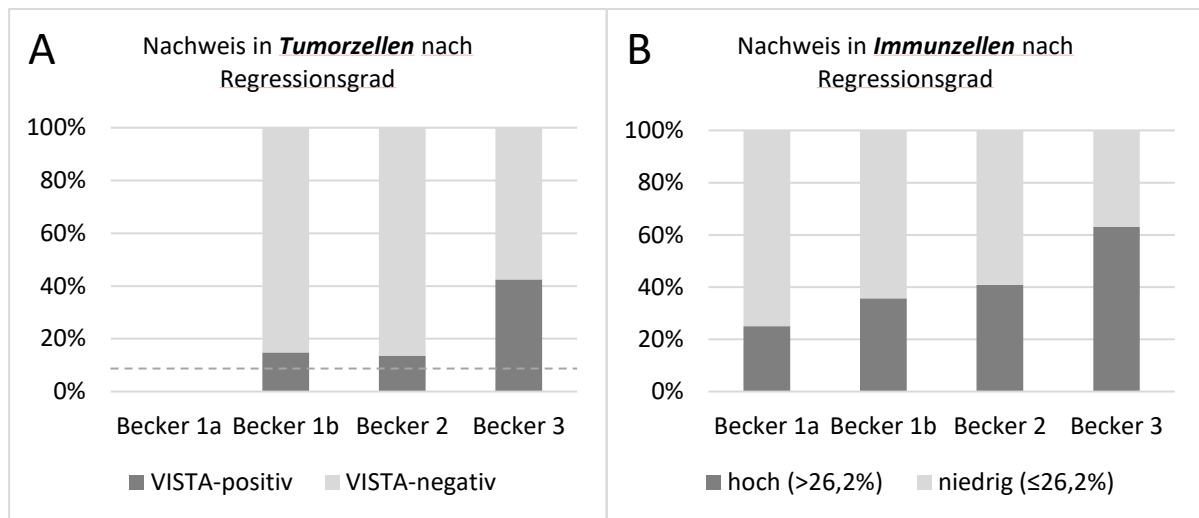


Abbildung 4.1 Anteile des Nachweises von VISTA in Tumor- und Immunzellen nach Tumorregression als Becker-Regressionsgrad. Abbildung A zeigt den Nachweis in Tumorzellen des Primärtumors als am Median des IRS (IRS=0) in positiv und negativ geteilte Fälle gegenüber Becker-Regressionsgrad. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Anteil positiver Fälle in der therapienaiven Untersuchung von Böger et al. (8,8%; ebenfalls bei Teilung am Median des IRS=0) [65]. Abbildung B zeigt den Nachweis in Immunzellen des Primärtumors als am Median des Anteils positiver Immunzellen (36,2%) in hoch und niedrig geteilt gegenüber Becker-Regressionsgrad.

4.1.3 Vergleich der Assoziationen mit klinisch-pathologischen Charakteristika gegenüber therapienaiven Magenkarzinomen

Therapienaive Magenkarzinome zeigten in der Untersuchung von Böger et al. eine Vielzahl an Zusammenhängen mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika. So war der Nachweis von VISTA in Tumorzellen signifikant mit nicht diffusem Phänotyp nach Laurén und proximaler Tumorlokalisation vergesellschaftet [65]. Eine Verteilung dieser Art ist auch in der vorliegenden perioperativ/neoadjuvant behandelten Kohorte zu beobachten, wobei deren Zusammenhang nach der Korrektur für multiple Tests die Signifikanz verlor (vgl. Tabelle 3.3, S. 32). Ausschlaggebend ist an dieser Stelle wahrscheinlich eine geringe Fallzahl in einzelnen Untergruppen, wie beispielsweise lediglich drei phänotypisch diffuse VISTA-positive Fälle und sechs distal gelegene VISTA-positive Fälle. Zusätzlich zeigten therapienaiv auch Immunzellen diese Zusammenhänge. Das Fehlen von Korrelationen mit klinisch-pathologischen Charakteristika für Immunzellen des perioperativ/neoadjuvant behandelten

Magenkarzinoms könnte zusätzlich mit der zuvor beschriebenen und VISTA unabhängigen Stimulation der Immunzellinvasion erklärt werden.

Böger et al. konnten in der therapienaiven Kohorte eine Korrelation zwischen dem Nachweis von VISTA und der T-Kategorie aufzeigen. Dabei bestand ein signifikanter Zusammenhang von VISTA und T-Kategorie im Anstieg des Vorliegens von pT1 zu pT2 und dem Abfall von pT2 zu pT3 [65]. In der perioperativ/neoadjuvant behandelten Kohorte ist ein solcher Verlauf über die T-Kategorie angedeutet zu erkennen, aber vermutlich auf Grund der geringen Fallzahl nicht signifikant (vgl. Tabelle 3.3, S. 32). Neu zeigt jedoch das UICC-Stadium neoadjuvant/perioperativ behandelt ein vergleichbares Muster mit signifikantem Anstieg von UICC-Stadium I bis III und Abnahme von UICC-Stadium III zu IV (Abbildung 3.7, S. 28). Das Auftreten dieses vergleichbaren Phänomens untermauert die von Böger et al. vorgetragene Hypothese des Verlustes von VISTA in fortgeschrittenen oder tief invadierenden Karzinomen als Kennzeichen eines adaptiven Prozesses während der Tumorprogression [65]. In diesem Zusammenhang ist auch der Verlust von VISTA im Rahmen einer epithelial-mesenchymaler Transition des Magenkarzinoms beschrieben [52].

Ein positiver EBV-Status war therapienaiv signifikant mit VISTA in Immunzellen assoziiert [65]. Bei den neoadjuvant/perioperativ behandelten Tumoren war dieser Zusammenhang bei kleiner Zahl nicht signifikant. Die bereits bekannte Assoziation von negativem EBV-Status in proximalen Magenkarzinomen [27] spiegelt sich so bei einem hohen Anteil proximaler Tumoren mit nur insgesamt drei EBV-positiven Fällen wider. Alle drei Fälle waren dabei jedoch in der Gruppe hohen VISTA-Nachweises in Immunzellen zu finden. Tumorzellen zeigten in beiden Kohorten keine signifikante Assoziation mit dem EBV-Status. Ebenso zeigten beide Kohorten keine signifikante Assoziation mit MSI-, MET- und HER2-Status.

