

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

**Untersuchung tumorbiologischer und
tumorgenetischer Zusammenhänge von p53 im
chromosomal instabilen Magenkarzinom**

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

vorgelegt von
Isabelle Victoria Schoop
aus Frankfurt a. M.

Kiel 2022

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christoph Röcken
2. Berichterstatterin:	Prof. Dr. Susanne Sebens
Tag der mündlichen Prüfung:	14.04.2023
Zum Druck genehmigt	Kiel, den 02.11.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Magenkarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Pathogenese.....	2
1.1.3 Ätiologie.....	2
1.1.4 Diagnostik.....	4
1.1.5 Therapie und Prognose.....	4
1.1.6 Klassifikationssysteme.....	5
1.2 p53 – der „Wächter des Genoms“.....	8
1.2.1 Die Karzinogenese: Onkogene und Tumorsuppressorgene.....	8
1.2.2 Das Gen <i>TP53</i>	9
1.2.3 Das Protein p53.....	9
1.2.4 Die Funktionen von p53.....	9
1.3 P53 und chromosomale Instabilität.....	14
1.3.1 Formen der genomischen Instabilität.....	14
1.3.2 Mechanismen chromosomaler Instabilität.....	15
1.4 Zielsetzung und Studiendesign.....	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Ethische Grundlagen.....	19
2.1.2 Studienkollektiv.....	19
2.1.3 Geräte.....	20

2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	20
2.1.5	Software	21
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Erhebung der klinisch-pathologischen Patientencharakteristika	22
2.2.2	Immunhistochemische Färbung.....	22
2.2.3	Mikroskopische Auswertung.....	23
2.2.4	Definition der mutmaßlichen CIN- und GS-Fälle.....	27
2.2.5	Genetische Analysen von <i>TP53</i>	27
2.2.6	Statistische Auswertung.....	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Allgemeine Ergebnisse	32
3.2	Hauptanalyse.....	32
3.2.1	Mikroskopische Auswertung.....	32
3.2.2	Vergleich mit klinisch-pathologischen Patientendaten	33
3.2.3	Vergleich mit der Überlebenszeit.....	35
3.2.4	Untersuchung des p53-Expressionsmusters	40
3.3	Validierung	42
3.3.1	Analysen von <i>TP53</i>	42
4	Diskussion und Interpretation.....	47
4.1	Der „ <i>TP53</i> -mutationsbedingte p53-Expressionstyp“	47
4.2	Validierung durch Genanalysen von <i>TP53</i>	50
4.3	Heterogene p53-Immunfärbemuster.....	52
4.4	Schlussfolgerung.....	54
4.5	Methodenbedingte Einschränkungen der Studie	55
4.6	Ausblick	56
5	Zusammenfassung.....	57

6	Literatur	58
A	Anhang	68
B	Publikationen	78
C	Erklärung	79
D	Danksagung.....	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Der Zellzyklus.....	11
Abbildung 2:	p53 zwischen Zellteilung und Apoptose.	13
Abbildung 3:	Schematische Übersicht der Mechanismen chromosomaler Instabilität.	16
Abbildung 4:	Übersicht zum Studiendesign.....	18
Abbildung 5:	Referenzschnitte der p53-Färbeintensitäten.	23
Abbildung 6:	Schema der untersuchten Algorithmen zur Einteilung der Studienkohorte.	24
Abbildung 7:	Schema des p53-Färbemusters.	26
Abbildung 8:	Beispiele für Gelelektrophoresen der PCR-Produkte verschiedener Exons.	30
Abbildung 9:	Verteilung der Kohorte in Gruppen bei verschiedenen p53-IHC-Bewertungsalgorithmen.....	33
Abbildung 10:	Verteilung der MSS, EBV-negativen, nicht-diffusen Fälle.	35
Abbildung 11:	Korrelation mit dem Überleben.	36
Abbildung 12:	Beispiele für Fälle mit homogenem p53-Färbemuster.	40
Abbildung 13:	Beispiele für Fälle mit heterogenem p53-Immunfärbemuster.....	41
Abbildung 14:	Übersicht der Ergebnisse der <i>TP53</i> -Genanalysen.	43
Abbildung 15:	Beispiel für die Wildtyp-Sequenz des Exon 7 (Fall 6).	45
Abbildung 16:	Beispiel für eine Missense-Mutation im Exon 7 (Fall 7).....	45
Abbildung 17:	Beispiel für die Wildtyp-Sequenz im Exon 5 (Fall 102, Areal „schwarz“).	46
Abbildung 18:	Beispiel für eine Frameshift-Mutation im Exon 5 (Fall 102, Areal „weiß“).	46
Abbildung 19:	Sensitivität und Spezifität.....	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation	5
Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung	6
Tabelle 3: Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer der Exons 4 bis 7 von <i>TP53</i>	21
Tabelle 4: Vergleich der p53-IHC mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika.	37
Tabellen 5-7: Weitere Korrelationen der p53-Immunhistochemie mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika.	69-79
Tabelle 8: <i>TP53</i> -Mutationsstatus in 103 CIN* und GS* Fällen.	72
Tabelle 9: <i>TP53</i> -Mutationsstatus in acht heterogenen Fällen.....	76

Abkürzungsverzeichnis

ACRG.....	<i>The Asian Cancer Research Group</i>
ATM.....	<i>engl. ataxia telangiectasia mutated</i>
BAK.....	<i>engl. Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX.....	<i>engl. Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl.....	<i>engl. B-cell lymphoma</i>
CAD.....	<i>Caspase-aktivierte DNase</i>
CAK.....	<i>CDK-aktivierende Kinase</i>
CDK.....	<i>engl. cyclin-dependent kinase, cyclinabhängige Kinase</i>
CENP-A.....	<i>engl. centromere protein A</i>
CHK2.....	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CIN.....	<i>Chromosomale Instabilität, chromosomal instabil</i>
DNA.....	<i>engl. desoxyribonucleid acid, Desoxyribonukleinsäure</i>
EBER.....	<i>engl. Epstein-Barr virus encoded small RNA</i>
EBV.....	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
EMT.....	<i>engl. epithelial-to-mesenchymal transition</i>
engl.....	<i>englisch</i>
FAP.....	<i>familial adenomatous polyposis</i>
FDR.....	<i>engl. false discovery rate, Falscherkennungsrate</i>
frz.....	<i>französisch</i>
g.....	<i>Schwerebeschleunigung</i>
G0.....	<i>Gap-0-Phase</i>
G1.....	<i>Gap-1-Phase</i>
G2.....	<i>Gap-2-Phase</i>
GAPPS.....	<i>engl. gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach</i>
GC.....	<i>engl. gastric cancer</i>
GIT.....	<i>Gastronintestinaltrakt</i>
griech.....	<i>griechisch</i>
GS.....	<i>genomisch stabil</i>

H. pylori	<i>Helicobacter pylori</i>
HDGC	<i>hereditary diffuse gastric cancer</i>
HER2	<i>engl. human epidermal growth factor receptor 2</i>
HNPCC.....	<i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>
HPV	<i>Humanes Papillomavirus</i>
HScore	<i>Histoscore</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
kb	<i>Kilobasen</i>
kDa.....	<i>Kilodalton</i>
lat.....	<i>latein</i>
MET.....	<i>Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor</i>
Min	<i>Minute, Minuten</i>
MS.....	<i>Mikrosatelliten</i>
MSI.....	<i>Mikrosatelliteninstabilität, mikrosatelliteninstabil</i>
MSS.....	<i>Mikrosatellitenstabilität, mikrosatellitenstabil</i>
PCR.....	<i>engl. polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion</i>
PUMA.....	<i>engl. p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
Rb.....	<i>Retinoblastom</i>
rpm	<i>engl. rounds per minute, Umdrehungen pro Minute</i>
S	<i>Synthese-Phase</i>
SAC.....	<i>engl. Spindle Assembly Checkpoint</i>
SCNA	<i>extensive somatic copy-number aberration</i>
Sek	<i>Sekunde, Sekunden</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TNM	<i>Tumor-Nodus-Metastasen</i>
u. a.	<i>unter anderem</i>
UICC	<i>frz. Union internationale contre le cancer</i>
vs	<i>versus</i>
WT1	<i>Wilms-Tumorsuppressorgen</i>
z. B.	<i>zum Beispiel</i>

1 Einleitung

1.1 Das Magenkarzinom

Zu den malignen Neoplasien des Magens gehören neben den Karzinomen auch zahlreiche weitere Tumorentitäten, wie beispielsweise Sarkome, Lymphome oder Karzinoide. Bei den epithelialen Tumoren handelt es sich meist um Adenokarzinome, welche mit 90% am häufigsten unter den Malignomen des Magens vertreten sind [1,2].

Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen sind ausschließlich Adenokarzinome des Magens und des gastroösophagealen Übergangs. Aktuelle Studien, z. B. durch *The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network*, haben signifikante genetische Überlappungen der Adenokarzinome des Magens und des gastroösophagealen Übergangs aufgezeigt, sodass in dieser Studie keine Differenzierung unternommen wurde [3,4]. Im Folgenden werden die Begriffe „Adenokarzinom des Magens bzw. gastroösophagealen Übergangs“ und „Magenkarzinom“ synonym verwendet. Für die bessere Lesbarkeit wurde u. a. bei der Verwendung des Plurals das generische Maskulinum verwendet und bezieht sowohl weibliche Patientinnen als auch männliche Patienten mit ein.

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit ist Magenkrebs nach Lungenkrebs, Brustkrebs und dem kolorektalen Karzinom die vierthäufigste Krebserkrankung und die zweithäufigste Ursache für ein krebsbedingtes Versterben [5–7]. Männer erkranken etwa doppelt so häufig wie Frauen an Magenkrebs. In Deutschland lag im Jahre 2016 die Inzidenz bei 5840 neuerkrankten Frauen und 9300 neuerkrankten Männern; die Mortalität lag bei 3829 verstorbenen Frauen und 5429 verstorbenen Männern [1,5,8]. Das Erkrankungsrisiko steigt mit dem Alter. Im Durchschnitt erkranken Männer mit 72 Lebensjahren und Frauen mit 76 Lebensjahren. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt für beide Geschlechter bei knapp über 30% [1].

Bei der Inzidenz des Magenkarzinoms lassen sich geographische Unterschiede erkennen [5,9]. Magenkrebs tritt häufiger in Südamerika, Osteuropa und Ostasien, seltener in Neuseeland, Südasien, Afrika und Nordamerika auf [5,10,11]. Insgesamt zeigen sich die Erkrankungs- und Sterberaten weltweit rückläufig [5,12]. In Westeuropa und den USA ist ein relativer Anstieg der Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs zu beobachten [5].

1.1.2 Pathogenese

Die Karzinogenese von Magenkrebs scheint die Konsequenz einer komplexen Interaktion zwischen individuellen und umweltlichen Faktoren zu sein [5]. Im Modell der Kanzerogenese des sporadisch auftretenden Magenkarzinoms nach *Correa et al.* führt die chronisch atrophisierende Gastritis mit der Zeit zu einer intestinalen Metaplasie, im Verlauf zu einer präkanzerösen Epitheldysplasie und schließlich zum Magenkarzinom [13,14]. Eine chronische Entzündung (z. B. Typ-A-, Typ-B- und Typ-C-Gastritis) führt zu einem erhöhten Umsatz an Gewebe. Mit der gesteigerten Proliferationsrate erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für Fehler in der Mitose. Im Rahmen von chronischen Entzündungen entstehen vermehrt reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale, welche direkt die genomische und mitochondriale DNA schädigen können [15,16]. Der Großteil an Magenkarzinomen tritt spontan auf, nur etwa 5-10% treten familiär gehäuft oder im Rahmen von Keimbahnmutationen auf [17].

1.1.3 Ätiologie

Als multifaktoriell bedingte Erkrankung sind für die Entstehung des Magenkarzinoms zahlreiche Risikofaktoren bekannt. Infektionen mit bakteriellen und viralen Erregern können die Entstehung von Magenkrebs fördern. Eine bedeutsame Rolle kommt einer Infektion mit dem spiralförmigen Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) zu, welches die Magenschleimhaut des Menschen besiedelt. *H. pylori*-Infektionen betreffen etwa 50% der Weltbevölkerung und sind ätiologisch mit Duodenalulzera, Lymphomen und Magenkarzinomen assoziiert [11,18]. Etwa 10% der Magenkarzinome weltweit sind mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) vergesellschaftet [3,15,19]. EBV ist ein allgegenwärtiges Herpesvirus, welches mit vielen Malignomen im Zusammenhang steht, beispielsweise Lymphomen, nasopharyngealen Karzinomen und dem Magenkarzinom [15]. Zu den exogenen Risikofaktoren für ein sporadisches Auftreten einer Magenkrebserkrankung zählen neben Infektionen auch Lebensstilfaktoren, die mit einem niedrigen sozioökonomischen Status assoziiert sind [14]. Hierzu gehören u. a. die Ernährung, insbesondere die vermehrte Einnahme von Salz und Nitraten durch gepökelte und geräucherte Kost, sowie ein geringer Verzehr von Frischobst und -gemüse [20]. Rauchen und Alkoholkonsum sind weitere wichtige Risikofaktoren für die Entstehung von Magenkrebs [7,21]. Übergewicht und die gastroösophageale Refluxkrankheit erhöhen insbesondere das Risiko für ein Karzinom des gastroösophagealen Übergangs [22]. Metaanalysen haben gezeigt, dass metabolische

Faktoren, wie ein erhöhter Nüchternblutzucker, Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterol und das metabolische Syndrom mit Dysplasien der Magenschleimhaut assoziiert sind [5,23]. Der Trend der weltweit sinkenden Inzidenz erklärt sich u. a. mit der Möglichkeit H. pylori-Infektionen zu behandeln, oder Nahrungsmittel durch Kühlung anstelle von Salz haltbarer zu machen. Ein relativer Anstieg ist dagegen bei den Kardia-Karzinomen zu beobachten, zu deren Risikofaktoren v. a. Übergewicht zählt [5].

Zu den endogenen Risikofaktoren zählen vor allem Entzündungen, wie die Typ-A-Gastritis oder die Riesenfaltengastritis. Darüber hinaus sind ein chronisches Ulkus-Leiden, der Zustand nach Magenteilresektion und adenomatöse Magenpolypen mit dem Magenkarzinom assoziiert [24,25]. Beobachtungen haben gezeigt, dass bei einer familiären Häufung von Magenkrebs das Risiko für eine Magenkrebserkrankung erhöht sein kann. Beispielsweise haben bestimmte genetische Polymorphismen Einfluss auf die Säureproduktion und Entzündungsreaktionen im Zusammenspiel mit einer H. pylori-Infektion. Je nach individuellen genetischen Faktoren entwickeln einige Patienten mit einer H. pylori-Infektion eine Magenkrebs-Erkrankung und bei anderen Patienten manifestiert sich die Erkrankung nicht [5,18,26,27]. Auch sind Menschen mit der Blutgruppe A zu ca. 20% häufiger vom Magenkarzinom betroffen [28].

Es sind zahlreiche familiäre und hereditäre Krebserkrankungen des Gastrointestinaltrakts (GIT) bekannt, beispielsweise die FAP (engl. *familial adenomatous polyposis*) oder das Lynch-Syndrom. Auch kann es u. a. im Rahmen des HNPCCs (engl. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*) oder des Peutz-Jeghers-Syndroms zur Entwicklung eines Magenkarzinoms kommen [29]. Das autosomal-dominant vererbte hereditäre diffuse Magenkarzinom (HDGC, engl. *hereditary diffuse gastric cancer*) ist mit knapp 2% unter den Magenkrebserkrankungen vertreten und wird durch Keimbahn-Mutationen im *CDH1*-Gen verursacht [30]. Ebenso autosomal-dominant wird das GAPPS (engl. *gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach*) vererbt [31].

1.1.4 Diagnostik

Die Symptome bei Magenkrebs sind häufig unspezifisch und äußern sich beispielsweise durch B-Symptomatik, gastrointestinale Blutungen oder Anämie. Dyspepsie, Dysphagie und Völlegefühl, sowie eine Abneigung gegen Fleisch werden häufig als ungefährlich verkannt. Diagnostische Verfahren, wie Haemoccult®-Test und Blutbild, radiologische Bildgebungsverfahren und letztlich die Gastroskopie mit Biopsie führen oftmals erst in fortgeschrittenen Stadien zur Diagnose Magenkrebs. Bei etwa einem Drittel der Fälle ist die Erkrankung bei Diagnosestellung bereits metastasiert [1,32]. Die Metastasierung des Magenkarzinoms erfolgt vor allem lymphogen und per continuitatem. Typisch ist das Auftreten eines verhärteten supraklavikulären Virchow-Lymphknotens [33]. In fortgeschrittenen und inoperablen Stadien treten Fernmetastasen, wie beispielsweise im Rahmen einer Peritonealkarzinose auf [34]. Eine besondere Metastasierung ist der Krukenberg-Tumor, welcher eine Abtropf-Metastase in die Ovarien bezeichnet [35].

1.1.5 Therapie und Prognose

Allgemein kommt der Eradikation von *H. pylori* und der Lebensstilintervention bei der Prävention von Magenkrebs eine große Bedeutung zu. Sobald jedoch irreversible histologische Veränderungen aufgetreten sind, ist die engmaschige endoskopische Überwachung unerlässlich, um eine neu entstandene Magenkrebserkrankung frühzeitig zu erkennen und eine chirurgische Sanierung möglich zu machen [5]. Staging-Untersuchungen bilden die Grundlage der Therapieplanung, wobei der Therapieansatz kurativ, potenziell kurativ und palliativ sein kann. Die kurative Therapie für das Magenkarzinom ist die vollständige Malignomresektion. Frühe Karzinome können endoskopisch entfernt werden. Die Malignomentfernung bei fortgeschrittenen Karzinomen erfolgt durch eine totale Gastrektomie oder Teil-Gastrektomie mit 5 cm Sicherheitsabstand (8 cm beim diffusen Typ) mit Entfernung von Omentum majus und minus, Lymphadenektomie und ggf. Splenektomie [36,37]. Eine (neo-) adjuvante Strahlen- und/oder Chemotherapie kann indiziert sein. Standardmäßig besteht die perioperative Chemotherapie aus jeweils vier Zyklen vor und nach der Operation, beispielsweise nach dem FLOT-Schema (Docetaxel, Oxaliplatin und 5-FU) [38,39]. In der palliativen Therapie kommen zusätzlich Antikörper wie beispielsweise Trastuzumab bei einer HER2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*, auch Her2/neu)-Überexpression in Betracht [36]. Bei Patienten mit dem erblichen Risiko eine

Magenkrebserkrankung zu entwickeln, wie z. B. beim HDGC, wird eine prophylaktische Gastrektomie empfohlen [40].

Ca. 70% der Betroffenen versterben innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung [17]. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Magenkrebs hängt stark davon ab, in welchem Stadium die Erkrankung erkannt wird [41]. Wichtiger Faktor für die Prognose des Magenkarzinoms ist die lymphogene Metastasierung [42]. Zur Verlaufs- und Rezidivkontrolle dient nach einer Chemotherapie und/oder operativen Eingriffen die Bestimmung der Tumormarker CEA und CA 19-9 [36].

1.1.6 Klassifikationssysteme

Zur Therapieplanung beim Magenkarzinom und zur Überprüfung des Erkrankungsverlaufs wird im klinischen Alltag klassischerweise *die TNM-Klassifikation*, bzw. *die UICC-Stadieneinteilung* genutzt. Die *Tumor-Nodus-Metastasen-Klassifikation* (TNM-Klassifikation) betrachtet dabei u. a. die Invasionstiefe des Primärtumors (T), Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) [43]. Die UICC-Stadieneinteilung (frz. *Union internationale contre le cancer*) basiert auf der TMN-Klassifikation und kann zu prognostischen Aussagen und zur Therapieplanung herangezogen werden (*Tabellen 1 und 2*) [43].

Die Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs werden seit der 7. Auflage der TNM-Klassifikation, bzw. der abgeleiteten UICC-Klassifikation den Ösophaguskarzinomen zugeordnet und nach der Siewert-Klassifikation eingeteilt [43].

Tabelle 1: TNM-Klassifikation [43].

TNM	Ausdehnung
Tis	Carcinoma in situ
T1	T1a: begrenzt auf die Mukosa, T1b: begrenzt auf die Submukosa
T2	Infiltration der Muscularis propria
T3	Infiltration der Subserosa
T4	Überschreitung der Serosa (T4a) mit Infiltration benachbarter Strukturen (T4b)
N1	1-2 regionäre Lymphknoten
N2	3-6 regionäre Lymphknoten
N3	≥7 regionäre Lymphknoten (N3a: 7-15 Lymphknoten, N3b: >15 Lymphknoten)
M1	Fernmetastasen, Peritonealkarzinose

Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung [43].

UICC-Stadium	TNM-Klassifikation
Stadium 0	Tis
Stadium IA	T1 N0 M0
Stadium IB	T1 N1 M0, T2 N0 M0
Stadium II	T1 N2 M0, T2 N1 M0, T3 N0 M0
Stadium IIIA	T2 N2 M0, T3 N1 M0, T4 N0 M0
Stadium IIIB	T3 N2 M0
Stadium IV	T1-T3 N3 M0, T4 N1-N3 M0, Tx Nx M1 (jede Fernmetastasierung)

Klinisch kann das Magenkarzinom in ein frühes und ein fortgeschrittenes Stadium eingeteilt werden [44]. Für die Magenfrühkarzinome wird zur Beurteilung einer endoskopischen Resektabilität die *japanische Klassifikation* herangezogen [33]. Für die fortgeschrittenen Karzinome (T2-T4) erfolgt die makroskopische Einteilung nach *Borrmann* in vier Typen: Typ I (polypöses Wachstum), Typ II (schüsselförmiges und begrenztes Wachstum), Typ III (unscharf begrenztes Ulcus) und Typ IV (diffus infiltrierendes, szirrhöses Wachstum) [45].

Eine Möglichkeit der Einteilung des Magenkarzinoms in Subgruppen besteht in der Differenzierung nach histomorphologischen Gesichtspunkten.

In der *Laurén-Klassifikation* von 1965 wird das Magenkarzinom histomorphologisch nach dem Wachstumsmuster in einen *intestinalen* (ca. 50%), einen *diffusen* (ca. 40%) und einen *gemischten/unbestimmbaren* (ca. 10%) Subtyp eingeteilt [46].

Die *WHO-Klassifikation* teilt die Magenkarzinome ebenfalls nach histomorphologischen Kriterien ein [47]. 90% aller Karzinome des Magens sind Adenokarzinome, welche dem papillären, tubulären, muzinösen, gering kohäsiven (z. B. Siegelringkarzinome) und gemischten Adenokarzinomen zugeordnet werden können. Zu den selteneren Karzinomen des Magens gehören das adenosquamöse Karzinom, das Karzinom mit lymphoidem Stroma, das hepatoide Karzinom, das Plattenepithelkarzinom und das undifferenzierte Karzinom [47,48].

Um individualisierte Therapien zu entwickeln und anzuwenden, sind Klassifikationssysteme unabdingbar, welche die genetischen und molekularen Eigenschaften des Magenkarzinoms abbilden [49,50]. Zahlreiche Studien haben mittels genetischer Analysen des Magenkarzinoms die Komplexität molekularbiologischer Veränderungen dieser malignen Erkrankung aufgezeigt [3,49,51,52]. *Lei et al.* haben 2013 das Magenkarzinom in drei Subtypen eingeteilt: das mesenchymale, das proliferative und das metabolische Magenkarzinom [49]. In ihrer Studie zeigten die Subtypen in vitro ein unterschiedlich starkes Therapieansprechen auf verschiedene Medikamente [5,49].

Umfassende molekularbiologische Untersuchungen des Magenkarzinoms durch *The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network* haben 2014 zu einer Einteilung in vier Subtypen geführt: das *Epstein-Barr-Virus positive (EBV+)*, das *mikrosatteliteninstabile (MSI)*, das *genomisch stabile (GS)* und das *chromosomal instabile (CIN)* Magenkarzinom [3]. Während die EBV+ und MSI Magenkarzinome recht einfach erkannt werden können, z. B. mithilfe von EBER (engl. *Epstein-Barr virus encoded small RNA*) -in-situ-Hybridisierung und MSI-Analysen, ist die Identifizierung von CIN und GS Magenkarzinomen aufwendiger. *TCGA* unterschied CIN von GS Magenkarzinomen auf dem Boden von somatischen Kopienzahl-Aberrationen (SCNA, engl. *somatic copy number aberrations*) [3].

Ähnlich wie *TCGA* teilt auch *The Asian Cancer Research Group (ACRG)* das Magenkarzinom basierend auf Sequenzierungen und Gen-Expressionsanalysen in vier Gruppen ein: *MSI*, *MSS/EMT* (engl. *epithelial-to-mesenchymal transition*), *MSS/TP53+* und *MSS/TP53-* [53,53].

Viele Arbeitsgruppen haben sich in den Folgejahren an diesen molekularbiologischen Erkenntnissen orientiert und ähnliche Einteilungen des Magenkarzinoms u. a. mittels immunhistochemischer Verfahren gegen das Tumorsuppressorprotein p53 vorgeschlagen. *Gonzalez et al.* teilen das Magenkarzinom beispielsweise in vier Subtypen ein: *EBV+ (EBER+)*, *MSI (MLH-)*, *CIN (aberrante p53-IHC)* und *GS* [51]. Nach *Setia et al.* erfolgt die Einteilung des Magenkarzinoms in fünf Subgruppen: *EBV-positive GC* (engl. *gastric cancer*), *Microsatellite instable GC*, *GC with aberrant E-cadherin expression*, *GC with aberrant p53 expression* und *GC with normal p53 expression* [52]. Weiterhin erfolgt nach *Setia et al.* eine Einteilung der p53-aberranten Magenkarzinome basierend auf der Expression von MUC2, MUC6, MUC5AC und CD10 [52].

1.2 p53 – der „Wächter des Genoms“

1.2.1 Die Karzinogenese: Onkogene und Tumorsuppressorgene

Typische Anzeichen tumorösen Wachstums sind eine höhere Teilungsrate, ein invasives Eindringen in Gewebe, die Induktion und Steuerung der Angiogenese oder die Ausschaltung der Apoptose [54]. Mit den Fortschritten der molekulargenetischen Forschung wird deutlich, dass die Karzinogenese ein mehrschrittiger Prozess ist, dem eine Vielzahl an genetischen Veränderungen voraus gehen, z. B. Punktmutationen, Rekombinationen, Amplifikationen, Deletionen, aber auch epigenetische Modifikationen [15]. Zellen entarten, wenn es zu Mutationen von Onkogenen und Anti-Onkogenen/Tumorsuppressorgenen kommt. Die Aktivierung von Onkogenen führt zu einer ungerichteten Förderung der Zellteilung. Dieser Effekt tritt bereits durch die Veränderung des Onkogens auf einem Allel auf, die Wirkung der Genprodukte ist dominant [55]. Bei den Tumorsuppressorgenen bewirken inaktivierende Mutationen eine unzureichende Regulierung oder Hemmung der Zellteilung. Dieser Effekt ist meist rezessiv, es bedarf entsprechend der „2-Treffer-Hypothese“ nach *Knudson* also einer Veränderung auf beiden Allelen, da eine intakte Genkopie ausreichen kann, um die physiologischen Funktionen des Genprodukts aufrecht zu erhalten [56].

TP53 ist mit einer Rate von über 50% das am häufigsten in menschlichen Krebszellen mutierte Gen [57]. Die meisten menschlichen Tumoren weisen eine Malfunktion im p53-Signalweg auf, entweder durch eine *TP53*-Mutation oder durch ein funktionsunfähiges Protein im p53-Signalweg [58,59]. Das Protein p53 wird aufgrund seiner primären Funktion als Tumorsuppressor allgemein auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet [60]. Die Struktur von p53 weist eine Besonderheit auf: Vier gleiche Untereinheiten bilden ein funktionsfähiges Tetramer. Der Einbau bereits einer mutierten Untereinheit in das Tetramer kann ausreichen, um die Funktion vollständig zu kompromittieren. Ist das Genprodukt eines Allels defekt, beinhaltet ein zusammengesetztes Protein p53 in 15 von 16 möglichen Kombinationen mindestens eine mutierte Untereinheit. Dieses Phänomen wird als dominant-negativer Effekt bezeichnet [61]. Fällt die p53-Funktion weg, weisen Zellen Resistenzen gegenüber Strahlung, Chemotherapie, dem Mangel an Wachstumsfaktoren, Hypoxie etc. auf [55].

Die besondere Bedeutung des „Wächters des Genoms“ zeigt sich eindrucksvoll bei Patienten mit einer hereditären *TP53*-Mutation in Form des *Li-Fraumeni-Syndroms*. Die unzureichende Wächterfunktion von p53 führt zur Akkumulation von Mutationen durch Weitergabe defekten Erbmaterials an die Tochterzellen und zu einer Instabilität deren

Genoms. Das Risiko der Zellentartung erhöht sich und es kommt frühzeitig zu multiplen Tumoren, vor allem Sarkomen [55]. Die herausragende Stellung von p53 wird auch am Beispiel der Infektion mit dem Humanen Papillomavirus (HPV) deutlich. Die Infektion mit den Hochrisiko-HPV-Typen 16 und 18 ist beispielsweise der Hauptrisikofaktor für die Entstehung des Zervixkarzinoms. Hier ist nicht das Gen *TP53* verändert, sondern das HPV-Protein E6-Protein induziert einen rascheren Abbau des Proteins p53 [55].

1.2.2 Das Gen *TP53*

TP53 befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13.1), hat eine Länge von ca. 20 Kilobasen und beinhaltet 11 Exons [62,63]. *TP53* kodiert für Proteine, die DNA binden können und als Transkriptionsfaktoren fungieren [55].

