

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

**Charakterisierung der tumorbiologischen Bedeutung
der differentiellen Expression des Insulinrezeptors (IR)
auf Epithelien und Endothelien des Magenkarzinoms**

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

vorgelegt von
Viva Maria Wiesener
aus Hamburg

Kiel 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Röcken

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Anne Letsch

Tag der mündlichen Prüfung: Kiel, den 17.02.2022

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 10.12.2021

gez. Dr. med. Christoph Röcken
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen Eltern und meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
1. Einleitung	1
1.1 Das Magenkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Risikofaktoren	2
1.1.3 Ätiopathogenese	6
1.1.4 Histopathologie	8
1.1.5 Primärdiagnostik	10
1.1.6 Ausbreitungsdiagnostik	11
1.1.7 Therapie und Prognose	13
1.2 Das Insulin-/IGF-System	17
1.2.1 Der Ligand Insulin (INS).....	17
1.2.2 Der Insulinrezeptor (IR).....	18
1.2.3 Struktur und Funktion der Isoformen des IR.....	20
1.2.4 Signaltransduktionskaskade.....	22
1.3 Involvierung des IR/IGF-IR-Netzwerks in die Karzinogenese	23
1.3.1 Stellenwert des IR-A.....	25
1.3.2 Pathophysiologische Effekte des IR auf Endothelien und Epithelien....	26
1.4 Möglichkeiten und Limitationen der IR-Inhibition	27
1.4.1 Nebenwirkungen der IR-Inhibition	30
1.4.2 Resistenzmechanismen bei Inhibition der IR/IGF-Achse	30
1.5 Tumormetabolismus	31
1.5.1 „Metabolic switch“ – Energiestoffwechsel in Tumoren.....	31
1.5.2 „Angiogenic switch“ – Angiogenese und Tumorexpansion	33
1.5.3 Bedeutung der Angiogenese für die Metastasierung	36
1.6 Fragestellung	38

2. Material und Methoden.....	39
2.1 Materialien.....	39
2.1.1 Ethikantrag	39
2.1.2 Studienkollektiv	39
2.1.3 Histologische Aufarbeitung und TNM-Klassifikation.....	39
2.1.4 Geräte.....	40
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien	40
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	41
2.1.7 Software	42
2.2 Methoden.....	42
2.2.1 <i>Tissue Microarrays</i> (TMAs)	42
2.2.2 Immunhistochemie	42
2.2.3 Konzept zur Auswertung der IR-Antikörperfärbung.....	44
2.3 Statistische Auswertung	45
3. Ergebnisse.....	47
3.1 Explorative Untersuchung der IR-Expression anhand von TMAs	47
3.2 Auswertung der IR-Großflächenschnitte (WTS)	49
3.3 Vergleich der IR-Expression in Endothelien bei Tumor- und Normalgewebe.....	51
3.4 Korrelation epithelialer (EIR) und vaskulärer (VIR) IR-Expression.....	51
3.5 Korrelation der IR-Expression auf Tumorzellen (EIR) mit klinisch-pathologischen Charakteristika.....	53
3.6 Korrelation der IR-Expression in Endothelien (VIR) mit klinisch-pathologischen Charakteristika.....	54
3.7 Korrelation der IR-Expression mit dem histologischen Tumortyp	56
3.8 Analyse der Überlebensdaten	57
4. Diskussion.....	64
4.1 Methodische Diskussion	64
4.1.1 Immunhistochemie	64
4.2 Diskussion und Interpretation der Ergebnisse	65
4.2.1 TMAs und Tumorerheterogenität	65

4.2.2 Expressionsanalyse des IR.....	66
4.2.3 Bedeutung der epithelialen (EIR) und vaskulären IR-Expression (VIR) im Zusammenhang mit dem Phänotyp	67
4.2.4 Bedeutung der endothelialen IR-Expression (VIR)	71
4.2.5 Die Expression des Insulinrezeptors bei malignen Tumoren	74
 5. Zusammenfassung	 76
 6. Literaturverzeichnis	 78
 7. Anhang	 88
7.1 Ethikvotum	88
7.2 Erklärung	89
 8. Publikationen	 90
 9. Danksagung	 91
 10. Lebenslauf	 92

Abkürzungsverzeichnis

A

a priori	(lat.) von vorneherein
Abb.	Abbildung
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC-Gen	Adenomatöse Polyposis Coli-Gen
ATP	Adenosintriphosphat

B

BRCA 1 bzw. 2	Breast cancer 1-Gen / Breast cancer 2-Gen
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise

C

°C	Grad Celsius
CA	Karzinom
ca.	circa
cagA	Zytotoxin-assoziiertes Gen A
CDH1	E-Cadherin
CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i> ; Synonym: Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CIN	chromosomal instabil
CEA	Carcinoembryonales Antigen
COX	Cytochrom-C-Oxidase
COX-2	Cyclooxygenase-2
CT	Computertomographie

E

EBV	Epstein-Barr-Virus
------------	--------------------

ECL-Zellen	Enterochromaffin-ähnliche Zellen
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
en bloc	(lat.), im Ganzen
ERK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1
et al.	<i>et alii</i> (lat.), und andere
ETOH	Äthanol
EUS	Endosonographie

F

FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
FIGC	Familiäres intestinales Magenkarzinom

G

g	Gramm
G6PD	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPPS	Gastrales Adenokarzinom mit proximaler Polypose des Magens
ggf.	gegebenenfalls
GH	Wachstumsfaktor
GERD	Gastroösophageale Refluxkrankheit
Grb2	Wachstumsfaktorgebundenes Protein 2
GS	genomisch stabil

H

HCL	Salzsäure
HDGC	Hereditäres diffuses Magenkarzinom
HE	Hämatoxylin und Eosin
HIF Ia bzw. IIa	Hypoxie-induzierter Faktor I Alpha bzw. II Alpha
HScore	Histo-Score

I

IgG	Immunglobulin G
IGF I bzw. -II	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I bzw. -II
IGFBP	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-Bindungsprotein
in vitro	(lat.) im Reagenzglas durchgeführt
in vivo	(lat.) am lebenden Objekt beobachtet/durchgeführt
INS	Insulin
IR	Insulinrezeptor
IRR	Insulin <i>receptor-related receptor</i>
IRS	Insulinrezeptorsubstrat

K

KAF	Karzinom-assoziiertes Fibroblast
KIT	KIT <i>proto-oncogene receptor tyrosine kinase</i> Synonym: Stammzellfaktor-Rezeptor

L

l	Liter
LAD	Lymphadenektomie

M

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 2
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLH1 bzw. 2	humanes MutL Homolog 1 bzw. 2
MSI	mikrosatelliteninstabil
MUC1	Mucin 1
MUTYH	MutY DNA Glykosylase
MVD	Mikrogefäßdichte

N

NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	Nichtsteroidale Antirheumatika

O

ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
OLGA	<i>Operative-link-for-gastritis-assessment</i>
OLGIM	<i>Operative-link-for-gastric-intestinal-metaplasia-assessment</i>
OS	Gesamtüberleben

P

pH	<i>potentia hydrogenii</i> (lat.)
PDK-1	Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1
PD-L1	<i>Programmed death ligand 1</i>
PECAM-1	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4, 5-Bisphosphat-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PSCA	<i>Prostate stem cell antigen</i>
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog

R

Raf	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 3
RHOA	<i>Ras homolog family member A</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase

S

sog.	sogenannt
SH2	<i>Src homology 2</i>
SOS	<i>Son of sevenless</i>
STK11	Serin/Threonin-Kinase 11

T

Tab.	Tabelle
TAM	Tumor-assoziiierter Makrophage
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen
TP53	Tumorsuppressorprotein p53
TU	Tumor
TSS	Tumorspezifisches Überleben

U

µm	Mikrometer
u.a.	unter anderem
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UICC	Union internationale contre le cancer (franz.)

V

VacA	Vakuolisierendes Zytotoxin A
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
vgl.	vergleiche
vs.	versus

W

WHO	Weltgesundheitsorganisation
WTS	<i>Whole tissue slides</i>

Z

z.B.	zum Beispiel
-------------	--------------

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Altersspezifische Inzidenz des Magenkarzinoms zwischen 2004 und 2014 im Vergleich.....	2
Abb. 2: Komponenten der IR/IGF- Achse.....	19
Abb. 3: Zusammenfassung der biologischen Diversitäten der Isoformen IR-A und IR-B.....	21
Abb. 4: Insulinrezeptor-Netzwerk.....	23
Abb. 5: Schematische Darstellung der Signaltransduktion bei Aktivierung des IR, des IGF-IR und des Hybridrezeptors	24
Abb. 6: Insulin-vermittelte Interaktion zwischen Perizyten und Endothelzellen im Zuge der Angiogenese.....	26
Abb. 7: Vergleich von physiologischem Energiemetabolismus mit dem Tumorstoffwechsel.....	32
Abb. 8: Prozess der Angiogenese.....	35
Abb. 9: Modell der Metastasierung.....	37
Abb. 10: Referenzschnitte des immunhistochemischen IR-Nachweis an Tumorzellen und Gefäßen im Magenkarzinomkollektiv.....	46
Abb. 11: Vergleich der VIR-Expression in intra- und extratumoralen Endothelien innerhalb eines Magenkarzinoms.....	52
Abb. 12: Korrelation des VIR-Status mit der T-Kategorie.....	54
Abb. 13: Korrelation des VIR-Status mit der N-Kategorie	55
Abb. 14: Korrelation des VIR-Status mit der V-Kategorie.....	55
Abb. 15: Korrelation des VIR-Status mit dem UICC-Stadium.....	56
Abb. 16: IR-Expression nach dem Phänotyp.....	56
Abb. 17: Überlebensanalyse mittels Kaplan-Meyer Schätzer. Gesamtüberleben und tumorspezifisches Überleben nach IR-Expression an Tumorzellmembranen (mEIR).....	59
Abb. 18: Überlebensanalyse mittels Kaplan-Meyer Schätzer. Gesamtüberleben und tumorspezifisches Überleben nach IR-Expression an Endothelien (VIR).....	59
Abb. 19: HER2-Status (negativ/positiv) und IR-Status (<i>-low/-high</i>) in den untersuchten Kategorien Tumorepithel (cEIR und mEIR) sowie Endothel (VIR).....	69

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenfassung der phäno- und genotypischen Merkmale der molekularen Subtypen des Magenkarzinoms.....	10
Tab. 2: Stadieneinteilung der Magenkarzinome gemäß ihres T-, N- und M-Status nach UICC und AJCC.....	12
Tab. 3: Zusammenfassung der Bindungsaffinitäten der Liganden Insulin, IGF-I und IGF-II zu ihren jeweiligen Rezeptoren.....	19
Tab. 4: Resultate der Zwischenanalyse der Tumorstanzen (TMAs).....	48
Tab. 5: Absolute und relative Häufigkeiten der Färbeintensitäten innerhalb des WTS-Kollektivs.....	51
Tab. 6: Resultate der Analyse der Tumor-Großflächenschnitte (WTS).....	60
Tab. 7: Ergebnisse der multivariaten Analyse (Cox-Regression).....	63
Tab. 8: Korrelation des HER2-Status (positiv oder negativ) mit dem IR-Status (<i>-low/-high</i>) im Magenkarzinomkollektiv	68

1 Einleitung

1.1. Das Magenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

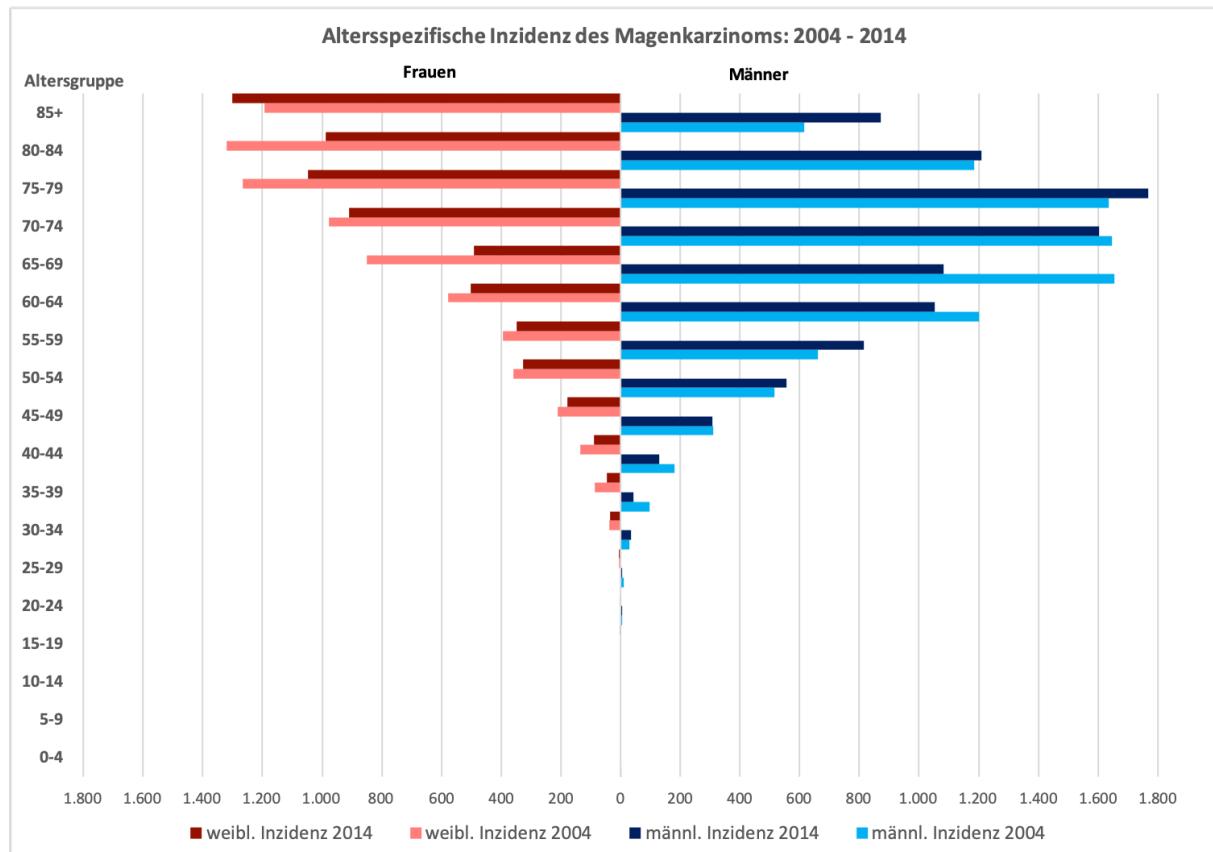
Das Magenkarzinom ist eines der führenden globalen Gesundheitsthemen. Weltweit stellt es die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache dar und ist im Allgemeinen der vierthäufigste Tumor nach Lungen-, Dickdarm- und Brustkarzinomen [1].

Laut Bericht des Zentrums für Krebsregisterdaten am Robert-Koch-Institut nimmt das Magenkarzinom in Deutschland bei Männern den 5. und bei Frauen den 6. Platz in der Rangfolge der häufigsten krebsbedingten Todesfälle ein [2, 3]. Jährlich erkranken auf 100.00 Bürger in Deutschland ca. 30 Männer und 20 Frauen neu an einem Magenkarzinom [4]. Die Analyse der Überlebensdaten zeigt jedoch einen positiven Trend: Seit den 1970er Jahren wird in den Industrienationen ein allgemeiner Rückgang der Inzidenz- und Mortalitätsraten an Karzinomen beobachtet [2]. Dabei weist das Magenkarzinom mit einer Abnahme der altersstandardisierten Mortalität um 3% unter allen Tumorentitäten eine der stärksten Senkungen der Sterblichkeit auf [3].

Magenkarzinome sind jedoch nach wie vor mit einer ungünstigen Prognose und geringen Überlebensrate assoziiert: Bundesweite Daten zeigen, dass bei Männern die 5- bzw. 10-Jahres-Überlebensrate bei 30% bzw. 28% liegt, Frauen weisen diesbezüglich mit 33% bzw. 29% analoge Werte auf [4]. Anhand von Prognosen, die den Stellenwert der am häufigsten zum Tode führenden Erkrankungen für das Jahr 2030 einschätzen, ist in der Zukunft eine steigende Relevanz der Mortalität am Magenkarzinom zu erwarten [5].

Die hohe Mortalität des Magenkarzinoms wird daran ersichtlich, als dass rund 1% der Todesfälle in Deutschland darauf zurückzuführen sind [4]. Die Ursachen hierfür sind vielfältig und beruhen zum einen darauf, dass das Magenkarzinom eine Erkrankung des alternden Menschen darstellt: Das durchschnittliche Diagnosealter liegt bei 75 Jahren für Frauen und bei 72 Jahren für Männer [2, 4]. Darüber hinaus sind im Gegensatz zu Japan bisher keine strukturierten Früherkennungsprogramme etabliert [6], sodass mehr als zwei Drittel der Tumoren in den fortgeschrittenen Stadien T3 und T4 diagnostiziert werden [3]. Unter diesen Umständen hat die kurative Therapie des Magenkarzinoms selten Aussicht auf Erfolg.

Abb. 1: Altersspezifische Inzidenz des Magenkarzinoms zwischen 2004 und 2014 im Vergleich. Die Inzidenz des Magenkarzinoms ist altersabhängig. Neuerkrankungen treten ab dem 2. Lebensdrittel und bei Männern gehäuft auf. Dabei ist der 10-Jahres Trend positiv und zeigt für beide Geschlechter insgesamt gesunkene Inzidenzraten. Daten von der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID).



1.1.2 Risikofaktoren

Das Magenkarzinom ist eine Erkrankung multifaktorieller Genese, wobei die Infektion mit *Helicobacter pylori* (H. pylori) als bedeutendster Risikofaktor gilt [4].

H. pylori-Besiedlung

H. pylori ist eines der weltweit am meisten verbreiteten Bakterien und der Mensch gegenwärtig sein einziger bekannter Wirt [7]. Mindestens die Hälfte der Weltbevölkerung gilt als infiziert, in ca. 70% der Fälle bleibt die Besiedlung asymptomatisch. Duodenale oder gastrale Ulzera sowie Magentumoren stellen Endpunkte einer chronischen Infektion dar und treten bei 15% aller Menschen mit positivem H. pylori-Nachweis auf. Die Prävalenz der H. pylori-Infektionen korreliert mit steigendem Alter sowie niedrigem sozialen Status [8].

Retrospektive Studien zeigen, dass die Übertragung des Bakteriums mehrheitlich in der Kindheit erfolgt, wobei das Alter zum Zeitpunkt der Erstinfektion eine wesentliche Rolle zu spielen scheint. Es gilt, dass mit frühkindlichem Erwerb des Bakteriums die Wahrscheinlichkeit, eine Pangastritis zu entwickeln und damit auch das Risiko, später an einem Magenkarzinom zu erkranken, steigt [7, 8]. Im Jahre 1994 wurde *H. pylori* zu einem humanen Kanzerogen der Gruppe 1 von der „*International Agency on Cancer*“ ernannt [4, 9], nachdem durch epidemiologische und histologische Studien das mutagene Potential auf die Magenschleimhaut nachgewiesen worden war [10, 11]. Die *H. pylori*-Besiedlung führt zu einer chronischen Typ B-Gastritis [4]. Es werden dabei drei Phänotypen unterschieden. Die Corpus-prädominante Typ B-Gastritis geht mit Atrophie und intestinaler Metaplasie einher und hat ein signifikant höheres Krebsrisiko. Die Antrum-prädominante Gastritis weist häufiger Magen- und Duodenalulzera auf ohne erhöhtes Entartungsrisiko. Schließlich gibt es noch die indolente Form der Typ B-Gastritis, die weder ein erhöhtes Krebsrisiko aufweist, noch mit Magen- oder Duodenalgeschwüren einhergeht [2]. Der Erreger besitzt neben Adhärenzfaktoren, die die Integrität der Schleimhaut stören, spezifische Virulenzfaktoren wie das Zytotoxin-assoziierte Gen A (*cagA*) und das Vakuolisierende Zytotoxin A (*vacA*), welche eine Entzündungsreaktion hervorrufen und die Proliferation und Apoptose begünstigen [12].

Zur Diagnostik wird der Krankheitserreger invasiv (Biopsieentnahme mittels Endoskopie) oder nicht-invasiv (ELISA- bzw. Latex-Agglutinations-Test, IgG-Stuhltest) nachgewiesen. Die medikamentöse Eradikationstherapie kann bei definierten Risikogruppen, wie z.B. Personen mit einer Pangastritis, früheren Neoplasien wie z.B. Magenadenomen oder erstgradig Verwandten von Magenkarzinompatienten die Inzidenz des Magenkarzinoms senken. Dabei gilt die Therapie vor allem dann als karzinomprotektiv, wenn noch keine präkanzerösen Läsionen wie eine Atrophie oder intestinale Metaplasie bestehen [4].

Epidemiologische Faktoren

Für Patienten aus Industrienationen gilt, dass bestimmte Facetten des westlichen Lebensstils das Auftreten eines Magenkarzinoms begünstigen. Erhebliche regionale Unterschiede hinsichtlich der Neuerkrankungsraten lassen Rückschlüsse darauf zu, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen kulturellen Faktoren und der Krebsentwicklung besteht.

Im Vergleich zu den Niedrigrisiko-Arealen Süd-Asien, Nord- und Süd-Afrika, Nord-Amerika, Australien und Neuseeland ist die Inzidenz des Magenkarzinoms in den Hochrisiko-Regionen Japan, Ost-Asien, Ost-Europa sowie Zentral- und Südamerika bis zu zehnfach erhöht [13]. Im internationalen Vergleich der Erkrankungs- und Sterberaten am Magenkarzinom weist Deutschland hinter Polen und Tschechien den zweiten Rang auf [2]. Assoziiert mit dem Leben in einer der genannten Hochrisikopopulationen sind zudem der sozioökonomische Status und Umweltfaktoren, welche das Risiko für Nicht-Kardiakarzinome des Magens beeinflussen [4].

Ernährungsweise

Da der Magen die Aufbereitung weitgehend unverdauter Nahrungsbestandteile zur Aufgabe hat, wird insbesondere dieser Teil des Gastrointestinaltraktes Xenobiotika ausgesetzt. Bereits im Jahre 1959 wurde salzhaltige Nahrung mit einem erhöhten Risiko am Magenkarzinom zu erkranken, in Verbindung gebracht [14]. Weiterhin weist ein Rückgang an Magentumoren zur Zeit der Entwicklung von Kühlgeräten auf den Beitrag salzhaltiger Konservierungsmethoden für die Entstehung des Magenkarzinoms hin [15]. Heutzutage gilt als gesicherter Zusammenhang, dass eine erhöhte Aufnahme von Natriumchlorid über die Nahrung das Magenepithel irritiert und im Zusammenspiel mit einer *H. pylori*-Infektion das Risiko für einen Magentumor bis zu zehnfach erhöht [16].

Der westliche Ernährungsstil mit reichlichem Konsum von rotem Fleisch und stark gewürzten Speisen bei gleichzeitig geringer Aufnahme an Obst, Gemüse und Ballaststoffen erhöht in Kombination mit bestimmten genetischen Konstellationen, wie der Alteration von DANN-Reperaturgenen *hOGG1*, *XRCC1* und *XPB*, das Magenkarzinomrisiko [17]. Wie die Metaanalyse von Kim et al. [17] zu Daten aus 38 weltweit durchgeführten Studien belegt, sind zudem genetische Polymorphismen in Enzymen der Biotransformation I und II der Leber unter dietätischen Aspekten mit der Entstehung von Magentumoren verknüpft. Zudem werden Magenkarzinome bei perniziöser Anämie (chronischer Vitamin B12-Mangel) infolge strikter vegetarischer Ernährung bzw. erfolgter (partieller) Gastrektomie begünstigt [4].

Stimulanzen

Der Einfluss von Rauchen hinsichtlich der Entwicklung eines Magenkarzinoms gilt als gesicherter Risikofaktor [18, 19]. Tabakrauch erhöht das Magenkarzinomrisiko überwiegend für männliche Zigarettenkonsumenten. Die Daten für Frauen sind hinsichtlich ihrer Ergebnisse inhomogen und spiegeln den geringeren relativen Anteil an Nikotinkonsumentinnen wider. Bei bereits bestehendem Magenkarzinom wirkt sich Tabakrauch negativ auf das Gesamt-, tumorspezifische- und 5-Jahres-Überleben aus [20]. Alkohol und seine bei der Oxidation in der Leber entstehenden Intermediate, allen voran der Acetaldehyd, gelten als Zellgifte. Erhöhte Blutkonzentrationen dieses Abbauproduktes stehen im Verdacht, DNA-Schäden zu verursachen und damit die Entstehung von Magentumoren zu begünstigen [21]. Eine Studie von Duell et al. zu Genpolymorphismen mehrerer Äthanol-abbauender Enzyme, Alkoholaufnahme und dem Risiko, ein Magenkarzinom zu entwickeln, zeigt, dass genetische Varianten der Alkoholdehydrogenase 1 und der Aldehyddehydrogenase 2 das Krebsrisiko steigern [21]. Ähnliches gilt für die Sulfotransferase 1A im Zusammenspiel mit gesteigertem Alkoholkonsum [22]. Die aufgeführten Enzyme metabolisieren Äthanol, sodass bei verminderter Enzymaktivität schädliche Intermediate akkumulieren und ihre mutagene Wirkung an der Magenschleimhaut entfalten.

Weitere Faktoren

Der aktuelle Stand der Forschung weist auf eine multifaktorielle Genese des Magenkarzinoms hin. Eine individuelle Suszeptibilität begünstigt die neoplastische Entartung, insbesondere Polymorphismen in pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen bei den Typ B-Gastritis-assoziierten Magenkarzinomen [2].

Dabei gelten die aufgeführten Einflüsse als individuell modifizierbar. Dazu zählt auch krankhaftes Übergewicht, bei welchem Metabolite des Fettstoffwechsels wie *Insulin-like growth factor* (IGF) und Leptin vermehrt pro-mitogene Signale generieren [23]. Das Risiko an einem Karzinom des ösophagogastralen Übergangs zu erkranken, scheint proportional mit dem BMI assoziiert zu sein [24]. Zudem trägt abdominelles Fett zur Entstehung der gastroösophagealen Refluxerkrankung (GERD) bei. Bei der GERD kann sich bei chronischer Reizung der gastroösophagealen Schleimhaut durch saure Verdauungssäfte eine sog. Barrett-Metaplasie entwickeln, welche eine präkanzeröse Läsion darstellt. Dabei gilt das

Risiko für ein Magenkarzinom als fünf- bis siebenfach erhöht [25]. Obwohl einige Studien den Zusammenhang zwischen der GERD und der Entwicklung eines Tumors des gastroösophagealen Übergangs nachgewiesen haben [26, 27], sind diese Ergebnisse nicht konsistent [4, 28].

Gewisse Faktoren sind unveränderlich und gehen *a priori* mit einem erhöhten Magenkarzinomrisiko einher. So steigt die Inzidenz an Magentumoren kontinuierlich mit dem Alter [2] und tritt vermehrt beim männlichen Geschlecht auf [4]. Zudem ist die Inzidenz des Magenkarzinoms mit bestimmten genetischen Risikokonstellationen assoziiert, auf welche im folgenden Abschnitt explizit eingegangen wird.

1.1.3 Ätiopathogenese

Tumoren des Magens entwickeln sich sporadisch oder resultieren aus einem durch genetische Prädisposition hereditär bzw. familiär weitergegebenen erhöhten Erkrankungsrisiko [2].

Pathogenese des sporadischen Magenkarzinoms

Wesentlich für die Entstehung des sporadischen Magenkarzinoms ist die von Correa im Jahre 1988 entwickelte „Epithel-Dysplasie-Karzinom-Sequenz“ [29], welche als Ausgangspunkt eine zunächst oberflächlich lokalisierte Gastritis annimmt. Bei Chronifizierung dieses Entzündungszustandes kommt es zur Atrophie und intestinalen Metaplasie der Magenschleimhaut. Derlei Epithelveränderungen sind primär reversibel, bei bestehender Inflammation und unter Einwirkung zusätzlicher Mutagene schreitet die Entwicklung von einer milden über eine schwere Dysplasie bis hin zum Auftreten eines invasiven Karzinoms fort. Während im initialen Modell die chronische Magenschleimhautentzündung vorwiegend salzhaltiger Kost und Medikamenten zugeschrieben wurde, gilt heutzutage insbesondere die Besiedlung mit *H. pylori* als zentraler Faktor für die Krebsentstehung [4]. Die chronische Entzündung der Magenschleimhaut stellt die Voraussetzung für maligne Entartung dar und wird ihrer Ursache nach in (A) die autoimmun ausgelöste, (B) die bakteriell bedingte und (C) die chemisch-toxischen Noxen zugeschriebene Gastritis kategorisiert. Die Prävalenz der Typ A-Gastritis ist niedrig, Frauen sind dreimal häufiger betroffen als Männer und es bestehen Assoziationen mit der perniziösen Anämie [30] und

weiteren Immunerkrankungen, darunter Diabetes mellitus Typ 1 [31]. Eigenreaktive Prozesse der Magenmukosa führen zur fokalen Atrophie und Pseudohypertrophie, welche ggf. in eine intestinale Metaplasie münden [32]. Eine Typ B-Gastritis wird durch die Besiedlung des Magens mit *H. pylori* hervorgerufen und stellt weltweit den häufigsten Grund für reaktive entzündliche Veränderungen an der Magenschleimhaut dar [32].

Im klinischen Alltag gewinnt die durch entzündungshemmende Medikamente (sog. NSAIDs: „*non-steroidal antiinflammatory drugs*“) und durch duodenogastralen Reflux ausgelöste Typ C-Gastritis an Bedeutung. Die orale Aufnahme von NSAIDs führt zur Irritation der Magenschleimhaut und bei längerfristiger Einnahme resultieren Hyperchlorhydrie und sinkende Bicarbonat- und Prostaglandinspiegel [33]. Die Folgen sind abermals Entzündung, architekturelle Veränderungen, Ulkus- und ggf. Tumorleiden. Laut Berichterstattung des Bundes nahm die Verordnung von nichtselektiven NSAIDs und selektiver COX-2-Hemmer zwischen 2001 und 2010 um ca. 30% zu. Weiterhin ist anzunehmen, dass die demographische Entwicklung hin zu einer überalterten Gesellschaft zu steigenden Verordnungszahlen von NSAIDs aufgrund ihrer vaskuloprotektiven und antithrombotischen Wirkung führen wird [33].

Pathogenese des familiären und hereditären Magenkarzinoms

Magenkarzinome, die gehäuft innerhalb der Verwandtschaftsabfolge auftreten, sind multifaktoriell bedingt und zum Teil auf gemeinsame Risikofaktoren zurückzuführen. Dazu gehören neben der Besiedlung durch *H. pylori* spezifische diätetische Gewohnheiten, welche in Kombination mit risikobehafteten Genpolymorphismen das Lebenszeitrisiko für ein Magenkarzinom erhöhen [2].

Der Anteil familiärer Karzinome an allen Magenkarzinomen beträgt ca. 5 - 10% [2].

Ungefähr 1 - 3% der Magentumoren weisen Alterationen von Genen der Keimbahn auf und gelten als hereditäre Magenkarzinome im engeren Sinne. Sie lassen sich in das hereditäre diffuse Magenkarzinom (HDGC), das familiäre intestinale Magenkarzinom (FIGC) und das gastrale Adenokarzinom mit proximaler Polypose des Magens (GAPPS) einteilen und werden allesamt autosomal-dominant vererbt [4].

Wesentlicher Faktor eines HDGC ist die Mutation des *CDH1*-Gens, welches für das Transmembranprotein E-Cadherin codiert. Das Gen zeigt sich in 30-40% der HDGC

genetisch alteriert, dabei sind bereits über 50 verschiedene *CDH1*-Mutationen beschrieben. Neben weiteren Faktoren gilt auch der Insulinrezeptor (IR) als potentiell bedeutendes Gen für die Entwicklung eines HDGC [2, 4]. Dem kürzlich entdeckten GAPPS-Syndrom liegt eine Genmutation im Exon 1B des *APC*-Gens zugrunde, infolgedessen es zu einer Polypose der Korpus- und Fundusregion des Magens kommt [34].

Des Weiteren treten Magenkarzinome im Rahmen hereditärer Tumorleiden gehäuft auf: Mutationen von Tumorsuppressorgenen wie dem *APC*- bzw. *PTEN*-Gen führen zur familiären adenomatösen Polypose bzw. dem Cowden-Syndrom. Weiterhin ist der *TP53*-Verlust bei dem Li-Fraumeni-Syndrom mit dem erblichen Magenkarzinom assoziiert, ebenfalls wie Alterationen der DNA-Reperaturgene *MLH1* und *MLH2* bei dem Lynch-Syndrom. Letzteres wird auch als hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (HNPCC) bezeichnet, unterliegt autosomal-dominanter Vererbung und zeigt gehäuft Magenkarzinome vom intestinalen Typ. Zudem treten Magenkarzinome bei erblichem Brust- und Ovarialkrebs aufgrund von *BRCA-1*- bzw. -2-Mutation, dem Peutz-Jeghers-Syndrom (*STK11*-Mutation) und der *MUTYH*-assoziierten adenomatösen Polypose vermehrt auf [2].