Böger et al. schlussfolgerten aus der Kombination von intestinalem Phänotyp nach Lauén, proximaler Lokalisation, *KRAS*-Mutation und angedeuteter Assoziation mit HER2-Positivität, dass VISTA-positive Magenkarzinome der Gruppe der chromosomal instabilen Karzinome angehören könnten [65]. Da in der vorliegenden Arbeit bei kleinen Fallzahlen jedoch keiner der genannten Zusammenhänge statistische Signifikanz aufweist, lässt sich diese Hypothese hier weder bestätigen noch widerlegen. Untersuchungen an größeren Kohorten sollten zukünftig genaueren Aufschluss über die Zusammenhänge von VISTA mit genetischen Subtypen geben.

4.2 VISTA als potenzielles Ziel eines immuntherapeutischen Ansatzes

Der vermehrte Nachweis von VISTA nach neoadjuvanter/perioperativer Chemotherapie macht diesen Immun-Checkpoint-Inhibitor besonders interessant als potenzielles Ziel eines immuntherapeutischen Ansatzes im Magenkarzinom. Im Folgenden werden daher Möglichkeiten der Erhebung des VISTA-Status aus Biopsien und Metastasen diskutiert. Außerdem wird die augmentierte adjuvante Chemotherapie als mögliches Anwendungsszenario gegen VISTA gerichteter Immuntherapie skizziert. Zuletzt erfolgt die Einordnung in aktuelle Erkenntnisse zu kombinierten Ansätzen der Anti-Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie.

4.2.1 Erhebung des VISTA-Status in Biopsien und Metastasen

Biopsien bieten klinisch meist die erste Möglichkeit, Tumorgewebe eines Patienten pathologisch zu untersuchen. Doch bestätigt die vorliegende Arbeit erneut eine intratumoral heterogene Verteilung von VISTA (vgl. 4.1.2). Entsprechend besteht auch bei neoadjuvant/perioperativ behandelten Magenkarzinomen die Gefahr eines Stichprobenfehlers analog zu der Beobachtung von Böger et al. [65] in chemotherapienaiven Magenkarzinomen.

Lymphknoten- und Fernmetastasen geben einen Einblick in weitere Manifestationen desselben Tumors innerhalb eines Patienten und in verschiedenen Tumormikromilieus. Lymphknotenmetastasen zeigen nach neoadjuvanter/perioperativer Chemotherapie keine Assoziationen mit den für den Primärtumor erhobenen klinisch-pathologischen Patientencharakteristika. Selbst Verteilungstendenzen wie sie, wenn auch ohne statistische Signifikanz nach der Korrektur für multiple Tests, im Primärtumor zu finden waren, gibt es für Lymphknotenmetastasen nicht. Trotzdem korrelieren die IRS der Primärtumoren und die IRS der Lymphknotenmetastasen signifikant miteinander ($p < 0,001$). Ursächlich für diese Diskrepanz könnte eine Gruppe diskordanter VISTA-Nachweise in Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen sein. Aber auch Unterschiede im Hinblick auf Tumorregression könnten eine Rolle spielen. So fällt auf, dass der Nachweis von VISTA nur in 11 Fällen konkordant sowohl im Primärtumor als auch in der Lymphknotenmetastase beobachtet wurde. 22 Fälle hingegen zeigten eine diskordante VISTA-Positivität mit

Nachweis nur im Primärtumor oder nur in der Lymphknotenmetastase. Der positive prädiktive Wert des positiven VISTA-Status der Lymphknotenmetastase für einen positiven Status des Primärtumors liegt nur bei 64,7%. Gleichzeitig lagen in 7 von 16 tumorzellfreien Primärtumoren (ypT0) zugehörige Lymphknotenmetastasen mit vitalen Tumorzellen vor und belegen, dass Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen unterschiedlich auf die neoadjuvante/perioperative Chemotherapie ansprechen, was wiederum auch den Nachweis von VISTA beeinflusst.

Fernmetastasen zeigten ebenfalls Unterschiede zu den Primärtumoren. So war in keinem Fall einer VISTA-positiven Metastase der Primärtumor VISTA-positiv und umgekehrt. Eine Konkordanz fand sich nur in VISTA-negativen Fällen (vgl. Tabelle 3.2).

Im Ergebnis erlauben weder Biopsien vom Primärtumor noch die Untersuchung von Lymphknoten- oder Fernmetastasen Rückschlüsse auf den VISTA-Status des Primärtumors. Zusätzlich gibt es starke Hinweise auf eine immunmechanistische Trennung von VISTA in Primärtumoren und zugehörigen Lymphknoten- und Fernmetastasen, möglicherweise im Zusammenhang mit Unterschieden des Tumormikromilieus. Wenn VISTA in zukünftigen Studien als prädiktiver Biomarker evaluiert werden sollte, muss dem Probeentnahmeverfahren (Biopsie vs. Resektat) und dem Probenort (Primärtumor vs. Metastase) besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

4.2.2 VISTA als Teil einer augmentierten adjuvanten Therapie

Bislang sind die Effekte eines gezielten Ausschaltens von VISTA nur im Mausmodell und an einzelnen humanen Zelllinien erprobt. So konnte für Ovarial- und Endometriumkarzinome in humanen Tumorzellen positive Effekte einer VISTA-Blockade auf die intratumorale Immunantwort, und im Mausmodell auf Überlebenszeit gezeigt werden [69]. Für das Magenkarzinom liegen noch keine Erkenntnisse vor.

An dieser Stelle zeigt die vorliegende Arbeit eine bemerkenswerte Konstellation von VISTA und dem Ansprechen auf neoadjuvante/perioperative Chemotherapie. Mehr als die Hälfte (52,5%) der untersuchten Magenkarzinome zeigen ein schlechtes Ansprechen auf die erfolgte Chemotherapie (Becker-Regressionsgrad 3; $\geq 50\%$ vitale Tumorresiduen). In dieser Gruppe findet sich gleichzeitig der Größte Anteil VISTA-positiver Tumoren bezogen auf die Tumor- (63,5%) und/oder Immunzellen (41,9%) (vgl. 4.1.2). So dient das schlechte

Ansprechen auf neoadjuvante/perioperative Chemotherapie im Operationsresektat gleichzeitig als Indikator eines wahrscheinlichen Vorliegens von VISTA und könnte künftig Anlass für die Bestimmung des VISTA-Status mittels Immunhistochemie an Großflächenschnitten sein. Die Evaluation adjuvanter Weiterbehandlung ist nach aktueller Leitlinie [31] bereits vorgesehen und könnten zukünftig Patienten mit einem positiven VISTA-Status einer um VISTA-Inhibitoren ergänzten adjuvanten Chemotherapie zuführen.