1.2.3 Das Protein p53

Alle Protein-Isoformen, die dem Gen *TP53* abstammen, werden als p53 bezeichnet. Den Namen p53 erhielt das prolinreiche Protein im Jahre 1979, nachdem in einer SDS-PAGE-Analyse eine Masse von 53 kDa festgestellt wurde, je nach Isoform variiert die molekulare Masse jedoch mitunter deutlich [64]. P53 hat eine typische Domänenstruktur, mit DNA-Bindungs- und Aktivierungsdomänen sowie einer Oligomerisierungsdomäne. Typischerweise finden sich vier p53-Untereinheiten zu einem funktionsfähigen Protein p53 zusammen. Es sind mehr als 10 Isoformen von p53 bekannt [57,65]. Je nach Gewebe werden unterschiedliche Isoformen exprimiert [66]. Die Funktionen der Isoformen und die Interaktionen untereinander sind komplex und nicht vollständig verstanden [65–68].

1.2.4 Die Funktionen von p53

P53 fungiert in seiner Rolle als Tumorsuppressor u. a. als transkriptioneller Regulator. Bei DNA-Schäden, z. B. durch ionisierende Strahlung, wird der Abbau von p53 unterbunden und das Protein akkumuliert in der Zelle. Konzentrationsabhängig führt dies primär zu einem Arrest des Zellzyklus, bei Irreparabilität des DNA-Schadens kann die Apoptose eingeleitet werden (*Abbildung 2*) [55]. Weitere Mechanismen, bei denen p53 eine Rolle spielt, z. B. die Inhibierung der Angiogenese [69], werden im Folgenden nicht näher beleuchtet.

1.2.4.1 P53 vermittelt den Zellzyklusarrest

Unabdingbar für das Entstehen neuer, gesunder Zellen ist die Sicherstellung einer fehlerfreien Duplizierung des Genoms, der regelrechten Trennung der Chromosomen und gleichmäßigen Verteilung auf die Tochterzellen. Der Zellzyklus kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden [55]. In der Gap-1-Phase (G1-Phase) werden Proteine synthetisiert und die Zelle wächst. In der Synthese-Phase (S-Phase) kommt es zur DNA-Replikation. In der Gap-2-Phase (G2-Phase) bereitet sich die Zelle auf die anstehende Teilungsphase vor. In der Mitose-Phase (M-Phase) kommt es zur Zytokinese, der Trennung der Chromosomen und Teilung der Zellen. Die Zytokinese selbst teilt sich in die Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase [55]. Die G1-, S- und G2-Phase werden zur sogenannten Interphase zusammengefasst. Nach der Mitose tritt die Zelle wieder in die G1-Phase ein und der Zellzyklus wiederholt sich. Wenn eine Zelle in einen Zustand gerät, in dem sie sich nicht teilen wird, kann sie nach der Mitosephase auch dauerhaft in der Interphase verbleiben. Dieses Stadium wird dann als Gap-0-Phase (G0-Phase) bezeichnet (*Abbildung 1*). Zellen, die typischerweise im Stadium der zellulären Quieszenz verbleiben, sind beispielsweise Neurone [55].

An drei wichtigen Kontrollpunkten (engl. *Checkpoints*) kann die Zelle den Zellzyklus überwachen [55]. Der Checkpoint 1 liegt am Ende der G1-Phase. Hier überprüft die Zelle ihre Größe, etwaige DNA-Schäden und mitotische Signale. Der zweite Checkpoint liegt am Ende der G2-Phase. Hier wird kontrolliert, ob die Replikation fehlerfrei war oder Fehler in der DNA vorliegen. Bei DNA-Fehlern kann die Zelle den Zellzyklus anhalten, um die Schäden zu reparieren oder bei Irreparabilität die Apoptose einzuleiten. Der dritte Checkpoint liegt am Ende der Mitose-Phase. Hier wird kontrolliert, ob die Chromosomen in der Mitosespindel korrekt aufgereiht sind. Erst danach erfolgt die Zytokinese (*Abbildung 1*) [55].

Die molekularbiologischen Vorgänge des eukaryotischen Zellzyklus sind komplex. Die entscheidende Rolle spielen Cycline und cyclinkinaseabhängige Kinasen (CDK, engl. *cyclin-dependent kinase*) [55]. Eine gesicherte Funktion im Zellzyklus besitzen die Cycline A, B, D und E, sowie die CDKs 1, 2, 4 und 6 [55]. Außerdem gibt es CDK-aktivierende Kinasen (CAK), die aber nicht zellzyklusabhängig sind. Die Cycline und CDKs haben ihren Namen erhalten, da sie Zyklen von Aktivität und Inaktivität durchlaufen. Aktive Komplexe aus Cyclinen und CDKs dominieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Zellzyklus. Eine Ausnahme bildet das Paar Cyclin H und CDK1, da es in mehreren Zellzyklusphasen aktiv ist (*Abbildung 1*) [55,70].

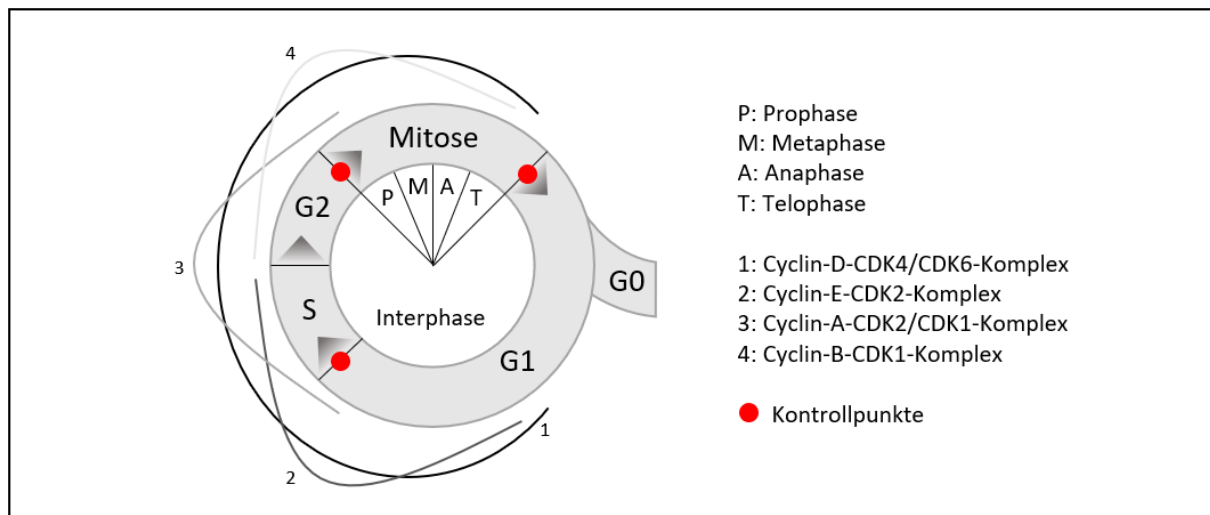


Abbildung 1: Der Zellzyklus. Die nummerierten Linien 1-4 stellen die Konzentrationsspiegel unterschiedlicher Cyclin-CDK-Komplexe zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Zellzyklus dar. Informationen nach [55].

Der G1-Kontrollpunkt liegt im G1-S-Übergang. Die Hauptakteure am G1/S-Übergang sind Cyclin D und CDK4/CDK6 [55,71]. Substrat des Cyclin-D-CDK4/CDK6-Komplexes ist das Protein des Retinoblastom-Gens (Rb-Protein). Das Rb-Protein bindet und inaktiviert im Normalzustand Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Genen des Zellzyklus und der DNA-Replikation steuern. Im G1/S-Übergang phosphoryliert der aktivierte Cyclin-D-CDK4-Komplex das Rb-Protein und entfernt es aus der Bindung mit E2F. E2F-gesteuerte Gene werden somit zur Transkription freigegeben, beispielsweise Cyclin E. CDK2 und Cyclin E können einen Komplex bilden und das Rb-Protein phosphorylieren, sodass dieses vollständig inaktiviert wird. Jetzt kann die Zelle endgültig in die S-Phase eintreten [55]. CDK-Inhibitoren (CKI) sind beispielsweise p16 (kann CKD4 und CDK6 hemmen) oder p21 (kann CDK2 hemmen). Wachstumsfaktoren steuern die Synthese von Cyclin D und den Übergang in die S-Phase. Bei einem Überangebot von Wachstumsfaktoren kann der Checkpoint an G1/S verloren gehen [55]. Kommt es beispielsweise über eine Mutation im *TP53* zu einer Fehlfunktion des G1-S-Kontrollpunktes, kann eine genomische Instabilität der Tochterzellen entstehen (*Abbildung 2*) [72]. Im normalen Zellablauf wird p53 fortlaufend gebildet und parallel kontinuierlich durch die E3-Ligase Mdm2 ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt. So wird der p53-Spiegel gleichmäßig niedrig gehalten. Wenn ein DNA-Schaden detektiert wird, kann der p53-Signalweg über posttranslationale Modifikationen von p53 aktiviert werden [73]. Beispielsweise werden die Proteinkinasen ATM (engl. *ataxia telangiectasia mutated*) und CHK2 (engl. *Checkpoint kinase 2*) aktiviert. Diese phosphorylieren p53, welches dann nicht mehr durch Mdm2 markiert werden kann. Das stabilisierte p53 kann in seiner tetrameren

Form im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor WT1 (Wilms-Tumorsuppressorgen) z. B. die Expression von p21 hochregulieren. P21 inhibiert den Cyclin-E-CDK2-Komplex am G1/S-Übergang, sowie den Cyclin-D-CDK4-Komplex in der späten G1-Phase und unterbindet somit die Phosphorylierung des Rb-Proteins. Dadurch bleibt die Rb-Protein-vermittelte Repression von Genen der S-Phase bestehen, der Zellzyklus sistiert. Nun können Reparaturvorgänge der DNA vorgenommen werden (*Abbildung 2*) [55]. Analog zu seiner Funktion am G1-Kontrollpunkt greift p53 in den Cyclin-B-CDK1-abhängigen Kontrollpunkt am Übergang G2/M ein [55].

1.2.4.2 P53 vermittelt die Apoptose

Soll eine Zelle aus dem Organismus entfernt werden, weil sie für das Individuum eine Gefahr darstellt, beispielsweise durch irreparabel defektes Erbgut oder durch eine Infektion, können Kaskaden von Enzymreaktionen den programmierten Zelltod (Apoptose, griech. Apoptōsis: das Abfallen, der Wegfall) auslösen. Die Apoptose kann über einen intrinsischen oder extrinsischen Weg initiiert werden [55]. Der intrinsische Weg der Apoptose wird durch Proteine der Bcl (engl. *B-cell lymphoma*)-Familie reguliert, welche pro- und antiapoptotische Funktionen haben. Zusammen mit WT1 reguliert p53 in hoher Konzentration die Expression von Faktoren hoch, z. B. von PUMA (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*) und NOXA (lat. Schaden). Diese wirken hemmend auf den antiapoptotischen Faktor Bcl2. Dadurch entfällt die inhibierende Wirkung des Bcl2 auf den proapoptotischen Faktor BAX (eng. *Bcl-2-associated X protein*). P53 induziert darüber hinaus die Expression des *bax*-Gens. BAX und BAK (engl. *Bcl-2 homologous antagonist/killer*) sind Proteine, welche in der mitochondrialen Membran Poren bilden, sodass Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Cytosol freigesetzt wird. Im Cytosol aktiviert Cytochrom c Enzyme der Gruppe der Caspasen (*Abbildung 2*) [55]. Beim extrinsischen Weg binden geeignete Liganden an Rezeptoren, z. B. Fas-Ligand an Fas-Rezeptor. Die Bindung des Fas-Liganden führt zu einer Oligomerisierung des Fas-Rezeptors und über eine Kaskadenreaktion ebenfalls zur Aktivierung von Caspasen [55].

Die Effektorcaspasen haben verschiedene Angriffsziele. Es kommt zur Spaltung von Strukturproteinen sowie zur Proteolyse von DNA-Reparaturenzymen und Spleißenzymen und ihren Cofaktoren. CAD (Caspase-aktivierte DNase) schneidet DNA an den Schaltstücken zwischen den Nukleosomen. Die Caspasen spalten auch andere Proteine des Zellzyklus, z. B.

Rb-Protein, p21, p27 [55]. Ein frühes Zeichen der Apoptose ist der Verlust der Zellsymmetrie: Das aus den Mitochondrien freigesetzte Cytochrom c transloziert an die innere Plasmamembran und bewirkt den Wechsel von Phosphatidylserin von der inneren in die äußere Lipidschicht. Nach dieser äußerlichen Zellmarkierung können extrazelluläre Proteine (z. B. Annexin V) binden. Die fokale Adhäsionskinase löst die apoptotische Zelle aus ihrer Zellmatrix heraus [55].

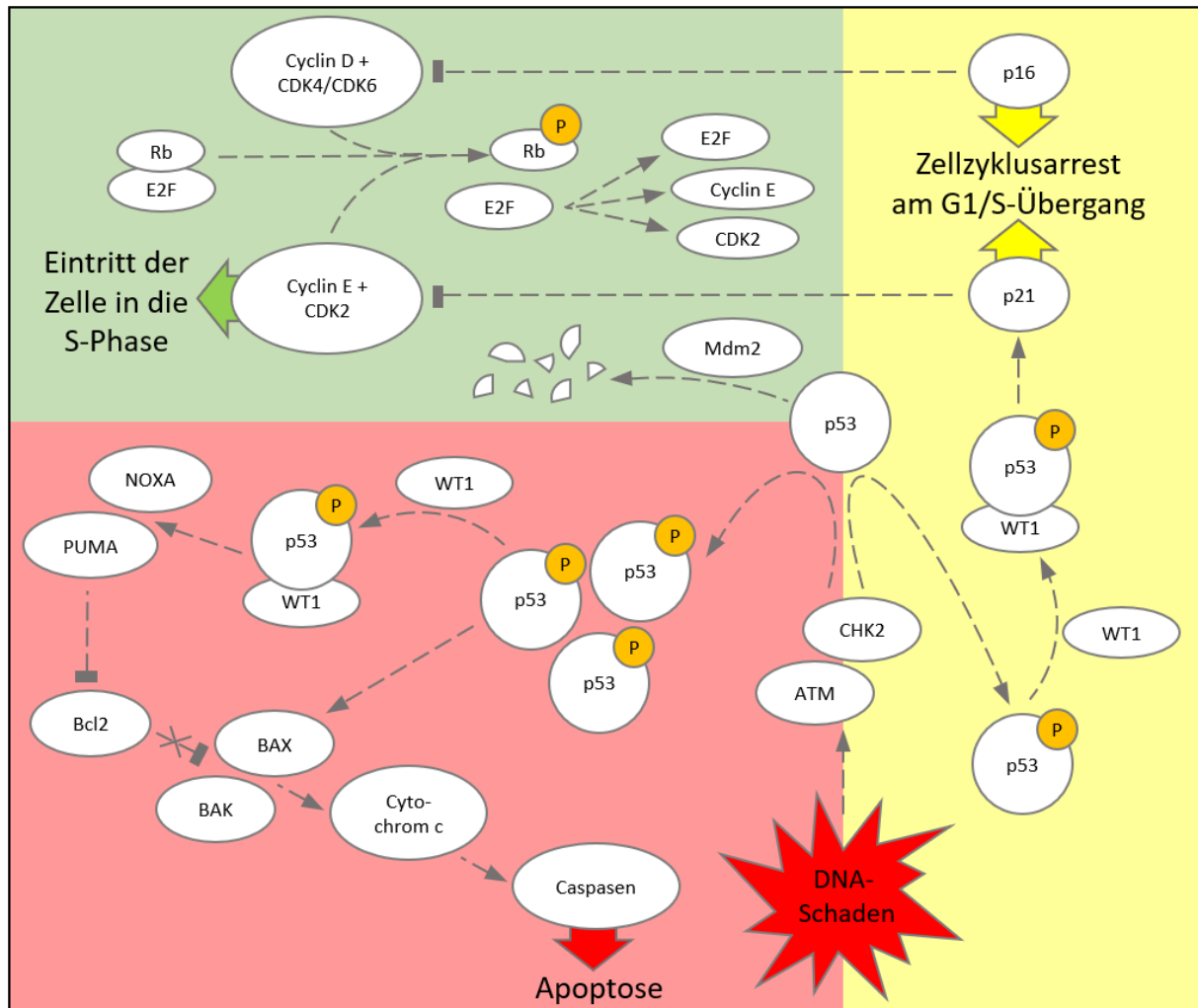


Abbildung 2: p53 zwischen Zellteilung und Apoptose. Vereinfachte Übersicht der p53-abhängigen biochemischen Prozesse im Falle eines DNA-Schadens. Im Normalfall wird p53 fortlaufend durch Mdm2 ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt. Kommt es jedoch zu einem DNA-Schaden, kann p53 konzentrationsabhängig den Zellzyklusarrest oder die Apoptose vermitteln. Abkürzungen siehe Text, P: Phosphat. Informationen nach [55].

1.3 P53 und chromosomale Instabilität

1.3.1 Formen der genomischen Instabilität

Unüberbrückbare Störungen bei Zellwachstum und -teilung führen normalerweise zur Aktivierung der Apoptose. Wenn die Kontrollmechanismen durch Akkumulation von Mutationen versagen, kann es jedoch in seltenen Fällen zu einer ungehemmten Zellteilung kommen. Somatische Mutationen führen häufig zu einer Aneuploidie, d. h. zu einem Karyotyp mit ungewöhnlicher Chromosomenzahl [55]. Die Unterscheidung zwischen genetischer Stabilität und Instabilität in einer Tumorzelle geschieht nicht anhand des Mutationsstatus, sondern bezieht sich auf die Mutationsrate [3,74,75]. Auch eine Tumorzelle mit einer Aneuploidie kann genetisch stabil sein [17,76]. Unter dem Begriff der genomischen Instabilität wird neben der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) auch die chromosomale Instabilität (CIN) zusammengefasst [74].

Mikrosatelliten (MS) sind einfache repetitive DNA-Sequenzen von 1-6 Basenpaaren an DNA, welche im gesamten menschlichen Genom zu finden sind [77]. Die Länge der Mikrosatelliten unterscheidet sich interindividuell und nach Gewebe. Die häufigste sich wiederholende Sequenz ist (CA)_n [74]. Bei Fehlern in der Mikrosatelliten-DNA greifen normalerweise Mismatch-Reparaturmechanismen, wie beispielsweise MSH2 und MLH1. Sind diese jedoch defekt, kommt es zu **Mikrosatelliteninstabilität (MSI)** [74].

Chromosomale Instabilität (CIN) ist das Bild einer genomischen Instabilität mit einer hohen Rate an Mutationen auf chromosomaler Ebene und geht mit der numerischen und/oder strukturellen Abweichung vom regulären diploiden Chromosomensatz (2n) einher, entweder durch Zugewinne oder Verluste chromosomaler Bruchstücke oder ganzer Chromosomen [17,78]. CIN führt in der Krebsentwicklung rasch zu einer intratumoralen Heterogenität und fördert die Selektion neuer Krebszellpopulationen im tumorumgebenden Milieu. CIN Krebszellen zeigen häufig eine heterogene karyotypische, molekulare und histologische Tumorstruktur auf [17,79]. Somit wird eine Resistenzentwicklung, beispielsweise gegen Chemotherapien der Krebszellen, begünstigt [80]. CIN Magenkarzinome treten typischerweise gehäuft in der Kardia und im gastroösophagealen Übergang auf, zeigen häufig einen intestinalen Phänotyp und sind überzufällig häufig mit *TP53*-Mutationen assoziiert [3]. Auch die Überexpression von HER2 und Rezeptortyrosinkinasen, wie MET (Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor), zeigen sich häufig im CIN Magenkarzinom [48].

1.3.2 Mechanismen chromosomaler Instabilität

Die Ursachen chromosomaler Instabilität sind vielfältig. Eine fehlerhafte Trennung und Aufteilung der Chromosomen während der Zellteilung, Telomerdysfunktionen oder Zellzyklus-Dysregulationen können in CIN resultieren [17].

Grund für eine fehlerhafte Chromosomen-Segregation kann eine abnorme Interaktion zwischen Kinetochor und Spindelapparat sein [17]. Kinetochore sind Proteinstrukturen an der Zentromerregion der Chromosomen, welche mit den Mikrotubuli des Spindelapparates interagieren. Während des *Spindle Assembly Checkpoints* (SAC) in der Mitose wird diese Interaktion überprüft [81]. Bei der funktionsfähigen Zelle wird über eine Signalkette der Proteinkomplex APC/C (engl. *anaphase-promoting complex/cyclosome*) inhibiert, welcher die Transition der Zelle aus der Metaphase in die Anaphase vermittelt. Beim Defekt einer Komponente des SAC kann die Funktion verloren gehen [17]. Die Zentromere enthalten das Protein CENP-A (engl. *centromere protein A*), welches wichtig für die Determinierung der Zentromerregion ist. Bei einer Überexpression von CENP-A kann dieses in einer nicht-zentromeren Region inkorporiert werden, sodass die Kinetochore sich an einer falschen Stelle bilden und konsekutiv durch den Spindelapparat Chromosomenbrüche verursacht werden [17,82]. Kommt es zu der Bildung multipler Zentrosomen, werden die Chromosomen ungleich auf die Tochterzellen verteilt. Auch können fehlerhafte Kinetochor-Anheftungen entstehen (amphitelisch, monotelisch, syntelisch und merotelisch), sodass aneuploide Tochterzellen entstehen. [17].

Eine weitere mögliche Ursache für die Entstehung von CIN ist die Telomerdysfunktion [17]. Telomere sind die physiologischen Chromosomenenden mit Wiederholungen des Sequenzmotivs $(T_2AG_3)_n$ [83]. Sie schützen die DNA vor Degradierung und verhindern eine Ringbildung von DNA, chromosomale Fusionen und Rekombinationen [84,85]. In menschlichen Chromosomen umfassen die Telomere ca. 5-15kb. Bei einer DNA-Replikation können die DNA-Enden nicht vollständig verdoppelt werden, sodass jede Zellteilung mit einer Verkürzung der Telomere einhergeht; nach einer gewissen Anzahl von Teilungen erreichen sie das finale Stadium, wenn das genetische Material sich bis zum sogenannten Hayflick-Limit verkürzt hat [86]. Viele Tumorzellen weisen eine Aktivität von Telomerase auf, welche de novo Telomere bilden und zum unendlichen Teilungspotenzial von Krebszellen beitragen kann [87]. Vor allem bei Telomerase- und p53-defizienten Krebszellen ist das Risiko für Chromosomen-Rearrangements erhöht [88].

CIN kann außerdem Folge einer Zellzyklus-Dysregulation sein [17]. Es sind mehrere DNA-Reparatursysteme in menschlichen Zellen bekannt, welche bei unterschiedlichen Schädigungen der DNA aktiviert werden. Die gestörte Zellzykluskontrolle, beispielsweise an den Zellzyklus-Kontrollpunkten G1/S, S/G2 und G2/M, trägt dazu bei, dass genetische Defekte ungehindert an die Tochterzellen weitergegeben werden können. Zum Beispiel kann über die Amplifikation von CDK4 eine Duplikation von Zentrosomen initiiert werden [89]. Auch die Hochregulierung von Cyclin E kann in CIN resultieren [70].

Es lässt sich also zusammenfassen, dass die Veränderungen in chromosomal instabilen Zellen normalerweise in die Apoptose führen müssten. Dies kann umgangen werden, wenn Kontrollmechanismen ausfallen, beispielsweise der p53-Signalweg (Abbildung 3) [90]. In der Literatur sind einige Hinweise auf den Zusammenhang von CIN und p53-Defizienz zu finden. Beispielsweise kann die Überexpression von MET die Bildung multipler Zentrosomen induzieren, vor allem in *TP53*-defizienten Zellen [91]. Passend zu diesen Ergebnissen hat TCGA *TP53*-Mutationen und den Funktionsverlust des p53-Signalwegs als eines der typischen Charakteristika von CIN Magenkarzinomen benannt [3].

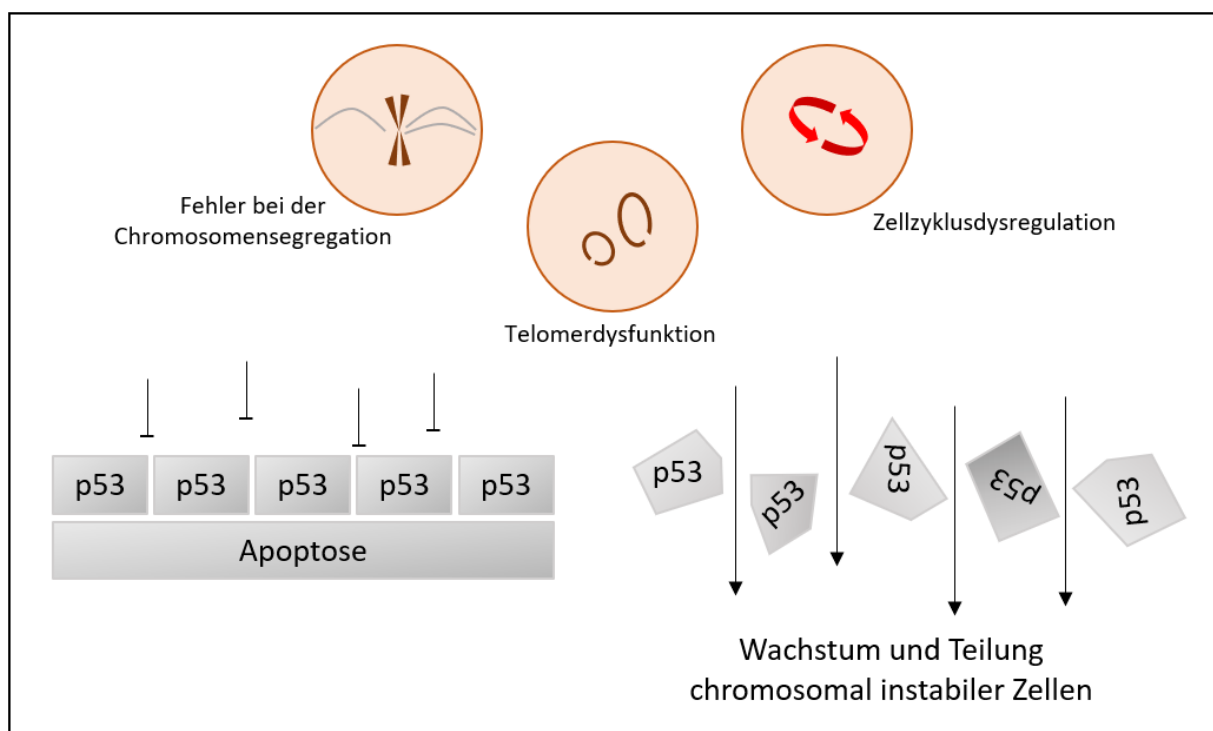


Abbildung 3: Schematische Übersicht der Mechanismen chromosomaler Instabilität. Normalerweise enden Zellen mit existentiellen Veränderungen des genetischen Materials in der Apoptose. Sind jedoch Kontrollmechanismen, wie der p53-Signalweg nicht funktionsfähig, können chromosomal instabile Zellen bestehen und sich teilen [17].

1.4 Zielsetzung und Studiendesign

Die zuverlässige Einordnung von Tumorentitäten ist ein Grundpfeiler in der Entwicklung neuer, gezielter Therapien. Die Diagnostik von EBV+ und MSI Magentumoren ist in Anlehnung an *TCGA* etabliert und praktikabel: Die Diagnostik von MSI erfolgt über die Immunhistochemie (IHC) mithilfe von Antikörperfarbstoffen gegen DNA-Mismatch-Reparatur-Proteine. EBV-Positivität wird über EBER-in-situ-Hybridisierung getestet [3,17]. Die Differenzierung von CIN und GS stellt sich erschwert dar, denn sie erfordert die Analyse der SCNA. Bei CIN zeigen sich extensive Abweichungen [3]. Neben der SCNA-Analyse ist bisher kein vereinfachtes Verfahren, beispielsweise im Sinne eines molekularen Markers, zur Identifikation von CIN etabliert. Die unzureichende Funktion des p53-Signalweges ist als Schlüsselcharakteristikum von CIN im Magenkarzinom anzusehen. Für andere Tumorentitäten gibt es Beobachtungen, dass eine optimierte p53-IHC-Auswertung eine zuverlässige Methode darstellen kann, um *TP53*-Mutationen zu detektieren, beispielsweise im Ovarialkarzinom [92].

In der vorliegenden Studie galt es also herauszuarbeiten, ob die immunhistochemische Analyse von p53 der Detektion von CIN im Magenkarzinom dienlich sein kann. Da die klinische Anwendbarkeit der SCNA-Analysen nicht gegeben ist, wurden die vermutlichen CIN Fälle annäherungsweise definiert. Dazu diente der Vergleich mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika, welche typischerweise mit CIN assoziiert sind (siehe Abschnitt 2.2.4). Darüber hinaus ist ein Magenkarzinom mit CIN (ein Malignom mit einem hohen Mutationspotential) prädisponiert dafür, eine intratumorale Heterogenität zu entwickeln. Daher galt ein besonderes Augenmerk der intratumoralen Heterogenität der p53-Expression und des *TP53*-Mutationsstatus.