1.1.4 Histopathologie

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) differenziert die unmittelbare Vorläuferläsion des Magenkarzinoms, die intestinale Metaplasie, in den intestinalen bzw. gastrischen Typ. Dabei wird die präkanzeröse Läsion in *Low*- bzw. *High-Grade* eingeteilt [2].

Das histologische Klassifikationsschema der WHO zu Tumoren des Magens wurde im Jahre 2010 aktualisiert. Demnach wird zwischen Adenokarzinomen, adenosquamösen Karzinomen, Karzinomen mit lymphoidem Stroma (medulläres Karzinom), hepatoiden Adenokarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und unklassifizierbaren Karzinomen differenziert [2]. Das Adenokarzinom stellt mit einem Anteil von über 90% den häufigsten histologischen Subtyp des Magenkarzinoms dar [35]. Wenngleich die WHO keine Empfehlung für historische Klassifikationsmodelle ausgesprochen hat, findet das 1952 von Laurén entwickelte Modell breite Anwendung in wissenschaftlicher Literatur und Praxis und dient auch der vorliegenden Arbeit als Referenz. Dabei wird anhand des morphologischen Phänotyps wird zwischen Magenkarzinomen von intestinaler, diffuser, gemischter und nicht klassifizierbarer Differenzierung unterschieden [36]. Der gut differenzierte intestinale

Typ formt histologisch tubuläre, kohäsive und häufig ulzerierende Strukturen und tritt gehäuft bei fortgeschrittenem Alter, Männern und in Hochrisiko-Gebieten auf. Dieser Tumortyp ist im Allgemeinen mit einer besseren Prognose assoziiert. Dahingegen wächst der diffuse Typ infiltrierend in die Magenwand ein, kommt besonders häufig bei jungen Patienten, weiblichem Geschlecht und der Blutgruppe A vor und hat eine schlechte Prognose [37].

Benigne Vorläuferläsionen und Präkanzerosen

Der häufigste primär gutartige gastrale Tumor stellt der hyperplastische Magenschleimhautpolyp dar, bei welchem Mutationen in Genen wie *TP53* oder *PIK3CA* zum Teil nachweisbar sind und ein potentieller Progress zum Magenkarzinom möglich ist [2]. Der Fundusdrüsenpolyp tritt gehäuft im Zusammenhang mit der familiären adenomatösen Polypose (FAP) auf, ist meist benigne und entartet selten [2, 38]. Adenome des Magens kommen vereinzelt vor. Man unterscheidet histopathologisch solche vom intestinalen Typ (tubulär, villös, tubulovillös), das Pylorusdrüsenadenom (tiefer gelegene gastrale Differenzierung) und seltene foveoläre Adenome (oberflächliche gastrale Differenzierung). Während das Adenom vom intestinalen Typ in den meisten Fällen von einer Gastritis-assoziierten Dysplasie ausgeht, liegt dem Pylorusdrüsenadenom eine chronische (Autoimmun-)Gastritis zugrunde. Am Pylorusdrüsenadenom erkranken insbesondere ältere Frauen. Es ist häufig im Magenkorpus lokalisiert und weist eine Entartungstendenz von ca. 30% auf [2, 4]. Bei der histopathologischen Befundung von Biopsien suspekter Läsionen des Magens sollte stets die Wahrscheinlichkeit einer intraepithelialen Neoplasie nach der Wien-Klassifikation angegeben werden. Dabei gelten die Kategorien 4.4 und 5 als Magenfrühkarzinome, die auf die Mukosa bzw. Submukosa beschränkt sind und eine Ausdehnung von ca. 2 - 5cm Durchmesser aufweisen [2].

Molekulare Subtypen

In einer Studie aus dem Jahre 2014 wurde eine Verknüpfung zwischen Phäno- und Genotyp der Magenkarzinome hergestellt. Demnach kann man das genomisch stabile (GS), das chromosomal instabile (CIN), das Epstein-Barr-Virus-assoziierte (EBV) und das mikrosatelliteninstabile (MSI) Magenkarzinom unterscheiden [39]. Überschneidungen sind möglich [39, 40].

GS-Tumoren weisen meist einen diffusen Phänotyp nach Laurén und alterierte Zelladhäsionsmoleküle wie E-Cadherin (CDH1) oder Mutationen des *RHOA*-Gens auf. Das CIN-Magenkarzinom zeigt vornehmlich eine intestinale Differenzierung. Dabei stehen Mutationen des *TP53*-Tumorsuppressorgens sowie Aktivierungen des Rezeptortyrosinkinasen-*RAS*-Systems im Vordergrund [39]. Für EBV- und MSI-Magentumoren ist ein ungewöhnlicher Phänotyp mit dichtem Entzündungsinfiltrat und geringgradiger desmoplastischer Stromareaktion kennzeichnend [2]. MSI-Magenkarzinome mit PD-L1 Expression sprechen auf eine Immuncheckpoint-Therapie an [41] mit entsprechend guter Prognose des Patienten [42]. Das EBV-positive Karzinom ist überwiegend vom intestinalen Typ nach Laurén. MSI-Tumoren weisen eine ausgeprägte morphologische Varianz auf und zeigen meist eine MLH1-Inaktivierung sowie Alterationen mitotischer Signalwege [35, 40].

Tab. 1: Zusammenfassung der phäno- und genotypischen Merkmale der molekularen Subtypen des Magenkarzinoms.

	Genomisch stabiles CA	Chromosomal instabiles CA	Epstein-Barr-Virus -assoziiertes CA	Mikrosatelliten-instabiles CA
Phänotyp nach Laurén	diffuser Typ	intestinaler Typ	gemischter bzw. unklassifizierbarer Typ	ungewöhnliche Morphologie
Genmutationen	CDH1, RHOA, PIK3CA	TP53, RTK-Aktivierung	CDKN2A-Inaktivierung, EBV-CpG-Insel-Methylierung	MLH1-Inktivierung

1.1.5 Primärdiagnostik

Da Magenkarzinome in der Regel mit unspezifischen Symptomen einhergehen und in einem langen Intervall symptomarm bleiben, erfolgt die Diagnose überwiegend in fortgeschrittenen Stadien [4]. Dies limitiert operative Ansätze unter kurativer Zielsetzung und mindert die Heilungschancen.

Prävention und Früherkennung

Bisher gibt es in der täglichen Diagnostik keine validierten laborchemischen Parameter, die eine verlässliche Früherkennung des Magenkarzinoms erlauben [4]. Serologische Surrogatmarker wie Pepsinogen I und II lassen Rückschlüsse auf die Ausdehnung und den Schweregrad präneoplastischer Veränderungen zu und erlauben ggf. eine Stratifizierung von Risikopatienten. Jedoch gibt es bislang keine Evidenz zum Nutzen der Bestimmung von Tumormarkern beim Magenkarzinom. Die Wirksamkeit einer Chemoprävention des Magenkarzinoms durch Medikamente zur Säuresuppression (Protonenpumpeninhibitoren) oder Antiinflammation und Analgesie (NSAIDs) ist durch derzeitige Studien nicht belegt [4]. Die Notwendigkeit der Etablierung neuer Surrogatmarker für das Magenkarzinom wird vor allem daran deutlich, als dass ein effektives Vorsorgeprogramm in Japan die Diagnostik der Magenkrebsleiden in früheren Stadien ermöglicht [43].

Endoskopische Untersuchung

Bei Auftreten bestimmter allgemeiner Symptome wie ungewolltem Gewichtsverlust, Inappetenz, rezidivierendem Erbrechen, Dysphagie oder unklarer Eisenmangelanämie sollte gemäß S3-Leitlinie von 2019 umgehend eine frühzeitige Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) erfolgen. Dabei gilt die ÖGD als Goldstandard zur Diagnose von Neoplasien des Ösophagus und des Magens und erlaubt eine simultane histologische Befundsicherung durch die gezielte Entnahme von 8-10 (bei Lymphomverdacht 15) Biopsien aus suspekten Arealen [4]. Zur Risikostratifizierung der Läsionen wird entweder das Ausmaß der Atrophie (OLGA: „*Operative-link-for-gastritis-assessment*“) oder der Grad der Metaplasie (OLGIM: „*Operativelink-for-gastric-intestinal-metaplasia-assessment*“) bestimmt [44]. Sind präkanzeröse Veränderungen sowohl im Antrum als auch in der Korpusregion des Magens nachweisbar, gilt die Entwicklung eines Magenkarzinoms als wahrscheinlich [32].

1.1.6 Ausbreitungsdiagnostik

Für das klinische *Staging* eines histopathologisch gesicherten Karzinoms des Magens wird der Primärtumor durch eine Endosonographie (EUS) beurteilt. Dabei wird die Tiefeninfiltration (T-Kategorie) und ggf. der Nodalstatus (N-Kategorie) erfasst. Der Vorteil der EUS liegt insbesondere darin, mittels eines nichtinvasiven Verfahrens Patienten mit

geringer Tumordinvasionstiefe zu identifizieren, um sie einer kurativen Therapie zuzuführen. Zur Klärung etwaiger Fernmetastasierung (M-Kategorie) sollten Patienten leitlinienkonform zusätzlich eine Sonographie des Abdomens und eine Computertomographie (CT) des Thorax und Abdomens inklusive Beckens unter intravenöser Gabe von Kontrastmittel erhalten. Bei einem lokal fortgeschrittenen Magenkarzinom kann eine Laparoskopie zur Bestimmung des Tumorausmaßes sowie Nachweis einer Peritonealkarzinose erfolgen [4]. Die Stadieneinteilung des Magenkarzinoms erfolgt nach der derzeit gültigen 8. Auflage der Union internationale contre le cancer (UICC) TNM: Klassifikation maligner Tumoren aus dem Jahr 2017 [45]. Nach der TNM-Klassifikation wird der Primarius nach dessen Ausdehnung (T-Kategorie), dem Vorhandensein und der Anzahl regionärer Lymphknotenmetastasen (N-Kategorie) sowie des Vorkommens von Fernmetastasen (M-Kategorie) eingeschätzt.

Tab. 2: Stadieneinteilung der Magenkarzinome gemäß ihres T-, N- und M-Status nach UICC und AJCC. In Anlehnung an In et al. (2017).

Stadium	Tumorausdehnung (T-Kategorie)	Lymphknotenstatus (N-Kategorie)	Fernmetastasen (M-Kategorie)
0	Tis	N0	M0
IA	T1a / 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 / N1	M0

	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
IIIC	T4b	N3 / N2	M0
	T4a	N3	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

1.1.7 Therapie und Prognose

Bei dem Magenkarzinom entscheidet der Zeitpunkt der Erstdiagnose über das weitere kurative bzw. palliative Procedere und damit das Patientenüberleben [37]. Die Behandlung eines Magenkarzinoms bleibt ein komplexes Unterfangen und erfordert multidisziplinäre Kooperation von Abdominalchirurgen, Onkologen, Strahlentherapeuten, Gastroenterologen, Radiologen und Pathologen [46]. Die TNM-Klassifikation gilt als stärkster prognostischer Parameter für das Patientenüberleben. Allen voran die Lokalisation und die lokale Tiefeninfiltration des Magenkarzinoms sowie der Lymphknotenbefall sind von Bedeutung [4]. Neben der TNM-Klassifikation sind der Phänotyp nach Laurén, der Mikrosatellitenstatus und weitere klinisch-pathologische Merkmale entscheidend für die Prognose des am Magenkarzinom Erkrankten [35]. Zur zuverlässigen Angabe der Patientenprognose hat sich in der klinischen Routine kein serum- oder gewebsbasierter Parameter etablieren können. In Bezug auf Ki67, den am häufigsten eingesetzten Prognosemarker im Zuge der Diagnostik maligner Erkrankungen, wurden Untersuchungen an demselben Tumorkollektiv vorliegender Arbeit durchgeführt. Dabei zeigten Böger et al. aus dem Institut für Pathologie des UKSH, dass Ki67 ebenfalls kein zuverlässiger prognostischer Surrogatmarker des Magenkarzinoms ist [6].

Kurative Therapiealgorithmen

Die Chance auf eine kurative Therapie des Magenkarzinoms besteht in der Resektion im frühen Krankheitsstadium, wenn der Tumor mit weniger als 2cm Durchmesser auf die Mukosa begrenzt, histologisch vom intestinalen Typ bzw. gut differenziert ist und nicht ulzerierend wächst [46]. Dann stellt die *en-bloc* Entfernung im Rahmen einer endoskopischen Mukosaresektion oder eine Magen(teil-)resektion einen möglichen Ansatz dar. Dabei ist stets das Ziel, den Tumor vollständig mitsamt regionären Lymphknoten und histologisch gesichert tumorfreien Rändern zu entfernen (R0-Resektion). Zu beachten ist,

dass sich gemäß aktueller S3-Leitlinie der zirkumferentielle Sicherheitsabstand von 5cm bei dem intestinalen Typ nach Laurén bei Vorliegen eines diffusen Magenkarzinoms auf 8cm erhöht. Verbleiben mikroskopische Reste (R1-Resektion) bzw. makroskopisch sichtbarer Tumor (R2-Resektion) in der Wundhöhle, sollte eine kurative Nachresektion erfolgen. Wenn dies nicht möglich ist, wird eine postoperative Radiochemotherapie angewandt [4]. Unter kurativer Zielsetzung ist zudem eine therapeutische Lymphadenektomie (LAD) von mindestens 25 regionären Lymphknoten (sog. D2-LAD) Standard. Leitliniengerecht werden zur Prüfung eines pathologisch gesicherten pN0-Magenkarzinoms mindestens 16 Lymphknoten reseziert und begutachtet [4, 47].

Multimodaler Behandlungsansatz

Die Mehrheit der Patienten im lokal fortgeschrittenen Krankheitsstadium profitiert von einem multimodalen Behandlungsansatz [46]. Dabei wird in Europa und Australien mehrheitlich die perioperative Chemotherapie angewandt: Die „*Medical Research Adjuvant Gastric Cancer Study*“ (MAGIC-Studie) konnte zeigen, dass eine perioperative Chemotherapie gegenüber der alleinigen Operation ein verbessertes 5-Jahres-Überleben von 36% gegenüber 23% aufweist [46, 48]. Dieses Ergebnis wird durch Daten einer weiteren europäischen Studie gestützt [49].

Das perioperative Konzept führt im Zuge der präoperativ erhaltenen Chemotherapie zu einer Reduktion des Tumorstadiums auch im Sinne eines *down-staging*. Die unter dieser Therapie auftretenden intra- und postoperativen Komplikationen sowie die 30-Tage-Mortalität werden von der perioperativen Therapie nicht beeinflusst [48].

In Nord-Amerika und Ost-Asien ist die adjuvante (Radio-)Chemotherapie Standardtherapie des lokal fortgeschrittenen Magenkarzinoms. Dabei besteht das Risiko des loko-regionären Rezidivs oder von Fernmetastasen. Zudem kann der Umfang der chirurgischen Magen- und Lymphknotenresektion zur Verzögerung der adjuvanten systemischen Therapie führen [46]. Nach Anwendung einer präoperativen Therapie sollte gemäß gültiger S3-Leitlinie in jedem Falle eine Wiedereinschätzung des Magentumors mittels EUS und CT erfolgen [4].

Die perioperative Therapie wird präoperativ begonnen und postoperativ fortgeführt und gilt als Standardverfahren des lokalisierten Magenkarzinoms, d.h. ab Stadium T2 kann und bei Stadium T3 bzw. T4a sollte die Therapie angewandt werden [4]. Dabei wird eine Dreierkombination von Chemotherapeutika, z.B. das FLOT-Regime, appliziert. Wie die

Studienlage belegt, verbessert die kombinierte Anwendung von **Fluorouracil**, **Oxaliplatin** und **Docetaxel** das Gesamtüberleben um 9%. Zudem waren die perioperativen Morbiditäts- und Mortalitätsraten geringer und die Zahl der R0-Resektionen höher [50].

Das Ansprechen des Magenkarzinoms auf die adjuvante oder perioperative Therapie wird durch das Regressionsgrading nach Becker ermittelt. Hierbei gilt kein Nachweis von residuellem Tumorgewebe als sensitiver Prädiktor für die therapeutische Wirksamkeit und bestimmt den Einsatz postoperativer Zytostatika [51].

Als Alternativen zu dem perioperativen Konzept gilt die neoadjuvante bzw. adjuvante Tumorthherapie. Bei nicht präoperativ (neoadjuvant) therapierten Patienten mit limitierter LAD sollte eine postoperative (adjuvante) Chemotherapie durchgeführt werden, um lokoregionären Rezidiven hochwirksam entgegenzuwirken. Bei im Vorfeld vorgenommenener erweiterter LAD sollte leitlinienkonform eine adjuvante Therapie angeboten werden, während neoadjuvant therapierte Patienten von diesem Verfahren keinen Vorteil erlangen. Bei dem nicht fernmetastasierten Adenokarzinom des Magens im fortgeschrittenen Stadium T3 bzw. T4a ist die perioperative Therapie der neoadjuvante Radiochemotherapie ebenbürtig. Hierbei wird gemäß der S3-Leitlinie die präoperative Bestrahlung des Magenkarzinoms mit der Einnahme platinbasierter Zytostatika kombiniert. Die Entscheidung für ein neoadjuvantes Verfahren wird interdisziplinär getroffen und hängt von Variablen wie der onkologischen Situation, dem Patientenalter und etwaigen Komorbiditäten ab [4].

Palliatives Procedere

Über alleinige unterstützende Maßnahmen (sog. BSE: „*best supportive care*“) hinaus hat es sich als wirksam erwiesen, zum frühestmöglichen Zeitpunkt Patienten mit unheilbarem Magenkarzinom einer systemischen Chemotherapie zuzuführen. Dabei stehen die Erhaltung der Lebensqualität, Selbstständigkeit und individuelle Patientenwünsche im Vordergrund und regulieren neben dem Ansprechen des Tumors das Therapiekonzept [4].

Bei einem inoperablen Magenkarzinom oder Vorhandensein von Fernmetastasen sowie bei einem Rezidiv stehen verschiedene palliative Therapieoptionen zur Verfügung. In der Palliativsituation sind operative Behandlungsansätze eingeschränkt, da nach gültiger S3Leitlinie keine Resektion des Primarius empfohlen wird. Ebenso erfolgt keine chirurgische Intervention bei Irresektabilität des Magenkarzinoms bzw. bei bestehender funktioneller

Inoperabilität aufgrund von Alter, Komorbiditäten oder anderen Faktoren. In diesem Falle kann gemäß Leitlinie eine definitive Radiochemotherapie angeboten werden. Dabei werden parallel zur Bestrahlung des Karzinoms platinhaltige Zytostatika appliziert [4]. Bei dem sog. limitiert metastasierten Magenkarzinom, bei welchem ausschließlich lokal begrenzte retroperitoneale Metastasen vorliegen, zeigte eine Studie von Al-Batran et al. einen möglichen Nutzen bei chirurgischer Resektion des Primarius und der Metastasen [52]. Zusammenfassend hängt die Wahl des palliativen Therapieregimes von der Lokalisation, Ausdehnung und Schwere der Symptomatik ab und wird maßgeblich von den Wünschen des Patienten beeinflusst. Schwere und lebensbedrohliche Komplikationen wie eine Stenosierung des Magenein- oder -ausganges sind durch die Implantation eines selbstexpandierenden Metallstents zu therapieren, ggf. muss jedoch wie auch im Falle einer unstillbaren Blutung eine palliative Magenresektion erwogen werden [4].

Zielgerichtete Therapie

Neben dem Einsatz „klassischer“ Kombinations-Chemotherapie-Regime können beim Magenkarzinom auch zielgerichtete Medikamente zum Einsatz kommen. Nach den aktuell gültigen Leitlinien aus August 2019 ist zu Beginn einer palliativen Therapie der HER2-Status des Magentumors histopathologisch zu ermitteln [4]. Studien konnten bei Patienten mit metastasiertem HER2-positiven Magenkarzinom einen Überlebensvorteil nachweisen, wenn sie zusätzlich zur platinbasierten Standard-Chemotherapie den monoklonalen Antikörper Trastuzumab erhielten [53]. Bei Patienten ohne HER2-Überexpression werden Platin/Fluoropyrimidin-haltige Zytostatika miteinander kombiniert. Eine Docetaxel-haltige Dreifachkombination ist unter bestimmten Konditionen ebenfalls wirksam [4].

Der monoklonale Antikörper Bevacizumab gegen den VEGF-Rezeptor zeigt für das Magenkarzinom eine Reduktion des Tumolvolumens sowie eine Wachstumshemmung *in vitro* und *in vivo* [54]. Jedoch wurde eine klinische Studie, in welcher das Medikament zusätzlich zur Standardchemotherapie verabreicht wurde, aufgrund schwerwiegender Wundheilungsstörungen und vermehrten Undichtigkeiten an Gefäßanastomosen abgebrochen [55]. Zudem ist das Auftreten von arteriellem Hypertonus bei Ansprechen auf eine VEGFR-Inhibition als ein häufiges Phänomen bekannt [54]. Aufgrund dieser Komplikationen wird Bevacizumab in der Therapie des fortgeschrittenen Magenkarzinoms nicht empfohlen, zudem zeigt es nachweislich keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben

[54]. Dahingegen belegte die *Regard*-Studie für antherapierte und fortgeschrittene Magenkarzinome eine Überlebensverlängerung bei monotherapeutischer bzw. kombinierter Anwendung des VEGF-Antikörpers Ramucirumab [56]. Demzufolge steht dieser Antikörper für die Zweitlinientherapie bei Therapieversagen oder rasch fortschreitendem Tumorwachstum unter Therapie ggf. gemeinsam mit Paclitaxel zur Verfügung. Die Antikörper Cetuximab und Panitumumab gegen den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) bringen hingegen für das Magenkarzinom keinen therapeutischen Nutzen [4].

Insgesamt wird pro-angiogenetisch wirksamen Molekülen eine prognostische Relevanz beim Magenkarzinom zugeschrieben: Bei fortgeschrittenen Tumoren ist Angiopoetin in erhöhter Konzentration im Blut nachweisbar und der VEGF-Spiegel steigt beim Vorliegen von Fernmetastasen [54]. Unabhängig voneinander haben zwei Studien zu anti-angiogenetisch wirksamen Medikamenten gezeigt, dass sich der vorteilhafte Effekt umkehren und die Metastasierung begünstigt werden kann [57, 58]. Insgesamt besteht beim Magenkarzinom ein unverändert hoher Druck, neue und innovative zielgerichtete Medikamente zu entwickeln, die die Prognose und das Therapieansprechen verbessern. Eine dieser neuen Zielstrukturen ist möglicherweise das Insulin/IGF-System.

1.2 Das Insulin/IGF-System

1.2.1 Der Ligand Insulin (INS)

Der Ligand Insulin wird von den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas produziert. Die unreife Form präpro-Insulin wird modifiziert, indem das C-Peptid herausgeschnitten und das A- und B-Peptid über Disulfidbrücken zu einem Polypeptidstrang verknüpft werden [59]. Der Botenstoff Insulin reguliert im Blut zirkulierende Konzentrationen an Glukose, Proteinen und Fettsäuren. Rückwirkend wird der Insulinspiegel durch Peptide und Aminosäuren, die Hormone Melatonin, Östrogen, Leptin und Somatropin (GH) reguliert [60]. Eine Störung dieses sensitiven Regelkreises geht mit Hyperinsulinämie und dem metabolischen Syndrom einher. Da bei Ligandenbindung über nachfolgende Signalketten Proliferationssignale initiiert werden, wirkt Insulin auf zellulärer Ebene als Wachstumsfaktor. Daher ist eine Störung der Glukosehomöostase nachweislich mit der Entstehung von Karzinomen assoziiert [61].

1.2.2 Der Insulinrezeptor (IR)

Molekularer Aufbau

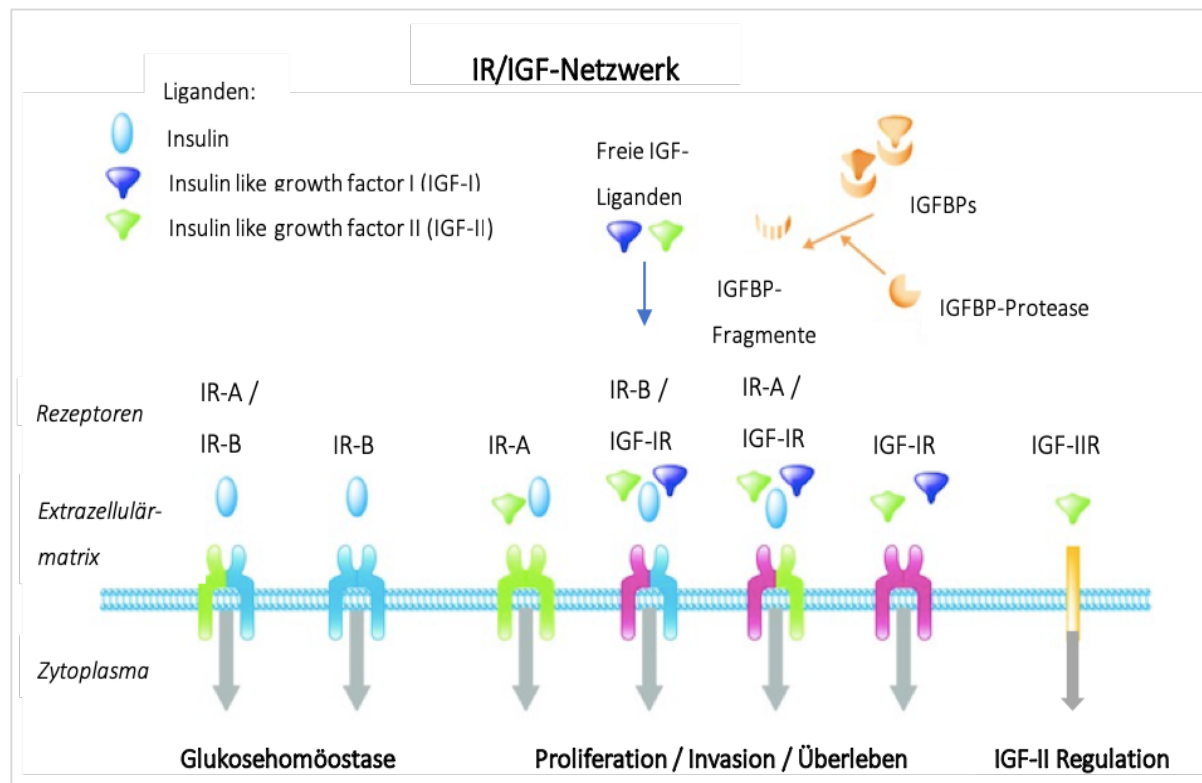
Der an der Zelloberfläche exprimierte IR ist ein heterotetrameres Glykoprotein, welches aus zwei α - und zwei β -Einheiten besteht, die über eine Disulfidbrücke funktionell zu einer $\alpha_2\beta_2$ -Konfiguration dimerisieren. Jedes Monomer besteht aus einer extrazellulär gelegenen α -Untereinheit und einer Membran-durchspannenden β -Einheit, für die jeweils ein einzelner mRNA-Strang codiert [62]. Im Rahmen der Proteinbiosynthese werden durch alternatives Spleißen zwei Isoformen des IR generiert [63].

IR und IGF-System

Der IR und strukturell eng verwandte IGF-IR/-IIR gehören zu der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren (RTK), denen beim Menschen noch 58 weitere Rezeptoren angehören [62]. Das in Säugetieren angelegte IR/IGF-Netzwerk zeichnet sich durch eine dynamische Interaktion zwischen den wesentlichen Liganden Insulin (INS), *Insulin like growth factor-I* (IGF-I) und *Insulin like growth factor-II* (IGF-II) mit den jeweiligen Rezeptoren aus. Von besonderer Interkonnektivität zeugt die Bildung von Hybridrezeptoren. Dabei formen die strukturell weitgehend homologen Rezeptoren IR und IGF-IR durch kovalente Wechselwirkungen die Heterodimere IR-A/IGF-IR bzw. IR-B/IGF-IR. Somit binden die drei Liganden (Insulin, IGF-I und IGF-II) an sechs Rezeptoren: den Insulinrezeptor (IR), IGF-I-Rezeptor (IGF-IR), IGF-II-Rezeptor (IGF-IIR), die Hybridrezeptoren IR-A/IGF-IR bzw. IR-B/IGF-IR und den *Insulin receptor-related receptor* (IRR) mit unterschiedlicher Affinität [64]. Bei IGF-katalysierten Reaktionen sind die *Insulin like growth factor binding proteins* (IGFBP) von Bedeutung. Jene niedermolekularen Proteine binden an die IGF-Proteine und verstärken deren Wechselwirkungen am Rezeptor. Bei dem Abbau durch IGFBP-Proteasen entstehen Fragmente, welche wiederum eine geringere Affinität zu den IGF-Rezeptoren zeigen. Infolgedessen wird die Bioverfügbarkeit freier IGF-Moleküle erhöht [65].

Abb. 2: Komponenten der IR/IGF-Achse. Die drei Liganden Insulin, IGF-I und IGF-II binden ihren jeweilig zugehörigen Rezeptor (IR; IGF-IR und IGF-IIR) sowie in unterschiedlicher Affinität die Hybridrezeptoren (IR-A/ IGF-IR bzw. IR-B/IGF-IR). IGFBP binden an die IGF-Moleküle und modifizieren die Ligand-Rezeptor-Interaktion qualitativ. Die bei ihrem Abbau entstehende

Fragmente beeinflussen die IGF-Quantität. IGF-IIR ist ein monomerer Rezeptor und kontrolliert die Konzentration frei zirkulierender IGF-II-Moleküle. Abbildung modifiziert nach Simpson et al. (2017).



Insulin wird mit ähnlich hoher Affinität von seinen Isorezeptoren, dem IR-A und IR-B gebunden und zudem mit niedrigerer Bindungsstärke von dem Hybridrezeptor IR-A/IGF-IR umgesetzt. Da die beiden Isoformen des IR das Insulinmolekül gleich stark binden, unterscheiden sie sich im Wesentlichen hinsichtlich ihrer Affinität zu den IGFs. Während der IR-A hochpotent den IGF-II und mäßig affin den IGF-I bindet, kann der IR-B den IGF-II allenfalls niedrigpotent und den IGF-I gar nicht umsetzen [61, 66].

Der Ligand IGF-I aktiviert vor allem den IGF-IR und die Hybridrezeptoren und kann niedrigpotent an den IR-A binden. Der dazugehörige IGF-IR wird folglich überwiegend von seinen Liganden IGF-I und IGF-II stimuliert [61, 66, 67].

Der Ligand IGF-II aktiviert hochaffin den IGF-IIR, den IGF-IR und den IR-A. Der entsprechende Rezeptor IGF-IIR hingegen bindet ausschließlich zirkulierendes IGF-II und reguliert durch enzymatische Degradation die IGF-II-Konzentration im Blut [65].

Tab. 3: Zusammenfassung der Bindungsaffinitäten der Liganden Insulin, IGF-I und IGF-II zu ihren jeweiligen Rezeptoren. Bindungsstärke auf einer Skala von - (keine Affinität) zu ++++ (höchste Affinität) symbolisiert. In Anlehnung an Malaguarnera, R. und Belfiore, A. (2011).

	Insulin	IGF-I	IGF-II
IR-A	++++	+ / ++	+++
IR-B	++++	-	+ / -
IGF-IR	-	++++	+++ / +++++
IGF-IIR	-	-	+++
IR-A/IGF-IR	- / ++	+++ / +++++	+++ / +++++
IR-B/IGF-IR	-	+++	++ / +++++

1.2.3 Struktur und Funktionen der Isoformen des IR

Die Isoformen des IR werden aus demselben Transkript durch alternatives Spleißen gewonnen. Entscheidend ist bei diesem Prozess das aus 36 Nukleotiden bestehende und für 12 Aminosäuren kodierende Exon 11 am C-Terminus des Proteins. Während der IR-B das betreffende Exon inkludiert, ist der IR-A Exon-11 negativ [63]. Die Expression der Isoformen ist abhängig von dem Differenzierungsgrad und dem Gewebe. Der IR-A wird insbesondere in embryonalen, undifferenzierten Geweben wie Muskulatur, Leber, Milz und Fibroblasten exprimiert und ist beinahe ubiquitär im Körper vorhanden [68]. Dahingegen wurde der IR-B überwiegend in ausdifferenzierten insulinsensitiven Geweben wie quergestreifter Skelettmuskulatur, Leber und Fettzellen nachgewiesen [69]. Beide Isorezeptoren werden von Karzinomen überexprimiert. Wie Malaguarnera et al. konkretisierten, umfasst dabei der Anteil des IR-A 60-100%. Demzufolge wird der IR-A in Tumoren dominant exprimiert [61].