Das Prinzip einer solchen durch gezielte Immuntherapie augmentierten Chemotherapie bestätigt sich eindrucksvoll im nicht kleinzelligen Lungenkarzinom, wo durch die Ergänzung um Pembrolizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen PD-1, eine Verlängerung der Progressionsfreiheit und des Gesamtüberlebens bewirkt werden konnte [70].

Für VISTA fehlen derzeit noch entsprechende Medikamente. Zuletzt wurde die einzige Phase 1 Studie zu einem monoklonalen Antikörper gegen VISTA abgebrochen (NCT02671955). So verbleibt zum aktuellen Zeitpunkt nur noch ein kombinierter PD-L1/2 und VISTA Antagonist in einer Phase 1 Studie (CA-170; NCT02812875).

4.2.3 Kombinierte Anti-Immun-Checkpoint-Regulator Therapie im Magenkarzinom

Eine gezielte Immuntherapie wird für das Magenkarzinom zum aktuellen Zeitpunkt nicht empfohlen [31]. Dennoch werden mögliche Ziele einer personalisierten Therapie in einer Vielzahl von Studien untersucht. Besonders Immun-Checkpoint-Regulatoren liegen dabei im Fokus, deren Vertreter PD-1/PD-L1 und CTLA-4 insbesondere Gegenstand aktueller Forschung sind [71]. Mit VISTA kommt nun ein weiteres Protein mit vielversprechenden Eigenschaften hinzu. So ist bereits bekannt, dass VISTA und andere Immun-Checkpoint-Regulatoren der B7-Familie an nicht redundante Signalwege gekoppelt sind [64]. Auch wurde im Melanom bereits die unabhängige Expression von VISTA und PD-L1 nachgewiesen [72]. Entsprechend muss besonders in der Überlegung über VISTA und PD-L1 als Therapieziele ein mögliches Ausweichen in die Immunevasion mittels des jeweils anderen Proteins bedacht werden. Die reaktive Hochregulation von VISTA konnte bereits für das Melanom mit einer gegen PD-L1 gerichteten Therapie [73], und für das Prostatakarzinom mit einer kombiniert gegen PD-1 und CTLA-4 gerichteten Therapie [74] gezeigt werden. Im Magenkarzinom zeigte eine Untersuchung der mRNA-Expression, dass 18 von 19

untersuchten Patienten mit einem Magenkarzinom mit lymphoidem Stroma und einer Expression von PD-1-mRNA gleichzeitig VISTA-, CTLA-4- oder mRNA beider Immun-Checkpoint-Regulatoren exprimierten [75]. Entsprechend gibt eine kombinierte Therapie Hoffnung auf eine breitere Wirkung gegen Mechanismen der Immunevasion.

Böger et al. untersuchten in einer Studie aus 2016 PD-L1 im therapienaiven Magenkarzinom [47]. Mit Hilfe dieser Daten wurde im therapienaiven Magenkarzinom das gemeinsame Vorliegen von VISTA und PD-L1 in Tumor- und Immunzellen und eine Assoziation von VISTA in Immunzellen und PD-L1 in Tumorzellen nachgewiesen [65]. Eine Assoziation von VISTA in Immunzellen und PD-L1 in Tumorzellen besteht auch nach neoadjuvanter/perioperativer Chemotherapie. Ein gemeinsames Vorliegen lässt sich jedoch nur noch in Immunzellen, nicht aber in Tumorzellen, als signifikant bestätigen. Obgleich das gemeinsame Vorkommen in Tumorzellen nach neoadjuvanter/perioperativer Chemotherapie keine statistische Signifikanz aufweist, bilden Tumoren mit VISTA- und PD-L1-Nachweis eine Subgruppe von etwa 10% (13/112) der untersuchten Fälle. PD-L1 und/oder VISTA lassen sich sogar in etwa 45% aller Fälle nachweisen. Therapienaiv umfasste diese Gruppe nur etwa 35% der Fälle [65]. Es zeichnet sich dabei eine heterogene Regulation nach der Exposition zu platinbasierter Chemotherapie ab. So ist die Ausweitung der Gruppe mit VISTA- und/oder PD-L1 im neoadjuvant/perioperativ behandelten Magenkarzinom vor allem in dem vermehrten Nachweis von VISTA begründet (+251% gegenüber therapienaiv). Ein PD-L1-Nachweis liegt hingegen im Mittel sogar seltener vor (-25% gegenüber therapienaiv) [76]. Gleichzeitig teilen beide Proteine ein häufigeres Auftreten in Abhängigkeit schlechten Ansprechens auf Chemotherapie. In dieser Subgruppe (Becker-Regressionsgrad 3; $\geq 50\%$ vitale Tumorresiduen) ist VISTA stark vermehrt nachweisbar (+376% gegenüber therapienaiv), und PD-L1 erreicht etwa das Niveau therapienaiver Magenkarzinome (-3%) [76]. Der Nachweis von VISTA- und/oder PD-L1 erreicht in der Gruppe der Tumoren mit Becker-Regressionsgrad 3 einen Anteil von 56% (Abbildung 4.2).

VISTA und PD-L1 in Immunzellen des Primärtumors sind signifikant miteinander assoziiert, unterliegen gleichzeitig aber einer heterogenen Regulation. Wie zuvor demonstriert lässt VISTA sich in Immunzellen bei allgemeiner Zunahme der Immunzellendichte auch anteilig gegenüber therapienaiven Magentumoren vermehrt nachweisen (+47,2% gegenüber therapienaiv). Im Gegensatz dazu erreicht PD-L1 in Immunzellen nicht den Anteil an Fällen mit hohem Nachweis, wie er therapienaiv zu finden war (-53,5%) [76]. Wird erneut nur die

Gruppe der Tumoren mit schlechtem Therapieansprechen (Becker-Regressionsgrad 3) betrachtet, sind sowohl VISTA als auch PD-L1 in Immunzellen gegenüber dem neoadjuvant/perioperativ behandelten Durchschnitt und therapienaiv beobachteten Werten erhöht (VISTA: +252,7%; PD-L1: +40,8% gegenüber therapienaiv) [76].

Anders als in der therapienaiven Kohorte, wo EBV-Positivität ausschließlich auf Fälle mit PD-L1 in Tumoren beschränkt war und MSI in keinem exklusiv VISTA-positiven Fall beobachtet wurde [65], besteht eine solche Trennung nach neoadjuvanter/perioperativer Chemotherapie nicht. EBV-Positivität ist hier auch in Fällen des gemeinsamen Nachweises von VISTA und PD-L1, und MSI in VISTA-positiven Tumoren zu finden (Abbildung 4.3).