In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise auf den komplexen Zusammenhang zwischen CIN, dem *TP53*-Mutationsstatus, der p53-Expression sowie der p53-IHC. Eine geringe bis moderate p53-Immunfärbung ist meist physiologisch und in den seltensten Fällen mutationsbedingt. Beispielsweise kann die p53-Expression bei Stress, wie UV-Licht, hochreguliert und in der Immunfärbung sichtbar werden [93]. *TCGA* beschreibt *TP53*-Mutationen und den Funktionsverlust des p53-Signalweges zwar als zentrales Charakteristikum von CIN im Magenkarzinom, jedoch weisen ihrer Beobachtung nach nur ca. 71% der Tumoren mit CIN *TP53*-Mutationen auf [3]. Missense-Mutationen führen zu einem veränderten Genprodukt, welches durch seine ausbleibende Funktion im Nukleus akkumulieren und zu einer starken Immunfärbung führen kann [94]. Nonsense-Mutationen

durch Bildung eines Stop-Codons oder Leseraster-Verschiebungen können zu einem strukturell so veränderten Genprodukt führen, dass der Immunfarbstoff gegen p53 trotz Proteinakkumulation nicht binden kann [94]. *Ando et al.* konnten in einer Studie entsprechend zeigen, dass alle Magenkarzinome mit einer *TP53*-Missense-Mutation eine starke nukleäre p53-Immunfärbung aufwiesen [95]. Karzinome hingegen ohne immunhistochemischen Nachweis von p53 zeigten in ca. 80% einem *TP53*-Wildtyp und in ca. 20% eine *TP53*-Nonsense- oder *TP53*-Missense-Mutation [95]. Der vollständige Verlust einer Proteinexpression tritt bei einer Gen- oder Chromosomendeletion auf [96]. Stille Mutationen führen nicht zu einem veränderten Produkt und haben keinen Einfluss auf die p53-IHC („Wobble-Hypothese“ [97]).

Die Hypothesen der vorliegenden Studie lauten:

- (1) Die p53-IHC kann CIN Magenkarzinome abbilden. Es kann ein geeigneter Bewertungsalgorithmus der p53-IHC herausgearbeitet werden, um den „*TP53*-mutationsbedingten p53-Expressionstyp“ [92,95,98–100] möglichst wahrheitsgetreu zu definieren (*Abbildung 4*).
- (2) Die p53-Expression ist insbesondere im CIN Magenkarzinom heterogen.

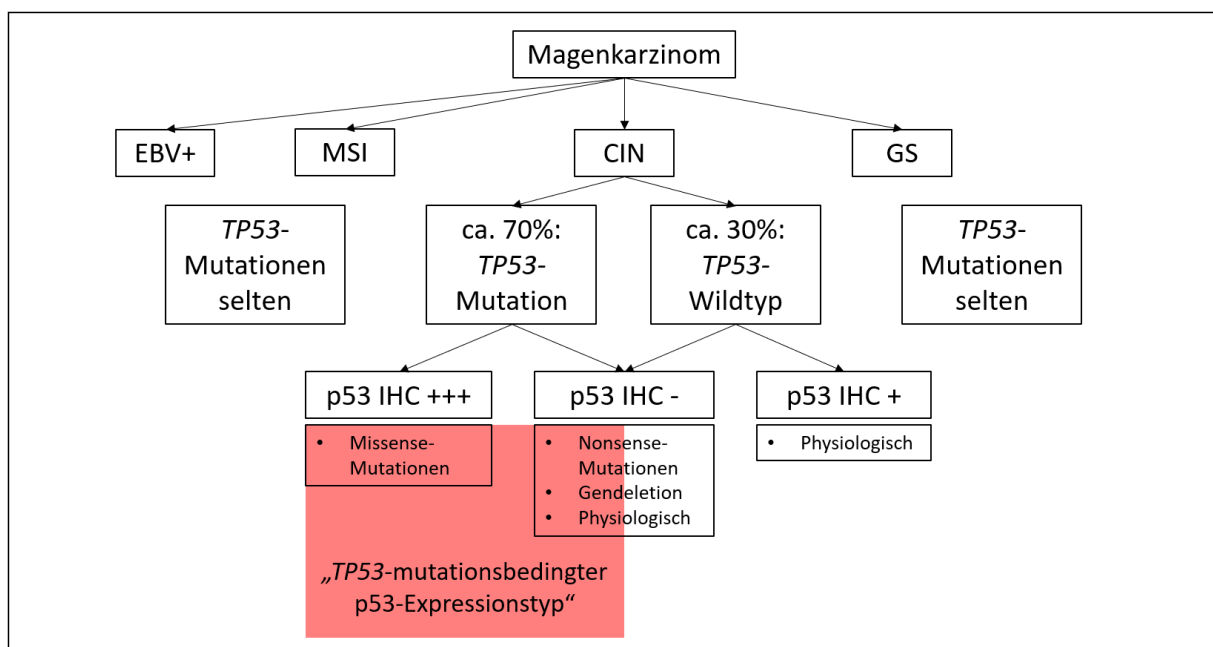


Abbildung 4: Übersicht zum Studiendesign. Bekannte Zusammenhänge von CIN, *TP53*-Mutationen und der p53-IHC. Ziel der vorliegenden Studie war die möglichst korrekte Erfassung des „*TP53*-mutationsbedingten p53-Expressionstyps“ durch einen IHC-Bewertungsalgorithmus, in der Abbildung rot markiert. Informationen nach [3,51,100].

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Ethische Grundlagen

Die vorliegende Studie wurde durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, hinsichtlich ethischer Gesichtspunkte geprüft und genehmigt. Sie steht nach der Deklaration von Helsinki in Einklang mit den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung (D 453/10).

2.1.2 Studienkollektiv

Das Studienkollektiv umfasst 467 Patienten mit Adenokarzinomen des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs, die zwischen 1997 und 2009 mit einer totalen oder partiellen Gastrektomie behandelt worden waren. Patientenfälle wurden aussortiert, wenn sich histologisch ein anderer Tumortyp als ein Adenokarzinom präsentierte oder der Patient eine neoadjuvante Chemo- und/oder Radiotherapie erhalten hatte. Alle Proben stammen aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Folgende Patientencharakteristika konnten aus der elektronischen Datenbank abgerufen werden: Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation, Tumorinvasionstiefe, Anzahl der entfernten Lymphknoten, Anzahl der Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen, Erkrankungsstadium, Lymphgefäßinvasion, Gefäßinfiltration, Grading und Residualtumor-Status. Alle vier Subtypen waren nach der Klassifikation von *TCGA* in der Kohorte vertreten [3], darunter 19 EBV-positive und 34 MSI Tumoren. Die Follow-Up- und Sterbedaten der Patienten stammten aus dem epidemiologischen Krebsregister von Schleswig-Holstein, aus Krankenhausakten und von den betreuenden Ärzten. Das letzte vorliegende Diagnosedatum stammt aus dem Jahr 2009, die letzte Abfrage der Überlebensdaten erfolgte im Jahr 2013. Alle verwendeten Patientendaten wurden nach dem Studieneinschluss pseudonymisiert. Die Auswertung erfolgte nur noch in kumulativer und damit anonymisierter Form.

Untersucht wurden 467 Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete (FFPE) Ganzgewebeschnitte. Pro Patient wurde jeweils eine Ganzgewebeprobe aus dem Primärtumor-Resektat untersucht.

2.1.3 Geräte

Für die fachgerechte Verwendung der Geräte, Chemikalien und Reagenzien wurden passende, nicht näher aufgeführte Einmal- und Verbrauchsmaterialien verwendet.

Für die **immunhistochemische Untersuchung** der p53-Expression wurden die folgenden Geräte genutzt: *Bond Max Autostainer* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), *Leica DM 1000 Lichtmikroskop* (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), *Leica SCN400 Scanner* (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland).

Für die **genetischen Analysen von TP53** wurden die folgenden Geräte verwendet: *C1000 Touch Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA), *Gelelektrophorese-System* (Scie-Plas, Cambridge, UK), *Heraeus Biofuge pico* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), *Heraeus Biofuge stratos* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), *Heraeus Pico 17 Centrifuge* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), *Lab dance vario* (IKA-Werke GmbH u. Co. KG, Staufen, Deutschland), *Mini-Zentrifuge* (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), *Mikrozentrifuge* (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), *Molecular Imager Gel Doc XR+* (Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA), *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), *Reagenzglas-Vortex-Schüttler* (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), *Thermomixer 5436* (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), *3500 Series Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), Pipetten unterschiedlicher Größe (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Für die **immunhistochemische Untersuchung** der p53-Expression wurden die folgenden Chemikalien und Reagenzien eingesetzt: Monoklonaler Antikörper gegen p53 in der Verdünnung 1:100 (Klon DO-7, Novocastra, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), *Bond Polymer Refine Detection Kit DC9800* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), *ER1 antigen retrieval solution* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), Hämatoxylin.

Für die **genetischen Analysen von TP53** wurden die folgenden Chemikalien und Reagenzien verwendet: *TP53* Primer (Biomers GmbH, Ulm, Deutschland, *Tabelle 3*), *AllPrep DNA/RNA FFPE Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), *BigDye® Terminator v1.1 Cycle sequencing kit* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Litauen), Ethanol, LE Argarose (Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland), nukleasefreies Wasser (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), *Nucleo SEQ® kit* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), *PyroMark PCR kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), *QIAamp DNA Mini kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), *QIAquick® 96 PCR Purification kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), Xylol.

Tabelle 3: Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer der Exons 4 bis 7 von *TP53*. Hergestellt von Biomers nach Empfehlung der IARC (engl. *International Agency for Research on Cancer International*).

Exon	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
4	5' tgctcttttcacccatctac 3'	5' atacggccaggcattgaagt 3'
5	5' ttcaactctgtctccttct 3'	5' cagccctgtcgtctctccag 3'
6	5' gcctctgattcctcactgat 3'	5' ttaaccctcctcccagaga 3'
7	5' aggcgcactggcctcatctt 3'	5' tgtgcagggtggcaagtggc 3'
8	5' ttccttactgcctcttgctt 3'	5' aggcataactgcacccttg 3'
9	5' gacaagaagcgggtggag 3'	5' cggcattttgagtgttagac 3'
10	5' caattgtaactgaaccatc 3'	5' ggatgagaatggaatcctat 3'

2.1.5 Software

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde folgende Software verwendet: *Citavi 5.7 für Windows* (Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz), *Cosmic and IARC TP53 data set*, *Microsoft® Windows 7 und 10* (IBM GmbH, Unterschleißheim, Deutschland), *Finch TV version 4 software* (Digital World Biology, Seattle, WA, USA), *reference coding sequence (CCDS 11118.1)* (Serial Cloner 2.1), *Image Lab Software* (Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA), *IBM SPSS Statistics 24 für Windows* (IBM GmbH, Ehningen, Deutschland), *Leica SCN400 Client* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), *Microsoft® Excel 2016* (IBM GmbH, Unterschleißheim, Deutschland), *Microsoft® Word 2016 MSO* (IBM GmbH, Unterschleißheim, Deutschland), *NanoDrop 2000/2000c* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

2.2 Methoden

2.2.1 Erhebung der klinisch-pathologischen Patientencharakteristika

Die Einteilung der Fälle in ein pTNM-Stadium basiert auf der achten Edition der UICC-Richtlinien [43]. Die Einteilung in histologische Subtypen erfolgte nach der Laurén-Klassifikation [46].

Folgende klinisch-pathologische Patientencharakteristika wurden im Rahmen vorausgehender Studien am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, bestimmt. Eine Schleimhautbesiedlung mit *H. pylori* wurde histologisch mithilfe einer modifizierten Giemsa-Färbung festgestellt oder das *H. pylori*-spezifische 16S rRNA Gen per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen [101]. Epstein-Barr-Virus-kodierende RNA wurde mittels „EBER probe“ und „BondMax detection system“ nach Hersteller-Anweisung detektiert (Novocastra, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) [102]. Der MS-Status wurde mittels IHC gegen MLH1, PMS2, MSH2 und MSH6 analysiert. Bei Schnitten mit reduzierter oder fehlender nuklearer Färbung wurde anschließend ein Vergleich der Allel-Profile der „mononucleotide repeat markers“ BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 und NR-27 im Tumor und im korrespondierenden Normalgewebe durchgeführt [103]. Die Analyse von HER2 erfolgte mittels IHC und chromogener In-situ-Hybridisierung [104]. Der MET-Status wurde ebenfalls anhand von IHC und chromogener In-situ-Hybridisierung bestimmt [105].

2.2.2 Immunhistochemische Färbung

Zur immunhistochemischen Färbung wurden monoklonale Antikörper gegen p53 verwendet. Zur Antigendemaskierung wurde die *ER1 antigen retrieval solution* genutzt (20 Min., pH 6.0; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Die Blockierung der Gewebs-Peroxidase erfolgte mithilfe des *Bond Polymer Refine Detection Kit DC9800* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Für die Gegenfärbung wurde Hämatoxylin verwendet. Die Immunfärbung erfolgte automatisiert mithilfe des *Bond Max Autostainer* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) nach Herstelleranweisung.

2.2.3 Mikroskopische Auswertung

2.2.3.1 Erhebung des Histoscore-Wertes

Die Ausprägung der p53-Immunfärbung in den Zellkernen der Tumorzellen wurde mikroskopisch analysiert. Den Tumorzellkernen wurde ein Immunfärb-Intensitätswert auf einer semiquantitativen Skala von „null“ bis „drei“ zugeordnet. Zellkerne ohne p53-Proteinfärbung erhielten einen Zahlenwert von „null“ (0). Zellkernen mit einer schwach positiven Immunfärbung wurde ein Zahlenwert von „eins“ (1), mit einer mäßig positiven Immunfärbung ein Wert von „zwei“ (2) und mit einer stark positiven Immunfärbung ein Wert von „drei“ (3) zugeordnet (*Abbildung 5*).

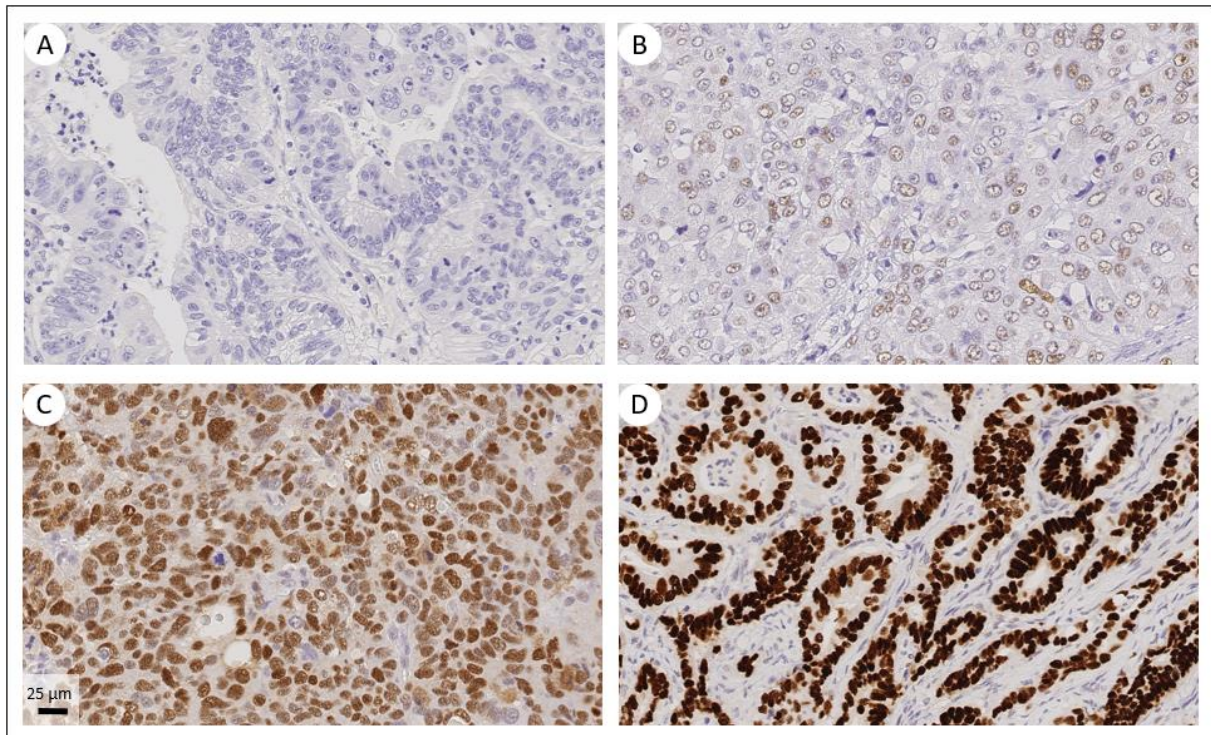


Abbildung 5: Referenzschnitte der p53-Färbintensitäten. A keine Färbung (0), B schwache Färbung (1), C moderate Färbung (2), D starke Färbung (3). A-D 400x vergrößert.

Für jeden Tumorschnitt wurde der prozentuale Anteil an Tumorzellen erhoben, deren Kerne in der jeweiligen Intensität gefärbt erschienen. Aus den Prozentanteilen der Färbeintensitäten wurde ein HistoScorewert (HScore) errechnet. Die verwendete Formel ($\text{HScore} = [0 \times \text{prozentualer Anteil immun-negativer Tumorzellkerne}] + [1 \times \text{prozentualer Anteil schwach gefärbter Tumorzellkerne}] + [2 \times \text{prozentualer Anteil moderat gefärbter Tumorzellkerne}] + [3 \times \text{prozentualer Anteil stark gefärbter Tumorzellkerne}]$) konnte für jeden Schnitt einen möglichen Wert zwischen 0 und 300 ergeben. Exemplarisch würde ein Schnitt ohne gefärbte Zellkerne einen HScore von 0 erhalten. Ein Schnitt, bei dem alle Tumorzellkerne stark (Intensitätsstufe 3) gefärbt sind, würde einen HScore von 300 erhalten: $(0 \times 0) + (1 \times 0) + (2 \times 0) + (3 \times 100) = 300$.

2.2.3.2 Erstellung von p53-IHC-Bewertungsalgorithmen

Es wurden verschiedene Bewertungsalgorithmen der p53-IHC angewendet, um den „TP53-mutationsbedingten p53-Expressionstyp“ zu erkennen. Die verschiedenen Algorithmen basieren auf den errechneten HScores oder auf den prozentualen Anteilen immunnegativer (0) und stark immunpositiver (3) Tumorzellkerne (*Abbildung 6*).

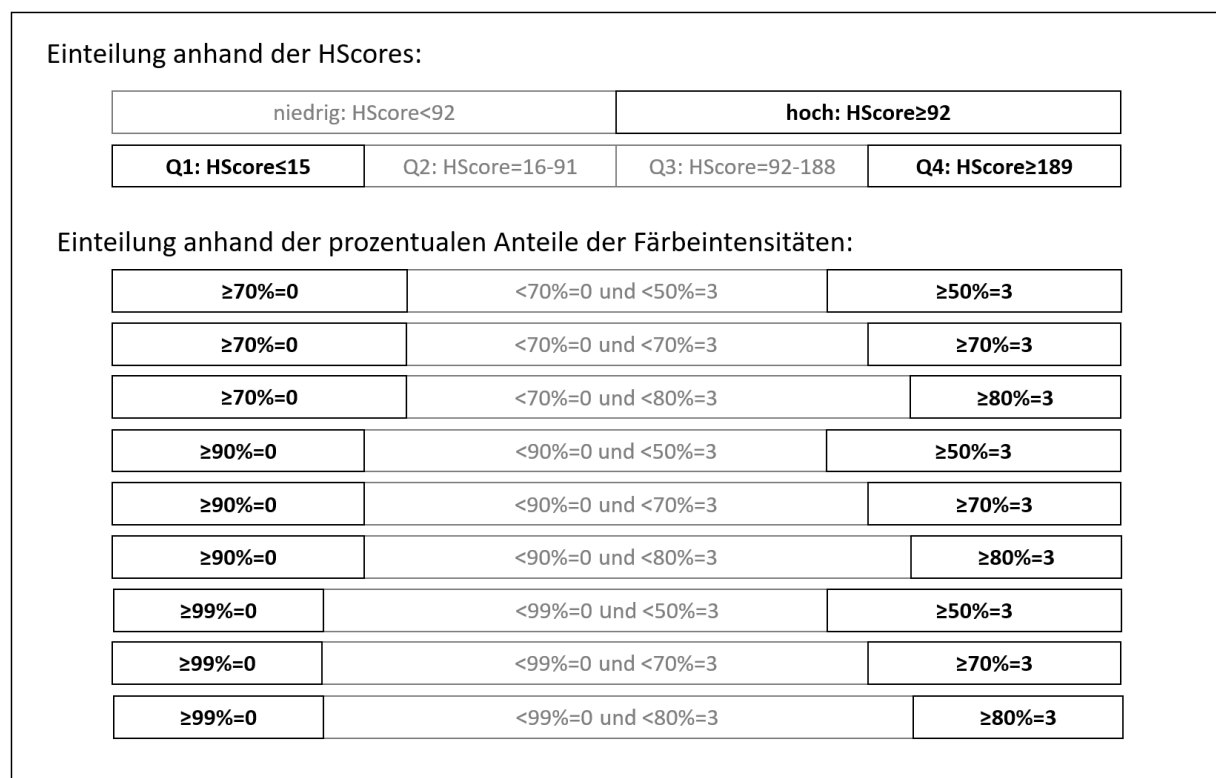


Abbildung 6: Schema der untersuchten Algorithmen zur Einteilung der Studienkohorte. Die schwarz umrandeten Abschnitte sollten den „TP53-mutationsbedingten p53-Expressionstyp“ abbilden.

Der erste Algorithmus definierte den „*TP53*-mutationsbedingten p53-Expressionstyp“ über den Median (HScore=92) der HScores. Karzinome mit niedrigen HScores wurden der Gruppe „niedrig“ (HScore<92) und Karzinome mit hohen HScores der Gruppe „hoch“ (HScore≥92) zugeordnet. Die Gruppe „hoch“ sollte *TP53*-mutierte Magenkarzinome abbilden.

Der zweite Algorithmus teilte die Kohorte anhand des HScores an den Quartil-Grenzen ein. Tumoren mit HScores aus dem zweiten Quartil (Q2: HScore=16-91) und aus dem dritten Quartil (Q3: HScore=92-188) wurden zu der Gruppe „Q2+Q3“ zusammengefasst. Karzinome mit HScores aus dem ersten Quartil (Q1: HScore≤15) und aus dem vierten Quartil (Q4: HScore≥189) bildeten zusammen die Gruppe „Q1+Q4“. Die Gruppe „Q1+Q4“ sollte Magenkarzinome mit *TP53*-Mutationen erfassen.

Anschließend wurden Bewertungsalgorithmen der IHC mithilfe der prozentualen Anteile an ungefärbten (Intensitätsstufe 0) und stark gefärbten (Intensitätsstufe 3) Tumorzellkernen erstellt. In verschiedenen Kombinationen wurden Karzinome mit vielen ungefärbten (mindestens 70%, 90% oder 99%) oder vielen stark gefärbten (mindestens 50%, 70% oder 80%) Zellkernen zusammengefasst, um den „*TP53*-mutationsbedingten p53-Expressionstyp“ zu erkennen. Exemplarisch wurde eine Gruppe mit mindestens 70% ungefärbten oder mindestens 50% stark gefärbten Zellkernen als „≥70%=0 oder ≥50%=3“ bezeichnet und gegen den Rest der Kohorte „<70%=0 und <50%=3“ abgegrenzt. Die folgenden neun Gruppen sollten *TP53*-mutierte Magenkarzinome abbilden: „≥70%=0 oder ≥50%=3“, „≥70%=0 oder ≥70%=3“, „≥70%=0 oder ≥80%=3“, „≥90%=0 oder ≥50%=3“, „≥90%=0 oder ≥70%=3“, „≥90%=0 oder ≥80%=3“, „≥99%=0 oder ≥50%=3“, „≥99%=0 oder ≥70%=3“ und „≥99%=0 oder ≥80%=3“. Alle neun Bewertungsalgorithmen wurden im Verlauf mit dem Laurén-Phänotyp, EBV-, MS-, HER2- und MET-Status korreliert (Tabellen 5-7 im Anhang). Nur der Algorithmus „≥90%=0 oder ≥50%=3 vs. <90%=0 und <50%=3“ wurde anschließend mit weiteren klinisch-pathologischen Charakteristika, den Überlebensdaten und den Ergebnissen der *TP53*-Mutationsanalysen verglichen (Tabelle 4).

2.2.3.3 Bestimmung des p53-Färbemusters

Bei allen 467 Fällen wurde das intratumorale Färbemuster der p53-IHC bewertet. Hierbei wurde zwischen „homogen“ und „heterogen“ unterschieden. Die nähere Beschreibung erfolgte nach einem erweiterten „Schwarz-Weiß-Schema“. „Schwarz“ bezeichnete Tumoreale mit positiven, gleichmäßig in den Intensitäten (1), (2) und (3) gefärbten Zellkernen. „Grau“ beschrieb positive Tumoreale, bei denen ungefärbte und in verschiedenen Intensitäten gefärbte Zellkerne nebeneinander zu beobachten waren. „Weiß“ benannte gleichmäßig p53-negative Tumorbereiche, deren Tumorzellkerne zu über 90% eine Intensität von (0) aufwiesen.

Schnitte, deren gesamtes Tumorgewebe in „schwarz“, „grau“ oder „weiß“ erschien, wurden als „homogen“ bezeichnet. „Heterogen“ bezeichnete Tumorgewebe mit unterschiedlich gefärbten Arealen innerhalb desselben Schnittes. Heterogene Fälle konnten sich somit als „schwarz-weiß“, „schwarz-grau“, „grau-weiß“ oder „schwarz-weiß-grau“ präsentieren (Abbildung 7).

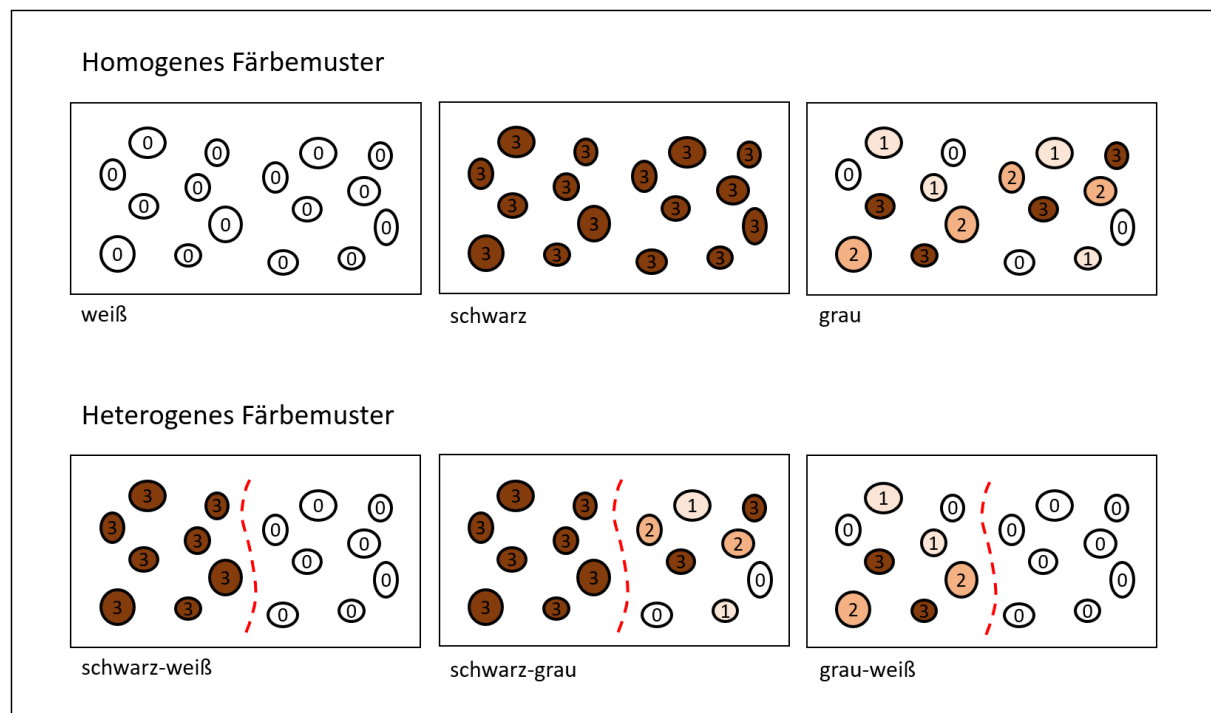


Abbildung 7: Schema des p53-Färbemusters. Ein homogenes Färbemuster kann als „weiß“ mit ungefärbten Tumorzellkernen, als „schwarz“ mit positiven Zellkernen in der gleichen Intensität, oder als „grau“ mit unterschiedlich gefärbten Tumorzellkernen auftreten. Ein heterogenes Färbemuster zeigt unterschiedlich gefärbte Areale, beispielsweise in den Ausprägungen „schwarz-weiß“, „schwarz-grau“ oder „grau-weiß“.

2.2.4 Definition der mutmaßlichen CIN- und GS-Fälle

Da die Analyse der SCNA zur Diagnostik von CIN Magenkarzinomen im Rahmen dieser Studie nicht möglich war, erfolgte die Unterscheidung der MSS/ EBV-negativen Fälle in mutmaßliche CIN und GS Fälle nur annäherungsweise. Im Folgenden werden MSS/EBV-negative Fälle mit einem histomorphologisch intestinalen Phänotyp und einem positiven HER2/MET-Status im Rahmen dieser Studie als CIN definiert und als CIN* bezeichnet. Analog werden MSS/EBV-negative Fälle mit einem histomorphologisch diffusen Phänotyp sowie mit negativem HER2/MET-Status als GS definiert und als GS* bezeichnet.