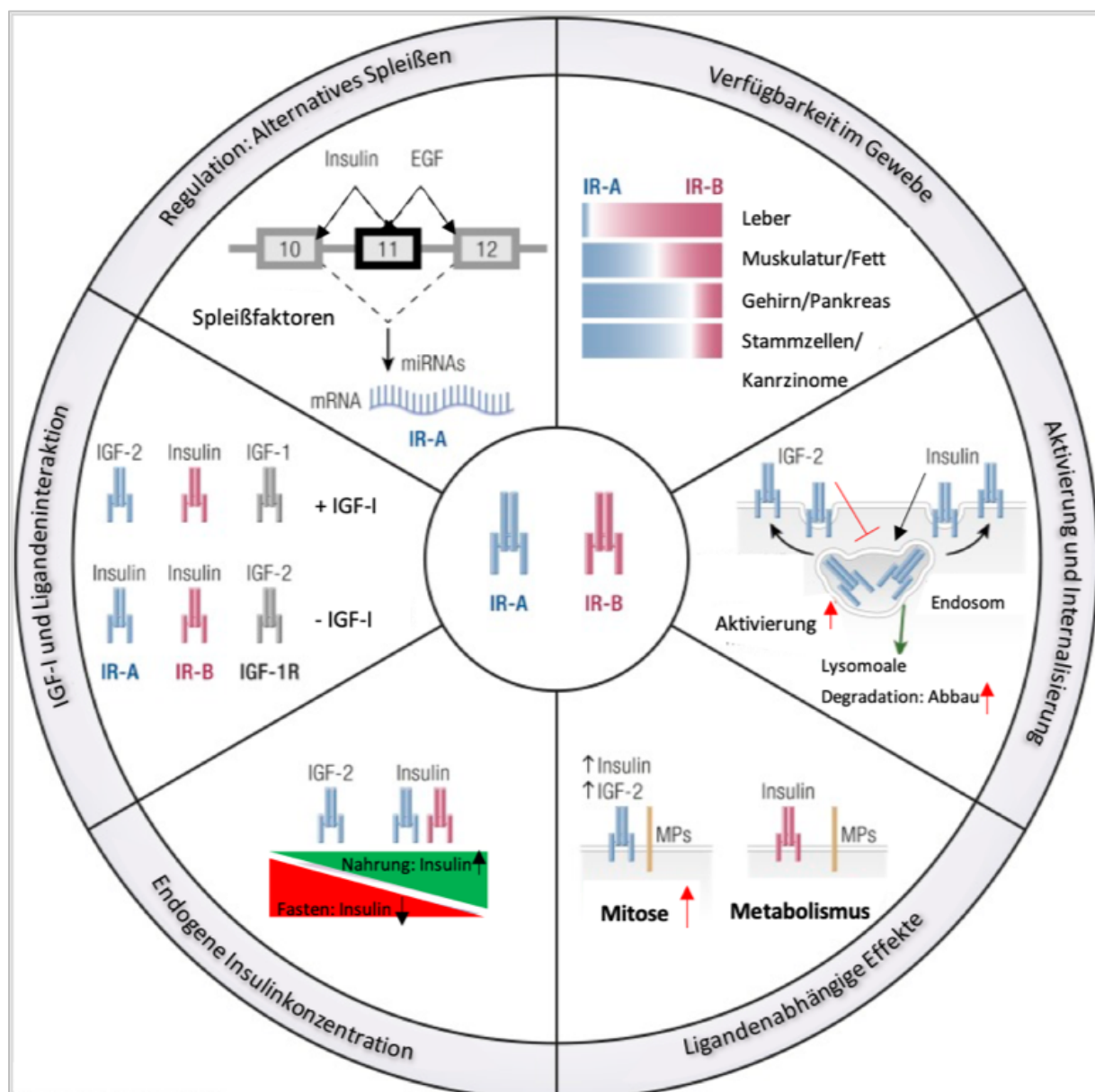
In Abbildung 3 sind die Unterschiede hinsichtlich der Biologie der Isorezeptoren zusammengefasst:

Der IR-A enthält das Exon 11 nicht. Spleißfaktoren, *miRNAs* und die Wachstumsfaktoren Insulin und EGF regulieren das alternative Spleißen zugunsten des IR-A. Jener Rezeptor ist prädominant in undifferenzierten Geweben, wie etwa fötalen Organen und Karzinomen. Die Bioverfügbarkeit des IR-A wird neben Gewebefaktoren auch von Liganden und der Konzentration zirkulierender Insulinmoleküle beeinflusst: Bindet Insulin an den IR-A, erfolgt dessen Internalisierung und Abbau, während bei IGF-II-Bindung keine lysosomale Degradation erfolgt und somit der IR-A länger aktiviert bleibt. Zudem bindet bei

Nahrungskarenz und niedrigem Insulinspiegel vornehmlich der IGF-II an den IR. Bei ausreichender Insulinkonzentration im Blut werden hingegen beide Isoformen des IR über Insulinmoleküle aktiviert. Zuletzt wird die Ligandenbindung am IR-A durch den IGF-I-Spiegel beeinflusst. Bei hoher Bioverfügbarkeit bindet IGF-I den zugehörigen IGF-IR, sodass IGF-II den IR-A besetzt. Dahingegen bindet bei Abwesenheit von IGF-I vorzugsweise Insulin an den IR-A [63].

Abb. 3: Zusammenfassung der biologischen Diversitäten der Isoformen IR-A und IR-B.

Abbildung modifiziert nach Belfiore et al. (2017).



1.2.4 Signaltransduktionskaskade

Die Rezeptoren IGF-I und IGF-IIR sowie die IR-Hybridrezeptoren initiieren über nachgeschaltete Signalkaskaden Zellwachstum, Proliferation, Überleben und Metastasierung [61, 67]. Für die vorliegende Arbeit stand jedoch der Mechanismus bei Ligandenbindung an den IR im Vordergrund, auf welchen im Folgenden eingegangen wird. Im Falle der Besetzung der extrazellulär gelegenen α -Untereinheit mit einem passenden Liganden steigt die intrinsische Aktivität der Proteinkinase der Transmembrandomäne und es kommt zur Autophosphorylierung konservierter Tyrosinreste der β -Untereinheit. Intramolekulare Konformationsänderungen aktivieren nachgeschaltete Adapterproteine, die Insulin Rezeptorsubstrat-Proteine (IRS) [70]. Die Übermittlung des extrazellulären Signals in einen intrazellulären Stoffwechselvorgang erfolgt anschließend entweder über die PI3K/Akt- oder die MAPK-Signalkaskade.

PI3K/Akt-Signalweg

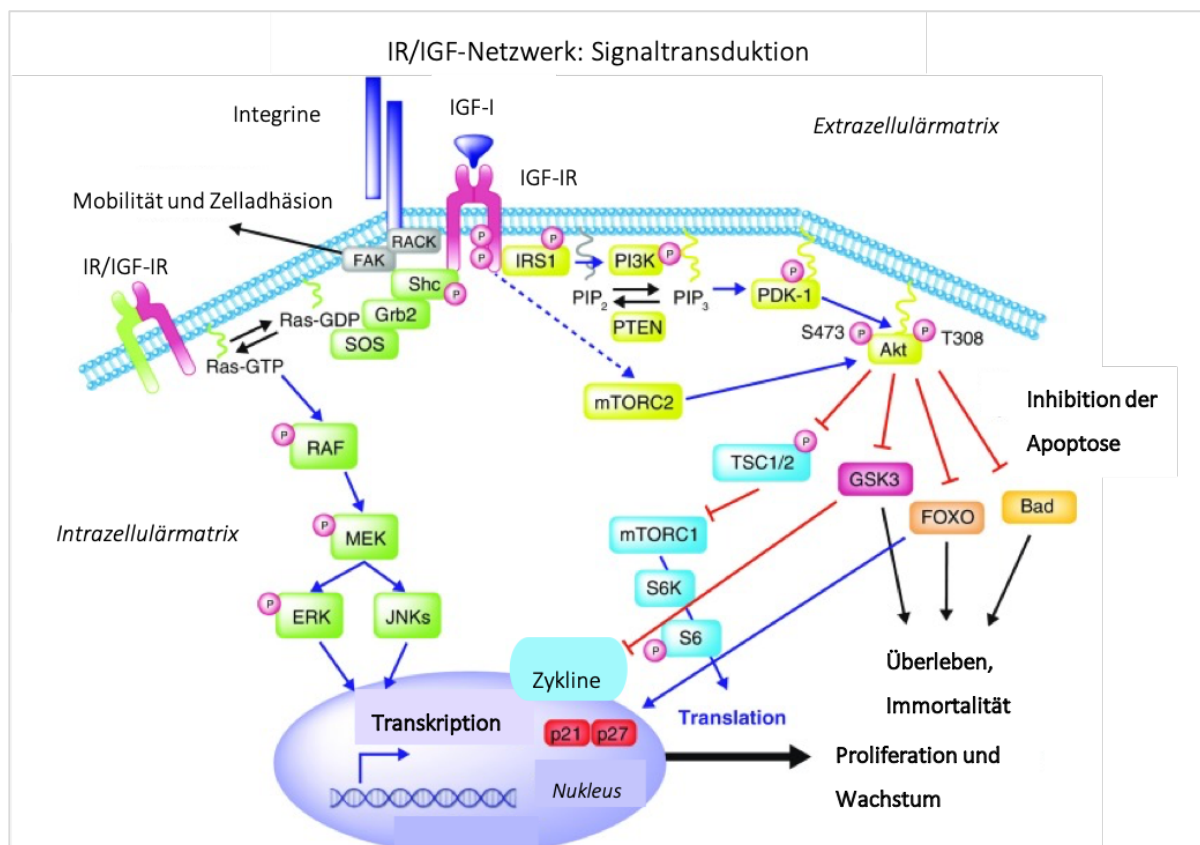
Bei dem nach der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) benannten Signalweg dockt an der *Src homology 2* (SH2) Bindestelle des IRS-Proteins das SH2-haltige Enzym PI3K an [70]. Durch die Bindung kommt es zur Konformationsänderung und damit zur Aktivierung des Enzyms. PI3K phosphoryliert alsdann Membranlipide zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3). Anschließend wird durch das Syntheseprodukt die Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1 (PDK-1) mittels Phosphorylierung aktiviert, welche die Serin-/Threonin-Kinase Akt stimuliert [71]. Über diese Serin-/Threonin-Kinase werden transkriptionale Signale bis in den Zellkern weitergeleitet. Über das Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN)-Protein wird der PI3K-Signalweg im Sinne einer negativen Rückkopplung reguliert [65]. PTEN ist das zweithäufigste in Karzinomen mutierte Tumorsuppressorgen. Ein Verlust der Aktivität von PTEN geht mit vermehrter Expression des IGF-II und Stimulation des tumorrelevanten IGF-IR einher [72].

MAPK-Signalweg

Die mehrstufige Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) - Signalkaskade stellt eine weitere Möglichkeit zur Transduktion des extrazellulären Stimulus dar. An die intrazellulär gelegene phosphorylierte Bindungsstelle des IR bindet das Wachstumsfaktorgebundene Protein 2 (Grb2), womit infolge sterischer Änderungen das Protein *Son of sevenless* (SOS)

eine Verbindung eingeht. Es folgt eine Phosphorylierungskaskade, die die Adapterproteine *Ras*, *Raf* (MAPK-3), *Mek* (MAPK-2) und *ERK* (MAPK-1) hintereinander gezielt aktiviert [73]. An dieser Stelle ist zudem erwähnenswert, dass das *Ras*-Protein auch von der PI3K gebunden werden kann und damit eine interkonnektive Verbindung beider Signalwege besteht [74]. Die MAPK ist eine selektive Serin-/Threonin-Kinase, welche Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und aktiviert. Diese werden in den Zellkern importiert, binden an spezifische DNA-Rezeptoren und führen zur Transkription von Zielgenen [73].

Abb. 4: Insulinrezeptor-Netzwerk. Die Ligandenbindung an den IR führt zur Autophosphorylierung und kreiert Bindungsstellen für die Adaptermoleküle IRS1 oder *Shc*. Daran schließen sich die PI3K/Akt- und Ras/Raf/MAPK-Signalwege an, welche auf nukleärer Ebene Proliferations-, Migrations- und Überlebens-Signale induzieren. Abbildung modifiziert nach Simpson et al. (2017).



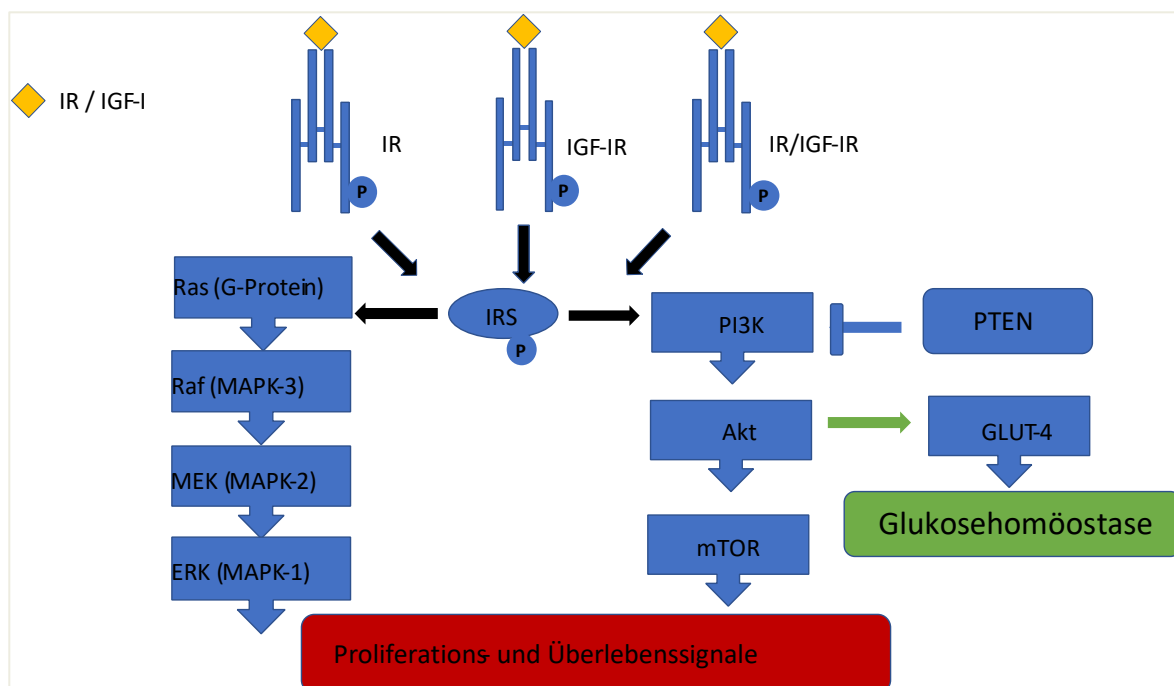
1.3 Involvierung des IR/IGF-IR-Netzwerks in die Karzinogenese

Bezüglich der Resultate bei IR- bzw. IGF-IR-Aktivierung ist zwischen der Stimulierung der Rezeptoren unter benignen und malignen Bedingungen zu differenzieren.

Physiologischerweise vermittelt der IR, vorzugsweise bei Stimulation durch Insulin, über die Aktivierung des PI3K-Signalwegs zelluläre Stoffwechselvorgänge und die Glukosehomöostase. Diese Prozesse umfassen unter anderem eine gesteigerte Glukoneogenese, Proteinsynthese und Lipogenese bei insgesamt anaboler Stoffwechsellaage. Binden hingegen IGFs an den IGFIR und initiieren die nachgeschaltete MAPK-Signalkaskade, werden zelluläre Wachstumssignale generiert. Somit weisen unter physiologischen Bedingungen der IR und der IGF-IR voneinander distinkte Funktionen auf [61].

Nach Malaguarnera et al. werden jene Signalwege in Karzinomen nicht mehr spezifisch angesteuert. Die Dysbalance der IR/IGF-Achse in Tumoren erfolgt zugunsten des MAPK-Signalweges und geht mit enthemmter Generierung pro-mitogener Signale einher [61].

Abb. 5: Schematische Darstellung der Signaltransduktion bei Aktivierung des IR, IGF-IR und Hybridrezeptors. Nach Ligandenbindung an den IR, den IGF-IR oder einen Hybridrezeptor kommt es zur Autophosphorylierung (P) und Aktivierung. Dies resultiert in einer Phosphorylierung der IRS mit Aktivierung zweier intrinsischer Zellwege: den MAPK- und PI3K-Signalweg. Über ersteren werden zelluläre Wachstumssignale generiert. Der PI3K-Weg reguliert über Akt die metabolische Homöostase und induziert über die Kinase mTOR Wachstumssignale. Das Tumorsuppressorgen PTEN reguliert die zelluläre und metabolische Antwort auf den Stimulus. In Anlehnung an Malaguarnera et al. (2011).



1.3.1 Stellenwert des IR-A

Die Annahme, dass der IR eine zentrale Rolle in der Karzinogenese einzunehmen scheint, ergibt sich aus der Beobachtung, dass der Rezeptor in einer Vielzahl von Tumorentitäten überexprimiert wird [63]. Interessanterweise zeigt sich die IR-A/IR-B-Ratio in Karzinomen wie dem Mamma-, Lungen-, Leber-, Prostata-, Harnblasen- und Kolonkarzinom sowie bei diversen (kindlichen) Knochentumoren zugunsten des IR-A erhöht [68, 75-79].

Die Isorezeptoren IR-A und IR-B unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Bindungsstärke zu dem Liganden Insulin nicht wesentlich. Von besonderer Bedeutung ist jedoch, dass lediglich der IRA hochaffin die IGFs, allen voran IGF-II, bindet, während der IR-B als spezifischer Rezeptor für Insulin gilt [61, 63]. Jener Unterschied ist relevant hinsichtlich der Bedeutung des IR-A für die Karzinogenese, da Tumoren durch auto- bzw. parakrin sezernierte IGFs die Fähigkeit zur Autostimulation besitzen. Damit wirkt IGF-II als Stimulanz für das Tumorwachstum. Grundsätzlich wird der Ligand IGF-II ähnlich potent von dem IR-A wie von dem IGF-IR umgesetzt. Vor dem Hintergrund, dass in Tumoren die IR-A/IGF-IR-Ratio zugunsten des IR-A überwiegt, erfolgt die Stimulation des IR-A in Karzinomen vornehmlich durch IGF-II [61]. Das enthemmte Zellwachstum wird zudem durch eine autokrine Verbindung zwischen dem IR-A und IGF-II gefördert [68, 75-78]. Studien haben herausgearbeitet, dass die biologischen Effekte der IR-A-Aktivierung abhängig von den extrazellulär bindenden Liganden sind. Demnach wiesen Malaguarnera et al. nach, dass IGF-II im Vergleich zu Insulin am IR-A ein wesentlich potenterer Ligand für die zelluläre Migration und Proliferation ist [61]. Darüber hinaus weisen Karzinome eine vermehrte Expression von Hybridrezeptoren auf. Dies bedeutet, dass die Liganden IGF-I und IGF-II ebenfalls über die Heterodimere verstoffwechselt werden und zur Amplifikation des Wachstumssignals beitragen. Schließlich induzieren auch pathologisch erhöhte Insulinkonzentrationen, wie beispielsweise bei Hyperinsulinämie, die permanente Aktivierung des IR [61].

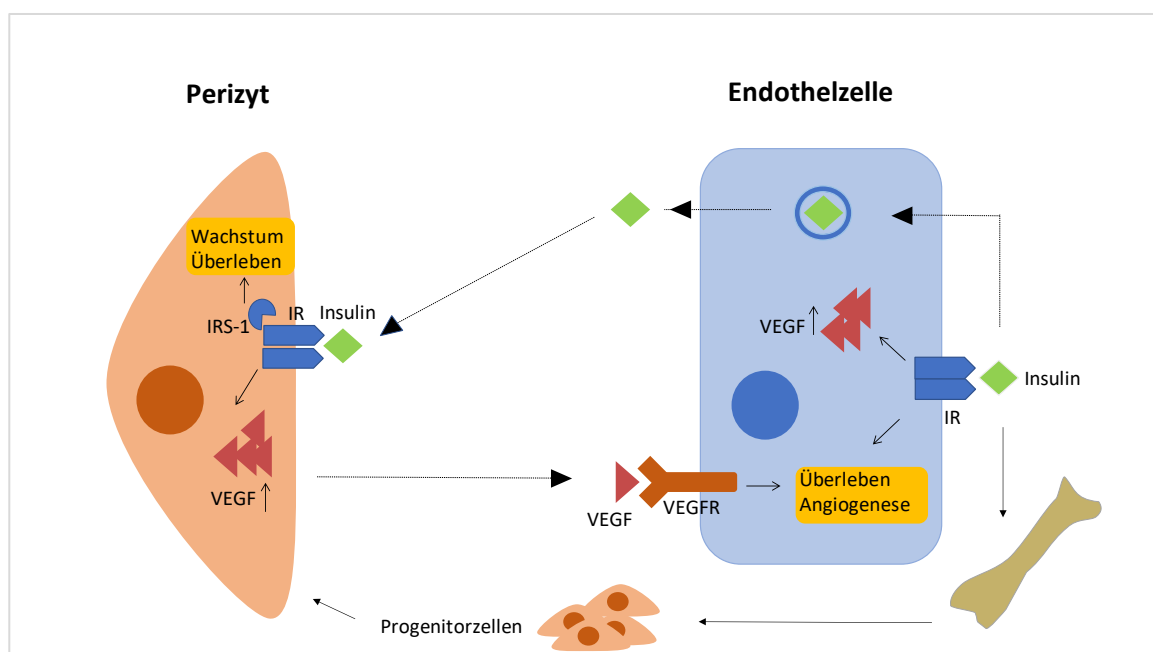
Zusammenfassend münden all jene genannten Prozesse in einer chronischen Aktivierung des IR in Karzinomen. Dabei rückt die physiologische Funktion des IR in den Hintergrund und es kommt zur Amplifikation des MAPK-Signalwegs mit exzessiver Stimulation pro-mitogener Signale. Somit trägt der IR-A durch seine pleiotropen Effekte nachweislich zur Karzinogenese bei [80]. Im Folgenden soll die Funktion des IR an Endothelien und Epithelien unter benignen und malignen Bedingungen dargelegt werden.

1.3.2 Pathophysiologische Effekte des IR auf Endothelien und Epithelien

Physiologische Funktionen des vaskulär exprimierten Insulinrezeptors (VIR)

Der von Endothelien exprimierte IR ist in mindestens vier Prozesse der Angiogenese involviert: (1) die Kommunikation zwischen Endothelzellen und Perizyten über transzellulären Insulintransport, (2) die Migration und Proliferation von Endothelzellen, (3) als Transkriptionsfaktor vasoaktiver Metabolite wie Stickstoffmonoxid (NO), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Angiopoetin sowie (4) für die Gewebshomöostase. Der IR wird sowohl auf Endothelien als auch auf umgebenden Stützzellen exprimiert und reguliert in Abhängigkeit des Liganden Insulin die Gefäßaussprossung und Proliferation [81]. In diesem Zusammenhang gilt Insulin als einer der stärksten Initiatoren der Angiogenese und ist bedeutsam für die Zellregeneration und Reoxygenierung ischämischer Gewebe. Aus der Aktivierung des IR in Endothelien resultiert eine Vasorelaxation, welche die Aufnahme von Aminosäuren fördert. Damit wirkt sich der IR positiv auf das Überleben der Endothelzellen aus mit einhergehenden vaskulo- und kardioprotektiven Effekten [82, 83].

Abb. 6: Insulin-vermittelte Interaktion zwischen Perizyten und Endothelzellen im Zuge der Angiogenese. Insulin wird para- oder transzellulär durch die Endothelzelle geschleust und stimuliert innerhalb des Perizyten die VEGF-Ausschüttung. VEGF wiederum kann an VEGF-Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen binden. Der IR bewirkt die Differenzierung maturer Progenitorzellen (PC) und Überlebens- und Proliferationseffekte. In Anlehnung an Escudero et al. (2017).



Pathologische Effekte des IR auf Epithelien und Endothelien

Eine Störung des IR-Netzwerks ist mit einem enthemmten Gefäßwachstum assoziiert und in die Genese von Erkrankungen wie Adipositas, Hyperinsulinämie, Diabetes mellitus und Karzinomen involviert [81]. Die Hypothese, dass der IR einen potenten Wachstumsfaktor zur Expansion der Tumormasse darstellt, gilt für einige Tumorentitäten als gesichert. Wie Heidegger et al. bei dem Prostatakarzinom bestätigten, war die Isoform IR-A mit vermehrtem Tumorwachstum und Vaskularisierung *in vivo* assoziiert. Darüber hinaus stimulierte der IR die Proliferation, Differenzierung, Migration, Invasion und das Überleben der Tumorzellen *in vitro* [84]. Zu ähnlichen Erkenntnissen kamen auch Roudnicky et al. in einer 2017 veröffentlichten Studie zum invasiven Harnblasenkarzinom. Die Gruppe konnte zeigen, dass der von Tumorepithelien vorrangig exprimierte IR-A die endotheliale Migration und darüber hinaus auch die Metastasierung förderte. Eine ausgeprägte vaskuläre IR-Expression war bei dem Harnblasenkarzinom mit einer infausten Patientenprognose assoziiert [85].

Zusammenfassend inkorporiert der IR sowohl pro-mitogene als auch pro-angiogenetische Eigenschaften. Damit ist dieser Rezeptor zum einen von Bedeutung für die Wundheilung und Regeneration ischämischen Gewebes. Bei Dysfunktion hingegen trägt der IR pathologischerweise zur Karzinogenese bei und stimuliert bei bereits vorhandenem Karzinom die Tumorexpansion [84, 85].

1.4 Möglichkeiten und Limitationen der IR-Inhibition

Für die Hemmung der IR/IGF-Achse bestehen derzeit drei wesentlichen Konzepte.

Da der IR zur Familie der RTK gehört, ist es möglich, über Liganden von extrazellulär (Antikörper) oder intrazellulär (*small molecules*, RTK-Inhibitoren) den Rezeptor zu antagonisieren. Als weitere antitumorale Strategie kann eine Hemmung des IR-A durch die Elimination des hauptsächlich stimulatorisch wirkenden Liganden IGF-II erreicht werden. Die letzte Option, die spezifische IR-A-Inhibition, ist nach dem Stand der heutigen Wissenschaft noch nicht realisierbar.

Monoklonale Antikörper

Ob ein Karzinom von den bisherig entwickelten Antikörpern zur IR- bzw. IGF-IR-Inhibition wirksam therapiert werden kann, hängt insbesondere von dessen IR/IGF-IR-Ratio ab. Nach Malaguarnera et al. sind bei Tumoren mit niedrigem IR/IGF-IR-Verhältnis insbesondere diejenigen IGF-IR-Antikörper von Vorteil, welche zusätzlich die Hybridrezeptoren blockieren [61]. Dalotuzumab stellt bislang den einzigen IGF-IR-Antikörper mit additiver IR/IGF-IR Hemmung dar und kann bei Karzinomen, in welchen der IR vorwiegend in Hybridrezeptoren gebunden ist, die IR-Aktivität wirksam reduzieren [86, 87]. Klinisch zeigte zudem auch die Kombination zweier IGF-IR-Antikörper anti-neoplastische Wirksamkeit, mit potenterer IGF-II-Blockade als die Applikation eines alleinigen Antikörpers [88].

Weist das Karzinom hingegen ein erhöhtes IR/IGF-Verhältnis auf, so wird die Wirksamkeit der Antikörpertherapie erhöht, indem additiv zu dem IGF-IR-Antagonist ein IGF-II-Antikörper verwendet wird. Im Falle des dualen IGF-I und IGF-II-Antikörpers *MEDI 573* konnten Gao et al. zeigen, dass in Kombinationstherapie mit IGF-IR-Antikörpern das Tumorstadium eingedämmt werden konnte [89].

RTK-Inhibitoren

Antagonisten der RTK verfügen über zytostatische, antiproliferative und anti-angiogenetische Eigenschaften und sind u.a. in der Behandlung gastrointestinaler Karzinome und weiterer Malignome etabliert [90]. Für Antikörpertherapien gegen den VEGFR und EGFR wurde bereits eine wirksame Reduktion der Tumormasse für einige Entitäten nachgewiesen [54, 91]. Beispielhaft ist ebenso der RTK-Hemmer des KIT-Rezeptors zu nennen, der bei der Behandlung gastrointestinaler Stromatumoren große Erfolge erzielen konnte [92].

Unspezifische RTK-Hemmer des IGF-IR haben den Vorteil, dass sie aufgrund der hohen Strukturhomologie dieser Rezeptoren auch zu einem gewissen Grad den IR hemmen [93]. Nachteilig ist jedoch, dass neben dem IR weitere RTK unspezifisch blockiert werden, was die Toxizität des Medikaments erhöht. Dahingegen zeigt die Applikation präziser IGF-IR-Antagonisten den Vorzug, dass IR-assoziierte Nebenwirkungen vermieden werden. Jedoch weisen diese Medikamente keine genügende Potenz gegen das in Karzinomen hochregulierte IR/IGF-Netzwerk mitsamt Hybridrezeptoren auf [61].

Zusammenfassend zeigen aktuell verfügbare RTK-Inhibitoren des IR anti-tumorale und anti-angiogenetische Wirksamkeit, sind jedoch bislang nicht Isoformen-spezifisch wirksam.

Das *small molecule* Sunitinib dient ebenfalls zur Therapie gastrointestinaler Stromatumoren [90]. Jene niedermolekularen Proteine werden in der zielgerichteten onkologischen Medizin dahingehend konfiguriert, dass sie intrazellulär an die intrinsische Tyrosinkinasedomäne binden. Linsitinib, wirksam gegen den IR und IGF-IR, zeigte in einer Vielzahl abgeschlossener Studien *in vivo* Wirksamkeit gegen gastrointestinale Tumoren. Eine klinische Testung am Magenkarzinom steht bislang aus. Die dualen RTK-Inhibitoren *KW-2450* und *BI 885578* hemmen zugleich den IR und den IGF-IR und wiesen eine antitumorale Wirkung bei akzeptabler Toxizität auf [63].

Bezüglich der Potenz der *small molecules* in der onkologischen Therapie gastrointestinaler Tumoren besteht zurzeit kein einheitliches Bild. Wie Belfiore et al. darlegten, kann die duale IR/IGF-Inhibition vielversprechende Resultate erzielen [63], jedoch bleibt der Erfolg der Anwendung von *small molecules* umstritten.

IGF-II-Neutralisation

Konzepte zur Reduktion frei im Blutkreislauf verfügbarer IGF-II-Moleküle sehen vor, entweder den Liganden spezifisch zu binden oder kompetitiv dessen Rezeptoren zu besetzen. Vorteilig ist dabei, dass dieser Therapieansatz die metabolisch-regulatorischen Effekte des IR nicht beeinträchtigt. Nachteilig ist jedoch, dass dabei nicht die ebenso zur Karzinogenese beitragenden hohen Insulinspiegel korrigiert werden [63]. *MEDI-573* ist ein humaner monoklonaler Antikörper zur Neutralisation von IGF-I und IGF-II. Das Medikament zeigte in Phase 1 der klinischen Testung eine potente Wirksamkeit bei guter Verträglichkeit [89]. Einen ähnlichen Wirkmechanismus besitzt die aus dem IGF-IIR extrahierte *Domäne 11*. Diese ist löslich im Serum und eliminiert hocheffizient frei flottierendes IGF-II [94]. Für gastrointestinale Tumoren wie das Magenkarzinom, bei denen eine autogene IGF-II Produktion zur Überstimulation des IR-A führt, kann eine effektive Senkung der IGF-II-Spiegel durch Somatostatin-Inhibitoren bzw. Dopamin-Antagonisten erreicht werden [95].

Spezifische IR-A-Antagonisten

Nach Überlegungen von Belfiore et al. [63] liegt der in Karzinomen regelmäßig erhöhten IRA/IR-B-Ratio eine genetische Alteration zugrunde, die während der Phase des

alternativen Spleißens das Gleichgewicht zugunsten des pro-onkogenen IR-A verschiebt. Gelänge es, jene Mutation zu detektieren, könnte vermutlich die Dysbalance der Isorezeptoren aufgehoben und damit die Karzinogenese bzw. der Progress von Tumoren gehemmt werden. Bislang wurde trotz anhaltender Bemühungen keine derartige Schlüsselmutation nachgewiesen, sodass entsprechende therapeutische Möglichkeiten vorerst hypothetisch sind.