Diese Arbeit zeigt eine heterogene Regulation der beiden Immun-Checkpoint-Regulatoren VISTA und PD-L1. Einen Anteil an dieser Beobachtung könnte die jüngst neu beschriebene Interaktion von VISTA und PSGL-1 in saurem Milieu sein [54]. Die gesteigerte Entzündungsreaktion, wie Sie an dem Anstieg der Immunzellichte zu erkennen war, könnte über eine Senkung des pH die Immunevasion mittels VISTA besonders begünstigt haben. Parallel zu diesem Mechanismus ist der vermehrte Nachweis in Fällen schlechten Therapieansprechens und ein teilweise gemeinsames Vorkommen nach neoadjuvanter/perioperativer Chemotherapie für beide Immun-Checkpoint-Regulatoren zu beobachten. Eine bei therapienaiven Tumoren beobachtete Trennung nach genetischen Alterationen lässt sich nicht bestätigen. Die gezielte einzelne oder kombinierte Therapie gegen VISTA und PD-L1 scheint besonders für einen therapieresistenten Verlauf interessant. Weiterführende Untersuchungen in diesem Feld sind dringend nötig, um die Ergebnisse dieser Arbeit zu überprüfen und den klinischen Nutzen der Immuntherapie für das Magenkarzinom zu evaluieren.

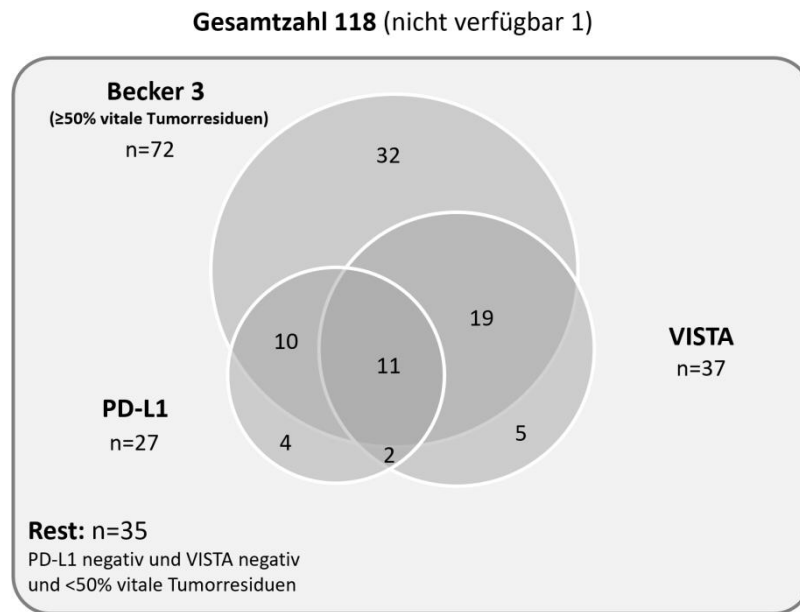


Abbildung 4.2 Mengendiagramm der Überschneidung von Becker-Regressionsgrad 3 und dem Nachweis von VISTA und PD-L1. Die angegebenen Mengen beziehen sich auf Fälle mit einem Nachweis des jeweiligen Proteins oder des Becker-Regressionsgrades 3 (Becker 3; $\geq 50\%$ vitale Tumorresiduen). Eingeschlossen wurden 119 Fälle mit $>0\%$ vitalen Tumorresiduen und verfügbarem PD-L1 Status [76]. Für 118 Fälle waren Informationen zu allen dargestellten Eigenschaften verfügbar.

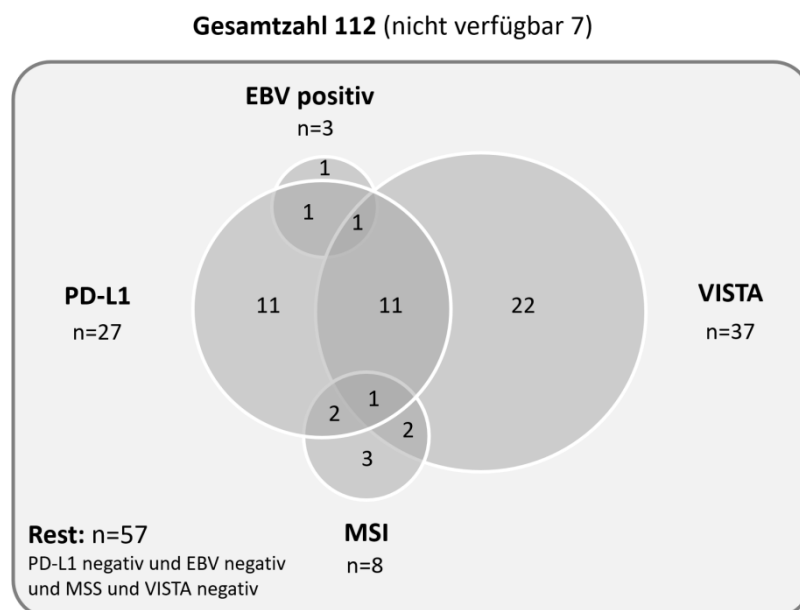


Abbildung 4.3 Mengendiagramm der Überschneidungen zwischen PD-L1-, VISTA-, MSI- und EBV-positiven Tumoren. Die angegebenen Mengen beziehen sich auf Fälle mit einem Nachweis des jeweiligen Proteins oder der genannten genetischen Alteration (Mikrosatelliteninstabilität (MSI); Mikrosatellitenstabilität (MSS); Epstein-Barr-Virus (EBV) Positivität oder Negativität) in Tumorzellen des Primärtumors. Eingeschlossen wurden 119 Fälle mit $>0\%$ vitalen Tumorresiduen und verfügbarem PD-L1 Status [76]. Für 112 Fälle waren Informationen zu allen dargestellten Eigenschaften verfügbar.

Zusammenfassung

Das Magenkarzinom hat trotz großer Fortschritte in chirurgischer und chemotherapeutischer Therapie noch immer eine insgesamt schlechte Prognose. Zugrunde liegt meist ein bei Diagnosestellung bereits fortgeschrittenes Tumorgeschehen. Zunehmendes Verständnis um die Relevanz immunevasorischer Prozesse in Tumorzellen weckt nun das Interesse diese Effekte zu charakterisieren und potenzielle Therapieziele zu identifizieren.