2.2.5 Genetische Analysen von *TP53*

Die Fälle für die Validierungskohorte waren EBV-negativ und mikrosatellitenstabil (MSS). Die Auswahl der Fälle erfolgte anhand des Laurén-Phänotyps, sowie des HER2- und MET-Status. *TP53* wurde in 34 CIN* und 69 GS* Magenkarzinomen analysiert. Zusätzlich wurden 13 Fälle mit einem heterogenen Muster analysiert, bei denen die Analyse in beiden Arealen getrennt durchgeführt werden konnte. Bei den untersuchten heterogenen Fällen wurden auch MSI bzw. EBV+ Fälle miteinbezogen.

Für 39 von insgesamt 111 Magenkarzinomen wurden die genetischen Analysen von Frau Saffiyeh Saboor Maleki durchgeführt und die Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt. In der *Tabelle 8* sind die entsprechenden Fälle gekennzeichnet. Bei den gekennzeichneten Fällen wurden abweichend das *AllPrep DNA/RNA FFPE Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) zur DNA-Extraktion und das *QIAquick® 96 PCR Purification kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) zur Aufreinigung der PCR-Produkte entsprechend der Hersteller-Empfehlungen verwendet [100].

2.2.5.1 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurde das *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet.

Die Extraktion der Gesamt-DNA wurde je nach Größe des angeschnittenen Tumoreals mit ein bis sechs auf Objektträgern aufgezogenen, ungefärbten Gewebeschnitten (5-10 µm Dicke) durchgeführt. Zur Entparaffinierung wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten zunächst für 5 Min. in Xylol und anschließend für 5 Min. in 99%igem Ethanol inkubiert. Nach dem Trocknen der Proben bei Raumtemperatur

wurde mit einem Einmalskalpell das Tumorareal aus dem Schnitt scharf entfernt und eine Mitnahme von nicht-tumörösem Gewebe möglichst gering gehalten. Bei heterogenen Fällen wurde DNA aus beiden Arealen entnommen und eine Kontamination des Materials gegenseitig möglichst vermieden. Das so gewonnene Gewebe wurde in Reagiergefäße mit 180 ml Puffer ATL überführt. Danach erfolgte die Zugabe von 20 µl Proteinkinase K und die Inkubation der Proben für 2-4 Stunden bei 56 °C und 550 rpm im *Thermomixer* (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zur enzymatischen Lyse des Gewebes. Nach kurzer Zentrifugation der Reagiergefäße mithilfe der *Heraeus Pico 17 Centrifuge* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) bei 1500 x g wurden 200 µl Puffer AL zu jeder Probe hinzugefügt und durch Vortexen gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben bei 70 °C für 10 Min. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 15000 x g wurde den Proben 200 µl Ethanol (95%ig) hinzugefügt und die Mischung erfolgte durch Vortexen.

Danach konnten die Proben in die QIAamp Mini Spin-Röhrchen (enthalten Silika-beschichtete Membranen) überführt und bei 6000 x g für 1 Min. zentrifugiert werden. Vor der DNA-Elution wurden die Röhrchen zweimal mit Puffer AW1 und AW2 gewaschen und zur Trocknung bei 17000 x g für 5 Min. zentrifugiert. Zuletzt konnten 50 µl Puffer AE in die QIAamp Mini Spin-Röhrchen pipettiert werden. Nach einer Inkubation von 1 Min. bei Raumtemperatur erfolgte die letzte Zentrifugation bei 6000 x g für 1 Min. zur Gewinnung der extrahierten DNA.

2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung und Verdünnung der DNA-Proben

Die Konzentration der im Eluat enthaltenen isolierten Tumor-DNA wurde anschließend photometrisch bestimmt. Bei erfolgreicher DNA-Isolierung wurde die Stammlösung zur weiteren Verwendung mit nukleasefreiem Wasser auf 10 ng/µl verdünnt. Anschließend wurden mindestens 50 µl der verdünnten DNA-Proben für die folgenden Arbeitsschritte verwendet.

2.2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion der TP53-Exons

Die TP53-Exons (4-10) wurden via *PyroMark PCR kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) unter Benutzung der entsprechenden Primer (Biomers GmbH, Ulm, Deutschland, *Tabelle 3*) amplifiziert. Die Amplifizierungsreaktion erfolgte nach 15 Min. bei 95 °C in 45 Zyklen bei 95 °C für 30 Sek., 60 °C für 30 Sek. und 72 °C für 45 Sek. Zuletzt folgten 10 Min. bei 72 °C.

2.2.5.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet.

Zunächst wurde jedes PCR-Produkt (20 µl) mit 280 µl Puffer NTI vermennt und in ein *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* Röhrchen (enthalten Silika-beschichtete Membranen) überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mithilfe der *Heraeus Biofuge pico* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) für 1 Min. bei 10,7 x 1000 rpm. Zum Waschen der Silika-Membranen der Röhrchen wurden zweimal 700 µl Puffer NT3 verwendet und die Röhrchen für jeweils 30 Sek. bei 10,7 x 1000 rpm zentrifugiert. Zum Trocknen der Silika-Membranen erfolgte anschließend eine Zentrifugation bei 10,7 x 1000 rpm für 1 Min. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde nach allen Arbeitsschritten verworfen. Zum Schluss wurden 40 µl Puffer NE in jedes Röhrchen hinzugefügt und für 1 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA zu eluieren. Zum Erhalt der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte eine Zentrifugation bei 10,7 x 1000 rpm für 1 Min. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit 40 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt.

2.2.5.5 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

In einer Gelelektrophorese wurden DNA-Reinheit und -Quantität der PCR-Produkte überprüft und bei fehlender oder schwacher Bande die PCR gegebenenfalls wiederholt (*Abbildung 8*).

2.2.5.6 Sequenzierungsreaktion der TP53-Exons

Die Sequenzierung der TP53-Exons erfolgte mithilfe des *BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing kit* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Litauen). 1 µl von jedem PCR-Produkt wurde zu einer Mischung bestehend aus 2µl *BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Mix*, 2 µl *BigDye Terminator v1.1 Sequencing Puffer*, 14,5 µl RNase/DNase-freiem Wasser und entweder 0,5 µl von dem entsprechenden Vorwärts- oder Rückwärtsprimer (3,2 pmol) hinzugefügt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte dann nach 5 Min. bei 95 °C in 27 Zyklen bei 96 °C für 20 Sek., 50 °C für 10 Sek. und 60 °C für 4 Min.

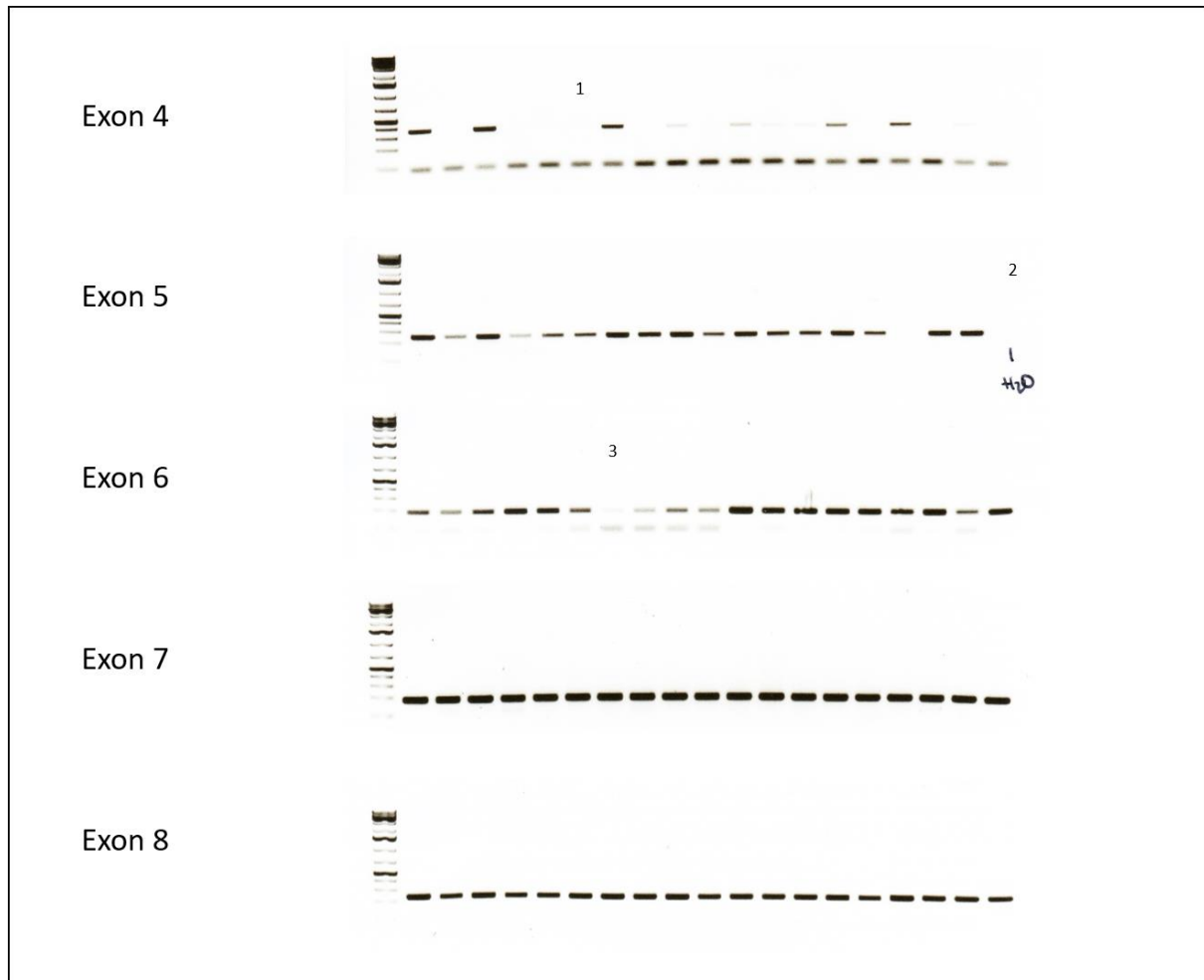


Abbildung 8: Beispiele für Gelelektrophoresen der PCR-Produkte verschiedener Exons. Exemplarisch 1 kein PCR-Produkt, 2 negativ-Probe, 3 zu wenig PCR-Produkt.

2.2.5.7 Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte

Die Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte geschah mithilfe des *Nucleo SEQ® kit* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland).

Zunächst erfolgte eine kurze Zentrifugation der Harz-gefüllten Röhrchen bei $2,9 \times 1000$ rpm für 30 Sek. mithilfe der *Heraeus Biofuge pico* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Anschließend wurden in jedes Röhrchen jeweils 600 µl nukleasefreies Wasser hinzugefügt und durch Vortexen mit dem Pulver möglichst Luftbläschen-frei vermischt. Das hydrierte Gel wurde zum Quellen für ca. 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem der Boden jedes Röhrchens geöffnet wurde, wurden die Röhrchen bei $2,9 \times 1000$ rpm für 2 Min. zentrifugiert, um das überschüssige Wasser zu entfernen. Die freigewordene Flüssigkeit wurde verworfen. Anschließend wurden 20 µl der Sequenzierprodukte zu jedem Röhrchen hinzugefügt und es erfolgte die abschließende Zentrifugation bei $2,9 \times 1000$ rpm für 5 Min.

2.2.5.8 TP53-Genanalyse

Die Sequenzierung der *TP53*-Exons erfolgte per Kapillarelektrophorese im *3500 Series Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Die Elektropherogramme wurden mithilfe der *Finch TV version 4 software* (Digital World Biology, Seattle, WA, USA) ausgewertet (zu den *TP53*-Wildtyp-Sequenzen siehe *Anhang A.1*). Mögliche Mutationen wurden anhand der *reference coding sequence* (CCDS 11118.1) (Serial Cloner 2.1) abgeglichen. Der Mutationstypus wurde mithilfe des *Cosmic and IARC TP53 data sets* bestimmt.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des *SPSS, Version 25.0.0.2* (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Assoziationen zwischen nominalen Variablen wurden durch den Fisher's Exact Test errechnet. Bei ordinalen Variablen wurde der Kendall's tau Test verwendet. Ein Signifikanzlevel von 0,05 wurde angenommen. Um die FDR (engl. false discovery rate, Falscherkennungsrate) auszugleichen, wurde das Verfahren nach Simes (Benjamini-Hochberg) angewandt [106].

Die Kaplan-Meier-Methode wurde mit einem Konfidenz-Intervall von 95% zur Analyse des Gesamt- und tumorspezifischen Überlebens genutzt. Unterschiede zwischen den Überlebenskurven wurde durch den Log-rank Test geprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Ergebnisse

Insgesamt erfüllten 467 Patienten die Studienkriterien. Pro Patientenfall wurde vom OP-Resektat ein Schnitt für die vorliegende Studie verwendet. Die klinisch-pathologischen Patientencharakteristika sind in *Tabelle 4* zusammengefasst. 181 (38,8%) Patienten waren weiblich, 286 (61,2%) männlich. Die Altersgruppe der über 68-Jährigen beinhaltete 232 (49,7%) Patienten, 235 (50,3%) Patienten waren 68 Jahre alt oder jünger.

Unter den 467 Patientenproben befanden sich 19 EBV-positive Fälle, in 14 Fällen war der EBV-Status unbekannt, 34 Fälle waren MSI, der MS-Status war in 16 Fällen unbekannt (siehe Abschnitt 2.2.1). Nach der Laurén-Klassifikation konnten 149 Fälle dem diffusen Phänotyp zugeordnet werden, während 318 Fälle phänotypisch intestinal, gemischt oder unklassifizierbar waren [46]. Unter Berücksichtigung aller Überschneidungen in dieser Kohorte waren 245 sowohl EBV-negativ, MSS und nicht-diffus (*Abbildung 10*).

Die Informationen zum Gesamt-Überleben waren bei 455 (97,4%) von 467 Fällen verfügbar, die Informationen zum tumorspezifischen Überleben bei 426 (91,2%) von 467 Fällen. Die mittlere Beobachtungszeit betrug 12,8 Monate (Umfang 0 bis 142,7 Monate). Das mittlere Gesamtüberleben betrug 14,9 Monate und das mittlere tumorspezifische Überleben lag bei 16,6 Monaten.

3.2 Hauptanalyse

3.2.1 Mikroskopische Auswertung

Eine immunhistochemische p53-Färbung zeigte sich in Tumorzellen, nicht-neoplastischen Mukosazellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Lymphozyten. Bei der mikroskopischen Auswertung der Schnitte waren unter den 467 Fällen 442 (94,6%) p53-immunpositiv, während 25 (5,4%) komplett p53-immunnegativ waren. In 117 (25,1%) Fällen waren mindestens 90% der Tumorzellen homogen p53-immunnegativ. Der prozentuale Anteil an gefärbten Tumorzellen reichte von 0% bis 100% (Median 50,0%). Die Immunfärbeintensitäten reichten von 0 (nicht gefärbt) bis 3 (stark gefärbt). Der aus den Prozentwerten errechnete HScore reichte von 0 bis 285, mit einem Median von 92. Die p53-Expression war bei 414 (88,7%) Magenkarzinomen homogen, bei 53 (11,3%) heterogen (*Abbildungen 12 und 13*).

3.2.2 Vergleich mit klinisch-pathologischen Patientendaten

Die *Abbildung 9* zeigt die Verteilung der Fälle der Kohorte auf die Gruppen verschiedener Bewertungsalgorithmen der p53-IHC mit dem prozentualen Anteil der in verschiedenen Intensitäten gefärbten Tumorzellen und gibt einen Eindruck des Färbeverhaltens innerhalb der Studienkohorte: „hoch vs. niedrig“, „Q1+Q4 vs. Q2+Q3“ und „ $\geq 90\%=0$ oder $\geq 50\%=3$ vs. $<90\%=0$ und $<50\%=3$ “. Zur Erstellung der Bewertungsalgorithmen siehe auch *Abbildung 6*.

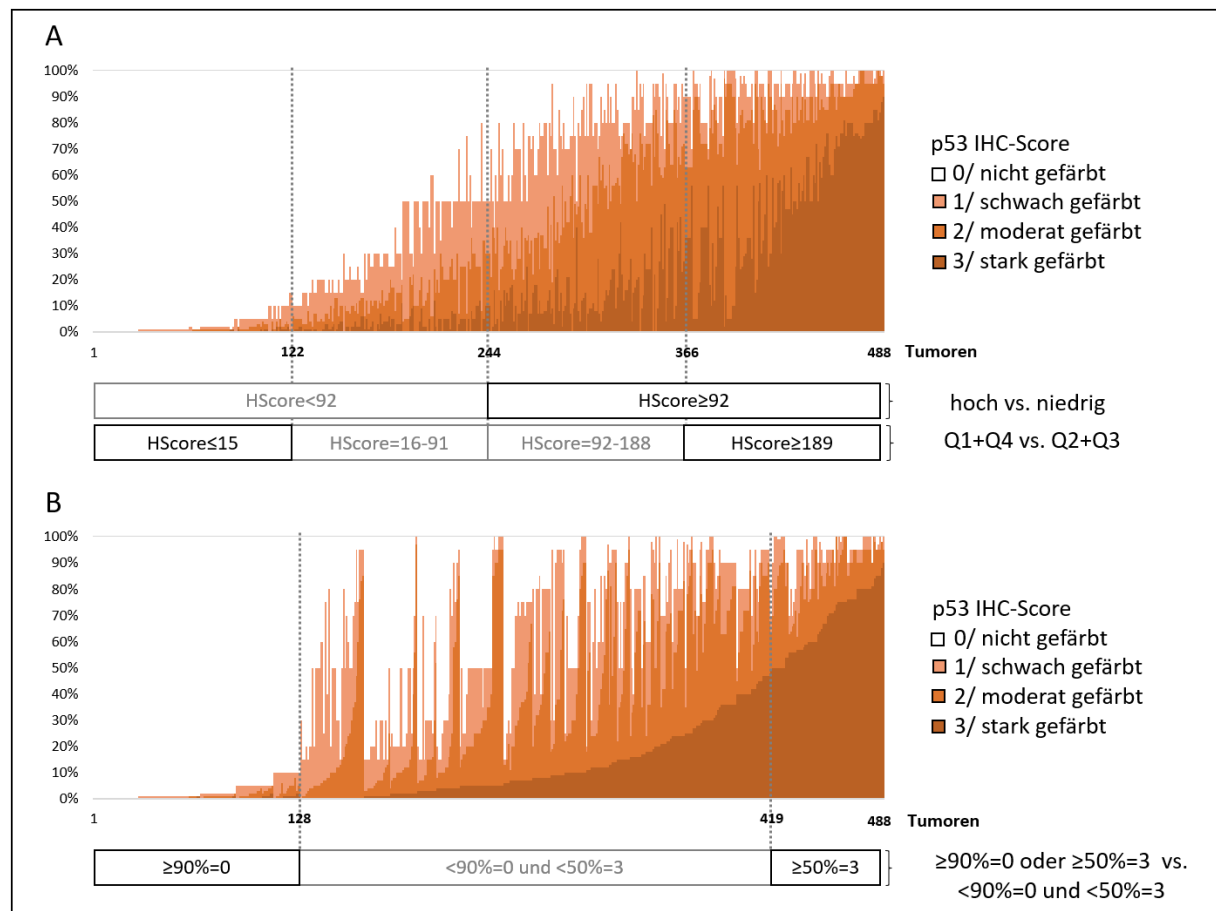


Abbildung 9: Verteilung der Kohorte in Gruppen bei verschiedenen p53-IHC-Bewertungsalgorithmen.

3.2.2.1 Erster Algorithmus: Kohorte am Median geteilt („hoch vs. niedrig“)

Bei der Dichotomierung der Kohorte am Median zeigte sich eine Korrelation des p53-IHC-Status mit dem MS-Status ($p=0,001$) und dem MET-Status ($p=0,005$). Die Gruppe „hoch“ beinhaltete mehr MSS und MET-positive Magenkarzinome. Nur der Zusammenhang mit MSS blieb nach der FDR-Korrektur bestehen (*Tabelle 4*). Bei der Betrachtung der 254 EBV-negativen, MSS und nicht-diffusen Magenkarzinome beinhaltete die Gruppe „niedrig“ 109 (ca. 43%) der Fälle und die Gruppe „hoch“ 145 (ca. 57%) der Fälle (*Abbildung 10*).

3.2.2.2 Zweiter Algorithmus: Kohorte in Quartile unterteilt („Q1+Q4 vs. Q2+Q3“)

Nach der Unterteilung der Kohorte anhand der HScores in Quartile wurden die inneren Quartile Q2 und Q3 und die äußeren Quartile Q1 und Q4 zusammengefasst. Hier zeigte sich ein Zusammenhang des p53-IHC-Status mit dem Laurén-Phänotyp ($p=0,041$), dem MS-Status ($p<0,001$) und dem EBV-Status ($p<0,001$). In der Gruppe „Q1+Q4“ waren mehr EBV-negative und MSS Magenkarzinome, sowie mehr Magenkarzinome mit einem intestinalen Phänotyp vertreten. Die Zusammenhänge mit dem MS-Status und dem EBV-Status blieben nach der FDR-Korrektur bestehen (Tabelle 4). Bei der Betrachtung der 254 EBV-negativen, MSS und nicht-diffusen Magenkarzinome beinhaltete die Gruppe „Q2+Q3“ 93 (ca. 37%) und die Gruppe „Q1+Q4“ 161 (ca. 63%) Fälle (Abbildung 10).

3.2.2.3 Dritter Algorithmus: Kohorte anhand der Menge ungefärbter und stark gefärbter Zellkerne eingeteilt („ $\geq 70/90/99\%=0$ oder $\geq 50/70/80\%=3$ vs. $<70/90/99\%=0$ und $<50/70/80\%=3$ “)

Die Kohorte wurde anhand der Menge an immunnegativen und stark immunpositiven Tumorzellkernen in Gruppen eingeteilt. Die Gruppe „ $\geq 70\%=0$ oder $\geq 70\%=3$ “ zeigte eine Korrelation mit dem EBV-Status ($p=0,043$). Die Einteilung „ $\geq 70\%=0$ oder $\geq 80\%=3$ “ korrelierte mit dem MS-Status ($p=0,029$) und dem MET-Status ($p=0,024$). Die Gruppe „ $\geq 90\%=0$ oder $\geq 70\%=3$ “ zeigte eine Assoziation mit dem EBV-Status ($p=0,027$). Beim Vergleich der klinisch-pathologischen Charakteristika mit der Gruppe „ $\geq 99\%=0$ oder $\geq 50\%=3$ “ war der Zusammenhang mit dem EBV-Status ($p=0,032$) und dem MS-Status ($<0,001$) signifikant. Die Gruppe „ $\geq 99\%=0$ oder $\geq 70\%=3$ “ zeigte eine Assoziation mit dem MS-Status ($p=0,004$) und dem HER2-Status ($p=0,016$). Die Einteilung „ $\geq 99\%=0$ oder $\geq 80\%=3$ “ ließ eine Korrelation mit dem MS-Status erkennen ($p=0,017$). Bei den Algorithmen „ $\geq 70\%=0$ oder $\geq 50\%=3$ “ und „ $\geq 90\%=0$ oder $\geq 80\%=3$ “ zeigten sich keine signifikanten Korrelationen mit den klinisch-pathologischen Charakteristika (Tabellen 5-7 im Anhang).

Die ausführlich untersuchte Kombination „ $\geq 90\%=0$ oder $\geq 50\%=3$ “ korrelierte mit EBV-Negativität ($p=0,007$), MSS ($p=0,017$) und darüber hinaus mit dem Grading ($p=0,035$). Kein Zusammenhang blieb nach der FDR-Korrektur bestehen (Tabelle 4). Unter den 254 EBV-negativen, MSS und nicht-diffusen Magenkarzinomen beinhaltete die Gruppe „ $<90\%=0$ oder $<50\%=3$ “ 133 (ca. 52%) Fälle und die Gruppe „ $\geq 90\%=0$ oder $\geq 50\%=3$ “ 121 (ca. 48%) Fälle (Abbildung 10).

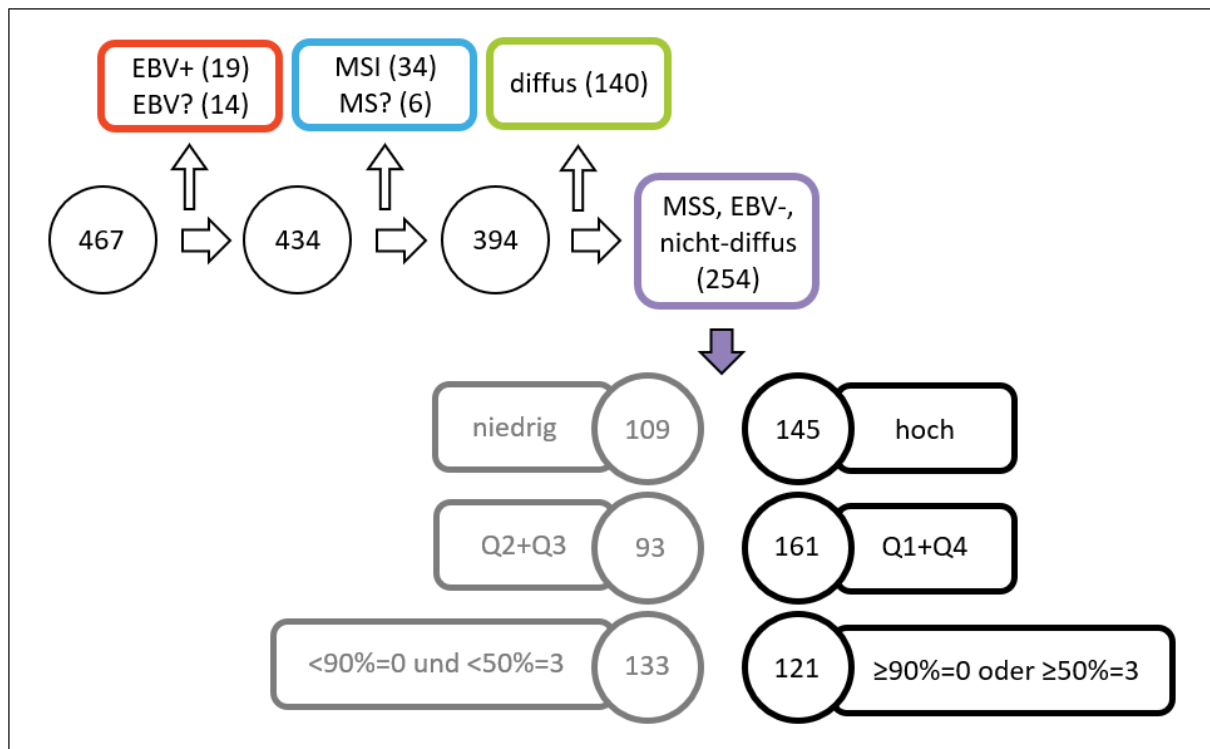


Abbildung 10: Verteilung der MSS, EBV-negativen, nicht-diffusen Fälle. Dargestellt wird die Verteilung der Magenkarzinome der untersuchten Kohorte auf die Gruppen der verschiedenen Auswertungs-Algorithmen, nachdem alle EBV-positiven, MSI und phänotypisch diffusen Fälle, sowie Fälle mit unbekanntem EBV- und MS-Status aussortiert wurden. Künstlerische Darstellung in Anlehnung an TCGA [3].

3.2.3 Vergleich mit der Überlebenszeit

Bei der statistischen Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem immunhistologisch untersuchten p53-Expressionsmuster und den klinisch-pathologischen Patienteneigenschaften wurden die drei IHC-Bewertungsalgorithmen, nämlich „hoch vs. niedrig“ (1. Algorithmus), „Q1+Q4 vs. Q2+Q3“ (2. Algorithmus) und „ $\geq 90\% = 0$ oder $\geq 50\% = 3$ vs. $< 90\% = 0$ und $< 50\% = 3$ “ (3. Algorithmus), sowie das p53-IHC-Färbemuster mit dem Gesamtüberleben und dem tumorspezifischen Überleben korreliert (*Abbildung 11*).

Die Kaplan-Meier-Analyse zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen einem der vier p53-IHC-Bewertungsalgorithmen und dem Gesamtüberleben oder dem tumorspezifischen Überleben (*Abbildung 11* und *Tabelle 4*). Zur Erstellung der Bewertungsalgorithmen siehe auch *Abbildung 6*.