1.4.1 Nebenwirkungen der IR-Inhibition

Vor dem Hintergrund, dass die derzeitigen IR-Antagonisten unspezifisch wirken, führt die IR-Inhibition zu einer Beeinträchtigung sowohl des IR-A als auch des IR-B [63]. Während Studien durch die Anwendung von IR-A-Inhibitoren von einer Reduktion der Tumormasse berichten, resultiert aus der unbeabsichtigten IR-B-Blockade ein Verlust der glykämischen Kontrolle. Aufgrund schwerwiegender glykämischer Entgleisungen mussten Studien zu IR-Antikörpern in präklinischen Phasen der Testung abgebrochen werden. Reversible Hyperglykämien gehören zu den Dosis-limitierenden Nebenwirkungen der unselektiven IR-Hemmer, sind jedoch ohne Einfluss auf die klinische Wirksamkeit [61].

Andere Nebenwirkungen, die auch bei anti-angiogenetisch wirksamen Antikörpern auftraten, spiegeln toxische Effekte auf hämatopoetische Zellen wider. Angiogenesehemmer führen vielfach zu Wundheilungsstörungen, gastrointestinalen Hämorrhagien, Beeinträchtigung der Nierenfunktion und Leuko- bzw. Neutropenie [96]. Gelänge eine gezielte Inhibition des ubiquitär in Tumoren exprimierten IR, könnten hämostaseologische Nebenwirkungen minimiert und anti-neoplastische Effekte über das Magenkarzinom hinaus erzielt werden [97].

Deshalb gilt der IR weiterhin als pharmakotherapeutisch attraktive Zielstruktur.

1.4.2 Resistenzmechanismen bei Inhibition der IR/IGF-Achse

Der Mechanismus, welcher der erworbenen Resistenz von Magenkarzinomen gegenüber dem RTK-Hemmer des *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) zugrunde liegt, ist am Mammakarzinom verstanden worden [61, 63, 98, 99].

Trotz initialer Response verlieren IGF-IR-Inhibitoren langfristig ihre Wirksamkeit, da Tumorzellen über nachfolgende Resistenzmechanismen verfügen:

(a) die Erhöhung der Sensitivität der Epithelien gegenüber Insulin, (b) die vermehrte Bildung von IR/IGF-IR-Heterodimeren, (c) die Hochregulation des IR-A und des Liganden IGF-II und (d) die Erhöhung des Insulinspiegels als Reaktion auf den Wegfall der negativen Rückkopplung durch IGF-I [100102]. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass die IGF-IR-Hemmung zur Stimulation und Hochregulation des IR führt und dadurch therapeutisch initiierte Signale auf den Tumor abgeschwächt bzw. gänzlich aufgehoben werden können. Nach Zhang et al. gilt die IR-Überexpression als eine mögliche Erklärung für die Resistenz fortgeschrittener Magenkarzinome gegen HER2-Inhibitoren. Durch die IR-Stimulation wird der MAPK-Signalweg reaktiviert und die pro-apoptotischen Signale von RTK-Inhibitoren gedämpft [103]. Darüber hinaus sind interkonnektive Verknüpfungen des IR/IGF-Systems verantwortlich für eine Vielzahl von Misserfolgen in klinischen Studien [75, 104-106].

1.5 Tumormetabolismus

Hanahan und Weinberg beschrieben im Jahre 2000 mit den „*Hallmarks of Cancer*“ wesentliche Eigenschaften maligner Tumoren. Dazu zählen die (1) Wachstumssignalautonomie, (2) Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, (3) Umgehung der Apoptose, (4) Immortalisation, (5) Fähigkeit der Angiogenese und schließlich (6) das Potential zur Invasion und Metastasierung [107]. Elf Jahre später ergänzten Hanahan und Weinberg ihre „*hallmarks*“ um eine Reihe weiterer wichtiger Eigenschaften maligner Tumoren, nämlich die (7) Immunevasion, (8) tumorfördernde Entzündung, (9) genomische Instabilität und (10) aerobe Glykolyse („*metabolic switch*“) [108].

1.5.1 „*Metabolic switch*“ – Energiestoffwechsel in Tumoren

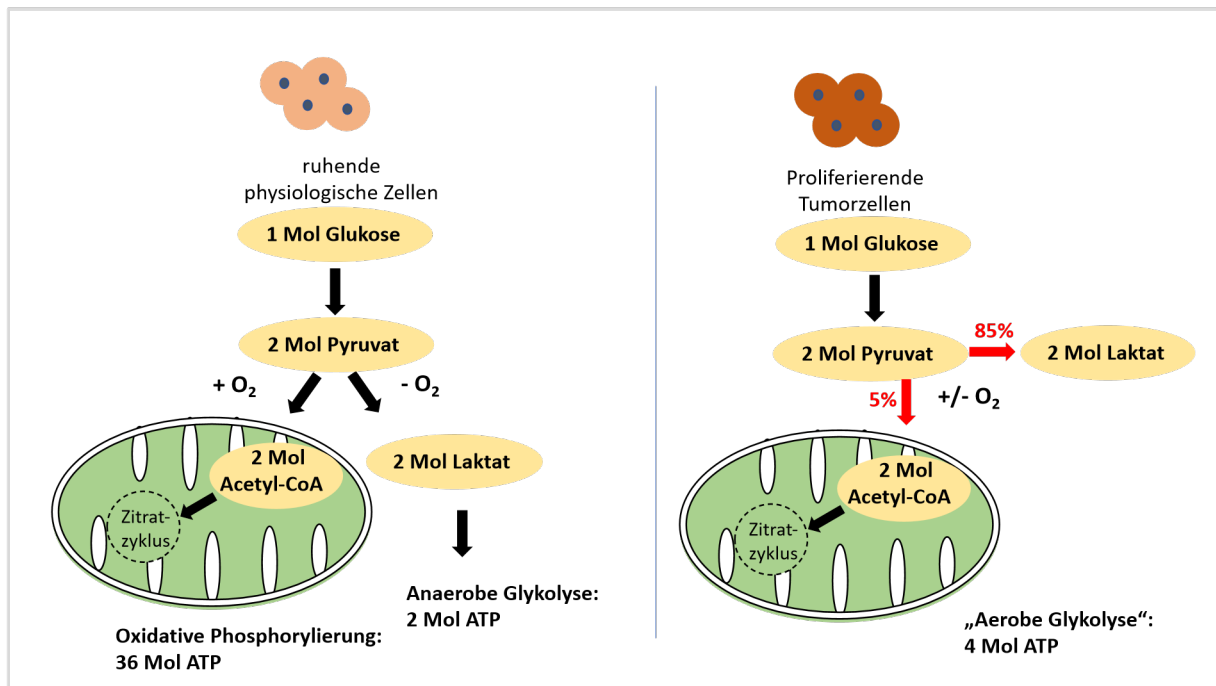
Grundsätzlich sind humane Stoffwechselvorgänge darauf ausgelegt, unter gegebenen Konditionen mit größtmöglicher Effizienz Glukose zu verwerten. Den Zellen wird hierbei Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereitgestellt. Intrazellulär aufgenommen, erfolgt die Verwertung von einem Mol Glukose zu zwei Mol Pyruvat, dabei entstehen zwei ATP-Äquivalente. Die Weiterverwertung des Pyruvats ist von dem Oxygenierungsgrad des Gewebes abhängig: Unter aeroben Bedingungen erfolgt die oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA im Mitochondrium. In der Atmungskette entstehen schließlich durch mehrstufige Oxidationsschritte zu CO₂ und H₂O insgesamt 32Mol ATP. Die anaerobe Glykolyse hingegen bleibt auf das Zytosol beschränkt. Dort wird Pyruvat zu 2Mol Laktat

umgewandelt. Insgesamt fällt die Energiebilanz mit der Synthese von 2Mol ATP pro Mol Glukose im Vergleich zur aeroben Glykolyse 16x geringer aus [109].

Warburg-Stoffwechsel

Nach Otto Warburg passen Tumorzellen ihren Stoffwechsel dahingehend an, dass selbst unter aeroben Bedingungen überwiegend Glukose zu Laktat abgebaut wird [110]. Er benannte dieses Phänomen „aerobe Glykolyse“ [111-113]. Resultat des sog. „Warburg-Effektes“ ist eine Stoffwechselumstellung, die mit einem gesteigertem Glukoseumsatz, vermehrter Glykolyse und Akkumulation von Laktat einhergeht [109, 110]. Daran anknüpfend berichteten Hanahan et al., dass sich im Zuge jenes „*metabolic switch*“ intratumoral zwei Subpopulationen ausbilden: hypoxische, zentrale Tumorzellen betreiben „aerobe Glykolyse“ und anfallendes Laktat wird von oxygenierten Zellen in der Peripherie des Tumoreals in den Zitratzyklus eingeschleust [114, 115]. Das durch lokal erhöhte Laktatspiegel entstehende saure Milieu fördert wiederum die Angiogenese und stimuliert die Induktion von Enzymen der Glykolyse in den Tumorzellen [116].

Abb. 7: Vergleich von physiologischem Energiemetabolismus mit dem Tumorstoffwechsel. Unter normoxischen Bedingungen verwertet die Zelle 1Mol Glukose zu 2Mol Pyruvat, aus welchen in der Atmungskette 36Mol ATP entstehen (oxidative Phosphorylierung). Bei O₂-Mangel wird Pyruvat im Zytosol zu Laktat reduziert unter Generierung von 2Mol ATP (anaerobe Glykolyse). Tumorzellen bedienen sich des „Warburg-Stoffwechsels“, bei dem unter (an-)aeroben Bedingungen ein Großteil des Pyruvats zu Laktat verstoffwechselt wird. In Anlehnung an Zhang et al. (2015).



Resümierend stellt sich die Frage, warum der Tumormetabolismus modifiziert wird, um trotz erhöhter Glukose-Aufnahme bei anaboler Stoffwechsellage eine niedrigere Energiebilanz und scheinbar ineffektive Verwertung zellulärer Energieressourcen zu erreichen?

Die „aerobe Glykolyse“ wird durch den quantitativen Überschuss an Intermediaten als vorteilig für den Tumor angesehen. Die aus katabolen Prozessen gewonnenen Proteine, Fette und Nukleinsäuren werden in dem sog. „Biosynthese-Modell“ für anabole Zwecke genutzt [117]. Dieser Ansatz geht auf eine Schlussfolgerung zurück, die Potter bereits im Jahre 1958 aufgestellt hatte [118] und die nun eine Renaissance erfahren hat: Der von Tumoren betriebene Kohlenhydratabbau dient dazu, Syntheseprodukte zu generieren und in Biosynthesewege einzuschleusen, die nicht mehr allein der Energiegewinnung dienen. Demzufolge verschafft sich der Tumor durch die kontinuierliche Bereitstellung von Mikromolekülen einen evolutionären Vorteil [117].

1.5.2 „Angiogenic switch“ - Angiogenese und Tumorexpansion

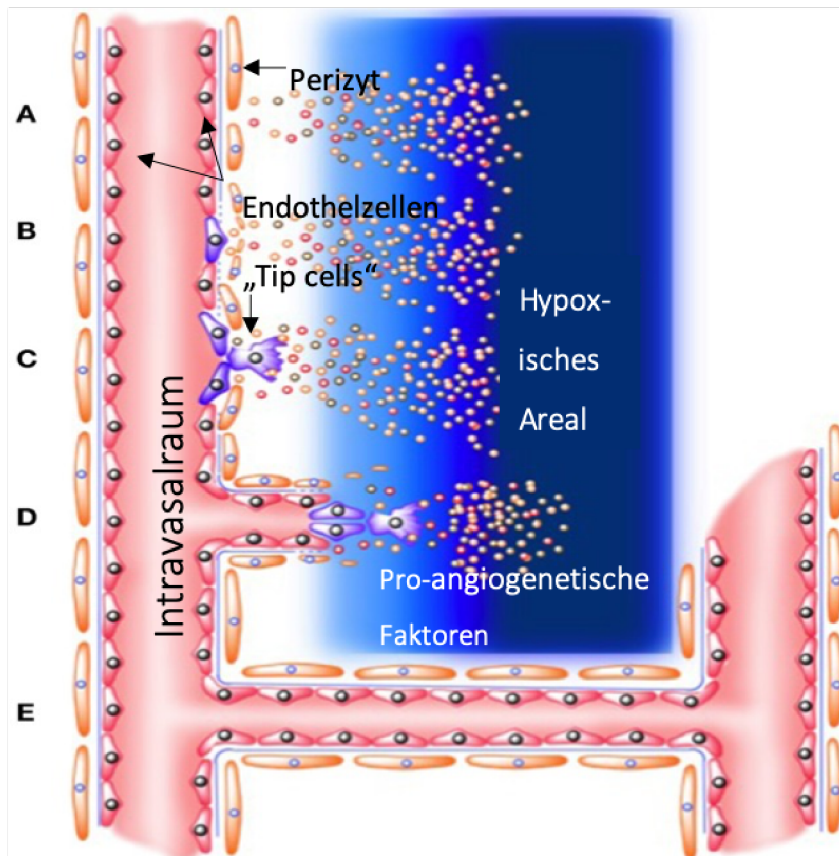
Anknüpfend an Hanahan und Weinbergs Erkenntnisse stellt die Untersuchung der Angiogenese im Magenkarzinom einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar.

Grundlagen

Allgemein wird zwischen der Vaskulogenese (*de novo* Bildung von Blutbahnen aus mitotisch aktiven Angioblasten im Zuge der Embryogenese), der Angiogenese (Formation von Kollateralen aus bereits bestehenden Gefäßen), Invagination (Teilung eines präexistenten Gefäßes) und vaskulären Mimikry (Tumor-assoziierte Gefäße) unterschieden [81]. In der Adoleszenz sind die Gefäße von einem nicht-proliferativen Monolayer aus Endothelzellen ausgekleidet. Eine konstitutionelle Aktivierung erfolgt lediglich im Zuge des weiblichen Menstruationszyklus oder der Wundheilung [81, 119].

Folkmann stellte 1971 die Hypothese auf, dass das Tumorwachstum in Abhängigkeit zur Angiogenese stehe [120]. Dem sei so, weil die natürliche Wachstumsgrenze von Neoplasien bei 1-2mm³ Durchmesser liege und durch die Diffusionskapazität des jeweiligen Gewebes (100-500µm) limitiert sei [121]. Aufgrund dessen ist die Bildung Tumor-assoziiierter Gefäße zur Expansion der Tumormasse notwendig [120]. Der Anschluss an das Gefäßsystem unterhält das Karzinom durch die Zufuhr lebensnotwendiger Nährstoffe und dient der Entsorgung von anfallenden Abbauprodukten [108]. Bei zunehmender Proliferation des Karzinoms tritt ein Zustand der relativen Hypoxie ein, der nur durch Angiogenese (vgl. Abbildung 8) überwunden werden kann. Zur Kompensation des Sauerstoffmangels schüttet das hochproliferative Gewebe die Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF) aus, welche wiederum den *Vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Spiegel im Serum erhöhen [122]. Sobald pro-angiogenetisch wirksame Faktoren wie VEGF, Angiopoetin-2, *Fibroblast growth factor* (FGF), Chemokine und Zytokine über endokrine Wege an die Endothelzelle gelangen (A), wird sie zur Teilung angeregt. Durch enzymatische Auflösung der Basalmembran lösen sich umgebende Perizyten (B). Jene und Gefäß-assoziierte Zellen sezernieren Matrix-degranulierende Enzyme, welche pro-mitogen auf die Endothelien wirken und die Basalmembran (post)-kapillärer Venolen lysieren [119, 123]. Damit lösen sich die Endothelzellen aus dem bestehenden Verbund und ordnen sich an einer aus Proteinextravasat geformten provisorischen Extrazellulärmatrix (C). Unter den migrierenden Endothelzellen formieren sich sogenannte „*tip-cells*“ und ihnen untergeordnete „*stalk cells*“ [81]. Die führenden Endothelzellen wachsen auf die Stimuli zu, verändern ihre Morphologie und formen eine hämodynamisch stabile Röhre (D), welche als ausgereiftes Gefäß einem permanenten pulsatilen Blutfluss standhält (E).

Abb. 8: Prozess der Angiogenese. Abbildung modifiziert nach Escudero et al. (2017).



Tumor-assoziierte Angiogenese

Innerhalb eines Tumors gelegene Blutbahnen weisen bedeutende Unterschiede zu im Gesunden entstandenen Gefäßen auf. Kennzeichnend sind frühzeitiges Aussprossen unreifer Kapillaren, Mikrohämmorrhagien und verminderter Perizytenbesatz [81]. Die Perizyten regulieren die Durchlässigkeit der Lumina, den kapillären Blutfluss und die Differenzierung der Endothelzellen. Bei Dysregulation werden *Hämangiosis carcinomatosa* und die Fernmetastasierung begünstigt [124] sowie die Proliferation der Endothelien stimuliert [81].

Der sogenannte „*angiogenic switch*“ ist ein komplexer Stoffwechselprozess, der das pathologisch hochregulierte Gefäßwachstum beschreibt [108] und sowohl in benignen Läsionen, wie z.B. uterinen Zysten oder Gefäßmalformationen, als auch in Tumoren stattfindet. Dabei ist das ansonsten physiologischerweise limitierte Gefäßwachstum kontinuierlich aktiviert [119]. Der „*angiogenic switch*“ ist bereits in frühen Stadien prämaligener Läsionen von Bedeutung [107, 121]. Tragende Rolle spielt hierbei das VEGF-Molekül, das in hohen Blutkonzentrationen vorliegt, während anti-angiogenetische Proteine wie Thrombospondin-1 herunterreguliert werden [125]. Zudem wird der

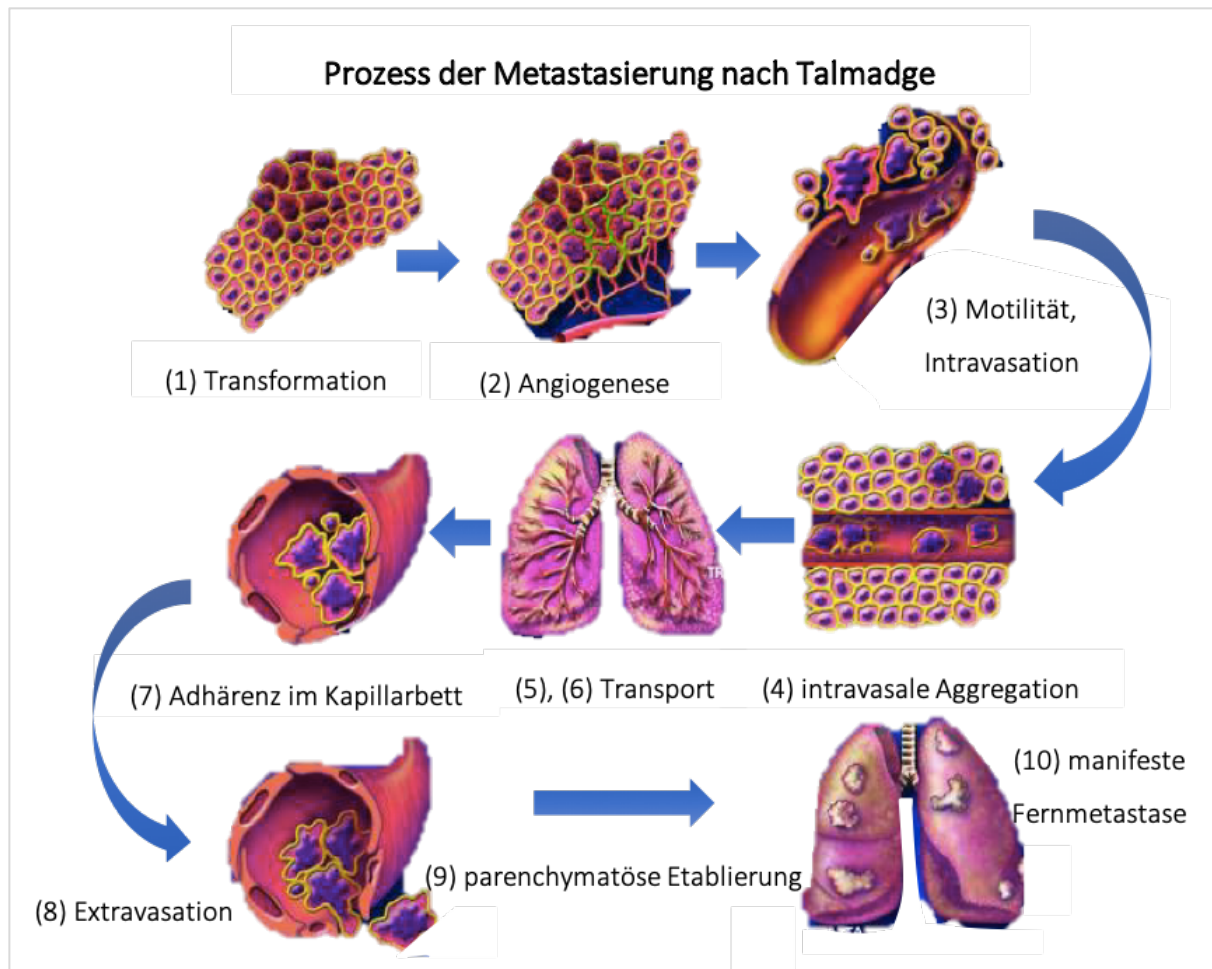
unmittelbaren Umgebung des Karzinoms vermehrt Bedeutung zugemessen: Karzinom-assoziierte Fibroblasten (KAFs) sezernieren pro-angiogenetische Faktoren, Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) synthetisieren VEGF [119].

1.5.3 Bedeutung der Angiogenese für die Metastasierung

Der Begriff Metastasierung wurde von Joseph-Claude-Anthelme Récamier im Jahre 1829 als „Transfer von Zellen zu einem anderen Ort im Körper“ definiert und 2010 von Talmadge et al. in das Verständnis der heutigen Zeit integriert [126]. Talmadge entwickelte ein allgemeingültiges Modell zum Prozess der Metastasierung (vgl. Abbildung 9).

Ausgehend von einer maligne transformierten Zellpopulation mit 1-2mm Durchmesser (1) erfolgt deren Anschluss an versorgende Blutbahnen (2) und die lokale Invasion der Mikrozirkulation und Lymphgefäße (3). Intraluminal kommt es durch Wechselwirkungen der abgesiedelten Zellen mit humoralen und hämatopoetischen Faktoren zur Bildung eines Aggregates (4), welches im Flüssigkeitsstrom weitergetragen wird (5). Dabei werden zirkulierende Bestandteile der Immunabwehr und der intravasale Scherstress bis hin zu einem Kapillarbett umgangen (6). Dort kommt es im Zuge der Extravasation zur Rekapitulation der Prozesse der Intravasation. Nach Anheftung der Tumorzellen an das Endothel (7) werden sämtliche Zelllagen inklusive der Basalmembran durchwandert (8). Im Parenchym erfolgt die Einnistung der abgesiedelten Tumorzellen, welche durch Zellwachstum (9) und Angiogenese schließlich zur manifesten Metastase auswächst. Bei erfolgreicher Aussaat und proliferativem Fortbestand innerhalb der fremden Matrix wiederholt sich die Invasions-Metastasierungs-Kaskade (10) [126]. Metastasierte Tumoren besitzen die Fähigkeit, Fernmetastasen zu bilden oder zum Ort des Primarius zurückzukehren [127].

Abb. 9: Modell der Metastasierung. Abbildung modifiziert nach Talmadge et al. (2010).



1.6 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit prüft die folgenden Hypothesen: Magenkarzinome exprimieren (1) den IR auf Tumorzellen und Endothelien; die Expression des IR (2) ist im Magenkarzinom heterogen und von (3) tumorbiologischer sowie (4) prognostischer Relevanz.

Ausgangspunkt der Arbeit waren Daten des *Cancer Genome Atlas*, die eine Überexpression des IR in einer Vielzahl von Tumorentitäten und auch in gastrointestinalen Tumoren beschrieben [63]. Da eine Dysregulation bzw. Dysfunktion des IR mit schwerwiegenden Krankheitsbildern wie Diabetes mellitus, neurodegenerativen Erkrankungen und der Entstehung von Karzinomen assoziiert ist [63, 81, 128], wurde die Hypothese abgeleitet, dass der IR auch für das Magenkarzinom relevant ist.

Heidegger et al. hatten beim Prostatakarzinom gezeigt, dass der IR als Wachstumsfaktor vielschichtig in die Tumorzellbiologie eingebunden ist, indem er die Zellproliferation, die zelluläre Migration sowie das invasive Wachstumsverhalten der Tumorzellen fördert [84]. Demzufolge wurde in dieser Arbeit die IR-Expression auf den Tumorzellen des Magenkarzinoms evaluiert.

Roudnicky et al. wiesen nach, dass für die Tumorbiologie nicht nur die Expression des IR auf den Tumorzellen, sondern auch in Endothelien tumorbiologisch relevant war [85]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die IR-Expression in den Gefäßendothelien begutachtet.

Zur Überprüfung der Hypothesen wurde zusammenfassend die Expression des IR auf den Tumorzellen und den Endothelien der Tumorgefäße mit einer Vielzahl an klinischpathologischen Patientencharakteristika verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Ethikantrag

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät hat im Rahmen des Antrages „Prädiktive Biomarker des Magenkarzinoms“ vom 29. 09. 2010 die Untersuchung potenzieller prädiktiver Biomarker beim Magenkarzinom genehmigt (Referenznummer: D 453/10).

2.1.2 Studienkollektiv

Aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des UKSH Kiel wurden Fälle mit histopathologisch gesichertem Magenkarzinom herausgesucht. Sämtliche Fälle wurden im Zeitraum von 1997 bis 2009 im Rahmen eines diagnostischen bzw. therapeutischen Eingriffes gewonnen. Einschlusskriterien waren (i) eine histopathologisch gesicherte Diagnose eines Adenokarzinoms des Magens bzw. ösophagogastralen Überganges und (ii) vollständig erfasste Überlebens- wie Sterbedaten. Ausschlusskriterien waren Patienten mit (i) einem differenten histologischen Subtyp des Magenkarzinoms, (ii) einer präemptiven Billroth-II-Magenresektion, (iii) einer perioperativ bzw. neoadjuvant angewandten Chemotherapie, mit (iiii) einer unvollständigen Datenlage zum Überleben und Versterben oder (iiiii) einem ungenügenden immunhistochemischen Färbeergebnis. Folgende Daten wurden zu jedem Patienten vollständig erhoben: Chirurgisches Verfahren, Patientenalter bei Erstdiagnose, Geschlecht, Tumortyp nach Laurén, Tumorgröße und -lokalisation, Invasionstiefe, Anzahl resezierter Lymphknoten sowie Anzahl der Lymphknotenmetastasen. Für Patienten, die nach Abschluss der Studie lebten, liegen *Follow-Up*-Daten betreuender Ärztinnen und Ärzte vor. Die Daten verstorbener Patienten wurden im Krebsregister des Bundeslandes Schleswig-Holstein dokumentiert. Hierbei wurde zwischen dem Versterben an einem Magenkarzinom und dem Tod durch andere Ursachen differenziert.

Nach Aufnahme in die Studie wurden sämtliche Patientendaten pseudonymisiert.

2.1.3 Histologische Aufbereitung und TNM-Klassifikation

Zur postoperativen Verarbeitung wurde das Material mit 10% neutralgepuffertem Formalin fixiert, in einem Gewebeeinbettautomaten entwässert und in Paraffin eingebettet.

Anschließend wurden 2µm dünne Paraffinschnitte hergestellt, auf Leica Bond™ Plus Slides (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) aufgezogen und über Nacht bei 54°C im Brutschrank getrocknet. Zur histopathologischen Begutachtung und Diagnosesicherung wurden die Objektträger entparaffiniert und mit Hämatoxylin und Eosin (Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co KG, Leipzig, Deutschland) angefärbt. Sämtliche Präparate waren von Fachärzten für Pathologie begutachtet worden. Dabei erfolgte die Klassifikation der Tumoren anhand der Laurén Klassifikation [129]. Auf alle Patientenfälle wurde nachträglich die aktuelle pTNM-Klassifikation angewandt (8. Auflage) [45].

2.1.4 Geräte

Es wurden die folgenden Geräte verwendet: Dampfdrucktopf Pascal (Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland), Eindeckautomat *Promounter RCM 2000* (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland), Färbeautomat Bond™ Max (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), Inkubator *Classic.Line B28* (Binder, Tuttlingen, Deutschland), Kippschüttler *See-Saw Rocker SSL4* (Stuart, Staffordshire, England), Kühlgerät LKexv 3910 MediLine (Liebherr, weltweit), Labor-Kühlschrank Super 720 (Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, Deutschland), Mikroskop DM 1000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), Pipetten (Eppendorf Research AG, Hamburg, Deutschland), Reagenzglasschüttler *Lab dancer vario* (IKA-Werke GmbH, Mannheim, Deutschland), Rotationsmikrotom RM2245 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), Scanner LeicaSCN400 Client (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), Waage PBS/PBJ (Kern, Balingen, Deutschland), , Wasserbad TFB 45 (MEDITE Group, Burgdorf, Deutschland).

2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Die folgenden Reagenzien und Chemikalien wurden verwendet: *Antibody Diluent* (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland), Äthanol absolut und Xylol (Th. Geyer GmbH & Co.KG, Renningen, Deutschland), deionisiertes Typ 2 Wasser aus hausinternem Wasseraufbereitungssystem Elixâ *Essential 10* (Merck, Darmstadt, Deutschland), Eindeckmedium Pertex™ (Biosystems Switzerland AG, Muttens, Deutschland), Hämalaunlösung sauer nach Mayer und Eosin G-Lösung 0,5% (beide Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), PAP PEN MKP-1/MKP-2 (Kisker BioTech, Steinfurt,

Deutschland), Peroxidase-Hemmer *Hydrogen Peroxide Block* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), Proteinblock *Ultra V Block* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), *Trizma base* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), Zitronensäure Monohydrat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland).

Die Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) wurde nach dem folgenden Rezept angesetzt: 60,57g *Trizma base* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 87,66g Natriumchlorid wurden in 1 Liter deionisiertem Wasser gelöst und mittels einer HCl-Lösung auf den pH = 7,4 titriert. Zur Herstellung der EDTA-Lösung wurden 0,375g EDTA (Carl Roth GmbH & Co. KG) mit 1,21g TBS in 100 ml deionisiertem Wasser in Lösung gebracht und mit Natronlauge auf den pH = 9,0 titriert. Anschließend wurde die so hergestellte EDTA-Lösung mit deionisiertem Wasser auf eine Gesamtmenge von 1 Liter im Verhältnis von 1:10 verdünnt.

Antikörper und Kitsysteme

Beide Isoformen des IR wurden immunhistochemisch durch einen aus dem Kaninchen gewonnenen monoklonalen Antikörper (1:50; Klon 4B8, *Cell Signaling Technologies* Frankfurt, Deutschland) nachgewiesen. Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte unter Verwendung des *Hydrogen Peroxide Block* und des *Ultra V Block*. Das anschließend verwendete Kitsystem enthielt den Sekundärantikörper *ImmPRESS HRP Universal Antibody* und den Farbstoff *ImmPact NovaRed™ Peroxidase Substrate* (beide Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Zudem wurde ein monoklonaler muriner CD31-Antikörper (1:100; JC70, Cell Marque, Kalifornien, USA) verwendet. Das *Polymer Refine Red Detection Kit* (Menarini Diagnostics, Berlin, Deutschland) diente der Visualisierung der automatisierten CD31-Färbung.

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Die folgenden Verbrauchsmaterialien fanden Verwendung: Deckgläser 24x60mm (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland), Objektträger Leica Bond™ *Plus Slides* (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), Pipettenspitzen Eppendorf e.p. T.I.P.S (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), Zentrifugenröhrchen *Corning CentriStar™ Cap* 15ml (Corning, New York, USA).

2.1.7 Software

Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung der Programme *Microsoft Office* 2016, Office 365 Abonnement (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und *PASW Statistics* 24.0 (SPSS) für Mac (IBM Corporation, New York, USA). Die Literaturrecherche und Anlage einer Online-Bibliothek wurde mittels Endnote X8 (Bilaney Consultants GmbH, Düsseldorf, Deutschland) vorgenommen.

2.2 Methoden

2.2.1 Tissue Microarrays (TMAs)

Der experimentelle Ansatz der vorliegenden Arbeit sah vor, dass neben den in der histopathologischen Begutachtung üblichen großflächigen Schnittpräparaten (WTS) zudem *Tissue Microarrays* (TMAs) zentral aus dem Gewebe der 467 Tumorpräparate angefertigt wurden.