Diese Arbeit befasst sich mit VISTA (V-domain immunoglobulin(Ig)-containing suppressor of T-cell activation), einem neuen Mitglied der B7-Membranproteinfamilie. Diese Proteine zeichnen sich durch ihre Funktion als Immun-Checkpoint-Regulatoren aus und umfassen klinisch bereits relevante Vertreter wie CTLA-4 und PD-1/PD-L1. VISTA übernimmt die Rolle eines Immun-Checkpoint-Inhibitors und induziert vor allem Effekte der Immunkontrolle. Der Nachweis bei Magenkarzinomen und zugehörigen tumorinfiltrierenden Lymphozyten konnte bereits geführt werden, doch ist bislang nichts über den Nachweis von VISTA nach neoadjuvanter/perioperativer Chemotherapie bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, diese Wissenslücke zu schließen und den Nachweis von VISTA in neoadjuvant/perioperativ behandelten Magenkarzinomen zu charakterisieren und im Vergleich mit einer Kohorte therapienaiver Magenkarzinome Rückschlüsse auf die Effekte platinbasierter Chemotherapie zu ziehen.

Es wurden Gewebeschnitte von 141 Fällen neoadjuvant behandelter Magenkarzinome mit 93 korrespondierenden regionären Lymphknoten- und 15 Fernmetastasen immunhistochemisch gegen VISTA gefärbt. Mikroskopisch wurden prozentualer Anteil und Intensität immunreaktiver vitaler Tumorzellen ermittelt. Positive Immunzellen (z.B. Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen) wurden pro Gesichtsfeld bei 400x Vergrößerung für Primärtumoren, geeignete Lymphknoten und Fernmetastasen ausgezählt. Die Ergebnisse wurden anschließend mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika korreliert, und den Ergebnissen einer früheren Untersuchung durch Böger et al. an therapienaiven Magenkarzinomen verglichen.

VISTA wurde in 38 (30,9%) Primärtumoren, 18 (21,7%) korrespondierenden Lymphknoten- und 5 (33%) Fernmetastasen nachgewiesen. Der Nachweis korrelierte in Tumor- und Immunzellen signifikant mit einer geringen Tumorregression (Becker-Regressionsgrad: $p=0,002$; $p<0,001$). Außerdem bestand ein Zusammenhang von VISTA in Immunzellen und

dem verwandten Immun-Checkpoint-Inhibitor PD-L1 in Immun- und Tumorzellen ($p < 0,001$; $p = 0,004$).

Diese Studie zeigt erstmals, dass VISTA in neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen und dessen Metastasen nachweisbar ist. Der Zusammenhang eines vermehrten Vorkommens in Fällen geringer oder keiner Tumorregression spricht für einen Einfluss auf das Therapieansprechen durch die Beteiligung an Immunevasionsprozessen. Der Vergleich mit Fällen therapienaiver Magenkarzinome zeigt eine deutliche Erhöhung von VISTA in Tumor- und Immunzellen nach der Exposition zu platinbasierter Chemotherapie.

Das gemeinsame Vorkommen mit PD-L1 präsentiert ein Ziel kombinierter VISTA- und PD-L1-Blockade bei nicht redundanten Signalwegen. Außerdem könnten besonders Patienten mit einem auf konventionelle Chemotherapie schlecht ansprechenden Tumor in Zukunft von einer um VISTA-Inhibitoren ergänzten adjuvanten Therapie profitieren.

Literatur

- 1 *Crew KD, Neugut AI.* Epidemiology of gastric cancer. *World journal of gastroenterology* 2006; 12(3): 354–362
- 2 *Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018; 68(6): 394–424
- 3 *Nagini S.* Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World journal of gastrointestinal oncology* 2012; 4(7): 156–169
- 4 *Robert Koch-Institut.* Berichts zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016: RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut); 2016
- 5 *Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland.* Krebs in Deutschland 2011/2012. 10th ed. Berlin; 2015
- 6 *Trédaniel J, Boffetta P, Buiatti E et al.* Tobacco smoking and gastric cancer: Review and meta-analysis. *International journal of cancer* 1997; 72(4): 565–573
- 7 *Jakszyn P.* Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence. *World journal of gastroenterology* 2006; 12(27): 4296
- 8 *Brooks-Wilson AR.* Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: Assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *Journal of Medical Genetics* 2004; 41(7): 508–517
- 9 *Martel C de, Ferlay J, Franceschi S et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis. *The Lancet. Oncology* 2012; 13(6): 607–615
- 10 *Correa P.* A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer research* 1988; 48(13): 3554–3560
- 11 *Correa P.* Helicobacter pylori and gastric cancer: State of the art. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 1996; 5(6): 477–481
- 12 *Marshall BJ, Warren JR.* Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet (London, England)* 1984; 1(8390): 1311–1315

- 13 INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS: Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori. 61st ed. Lyon, France; 1994
- 14 Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in Helicobacter pylori infection. Gastroenterology 2008; 134(1): 306–323
- 15 Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, Hrsg. Helicobacter pylori: Physiology and genetics. Washington, DC: ASM Press; 2001
- 16 Smoot DT. How Does Helicobacter pylori Cause Mucosal Damage?: Direct Mechanisms. Gastroenterology 1997; 113(6): S31-S34
- 17 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. The New England journal of medicine 2001; 345(11): 784–789
- 18 Amieva M, Peek RM. Pathobiology of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer. Gastroenterology 2016; 150(1): 64–78
- 19 Pounder RE, Ng D. The prevalence of Helicobacter pylori infection in different countries. Alimentary pharmacology & therapeutics 1995; 9 Suppl 2: 33–39
- 20 Blaser MJ. Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases. EMBO reports 2006; 7(10): 956–960
- 21 Röcken C. Tumoren und Tumorstadien des Magens. Der Pathologe 2017; 38(2): 75–86
- 22 Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Clinical microbiology reviews 2006; 19(3): 449–490
- 23 González CA, Sala N, Rokkas T. Gastric cancer: Epidemiologic aspects. Helicobacter 2013; 18 Suppl 1: 34–38
- 24 Buckland G, Agudo A, Luján L et al. Adherence to a Mediterranean diet and risk of gastric adenocarcinoma within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort study. The American journal of clinical nutrition 2010; 91(2): 381–390
- 25 Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J et al. Familial gastric cancer: Genetic susceptibility, pathology, and implications for management. The Lancet Oncology 2015; 16(2): e60-e70
- 26 van der Post RS, Vogelaar IP, Carneiro F et al. Hereditary diffuse gastric cancer: Updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. Journal of Medical Genetics 2015; 52(6): 361–374