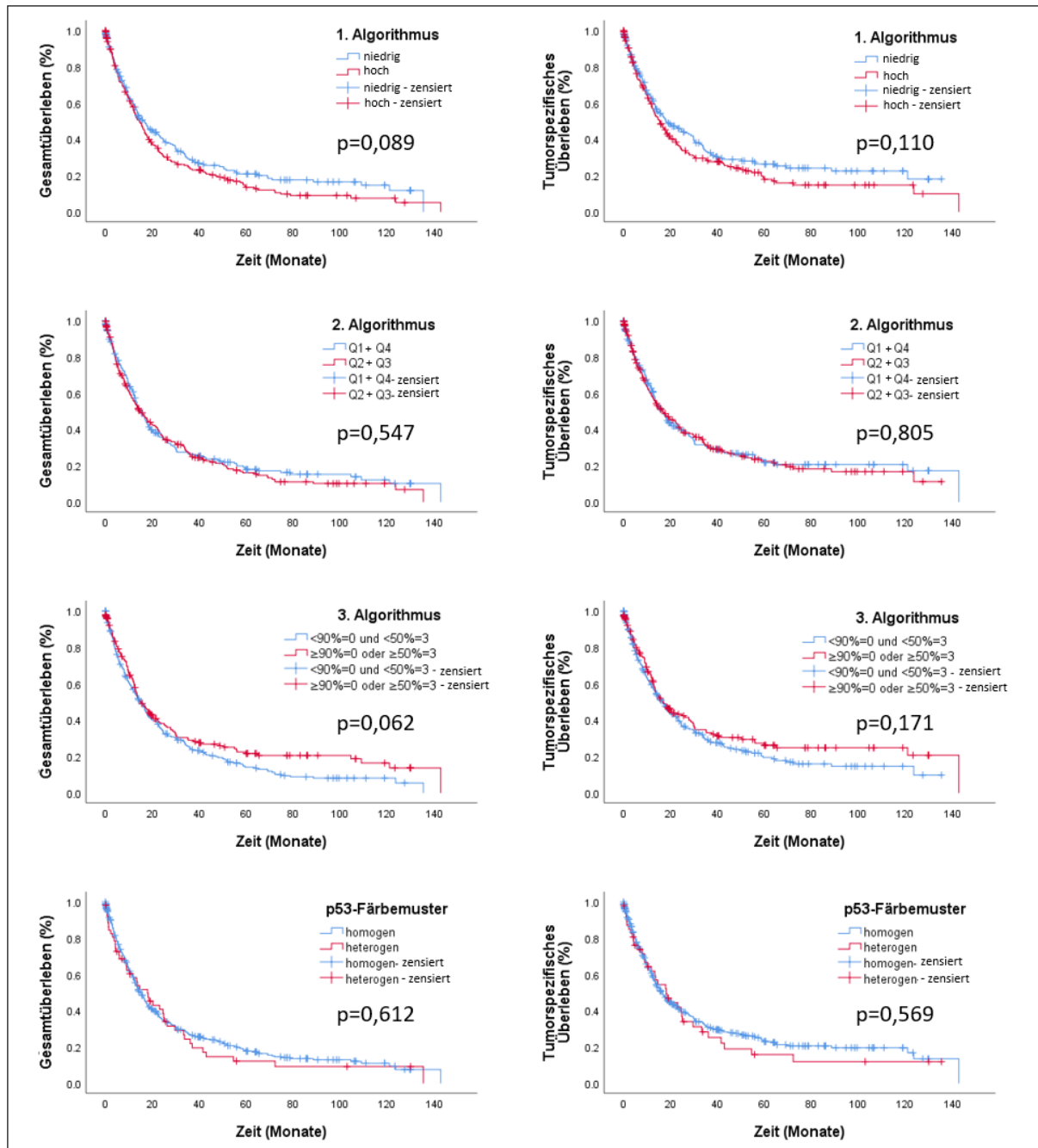


Abbildung 11: Korrelation mit dem Überleben. Die Kaplan-Meier-Analyse zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den untersuchten Bewertungsalgorithmen der p53-IHC und dem Gesamtüberleben oder dem tumorspezifischen Überleben.

Tabelle 4: Vergleich der p53-IHC mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika. (1) Fisher's Exact Test. (2) Kendall's tau Test. (3) Log-rank Test. * Signifikanz besteht nach FDR-Korrektur.

		gültig / nicht gültig [n]	hoch vs. niedrig		Q1+Q4 vs. Q2+Q3		≥90%=0 oder ≥50%=0 vs. <90%=0 und <50%=3		Muster der p53- Immunfärbung	
			niedrig	hoch	Q2+Q3	Q1+Q4	<90%=0 u. <50%=3	≥90%=0 o. ≥50%=0	homogen	heterogen
		n (%)	n	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Alter (Jahre)	p ⁽¹⁾	467 / 0	p=0,405		p=0,579		p=0,345		p=0,468	
< 68		235 (50,3)	122 (51,9)	113 (48,1)	120 (51,1)	115 (48,9)	135 (57,4)	100 (42,6)	211 (89,8)	24 (10,2)
≥ 68		232 (49,7)	111 (47,8)	121 (52,2)	112 (48,3)	120 (51,7)	144 (62,1)	88 (37,9)	203 (87,5)	29 (12,5)
Geschlecht	p ⁽¹⁾	467 / 0	p>0,999		p>0,999		p=0,628		p=0,882	
weiblich		181 (38,8)	90 (49,7)	91 (50,3)	90 (49,7)	91 (50,3)	111 (61,3)	70 (38,7)	160 (88,4)	21 (11,6)
männlich		286 (61,2)	143 (50,0)	143 (50,0)	142 (49,7)	144 (50,3)	168 (58,7)	118 (41,3)	254 (88,8)	32 (11,2)
Lokalisation	p ⁽¹⁾	466 / 1	p=0,072		p=0,368		p>0,999		p=0,529	
proximal		145 (31,1)	63 (43,4)	82 (56,6)	67 (46,2)	78 (53,8)	87 (60,0)	58 (40,0)	131 (90,3)	14 (9,7)
distal		321 (68,9)	169 (52,6)	152 (47,4)	164 (51,1)	157 (48,9)	191 (59,5)	130 (40,5)	282 (87,9)	39 (12,1)
Laurén Phänotyp	p ⁽¹⁾	467 / 0	p=0,338		p=0,041		p=0,893		p=0,222	
intestinal		238 (51,0)	115 (48,3)	123 (51,7)	103 (43,3)	135 (56,7)	138 (58,0)	100 (42,0)	208 (87,4)	30 (12,6)
diffus		149 (31,9)	82 (55,0)	67 (45,0)	85 (57,0)	64 (43,0)	92 (61,7)	57 (38,3)	138 (92,6)	11 (7,4)
gemischt		31 (6,6)	12 (38,7)	19 (61,3)	18 (58,1)	13 (41,9)	19 (61,3)	12 (38,7)	26 (83,9)	5 (16,1)
nicht klassifizierbar		49 (10,5)	24 (49,0)	25 (51,0)	26 (53,1)	23 (46,9)	30 (61,2)	19 (38,8)	42 (85,7)	7 (14,3)
pT-Kategorie	p ⁽²⁾	467 / 0	p=0,529		p=0,383		p=0,731		p=0,918	
T1a / T1b		60 (12,8)	32 (53,3)	28 (46,7)	19 (31,7)	41 (68,3)	27 (45,0)	33 (55,0)	56 (93,3)	4 (6,7)
T2		53 (11,3)	28 (52,8)	25 (47,2)	30 (56,6)	23 (43,4)	31 (58,5)	22 (41,5)	47 (88,7)	6 (11,3)
T3		184 (39,4)	90 (48,9)	94 (51,1)	100 (54,3)	84 (45,7)	126 (68,5)	58 (31,5)	157 (85,3)	27 (14,7)
T4a / T4b		170 (36,4)	83 (48,8)	87 (51,2)	83 (48,8)	87 (51,2)	95 (55,9)	75 (44,1)	154 (90,6)	16 (9,4)
pN-Kategorie	p ⁽²⁾	466 / 1	p=0,691		p=0,529		p=0,444		p=0,705	
N0		136 (29,2)	75 (55,1)	61 (44,9)	73 (53,7)	63 (46,3)	79 (58,1)	57 (41,9)	122 (89,7)	14 (10,3)
N1		63 (13,5)	27 (42,9)	36 (57,1)	25 (39,7)	38 (60,3)	35 (55,6)	28 (44,4)	57 (90,5)	6 (9,5)
N2		82 (17,6)	35 (42,7)	47 (57,3)	44 (53,7)	38 (46,3)	50 (61,0)	32 (39,0)	70 (85,4)	12 (14,6)
N3		185 (39,7)	95 (51,4)	90 (48,6)	89 (48,1)	96 (51,9)	114 (61,6)	71 (38,4)	164 (88,6)	21 (11,4)

Lymphknotenratio	p ⁽¹⁾	466 / 1	p=0,578		p=0,517		p>0,999		p>0,999	
<0,189		228 (48,9)	117 (51,3)	111 (48,7)	117 (51,3)	111 (48,7)	136 (59,6)	92 (40,4)	202 (88,6)	26 (11,4)
≥0,189		238 (51,1)	115 (48,3)	123 (51,7)	114 (47,9)	124 (52,1)	142 (59,7)	96 (40,3)	211 (88,7)	27 (11,3)
pM-Kategorie	p ⁽¹⁾	467 / 0	p=0,408		p=0,344		p=0,228		p=0,265	
M0		379 (81,2)	193 (50,9)	186 (49,1)	184 (48,5)	195 (51,5)	221 (58,3)	158 (41,7)	339 (89,4)	40 (10,6)
M1		88 (18,8)	40 (45,5)	48 (54,5)	48 (54,5)	40 (45,5)	58 (65,9)	30 (34,1)	75 (85,2)	13 (14,8)
UICC-Stadium	p ⁽²⁾	466 / 1	p=0,404		p=0,175		p=0,072		p=0,170	
IA / IB		83 (17,8)	45 (54,2)	38 (45,8)	35 (42,2)	48 (57,8)	41 (49,4)	42 (50,6)	78 (94,0)	5 (6,0)
IIA / IIB		98 (21,0)	47 (48,0)	51 (52,0)	50 (51,0)	48 (49,0)	61 (62,2)	37 (37,8)	85 (86,7)	13 (13,3)
IIIA / IIIB / IIIC		197 (42,3)	100 (50,8)	97 (49,2)	98 (49,7)	99 (50,3)	118 (59,9)	79 (40,1)	175 (88,8)	22 (11,2)
IV		88 (18,8)	40 (45,5)	48 (54,5)	48 (54,5)	40 (45,5)	58 (65,9)	30 (34,1)	75 (85,2)	13 (14,8)
pL-Kategorie	p ⁽¹⁾	449 / 18	p=0,187		p=0,637		p=0,701		p=0,465	
L0		220 (49,0)	116 (52,7)	104 (47,3)	112 (50,9)	108 (49,1)	129 (58,6)	91 (41,4)	192 (87,3)	28 (12,7)
L1		229 (51,0)	106 (46,3)	123 (53,7)	111 (48,5)	118 (51,5)	139 (60,7)	90 (39,3)	205 (89,5)	24 (10,5)
pV-Kategorie	p ⁽¹⁾	448 / 19	p=0,763		p=0,546		p=0,645		p=0,815	
V0		399 (89,1)	200 (50,1)	199 (49,9)	200 (50,1)	199 (49,9)	235 (58,9)	164 (41,1)	353 (88,5)	46 (11,5)
V1		49 (10,9)	23 (46,9)	26 (53,1)	22 (44,9)	27 (55,1)	31 (63,3)	18 (36,7)	43 (87,8)	6 (12,2)
Grading	p ⁽¹⁾	467 / 0	p=0,128		p=0,064		p=0,035		p=0,392	
G1 / G2		110 (23,6)	62 (56,4)	48 (43,6)	46 (41,8)	64 (58,2)	56 (50,9)	54 (49,1)	95 (86,4)	15 (13,6)
G3 / G4		357 (76,4)	171 (47,9)	186 (52,1)	186 (52,1)	171 (47,9)	223 (62,5)	134 (37,5)	319 (89,4)	38 (10,6)
R-Status	p ⁽¹⁾	464 / 3	p=0,674		p=0,889		p>0,999		p=0,827	
R0		406 (87,5)	205 (50,5)	201 (49,5)	202 (49,8)	204 (50,2)	242 (59,6)	164 (40,4)	360 (88,7)	46 (11,3)
R1		58 (12,5)	27 (46,6)	31 (53,4)	28 (48,3)	30 (51,7)	35 (60,3)	23 (39,7)	51 (87,9)	7 (12,1)
H. pylori-Status	p ⁽¹⁾	396 / 71	p=0,579		p=0,890		p=0,322		p=0,108	
negativ		335 (84,6)	174 (51,9)	161 (48,1)	165 (49,3)	170 (50,7)	194 (57,9)	141 (42,1)	304 (90,7)	31 (9,3)
positiv		61 (15,4)	29 (47,5)	32 (52,5)	31 (50,8)	30 (49,2)	40 (65,6)	21 (34,4)	51 (83,6)	10 (16,4)
EBV-Status	p ⁽¹⁾	453 / 14	p=0,490		p<0,001*		p=0,007		p=0,146	
negativ		434 (95,8)	213 (49,1)	221 (50,9)	205 (47,2)	229 (52,8)	252 (58,1)	182 (41,9)	388 (89,4)	46 (10,6)
positiv		19 (4,2)	11 (57,9)	8 (42,1)	17 (89,5)	2 (10,5)	17 (89,5)	2 (10,5)	15 (78,9)	4 (21,1)

MS-Status	p ⁽¹⁾	451 / 16	p=0,001*		p<0,001*		p=0,017		p=0,574	
MSS		417 (92,5)	197 (47,2)	220 (52,8)	194 (46,5)	223 (53,5)	241 (57,8)	176 (42,2)	370 (88,7)	47 (11,3)
MSI		34 (7,5)	26 (76,5)	8 (23,5)	27 (79,4)	7 (20,6)	27 (79,4)	7 (20,6)	29 (85,3)	5 (14,7)
HER2-Status	p ⁽¹⁾	437 / 30	p=0,296		p=0,223		p=0,109		p=0,290	
negativ		401 (91,8)	198 (49,4)	203 (50,6)	204 (50,9)	197 (49,1)	247 (61,6)	154 (38,4)	356 (88,8)	45 (11,2)
positiv		36 (8,2)	14 (38,9)	22 (61,1)	14 (38,9)	22 (61,1)	17 (47,2)	19 (52,8)	30 (83,3)	6 (16,7)
MET-Status	p ⁽¹⁾	455 / 12	p=0,005		p=0,278		p=0,456		p>0,999	
negativ		423 (93,0)	217 (51,3)	206 (48,7)	215 (50,8)	208 (49,2)	256 (60,5)	167 (39,5)	374 (88,4)	49 (11,6)
positiv		32 (7,0)	8 (25,0)	24 (75,0)	13 (40,6)	19 (59,4)	17 (53,1)	15 (46,9)	29 (90,6)	3 (9,4)
TP53-Mutationsstatus	p ⁽¹⁾	111 / 356	p<0,001*		p=0,101		p=0,210		p=0,101	
Wildtyp		75 (67,6)	49 (65,3)	26 (34,7)	47 (62,7)	28 (37,3)	50 (66,7)	25 (33,3)	66 (88,0)	9 (12,0)
mutiert		36 (32,4)	10 (27,8)	26 (72,2)	16 (44,4)	20 (55,6)	19 (52,8)	17 (47,2)	27 (75,0)	9 (25,0)
p53-IHC-Muster	p ⁽¹⁾	467 / 0	p=0,243		p<0,001*		p=0,037			
homogen		414 (88,7)	211 (51,0)	203 (49,0)	192 (46,4)	222 (53,6)	240 (58,0)	174 (42,0)		
heterogen		53 (11,3)	22 (41,5)	31 (58,5)	40 (75,5)	13 (24,5)	39 (73,6)	14 (26,4)		
Gesamtüberleben (Monate)	p ⁽³⁾		p=0,089		p=0,547		p=0,062		p=0,612	
Gesamt/Ereignisse/Zensiert		455/352/103	226/163/63	229/189/40	225/178/47	230/174/56	273/223/50	182/129/53	403/309/94	52/43/9
Mittlere Überlebenszeit		14,9 ± 1,1	16,5 ± 2,1	14,6 ± 1,3	14,6 ± 1,9	15,0 ± 1,4	14,7 ± 1,5	15,0 ± 1,9	14,7 ± 1,1	17,9 ± 3,8
95% C.I.		12,7 - 17,0	12,5 - 20,6	12,0 - 17,2	10,8 - 18,4	12,2 - 17,7	11,7 - 17,7	11,2 - 18,8	12,5 - 16,9	10,5 - 25,4
Tumorspezifisches Überleben (Monate)	p ⁽³⁾		p=0,110		p=0,805		p=0,171		p=0,569	
Gesamt/Ereignisse/Zensiert		426/287/139	213/133/80	213/154/59	214/145/69	212/142/70	257/180/77	169/107/62	379/252/127	47/35/12
Mittlere Überlebenszeit		16,6 ± 1,4	18,1 ± 3,6	15,4 ± 1,7	16,6 ± 2,7	16,6 ± 1,6	16,6 ± 1,6	16,7 ± 2,5	16,5 ± 1,5	18,2 ± 4,1
95% C.I.		13,8 - 19,4	11,0 - 25,2	12,1 - 18,7	11,3 - 22,0	13,4 - 19,7	13,4 - 19,8	11,8 - 21,6	13,5 - 19,5	10,2 - 26,2

3.2.4 Untersuchung des p53-Expressionsmusters

Das Färbemuster der p53-IHC präsentierte sich als homogen oder heterogen. In der Kohorte zeigten 414 (88,7%) Magenkarzinome ein homogenes und 53 (11,3%) ein heterogenes Muster. Unter den homogenen Karzinomen befanden sich 117 (25,1%) negative, also homogen „weiße“ Fälle mit mindestens 90% ungefärbten Zellkernen. 96 (20,6%) Fälle waren homogen „schwarz“ mit ausschließlich gleich intensiv gefärbten Zellkernen. 201 (43,0%) untersuchte Fälle zeigten nebeneinander unterschiedlich stark gefärbte Zellkerne und wurden als homogen „grau“ klassifiziert (*Abbildung 12*).

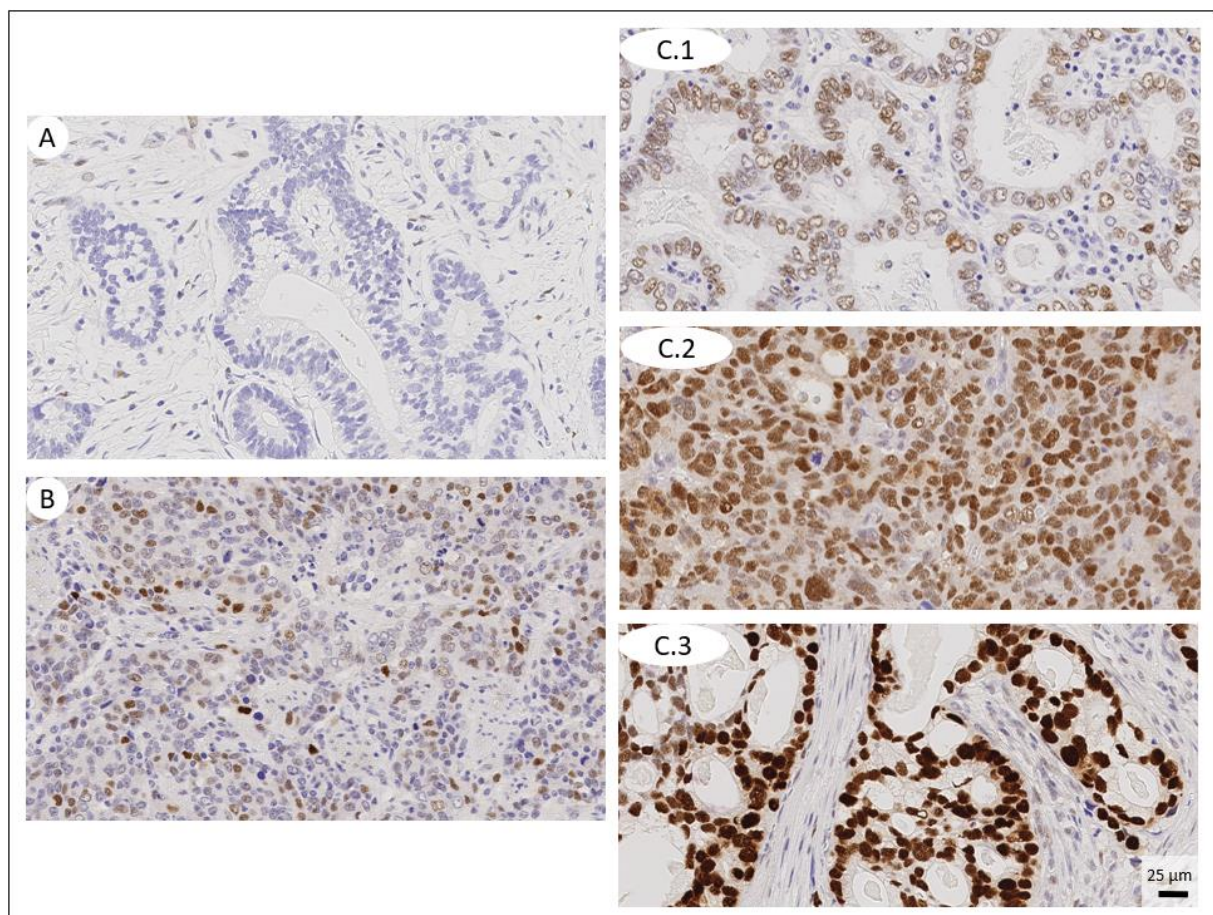


Abbildung 12: Beispiele für Fälle mit homogenem p53-Färbemuster. A Homogen „weiß“: negatives Tumorgewebe mit über 90% der Zellkerne in der Farbintensität (0). B Homogen „grau“: negative und unterschiedlich stark positiv gefärbte Tumorzellen. C.1-3 Homogen „schwarz“ in unterschiedlichen p53-Immunfärbintensitäten. A-C 400x vergrößert.

Ein heterogenes Färbemuster mit deutlich abgrenzbaren Arealen war in 10 (2,1%) „schwarz-weißen“, 21 (4,5%) „schwarz-grauen“ und 20 (4,3%) „grau-weißen“ Karzinomen nachweisbar (*Abbildung 13*). Zwei Karzinome präsentierten im untersuchten Anschnitt mehr als zwei unterschiedlich gefärbte Areale und wurden als „schwarz-weiß-grau“ bezeichnet.

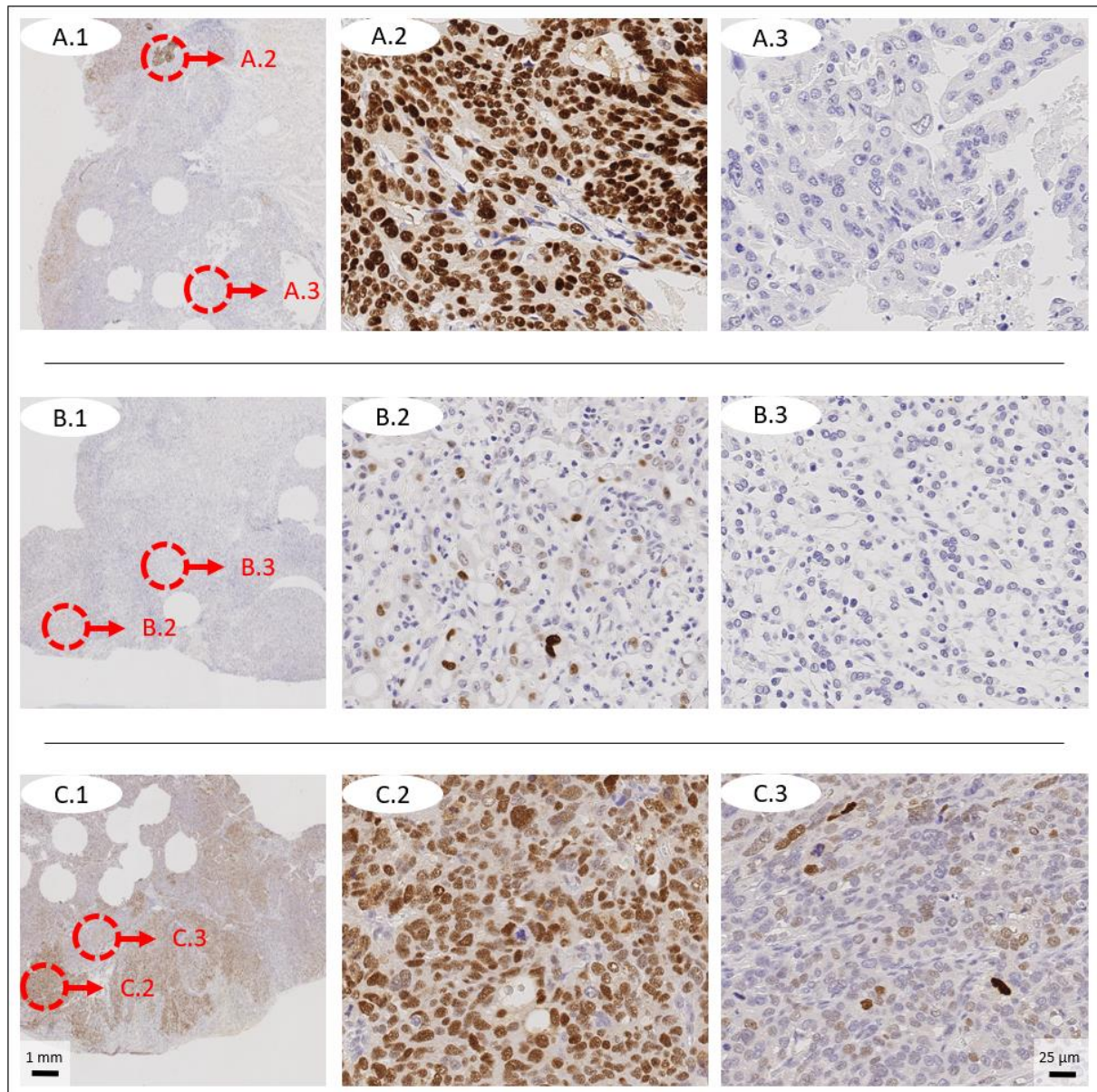


Abbildung 13: Beispiele für Fälle mit heterogenem p53-Immunfärbemuster. A Heterogen „schwarz-weiß“. B Heterogen „grau-weiß“. C Heterogen „schwarz-grau“. A.1, B.1, C.1 Übersichtsansicht, A.2/3, B.2/3, C.2/3 400x vergrößert.

Beim Vergleich des Färbemusters mit den klinisch-pathologischen Patientencharakteristika zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang. Die heterogenen Magenkarzinome fanden sich vermehrt in den Gruppen „Q2+Q3“ ($p < 0,001$) und „ $<90\%=0$ und $<50\%=3$ “ ($p = 0,037$). Die Verteilung der 53 heterogenen Fälle in den verschiedenen Gruppen zeigte Folgendes: 31 (58,5%) heterogene Fälle waren Teil der Gruppe „hoch“, die äußeren Quartile „Q1+Q4“ beinhalteten 13 (24,5%) heterogene Fälle, die Gruppe „ $\geq 90\%=0$ oder $\geq 50\%=3$ “ wies 14 (26,4%) heterogene Fälle auf (Tabelle 4).

3.3 Validierung

3.3.1 Analysen von *TP53*

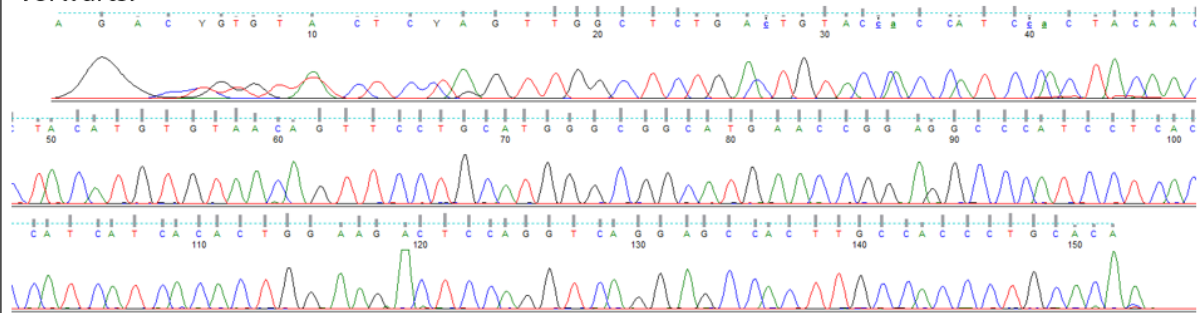
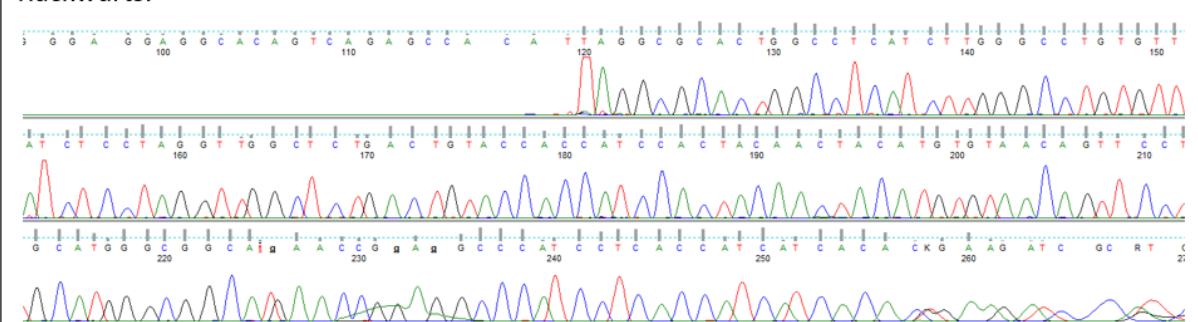
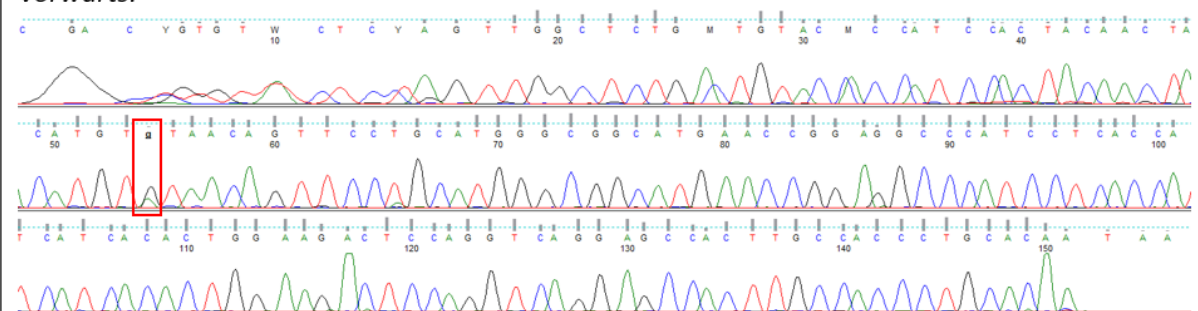
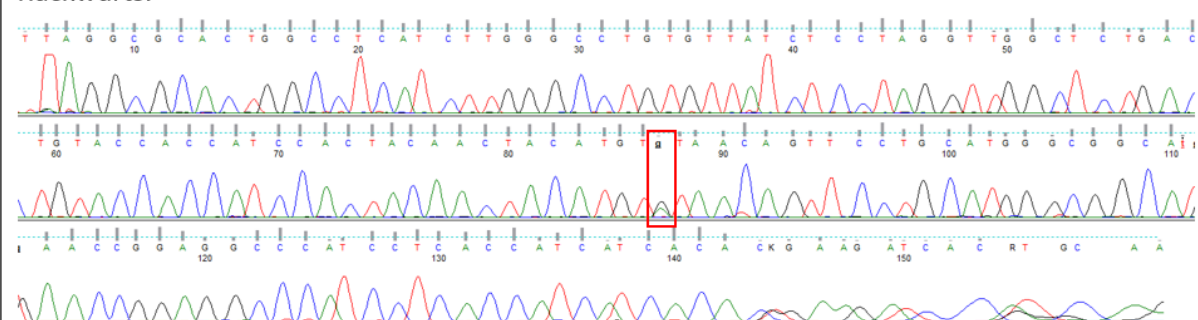
Zur Überprüfung der Validität des durch die verschiedenen p53-IHC-Bewertungsalgorithmen definierten „*TP53*-mutationsbedingten p53-Expressionstyps“ wurde *TP53* via Sanger-Sequenzierung bei insgesamt 111 Magenkarzinomen analysiert. Die 111 Fälle der Validierungskohorte setzten sich wie folgt zusammen. Von allen 36 HER2- und/oder MET-positiven, phänotypisch intestinalen Karzinomen (CIN*) der Kohorte war eine Genanalyse in 34 Fällen möglich. Für die Kontrollgruppe der HER2- und MET- negativen, phänotypisch diffusen Karzinome (GS*) war eine Genanalyse in 69 Fällen erfolgreich. Von allen 53 heterogenen Fällen der Kohorte war es bei 23 Fällen möglich, DNA aus den unterschiedlich gefärbten Arealen getrennt voneinander zu isolieren. Eine getrennte Genanalyse beider Areale war in 13 Fällen erfolgreich (1 CIN*, 4 GS* und 8 andere heterogene Fälle).