Dabei wurden von den in Formalin fixierten und in Paraffin konservierten „Spender“-Blöcken Schnitte angefertigt und diese Objektträger mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Unter dem Mikroskop wurden fünf morphologisch repräsentative Areale bestimmt. Es folgte die Ausstanzung von fünf Gewebezylindern aus den definierten Arealen (Durchmesser jeweils 0,6µm) und die Übertragung in die im Voraus hergestellten Vertiefungen des Paraffin- „Empfänger“-Blocks. Zur Verbindung des Stanzzylinders mit dem „Empfänger“-Paraffinblock erfolgte eine Erwärmung auf 54°C für 5 Minuten. Daraufhin wurden 2µm dünne Schnitte angefertigt und diese auf Objektträger aufgezogen, bei 54°C über Nacht getrocknet und in Polystyrene Boxen bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Diese TMAs wurden im Vorfeld von Mitarbeitern der Arbeitsgemeinschaft Röcken angefertigt und der Doktorandin für die beschriebene Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Immunhistochemie

Von jedem Magenkarzinom des Kollektivs wurden insgesamt vier Schnittpräparate angefertigt. Aus dem Tumorblock desselben Patienten wurden zwei Objektträger mit TMAs und zwei großflächige Schnittpräparate (WTS) gewonnen. Zwei Schnitte (jeweils ein TMA und ein WTS) wurden mit einem gegen CD31 gerichteten Antikörper gefärbt. Analog dazu

wurden zwei weitere Objektträger mit einem gegen den IR gerichteten Antikörper versehen.

Immunhistochemischer Nachweis von CD31

Das Protein *Cluster of differentiation 31* (CD31) wird auch Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1) bezeichnet und diente dem Nachweis von Gefäßendothelien [130]. In der folgenden Arbeit waren insbesondere intratumoral gelegene Gefäße von Belang. Dabei wurden Kapillaren, Arteriolen und Venolen, sofern sie von Tumorzellen umgeben waren, als Tumor-assoziierte Gefäße definiert.

Die Paraffinschnitte wurden mithilfe des automatisierten Färbesystems Bond™ Max und des *Polymer Refine Red Detection Kit* gemäß Herstellerangaben gefärbt. Die AntigenDemaskierung erfolgte unter Verwendung der *Epitope Retrieval Solution 2 Novocastra* (pH = 9,0; Leica-Menarini, Berlin, Deutschland) für 20min. Dabei wurde der monoklonale murine CD31-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 appliziert. Nach Dehydrierung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate mit dem xylolbasierten Eindeckmedium Pertex™ und Deckgläsern (26 x 76mm; Medite, Burgdorf, Deutschland) durch den Objektträger-Glas-Eindeckautomaten versehen.

Immunhistochemischer Nachweis des Insulinrezeptors

Der immunhistochemische Nachweis des IR auf Tumorzellen und Gefäßen des Magenkarzinomkollektivs wurde manuell nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zunächst wurden die Paraffinschnitte in Xylol und absteigenden Bädern von reinem 99% Äthanol (ETOH) bis 50% ETOH entparaffiniert und rehydriert. Die deparaffinierten Schnitte wurden mit EDTA-Puffer (pH = 9,0) versetzt und in einem mit 0,5l deionisierten Wasser gefüllten Dampfdrucktopf demaskiert (1min; 125°C). Darauf folgte das stufenweise Abkühlen mit Leitungswasser und eine Waschung mit TBS für 3 x 5min. Anschließende Maßnahmen dienten der Blockade humaner Proteine und endogener Peroxidaseaktivität. Es erfolgte die Applikation von 2-3 Tropfen *Hydrogen Peroxide Block* für 15min, eine erneute TBS-Waschung und das Auftragen von 2-3 Tropfen *Ultra V Block* mit 5min Inkubationszeit. Danach folgte eine TBS-Spülung (3 x 5min). Die anschließende Verwendung des PAP-PEN zur Umrandung des Gewebeumrisses diente der effizienten und Reagenzien-sparenden Arbeit. Daraufhin wurde der gegen den IR gerichtete Primärantikörper (Klon

4B8) auf eine Konzentration von 1:50 mit *Antibody Diluent* verdünnt und appliziert. Auf eine Vorinkubation für 30min bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4-8°C im Kühlschrank.

Am darauffolgenden Tag wurde eine Spülung mit TBS-Puffer für 3 x 5min vorgenommen. Zur Visualisierung der Immunreaktion wurde der Sekundärantikörper *ImmPRESS HRP Universal Antibody* (30min Inkubation) aufgetragen, es folgte eine TBS-Waschung (3 x 5min) und danach die Verwendung des Farbstoffs *ImmPact NovaRed™ Peroxidase Substrate* (7min Inkubation). Eine Waschung mit deionisiertem Wasser beendete die Reaktion des zugefügten Chromogens. Es folgte die Färbung der Zellkerne mittels Hämalaunlösung für 1min und anschließender 10-minütiger Bläungszeit unter fließendem warmen Leitungswasser. Abschließend wurde die Dehydrierung in einer aufsteigenden Reihe von 70% bis 99% ETOH, ein zweimaliges Xylol-Bad (je 5min) und die maschinelle Eindeckelung mit Objektträgern vorgenommen.

Im Zuge des Färbeprotokolls wurden kontinuierlich Negativkontrollen durch das Weglassen des Primärantikörpers gewonnen. Als Positivkontrollen dienten Präparate mit physiologischer Endometriumschleimhaut in der Proliferationsphase aus dem hausinternen Archiv.

2.2.3 Konzept zur Auswertung der IR-Antikörperfärbung

Um der intratumoralen Heterogenität der Magentumoren Rechnung zu tragen, wurde zur Auswertung der IR-Färbungen der Histo-Score (HScore) modifiziert. Dabei wurde die Expression des IR in den Kategorien **Epithel** (Zytoplasma: **cEIR**; Zellmembran: **mEIR**) und **Endothel** (**VIR**) untersucht. Der HScore wurde an sämtlichen Präparaten des Magenkarzinomkollektivs wie folgt ermittelt: Als erster Parameter wurde die **Intensität** der Färbung von „0“ = negativ, „1+“ = schwach bis „2+“ = stark positiv eingeschätzt. Hierfür wurde im Vorfelde das gesamte Kollektiv an Tumoren mehrmals begutachtet und vier repräsentative Magenkarzinome der Intensitäten „0“, „1+“, „2+“ als Referenzen für die tiefergehende Analyse festgelegt (vgl. Abbildung 10). Als zweiter Parameter wurde die **prozentuale Verteilung** (P) der drei Intensitätsstufen in Bezug auf die Gesamtheit eines Tumorpräparates ermittelt. Dabei wurde der prozentuale Wert der drei Intensitätsstufen innerhalb eines Tumorpräparats auf 100% addiert. Beispielhaft wurde ein Präparat ohne jeglichen IR-Nachweis als 100% negativ (0), ein anderes Präparat mit hälftig starker und

häufig negativ IR-Färbung als 50% stark positiv (2+) und 50% negativ (0) gewertet. Mithilfe des modifizierten HScores konnte die intratumorale Heterogenität der Magenkarzinome erfasst werden.

Zur Berechnung des HScores diente die folgende Formel: **HScore = (0 x Prozentsatz negativer Tumorzellen) + (1 x Prozentsatz schwach gefärbter Tumorzellen) + (2 x Prozentsatz stark positiver Tumorzellen)**. Die gebildeten HScores erstreckten sich vom Minimum 0 bis zum Maximum 200, was einem Magenkarzinom mit gänzlich stark positivem IR-Nachweis entspräche: $(0 \times 0\%) + (1 \times 0\%) + (2 \times 100\%) = 200$. Innerhalb der Formel begünstigten die Multiplikatoren die Streuung des HScores, da Tumorpräparate mit vorwiegend starkem IR-Nachweis von Fällen mit überwiegend schwacher IR-Färbung separiert wurden.

In die statistische Analyse flossen sowohl die einzelnen Werte als auch der Gesamt-HScore eines jeden Präparates ein. Dabei wurde der Median (cEIR: HScore ≥ 90 , mEIR: HScore > 40 , VIR: HScore ≥ 115) als *cut-off*-Wert genutzt, um zwischen schwachem (IR-low) und starkem (IR-high) Nachweis des IR zu unterscheiden.

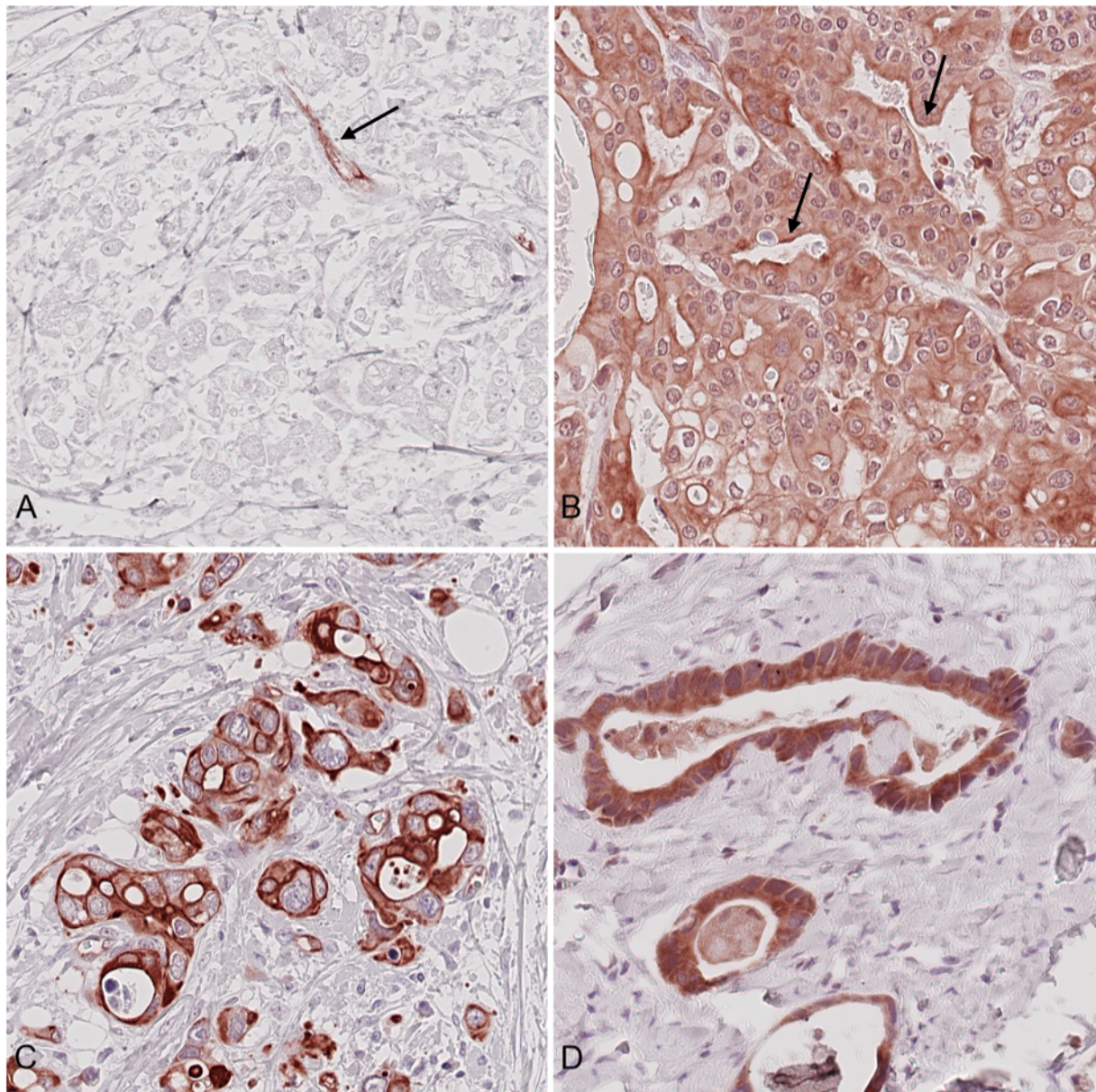
2.3 Statistische Auswertung

Für die Korrelation der IR-Expression mit nicht-ordinalen klinisch-pathologischen Patientencharakteristika und Überlebensdaten wurde der *Fisher's Exact* Test verwendet. Zur Überprüfung linearer Zusammenhänge bei Parametern auf Ordinalskalenniveau (T- und N-Kategorie, UICC-Klassifikation, Differenzierungsgrad) wurde der *Kendall's Tau* Test angewandt. Weiterhin wurden p-Werte durch zweiseitige-T-Tests berechnet, dabei galt $p=0,05$ als signifikant und $p=0,01$ als hochsignifikant. Das mediane Überleben innerhalb des 95% Konfidenzintervalls wurde mit der Kaplan-Meier Methode bestimmt und graphisch dargestellt. Die Unterschiede des medianen Gesamt- und tumorspezifischen Überlebens wurden mit dem *Log-Rank*-Verfahren ermittelt. Im Zuge der erweiterten Überlebensanalyse wurde das Cox-Regressions-Modell angewandt. Für die multivariate Analyse kumulativer Einflussfaktoren auf das Patientenüberleben galten alle p -Werte $=0,05$ als signifikant. Zur Aufdeckung etwaiger Falscherkennungsraten der Korrelationen wurde der Benjamini-Hochberg Test genutzt. P-Werte mit Verlust der statistischen Signifikanz werden angezeigt.

Abb. 10: Referenzschnitte des immunhistochemischen IR-Nachweis an Tumorzellen und Gefäßen im Magenkarzinomkollektiv.

Bild **A** zeigt einen stark positiven vaskulären IR-Nachweis (VIR-*high*, HScore ≥ 115 ; Pfeil) und IR-negative Tumorzellen (cEIR- und mEIR-*low*). Magenkarzinom **B** weist stark IR-positives Zytoplasma (cEIR-*high*; HScore ≥ 90) und stark positive Tumorgefäße (VIR-*high*, s.o.; Pfeile) bei schwach positiven Tumorzellmembranen (mEIR-*low*; HScore ≤ 40) auf. Bild **C** zeigt stark IR-positive Membranen (mEIR-*high*; HScore > 40) mit schwach positivem Zytoplasma (cEIR-*low*; HScore < 90). Bild **D** ist gegensätzlich: Das Zytoplasma ist stark IR-positiv (cEIR-*high*, s.o.) bei schwach positiven Tumorzellmembranen (mEIR-*low*, s.o.).

Vergrößerung **A-D** 1:400. Abbildung modifiziert nach Heckl et al. (2019).



3 Ergebnisse

3.1 Explorative Untersuchung der IR-Expression anhand von TMAs

Zunächst wurde eine Interim-Analyse der TMA-Objektträger mit 101 Patientenfällen durchgeführt. Die **Intensität** der Färbung wurde abweichend von der späteren Auswertung der WTS auf einer vierstufigen Skala von „0“ (negativ), „1+“ (schwach), „2+“ (mittelstark positiv) bis „3+“ (stark positiv) bewertet. Es wurden die Kategorien **Epithel (EIR)** und **Endothel (VIR)** hinsichtlich ihrer IR-Expression untersucht. Dabei wurden in der statistischen Analyse die Intensitäten 0-2 als *IR-low* und die Intensität 3 als *IR-high* zusammengefasst. In Analogie zu dem Gesamtkollektiv überwog in dieser 101 Patienten umfassenden Kohorte der Anteil der männlichen (56,4%) denen der weiblichen (43,6%) Erkrankten. Das mediane Patientenalter lag bei 68 Jahren. Der intestinale Subtyp nach Laurén war in über der Hälfte der Fälle (54,5%) vertreten und wurde von dem diffusen (27,7%), dem nicht klassifizierbaren (10,9%) und dem gemischten Tumortyp (6,9%) gefolgt. Rund ein Drittel (32,0%) der Magenkarzinome der TMA-Kohorte lag proximal, zwei Drittel der Tumore (67%) waren im distalen Magen lokalisiert.

Ergebnisse

Für die Korrelation der epithelialen (EIR) und vaskulären (VIR) IR-Expression mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika ergaben sich bei den TMAs keine signifikanten Zusammenhänge (vgl. Tabelle 4). Zum Ausschluss etwaiger Stichprobenfehler wurden aus demselben Kollektiv 20 WTS ausgewählt, manuell nach oben genannten Färbeprotokoll mit dem IR-Antikörper versetzt und histologisch begutachtet. Es zeigte sich eine intratumorale Heterogenität der IR-Expression, die in den TMAs nicht repräsentativ abgebildet wurde. Dieses Phänomen wurde von der Arbeitsgruppe für andere RTKs (HER2, MET) bereits nachgewiesen [131, 132]. Auf Grundlage dessen wurde die Entscheidung getroffen, die Untersuchungen an den Großflächenschnitten des Magenkarzinomkollektivs weiterzuführen.

Tab. 4: Resultate der Zwischenanalyse der Tumorstanzen (TMAs). Korrelation erhobener Werte mit klinisch-pathologischen Daten.

Resultate TMAs			VIR		EIR	
			-low (0-2+)	-high (3+)	negativ	positiv
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Geschlecht	n	p⁽¹⁾	101	0,547	101	1,0
männlich			28 (49,1)	29 (50,9)	1 (1,8)	56 (98,2)
weiblich			25 (56,8)	19 (43,2)	1 (2,3)	43 (97,7)
Alter	n	p⁽¹⁾	99	1,0	99	1,0
<68 Jahre			26 (53,1)	23 (46,9)	1 (2,0)	48 (98,0)
≥68 Jahre			26 (52,0)	24 (48,0)	1 (2,0)	49 (98,0)
Tumortyp nach Laurén	n	p⁽¹⁾	101	0,072	101	1,0
intestinal			29 (52,7)	26 (47,3)	1 (1,8)	54 (98,2)
diffus			17 (60,7)	11 (39,3)	1 (3,6)	27 (96,4)
gemischt			5 (71,4)	2 (28,6)	0 (0,0)	7 (100,0)
unklassifizierbar			2 (18,2)	9 (81,8)	0 (0,0)	11 (100,0)
Lokalisation	n	p⁽¹⁾	97	1,0	97	1,0
proximal			16 (50,0)	16 (50,0)	0 (0,0)	32 (100,0)
distal			34 (52,3)	31 (47,7)	2 (3,1)	63 (96,9)
pT - Kategorie	n	p⁽²⁾	101	0,6	101	0,266
T1a / T1b			6 (60,0)	4 (40,0)	1 (10,0)	9 (90,0)
T2			7 (50,0)	7 (50,0)	0 (0,0)	14 (100,0)
T3			22 (55,0)	18 (45,0)	1 (2,5)	39 (97,5)
T4a / T4b			18 (48,6)	19 (51,4)	0 (0,0)	37 (100,0)
pN - Kategorie	n	p⁽²⁾	101	0,677	101	0,041
N0			18 (62,1)	11 (37,9)	0 (0,0)	29 (100,0)
N1			7 (38,9)	11 (61,1)	2 (11,1)	16 (88,9)
N2			5 (45,5)	6 (54,5)	0 (0,0)	11 (100,0)
N3			23 (53,5)	20 (46,5)	0 (0,0)	43 (100,0)
pN - gruppiert	n	p⁽¹⁾	101	0,273	101	1,0
N0			18 (62,1)	11 (37,9)	0 (0,0)	29 (100,0)
N1 / N2 / N3/a/b			35 (48,6)	37 (51,4)	2 (2,8)	70 (90,2)
M - Kategorie	n	p⁽¹⁾	101	0,791	101	1,0
M0			44 (51,8)	41 (48,2)	2 (2,4)	83 (97,6)
M1			9 (56,3)	7 (43,8)	0 (0,0)	16 (100,0)

Resultate TMAs			VIR		EIR	
			-low (0-2+)	-high (3+)	negativ	positiv
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
UICC - Stadium	n	p⁽²⁾	101	0,914	101	0,134
IA / IB			9 (60,0)	6 (40,0)	1 (6,7)	14 (93,3)
IIA / IIB			15 (50,0)	15 (50,0)	1 (3,3)	29 (96,7)
IIIA / IIIB / IIIC			20 (50,0)	20 (50,0)	0 (0,0)	40 (100,0)
IV			9 (56,3)	7 (43,8)	0 (0,0)	16 (100,0)
pL - Kategorie	n	p⁽¹⁾	93	0,3	93	0,201
L0			24 (57,1)	18 (42,9)	2 (4,8)	40 (95,2)
L1			23 (45,1)	28 (54,9)	0 (0,0)	51 (100,0)
pV - Kategorie	n	p⁽¹⁾	94	0,428	94	1,0
V0			41 (53,2)	36 (46,8)	2 (2,6)	75 (97,4)
V1			7 (41,2)	10 (58,8)	0 (0,0)	17 (100,0)
R - Kategorie	n	p⁽¹⁾	95	0,307	95	1,0
R0			46 (53,5)	40 (46,5)	2 (2,3)	84 (97,7)
R1 / R2			3 (33,3)	6 (66,7)	0 (0,0)	9 (100,0)
Differenzierungsgrad	n	p⁽¹⁾	100	0,167	100	0,439
G1 / G2			10 (40,0)	15 (60,0)	1 (4,0)	24 (96,0)
G3 / G4			43 (57,3)	32 (42,7)	1 (1,3)	74 (98,7)

⁽¹⁾ Fisher's exact Test

⁽²⁾ Kendall's tau Test

3.2 Auswertung der IR-Großflächenschnitte (WTS)

Das Studienkollektiv umfasste 467 Patientenfälle, davon waren 298 (63,8%) Männer und 169 (36,2%) Frauen. Das mediane Patientenalter betrug 68 Jahre (Range 28-92 Jahre). In Analogie zu den TMAs stellte die Gruppe der intestinalen Magenkarzinome nach Laurén mit 52% den größten Anteil aller untersuchten Tumoren dar, gefolgt von den diffusen (30,4%), unklassifizierbaren (10,7%) und gemischten Tumoren (6,9%).

Immunhistochemie

Der IR ließ sich in 98,3% der Fälle in Endothelien und Tumorzellen nachweisen. Da die visuelle Untersuchung von drei verschiedenen Intensitätsstufen (1+, 2+, 3+) der Immunreaktion als wenig reproduzierbar gewertet wurde, erfolgte die Kategorisierung der

Immunreaktion bei der Auswertung der WTS nur noch in schwach (1+) und stark positiv (2+). Folgende Daten geben die Kumulation der insgesamt für das Magenkarzinomkollektiv erhobenen prozentualen Anteile der einzelnen Färbeintensitäten wieder.

Eine schwache IR-Färbung des Zytoplasmas (cEIR 1+) zeigten 431 (92,3%) der Fälle, eine starke zytoplasmatische Färbung (cEIR 2+) wiesen 254 (54,4%) Präparate auf. Tumorzellen mit immunnegativem Zytoplasma (cEIR 0) wurden in 364 (77,9%) Tumoren nachgewiesen, dabei war der Anteil mit vollständig negativem Zytoplasma (Intensität 0 zu 100%) gering: 20 (4,3%) Fälle. Zu 100% stark IR-positives Zytoplasma (cEIR 2+) wiesen 6 (1,3%) Tumoren auf. 441 (94,4%) der Magenkarzinome zeigten eine variable Kombination von zwei bzw. drei Färbeintensitäten. Der Median für cEIR betrug HScore ≥ 90 .

Bei den Tumorzellmembranen wiesen 343 (73,4%) Magenkarzinome schwach positive Membranen (mEIR 1+) und 322 (69,0%) Fälle stark positive Membranen (mEIR 2+) auf. Tumorzellen mit immunnegativen Membranen (mEIR 0) kamen häufig vor: 457 (97,9%) Präparate zeigten mEIR 0, davon wiesen 58 (12,4%) der Fälle zu 100% IR-negative Tumorzellmembranen auf. Lediglich zwei Magentumoren zeigten einen zu 100% stark positiven IR-Nachweis (mEIR 2+) an den Membranen. Insgesamt waren bei 407 (87,2%) Präparaten variable Kombinationen zweier oder dreier Intensitätsstufen an den Tumorzellmembranen festzustellen. Der Median für mEIR betrug HScore > 40 .

Wie durch die Immunreaktion mit dem gegen CD31 gerichteten Antikörper bestätigt wurde, enthielten sämtliche 467 Fälle intratumorale Gefäße. Dabei wurde eine vaskuläre IR-Expression interessanterweise vorwiegend in den intratumoralen Gefäßen und nicht in den Gefäßen des umgebenden nicht-neoplastischen Gewebes nachgewiesen. Auffällig war zudem, dass der IR insbesondere in Kapillaren exprimiert wurde, während in Arteriolen oder Venolen der IR-Nachweis deutlich schwächer ausfiel. Ein schwach positiver vaskulärer IR-Nachweis (VIR 1+) kam bei 428 (91,6%) Magenkarzinomen und ein starker IR-Nachweis (VIR 2+) bei 361 (77,3%) der Fälle vor. Überraschenderweise zeigten sich 14 (3,0%) Präparate, bei denen trotz des CD31-geführten Nachweises von Gefäßen keine endotheliale IR-Expression vorlag. Der Median für cEIR betrug HScore ≥ 115 .

Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass Magenkarzinome den IR sowohl in Tumorzellen als auch in Endothelien der intratumoralen Gefäße exprimieren. Die Streuung des Histo-Scores verdeutlicht die intratumorale Heterogenität der IR-Expression in den Magenkarzinomen (vgl. Tabelle 5).

Tab. 5: Absolute und relative Häufigkeiten der Färbeintensitäten innerhalb des WTS-Kollektivs.

Das Kollektiv umfasste 467 (=n-Gesamt) in die Auswertung miteinbezogene Magenkarzinome.

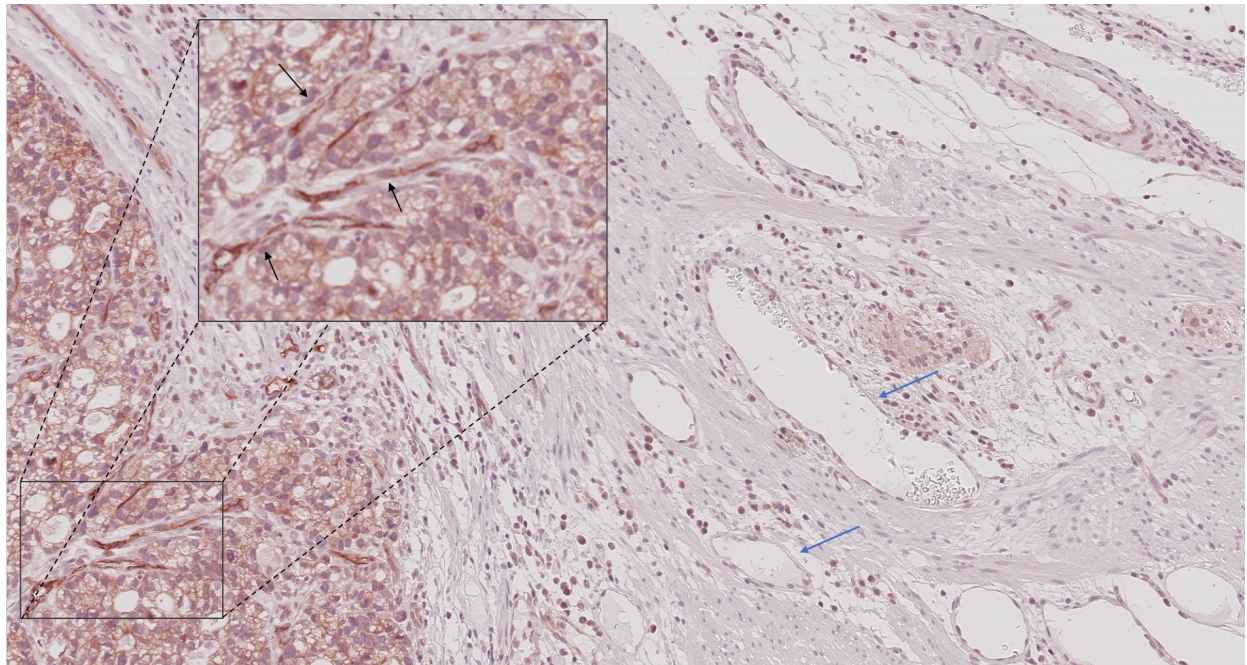
Intensität Kategorie	0		1+		2+	
	n	%	n	%	n	%
cEIR	364	78,0	431	92,3	254	54,4
mEIR	457	97,9	343	73,4	322	69,0
VIR	346	70,1	428	91,6	361	77,3

3.3 Vergleich der IR-Expression in Endothelien bei Tumor- und Normalgewebe

Studien zur vaskulären IR-Expression (VIR) des Prostata- [84], Harnblasen- [85] und Kolonkarzinoms [79] berichteten über eine charakteristische IR-Expression in intratumoralen Endothelien. Ferner zeigten Roudnicky et al. [85], dass bei der Betrachtung der extratumoralen Peripherie des invasiven Harnblasenkarzinoms immunhistochemisch kein vaskulär exprimierter IR nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass es intratumoral möglicherweise einen speziellen Typ Tumor-assoziiertes Gefäß gebe, der anhand der vaskulären IR-Expression zu identifizieren sei. Diese Annahme bestätigte sich auch für das Magenkarzinom, da von sämtlichen 467 Tumoren lediglich 14 (3,0%) Fälle keine VIR-Expression in den intratumoralen Endothelien aufwiesen.

Des Weiteren wurde an den Tumorrändern eine vergleichende Betrachtung der intra- und extratumoralen Gefäße durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in Analogie zu den Ergebnissen von Roudnicky et al. [85] die Gefäßendothelien des den Magentumor umgebenden nichtneoplastischen Gewebes keine IR-Immunoreaktivität aufwiesen (VIR=0; vgl. Abbildung 11). Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse, dass die Expression des IR auch beim Magenkarzinom einen Marker für intratumorale Gefäße darstellt und die Expression des IR in Gefäßendothelien ein tumorspezifisches Phänomen ist.

Abb. 11: Vergleich der VIR-Expression in intra- und extratumoralen Endothelien innerhalb eines Magenkarzinoms. Die intratumoral gelegenen Endothelien (schwarze Pfeile) sind stark IR-positiv, während die Gefäße der unmittelbaren extratumoralen Peripherie IR-negativ sind (blaue Pfeile). Vergrößerung 1:15.



3.4 Korrelation epithelialer (EIR) und vaskulärer (VIR) IR-Expression

In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression des IR in Tumorzellen und in Tumorgefäßendothelien besteht. Dazu wurde die Expression des IR jeweils am Median in *cEIR-low* und *-high*, *mEIR-low* und *-high* sowie *VIR-low* und *-high* dichotomiert. Der *Fisher's Exact-Test* zeigte, dass die *VIR-*, *cEIR-* und *mEIR-Expression* im Magenkarzinom positiv miteinander assoziiert sind. Eine *VIR-high* Expression korrelierte signifikant mit einer starken IR-Expression in den Tumorzellen, nämlich mit *cEIR-high* in 62,0% ($p < 0,001$) und mit *mEIR-high* in 55,3% der Fälle ($p = 0,005$). Zudem korrelierte eine starke zytoplasmatische Expression des IR (*cEIR-high*) mit einer starken membranären Expression (*mEIR-high*) in 57,0% der Fälle ($p < 0,001$).

3.5 Korrelation der IR-Expression auf Tumorzellen (EIR) mit klinisch-pathologischen Charakteristika

Zur Überprüfung einer möglichen tumorbiologischen Relevanz des IR im Magenkarzinom wurde dessen Expression (cEIR und mEIR) mit klinisch-pathologischen Patienteneigenschaften verglichen. Es fanden sich signifikante Korrelationen zwischen der cEIR-Expression und den folgenden klinisch-pathologischen Patientencharakteristika (vgl. Tabelle 6): Patientenalter, Tumortyp nach Laurén, Tumorlokalisierung, Differenzierungsgrad und Lymphknotenratio (Anzahl befallener Lymphknoten dividiert durch Anzahl untersuchter Lymphknoten). Patienten mit Magenkarzinomen, die cEIR-*high* aufwiesen, waren signifikant älter (≥ 68 Jahre; $p=0,005$) und litten besonders häufig an proximal lokalisierten Tumoren ($p=0,015$). Diese waren mehrheitlich vom intestinalen oder differenzierten Typ nach Laurén ($p<0,001$) und wiesen in dem Gesamtresektat weniger Lymphknotenmetastasen auf (LK-Ratio; $p=0,033$). Zudem war die cEIR-Expression mit dem Differenzierungsgrad assoziiert: gut (G1) und mittelgradig (G2) differenzierte Tumoren wiesen zu etwa $\frac{2}{3}$ cEIR-*high* und zu $\frac{1}{3}$ cEIR-*low* auf. Dahingegen überwogen unter den gering differenzierten Magenkarzinomen (G3 oder G4) die cEIR-*low*- (54,5%) die cEIR-*high*-Magentumoren (45,6%; $p<0,001$). Somit war cEIR mit der Tumordignität assoziiert, ohne sich dabei signifikant auf das Patientenüberleben auszuwirken.