- 27 *Carl-McGrath S, Ebert M, Röcken C.* Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis. *Cancer therapy*; 2007(Vol. 5): 879–896
- 28 *Bosman FT, Hrsg.* WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2010
- 29 Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014; 513(7517): 202–209
- 30 *Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C.* TNM classification of malignant tumours; 2017
- 31 *Leitlinienprogramm Onkologie.* S3-Leitlinie Magenkarzinom: Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs. AWMF-Registernummer: 032/009OL; 2019. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Magenkarzinom/Version_2/LL_Magenkarzinom_Langversion_2.0.pdf (18.11.2019)
- 32 *Feng G-S, Ma J-L, Wong BCY et al.* Celecoxib-related gastroduodenal ulcer and cardiovascular events in a randomized trial for gastric cancer prevention. *World journal of gastroenterology* 2008; 14(28): 4535
- 33 *Jain VK, Cunningham D, Rao S.* Chemotherapy for operable gastric cancer: Current perspectives. *Indian journal of surgical oncology* 2011; 2(4): 334–342
- 34 *Choi YY, Noh SH, Cheong J-H.* Evolution of Gastric Cancer Treatment: From the Golden Age of Surgery to an Era of Precision Medicine. *Yonsei medical journal* 2015; 56(5): 1177–1185
- 35 *Cunningham D, Allum WH, Stenning SP et al.* Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *The New England journal of medicine* 2006; 355(1): 11–20
- 36 *Walsh TN, Noonan N, Hollywood D et al.* A comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma. *The New England journal of medicine* 1996; 335(7): 462–467
- 37 *Al-Batran S-E, Homann N, Schmalenberg H et al.* Perioperative chemotherapy with docetaxel, oxaliplatin, and fluorouracil/leucovorin (FLOT) versus epirubicin, cisplatin, and fluorouracil or capecitabine (ECF/ECX) for resectable gastric or gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma (FLOT4-AIO): A multicenter, randomized phase 3 trial. *JCO* 2017; 35(15_suppl): 4004

- 38 *Bang Y-J, van Cutsem E, Feyereislova 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 (London, England)* 2010; 376(9742): 687–697
- 39 *Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ et al.* Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): An international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 2014; 383(9911): 31–39
- 40 *Wong H, Yau T.* Molecular targeted therapies in advanced gastric cancer: Does tumor histology matter? *Therapeutic advances in gastroenterology* 2013; 6(1): 15–31
- 41 *Yu B, Xie J.* Identifying therapeutic targets in gastric cancer: The current status and future direction. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2016; 48(1): 90–96
- 42 *Carreno BM, Collins M.* The B7 family of ligands and its receptors: New pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annual review of immunology* 2002; 20: 29–53
- 43 *Collins M, Ling V, Carreno BM.* The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome biology* 2005; 6(6): 223
- 44 *Hanahan D, Weinberg RA.* Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674
- 45 *Ni L, Dong C.* New B7 Family Checkpoints in Human Cancers. *Molecular cancer therapeutics* 2017; 16(7): 1203–1211
- 46 *Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB et al.* Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007; 27(1): 111–122
- 47 *Böger C, Behrens H-M, Mathiak M et al.* PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget* 2016; 7(17): 24269–24283
- 48 *Leitlinienprogramm Onkologie.* Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms: Kurzversion 2.0; 2016. <http://leitlinienprogrammmonkologie.de/Melanom.65.0.html> (09.03.2019)
- 49 *Leitlinienprogramm Onkologie.* Prävention, Diagnostik, Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms: Langversion 1.0; 2018. <https://www.leitlinienprogramm->

- onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Lungenkarzinom/LL_Lungenkarzinom_Langversion_1.0.pdf (09.03.19)
- 50 Ceeraz S, Nowak EC, Noelle RJ. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends in immunology* 2013; 34(11): 556–563
- 51 Ceeraz S, Sergent PA, Plummer SF et al. VISTA Deficiency Accelerates the Development of Fatal Murine Lupus Nephritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2017; 69(4): 814–825
- 52 Oliveira P, Carvalho J, Rocha S et al. Dies1/VISTA expression loss is a recurrent event in gastric cancer due to epigenetic regulation. *Scientific reports* 2016; 6: 34860
- 53 Wang J, Wu G, Manick B et al. VSIG-3 as a ligand of VISTA inhibits human T-cell function. *Immunology* 2019; 156(1): 74–85
- 54 Johnston RJ, Su LJ, Pinckney J et al. VISTA is an acidic pH-selective ligand for PSGL-1. *Nature* 2019; 574(7779): 565–570
- 55 Le Mercier I, Chen W, Lines JL et al. VISTA Regulates the Development of Protective Antitumor Immunity. *Cancer research* 2014; 74(7): 1933–1944
- 56 Yoon KW, Byun S, Kwon E et al. Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science (New York, N.Y.)* 2015; 349(6247): 1261669
- 57 Lines JL, Sempere LF, Broughton T et al. VISTA is a novel broad-spectrum negative checkpoint regulator for cancer immunotherapy. *Cancer immunology research* 2014; 2(6): 510–517
- 58 Lines JL, Pantazi E, Mak J et al. VISTA is an immune checkpoint molecule for human T cells. *Cancer research* 2014; 74(7): 1924–1932
- 59 Le Mercier I, Lines JL, Noelle RJ. Beyond CTLA-4 and PD-1, the Generation Z of Negative Checkpoint Regulators. *Frontiers in immunology* 2015; 6: 418
- 60 Ceeraz S, Eszterhas SK, Sergent PA et al. VISTA deficiency attenuates antibody-induced arthritis and alters macrophage gene expression in response to simulated immune complexes. *Arthritis research & therapy* 2017; 19(1): 270
- 61 Ohno T, Zhang C, Kondo Y et al. The immune checkpoint molecule VISTA regulates allergen-specific Th2-mediated immune responses. *International immunology* 2018; 30(1): 3–11
- 62 Li N, Xu W, Yuan Y et al. Immune-checkpoint protein VISTA critically regulates the IL-23/IL-17 inflammatory axis. *Scientific reports* 2017; 7(1): 1485