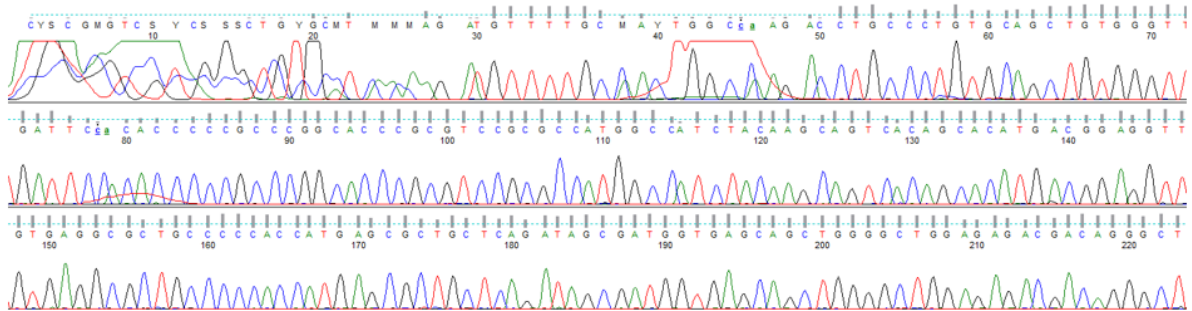
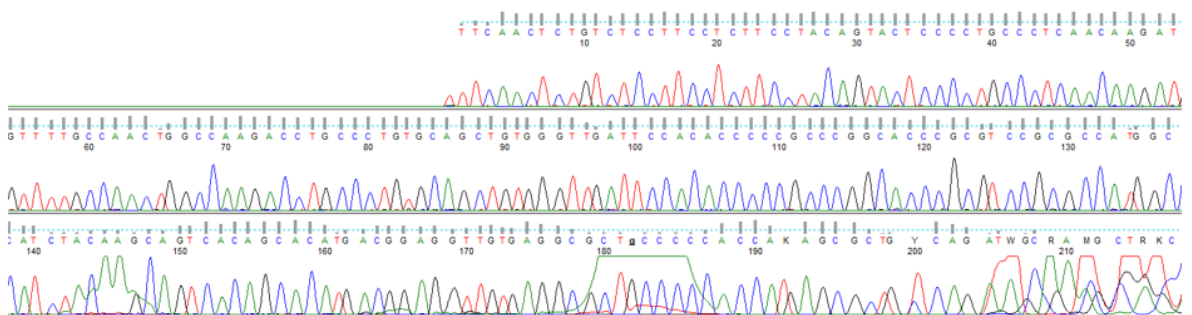
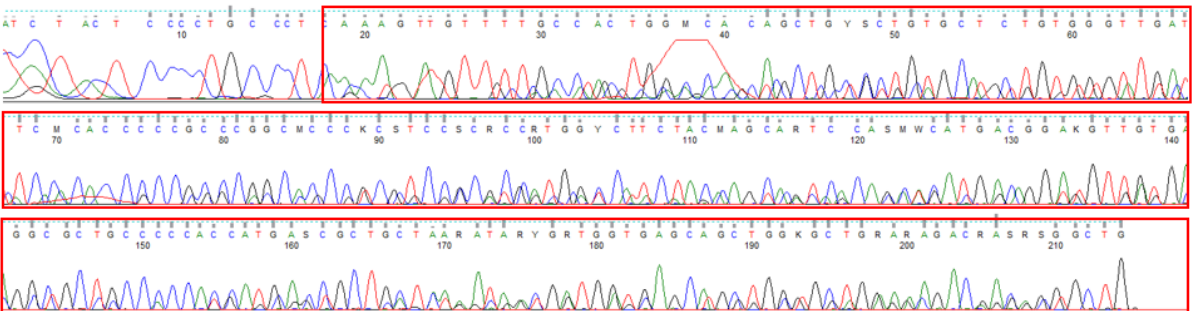
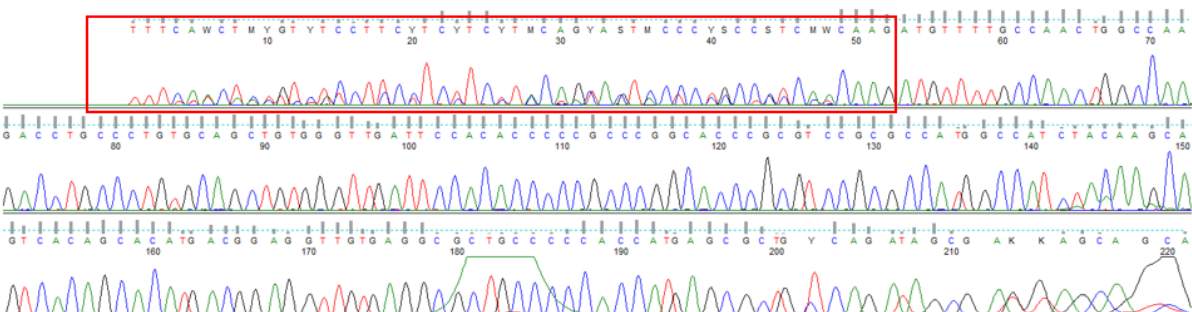
Die p53-Immunfärbung zeigte in den 111 Fällen der Validierungskohorte Immunnegativität oder schwache bis starke Immunpositivität. Bei der Sanger-Sequenzierung zeigten 75 (67,6%) von insgesamt 111 Fällen den *TP53*-Wildtyp oder eine stumme Mutation. 36 (32,4%) Karzinome zeigten eine andere Mutation als eine stumme Mutation. *TP53*-Mutationen fanden sich bei p53-positiven und -negativen Magenkarzinomen, bei HER2-/MET-positiven und bei HER2-/MET-negativen Magenkarzinomen. 20 (58,8%) von 34 HER2-/MET-positiven, intestinalen Magenkarzinomen zeigten eine Mutation (nicht stumm), wohingegen 14 (20,3%) von 69 HER2-/MET-negativen, diffusen Fällen eine Mutation (nicht stumm) aufwiesen. Bei der Analyse der heterogenen Fälle wurde Wildtyp-*TP53* in 8 Fällen gefunden, 3 Fälle zeigten in beiden Arealen dieselbe Mutation und bei zwei Fällen zeigte sich eine Mutation nur in einem der beiden analysierten Areale (*Abbildung 14, Tabellen 8 und 9 im Anhang*). Die Abbildungen 15 bis 18 zeigen Beispiele für Wildtyp-Sequenzen und Mutationen in den untersuchten *TP53*-Exons: Wildtyp-Sequenz des Exons 7 im Fall 6 (*Abbildung 15*), Missense-Mutation des Exons 7 im Fall 7 (*Abbildung 16*), Wildtyp-Sequenz des Exons 5 im Fall 102/Areal „schwarz“ (*Abbildung 17*), Frameshift-Mutation des Exons 5 im Fall 102/Areal „weiß“ (*Abbildung 18*).

Beim Vergleich der Ergebnisse der *TP53*-Genanalyse mit den Beobachtungen der p53-IHC zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem *TP53*-Mutationsstatus und dem „hohen“ HScore ($p < 0,001$). Während die Gruppe „hoch“ von allen 36 nicht-stumm mutierten Karzinomen 26 (72,2%) Fälle enthielt, beinhaltete die Gruppe „Q1+Q4“ 20 (55,6%) und die Gruppe „ $\geq 90\% = 0$ oder $\geq 50\% = 3$ “ 17 (47,2%) Fälle (*Tabelle 4*).

Bei der Betrachtung von Sensitivität und Spezifität zeigt sich, dass der p53-IHC-Bewertungsalgorithmus „hoch vs. niedrig“ den „*TP53*-mutationsbedingten p53-Expressionstyp“ in der gesamten Validierungskohorte mit einer Sensitivität von 72% erfasste, wobei die Spezifität 65% betrug. Unter den ausschließlich CIN* Fällen lag die Sensitivität bei 80% und die Spezifität bei 64%. Der Algorithmus „Q1+Q4 vs. Q2+Q3“ erfasste den „*TP53*-mutationsbedingten p53-Expressionstyp“ in der gesamten Validierungskohorte mit einer Sensitivität von 55% und einer Spezifität von 63%, unter den CIN* Fällen mit einer Sensitivität von 80% und einer Spezifität von 64%. Der Algorithmus „ $\geq 90\% = 0$ oder $\geq 50\% = 3$ vs. $< 90\% = 0$ und $< 50\% = 3$ “ erfasste den „*TP53*-mutationsbedingten p53-Expressionstyp“ in der gesamten Validierungskohorte mit einer Sensitivität von 47% und einer Spezifität von 67%, unter den CIN* Fällen mit einer Sensitivität von 45% und einer Spezifität von 37% (*Abbildung 19 im Anhang*).

Zusammenfassend zeigt die Untersuchung der Korrelation des *TP53*-Genotyps und des p53-IHC-Phänotyps einen signifikanten Zusammenhang der Gruppe „hoch“ ($\text{HScore} \geq 92$) mit dem *TP53*-Mutationssatus. Sensitivität und Spezifität sind bei dem Bewertungsalgorithmus „hoch vs. niedrig“ am höchsten (*Tabelle 4* und *Abbildung 19 im Anhang*).

Fall Nr. 6: Exon 7, Wildtyp**Vorwärts:****Rückwärts:****Abbildung 15:** Beispiel für die Wildtyp-Sequenz des Exon 7 (Fall 6).**Fall Nr. 7: Exon 7, Mutation c.713G>T (p.C238Y)****Vorwärts:****Rückwärts:****Abbildung 16:** Beispiel für eine Missense-Mutation im Exon 7 (Fall 7).

Fall Nr. 102 schwarz: Exon 5, Wildtyp**Vorwärts:****Rückwärts:****Abbildung 17:** Beispiel für die Wildtyp-Sequenz im Exon 5 (Fall 102, Areal „schwarz“).**Fall Nr. 102 weiß: Exon 5, Mutation c.394_395del (p.N131del)****Vorwärts:****Rückwärts:****Abbildung 18:** Beispiel für eine Frameshift-Mutation im Exon 5 (Fall 102, Areal „weiß“).

4 Diskussion und Interpretation

Die sichere Diagnostik und Klassifikation einer Tumorentität ist unabdingbar für die Auswahl und Entwicklung geeigneter Therapien. Nach *TCGA* erfolgt die Einteilung des Adenokarzinoms des Magens in vier Subtypen: das EBV-positive (EBV+), das mikrosatteliteninstabile (MSI), das chromosomal instabile (CIN) und das genomisch stabile (GS) Magenkarzinom. Während die Diagnostik von EBV+ und MSI im Magenkarzinom bekannt und umsetzbar ist, gestaltet sich die Differenzierung von CIN und GS über genetische Eigenschaften im klinischen Alltag schwierig. Nach *TCGA* zeichnen sich CIN Magenkarzinome durch extensive somatische Kopienzahl-Aberrationen (SCNA, engl. *somatic copy number aberrations*) aus. Schlüsselcharakteristikum von CIN Magenkarzinomen sind *TP53*-Mutationen [3].

Ziel der vorliegenden Studie war es, CIN im Magenkarzinom mithilfe der Immunhistochemie (IHC), einem einfachen und etablierten Verfahren des klinischen Alltags, abzubilden und *TP53*-Mutationen vorherzusagen (siehe Abschnitt 1.4). Die Validierung erfolgte über die Analyse des *TP53*-Mutationsstatus mithilfe der Sanger-Sequenzierung, welche ebenfalls ein verbreitetes und praktikables Verfahren darstellt.

4.1 Der „*TP53*-mutationsbedingte p53-Expressionstyp“

Wildtyp-p53 erfüllt seine Funktion im Nukleus und hat eine kurze Halbwertszeit. Eine Immunfärbung durch die geringe bis moderate Akkumulation von p53 ist meist Folge physiologischer Umstände und weist in den seltensten Fällen auf ein mutationsbedingt funktionsunfähiges Protein hin [107]. Als interne Validierung war auch in der untersuchten Studienkohorte eine p53-Immunpositivität bei Fibroblasten und anderen nicht-tumorösen Zellen zu beobachten. Positiv gefärbte Tumorzellkerne unterschiedlicher Intensität fanden sich in allen Subgruppen der untersuchten Magenkarzinome, den EBV+, MSI, CIN* und GS* Magenkarzinomen. Zur Definition von CIN* und GS* in der vorliegenden Arbeit siehe Abschnitt 2.2.4.

Es wurden verschiedene Algorithmen zur Bewertung der p53-IHC erstellt, um den „*TP53*-mutationsbedingten p53-Expressionstyp“ im Magenkarzinom zu erfassen und CIN abzubilden (siehe Abschnitt 2.2.3.2 und *Abbildung 6*). Plausibilität und Vorhersagekraft der angewandten p53-IHC-Bewertungsalgorithmen wurde anhand folgender Kriterien bemessen.

1. Die Algorithmen sollten den umfangreichen Erkenntnissen zu *TP53*-Mutationen, ihrem Einfluss auf die p53-Expression und das p53-Immunfärbeverhalten entsprechen und optimalerweise sowohl Missense- als auch Nonsense-Mutationen vorhersagen können (siehe Abschnitt 1.4).
2. Als Validierung einer erfolgreichen Abbildung von CIN Magenkarzinomen wurden die Algorithmen mit für die Studienkohorte bereits verfügbaren klinisch-pathologischen Patienteneigenschaften verglichen. Typisch für CIN im Magenkarzinom sind u. a. eine proximale Lokalisation, ein intestinaler Phänotyp nach Laurén, EBV-Negativität, MSS, HER2-Positivität, MET-Positivität oder eine schlechtere Prognose [3,48,75] (siehe Abschnitt 3.2.2).
3. Zuletzt wurde eine Subkohorte von ausschließlich EBV-negativen, MSS und nicht-diffusen Magenkarzinomen als vereinfachte Surrogatgruppe für CIN betrachtet. Eine Beobachtung von TCGA lautet, dass der *TP53*-Mutationsanteil unter CIN Magenkarzinomen bei ca. 71% liegt [3]. Die Verteilung der Magenkarzinome dieser Subkohorte auf die Gruppen der Bewertungsalgorithmen sollte die Beobachtung von TCGA möglichst widerspiegeln, wodurch ein zusätzlicher Vergleichspunkt für die Plausibilität des angewandten Algorithmus vorlag (siehe Abschnitt 3.2.2 und *Abbildung 10*).

Der einfachste Weg, den Status einer Proteinexpression in der IHC zu bewerten, ist die Beurteilung als positiv oder negativ. Mithilfe des HScore werden Tumoren mit einem besonders hohen Anteil an stark gefärbten Zellkernen und Tumoren mit wenig Färbintensität besser voneinander trennbar. Der entsprechende Bewertungsalgorithmus „hoch vs. niedrig“ sollte vor allem CIN Magenkarzinome mit Missense-Mutationen abbilden, welche mit über 70% die häufigsten *TP53*-Mutationen in menschlichen Krebszellen sind [95,108] und bei denen eine stark positive Immunfärbung zu erwarten ist. Um in einem weiteren Schritt zusätzlich die Miterfassung von Nonsense-Mutationen zu ermöglichen, erfolgte die Erstellung des Algorithmus „Q1+Q4 vs. Q2+Q3“. Da Fälle mit einem heterogenen Färbemuster häufiger einen HScore der mittleren Quartile erhielten, wurden IHC-Bewertungsalgorithmen erstellt, welche sich an den prozentualen Anteilen stark (3) und negativ (0) gefärbter Tumorzellkerne orientierten. Zur Erstellung der Algorithmen siehe auch Abschnitt 2.2.3.2 und *Abbildung 6*.

Bei dem Vergleich des p53-IHC-Status mit den CIN-assoziierten klinisch-pathologischen Patientencharakteristika präsentierten sich mehrere statistisch signifikante Zusammenhänge (siehe Abschnitt 3.2.2 und *Tabellen 4 und 5-7*). Nach der FDR-Korrektur blieben folgende Zusammenhänge bestehen: Der Algorithmus „Q1+Q4 vs. Q2+Q3“ korrelierte mit EBV-Negativität ($p < 0,001$) und MSS ($p < 0,001$), der Algorithmus „hoch vs. niedrig“ korrelierte mit MSS ($p = 0,001$). Der Algorithmus „ $\geq 90\% = 0$ oder $\geq 50\% = 3$ vs. $< 90\% = 0$ und $< 50\% = 3$ “ wurde repräsentativ bei vielversprechenden Zusammenhängen in der Voranalyse unter den Prozentwert-orientierten Algorithmen zur weiteren Untersuchung ausgewählt (*Tabellen 5-7 im Anhang*). Dieser wies jedoch nach der FDR-Korrektur keine statistisch signifikanten Zusammenhänge auf. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass CIN im Magenkarzinom häufig mit einer schlechteren Prognose einhergeht [75], in der vorliegenden Arbeit ließ sich kein Zusammenhang zwischen der p53-IHC und den Überlebensdaten der Patienten erkennen.

Von den 254 ausschließlich EBV-negativen, MSS und phänotypisch nicht-diffusen Karzinomen der Kohorte fielen 161 (ca. 63%) Fälle in die Gruppe „Q1+Q4“ und 93 (ca. 37%) Fälle in die Gruppe „Q2+Q3“. Diese Verteilung deckt sich am ehesten mit der Beobachtung von *TCGA*, nämlich dass 71% der CIN Magenkarzinome *TP53*-mutiert sind [3]. Bei der Betrachtung der phänotypisch nicht-diffusen, MSS- und EBV-negativen Fälle spiegelten die Algorithmen „hoch vs. niedrig“ und „ $\geq 90\% = 0$ oder $\geq 50\% = 3$ vs. $< 90\% = 0$ und $< 50\% = 3$ “ die Angabe von *TCGA* weniger gut wider [3]: die Gruppe „hoch“ beinhaltete 145 (ca. 57%) Fälle, die Gruppe „ $\geq 90\% = 0$ oder $\geq 50\% = 3$ “ beinhaltete 121 (ca. 48%) Fälle (*Abbildung 10*).

Nach der Auswertung der Ergebnisse der Hauptanalyse scheint es naheliegend, den Algorithmus „Q1+Q4 vs. Q2+Q3“ gegenüber den anderen untersuchten Bewertungsalgorithmen für die Diagnostik des „*TP53*-mutationsbedingten p53-Expressionstyps“ vorzuziehen, da er anders als der Algorithmus „hoch vs. niedrig“ möglicherweise auch *TP53*-Nonsense-Mutationen anzeigen kann, nach der FDR-Korrektur mit zwei für CIN typischen klinisch-pathologischen Patientencharakteristika signifikant korreliert und die durch *TCGA* beobachtete Häufigkeit an *TP53*-Mutationen unter CIN Magenkarzinomen bei der Betrachtung einer EBV-negativen, MSS und phänotypisch nicht-diffusen Surrogatgruppe am besten zu replizieren scheint.

4.2 Validierung durch Genanalysen von *TP53*

Die *TP53*-Sequenzierung erfolgte als Validierung der immunhistochemischen Definition des „*TP53*-mutationsbedingten p53-Expressionstyps“ in 111 Fällen der Studienkohorte (siehe Abschnitte 2.2.5 und 3.3.1). Die Validierungskohorte enthielt auf dem Boden ihres bekannten HER2-/MET-Status und Laurén-Phänotyps 34 CIN* und 69 GS*-Magenkarzinome (siehe Abschnitt 2.2.4) [3,48]. Zur Diskussion und Interpretation der Ergebnisse der Genanalyse bei 13 ausgewählten heterogen gefärbten Fällen siehe Abschnitt 4.3.

TP53 ist in menschlichen Krebszellen eines der am häufigsten mutierten Gene [57]. Den 111 untersuchten Magenkarzinomen konnten tatsächlich 36 nicht-stumme *TP53*-Mutationen nachgewiesen werden. CIN ist im Magenkarzinom überzufällig häufig mit *TP53*-Mutationen assoziiert [3]. Die Mehrzahl der gefundenen Mutationen, nämlich 20 (55,6%), war in der vorliegenden Studie bei den CIN* Fällen zu beobachten. Passend zu den Erkenntnissen von Ando *et al.* [95] trugen die Magenkarzinome mit einem HScore ≥ 92 häufiger *TP53*-Missense-Mutationen: es handelte sich bei 24 von 26 nicht-stummen Mutationen um Missense-Mutationen; bei den Magenkarzinomen mit einem HScore < 92 waren unter 10 detektierten nicht-stummen Mutationen 7 Nonsense-Mutationen durch Stop-Codon-Bildung oder Leseraster-Verschiebung zu finden (*Abbildung 14* und *Tabelle 8*). Interessanterweise ließ sich trotz dieser Übereinstimmungen kein statistisch signifikanter Zusammenhang der mittels des Algorithmus „Q1+Q4“ als „*TP53*-mutationsbedingte p53-Expressionstyp“ charakterisierten Fälle und einer mittels Sanger-Sequenzierung nachgewiesenen *TP53*-Mutation beobachten. Stattdessen korrelierte der Algorithmus „hoch vs. niedrig“ signifikant mit dem erhobenen *TP53*-Mutationsstatus ($p < 0,001$).

Dieser vermeintliche Widerspruch lässt sich in der Zusammenschau folgender Erkenntnisse zu zellbiologischen Prozessen und einiger methodischer Einschränkungen erklären. Die Definition von CIN impliziert ein hohes Maß an mutagenem Potential auf chromosomaler Ebene. In einer biallelen Zelle führt eine heterogene *TP53*-Mutation bei 16 Kombinationsmöglichkeiten zu einem funktionsfähigen und 15 dysfunktionalen p53-Proteinkombinationen mit mindestens einer mutierten Untereinheit. Dieses Phänomen des „dominant-negativen Effekts“ ergibt sich aus der Tatsache, dass p53 normalerweise als Tetramer vorliegt und fungiert [55]. Konsekutiv können in einer Krebszelle mit Chromosomenzahlaberrationen deutlich mehr als 16 mögliche Kombinationen eines tetrameren p53 auftreten. Hinzu kommen komplexe Regulationen mit alternativen Spleiß-

Stellen und Translationsmöglichkeiten. Das Protein besitzt zahlreiche Isoformen und wird durch posttranslationale Modifikationen aktiviert [109]. Des Weiteren haben beispielsweise epigenetische Modifikationen und Proteinexpressions-modulierende microRNAs Einfluss auf die Funktionstüchtigkeit des Proteins [110,111]. Verschiedene Mutationen des Gens *TP53* selbst oder Mutationen anderer Gene, deren Proteine Teil des p53-Signalwegs sind, können sich in einer Zelle anhäufen und eher zu einer „Grauskalierung“ der p53-Expression führen als zu einem einfachen Bild von einem negativen (= Nonsense-*TP53*-Mutation) oder einem stark positiven (= Missense-*TP53*-Mutation) p53-Expressionstyp. Darüber hinaus können auch p53-Monomere und -Dimere Teilfunktionen erfüllen. So wirken zum Beispiel manche p53-Dimere zytostatisch und können zum Zellzyklusarrest führen [112], wodurch die „Grauskala“ der Expression und Funktion von p53 in einer entarteten Zelle ebenfalls erweitert wird. Unter physiologischen Umständen würde CIN eine Zelle in die Apoptose führen, insbesondere durch den Einfluss von p53. CIN Magenkrebszellen scheinen eher die äußeren Extreme der „Grauskala“ der p53-Färbung und -Funktion zu zeigen („Q1+Q4“), also mit überwiegend funktionsunfähigen oder fehlenden Genprodukten.

TP53-Mutationen korrelierten hingegen nur mit Fällen, die einen stärker gefärbten Expressionstyp (hohe HScore-Werte) aufweisen. Missense-Mutationen kommen allgemein häufiger als Nonsense-Mutationen vor [95,108]. Die Ergebnisse der vorliegenden *TP53*-Mutationsanalyse stützen diese Beobachtung. In der untersuchten Validierungskohorte waren 30 aller 43 gefundenen Sequenzabweichungen Missense-Mutationen. Allerdings ist der Tatsache Rechnung zu tragen, dass die Sanger-Sequenzierung nicht geeignet ist, um Gendeletionen zu detektieren. Auch können Nonsense- und Frameshift-Mutationen einer Detektion durch die Sanger-Sequenzierung entgehen, sobald die Zielsequenz der verwendeten Primer zu stark verändert ist [113]. Ein Zusammenhang zwischen einer starken p53-Immunfärbung und der Detektion einer *TP53*-Missense-Mutation ist somit vermutlich in der vorliegenden Studie auch anteilig methodenbedingt hervorgehoben.

Mithilfe der Validierung des *TP53*-Status durch Sanger-Sequenzierung wurden Sensitivität und Spezifität der Bewertungsalgorithmen der p53-IHC bestimmt und miteinander verglichen. Beim Ovarialkarzinom gibt es Beobachtungen, dass durch eine optimierte Auswertung der p53-IHC die Vorhersage des *TP53*-Mutationsstatus mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils über 90% erreicht werden kann [92]. In der vorliegenden Studie ist es nicht gelungen,

einen Bewertungsalgorithmus der p53-IHC herauszuarbeiten, der im Magenkarzinom ähnlich hohe Werte für Sensitivität und Spezifität bei der *TP53*-Mutations-Diagnostik erreicht. Der Algorithmus „hoch vs. niedrig“ erfasste Mutationen in der gesamten Validierungskohorte mit einer Sensitivität von nur 72% und einer Spezifität von 65%. Unter den präselektierten CIN* Fällen ließ sich die Sensitivität bei annähernd gleicher Spezifität auf 80% steigern. Die übrigen Bewertungsalgorithmen „Q1+Q4 vs. Q2+Q3“ und „ $\geq 90\% = 0$ oder $\geq 50\% = 3$ vs. $< 90\% = 0$ und $< 50\% = 3$ “ erreichten nur ähnliche bis deutlich niedrigere Werte (*Abbildung 19 im Anhang*).

Letztendlich konnte sich das für diese Studie zugrunde gelegte Konstrukt eines „*TP53*-mutationsbedingten p53-Expressionstyp“ als Surrogat für den tatsächlichen Mutationsstatus auf dem Boden der verwendeten Methoden des klinischen Alltags nicht behaupten. Es lässt sich festhalten, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der p53-IHC und *TP53*-Mutationen im Magenkarzinom besteht, im Einzelfall ist jedoch keiner der untersuchten Bewertungsalgorithmen für die Vorhersage von *TP53*-Mutationen geeignet, da sowohl Sensitivität als auch Spezifität zu gering bleiben.