Bei der statistischen Auswertung bezüglich der membranären IR-Expression (mEIR) konnte eine Korrelation mit dem Phänotyp nach Laurén nachgewiesen werden. Magenkarzinome mit mEIR-*high* waren besonders häufig intestinal differenziert, während jene, die mEIR-*low* aufwiesen, mehrheitlich dem diffusen Typ entsprachen ($p=0,043$). Weitere Ergebnisse für die mEIR- und cEIR-Expression erreichten bezüglich des lokalen Tumorstadiums (T-Kategorie), der lokalen Metastasierung (N-Kategorie) und der Fernmetastasierung (M-Kategorie) sowie weiteren untersuchten Parametern keine Signifikanz (vgl. Tabelle 6).

3.6 Korrelation der IR-Expression in Endothelien (VIR) mit klinisch-pathologischen Charakteristika

Anschließend wurde die Expression des IR in den Tumorgefäßendothelien mit den klinisch-pathologischen Patientencharakteristika korreliert. Die vaskuläre IR-Expression (VIR) war signifikant mit dem Überleben, dem Geschlecht, dem Tumortyp nach Laurén, der Tumorlokalisation, der T-Kategorie, der N-Kategorie, der V-Kategorie und dem UICC-Stadium assoziiert (vgl. Tabelle 6).

Magenkarzinome mit *VIR-high* kamen überwiegend bei Männern vor ($p=0,027$) und waren mehrheitlich im proximalen Magen lokalisiert (62,9% der Fälle; $p=0,001$). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass bei *VIR-high* Karzinomen mit zunehmender lokaler Tumorexpansion (T-Kategorie) auch die endotheliale IR-Expression graduell zunahm ($p=0,002$). In Analogie dazu wiesen Magenkarzinome bei steigender Anzahl lokaler Lymphknotenmetastasen vermehrt *VIR-high* auf ($p=0,017$). Gleiches galt für die Gefäßinfiltration (V-Kategorie): signifikant mehr *VIR-high* fand sich bei fortgeschrittenen Tumoren mit *Hämangiosis carcinomatosa* im Vergleich zu solchen ohne Gefäßinfiltration ($p=0,005$).

Abb. 12: Korrelation des VIR-Status mit der T-Kategorie. Die VIR-Expression steigt graduell mit dem Ausmaß der lokalen Infiltration (T-Kategorie) des Magenkarzinoms.

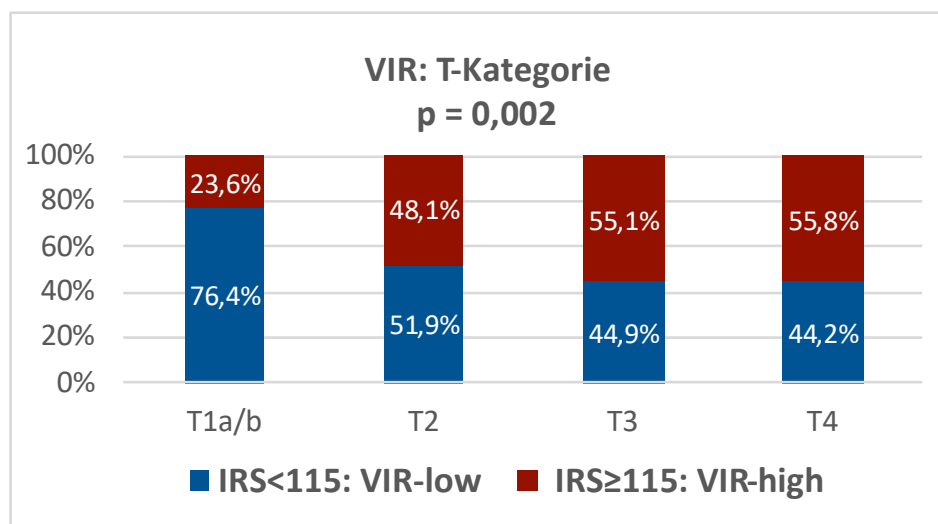


Abb. 13: Korrelation des VIR-Status mit der N-Kategorie. Bei positivem Nodalstatus (N1) kann ein deutlicher Anstieg der VIR-Expression nachgewiesen werden. Zudem zeigen die Magentumoren bei fortschreitender Metastasierung in die lokoregionären Lymphknoten eine kontinuierliche Zunahme der VIR-high-Expression.

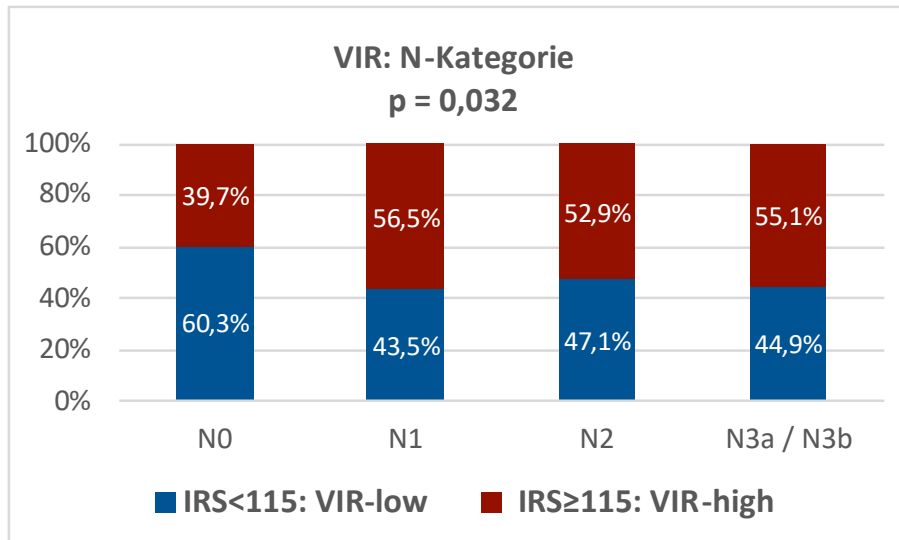
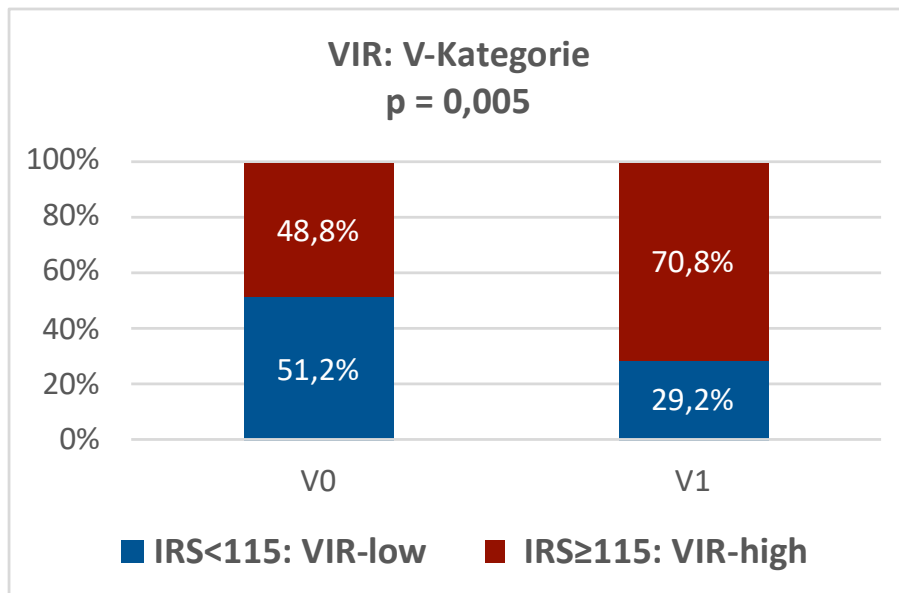
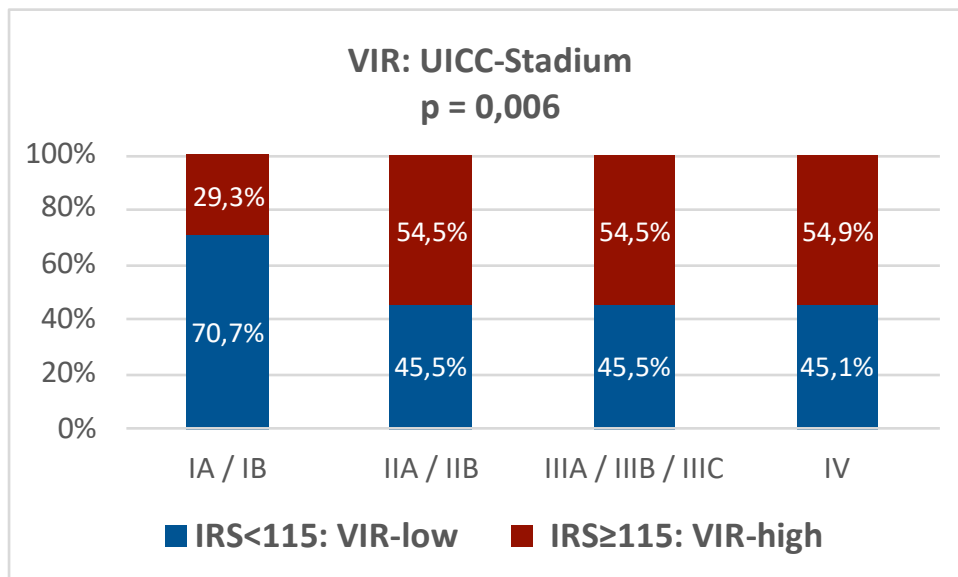


Abb. 14: Korrelation des VIR-Status mit der V-Kategorie. Mit dem Tumoreinbruch in die Blutgefäße (V1) kann ein sprunghafter Anstieg der vaskulären IR-Expression verzeichnet werden.



An die obigen Resultate anknüpfend konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem UICC-Stadium und der VIR-Expression nachgewiesen werden: Die Mehrzahl der Magenkarzinome in früheren Stadien IA/IB (70,9%) zeigten VIR-low. Dahingegen wiesen die meisten Karzinome in höheren Tumorstadien hochsignifikant VIR-high auf (p=0,006).

Abb. 15: Korrelation des VIR-Status mit dem UICC-Stadium. Mit Zunahme des Tumorstadiums kann eine graduell vermehrte vaskuläre IR-Expression nachgewiesen werden. Das fortgeschrittene Magenkarzinom weist mehrheitlich eine VIR-high-Expression auf.

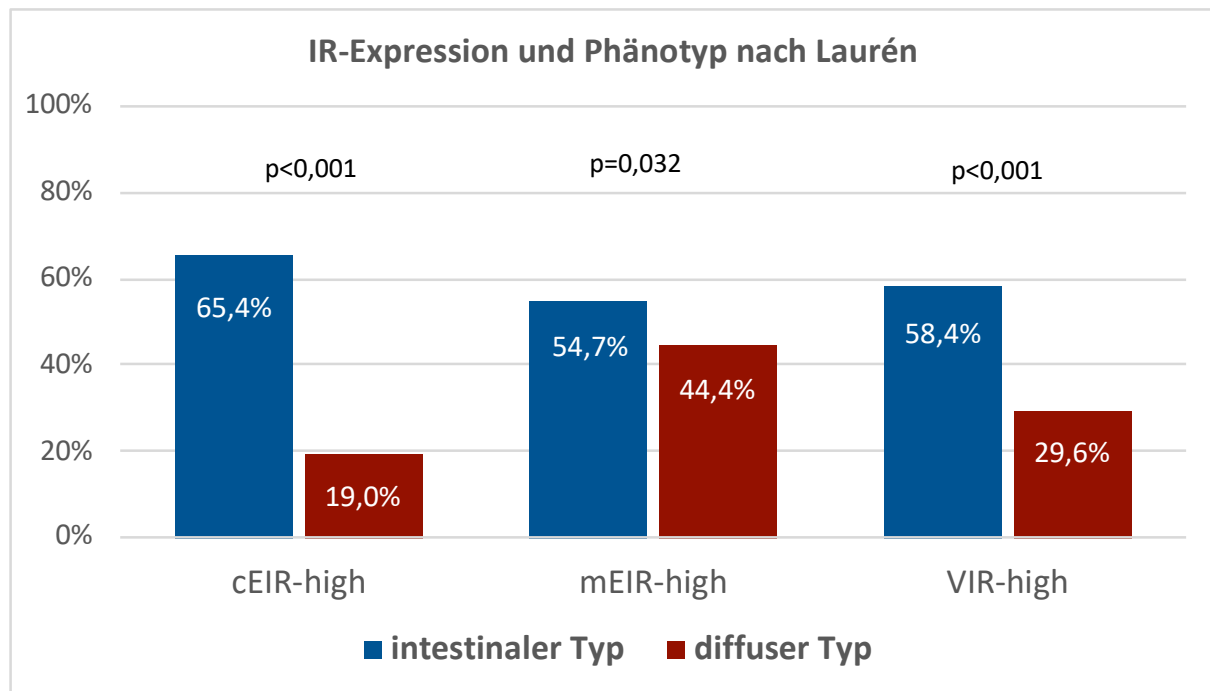


Bezüglich des Differenzierungsgrades und der Fernmetastasierung (M-Kategorie) des Magenkarzinoms ergab die Auswertung zur VIR-Expression keine signifikanten Ergebnisse.

3.7 Korrelation der IR-Expression mit dem histologischen Tumortyp

Weiterhin korrelierte der IR-Status des Tumors mit dem histologischen Typ nach Laurén: VIR-high ($p<0,001$), cEIR-high ($p<0,001$) und mEIR-high ($p=0,032$) wurden allesamt vermehrt beim intestinalen Magenkarzinom nach Laurén nachgewiesen. Zwei Drittel der Magenkarzinome vom intestinalen Typ waren cEIR-high ($p<0,001$) bzw. in über der Hälfte der Fälle VIR-high ($p<0,001$). Im Gegensatz dazu wiesen 81,0% bzw. 70,4% der diffusen Magenkarzinome cEIR-low und VIR-low auf (jeweils $p<0,001$).

Abb. 16: IR-Expression nach dem Phänotyp. Der immunhistochemische IR-Nachweis beim intestinalen Magenkarzinom überwiegt im Vergleich zum diffusen Typ in allen untersuchten Kategorien cEIR, mEIR und VIR.



3.8 Analyse der Überlebensdaten

Das mediane Gesamtüberleben (OS) des Magenkarzinomkollektivs lag bei 14,1 Monaten. Das tumorspezifische Überleben (TSS) betrug 15,5 Monate. Die Auswertung ergab, dass die Prognose eines Patienten signifikant vom Phänotyp nach Laurén, der T-, N-, M-, L-, V- und R-Kategorie, dem UICC-Stadium, der Lymphknotenratio sowie dem mEIR- und VIR-Status abhing (vgl. Abbildung 17 und 18 sowie Tabelle 6).

Magenkarzinome der mEIR-*high* Gruppe waren zu solchen der mEIR-*low* Gruppe mit einer signifikant verkürzten Überlebenszeit assoziiert: Das OS betrug 12,5 vs. 17,3 Monate (Δ 4,8 Monate; p=0,026) und das TSS 12,8 vs. 20,3 Monate (Δ 7,5 Monate; p=0,01).

Somit zeigten Patienten mit mEIR-*high* Magentumoren eine zum Median 34% kürzere Gesamtüberlebenszeit bzw. zum Median um 48% verkürzte tumorspezifische Überlebenszeit. Der Zusammenhang zwischen der mEIR-Expression der Tumorzellen im Magenkarzinom und einem kürzeren Patientenüberleben blieb im multiplen Test nach Benjamini-Hochberg signifikant.

Die zytoplasmatische IR-Expression auf Tumorzellen (cEIR) des Magenkarzinoms korrelierte nicht mit dem Patientenüberleben (vgl. Tabelle 6).

Die statistische Auswertung zur VIR-Expression zeigte ähnliche Ergebnisse. Die Expression des IR in Tumorgefäßen war mit einem signifikant schlechteren Patientenüberleben verknüpft: Das OS und das TSS der VIR-*high*- zur VIR-*low* Gruppe betrug 12,1 vs. 16,7 Monate bzw. 13,4 vs. 19,9 Monate. Dies bedeutet eine Verkürzung des OS um 4,6 Monate ($p=0,044$) bzw. des TSS um ca. 6,5 Monate ($p=0,045$) bei VIR-*high* Magenkarzinomen. Anders gesagt ist das Überleben der VIR-*high* Gruppe im Vergleich zum medianen OS um ca. 33% bzw. zum medianen TSS um ca. 42% verkürzt. Dieser Zusammenhang verlor im Benjamini-Hochberg-Test seine statistische Signifikanz (vgl. Tabelle 6). Jedoch konnte die VIR-Expression in der multivariaten Analyse als unabhängiger prognostischer Parameter für das Patientenüberleben und die -prognose bestätigt werden (OS: $p=0,010$; Hazard Ratio = 1,355; TSS: $p=0,006$; Hazard Ratio = 1,429; vgl. Tabelle 7).

Abb. 17: Überlebensanalyse mittels Kaplan-Meyer Schätzer. Gesamtüberleben (OS) und tumorspezifisches Überleben (TSS) nach IR-Expression an Tumorzellmembranen (mEIR): Patienten der mEIR-high Gruppe (grün) zeigten im Vergleich zur mEIR-low Gruppe (blau) ein signifikant verkürztes OS (Δ 4,8 Monate; $p=0,026$) und TSS (Δ 7,5 Monate; $p=0,01$).

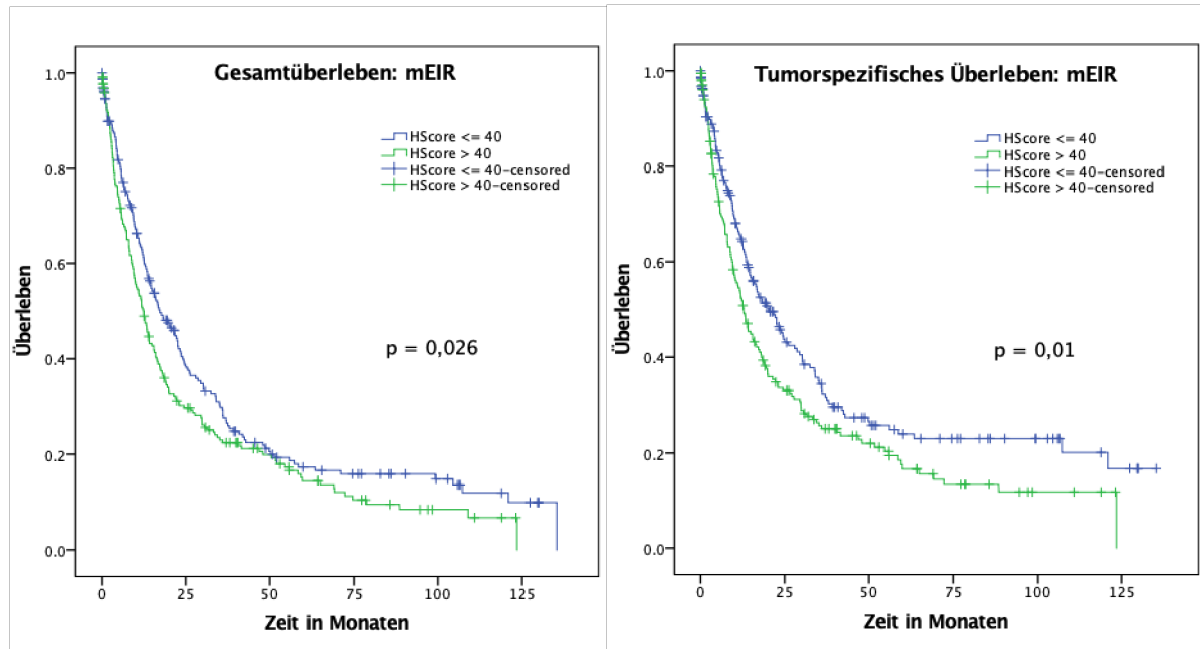
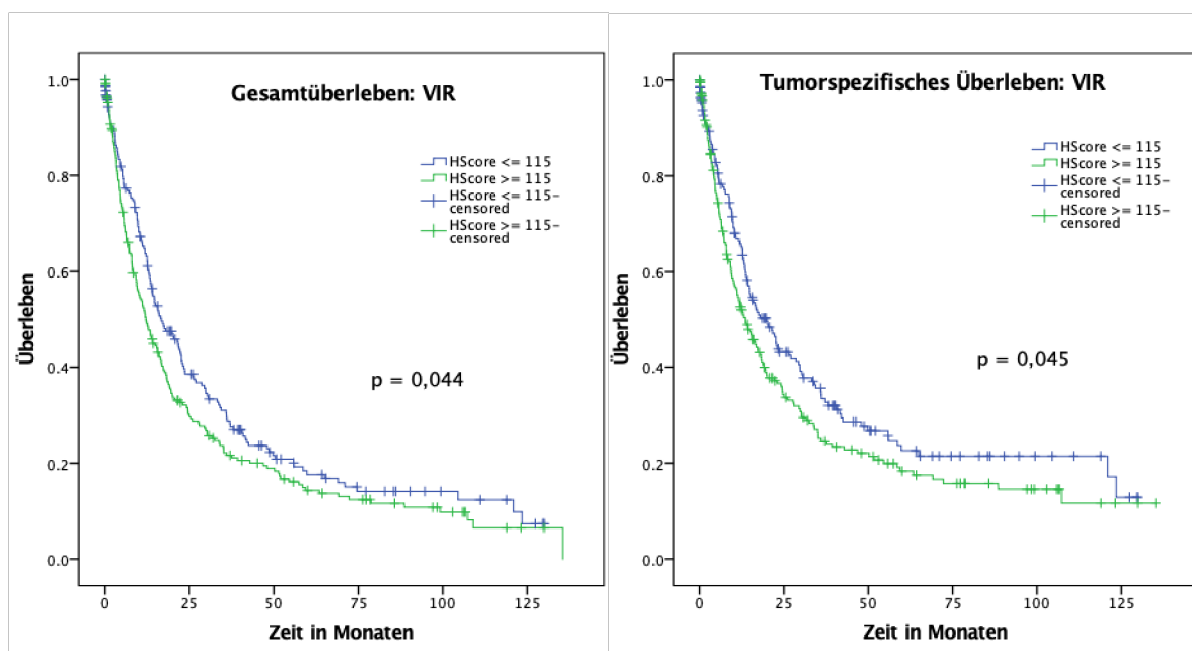


Abb. 18: Überlebensanalyse mittels Kaplan-Meyer Schätzer. Gesamtüberleben (OS) und tumorspezifisches Überleben (TSS) nach IR-Expression an Endothelien (VIR). Patienten der VIR-high Gruppe (grün) zeigten im Vergleich zur VIR-low Gruppe (blau) ein signifikant verkürztes OS (Δ 4,6 Monate; $p=0,044$) und TSS (Δ 6,5 Monate; $p=0,045$).



Tab. 6: Resultate der Analyse der Tumor-Großflächenschnitte (WTS). Korrelation der IR-Expression auf Endothelien (VIR) und Epithelien (EIR) des Magenkarzinoms mit klinisch-pathologischen Charakteristika. Dichotomierung des Kollektivs in eine IR-*low*- und -*high* Gruppe am Median.

Resultate WTS	Total		Vaskuläre IR-Expression (VIR)				Zytoplasmatische IR-Expression (cEIR)				Membranäre IR-Expression (mEIR)			
			<i>low:</i>		<i>high:</i>		<i>low:</i>		<i>high:</i>		<i>low:</i>		<i>high:</i>	
	HS-Score		HS-Score		HS-Score		HS-Score		HS-Score		HS-Score		HS-Score	
	<115		≥115		<90		≥90		≤40		>40			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Geschlecht														
n	467		467				467				467			
p ⁽¹⁾														
weiblich	169	36,2	95	56,2	74	43,8	85	50,3	84	49,7	81	47,9	88	52,1
männlich	298	63,8	135	45,3	163	54,7	147	49,3	151	50,7	158	53,0	140	47,0
Alter														
n	461		461				461				461			
p ⁽¹⁾														
< 68 Jahre	231	50,1	119	51,5	112	48,5	129	55,8	102	44,2	126	54,5	105	45,5
≥ 68 Jahre	230	49,9	108	47,0	122	53,0	98	42,6	132	57,4	109	47,4	121	52,6
Laurén-Typ														
n	467		467				467				467			
p ⁽¹⁾														
intestinal	243	52,0	101	41,6	142	58,4	84	34,6	159	65,4	110	45,3	133	54,7
diffus	142	30,4	100	70,4	42	29,6	115	81,0	27	19,0	79	55,6	63	44,4
gemischt	32	6,9	16	50,0	16	50,0	16	50,0	16	50,0	18	56,3	14	43,8
unklassifiziert	50	10,7	13	26,0	37	74,0	17	34,0	33	66,0	32	64,0	18	36,0
Lokalisation														
n	454		454				454				454			
p ⁽¹⁾														
proximal	140	30,8	52	37,1	88	62,9	57	40,7	83	59,3	72	51,4	68	48,6
distal	314	69,2	171	54,5	143	45,5	168	53,5	146	46,5	157	50,0	157	50,0
pT-Kategorie														
n	466		466				466				466			
p ⁽²⁾														
T1a / T1b	55	11,8	42	76,4	13	23,6	24	43,6	31	56,4	30	54,5	25	45,5
T2	54	11,6	28	51,9	26	48,1	19	35,2	35	64,8	29	53,7	25	46,3
T3	185	39,7	83	44,9	102	55,1	100	54,1	85	45,9	102	55,1	83	44,9
T4a / T4b	172	36,9	76	44,2	96	55,8	88	51,2	84	48,8	77	44,8	95	55,2

pN-Kategorie					
n	p ⁽²⁾	465	465	465	465
			<u>0,017*</u>	0,191	0,504
N0		131 28,2	79 60,3 52 39,7	61 46,6 70 53,4	69 52,7 62 47,3

Resultate WTS	Total		Vaskuläre IR-Expression (VIR)				Zytoplasmatische IR-Expression (cEIR)				Membranäre IR-Expression (mEIR)			
			low:		high:		low:		high:		low:		high:	
			HS-Score		HS-Score		HS-Score		HS-Score		HS-Score		HS-Score	
			<115		≥115		<90		≥90		≤40		>40	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
N1	62	13,3	27	43,5	35	56,5	27	43,5	35	56,5	31	50,0	31	50,0
N2	85	18,3	40	47,1	45	52,9	44	51,8	41	48,2	46	54,1	39	45,9
N3a / N3b	187	40,2	84	44,9	103	55,1	99	52,9	88	47,1	91	48,7	96	51,3
M-Kategorie														
n	p ⁽¹⁾	467	467		0,563	467		0,298	467		0,419			
M0		374 80,1	187 50,0	187 50,0		181 48,4	193 51,6		195 52,1	179 47,9				
M1		93 19,9	43 46,2	50 53,8		51 54,8	42 45,2		44 47,3	49 52,7				
UICC Stadium														
n	p ⁽²⁾	465	465		0,006**	465		0,116	465		0,318			
IA / IB		75 16,1	53 70,7	22 29,3		31 41,3	44 58,7		41 54,7	34 45,3				
IIA / IIB		101 21,7	46 45,5	55 54,5		50 49,5	51 50,5		53 52,5	48 47,5				
IIIA/IIIB/IIIC		198 42,6	90 45,5	108 54,5		99 50,0	99 50,0		100 50,5	98 49,5				
IV		91 19,6	41 45,1	50 54,9		50 54,9	41 45,1		43 47,3	48 52,7				
Lymphknoten-Ratio														
n	p ⁽¹⁾	464	464		0,193	464		0,033*	464		0,781			
< 0.189		223 48,1	118 52,9	105 47,1		99 44,4	124 55,6		115 51,6	108 48,4				
≥ 0.189		241 51,9	112 46,5	129 53,5		131 54,4	110 45,6		121 50,2	120 49,8				
pL-Kategorie														
n	p ⁽¹⁾	432	432		0,067	432		0,442	432		0,178			
L0		209 48,4	111 53,1	98 46,9		97 46,4	112 53,6		112 53,6	97 46,4				
L1		223 51,6	98 43,9	125 56,1		112 50,2	111 49,8		104 46,6	119 53,4				
pV-Kategorie														
n	p ⁽¹⁾	431	431		0,005**	431		0,359	431		0,361			
V0		383 88,9	196 51,2	187 48,8		189 49,3	194 50,7		196 51,2	187 48,8				
V1		48 11,1	14 29,2	34 70,8		20 41,7	28 58,3		21 43,8	27 56,3				

Differenzierungsgrad				
n				
p ⁽¹⁾				
	463	463	0,272	463
				<0,001**
				463
				0,187
niedrig (G1/G2)	108 23,3	48 44,4 60 55,6	37 34,3 71 65,7	49 45,4 59 54,6
hoch (G3/G4)	355 76,7	181 51,0 174 49,0	193 54,4 162 45,6	188 53,0 167 47,0
Resultate	Total	Vaskuläre IR-Expression (VIR)	Zytoplasmatische IR-Expression (cEIR)	Membranäre IR-Expression (mEIR)
		low: high:	low: high:	low: high:
		HS-Score HS-Score	HS-Score HS-Score	HS-Score HS-Score
		<115 ≥115	<90 ≥90	≤40 >40
	WTS	n % n %	n % n %	n % n %
Resektionsgrad				
n	448	448	448	448
p ⁽¹⁾		0,889	0,166	0,209
R0	389 86,8	191 49,1 198 50,9	186 47,8203 52,2	201 51,7 188 48,3
R1/R2	59 13,2	28 47,5 31 52,5	34 57,6 25 42,4	25 42,4 34 57,6
Gesamtüberleben				
p ⁽³⁾				
[Monate]		0,044*	0,214	0,026*
Gesamt/Events			222/177	
/Zensiert	448/352/96	216/160/56 232/192/40	/45 226/175/51	228/168/60 220/184/36
Median	14,1	16,7 12,1	15,5 13,5	17,3 12,5
95% Konfidenz-Intervall	12,1 - 16,1	11,7 - 21,6 9,5 - 14,8	12,7 - 18,3 10,8 - 16,3	12,6 - 21,9 10,1 - 14,9
Tumor- spezifisches Überleben				
p ⁽³⁾				
[Monate]		0,045*	0,135	0,01**
Gesamt/Events	421/290		208/149	
/Zensiert	/131	199/128/71 222/162/60	/59 213/141/72	218/136/82 203/154/49
Median	15,5	19,9 13,4	16,0 14,9	20,3 12,8
95% Konfidenz-intervall	12,7 - 18,3	14,3 - 25,6 9,8 - 17,1	11,8 - 20,2 10,9 - 18,9	14,8 -25,8 10,1 - 15,6

Legende:

* = relevante Korrelation, dabei gilt $p \leq 0,05$ als signifikant und $p \leq 0,01$ als hochsignifikant.

$p^{(1)}$ Fisher's exact-Test; $p^{(2)}$ Kendall's tau-Test; $p^{(3)}$ Log-rank-Test

P-Werte mit einem Verlust der statistischen Signifikanz bei der multiplen Testung nach Benjamini-Hochberg wurden unterstrichen.

Tab. 7: Ergebnisse der multivariaten Analyse (Cox-Regression) zu den Einflussfaktoren auf das Gesamt- und tumorspezifische Überleben beim Magenkarzinom.