- 63 Prodeus A, Abdul-Wahid A, Sparkes A et al. VISTA.COMP - an engineered checkpoint receptor agonist that potently suppresses T cell-mediated immune responses. *JCI insight* 2017; 2(18)
- 64 Liu J, Yuan Y, Chen W et al. Immune-checkpoint proteins VISTA and PD-1 nonredundantly regulate murine T-cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015; 112(21): 6682–6687
- 65 Böger C, Behrens H-M, Krüger S, Röcken C. The novel negative checkpoint regulator VISTA is expressed in gastric carcinoma and associated with PD-L1/PD-1: A future perspective for a combined gastric cancer therapy? *Oncoimmunology* 2017; 6(4): e1293215
- 66 Immunhistochemie. In: Lang G, editor. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Vienna: Springer-Verlag/Wien; 2006: 257–294
- 67 Becker K, Mueller JD, Schulmacher C et al. Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 2003; 98(7): 1521–1530
- 68 Benjamini Y. Discovering the false discovery rate. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* 2010; 72(4): 405–416
- 69 Mulati K, Hamanishi J, Matsumura N et al. VISTA expressed in tumour cells regulates T cell function. *British journal of cancer* 2019; 120(1): 115–127
- 70 Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine* 2018; 378(22): 2078–2092
- 71 Ishii T, Kawazoe A, Shitara K. Dawn of precision medicine on gastric cancer. *International journal of clinical oncology* 2019
- 72 Morales-Betanzos CA, Lee H, Gonzalez Ericsson PI et al. Quantitative Mass Spectrometry Analysis of PD-L1 Protein Expression, N-glycosylation and Expression Stoichiometry with PD-1 and PD-L2 in Human Melanoma. *Molecular & cellular proteomics MCP* 2017; 16(10): 1705–1717
- 73 Kakavand H, Jakkett LA, Menzies AM et al. Negative immune checkpoint regulation by VISTA: A mechanism of acquired resistance to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma patients. *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2017; 30(12): 1666–1676

- 74 Gao J, Ward JF, Pettaway CA et al. VISTA is an inhibitory immune checkpoint that is increased after ipilimumab therapy in patients with prostate cancer. *Nature medicine* 2017; 23(5): 551–555
- 75 Gullo I, Carvalho J, Martins D et al. The Transcriptomic Landscape of Gastric Cancer: Insights into Epstein-Barr Virus Infected and Microsatellite Unstable Tumors. *International journal of molecular sciences* 2018; 19(7)
- 76 Schoop H, Bregenzer A, Halske C et al. Therapy Resistance in Neoadjuvantly Treated Gastric Cancer and Cancer of the Gastroesophageal Junction is Associated with an Increased Expression of Immune Checkpoint Inhibitors—Comparison Against a Therapy Naïve Cohort. *Translational Oncology* 2020; 13(2): 165–176

Anhang

	Gültig		HER2-Status				MET-Status				MSI-Status								
	n	(%)	Gültig		p-Wert		Gültig		p-Wert		Gültig		p-Wert						
			negativ	positiv	negativ	positiv	MSS	MSI	n	(%)	n	(%)							
Geschlecht	140		122				124					121							
Weiblich	28	(20,0)	21	(100)	0	(0,0)	21	(95,5)	1	(4,5)	17	(77,3)	3	(22,7)					
Männlich	112	(80,0)	93	(92,1)	8	(7,9)	97	(95,1)	5	(4,9)	96	(97,0)	5	(3,0)					
Alter	140		116				118					116							
< 66 Jahre	70	(50,0)	48	(90,6)	5	(9,4)	52	(94,5)	3	(5,5)	52	(98,1)	1	(1,9)					
≥ 66 Jahre	70	(50,0)	60	(95,2)	3	(4,8)	60	(95,2)	3	(4,8)	56	(88,9)	7	(11,1)					
Lokalisation	140		122				124					121							
Proximal	90	(64,3)	74	(91,4)	7	(8,6)	78	(95,1)	4	(4,9)	76	(96,2)	3	(3,8)					
Distal	50	(53,7)	40	(97,6)	1	(2,4)	40	(95,2)	2	(4,8)	37	(88,1)	5	(11,9)					
Laurén	140		122				124					121							
Intestinal	62	(44,3)	51	(86,4)	8	(13,6)	60	(98,4)	1	(1,6)	56	(94,9)	3	(5,1)					
Diffus	26	(18,6)	24	(100)	0	(0,0)	20	(83,3)	4	(16,7)	22	(91,7)	2	(8,3)					
Gemischt	26	(18,6)	26	(100)	0	(0,0)	26	(100)	0	(0,0)	22	(88,0)	3	(12,0)					
Unklass.	14	(10,0)	13	(100)	0	(0,0)	12	(93,3)	1	(7,7)	13	(100)	0	(0,0)					
Vollständige Regression	12	(8,6)		N.A.		N.A.		N.A.		N.A.		N.A.		N.A.					
T-Kategorie	140		122				124					121							
T0	16	(11,4)	2	(100)	0	(0,0)	3	(100)	0	(0,0)	2	(100)	0	(0,0)					
T1(a/b)	20	(14,3)	14	(82,4)	3	(17,6)	18	(100)	0	(0,0)	15	(93,8)	1	(6,3)					
T2	20	(14,3)	18	(90,0)	2	(10,0)	18	(90,0)	2	(10,0)	18	(90,0)	2	(10,0)					
T3	74	(52,9)	70	(95,9)	3	(4,1)	70	(95,9)	3	(4,1)	68	(93,2)	5	(6,8)					
T4(a/b)	10	(7,1)	10	(100)	0	(0,0)	9	(90,0)	1	(10,0)	10	(100)	0	(0,0)					
N-Kategorie	140		122				124					121							
N0	51	(36,4)	31	(83,3)	6	(16,7)	36	(97,3)	1	(2,7)	31	(88,6)	4	(11,4)					
N1	33	(23,6)	30	(100)	0	(0,0)	30	(96,8)	1	(3,2)	30	(96,8)	1	(3,2)					
N2	32	(22,9)	31	(96,9)	1	(3,1)	32	(100)	0	(0,0)	29	(93,5)	2	(6,5)					
N3(a/b)	24	(17,1)	23	(95,9)	1	(4,2)	20	(83,3)	4	(16,7)	23	(95,8)	1	(4,2)					
M-Kategorie	140		122				124					121							
M0	119	(85,0)	95	(92,2)	8	(7,8)	101	(96,2)	4	(3,8)	95	(93,1)	7	(6,9)					
M1	21	(15,0)	19	(100)	0	(0,0)	17	(89,5)	2	(10,5)	18	(94,7)	1	(5,3)					
UICC-Stadium	140		120				122					119							
0/N+	15	(10,9)	2	(100)	0	(0,0)	3	(100)	0	(0,0)	2	(100)	0	(0,0)					
I(A/B)	21	(15,2)	13	(72,2)	5	(27,8)	18	(94,7)	1	(5,3)	16	(94,1)	1	(5,9)					
II(A/B)	24	(17,4)	23	(95,8)	1	(4,2)	24	(100)	0	(0,0)	20	(83,3)	4	(16,7)					
III(A/B/C)	57	(41,3)	55	(96,5)	2	(3,5)	54	(94,7)	3	(5,3)	55	(96,5)	2	(3,5)					
IV	21	(15,2)	19	(100)	0	(0,0)	17	(89,5)	2	(10,5)	18	(94,7)	1	(5,3)					
L-Kategorie	140		122				124					121							
L0	98	(70,0)	75	(93,8)	5	(6,3)	81	(98,8)	1	(1,2)	76	(95,0)	4	(5,0)					
L1	42	(30,0)	39	(92,9)	3	(7,1)	37	(88,1)	5	(11,9)	37	(90,2)	4	(9,8)					
V-Kategorie	140		122				124					121							
V0	130	(92,9)	104	(92,9)	8	(7,1)	110	(96,5)	4	(3,5)	103	(92,8)	8	(7,2)					
V1	10	(7,1)	10	(100)	0	(0,0)	8	(80,0)	2	(20,0)	10	(100)	0	(0,0)					
Pn-Kategorie	140		122				124					121							
Pn0	110	(78,6)	84	(91,3)	8	(8,7)	91	(96,8)	3	(3,2)	85	(93,4)	6	(6,6)					
Pn1	30	(21,4)	30	(100)	0	(0,0)	27	(90,0)	3	(10,0)	28	(93,3)	2	(6,7)					
R-Status	140		122				124					121							
R0	125	(89,3)	99	(92,5)	8	(7,5)	106	(97,2)	3	(2,8)	98	(92,5)	8	(7,5)					
R1	13	(9,3)	13	(100)	0	(0,0)	10	(76,9)	3	(23,1)	13	(100)	0	(0,0)					
RX	2	(1,4)	2	(100)	0	(0,0)	2	(100)	0	(0,0)	2	(100)	0	(0,0)					
MSI-Status	121		120				121												
MSS	113	(93,4)	104	(93,1)	8	(6,9)	107	(94,7)	6	(5,3)		N.A.		N.A.					
MSI	8	(6,6)	8	(100)	0	(0,0)	8	(100)	0	(0,0)		N.A.		N.A.					
EBV-Status	122		120				122					119							
negativ	119	(97,5)	109	(93,2)	8	(6,8)	113	(95,0)	6	(5,0)	102	(93,1)	8	(6,9)					
positiv	3	(2,5)	3	(100)	0	(0,0)	3	(100)	0	(0,0)	3	(100)	0	(0,0)					
MET-Status	124		122				122					121							
negativ	118	(84,3)	108	(93,1)	8	(6,9)		N.A.		N.A.		107	(93,0)	8	(7,0)				
positiv	6	(4,8)	6	(100)	0	(0,0)		N.A.		N.A.		6	(100)	0	(0,0)				
HER2-Status	122						122					120							
negativ	114	(93,4)		N.A.		N.A.	108	(94,7)	6	(5,3)	104	(93,1)	8	(6,9)					
positiv	8	(6,6)		N.A.		N.A.	8	(100)	0	(0,0)	8	(100)	0	(0,0)					
Regression (Becker)	140		122				124					121							
1a	16	(11,4)	2	(100)	0	(0,0)	3	(100)	0	(0,0)	2	(100)	0	(0,0)					
1b	29	(20,7)	25	(89,3)	3	(10,7)	29	(100)	0	(0,0)	27	(96,4)	1	(3,6)					
2	22	(15,7)	19	(95,0)	1	(5,0)	19	(95,0)	1	(5,0)	20	(100)	0	(0,0)					
3	73	(52,1)	68	(94,4)	4	(5,6)	67	(94,7)	5	(6,9)	64	(90,1)	7	(9,9)					