4.3 Heterogene p53-Immunfärbemuster

Im Rahmen dieser Studie lag ein besonderes Augenmerk auf einer möglichen intratumoralen Heterogenität der p53-Expression im Magenkarzinom. CIN wird aufgrund des hohen Maßes an Mutationspotential sowohl im Magenkarzinom als auch in verschiedenen anderen Tumorentitäten als Treiber intratumoraler Heterogenität beschrieben. Es entstehen frühzeitig unterschiedliche Zellreihen in einer Tumorphilipulation und dadurch eine subklonale Diversität im CIN Tumor. Während des Tumorprogresses sind diese Subklone einem Selektionsdruck ausgesetzt und führen im Rahmen der Tumorevolution zu intratumoraler Heterogenität [114]. Böger *et al.* konnten zeigen, dass ein einzelner Primarius eines Magenkarzinoms bis zu fünf verschiedene *PIK3CA*-Genotypen enthalten kann [102]. Auch konnten Tumorklone mit und ohne *HER2*- und *MET*-Amplifikation innerhalb desselben Magenkarzinoms nachgewiesen werden [104,105,115]. Da CIN die Tumorevolution und Tumorselektion mehrerer Zellklone in der Tumormikroumgebung vorantreibt, könnte die Diagnostik von CIN im Magenkarzinom von großer Bedeutung für das Behandlungskonzept des Patienten sein. Chemotherapie kann hier auch als ein Selektionsdruck auf die Tumorentwicklung fungieren, sodass durch CIN neue Subklone mit Überlebensvorteil hervorgebracht werden [75].

Die vorliegende Arbeit bestätigt das Vorkommen intratumoraler Heterogenität des immunhistochemischen Nachweises von p53 im Magenkarzinom. Daher scheint eine limitierte Betrachtung, wie eine Biopsie aus dem Tumor, für die Bestimmung des p53-Expressionsstatus mittels IHC ungeeignet. Um zu untersuchen, ob Fälle mit heterogener p53-Expression auch einen diskordanten *TP53*-Genotyp aufweisen, wurden bei 13 Tumoren mit eindeutig trennbaren Färbungsmustern diese Regionen separat auf *TP53*-Mutationen hin untersucht und eine Kreuzkontamination der Proben möglichst vermieden [116]. Es zeigte sich in 8 Fällen ein *TP53*-Wildtyp und in 3 Fällen eine identische Mutation in beiden Arealen. In zwei Fällen (Fall Nr. 102 und 104) war der *TP53*-Mutationssatus im selben Primarius different (*Tabellen 8 und 9 im Anhang*). Beim Fall Nr. 102 wiesen die Zellen des „weißen“ Areals eine Frameshift-Mutation auf, während die Zellen des „schwarzen“ Areals die Wildtyp-Sequenz aufwiesen (*Abbildungen 17 und 18*). Beim Fall 104 war unter den Zellen des „grauen“ Areals eine Missense-Mutation zu finden, unter den Zellen des „schwarzen“ Areals nicht.

Das Färbungsmuster zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit dem *TP53*-Mutationsstatus. Die Fehlfunktion von p53 als Treiber genomischer Instabilität, beispielsweise bei CIN, könnte sich schon früh in der Tumorevolution entwickeln und die Entstehung einer intratumoralen Heterogenität nach sich ziehen. Umgekehrt könnte auch die aus CIN resultierende subklonale Diversität die p53-Regulation beeinflussen und so erst später zu einem intratumoral heterogenen Muster führen. Insgesamt scheint die intratumorale Heterogenität der immunhistologisch erfassten p53-Expression eher ein Ausdruck übergreifender subklonaler Diversität bei CIN und nicht Zeichen einer intratumoralen genetischen *TP53*-Heterogenität zu sein.

Bei der mikroskopischen Untersuchung einzelner Ganzgewebeschnitte von Magenkarzinomen stellte sich schnell heraus, dass die Heterogenität der p53-Expression vermutlich unterschätzt wurde. Einige Schnitte, welche als heterogen bezeichnet wurden, zeigten sehr kleine andersfarbige Areale. Es ist anzunehmen, dass bei manchen als homogen klassifizierten Karzinomen im gesamten Tumor verschieden gefärbte Areale vorhanden waren, welche nicht auf den betrachteten Gewebeschnitten miterfasst wurden.

Die Heterogenität des immunhistologischen Nachweises von p53 im selben Tumor stellt auch ein Problem für die systematische Auswertung dar. Die hier explorierten verschiedenen Bewertungsalgorithmen können die intratumorale Heterogenität des Magenkarzinoms unter Umständen nicht sinnvoll darstellen. Der prozentuale Anteil der

Tumorzellen mit verschiedenen Färbeintensitäten wurde in Bezug auf den gesamten Tumorschnitt beurteilt. Ein hypothetisches Magenkarzinom mit zwei deutlich getrennten Färberealen (stark gefärbt und vollständig ungefärbt) könnte im Gesamtbild 30% stark gefärbte und 70% ungefärbte Tumorzellkernen aufweisen. Beim Bewertungsalgorithmus „ $\geq 90\%=0$ oder $\geq 50\%=3$ vs. $<90\%=0$ und $<50\%=3$ “ würde dieses hypothetische Magenkarzinom in die Gruppe „ $<90\%=0$ und $<50\%=3$ “ fallen. Bei den Bewertungsalgorithmen, welche sich am errechneten HScore orientieren, fiel dieser Tumor mit einem HScore von 90 ($((0 \times 70) + (1 \times 0) + (2 \times 0) + (3 \times 30) = 90)$) in die Gruppe „niedrig“ bzw. in die Gruppe „Q2+Q3“. Die in dieser Studie untersuchten Bewertungsalgorithmen würden die Auffälligkeit dieses hypothetischen Magenkarzinoms verkennen. Beim Vergleich des p53-Färbemusters mit den p53-IHC-Bewertungsalgorithmen waren Magenkarzinome mit einem heterogenen p53-Färbemuster überzufällig häufig in der Gruppe „Q2+Q3“ ($p < 0,001$) und der Gruppe „ $<90\%=0$ und $<50\%=3$ “ ($p = 0,037$) vertreten. Diese Beobachtung zeigt, dass Tumoren mit heterogener Expression von p53 gesondert betrachtet werden müssen.

4.4 Schlussfolgerung

Bei anderen Tumorentitäten erwies sich die p53-IHC als diagnostisch sinnvoll, exemplarisch bei einigen gynäkologischen Krebserkrankungen. So konnte die Arbeitsgruppe *Zheng et al.* zeigen, dass eine Überexpression von p53 Vorläuferläsionen des papillär-serösen Endometriumkarzinoms anzeigen kann [117]. *Boyle et al.* fanden heraus, dass bei Brustkrebs ein „extremes p53-Färbemuster“ („extrem positive“ oder „extrem negative“ p53-Expression) u. a. mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [118].

In Bezug auf das Magenkarzinom haben verschiedene Arbeitsgruppen zuvor versucht, das Magenkarzinom in Subtypen zu unterteilen und den CIN Subtyp mithilfe der p53-IHC abzubilden. Exemplarisch haben *Gonzalez et al.* das Magenkarzinom wie TCGA in vier Gruppen eingeteilt. CIN wurde in ihrer Studie mit einer aberranten p53-IHC gleichgesetzt, jedoch wurde keine Validierung vorgenommen [51]. Nach *Setia et al.* erfolgte die Einteilung des Magenkarzinoms in fünf Gruppen u. a. anhand der immunhistochemischen p53-Expression. Der von ihnen benannte p53-aberrante Subtyp zeigte, ähnlich wie ein Karzinom mit CIN, Assoziationen mit dem intestinalen Phänotyp nach Laurén, Lymphknotenmetastasen und einem positiven HER2-Status [52].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen den Schluss zu, dass im Magenkarzinom der Vorhersagewert der p53-IHC für das Vorliegen einer *TP53*-Mutation im diagnostischen Einzelfall zu ungenau ist. Trotzdem bleibt die Verbindung zwischen der p53-IHC und den für CIN typischen klinisch-pathologischen Charakteristika in der kumulativen Betrachtung der betreffenden Gesamtkohorte bestehen. Eine *TP53*-Mutation ist keine Voraussetzung für CIN im Magenkarzinom. Immerhin zeigen nach TCGA ca. 30% der CIN Magenkarzinome keine *TP53*-Mutation [3]. „Q1+Q4“ scheint, soweit mit den verwendeten Methoden eruierbar, zwar nicht geeignet, um *TP53*-Mutationen anzuzeigen, könnte aber dennoch CIN im Magenkarzinom abbilden, da ein Funktionsverlust im p53-Signalweg vielfältige Ursachen haben kann, beispielsweise eine Amplifikation von *MDM2* [119].

4.5 Methodenbedingte Einschränkungen der Studie

Einige methodenbedingte Einschränkungen sind bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Studie anzumerken. Die sichere Bestimmung von CIN ist nach aktuellem Forschungsstandard grundsätzlich nur eingeschränkt möglich, daher wurde in der vorliegenden Studie lediglich eine Annäherung an CIN anhand typischer klinisch-pathologischer Patienteneigenschaften, wie des HER2- und MET-Status oder des Laurén-Phänotyps, vorgenommen [3,48].

Für die immunhistologische Untersuchung von p53 wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet (Klon DO-7, Novocastra, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). DO-7 bindet an ein Epitop am N-terminalen Ende von p53 zwischen den Aminosäuren 20 und 25. Isoformen, bei denen dieser Abschnitt fehlt, können durch DO-7 nicht nachgewiesen werden [120,121]. Hieraus ergibt sich eine diagnostische Lücke.

Bei der Untersuchung des *TP53*-Mutationsstatus ist zu betonen, dass eine Deletion des gesamten Gens, oder der Verlust des gesamten oder anteiligen Chromosoms mithilfe der verwendeten Sanger-Sequenzierung nicht beurteilt werden kann. Voraussetzung für die Vervielfältigung des zu untersuchenden Genabschnitts mittels Sanger-Sequenzierung ist außerdem, dass die Zielsequenzen der verwendeten Primer nicht zu stark verändert sein dürfen [113]. Des Weiteren wurde bei der Analyse von *TP53* nicht das gesamte Gen analysiert. Nach *Olivier et al.* sind die meisten *TP53*-Mutationen (ca. 86%) zwischen den Codons 125 und 300 zu finden und betreffen die Exons 5 bis 8 [108]. Die Exons 5, 6, 7 und 8 wurden bei allen Magenkarzinomen sequenziert. Die Analyse der Exons 4, 9 und 10 erfolgte exemplarisch. Die

meisten gescheiterten Genanalysen betrafen das Exon 4 und sind am ehesten auf die unzureichende DNA-Qualität des FFPE-Gewebes zurückzuführen. Es ist denkbar, dass Mutationen übersehen wurden, denn die untersuchten Magenkarzinome mit den Fallnummern 5 und 23 wiesen Mutationen im Exon 4 auf (*Tabelle 8*).

Andere Gründe für einen p53-Funktionsausfall, z. B. durch Fehler der posttranslationalen Modifikation, oder des p53-Signalwegs, z. B. durch ein funktionsunfähiges p21 oder die Amplifikation von *MDM2* [119], wurden in dieser Studie nicht untersucht und bleiben spekulativ.

4.6 Ausblick

Nach der Veröffentlichung einer Originalarbeit im Herbst 2020 [100] haben bereits verschiedene Arbeitsgruppen an die Ergebnisse und Schlussfolgerungen der vorliegenden Studie angeknüpft. 2021 haben *Yu et al.* verschiedene Antikörperfarbstoffe gegen p53 getestet, um die p53-Expression mittels IHC darzustellen [122]. Die Sensitivität und Spezifität bei der Vorhersage des *TP53*-Mutationsstatus wurde direkt anhand der gefundenen Mutationen mittels *Next Generation Sequencing* optimiert. Ihre Ergebnisse zeigten, dass mithilfe des SP5-Antikörper-Farbstoffes und einer IHC-Schwellenbestimmung über die gefundenen Sequenzabweichungen *TP53*-Mutationen mit hoher Genauigkeit vorhersagbar sind und auch zwischen Mutationen unterschieden werden kann [122]. *Daun et al.* haben versucht, die beiden Klassifikationssysteme von *TCGA* und *ACRG* zu überarbeiten und zu verbinden [123]. Sie schlagen eine Klassifikation des Magenkarzinoms in fünf Subgruppen vor: MSI, EBV-assoziiert, mit einer epithelial-mesenchymalen Transition, CIN und GS. Als Surrogat für CIN nennen *Daun et al.* die „p53-Aberration“, wobei sowohl eine p53-Überexpression als auch per *Next Generation Sequencing* detektierte *TP53*-Mutationen berücksichtigt wurden [123].

Auf dem Boden der methodischen Einschränkungen der vorliegenden Studie und der Ergebnisse obengenannter Folgestudien wird deutlich, dass die Verbesserung einiger Ansatzpunkte einen akademischen Mehrgewinn erzielen kann, jedoch schnell die Reichweite der alltagspraktikablen Möglichkeiten verlässt. Die vorliegende Studie zeigt auf, dass selbst ein optimiertes Analyseverfahren für p53 und *TP53* vor zwei Problemen steht, nämlich der intratumoralen Heterogenität im Magenkarzinom und der Tatsache, dass CIN eine eher vage definierte und schwer erfassbare, komplexe Eigenschaft eines fraglichen Subtyps im Magenkarzinom darstellt.

5 Zusammenfassung

In einer groß angelegten Grundlagenstudie durch *TCGA* wurde das Adenokarzinom des Magens in vier Subtypen eingeteilt: das Epstein-Barr-Virus-positive (EBV+), das mikrosatelliteninstabile (MSI), das chromosomal instabile (CIN) und das genomisch stabile (GS) Magenkarzinom [3]. Basierend auf bekannten, komplexen Zusammenhängen von CIN und p53 wurde in der vorliegenden Studie die Hypothese aufgestellt, dass typische, mit CIN assoziierte klinisch-pathologische Charakteristika mit der p53-IHC korreliert sind.

467 Ganzgewebeschnitte von Patienten mit Therapie-naiven Magenkarzinomen wurden immunhistologisch gegen p53 gefärbt. Für jeden Gewebeschnitt wurden der HScore und das Färbemuster bestimmt. Es wurden verschiedene Bewertungsalgorithmen der p53-IHC gebildet und mit zahlreichen klinisch-pathologischen Patienteneigenschaften verglichen. Die Ergebnisse wurden anschließend durch *TP53*-Genanalysen in 111 Fällen validiert.

442 Karzinome waren p53-immunpositiv, 25 waren p53-immunnegativ. Nach der Korrektur der Falscherkennungsrate (FDR) zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen dem Algorithmus „Q1+Q4 vs. Q2+Q3“ mit dem MS- und EBV-Status; der Algorithmus „hoch vs. niedrig“ korrelierte mit dem MS- und *TP53*-Mutationsstatus. Der Algorithmus „ $\geq 90\%=0$ oder $\geq 50\%=3$ vs. $< 90\%=0$ und $< 50\%=3$ “ wies nach der FDR-Korrektur keine Korrelationen auf.

Die intratumorale Heterogenität des immunhistochemischen Nachweises von p53 im Magenkarzinom konnte bestätigt werden: 414 Karzinome zeigten ein homogenes Färbemuster, 53 zeigten ein heterogenes Färbemuster. Entsprechend scheinen insbesondere Biopsien nicht geeignet zu sein, um den p53-Status immunhistochemisch zu untersuchen. Auch bei der Untersuchung von Ganzgewebeschnitten ist bei sehr kleinen heterogenen Färbearealen ein hoher Stichprobenfehler zu erwarten. Das p53-Färbemuster zeigte keine Korrelationen mit klinisch-pathologischen Patienteneigenschaften.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass der immunhistologische Nachweis von p53, der *TP53*- Mutationsstatus und das CIN Magenkarzinom miteinander in signifikantem Zusammenhang stehen. Aufgrund niedriger Sensitivität und Spezifität ist im diagnostischen Einzelfall jedoch mittels p53-IHC kein Rückschluss auf den *TP53*-Mutationsstatus möglich. Der immunhistochemische Nachweis von p53 im Magenkarzinom korrelierte weder mit dem tumorspezifischen Überleben noch dem Gesamtüberleben und zeigte in der untersuchten Kohorte somit keinen prognostischen Wert.

6 Literatur

- 1 *Robert-Koch-Institut*. Krebs in Deutschland für 2015/2016
- 2 *Crew KD, Neugut AI*. Epidemiology of gastric cancer. *WJG* 2006; 12(3): 354–362
- 3 *The Cancer Genome Atlas Research Network*. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014; 513(7517): 202–209
- 4 *The Cancer Genome Atlas Research Network*. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature* 2017; 541(7636): 169–175
- 5 *Ang TL, Fock KM*. Clinical epidemiology of gastric cancer. *Singapore medical journal* 2014; 55(12): 621–628
- 6 *Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM*. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2010; 19(8): 1893–1907
- 7 *Machlowska J, Baj J, Sitarz M et al*. Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. *International journal of molecular sciences* 2020; 21(11)
- 8 *Ferlay J, Shin H-R, Bray F et al*. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer* 2010; 127(12): 2893–2917
- 9 *Anderson WF, Camargo MC, Fraumeni JF et al*. Age-specific trends in incidence of noncardia gastric cancer in US adults. *JAMA* 2010; 303(17): 1723–1728
- 10 *Sasako M, Inoue M, Lin J-T et al*. Gastric Cancer Working Group report. *Japanese journal of clinical oncology* 2010; 40 Suppl 1: i28-37
- 11 *Fock KM, Ang TL*. Epidemiology of Helicobacter pylori infection and gastric cancer in Asia. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2010; 25(3): 479–486
- 12 *Bray F, Jemal A, Grey N et al*. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): A population-based study. *The Lancet Oncology* 2012; 13(8): 790–801
- 13 *Correa P*. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer research* 1988; 48(13): 3554–3560

- 14 *Correa P.* Human gastric carcinogenesis: A multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer research* 1992; 52(24): 6735–6740
- 15 *Jang B-G, Kim WH.* Molecular pathology of gastric carcinoma. *Pathobiology journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 2011; 78(6): 302–310
- 16 *Farinati F, Cardin R, Cassaro M et al.* Helicobacter pylori, inflammation, oxidative damage and gastric cancer: A morphological, biological and molecular pathway. *European journal of cancer prevention the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 2008; 17(3): 195–200
- 17 *Maleki SS, Röcken C.* Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 2017; 19(5): 412–420
- 18 *Correa P, Piazzuelo MB.* Natural history of Helicobacter pylori infection. *Digestive and liver disease official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2008; 40(7): 490–496
- 19 *Uozaki H, Fukayama M.* Epstein-Barr virus and gastric carcinoma--viral carcinogenesis through epigenetic mechanisms. *International journal of clinical and experimental pathology* 2008; 1(3): 198–216
- 20 *Wang X-Q, Terry P-D, Yan H.* Review of salt consumption and stomach cancer risk: Epidemiological and biological evidence. *World journal of gastroenterology* 2009; 15(18): 2204–2213
- 21 *Ladeiras-Lopes R, Pereira AK, Nogueira A et al.* Smoking and gastric cancer: Systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer causes & control CCC* 2008; 19(7): 689–701
- 22 *Yang P, Zhou Y, Chen B et al.* Overweight, obesity and gastric cancer risk: Results from a meta-analysis of cohort studies. *European journal of cancer (Oxford, England 1990)* 2009; 45(16): 2867–2873
- 23 *Yang H-J, Kang D, Chang Y et al.* Diabetes mellitus is associated with an increased risk of gastric cancer: A cohort study. *Gastric cancer official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 2020; 23(3): 382–390
- 24 *Noto JM, Gaddy JA, Lee JY et al.* Iron deficiency accelerates Helicobacter pylori-induced carcinogenesis in rodents and humans. *The Journal of clinical investigation* 2013; 123(1): 479–492

- 25 Sitarz R, Maciejewski R, Polkowski WP, Offerhaus GJA. Gastroenterostoma after Billroth antrectomy as a premalignant condition. *World journal of gastroenterology* 2012; 18(25): 3201–3206
- 26 Brenner H, Arndt V, Strmer T et al. Individual and joint contribution of family history and *Helicobacter pylori* infection to the risk of gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 88(2): 274–279
- 27 El-Omar EM, Oien K, Murray LS et al. Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: Critical role of *H. pylori*. *Gastroenterology* 2000; 118(1): 22–30
- 28 Huang JY, Wang R, Gao Y-T, Yuan J-M. ABO blood type and the risk of cancer - Findings from the Shanghai Cohort Study. *PloS one* 2017; 12(9): e0184295
- 29 Lynch HT, Lynch JF, Shaw TG. Hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Gastrointestinal cancer research GCR* 2011; 4(4 Suppl 1): S9-S17
- 30 Guilford P, Hopkins J, Harraway J et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998; 392(6674): 402–405
- 31 Worthley DL, Phillips KD, Wayte N et al. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): A new autosomal dominant syndrome. *Gut* 2012; 61(5): 774–779
- 32 Bornschein J, Malfertheiner P. Gastric carcinogenesis. *Langenbeck's archives of surgery* 2011; 396(6): 729–742
- 33 *Onkologie Leitlinienprogramm*. S3 Leitlinie Magenkarzinom, Langversion 2.01 (Konsultationsfassung) – Januar 2019
- 34 Lumpkin WM, Crow RL, Hernandez CM, Cohn I. Carcinoma of the Stomach: Review of 1,035 cases. *Annals of surgery* 1964; 159: 919–932
- 35 Zulfiqar M, Koen J, Nougaret S et al. Krukenberg Tumors: Update on Imaging and Clinical Features. *AJR. American journal of roentgenology* 2020; 215(4): 1020–1029
- 36 *Onkologie Leitlinienprogramm*. S3 Leitlinie Magenkarzinom, Langversion 2.0, August 2019
- 37 Schuhmacher C, Novotny A, Meyer H-J. Therapie des Magenkarzinoms über die aktuelle Leitlinie hinaus: Eine Bestandsaufnahme. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2013; 84(4): 310–315
- 38 Macdonald John S., Smalley Stephen R., Benedetti Jacqueline et al. Chemoradiotherapy after Surgery Compared with Surgery Alone for Adenocarcinoma of the Stomach or Gastroesophageal Junction

- 39 Schröder W, Bruns CJ. Multimodale Therapie des Magenkarzinoms und Karzinoms des gastroösophagealen Übergangs – ECF vs. FLOT. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2017; 88(6): 540
- 40 Seevaratnam R, Coburn N, Cardoso R et al. A systematic review of the indications for genetic testing and prophylactic gastrectomy among patients with hereditary diffuse gastric cancer. *Gastric cancer official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 2012; 15 Suppl 1: S153-63
- 41 Chen Y, Zhang G, Zhao B et al. A better prognostic stratification for the 8th edition of the AJCC staging system of gastric cancer by incorporating pT4aN0M0 into stage IIIA. *Surgical oncology* 2019; 29: 90–96
- 42 Yokota T, Ishiyama S, Saito T et al. Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in gastric cancer: A multiple logistic regression analysis. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2004; 39(4): 380–384
- 43 Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C, Hrsg. TNM classification of malignant tumours. Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc; 2017
- 44 Hu B, El Hajj N, Sittler S et al. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of gastrointestinal oncology* 2012; 3(3): 251–261
- 45 Tsukiyama I, Akine Y, Kajiura Y et al. Radiation therapy for advanced gastric cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1988; 15(1): 123–127
- 46 Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma: An attempt at a histo-clinical classification. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 1965; 64: 31–49
- 47 Bosman FT, Hrsg. WHO classification of tumours of the digestive system: [reflects the views of a working group that convened for an editorial and consensus conference at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, December 10 - 12, 2009 ; third volume of the 4th edition of the WHO series on histological and genetic typing of human tumours]. 4th ed. Lyon: IARC; 2010
- 48 Röcken C. Tumoren und Tumorstadien des Magens. *Der Pathologe* 2017; 38(2): 75–86
- 49 Lei Z, Tan IB, Das K et al. Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterology* 2013; 145(3): 554–565

- 50 *Yoong J, Michael M, Leong T.* Targeted therapies for gastric cancer: Current status. *Drugs* 2011; 71(11): 1367–1384
- 51 *Gonzalez RS, Messing S, Tu X et al.* Immunohistochemistry as a surrogate for molecular subtyping of gastric adenocarcinoma. *Human pathology* 2016; 56: 16–21
- 52 *Setia N, Agoston AT, Han HS et al.* A protein and mRNA expression-based classification of gastric cancer. *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2016; 29(7): 772–784
- 53 *Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M et al.* Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nature medicine* 2015; 21(5): 449–456
- 54 *Hanahan D, Weinberg RA.* Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674
- 55 *Müller-Esterl W.* Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. 2nd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011
- 56 *Knudson AG.* Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1971; 68(4): 820–823
- 57 *Surget S, Khoury MP, Bourdon J-C.* Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: A clinical perspective. *OncoTargets and therapy* 2013; 7: 57–68
- 58 *Levine AJ, Hu W, Feng Z.* The P53 pathway: What questions remain to be explored? *Cell death and differentiation* 2006; 13(6): 1027–1036
- 59 *Soussi T.* The p53 pathway and human cancer. *The British journal of surgery* 2005; 92(11): 1331–1332
- 60 *Lane DP.* Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381): 15–16
- 61 *Chene, P.* In Vitro Analysis of the Dominant Negative Effect of p53 Mutants
- 62 *Isobe M, Emanuel BS, Givol D et al.* Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 1986; 320(6057): 84–85
- 63 *McBride OW, Merry D, Givol D.* The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986; 83(1): 130–134
- 64 *Ziener MA, Mason A, Carlson DM.* Cell-free translations of proline-rich protein mRNAs. *The Journal of biological chemistry* 1982; 257(18): 11176–11180
- 65 *Khoury MP, Bourdon J-C.* p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes & cancer* 2011; 2(4): 453–465

- 66 Bourdon J-C, Fernandes K, Murray-Zmijewski F et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development* 2005; 2122–2137
- 67 Zhu J, Zhang S, Jiang J, Chen X. Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275(51): 39927–39934
- 68 Vieler M, Sanyal S. p53 Isoforms and Their Implications in Cancer. *Cancers* 2018; 10(9)
- 69 Teodoro JG, Evans SK, Green MR. Inhibition of tumor angiogenesis by p53: A new role for the guardian of the genome. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2007; 85(11): 1175–1186
- 70 Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nature reviews. Cancer* 2009; 9(3): 153–166
- 71 Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004; 432(7015): 316–323
- 72 Hartwell L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 1992; 71(4): 543–546
- 73 Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: Positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005; 24(17): 2899–2908
- 74 Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396(6712): 643–649
- 75 Bakhoun SF, Cantley LC. The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment. *Cell* 2018; 174(6): 1347–1360
- 76 Holland AJ, Cleveland DW. Boveri revisited: Chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2009; 10(7): 478–487
- 77 Hussein MR, Wood GS. Building bridges in cancer: Mismatch repair and microsatellite instability. *The American Journal of dermatopathology* 2002; 24(1): 76–81
- 78 Gollin SM. Chromosomal instability. *Current opinion in oncology* 2004; 16(1): 25–31
- 79 Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends in cell biology* 1999; 9(12): M57-60
- 80 Tannock IF, Hickman JA. Limits to Precision Cancer Medicine. *The New England journal of medicine* 2017; 376(1): 96–97
- 81 Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2007; 8(5): 379–393
- 82 Cheeseman IM, Desai A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2008; 9(1): 33–46

- 83 Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85(18): 6622–6626
- 84 Artandi SE, Chang S, Lee SL et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000; 406(6796): 641–645
- 85 McClintock B. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* 1941; 26(2): 234–282
- 86 Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 1961; 25: 585–621
- 87 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (New York, N.Y.)* 1994; 266(5193): 2011–2015
- 88 Bailey SM, Murnane JP. Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic acids research* 2006; 34(8): 2408–2417
- 89 Nelsen CJ, Kuriyama R, Hirsch B et al. Short term cyclin D1 overexpression induces centrosome amplification, mitotic spindle abnormalities, and aneuploidy. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280(1): 768–776
- 90 Lee J-K, Choi Y-L, Kwon M, Park PJ. Mechanisms and Consequences of Cancer Genome Instability: Lessons from Genome Sequencing Studies. *Annual review of pathology* 2016; 11: 283–312
- 91 Nam H-J, Chae S, Jang S-H et al. The PI3K-Akt mediates oncogenic Met-induced centrosome amplification and chromosome instability. *Carcinogenesis* 2010; 31(9): 1531–1540
- 92 Köbel M, Piskorz AM, Lee S et al. Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. *The journal of pathology. Clinical research* 2016; 2(4): 247–258
- 93 Cui R, Widlund HR, Feige E et al. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 2007; 128(5): 853–864
- 94 Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: Emerging patterns from divergent signals. *Genes & development* 1998; 12(19): 2973–2983
- 95 Ando K, Oki E, Saeki H et al. Discrimination of p53 immunohistochemistry-positive tumors by its staining pattern in gastric cancer. *Cancer medicine* 2015; 4(1): 75–83