	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall	P - Wert
Gesamtüberleben			
N - Kategorie			0,005
N1 vs. N0	2,100	1,355 – 3, 257	0,001
N2 vs. N0	1,707	1,022 – 2, 851	0,041
N3 vs. N0	2,071	1,150 – 3,729	0,015
M - Kategorie: M1 vs. M0	1,671	1,242 – 2,249	0,001
LK - Ratio: <i>high</i> vs. <i>low</i>	1,757	1,068 – 2,891	0,026
V-Kategorie: V1 vs. V0	1,526	1,086 – 2,143	0,015
R-Status: R1/R2 vs. R0	2,005	1,439 – 2,793	0,000
VIR-Status: VIR- <i>low</i> vs. VIR- <i>high</i>	1,355	1,074 – 1,709	0,010
Tumorspezifisches Überleben			
N - Kategorie			0,000
N1 vs. N0	2,430	1,451 – 4,069	0,001
N2 vs. N0	2,949	1,870 – 4,649	0,000
N3 vs. N0	4,381	2,865 – 6,701	0,000
M - Kategorie: M1 vs. M0	1,529	1,113 – 2,100	0,009
V-Kategorie: V1 vs. V0	1,642	1,147 – 2,350	0,007
R-Status: R1/R2 vs. R0	2,298	1,634 – 3,232	0,000
VIR-Status: VIR- <i>low</i> vs. VIR- <i>high</i>	1,429	1,106 – 1,847	0,006

4 Diskussion

4.1 Methodische Diskussion

4.1.1 Immunhistochemie

Der experimentelle Ansatz der vorliegenden Arbeit sah vor, den IR in Endothelien und Epithelien des Magenkarzinoms nachzuweisen. Dafür wurde ein Färbeprotokoll genutzt, das von unserer Arbeitsgruppe für vorangegangene Projekte zum Themenkomplex gastrointestinaler Tumoren entwickelt wurde. Die initiale Funktionsprüfung sowie Etablierung des verwendeten IR-Antikörpers gelang den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe an Präparaten von Kolonkarzinomen im Vorfelde [79]. Für das Magenkarzinom führte die Verdünnung des IR-Antikörpers von 1:50 zu zufriedenstellenden immunhistochemischen Ergebnissen. Durch das Weglassen des Primärantikörpers wurden im laufenden Färbeprozess kontinuierlich Negativkontrollen zur internen Qualitätskontrolle mitgeführt. Die vorliegende Studie weist hinsichtlich ihrer experimentellen Gestaltung einen hohen Grad der Homologie zu den Arbeiten von Roudnicky et al. [85] über das Harnblasenkarzinom und Heckl et al. [79] über das Kolonkarzinom auf. Während Roudnicky et al. in ihrer Arbeit den Einfluss von VIR auf das Harnblasenkarzinom untersuchten, analysierten Heckl et al. die Bedeutung von EIR und VIR beim Kolonkarzinom unter Verwendung des gleichen gegen den Insulinrezeptor gerichteten Antikörpers. Vergleichbar mit unserer Vorgehensweise nutzen beide Arbeitsgruppen ebenfalls TMAs. Darüber hinaus nahmen Heckl et al. die Einschätzung der VIR-Expression mittels eines ähnlichen mehrstufigen Immunreaktivitätsscores vor („0“: keine, „1+“: schwache, „2+“: mäßige und „3+“ stark positive IR-Expression). In Analogie zur vorliegenden Arbeit wurde die EIR-Expression in zytoplasmatisch (cEIR) und membranär (mEIR) unterteilt [79]. Zudem dichotomierten sowohl die unsrige als auch beide genannten Arbeitsgruppen die ermittelten Daten zur VIR- bzw. EIR-Expression in eine IR-*low* und -*high* Gruppe. Ferner korrelierten sowohl Roudnicky et al. [85] als auch Heckl et al. [79] die erhobenen Werte ebenfalls mit bekannten klinisch-pathologischen Patienten- und Überlebensdaten. Dabei legt die immunhistochemische und statistisch-analytische Äquivalenz mit den vorliegenden Daten die Grundlage für die Übertragung unserer Hypothesen und Ergebnisse auf die Resultate von Heckl. und Roudnicky et al.

4.2 Diskussion und Interpretation der Ergebnisse

4.2.1 TMAs und Tumorheterogenität

In der methodischen Aufbereitung der TMAs wie den WTS wurde auf größtmögliche Äquivalenz geachtet. Die TMAs waren von derselben Patientenkohorte und wurden aus denselben Paraffinblöcken gewonnen. Das Färbeprotokoll sowie die Reagenzien wurden einheitlich angewandt und es wurde in beiden Fällen eine Dichotomierung am Median in eine IR-*low*- und -*high* Gruppe vorgenommen. Lediglich der Auswertungsalgorithmus der TMAs war vierstufig, sodass zwischen den Kategorien „0“, „1+“, „2+“ und „3+“ unterschieden wurde, während die Immunoreaktivität der WTS auf drei Stufen „0“, „1+“ und „2+“ eingeteilt wurde. Die Korrelation erhobener Befunde zur differentiellen IR-Expression mit den bekannten Patientencharakteristika erbrachte interessanterweise bei den TMAs keine Ergebnisse (vgl. Tabelle 4). Dahingegen ergaben sich bei den Gesamtumorpräparaten eine Vielzahl signifikanter Zusammenhänge (vgl. Tabelle 6).

Die inter- und intratumorale Heterogenität ist ein bekanntes Phänomen maligner Tumoren und gilt in besonderem Maße auch für das Magenkarzinom. Wie Gullo et al. [133] konkretisierten, finden sich bei Magentumoren Unterschiede zwischen verschiedenen Patienten (intertumorale Heterogenität) und auch innerhalb eines Magenkarzinoms (intratumorale Heterogenität), sowohl auf räumlicher als auch auf „zeitlicher“ Ebene (Progression vom Primarius zum metastasierten Magenkarzinom). Dabei gilt die intratumorale Heterogenität als eine der größten Herausforderungen auf dem Weg von präziser zu personalisierter Medizin beim Magenkarzinom [134]. In der vorliegenden Studie erfasste der modifizierte HScore die intratumorale Heterogenität des Magenkarzinoms: Einige Fälle wiesen eine „Grauskalierung“ der IR-Expression im Tumorgewebe auf, d.h. das gesamte Spektrum der Farbtintensitäten („0“, „1+“, „2+“) lag gemischt nebeneinander vor. Davon waren Tumoren zu unterscheiden, die z.B. zwei Farbstufen („0“ und „2+“) in räumlich klar voneinander unterscheidbaren Arealen aufwiesen. Dasselbe Magenkarzinomkollektiv wurde im Vorfeld bereits für die Expressionsanalyse weiterer RTK und Proteine genutzt. Bei der Auswertung zur Expression des Wachstumsfaktors *MET* sowie des *PIK3CA*-Status in den Magentumoren kamen Metzger et al. [131] und Böger et al. [135] zu übereinstimmenden Ergebnissen: Es wurden intratumorale Inhomogenitäten hinsichtlich der genomischen Alterationen und der Protein-Expression festgestellt. Ein ähnliches Resultat zeigte die

Arbeitsgruppe auch bei der Untersuchung der HER2-Expression: Warneke et al. [132] wiesen nach, dass Tumorstanzen bei der Bewertung des HER2-Status dem Risiko eines Stichprobenfehlers unterliegen. Böger et al. [135] äußerten in ihrer Arbeit zudem, dass das Magenkarzinom aufgrund seiner ausgeprägten intratumoralen Heterogenität bevorzugt als großflächiges Schnittpräparat untersucht werden sollte. Diese Aussage wird von Alsino et al. [134] gestützt.

All diese Erkenntnisse führen zu dem Schluss, dass Magenkarzinome in ihrer Struktur hochkomplex sind und demzufolge die vorliegenden Resultate der TMA-Analyse einem Stichprobenfehler unterlagen. Da mehrheitlich über heterogene Expressionslevel von RTK innerhalb desselben Kollektivs berichtet wurde [131, 132, 135], erklärt sich die inhomogene Expression des IR in den Magenkarzinomen vermutlich durch seine Zugehörigkeit zu den RTK. Um der intratumoralen Heterogenität der Magenkarzinome gerecht zu werden, wurde der modifizierte HScore angewandt, welcher eine Dichotomierung in Karzinome mit hoher und geringer IR-Expression auf Tumorzellen und Endothelien ermöglichte. Unter der Annahme, dass dominante Krebszellen in inhomogenen Karzinomen die Tumoreigenschaften und das Patientenschicksal determinieren, konnte somit die Gruppe der *IR-high* Magenkarzinome präzise charakterisiert werden.

4.2.2 Expressionsanalyse des Insulinrezeptors

Zur Evaluation der Relevanz der IR-Expression im Magenkarzinom wurde ein umfassendes Kollektiv von 467 primären Magentumoren untersucht. Der IR ließ sich in 95,7% der Fälle im Zytoplasma (cEIR), bei 87,6% der Fälle an Tumorzellmembranen (mEIR) und bei 97,0% der Fälle in intratumoralen Endothelien (VIR) nachweisen (HScore >0). Somit ist durch die vorliegende Arbeit erstmalig der Nachweis erbracht worden, dass sowohl die Epithelien als auch die Endothelien des Magenkarzinoms den IR beinahe ubiquitär und gegenüber nichtneoplastischem Gewebe verstärkt exprimieren.

Dabei ergab die statistische Auswertung, dass cEIR-, mEIR- und VIR-*high* beim fortgeschrittenen Magenkarzinom signifikant miteinander korrelieren. Dieses Phänomen lässt sich durch die Beobachtung von Morcavallo et al. erklären, die nachwiesen, dass eine Stimulation durch die Liganden Insulin bzw. IGF-II die Internalisierung des IR induziert. Demnach geht die zytoplasmatische Aufnahme des IR mit einer prolongierten Aktivierung

einher [136]. Unter Annahme dessen könnten vermutlich besonders stoffwechselaktive Karzinome ein simultanes Vorkommen von cEIR-*high* und mEIR-*high* gezeigt haben.

Darüber hinaus zeigte sich die IR-Expression im Zytoplasma und an den Tumorzellmembranen inhomogen. In Bezug auf die intratumorale Heterogenität der Magenkarzinome könnte die cEIR- und mEIR-*high*-Expression Hinweise auf die divergierende Stoffwechselaktivität spezifischer Areale geben.

Da die Bildung des IR/IGF-IR unmittelbar von der Quantität vorhandener Liganden abhängt [66], kann durch die nachgewiesene hochfrequente IR-Expression angenommen werden, dass jene Hybridrezeptoren im untersuchten Magenkarzinomkollektiv ebenso exprimiert wurden. Der experimentell verwendete IR-Antikörper war hochaffin (nicht Isoformen-spezifisch) für den IR, dabei wurde jedoch nicht der im Hybridrezeptor heterodimerisiert vorliegende Anteil des IR nachgewiesen. Die Existenz des IR/IGF-IR ist für einige Tumorentitäten bekannt und wird durch den Wechsel vom IR zu IGF-I als stimulierenden Liganden (tumor-)biologisch relevant. Die Isoformen des IR bilden differente Hybridrezeptoren, wobei insbesondere der IR-A/IGF-IR die Zellmigration und -proliferation steigert und in diesem Sinne die Kanzerogenese beeinflusst [66, 67]. Daher sollten künftige Studien zur Entschlüsselung der molekularen Mechanismen des Magenkarzinoms neben dem immunhistochemischen Nachweis des Rezeptors auch eine Genanalyse der IR-Hybridrezeptoren anstreben.

4.2.3 Bedeutung der epithelialen (EIR) und vaskulären IR-Expression (VIR) im Zusammenhang mit dem Phänotyp

Interessanterweise bestanden hochsignifikante Ergebnisse sowohl für die cEIR- und mEIR-Expression ($p < 0,001$), als auch für die EIR- und VIR-Expression ($p = 0,005$) zugleich ausschließlich für den Phänotypen nach Laurén (vgl. Abbildung 16). Dass die IR-Expression insbesondere beim intestinalen Magenkarzinom hochfrequent nachgewiesen wurde, könnte durch Beobachtungen von Tan et al. [137] erklärt werden. Diese formulierten im Jahr 2011 die These, dass beim intestinalen und diffusen Magenkarzinom neben morphologischen Diversitäten auch Unterschiede hinsichtlich der metabolischen Signatur bestünden. Demnach wiesen Tan et al. [137] nach, dass abhängig von dem Phänotyp des Magentumors bestimmte Gene der Proteinbiosynthese hochreguliert sind: Beim

intestinalen Typ betrifft dies die Gene des Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsels, zu denen auch der IR gehört. Beim diffusen Magenkarzinom hingegen werden einige Gene des Zellwachstums und des Fettsäurekatabolismus überexprimiert. Tans Hypothese der intrinsischen Subtypen konnte bestätigt werden durch die Entschlüsselung der proliferativen Gensignatur und Erkenntnissen zum Energiestoffwechsel des Magenkarzinoms. Nach Lei et al. [138] gibt es einen proliferativen Subtyp des Magenkarzinoms, dessen Eigenschaften mit Charakteristika der EIR-*high* Magenkarzinome wie niedrigeren Differenzierungsgraden und höheres Patientenalter übereinstimmen. Demzufolge könnten der differentiellen EIR-Expression im Magenkarzinom genetisch determinierte metabolische Subtypen zugrunde liegen.

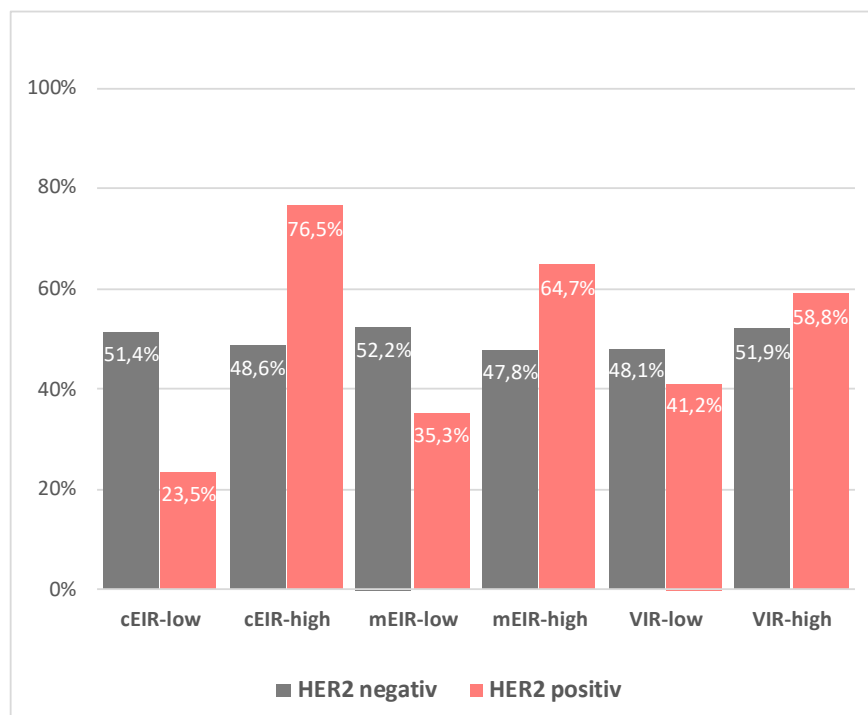
Darüber hinaus scheint die differentielle IR-Expression im Magenkarzinom mit den eingangs beschriebenen molekularen Subtypen des Magenkarzinoms (vgl. Tabelle 1) zusammenzuhängen. Insbesondere ist das CIN-Magenkarzinom anzuführen, welches häufig alterierte und heterogen exprimierte RTKs, u.a. MET und HER2, aufweist und mit einer intestinalen Differenzierung assoziiert ist [35]. In diesem Zusammenhang sind die Resultate der vorliegenden Arbeit von Heckl et al. [139] interessant. An demselben Kollektiv wurde die Expression des IR mit der von HER2 korreliert. Beide Rezeptoren gehören zur übergeordneten Familie der RTK. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression beider RTK miteinander korreliert: Magenkarzinome mit starker IR-Expression am Epithel (cEIR-*high* und mEIR-*high*) und Endothel (VIR-*high*) waren überwiegend HER2 positiv (in 76,5% der Fälle bei cEIR-*high*-, in 64,7% der Fälle bei mEIR-*high*- und in 58,8% der Fälle bei VIR-*high*-Karzinomen).

Tab. 8: Korrelation des HER2-Status (positiv oder negativ) mit dem IR-Status (-low/-high) im Magenkarzinomkollektiv. Daten nach Heckl et al. (2019).

	HER2 negativ		HER2 positiv		p-Wert
	n	%	n	%	
cEIR-low	200	(51,4)	8	(23,5)	0,002
cEIR-high	189	(48,6)	26	(76,5)	
mEIR-low	203	(52,2)	12	(35,3)	0,073
mEIR-high	186	(47,8)	22	(64,7)	

VIR-low	187	(48,1)	14	(41,2)	0,478
VIR-high	201	(51,9)	222	(58,8)	

Abb. 19: HER2-Status (negativ/positiv) und IR-Status (-low/-high) in den untersuchten Kategorien Tumorepithel (cEIR und mEIR) sowie Endothel (VIR). Es besteht eine signifikante Häufigkeitsassoziation zwischen der Expression der zur Familie der RTK gehörenden IR und HER2 im Magenkarzinom. Daten nach Heckl et al. (2019).



Da der IR innerhalb des Kollektivs heterogen exprimiert wurde und zu den RTK gehört, fügt sich die IR-Überexpression beim intestinalen Magenkarzinom schlüssig in dieses Bild ein. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die EIR-Expression beim intestinalen Phänotyp sehr gut zum Genotyp des CIN-Magenkarzinoms passt. Die fehlenden Korrelationen der IR-Expression im Magenkarzinom mit dem lokalen Tumorwachstum (T-Kategorie) und den Metastasierungseigenschaften (N-, M-Kategorie) begründen die Erkenntnis, dass die Expression des IR auf der Tumorzelle für diese Prozesse eine untergeordnete Bedeutung hat.

Vor dem Hintergrund dessen könnte die positive Korrelation der cEIR-Expression mit der Tumordignität durch die prognostisch günstigen Eigenschaften des intestinal differenzierten Magenkarzinoms verstanden werden. Der Zusammenhang zwischen mEIR-*high* beim intestinalen Karzinom und einem verkürzten Patientenüberleben steht jedoch dazu im Widerspruch, da intestinale Magenkarzinome *a priori* bessere Überlebenschancen aufweisen [37, 140]. Unserer Studie nach zeigten allerdings auch 44,4% der diffusen Tumoren mEIR-*high*, wobei die Assoziation des diffusen Magenkarzinoms mit einer schlechteren Prognose mit den vorliegenden Überlebensdaten übereinstimmt. An dieser Stelle ist hervorzuheben, dass die phänotypische Einteilung der Magenkarzinome ein subjektiv ermitteltes Kriterium darstellt, wobei keine absolute Kongruenz zwischen der Morphologie und dem Genotyp besteht [137]. Durch die *Inter-Observer*-Variabilität, Erfahrung des Pathologen und die klonale Vielfalt des Magenkarzinoms ergeben sich Diskrepanzen bzw. mögliche Stichprobenfehler bei der Einteilung nach Laurén. Zudem sollte festgehalten werden, dass in der Cox-Regression die mEIR-Expression nicht als prognostisch unabhängiger Faktor bestätigt werden konnte und somit ein unsicheres Kriterium für die Patientenprognose darstellt. Weiterhin stellen aktuelle Studien die gängige Assoziation einzelner Phänotypen mit Prognosevorteilen in Frage, so konnten Bringeland et al. [140] keine Differenz des Patientenoutcomes beim intestinalen, diffusen oder Siegelringzellkarzinom feststellen. Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit Anhaltspunkte dafür, dass die molekularen Subtypen des Magenkarzinoms zur Risikostratifizierung nützlich sein könnten, wobei tiefergehende Studien die Anwendung in der klinischen Praxis erst noch prüfen müssen.

Bei der vaskulären IR-Expression exprimierten diffuse Magenkarzinome im Vergleich zum intestinalen Typ seltener VIR-*high* (29,6% vs. 58,4%). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Satoh et al. [141], welcher in Perfusions-CT-Aufnahmen eine signifikant verminderte Durchblutung des diffusen Karzinoms nachwies. Zudem war der Blutfluss (ml/min/100g) in Abhängigkeit zur Stromadichte und beim fortgeschrittenen Magenkarzinom reduziert [141]. Diffuse Magenkarzinome weisen somit scheinbar eine andere Durchblutung als intestinal differenzierte Magenkarzinome auf, was sich in der VIR-Expression widerspiegeln könnte. Da aufgrund des verstreuten und tiefeninfiltrativen Wachsmusters die Einschätzung des Ausmaßes eines diffusen Magenkarzinoms oftmals Schwierigkeiten

bereitet [142], könnte nach Satoh et al. [141] ein präoperatives Perfusions-CT zur Klärung des Phänotyps herangezogen werden. Eine umfangreiche Metaanalyse zur Mikrogefäßdichte (MVD) bei über 4000 Magenkarzinomen zeigte jedoch, dass der diffuse Phänotyp im Vergleich zum intestinalen Magenkarzinom sogar eine erhöhte MVD aufwies [142]. Dies widerspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, zumal Satoh et al. [141] keine Korrelation zwischen der MVD und dem Blutfluss herstellen konnten. Eine Ursache für die inkongruenten Ergebnisse könnten die angewandten Untersuchungsmethoden, unterschiedliche mikroskopische Vergrößerungen, die Studienpopulationen und deren Umfang sowie unvollständige Patientendaten sein [142].

4.2.4 Bedeutung der endothelialen IR-Expression (VIR)

Primär zeigte die vorliegende Arbeit, dass die VIR-Expression ein Identifikationsmerkmal Tumor-assoziiierter Gefäße darstellte. Der IR wurde nahezu exklusiv in intratumoralen Endothelien exprimiert, mit zum Teil scharfer Begrenzung zum umliegenden nichtneoplastischen Gewebe (vgl. Abbildung 11). Das beinahe ubiquitäre Vorkommen des IR auf Tumor-assoziierten Endothelien (VIR) wurde durch unsere Arbeitsgruppe erstmals in derart beständiger Weise für das Magenkarzinom nachgewiesen.

Die Bedeutung der Expression des IR in Tumor-assoziierten Endothelien wird durch die zahlreichen signifikanten Korrelationen der VIR-Expression mit diversen klinisch-pathologischen Daten hervorgehoben (vgl. Tabelle 6). Im Gegensatz zur EIR-Expression zeigte sich die VIR-Expression nicht von genetisch determinierten Subtypen des Magenkarzinoms beeinflusst: Die Fähigkeit zur Angiogenese ist eine generelle Eigenschaft maligner Tumoren [143] und somit als unabhängig vom molekularen Subtyp zu verstehen. Die VIR-Expression korrelierte mit der Infiltrationstiefe des Magenkarzinoms (T-Kategorie), dem Nodalstatus (N-Kategorie), der Gefäßinvasion (V-Kategorie), dem Phänotyp (s.o.), dem UICC-Stadium und dem Überleben (vgl. Tabelle 6). Diese Ergebnisse lassen sich vor dem Hintergrund der pleiotropen pathophysiologischen Effekte des IR auf den Tumormetabolismus und die Neoangiogenese deuten.

Insulin ist ein pro-angiogenetisch wirksames Molekül, welches über den vaskulär exprimierten IR die Differenzierung, Maturation und Migration von Endothelzellen stimuliert [81, 144]. Für die Proliferation eines Tumors ist laut Folkman et al. [121] die Neoangiogenese unabdinglich. Dabei regt neben löslichen Faktoren wie der HIF und VEGF wahrscheinlich auch der IR die Bildung Tumor-assoziiierter Gefäße an [145]. Bei Expansion eines Karzinoms entsteht ein Sauerstoffmangel, den u.a. der GLUT1-Rezeptor anzeigt: Im Harnblasenkarzinom führte eine Gewebshypoxie zur vermehrten Expression von GLUT1 und auch dem IR [85]. Dieses Phänomen könnte auf das Magenkarzinom übertragbar sein, da Magentumoren ebenfalls eine gesteigerte GLUT1-Transporter-Expression an der Oberfläche zur Erhöhung des Kohlenhydrat-Influx in das Zytoplasma aufweisen [110, 146]. Zudem unterliegen expandierende Magenkarzinome einer Stoffwechselsteigerung: Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Untersuchungen zeigten eine verstärkte intrazelluläre Glukoseaufnahme [147, 148] und Genanalysen wiesen die Überexpression sämtlicher Enzyme der Glykolyse in Magentumoren nach [149]. In der Zusammenschau ergibt sich, dass der IR vermutlich durch Hypoxie und lösliche Faktoren wie z.B. den GLUT1 getriggert wird und an Tumor-assoziierten Endothelien des Magenkarzinoms möglicherweise als Proliferationsfaktor wirkt. Dabei ist der IR ein Surrogatmarker für das lokale Wachstum und beeinflusst den Metabolismus des Magenkarzinoms. Unter Annahme dieser Hypothese erklärt sich die graduell mit dem lokalen Wachstum (T-Kategorie) steigende vaskuläre IR-Expression (vgl. Abbildung 12). Zudem steht damit auch die Metastasierungstendenz der *VIR-high* Magenkarzinome im Zusammenhang. In der vorliegenden Untersuchung präsentierten sich die *VIR-high* Magenkarzinome vorwiegend als fortgeschrittene Tumoren (pT3: 55,1%, pT4: 55,8%) mit zum Teil ausgedehntem Lymphknotenbefall (pN1: 56,5%, pN2: 52,9%, pN3: 55,1%). Das *VIR-high* beim fortgeschrittenen Magenkarzinom vermehrt nachweisbar war, liegt zum einen an der quantitativ erhöhten Tumormasse, welche zur Nutrition und Proliferation *per se* eine hohe Gefäßdichte benötigt. Die bei *Hämangiosis carcinomatosa* und Lymphknoteninfiltration sprunghaft erhöhte VIR-Expression (vgl. Abbildung 14) kann ebenso durch die späten Tumorstadien erklärt werden, da eine (lokale) Metastasierung nach Hanahan et al. [108] die Fähigkeit eines fortgeschrittenen Karzinoms darstellt. Zum anderen kann geschlussfolgert werden, dass der IR an Tumor-assoziierten Endothelien die Permeabilität beeinflusst und vermutlich die Invasivität des Magenkarzinoms begünstigt. Dieser

Hypothese liegt die bereits bekannte Dysfunktion Tumor-assoziiierter Gefäße durch aberrante luminale und longitudinale Formation zugrunde [150]. Eine erhöhte Permeabilität geht mit erniedrigter Resistenz der Gefäßwand einher und begünstigt die luminale Intravasation sowie die Extravasation von Tumorzellen [124]. Wie Deryugina et al. [124] rekapitulierten, gelingt den Tumorzellen die aktive Penetration der Gefäßwand an Insuffizienzen, wobei dass irregulär vergrößerte Lumen die Aggregation und Dissemination von Metastasen ermöglicht. Im Sinne des Patienten ist der positive Nodalstatus als zentrales Geschehen seiner Erkrankungshistorie zu werten, da anhand dessen der Fortschritt des Tumors reflektiert und beim fortgeschrittenen Magenkarzinom die Prognose maßgeblich beeinflusst wird [151]. Mit steigender Zahl lokoregionärer Metastasen nimmt die Überlebenszeit beim Magenkarzinom sukzessive ab [152]. Dies stimmt überein mit der gehäuften Lymphknotenmetastasierung (N-Kategorie) und der drastisch verkürzten Überlebenszeit im Magenkarzinomkollektiv bei *VIR-high* Tumoren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die (tumor-)biologische Bedeutung des IR im Magenkarzinom von dessen differentieller Expression auf Tumorzellen und Endothelien abhängig zu sein scheint. Da sich insbesondere ein Zusammenhang zwischen dem lokalen Tumorwachstum (T-Kategorie) und der *VIR*-Expression ergab, kann geschlussfolgert werden, dass der IR in die Neoangiogenese des Magenkarzinoms involviert ist. Damit wirkt sich die *VIR*-Expression auf das Wachstum und die Metastasierungstendenz des Magenkarzinoms aus. Es bleibt jedoch offen, ob die *VIR*-Expression auch für die Fernmetastasierung (M-Kategorie) relevant ist. An dieser Stelle begünstigt die Zusammensetzung der Patientenkohorte einen Stichprobenfehler: 80,1% der Fälle sind nicht fernmetastasiert (M0), wohingegen 19,9% der Karzinome Fernmetastasen (M1) zeigen. Daher sollten nachfolgende Studien hierzu ein noch umfangreicheres Kollektiv analysieren. *VIR-high* stellt ein Charakteristikum vor allem fortgeschrittener Magenkarzinome dar, geht mit einer signifikant schlechteren Prognose einher und wurde statistisch als unabhängiger Prädiktor für das Patientenüberleben bestätigt (vgl. Tabelle 7). Nach unseren Erkenntnissen könnten daher vor allem Patienten jener putativen Hochrisikogruppe von einer gegen den IR gerichteten molekularen Therapie profitieren.

Zudem sollten zukünftige Studien prüfen, ob sich der VIR-Status als prognostischer Biomarker eignet und im Zuge einer innovativen Bildgebung zur Ermittlung der wahren Ausdehnung eines Magenkarzinoms genutzt werden kann.

4.2.5 Die Expression des Insulinrezeptors bei malignen Tumoren

Die bisherige Datenlage zum Einfluss des IR auf die allgemeine Tumorbilogie unterstützt die Ergebnisse vorliegender Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass Magenkarzinome mit IR-Überexpression auf Endothelien und Tumorzellmembranen einen protrusen Krankheitsverlauf mit vorzeitigem Patientenversterben aufwiesen. Roudnicky et al. [85] bemerkten ebenfalls einen fortschreitenden Progress sowie die Verkürzung des Fortschrittsfreien- und Gesamtüberleben bei *VIR-high* Harnblasenkarzinomen. Dabei erlauben die homologen experimentellen Bedingungen dieser und der unsrigen Arbeit eine Gewichtung der übereinstimmenden Ergebnisse. Heidegger et al. [84] bestätigten die protumoralen Eigenschaften von EIR *in vitro* und *in vivo*: Der IR auf Tumorzellen des Prostatakarzinoms erhöhte das Zellwachstum, die Proliferation, Migration, Invasion und Resistenz gegenüber Apoptosemechanismen. In Analogie dazu ist die EIR-Expression zudem mit schlechteren Überlebensraten beim invasiven Lungenkarzinom assoziiert [153].

Jedoch existieren auch gegensätzliche Ergebnisse zu denen der vorliegenden Studie. Beim Mammakarzinom wurde die EIR-Expression je nach Studienlage mit verbessertem [154] bzw. verschlechtertem [155] Patientenüberleben in Verbindung gebracht. Interessanterweise bestand beim Kolonkarzinom ein zum Magenkarzinom inverser Zusammenhang zwischen der EIR-Expression, dem Tumorprogress und dem Patientenüberleben: Bei Dickdarmtumoren wies EIR-*high* auf differenzierte Tumoren hin, wohingegen sich EIR-*low* als prognostisch ungünstig auf die Überlebenszeit auswirkte. Jedoch konnten Heckl et al. die Resultate der vorliegenden Arbeit dahingehend bestätigen, als dass im Kolonkarzinom die VIR-Expression das lokale Tumorwachstum stimulierte [79]. Fasst man diese Daten zusammen, so muss offenbar für jede einzelne Tumorentität und den jeweiligen Tumorsubtyp individuell die Bedeutung der EIR-Expression überprüft werden. Demnach sind Verallgemeinerungen des Effekts der EIR-Expression in Karzinomen nur sehr begrenzt möglich. Für die VIR-Expression fügen sich die vorliegenden Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext ein, sodass die signifikanten Zusammenhänge mit

klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen die pro-tumorale Wirkung des vaskulär exprimierten IR beim Magenkarzinom unterstreichen.

Die Untersuchung weiterer signifikanter Ergebnisse wie cEIR mit dem Patientenalter, cEIR und VIR mit der Lokalisation des Magenkarzinoms und VIR mit dem Geschlecht wäre in zukünftigen Studien anzustreben. Soziodemographische Daten bezüglich der IR-Expression im Magenkarzinom könnten zur Aufklärung des Zusammenhangs zwischen chronischen Stoffwechselerkrankungen, allen voran Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2), und der Entstehung des Magenkarzinoms, beitragen [61]. Das Lebenszeitrisiko einer an DMT2 erkrankten Person für ein Karzinom des Magens ist um etwa 20% erhöht [156]. Da ca. 12% bis 14% der Erwachsenen der westlichen Welt von dieser Stoffwechselerkrankung betroffen sind, weist dementsprechend ein umfangreicher Anteil der Bevölkerung möglicherweise ein erhöhtes Magenkarzinomrisiko auf [157]. Zudem stimulieren hyperinsulinämische Konditionen über den IR nachweislich das Tumorwachstum [158].

Als bislang einziges Antidiabetikum zeigte Metformin antitumorale Effekte, vornehmlich durch die Erniedrigung der Insulinkonzentration und Unterdrückung IR-vermittelter Signalkaskaden [61, 156]. In der präklinischen Testung war die Anwendung von Metformin zugleich präventiv und therapeutisch wirksam: Bei Patienten mit manifestem Diabetes mellitus konnte ein reduziertes Risiko für einen Magentumor [159, 160] und ein verlängertes Überleben mit geringeren Rezidivraten [161] erzielt werden.

Wie in der vorliegenden Studie herausgearbeitet wurde, könnten Magenkarzinompatienten von einer gezielt gegen den IR gerichteten Therapie profitieren. Zudem legen vorläufige Erkenntnisse die Vermutung nahe, dass es bei Patienten mit (prä-)diabetischer Stoffwechsellage sogar einen tumorpräventiven Therapieeffekt mit Metformin geben könnte.

5. Zusammenfassung

Eine Umstrukturierung des Stoffwechsels („*metabolic switch*“) beim Magenkarzinom umfasst neben einem veränderten Glukosemetabolismus (u.a. Warburg-Stoffwechsel) auch die Expression des Insulinrezeptors (IR) auf Tumorzellen und Endothelien. Die vorliegende Arbeit diene der Überprüfung folgender Hypothesen: (1) Tumorzellepithelien und Endothelien des Magenkarzinoms exprimieren den IR, (2) die Expression des IR ist, typisch für Tyrosinkinaserzeptoren, intratumoral heterogen und (3) von tumorbiologischer sowie (4) prognostischer Relevanz.