Anhang Tabelle 2 Korrelation von HER2, MET und MSI mit klinisch-pathologischen Charakteristika und Regression. Die Tabelle zeigt den HER-, MET- und MSI-Status des Primärtumors gegenüber klinisch-pathologischen Parametern und genetischen Alterationen. P-Werte unterhalb des 0,05% Signifikanzniveaus sind grau unterlegt. Die Art des statistischen Tests ist jeweils an den angegebenen p-Werten vermerkt (*=exakter Test nach Fisher; °=Kendalls Tau). Die Abkürzung „Unklass.“ repräsentiert Fälle mit unklassifiziertem Phänotyp nach Laurén. Die Abkürzung „N.A.“ bezeichnet Felder als „nicht anwendbar“, sofern diesem kein Wert zugewiesen werden konnte.

Publikationen

24.05.2018

Vortrag auf der 102. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Berlin (AG01.04):
VISTA: Expression in neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen

Abstract:

VISTA: Expression in neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen

Schoop GH, Böger C, Krüger S, Behrens HM, Röcken C; [Der Pathologe, Band 39, Suppl. 1, 2018; DOI: 10.1007/s00292-018-0442-x; S55]

06.11.2019

Manuskript:

Therapy resistance in neoadjuvantly treated gastric cancer and cancer of the gastroesophageal junction is associated with an increased expression of immune checkpoint inhibitors - comparison against a therapy naïve cohort

Schoop H, Bregenzer A, Halske C, Behrens HM, Krueger S, Egberts JH, Röcken C; [Translational Oncology, Band 13, 2020; DOI: 10.1016/j.tranon.2019.11.004; S165–176]

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit unter Anleitung meiner Betreuer selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Kiel, 12.01.2020

(Georg Hauke Schoop)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Christoph Röcken für die Bereitstellung und persönliche Betreuung meiner Promotionsarbeit. Mit kritischen Fragen und ermutigten Worten wurde ich von Professor Röcken stets unterstützt. Herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. med. Christine Halske für die Organisation und Einarbeitung in die theoretischen und praktischen Grundlagen meiner Dissertation und mit ihr zusammen Frau Antonia Freiin Grote für das Zusammentragen der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte.

Dank für die Unterstützung bei Laborarbeiten gilt Frau Sandra Krüger für ihre Anleitung und geschätzten Rat. Auch danke ich Herrn Dr. rer. medic. Hans-Michael Behrens für die herzliche Betreuung der statistischen Auswertung und der Hilfe bei der Lösung von IT-Fragen. Frau Anna Bregenzer gilt mein Dank für die Zusammenarbeit bei unserer gemeinsamen Veröffentlichung und die Bereitstellung der Ergebnisse ihrer Promotionsarbeit.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und besonders auch meiner Frau, für offene Ohren und warme Worte danken.