- 96 *Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Stemmermann GN, Noffsinger A.* TP53 and gastric carcinoma: A review. *Human mutation* 2003; 21(3): 258–270
- 97 *Crick FHC.* Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. *Journal of Molecular Biology* 1966; 19(2): 548–555
- 98 *Xue Y, San Luis B, Lane DP.* Intratumour heterogeneity of p53 expression; causes and consequences. *The Journal of pathology* 2019; 249(3): 274–285
- 99 *Itaya M, Yoshimoto J, Kojima K, Futagawa S.* Usefulness of p53 protein, Bcl-2 protein and Ki-67 as predictors of chemosensitivity of malignant tumors. *Oncology reports* 1999; 6(3): 675–682
- 100 *Schoop I, Maleki SS, Behrens H-M et al.* p53 immunostaining cannot be used to predict TP53 mutations in gastric cancer: Results from a large Central European cohort. *Human pathology* 2020; 105: 53–66
- 101 *Warneke VS, Behrens H-M, Haag J et al.* Prognostic and putative predictive biomarkers of gastric cancer for personalized medicine. *Diagnostic molecular pathology the American journal of surgical pathology, part B* 2013; 22(3): 127–137
- 102 *Böger C, Krüger S, Behrens HM et al.* Epstein-Barr virus-associated gastric cancer reveals intratumoral heterogeneity of PIK3CA mutations. *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology* 2017; 28(5): 1005–1014
- 103 *Mathiak M, Warneke VS, Behrens H-M et al.* Clinicopathologic Characteristics of Microsatellite Instable Gastric Carcinomas Revisited: Urgent Need for Standardization. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology AIMM* 2017; 25(1): 12–24
- 104 *Warneke VS, Behrens H-M, Böger C et al.* Her2/neu testing in gastric cancer: Evaluating the risk of sampling errors. *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology* 2013; 24(3): 725–733
- 105 *Metzger M-L, Behrens H-M, Böger C et al.* MET in gastric cancer--discarding a 10% cutoff rule. *Histopathology* 2016; 68(2): 241–253
- 106 *R. J. Simes.* An Improved Bonferroni Procedure for Multiple Tests of Significance. *Biometrika* (1986); Vol. 73, No. 3: pp. 751–754
- 107 *Ashcroft M, Vousden KH.* Regulation of p53 stability. *Oncogene* 1999; 18(53): 7637–7643

- 108 *Olivier M, Hollstein M, Hainaut P.* TP53 mutations in human cancers: Origins, consequences, and clinical use. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2010; 2(1): a001008
- 109 *Hollstein M, Hainaut P.* Massively regulated genes: The example of TP53. The Journal of pathology 2010; 220(2): 164–173
- 110 *Kumar M, Lu Z, Takwi AAL et al.* Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. Oncogene 2011; 30(7): 843–853
- 111 *Murao K, Kubo Y, Ohtani N et al.* Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: Frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways. The British journal of dermatology 2006; 155(5): 999–1005
- 112 *Fischer NW, Prodeus A, Malkin D, Gariépy J.* p53 oligomerization status modulates cell fate decisions between growth, arrest and apoptosis. Cell cycle (Georgetown, Tex.) 2016; 15(23): 3210–3219
- 113 *Haque MM, Kowtal P, Sarin R.* Identification and characterization of TP53 gene Allele Dropout in Li-Fraumeni syndrome and Oral cancer cohorts. Scientific reports 2018; 8(1): 11705
- 114 *Bakhoun SF, Landau DA.* Chromosomal Instability as a Driver of Tumor Heterogeneity and Evolution. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2017; 7(6)
- 115 *Iwamatsu H, Nishikura K, Watanabe H et al.* Heterogeneity of p53 mutational status in the superficial spreading type of early gastric carcinoma. Gastric cancer official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association 2001; 4(1): 20–26
- 116 *Hong WS, Hong SI, Lee DS, Son Y.* Effect of non-tumor cell contamination on detection of p53 gene mutations in human gastric cancer cells by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. The Korean journal of internal medicine 1994; 9(1): 20–24
- 117 *Zheng W, Khurana R, Farahmand S et al.* p53 immunostaining as a significant adjunct diagnostic method for uterine surface carcinoma: Precursor of uterine papillary serous carcinoma. The American journal of surgical pathology 1998; 22(12): 1463–1473
- 118 *Boyle DP, McArt DG, Irwin G et al.* The prognostic significance of the aberrant extremes of p53 immunophenotypes in breast cancer. Histopathology 2014; 65(3): 340–352

- 119 Beroukhi R, Mermel CH, Porter D et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 2010; 463(7283): 899–905
- 120 Vojtěšek B, Bártek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. *Journal of Immunological Methods* 1992; 151(1-2): 237–244
- 121 Würfl P, Taubert H, Meye A et al. Prognostic value of immunohistochemistry for p53 in primary soft-tissue sarcomas: A multivariate analysis of five antibodies. *Journal of cancer research and clinical oncology* 1997; 123(9): 502–508
- 122 Yu R, Sun T, Zhang X et al. TP53 Co-Mutational Features and NGS-Calibrated Immunohistochemistry Threshold in Gastric Cancer. *OncoTargets and therapy* 2021; 14: 4967–4978
- 123 Daun T, Nienhold R, Paasinen-Sohns A et al. Combined Simplified Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma, Enhanced by Lymph Node Status: An Integrative Approach. *Cancers* 2021; 13(15)

A Anhang

A.1 TP53-Exons

Exon 2

Cagccagactgccttccgggtcactgccatggaggagccgcagtcagatcctagcgtcgagccccctctgagtcaggaaacattttcagacctatggaaact

Exon 3

acttcctgaaaacaacgttctg

Exon 4

Tcccccttgccgtccaagcaatggatgatttgatgctgtccccggacgatattgaacaatggttactgaagaccaggtccagatgaagctcccagaatgccagaggctgtcccccggtggcccctgcaccagcagctcctacaccggcgcccctgcaccagccccctctggcccctgtcatcttctgtcccttcccagaaaacctaccagggcagctacggtttccgtctgggcttctgcattctgggacagccaagtctgtgacttgacg

Polymorphismus c.215C>G, p.R72P

Tcccccttgccgtccaagcaatggatgatttgatgctgtccccggacgatattgaacaatggttactgaagaccaggtccagatgaagctcccagaatgccagaggctgtcccccggtggcccctgcaccagcagctcctacaccggcgcccctgcaccagccccctctggcccctgtcatcttctgtcccttcccagaaaacctaccagggcagctacggtttccgtctgggcttctgcattctgggacagccaagtctgtgacttgacg

Exon 5

tactccccctgccctcaacaagatgttttccaactggccaagacctgccctgtgcagctgtgggttgattccacaccccccccgccacccgcgtccgcgcatggccatcacaagcagtcacagcacatgacggaggttgtagggcgctgccccacccatgagcgctgctcagatagcgatg

Exon 6

gtctggcccctcctcagcatcttatccgagtgggaaggaaatttgctgtggagtatttgatgacagaaacacttttcgacatagtgtggtgggtgccctatgagccgcctgag

Exon 7

gttggtctgactgtaccacatccactacaactacatgtgtaaacagttcctgcattggcgccatgaaccggaggcccatcctcaccatcatcacactggaagac tccag

Exon 8

tggtaatctactgggacggaacagctttgaggtgcgtgtttgtgcctgtcctgggagagaccggcgcacagaggaagagaatctccgaagaaaggggagcctcaccacgagctgccccaggagcactaagcgag

Exon 9

cactgccaacaacaccagctcctctccccagccaaagaagaaccactggatggagaatatttcacccttcag

Exon 10

atccgtggcgctgagcgcttcgagatgttccgagagctgaatgaggccttggaactcaaggatgccagggctgggaaggagccaggggggagcagggctcactccag

Exon 11

ccacctgaagtccaaaaagggtcagttctacctccgccataaaaaactcatgttcaagacagaagggcctgactcagactga

A.2 Tabellen 5-7

Tabelle 5: Weitere Korrelationen der p53-Immunhistochemie mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika. (1) Fisher's Exact Test.

		gültig / nicht gültig [n]	„<70%=0 und <50%=3“ vs. „≥70%=0 oder ≥50%=3“		„<70%=0 und <70%=3“ vs. „≥70%=0 oder ≥70%=3“		„<70%=0 und <80%=3“ vs. „≥70%=0 oder ≥80%=3“	
		n (%)	<70%=0 und <50%=3 n (%)	≥70%=0 oder ≥50%=3 n (%)	<70%=0 und <70%=3 n (%)	≥70%=0 oder ≥70%=3 n (%)	<70%=0 und <80%=3 n (%)	≥70%=0 oder ≥80%=3 n (%)
Laurén-Phänotyp	p ⁽¹⁾	467 / 0	p=0,545		p=0,295		p=0,437	
intestinal		238 (51,0)	104 (47,5)	134 (54,0)	120 (48,0)	118 (54,4)	130 (48,7)	108 (54,0)
diffus		149 (31,9)	76 (34,7)	73 (29,4)	81 (32,4)	68 (31,3)	85 (31,8)	64 (32,0)
gemischt		31 (6,6)	15 (6,8)	16 (6,5)	21 (8,4)	10 (4,6)	21 (7,9)	10 (5,0)
nicht klassifizierbar		49 (10,5)	24 (11,0)	25 (10,1)	28 (11,2)	21 (9,7)	31 (11,6)	18 (9,0)
EBV-Status	p ⁽¹⁾	453 / 14	p=0,063		p=0,243		p=0,356	
negativ		434 (95,8)	200 (93,9)	234 (97,5)	231 (94,7)	203 (97,1)	248 (95,0)	186 (96,9)
positiv		19 (4,2)	13 (6,1)	6 (2,5)	13 (5,3)	6 (2,9)	13 (5,0)	6 (3,1)
MS-Status	p ⁽¹⁾	451 / 16	p=0,372		p=0,074		p=0,029	
MSS		417 (92,5)	199 (93,9)	218 (91,2)	229 (94,6)	188 (90,0)	246 (95,0)	171 (89,1)
MSI		34 (7,5)	13 (6,1)	21 (8,8)	13 (5,4)	21 (10,0)	13 (5,0)	21 (10,9)
HER2-Status	p ⁽¹⁾	437 / 30	p=0,300		p=0,385		p=0,727	
negativ		401 (91,8)	194 (93,3)	207 (90,4)	222 (92,9)	179 (90,4)	235 (92,2)	166 (91,2)
positiv		36 (8,2)	14 (6,7)	22 (9,6)	17 (7,1)	19 (9,6)	20 (7,8)	16 (8,8)
MET-Status	p ⁽¹⁾	455 / 12	p=0,583		p=0,043		p=0,024	
negativ		423 (93,0)	199 (92,1)	224 (93,7)	224 (90,7)	199 (95,7)	239 (90,5)	184 (96,3)
positiv		32 (7,0)	17 (7,9)	15 (6,3)	23 (9,3)	9 (4,3)	25 (9,5)	7 (3,7)

Tabelle 6: Weitere Korrelationen der p53- Immunhistochemie mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika. (1) Fisher's Exact Test.

		gültig / nicht gültig [n]	„<90%=0 und <50%=3“ vs. „≥90%=0 oder ≥50%=3“		„<90%=0 und <70%=3“ vs. „≥90%=0 oder ≥70%=3“		„<90%=0 und <80%=3“ vs. „≥90%=0 oder ≥80%=3“	
			<90%=0 und <50%=3	≥90%=0 oder ≥50%=3	<90%=0 und <70%=3	≥90%=0 oder ≥70%=3	<90%=0 und <80%=3	≥90%=0 oder ≥80%=3
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Laurén-Phänotyp	p ⁽¹⁾	467 / 0	p=0,893		p=0,333		p=0,439	
intestinal		238 (51,0)	138 (49,5)	100 (53,2)	154 (49,7)	84 (53,5)	164 (50,2)	74 (52,9)
diffus		149 (31,9)	92 (33,0)	57 (30,3)	97 (31,3)	52 (33,1)	101 (30,9)	48 (34,3)
gemischt		31 (6,6)	19 (6,8)	12 (6,4)	25 (8,1)	6 (3,8)	25 (7,6)	6 (4,3)
nicht klassifizierbar		49 (10,5)	30 (10,8)	19 (10,1)	34 (11,0)	15 (9,6)	37 (11,3)	12 (8,6)
EBV-Status	p ⁽¹⁾	453 / 14	p=0,007		p=0,027		p=0,073	
negativ		434 (95,8)	252 (93,7)	182 (98,9)	283 (94,3)	151 (98,7)	300 (94,6)	134 (98,5)
positiv		19 (4,2)	17 (6,3)	2 (1,1)	17 (5,7)	2 (1,3)	17 (5,4)	2 (1,5)
MS-Status	p ⁽¹⁾	451 / 16	p=0,017		p=0,093		p=0,247	
MSS		417 (92,5)	241 (89,9)	176 (96,2)	271 (90,9)	146 (95,4)	288 (91,4)	129 (94,9)
MSI		34 (7,5)	27 (10,1)	7 (3,8)	27 (9,1)	7 (4,6)	27 (8,6)	7 (5,1)
HER2-Status	p ⁽¹⁾	437 / 30	p=0,109		p=0,136		p=0,339	
negativ		401 (91,8)	247 (93,6)	154 (89,0)	275 (93,2)	126 (88,7)	288 (92,6)	113 (89,7)
positiv		36 (8,2)	17 (6,4)	19 (11,0)	20 (6,8)	16 (11,3)	23 (7,4)	13 (10,3)
MET-Status	p ⁽¹⁾	455 / 12	p=0,456		p=0,697		p=0,423	
negativ		423 (93,0)	256 (93,8)	167 (91,8)	281 (92,4)	142 (94,0)	296 (92,2)	127 (94,8)
positiv		32 (7,0)	17 (6,2)	15 (8,2)	23 (7,6)	9 (6,0)	25 (7,8)	7 (5,2)

Tabelle 7: Weitere Korrelationen der p53- Immunhistochemie mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika. (1) Fisher's Exact Test.

		gültig / nicht gültig [n]	„<99%=0 und <50%=3“ vs. „≥99%=0 oder ≥50%=3“		„<99%=0 und <70%=3“ vs. „≥99%=0 oder ≥70%=3“		„<99%=0 und <80%=3“ vs. „≥99%=0 oder ≥80%=3“	
		n (%)	<99%=0 und <50%=3 n (%)	≥99%=0 oder ≥50%=3 n (%)	<99%=0 und <70%=3 n (%)	≥99%=0 oder ≥70%=3 n (%)	<99%=0 und <80%=3 n (%)	≥99%=0 oder ≥80%=3 n (%)
Laurén-Phänotyp	p ⁽¹⁾	467 / 0	p=0,254		p=0,103		p=0,253	
intestinal		238 (51,0)	165 (48,5)	73 (57,5)	181 (48,8)	57 (59,4)	191 (49,2)	47 (59,5)
diffus		149 (31,9)	117 (34,4)	32 (25,2)	122 (32,9)	27 (28,1)	126 (32,5)	23 (29,1)
gemischt		31 (6,6)	23 (6,8)	8 (6,3)	29 (7,8)	2 (2,1)	29 (7,5)	2 (2,5)
nicht klassifizierbar		49 (10,5)	35 (10,3)	14 (11,0)	39 (10,5)	10 (10,4)	42 (10,8)	7 (8,9)
EBV-Status	p ⁽¹⁾	453 / 14	p=0,032		p=0,143		p=0,221	
negativ		434 (95,8)	310 (94,5)	124 (99,2)	341 (95,0)	93 (98,9)	358 (95,2)	76 (98,7)
positiv		19 (4,2)	18 (5,5)	1 (0,8)	18 (5,0)	1 (1,1)	18 (4,8)	1 (1,3)
MS-Status	p ⁽¹⁾	451 / 16	p<0,001		p=0,004		p=0,017	
MSS		417 (92,5)	294 (89,9)	123 (99,2)	324 (90,8)	93 (98,9)	341 (91,2)	76 (98,7)
MSI		34 (7,5)	33 (10,1)	1 (0,8)	33 (9,2)	1 (1,1)	33 (8,8)	1 (1,3)
HER2-Status	p ⁽¹⁾	437 / 30	p=0,018		p=0,016		p=0,060	
negativ		401 (91,8)	299 (93,7)	102 (86,4)	327 (93,4)	74 (85,1)	340 (92,9)	61 (85,9)
positiv		36 (8,2)	20 (6,3)	16 (13,6)	23 (6,6)	13 (14,9)	26 (7,1)	10 (14,1)
MET-Status	p ⁽¹⁾	455 / 12	p=0,212		p>0,999		p=0,803	
negativ		423 (93,0)	313 (94,0)	110 (90,2)	338 (92,9)	85 (93,4)	353 (92,7)	70 (94,6)
positiv		32 (7,0)	20 (6,0)	12 (9,8)	26 (7,1)	6 (6,6)	28 (7,3)	4 (5,4)

A.3 Tabelle 8

Tabelle 8: TP53-Mutationsstatus in 103 CIN* und GS* Fällen. ¹Bei den gekennzeichneten Fällen wurden abweichend das *AllPrep DNA/RNA FFPE Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) zur DNA-Extraktion und das *QIAquick® 96 PCR Purification kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) zur Aufreinigung der PCR-Produkte entsprechend der Hersteller-Empfehlung verwendet [100].

Fallnummer	Lauren-Phänotyp	HER2-/MET-Status	p53-IHC			TP53-Mutationsstatus							Effekt der Mutation
			Färbemuster	Algorithmen		Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9	Exon 10	
				HScore (Median)	HScore (Quartile)								
1 ¹	intestinal	HER2-/MET-positiv	hoch	Q2+Q3	<90%=0 und <50%=3	wt	wt	wt	wt	wt	wt	-	
2 ¹						-	wt	c.646G>T	wt	wt	-	-	p.V216L/missense
3 ¹						-	wt	c.639A>G	wt	c.844C>T	-	-	p.R213R/silent p.R282W/missense
4 ¹						-	wt	wt	wt	c.844C>T	-	-	p.R282W/missense
5 ¹						c.215C>G	wt	wt	wt	wt	wt	wt	p.P72R/missense
6						-	wt	wt	wt	wt	-	-	
7						n.a.	wt	wt	c.713G>A	wt	-	-	p.C238Y/missense
8						-	wt	wt	wt	c.832C>G	-	-	p.P278A/missense
9						n.a.	c.524G>A	wt	wt	wt	-	-	p.R175H/missense
10						n.a.	wt	c.652_654del	wt	wt	-	-	p.V218del/frameshift
11 ¹				-		c.524G>A	wt	wt	wt	-	-	p.R175H/missense	
12 ¹				wt		wt	c.632C>T	wt	wt	wt	wt	p.T211I/missense	
13 ¹				-		wt	wt	c.743G>A	wt	-	-	p.R248Q/missense	
14 ¹				-		wt	wt	c.743G>A	wt	-	-	p.R248Q/missense	
15 ¹				-		c.530C>G	wt	wt	wt	-	-	p.P177R/missense	
16				-		wt	wt	c.749C>T	wt	-	-	p.P250L/missense	

17	HER2-/MET-positiv	intestinal	hoch	Q1+Q4	≥90%=0 oder ≥50%=3	n.a.	wt	wt	wt	n.a.	-	-	
18						-	wt	wt	wt	wt	-	-	
19						-	wt	wt	wt	c.899C>T	-	-	p.P300L/missense
20						-	wt	wt	wt	wt	-	-	
21						n.a.	wt	wt	c.743G>A	n.a.	wt	n.a.	p.R248Q/missense
22 ¹						n.a.	wt	wt	c.743G>A	wt	wt	wt	p.R248Q/missense
23 ¹						-	wt	wt	c.723del	wt	-	-	p.S241fs/frameshift
24 ¹						c.347del	wt	wt	wt	wt	wt	-	p.S116fs/frameshift
25 ¹						-	wt	wt	c.723del	wt	-	-	p.S241fs/frameshift
26 ¹						n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	-	
27 ¹	HER2-/MET-negativ	diffus	niedrig	Q2+Q3	<90%=0 und <50%=3	wt	wt	wt	wt	wt	wt	-	
28 ¹						n.a.	wt	wt	wt	wt	n.a.	-	
29						-	c.438G>A	wt	wt	c.837G>A	-	-	p.W146*/nonsense p.G279G/silent
30						-	wt	wt	wt	wt	-	-	
31						n.a.	wt	wt	wt	wt	-	-	
32 ¹						wt	wt	wt	wt	wt	wt	-	
33 ¹						wt	wt	wt	wt	wt	c.993G>A	-	p.Q331Q/silent
34						n.a.	wt	wt	wt	wt	-	-	
35 ¹						n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	-	
36 ¹						n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	-	
37 ¹						wt	wt	wt	wt	n.a.	wt	-	
38 ¹						wt	wt	wt	wt	wt	wt	-	
39 ¹						n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	-	
40 ¹						n.a.	wt	wt	wt	wt	n.a.	-	
41						-	wt	wt	wt	wt	-	-	
42						-	wt	wt	n.a.	wt	-	-	
43						n.a.	wt	wt	wt	wt	-	-	
44						-	wt	wt	wt	n.a.	-	-	
45						-	wt	wt	wt	wt	-	-	
46						-	wt	wt	wt	wt	-	-	
47						-	wt	wt	wt	wt	-	-	
48						-	wt	wt	wt	wt	-	-	

49	diffus	HER2-/MET-negativ	niedrig	hoch	Q2+Q3	<90%=0 u. <50%=3	-	wt	wt	wt	wt	-	-		
50							-	wt	wt	wt	wt	-	-		
51							grau	n.a.	c.553A>G	n.a.	wt	n.a.	wt	n.a.	p.S185G/missense
							schwarz	n.a.	c.553A>G	n.a.	wt	wt	wt	n.a.	p.S185G/missense
52							grau	-	wt	wt	wt	wt	-	-	
							weiß	-	wt	wt	wt	wt	-	-	
53								-	wt	wt	wt	wt	-	-	
54								-	wt	wt	wt	wt	-	-	
55 ¹								n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	-	
56 ¹								wt	wt	wt	wt	wt	wt	-	
57 ¹								wt	wt	wt	wt	wt	wt	-	
58 ¹								n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	-	
59 ¹								wt	wt	wt	wt	wt	wt	-	
60 ¹								wt	wt	wt	wt	wt	wt	-	
61 ¹								n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	-	
62								-	wt	wt	c.751A>C	wt	-	-	p.I251L/missense
63								-	wt	wt	wt	wt	-	-	
64								-	wt	wt	wt	wt	-	-	
65								-	c.511G>T	wt	wt	wt	-	-	p.E171*/nonsense
66								n.a.	c.510_511delinsTT	wt	wt	wt	-	-	p.E171*/nonsense
67								-	wt	wt	wt	wt	-	-	
68								n.a.	wt	wt	wt	wt	-	-	
69								-	wt	wt	wt	wt	-	-	
70								n.a.	wt	wt	wt	wt	-	-	
71								-	wt	wt	wt	wt	-	-	
72								-	wt	wt	wt	wt	-	-	
73								-	wt	c.574C>T	wt	wt	-	-	p.Q192*/nonsense
74								-	wt	wt	wt	wt	-	-	
75								n.a.	wt	wt	wt	c.809T>G	-	-	p.F270C/missense
76								-	wt	wt	c.730G>T	wt	-	-	p.G244C/misense
77								n.a.	c.536A>G	wt	wt	wt	-	-	p.H179R/missense
78								-	wt	wt	wt	c.818G>A	-	-	p.R273H/missense
79 ¹								n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	-	
80								-	wt	wt	wt	wt	-	-	

81	diffus	HER2-/MET-negativ		hoch	Q2+Q3	<90%=0 und <50%=3	-	wt	wt	wt	wt	wt	-	-	
82 ¹							wt	wt	wt	wt	wt	wt	-		
83 ¹							n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	-		
84 ¹							n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	-		
85 ¹							wt	wt	wt	wt	wt	wt	-		
86 ¹							wt	wt	wt	wt	wt	wt	-		
87 ¹							-	c.524G>A	wt	wt	wt	-	-	p.R175H/missense	
88							-	wt	wt	wt	c.817C>T	-	-	p.R273C/missense	
89							-	wt	c.639A>G	wt	wt	-	-	c.639A>G/silent	
90							-	wt	wt	wt	wt	-	-		
91							-	wt	wt	wt	wt	-	-		
92							-	wt	wt	wt	wt	-	-		
93							-	wt	wt	wt	wt	-	-		
94							-	wt	wt	wt	wt	-	-		
95							-	wt	c.640C>G	wt	wt	-	-	p.H214D/missense	
96							-	wt	wt	wt	wt	-	-		
97							-	wt	wt	wt	wt	-	-		
98							-	wt	wt	wt	wt	-	-		
99							-	wt	wt	wt	wt	-	-		
100							-	wt	wt	c.743G>A	wt	-	-	p.R248Q/missense	
101							-	wt	wt	wt	wt	-	-		
102							schwarz	-	wt	wt	wt	-	-		
							weiß	-	c.393_395del	wt	wt	-	-	p.N131del/frameshift	
103							schwarz	-	wt	wt	wt	-	-		
	weiß	-	wt	wt	wt	-	-								

A.4 Tabelle 9

Tabelle 9: TP53-Mutationsstatus in acht heterogenen Fällen.

Fallnummer	p53-IHC				TP53-Mutationsstatus							Effekt der Mutation	
	Färbemuster	Algorithmen			Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9	Exon 10		
		HScore (Median)	HScore (Quartile)	Färbeintensität (%)									
104	schwarz	hoch	Q2+Q3	<90%=0 und <50%=3	-	wt	wt	wt	wt	-	-	p.Y220C/missense	
	grau				-	wt	c.659A>G	wt	wt	-	-		
105	grau				n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	wt		
	schwarz				n.a.	wt	wt	wt	wt	n.a.	n.a.		
106	weiß	niedrig			n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	
	grau				n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	
107	weiß				n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	
	grau				n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	
108	grau				n.a.	c.424C>T	wt	wt	wt	wt	wt	n.a.	p.P142S/missense
	schwarz				n.a.	c.424C>T	wt	wt	wt	wt	wt	n.a.	p.P142S/missense
109	weiß				n.a.	wt	wt	wt	n.a.	wt	wt	wt	
	grau				n.a.	wt	wt	wt	n.a.	wt	wt	wt	
110	weiß				n.a.	wt	wt	wt	n.a.	wt	n.a.		
	grau				n.a.	wt	wt	wt	wt	wt	wt		
111	schwarz				-	wt	wt	wt	wt	-	-		
	weiß				-	wt	wt	wt	wt	-	-		

A.5 Abbildung 19

Gesamte Validierungskohorte (111)			CIN* Fälle (34)		
	TP53- Mutation	TP53- Wildtyp		TP53- Mutation	TP53- Wildtyp
hoch	26	26	hoch	16	5
niedrig	10	49	niedrig	4	9
Sensitivität ≈ 0,72 Spezifität ≈ 0,65			Sensitivität ≈ 0,8 Spezifität ≈ 0,64		
	TP53- Mutation	TP53- Wildtyp		TP53- Mutation	TP53- Wildtyp
Q1+Q4	20	28	Q1+Q4	12	9
Q2+Q3	16	47	Q2+Q3	8	5
Sensitivität ≈ 0,56 Spezifität ≈ 0,63			Sensitivität ≈ 0,6 Spezifität ≈ 0,36		
	TP53- Mutation	TP53- Wildtyp		TP53- Mutation	TP53- Wildtyp
≥90%=0 oder ≥50%=3	17	25	≥90%=0 oder ≥50%=3	9	9
<90%=0 und <50%=3	19	50	<90%=0 und <50%=3	11	5
Sensitivität ≈ 0,47 Spezifität ≈ 0,67			Sensitivität ≈ 0,45 Spezifität ≈ 0,36		

Sensitivität = $\frac{\text{korrekt erkannter TP53 – mutationsbedingter p53 – Expressionstyp}}{\text{alle TP53 – mutierten Fälle}}$

Spezifität = $\frac{\text{korrekt erkannter TP53 – Wildtyp}}{\text{alle Fälle mit TP53 – Wildtyp}}$

Abbildung 19: Sensitivität und Spezifität. Genauigkeit verschiedener p53-IHC-Bewertungsalgorithmen bei der Erfassung des „TP53-mutationsbedingten p53-Expressionstyps“. Zu den TP53-Mutationen werden alle Veränderungen gezählt, bei denen es sich nicht um eine stumme Mutation handelt, diese werden bei den Fällen mit TP53-Wildtyp berücksichtigt.

B Publikationen

Vortrag

Intratumorale Heterogenität der p53-Expression im Magenkarzinom

I. V. Glaßer, S. S. Maleki, C. Böger, S. Krüger, H.-M. Behrens, C. Röcken

102. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie,

24.-26. Mai 2018, Berlin

Originalarbeit

p53 immunostaining cannot be used to predict TP53 mutations in gastric cancer - Results from a large Central European cohort

Schoop, I.; Maleki, S. S.; Behrens, H.-M.; Krüger, S.; Haag, J.; Röcken, C.

Human Pathology, 105 (2020) 53-66. doi:10.1016/j.humpath.2020.09.006

C Erklärung

Hiermit erkläre ich, Isabelle Victoria Schoop, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit unter Anleitung meiner Betreuer eigenständig verfasst habe. Es wurden ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel und Quellen genutzt. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Kiel, den 01.01.2022

Isabelle Victoria Schoop

D Danksagung

Mein größter Dank gilt meinen Doktorvater Herrn Professor Dr. Christoph Röcken, Direktor und Leiter des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, für die Bereitstellung des Themas und der Ressourcen für meine Promotionsarbeit, die stets herzliche und engagierte Betreuung bei manchmal verzwickten Fragestellungen und die unendliche Geduld.

Ein herzlicher Dank geht an das hervorragende Laborteam des Instituts für Pathologie des UKSH Kiel unter der Leitung von Frau Sandra Krüger. Besonders möchte ich Herrn Dr. Jochen Haag danken, ohne dessen Anleitung und Hilfestellung im Labor die zeitgerechte, erfolgreiche Veröffentlichung unserer Forschungsergebnisse nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte mich sehr bei Herrn Dr. Hans-Michael Behrens für die zuverlässige und gewissenhafte Betreuung der statistischen Auswertung und die Hilfe bei technischen Problemen aller Art bedanken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Saffiyeh Saboor Maleki für die Bereitstellung der Laborergebnisse, welche im Rahmen ihrer Masterarbeit entstanden sind.

In Dankbarkeit möchte ich allen Patienten und Patientinnen gedenken, deren Gewebeproben ich im Rahmen meiner Promotionsarbeit untersuchen durfte.

Zuletzt möchte ich aus tiefstem Herzen meiner Familie und meinen Freunden danken, denn sie haben niemals aufgehört, an mich zu glauben.