Zur Überprüfung dieser Arbeitshypothesen wurden 467 primäre Magenkarzinome auf Großflächenschnitten immunhistochemisch mit einem gegen den IR-gerichteten Antikörper gefärbt. Zudem wurde mittels des Gefäßmarkers CD31 sichergestellt, dass sämtliche Präparate Endothelien enthielten. Die immunhistochemische Reaktion wurde mittels eines **dreistufigen Histo-Scores** (HScore) von 0 = negativ, „1+“ = schwach und „2+“ = stark positiv bewertet und der HScore gleichermaßen für das **Zytoplasma (cEIR)** und die **Membranen (mEIR)** der **Tumorzellen (Gesamt: EIR)** sowie die **Endothelien (VIR)** angewandt. Danach wurde der jeweilige **prozentuale Anteil (P)** der drei Intensitätsstufen am Gesamtpräparat bestimmt. Abschließend wurde der HScore kalkuliert: **HScore = (0 x Prozentsatz negativer Tumorzellen) + (1 x Prozentsatz schwach gefärbter Tumorzellen) + (2 x Prozentsatz stark positiver Tumorzellen)**. Er erstreckte sich von Werten zwischen 0 bis maximal 200. Die Ergebnisse der betrachteten Kategorien cEIR, mEIR und VIR wurden jeweils am Median in eine IR-*high* und -*low* Gruppe dichotomiert und mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika korreliert.

Die Auswertung des 467 Tumoren umfassenden Kollektivs ergab, dass cEIR, mEIR und VIR häufig im Magenkarzinom exprimiert wurden (in 95,7%, 87,6% und 97,0% der Fälle). Dabei korrelierte ein simultanes Auftreten von EIR-*high* und VIR-*high* signifikant miteinander. Hinsichtlich des Phänotyps der Karzinome zeigte sich, dass eine IR-Expression auf Tumorzellen und Endothelien mit dem intestinalen Typ nach Laurén assoziiert war. Die cEIR-Expression korrelierte weiterhin mit dem Patientenalter, der Tumorlokalisation, der Lymphknoten-Ratio und dem Differenzierungsgrad. Einige jener Tumorcharakteristika stimmen mit Eigenschaften des intrinsischen proliferativen Subtyps des Magenkarzinoms überein, welcher mit dem intestinalen Phänotyp assoziiert ist. Da das intestinale

Magenkarzinom mit dem Genotyp des chromosomal instabilen Magenkarzinoms korreliert, bestehen insgesamt starke Hinweise darauf, dass die differentielle EIR-Expression im Magenkarzinom von dessen genetischem Subtyp abhängt. Hinsichtlich der mEIR-Expression bestanden keine weiteren signifikanten Ergebnisse mit den klinisch-pathologischen Patientencharakteristika. Eine Korrelation zum Patientenüberleben verlor in der multivariaten Analyse seine Signifikanz. Die VIR-Expression im Magenkarzinom hingegen war vom genetischen Subtyp der Tumoren unabhängig und korrelierte mit zahlreichen klinisch-pathologischen Eigenschaften wie Geschlecht, Tumortyp nach Laurén, Tumorlokalisation, T-, N-, V-Kategorie, dem UICC-Stadium und dem Überleben. Wie die multivariate Analyse bestätigte, ist die VIR-Expression ein unabhängiger prognostischer Prädiktor des Patientenüberlebens. Dabei liegt die infauste Prognose von *VIR-high* Magenkarzinomen vermutlich in den pleiotropen Effekten des IR begründet, welcher durch pro-angiogenetische und pro-mitotische Signale den Tumorprogress sowie die Lokalinvasion fördert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der IR beinahe ubiquitär und dabei gleichermaßen auf Tumorzellen wie Tumor-assoziierten Endothelien im Magenkarzinom exprimiert wurde. Hinausgehend über die traditionelle Assoziation mit der glykämischen Homöostase erscheint der IR möglicherweise zentraler in die Biologie des Magenkarzinoms eingebunden zu sein als angenommen. Bisherige Bemühungen zur IR-Inhibition belegen die antitumorale Wirkung von Antidiabetika wie Metformin. Limitierend für den Einsatz von Hemmstoffen gegen den IR ist die bislang nur unspezifische Wirkweise an beiden Isoformen des IR. Vor dem Hintergrund des Zusammenhangs zwischen chronischen Stoffwechselerkrankungen und der Tumorgenese des Magenkarzinoms könnte sich die Indikation spezifischer IR-Inhibitoren neben Tumorpatienten auch auf nicht-onkologische Patienten mit Diabetes mellitus im Sinne einer Tumorprävention ausdehnen.

6. Literaturverzeichnis

1. Hamilton, J.P. and S.J. Meltzer, *A review of the genomics of gastric cancer*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006. **4**(4): p. 416-25.
2. Rocken, C., *[Gastric tumors and tumor precursors]*. Pathologe, 2017. **38**(2): p. 75-86.
3. Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. 11. Ausgabe. Berlin, 2017.
4. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), *S3-Leitlinie Magenkarzinom, Langversion 2.01 (Konsultationsfassung), 2019 AWMF Registernummer: 032/009OL*, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/magenkarzinom/> abgerufen am 22.12.19. 2019.
5. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS Med, 2006. **3**(11): p. e442.
6. Boger, C., H.M. Behrens, and C. Rocken, *Ki67--An unsuitable marker of gastric cancer prognosis unmasks intratumoral heterogeneity*. J Surg Oncol, 2016. **113**(1): p. 46-54.
7. Logan, R.P. and M.M. Walker, *ABC of the upper gastrointestinal tract: Epidemiology and diagnosis of Helicobacter pylori infection*. BMJ, 2001. **323**(7318): p. 920-2.
8. Hocker, M. and P. Hohenberger, *Helicobacter pylori virulence factors--one part of a big picture*. Lancet, 2003. **362**(9391): p. 1231-3.
9. *Infection with Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1994. **61**: p. 177-240.
10. Sipponen, P. and H. Hyvarinen, *Role of Helicobacter pylori in the pathogenesis of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1993. **196**: p. 36.
11. Correa, P., et al., *Helicobacter pylori and gastric carcinoma. Serum antibody prevalence in populations with contrasting cancer risks*. Cancer, 1990. **66**(12): p. 2569-74.
12. Minalyan, A., et al., *Autoimmune atrophic gastritis: current perspectives*. Clin Exp Gastroenterol, 2017. **10**: p. 19-27.
13. Parkin, D.M., *International variation*. Oncogene, 2004. **23**(38): p. 6329-40.
14. Sato T, F.T., Suzuki T, Takayangi J, Murakami T, Shiotsuki N, Tanaka R, Tsuji R., *Studies of causation of gastric cancer 2. The relation between gastric cancer mortality rate and salted food intake in several places in Japan*. Bull Inst Public Health., 1959(8): p. 187-198.
15. La Vecchia, C., et al., *Electric refrigerator use and gastric cancer risk*. Br J Cancer, 1990. **62**(1): p. 136-7.

16. Lee, S.A., et al., *Effect of diet and Helicobacter pylori infection to the risk of early gastric cancer*. J Epidemiol, 2003. **13**(3): p. 162-8.
17. Kim, J., et al., *Gene-diet interactions in gastric cancer risk: a systematic review*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(28): p. 9600-10.
18. Nishino, Y., et al., *Tobacco smoking and gastric cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population*. Jpn J Clin Oncol, 2006. **36**(12): p. 800-7.
19. Peleteiro, B., et al., *Worldwide Burden of Gastric Cancer Attributable to Tobacco Smoking in 2012 and Predictions for 2020*. Dig Dis Sci, 2015. **60**(8): p. 2470-6.
20. Smyth, E.C., et al., *Tobacco use is associated with increased recurrence and death from gastric cancer*. Ann Surg Oncol, 2012. **19**(7): p. 2088-94.
21. Duell, E.J., et al., *Genetic variation in alcohol dehydrogenase (ADH1A, ADH1B, ADH1C, ADH7) and aldehyde dehydrogenase (ALDH2), alcohol consumption and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort*. Carcinogenesis, 2012. **33**(2): p. 361-7.
22. Boccia, S., et al., *Sulfotransferase 1A1 polymorphism and gastric cancer risk: a pilot case-control study*. Cancer Lett, 2005. **229**(2): p. 235-43.
23. Aleman, J.O., et al., *Mechanisms of obesity-induced gastrointestinal neoplasia*. Gastroenterology, 2014. **146**(2): p. 357-373.
24. Hoyo, C., et al., *Body mass index in relation to oesophageal and oesophagogastric junction adenocarcinomas: a pooled analysis from the International BEACON Consortium*. Int J Epidemiol, 2012. **41**(6): p. 1706-18.
25. Rubenstein, J.H. and J.B. Taylor, *Meta-analysis: the association of oesophageal adenocarcinoma with symptoms of gastro-oesophageal reflux*. Aliment Pharmacol Ther, 2010. **32**(10): p. 1222-7.
26. Whiteman, D.C., et al., *Combined effects of obesity, acid reflux and smoking on the risk of adenocarcinomas of the oesophagus*. Gut, 2008. **57**(2): p. 173-80.
27. Derakhshan, M.H., et al., *Combination of gastric atrophy, reflux symptoms and histological subtype indicates two distinct aetiologies of gastric cardia cancer*. Gut, 2008. **57**(3): p. 298-305.
28. Figueroa, J.D., et al., *Cigarette smoking, body mass index, gastro-esophageal reflux disease, and non-steroidal anti-inflammatory drug use and risk of subtypes of esophageal and gastric cancers by P53 overexpression*. Cancer Causes Control, 2009. **20**(3): p. 361-8.
29. Correa, P., *A human model of gastric carcinogenesis*. Cancer Res, 1988. **48**(13): p. 3554-60.
30. Villanacci, V., et al., *Autoimmune gastritis: relationships with anemia and Helicobacter pylori status*. Scand J Gastroenterol, 2017. **52**(6-7): p. 674-677.
31. Rodriguez-Castro, K.I., et al., *Autoimmune diseases in autoimmune atrophic gastritis*. Acta Biomed, 2018. **89**(8-s): p. 100-103.
32. Langner, C., *[Precursors of gastric cancer : Dysplasia and adenoma]*. Pathologe, 2017. **38**(2): p. 67-74.
33. Robert-Koch-Institut, B.H., *Gastritis, Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre. Gesundheitsberichterung des Bundes. Heft 55*. 2013.

34. Li, J., et al., *Point Mutations in Exon 1B of APC Reveal Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomach as a Familial Adenomatous Polyposis Variant*. Am J Hum Genet, 2016. **98**(5): p. 830-842.
35. Rocken, C., *Molecular classification of gastric cancer*. Expert Rev Mol Diagn, 2017. **17**(3): p. 293-301.
36. Jarvi, O. and P. Lauren, *On the pathogenesis of gastric cancer*. Acta Unio Int Contra Cancrum, 1952. **8**(2): p. 393-4.
37. Nagini, S., *Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention*. World J Gastrointest Oncol, 2012. **4**(7): p. 156-69.
38. Hashimoto, T., et al., *Familial adenomatous polyposis-associated and sporadic pyloric gland adenomas of the upper gastrointestinal tract share common genetic features*. Histopathology, 2015. **67**(5): p. 689-98.
39. Razzak, M., *Genetics: New molecular classification of gastric adenocarcinoma proposed by The Cancer Genome Atlas*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014. **11**(10): p. 577.
40. Sunakawa, Y. and H.J. Lenz, *Molecular classification of gastric adenocarcinoma: translating new insights from the cancer genome atlas research network*. Curr Treat Options Oncol, 2015. **16**(4): p. 17.
41. Boger, C., et al., *PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients*. Oncotarget, 2016. **7**(17): p. 24269-83.
42. Mathiak, M., et al., *Clinicopathologic Characteristics of Microsatellite Instable Gastric Carcinomas Revisited: Urgent Need for Standardization*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2017. **25**(1): p. 12-24.
43. Inoue, M. and S. Tsugane, *Epidemiology of gastric cancer in Japan*. Postgrad Med J, 2005. **81**(957): p. 419-24.
44. Capelle, L.G., et al., *The staging of gastritis with the OLGA system by using intestinal metaplasia as an accurate alternative for atrophic gastritis*. Gastrointest Endosc, 2010. **71**(7): p. 1150-8.
45. In, H., et al., *Validation of the 8th Edition of the AJCC TNM Staging System for Gastric Cancer using the National Cancer Database*. Ann Surg Oncol, 2017. **24**(12): p. 36833691.
46. Jain, V.K., D. Cunningham, and S. Rao, *Chemotherapy for operable gastric cancer: current perspectives*. Indian J Surg Oncol, 2011. **2**(4): p. 334-42.
47. Coburn, N., et al., *Staging and surgical approaches in gastric cancer: A systematic review*. Cancer Treat Rev, 2018. **63**: p. 104-115.
48. Cunningham, D., et al., *Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer*. N Engl J Med, 2006. **355**(1): p. 11-20.
49. Ychou, M., et al., *Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial*. J Clin Oncol, 2011. **29**(13): p. 1715-21.
50. Al-Batran, S.E., et al., *Biweekly fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel (FLOT) for patients with metastatic adenocarcinoma of the stomach or*

- esophagogastric junction: a phase II trial of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie*. Ann Oncol, 2008. **19**(11): p. 1882-7.
51. Langer, R. and K. Becker, *Tumor regression grading of gastrointestinal cancers after neoadjuvant therapy*. Virchows Arch, 2018. **472**(2): p. 175-186.
 52. Al-Batran, S.E., et al., *The feasibility of triple-drug chemotherapy combination in older adult patients with oesophagogastric cancer: a randomised trial of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (FLOT65+)*. Eur J Cancer, 2013. **49**(4): p. 835-42.
 53. Bang, Y.J., et al., *Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastrooesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial*. Lancet, 2010. **376**(9742): p. 687-97.
 54. Nienhuser, H. and T. Schmidt, *Angiogenesis and Anti-Angiogenic Therapy in Gastric Cancer*. Int J Mol Sci, 2017. **19**(1).
 55. Cunningham, D., et al., *Peri-operative chemotherapy with or without bevacizumab in operable oesophagogastric adenocarcinoma (UK Medical Research Council ST03): primary analysis results of a multicentre, open-label, randomised phase 2-3 trial*. Lancet Oncol, 2017. **18**(3): p. 357-370.
 56. Fuchs, C.S., et al., *Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2014. **383**(9911): p. 31-39.
 57. Ebos, J.M., et al., *Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis*. Cancer Cell, 2009. **15**(3): p. 232-9.
 58. Paez-Ribes, M., et al., *Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis*. Cancer Cell, 2009. **15**(3): p. 22031.
 59. Steiner, D.F. and P.E. Oyer, *The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. **57**(2): p. 47380.
 60. Fu, Z., E.R. Gilbert, and D. Liu, *Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes*. Curr Diabetes Rev, 2013. **9**(1): p. 25-53.
 61. Malaguarnera, R. and A. Belfiore, *The insulin receptor: a new target for cancer therapy*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 93.
 62. De Meyts, P., *The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors?* Trends Biochem Sci, 2008. **33**(8): p. 376-84.
 63. Belfiore, A., et al., *Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View*. Endocr Rev, 2017. **38**(5): p. 379-431.
 64. de-Freitas-Junior, J.C., et al., *Insulin/IGF-I signaling pathways enhances tumor cell invasion through bisecting GlcNAc N-glycans modulation. an interplay with Ecadherin*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e81579.
 65. Simpson, A., et al., *Insulin-Like Growth Factor (IGF) Pathway Targeting in Cancer: Role of the IGF Axis and Opportunities for Future Combination Studies*. Target Oncol, 2017.

66. Benyoucef, S., et al., *Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation*. Biochem J, 2007. **403**(3): p. 60313.
67. Pandini, G., et al., *Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39684-95.
68. Frasca, F., et al., *Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulinlike growth factor II receptor in fetal and cancer cells*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3278-88.
69. Seino, S. and G.I. Bell, *Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **159**(1): p. 312-6.
70. Quon, M.J., A.J. Butte, and S.I. Taylor, *Insulin signal transduction pathways*. Trends Endocrinol Metab, 1994. **5**(9): p. 369-76.
71. Manrique, C., G. Lastra, and J.R. Sowers, *New insights into insulin action and resistance in the vasculature*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1311**: p. 138-50.
72. Yi, H.K., et al., *Impact of PTEN on the expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in human gastric adenocarcinoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **330**(3): p. 760-7.
73. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
74. Rodriguez-Viciana, P., et al., *Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras*. Nature, 1994. **370**(6490): p. 527-32.
75. Forest, A., et al., *Intrinsic Resistance to Cixutumumab Is Conferred by Distinct Isoforms of the Insulin Receptor*. Mol Cancer Res, 2015. **13**(12): p. 1615-26.
76. Jiang, L., et al., *Increased IR-A/IR-B ratio in non-small cell lung cancers associates with lower epithelial-mesenchymal transition signature and longer survival in squamous cell lung carcinoma*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 131.
77. Avnet, S., et al., *Insulin receptor isoform A and insulin-like growth factor II as additional treatment targets in human osteosarcoma*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2443-52.
78. Perks, C.M., et al., *Insulin Receptor Isoform Variations in Prostate Cancer Cells*. Front Endocrinol (Lausanne), 2016. **7**: p. 132.
79. Heckl, S.M., et al., *Epithelial insulin receptor expression-prognostic relevance in colorectal cancer*. Oncotarget, 2018. **9**(101): p. 37497-37508.
80. Ji, Q.S., et al., *A novel, potent, and selective insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor blocks insulin-like growth factor-I receptor signaling in vitro and inhibits insulin-like growth factor-I receptor dependent tumor growth in vivo*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(8): p. 2158-67.
81. Escudero, C.A., et al., *Pro-angiogenic Role of Insulin: From Physiology to Pathology*. Front Physiol, 2017. **8**: p. 204.
82. Dubo, S., et al., *Cardiovascular Action of Insulin in Health and Disease: Endothelial LArginine Transport and Cardiac Voltage-Dependent Potassium Channels*. Front Physiol, 2016. **7**: p. 74.

83. Sobrevia, L., et al., *Insulin Is a Key Modulator of Fetoplacental Endothelium Metabolic Disturbances in Gestational Diabetes Mellitus*. Front Physiol, 2016. **7**: p. 119.
84. Heidegger, I., et al., *Oncogenic functions of IGF1R and INSR in prostate cancer include enhanced tumor growth, cell migration and angiogenesis*. Oncotarget, 2014. **5**(9): p. 2723-35.
85. Roudnicky, F., et al., *High expression of insulin receptor on tumour-associated blood vessels in invasive bladder cancer predicts poor overall and progression-free survival*. J Pathol, 2017. **242**(2): p. 193-205.
86. Pandini, G., et al., *Functional responses and in vivo anti-tumour activity of h7C10: a humanised monoclonal antibody with neutralising activity against the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor and insulin/IGF-1 hybrid receptors*. Eur J Cancer, 2007. **43**(8): p. 1318-27.
87. Sachdev, D., et al., *Down-regulation of insulin receptor by antibodies against the type I insulin-like growth factor receptor: implications for anti-insulin-like growth factor therapy in breast cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 2391-402.
88. Dong, J., et al., *Combination of two insulin-like growth factor-I receptor inhibitory antibodies targeting distinct epitopes leads to an enhanced antitumor response*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(9): p. 2593-604.
89. Gao, J., et al., *Dual IGF-I/II-neutralizing antibody MEDI-573 potently inhibits IGF signaling and tumor growth*. Cancer Res, 2011. **71**(3): p. 1029-40.
90. Christensen, J.G., *A preclinical review of sunitinib, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor with anti-angiogenic and antitumour activities*. Ann Oncol, 2007. **18 Suppl 10**: p. x3-10.
91. Xu, M.J., D.E. Johnson, and J.R. Grandis, *EGFR-targeted therapies in the post-genomic era*. Cancer Metastasis Rev, 2017. **36**(3): p. 463-473.
92. Wiedmann, M.W. and K. Caca, *Molecularly targeted therapy for gastrointestinal cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2005. **5**(3): p. 171-93.
93. Buck, E. and M. Mulvihill, *Small molecule inhibitors of the IGF-1R/IR axis for the treatment of cancer*. Expert Opin Investig Drugs, 2011. **20**(5): p. 605-21.
94. Frago, S., et al., *Functional evolution of IGF2:IGF2R domain 11 binding generates novel structural interactions and a specific IGF2 antagonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(20): p. E2766-75.
95. van Adrichem, R.C., et al., *Effects of Somatostatin Analogs and Dopamine Agonists on Insulin-Like Growth Factor 2-Induced Insulin Receptor Isoform A Activation by Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumor Cells*. Neuroendocrinology, 2016. **103**(6): p. 815-25.
96. Shan, F., et al., *Controlling angiogenesis in gastric cancer: A systematic review of antiangiogenic trials*. Cancer Lett, 2016. **380**(2): p. 598-607.
97. Gualberto, A. and M. Pollak, *Clinical development of inhibitors of the insulin-like growth factor receptor in oncology*. Curr Drug Targets, 2009. **10**(10): p. 923-36.
98. Zhang, Z., et al., *Functional genetic approach identifies MET, HER3, IGF1R, INSR pathways as determinants of lapatinib unresponsiveness in HER2-positive gastric cancer*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(17): p. 4559-73.

99. Chandarlapaty, S., et al., *Frequent mutational activation of the PI3K-AKT pathway in trastuzumab-resistant breast cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(24): p. 6784-91.
100. Pollak, M., *Targeting insulin and insulin-like growth factor signalling in oncology*. Curr Opin Pharmacol, 2008. **8**(4): p. 384-92.
101. Garofalo, C., et al., *Efficacy of and resistance to anti-IGF-1R therapies in Ewing's sarcoma is dependent on insulin receptor signaling*. Oncogene, 2011. **30**(24): p. 273040.
102. Zhang, H., et al., *Down-regulation of type I insulin-like growth factor receptor increases sensitivity of breast cancer cells to insulin*. Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 3917.
103. Zhang, Z., et al., *Functional Genetic Approach Identifies MET, HER3, IGF1R, INSR Pathways as Determinants of Lapatinib Unresponsiveness in HER2-Positive Gastric Cancer*. Clinical Cancer Research, 2014. **20**(17): p. 4559-4573.
104. Bid, H.K., et al., *Potent inhibition of angiogenesis by the IGF-1 receptor-targeting antibody SCH717454 is reversed by IGF-2*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(3): p. 649-59.
105. Sciacca, L., et al., *Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism*. Oncogene, 1999. **18**(15): p. 2471-9.
106. Ulanet, D.B., et al., *Insulin receptor functionally enhances multistage tumor progression and conveys intrinsic resistance to IGF-1R targeted therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(24): p. 10791-8.
107. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
108. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
109. Zhang, W., et al., *Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target?* Int J Biol Sci, 2015. **11**(12): p. 1390-400.
110. DeBerardinis, R.J., et al., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 11-20.
111. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
112. Warburg, O., *On respiratory impairment in cancer cells*. Science, 1956. **124**(3215): p. 269-70.
113. Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein, *The Metabolism of Tumors in the Body*. J Gen Physiol, 1927. **8**(6): p. 519-30.
114. Kennedy, K.M. and M.W. Dewhirst, *Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation*. Future Oncol, 2010. **6**(1): p. 127-48.
115. Feron, O., *Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells*. Radiother Oncol, 2009. **92**(3): p. 329-33.
116. Doherty, J.R. and J.L. Cleveland, *Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics*. J Clin Invest, 2013. **123**(9): p. 3685-92.
117. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
118. Potter, V.R., *The biochemical approach to the cancer problem*. Fed Proc, 1958. **17**(2): p. 691-7.

119. Bielenberg, D.R. and B.R. Zetter, *The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis*. Cancer J, 2015. **21**(4): p. 267-73.
120. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
121. Folkman, J., *Angiogenesis*. Annu Rev Med, 2006. **57**: p. 1-18.
122. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(6): p. 789-91.
123. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52-67.
124. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature*. Matrix Biol, 2015. **44-46**: p. 94-112.
125. Watnick, R.S., et al., *Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis*. Cancer Cell, 2003. **3**(3): p. 219-31.
126. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5649-69.
127. Valastyan, S. and R.A. Weinberg, *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms*. Cell, 2011. **147**(2): p. 275-92.
128. Escribano, O., et al., *The Role of Insulin Receptor Isoforms in Diabetes and Its Metabolic and Vascular Complications*. J Diabetes Res, 2017. **2017**: p. 1403206.
129. Lauren, P., *The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and SoCalled Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1965. **64**: p. 31-49.
130. Li, Y., et al., *CD31(+) cell transplantation promotes recovery from peripheral neuropathy*. Mol Cell Neurosci, 2014. **62**: p. 60-7.
131. Metzger, M.L., et al., *MET in gastric cancer--discarding a 10% cutoff rule*. Histopathology, 2016. **68**(2): p. 241-53.
132. Warneke, V.S., et al., *Her2/neu testing in gastric cancer: evaluating the risk of sampling errors*. Ann Oncol, 2013. **24**(3): p. 725-33.
133. Gullo, I., et al., *Heterogeneity in Gastric Cancer: From Pure Morphology to Molecular Classifications*. Pathobiology, 2017.
134. Alsina, M., I. Gullo, and F. Carneiro, *Intratumoral heterogeneity in gastric cancer: a new challenge to face*. Ann Oncol, 2017. **28**(5): p. 912-913.
135. Boger, C., et al., *Epstein-Barr virus-associated gastric cancer reveals intratumoral heterogeneity of PIK3CA mutations*. Ann Oncol, 2017. **28**(5): p. 1005-1014.
136. Morcavallo, A., et al., *Ligand-mediated endocytosis and trafficking of the insulin-like growth factor receptor I and insulin receptor modulate receptor function*. Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 220.
137. Tan, I.B., et al., *Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy*. Gastroenterology, 2011. **141**(2): p. 476-85, 485 e1-11.
138. Lei, Z., et al., *Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil*. Gastroenterology, 2013. **145**(3): p. 554-65.

139. Heckl, S.M., et al., *The expression of the insulin receptor in gastric cancer correlates with the HER2 status and may have putative therapeutic implications*. Gastric Cancer, 2019. **22**(6): p. 1130-1142.
140. Bringeland, E.A., et al., *A population-based study on incidence rates, Lauren distribution, stage distribution, treatment, and long-term outcomes for gastric adenocarcinoma in Central Norway 2001-2011*. Acta Oncol, 2017. **56**(1): p. 39-45.
141. Satoh, A., et al., *Role of perfusion CT in assessing tumor blood flow and malignancy level of gastric cancer*. Dig Surg, 2010. **27**(4): p. 253-60.
142. Hong, W.G., Y.S. Ko, and J.S. Pyo, *Clinicopathological significance and prognostic role of microvessel density in gastric cancer: A meta-analysis*. Pathol Res Pract, 2017. **213**(12): p. 1459-1463.
143. Folkman, J., *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis*. Semin Oncol, 2002. **29**(6 Suppl 16): p. 15-8.
144. Liu, Y., M. Petreaca, and M. Martins-Green, *Cell and molecular mechanisms of insulin-induced angiogenesis*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(11-12): p. 4492-504.
145. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
146. Jones, R.G. and C.B. Thompson, *Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth*. Genes Dev, 2009. **23**(5): p. 537-48.
147. Hur, H., et al., *Quantitative measurement of organic acids in tissues from gastric cancer patients indicates increased glucose metabolism in gastric cancer*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e98581.
148. Kudou, M., et al., *Value of Preoperative PET-CT in the Prediction of Pathological Stage of Gastric Cancer*. Ann Surg Oncol, 2018. **25**(6): p. 1633-1639.
149. Diaz-Ruiz, R., et al., *Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1796**(2): p. 252-65.
150. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
151. Deng, J. and H. Liang, *[Re-discussion of lymph node metastasis from gastric cancer on prognostic evaluation]*. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi, 2016. **19**(2): p. 157-64.
152. Deng, J.Y. and H. Liang, *Clinical significance of lymph node metastasis in gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(14): p. 3967-75.
153. Kim, J.S., et al., *Prognostic impact of insulin receptor expression on survival of patients with nonsmall cell lung cancer*. Cancer, 2012. **118**(9): p. 2454-65.
154. Mulligan, A.M., et al., *Insulin receptor is an independent predictor of a favorable outcome in early stage breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **106**(1): p. 39-47.
155. Law, J.H., et al., *Phosphorylated insulin-like growth factor-I/insulin receptor is present in all breast cancer subtypes and is related to poor survival*. Cancer Res, 2008. **68**(24): p. 10238-46.
156. Cheung, K.S., et al., *Metformin Use and Gastric Cancer Risk in Diabetic Patients After Helicobacter pylori Eradication*. J Natl Cancer Inst, 2018.
157. Menke, A., et al., *Prevalence of and Trends in Diabetes Among Adults in the United States, 1988-2012*. Jama, 2015. **314**(10): p. 1021-9.

158. Belfiore, A. and R. Malaguarnera, *Insulin receptor and cancer*. Endocr Relat Cancer, 2011. **18**(4): p. R125-47.
159. Zhou, X.L., et al., *Association between metformin and the risk of gastric cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of cohort studies*. Oncotarget, 2017. **8**(33): p. 55622-55631.
160. Tseng, C.H., *Metformin reduces gastric cancer risk in patients with type 2 diabetes mellitus*. Aging (Albany NY), 2016. **8**(8): p. 1636-49.
161. Li, P., et al., *Metformin use and its effect on gastric cancer in patients with type 2 diabetes: A systematic review of observational studies*. Oncol Lett, 2018. **15**(1): p. 1191-1199.

7. Anhang

7.1 Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwänenweg 20 · 24105 Kiel

Prof. Dr. Christoph Röcken
Institut für Pathologie
Arnold-Heller-Straße 3, Haus 14
24105 Kiel

EINGEGANGEN
01. Nov. 2010

Schwänenweg 20
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-18 31

Datum: 22.10.2010

AZ.: D 453/10 (bitte stets angeben)

Studienplan: **Prädiktive Biomarker des Magenkarzinoms**
Anschreiben mit Studienplan

Antragsteller: **Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie, UKSH,
Campus Kiel**

Datum des
Antrages: **29.09.2010 (Eingang 01.10.2010)**

Sehr geehrter Herr Kollege Röcken,

vielen Dank für Ihren obengenannten Antrag. Nach Durchsicht des Antrages durch die Geschäftsstelle und durch mich als stellvertretenden Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch
Stellv. Vorsitzender der Ethik-Kommission

Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

7.2 Erklärung

Hiermit erklärt die Promovendin Viva Maria Wiesener, dass sie die vorliegende Promotion selbstständig verfasst hat.

Dabei wurden ausschließlich jene in der Arbeit explizit genannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut wurde als solches kenntlich gemacht.

Datum, Ort

Unterschrift

8. Publikationen

Originalarbeit

Heckl SM, **Wiesener V**, Behrens HM, Ulase D, Krüger S, Röcken C.

The expression of the insulin receptor in gastric cancer correlates with the HER2 status and may have putative therapeutic implications.

Gastric Cancer. 2019 Nov;22(6):1130-1142. doi: 10.1007/s10120-019-00964-6

Kongressbeitrag

Wiesener V, Behrens HM, Krüger S, Heckl S, Röcken C.

Die Expression des Insulinrezeptors (IR) auf Endothelien und Tumorzellen des Magenkarzinoms.

73. Jahrestagung der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten) und DGAV (Deutsche Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie) in München. Freier Kurzvortrag; 14. September 2018.

9. Danksagung

Für die Verfassung meiner Dissertation danke ich Herrn Professor Röcken für die engmaschige Betreuung und konstruktive Kritik, sowie Herrn Doktor Behrens für die Unterstützung bei einer korrekten statistischen Auswertung der erhobenen Daten. Des Weiteren möchte ich mich bei sämtlichen Mitarbeitern des Institutes für Pathologie, vor allem die der Forschungsgruppe Magenkarzinom, für die stetige Beratung bei allen im Laufe der Arbeit aufkommenden Fragestellungen bedanken. Insbesondere in der Laborarbeit unterstützt haben mich Frau Sandra Krüger mit ihrer fachlichen Expertise und Frau Maren Dirks in der aufwändigen Aufbereitung des Magenkarzinomkollektivs.

Ich danke meiner Familie, meinem Partner und meinen Freunden für ihr Verständnis und ihren Beistand sowie das allzeit offene Ohr für (nicht-fachlichen) Austausch.

10 Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wird der an dieser Stelle üblicherweise inkludierte Lebenslauf nicht in der der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellten Version der Promotionsarbeit mit abgebildet.