

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

**Die Bedeutung der FGFR2-Proteinexpression für
Patienten mit Karzinomen des Magens in einer
zentraleuropäischen Kohorte**

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

vorgelegt von

Thorben Schrumpf
aus Flensburg

Kiel 2022

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie
2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Susanne Sebens, Institut für Experimentelle Tumorforschung

Tag der mündlichen Prüfung: Freitag der, 18.08.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 14.04.2023

gez.: Prof. Dr. Christoph Röcken

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis:	II
Tabellenverzeichnis:	IV
Abbildungsverzeichnis:	V
1. Einleitung.....	1
1.1. Zielsetzung der Arbeit.....	9
2. Material und Methoden.....	10
2.1. Patienten.....	10
2.2. Material	11
2.2.1. Geräte	11
2.2.2. Chemikalien und Reagenzien.....	11
2.2.3. Kitsysteme	12
2.2.4. Antikörper.....	12
2.2.5. Sonde	12
2.2.6. Verbrauchsmaterialien	13
2.2.7. Software	13
2.3. Methoden	13
2.3.1. Histologische Untersuchungen	13
2.3.2. Immunhistochemie (IHC).....	14
2.3.3. Chromogene in-situ Hybridisation (CISH)	17
2.4. Pathologisch-anatomische Patientenmerkmale.....	19
2.5. Statistik	19
3. Ergebnisse	20
3.1. Immunhistochemie	20
3.2. Chromogene in-situ Hybridisierung	27
3.3. Korrelation des FGFR2-IHC-Rezeptorstatus mit klinisch-pathologischen Parametern	32
4. Diskussion	35
5. Zusammenfassung	44
6. Literaturverzeichnis.....	45
7. Anhang	50
7.1. Ethikvotum	50
8. Publikation	51
9. Danksagung	52

Abkürzungsverzeichnis:

CagA	Cytotoxin-assoziiertes Gen A
Cens.	censored event
CISH	chromogene in-situ Hybridisierung
Conf. Int.	Konfidenzintervall
EBV	Epstein–Barr Virus
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ERBB2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
FGFR2	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor 2
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FRS2	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptorsubstrat 2
Grb2	Wachstumsfaktorrezeptor-gebundenes Protein 2
H-score	Histoscore
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
IHC	Immunhistochemie
IM	intestinale Metaplasie
IEN	intraepitheliale Neoplasie
ISH	In-situ Hybridisierung
KRAS	K-Ras proto-oncogene
MAPK3	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 3
MET	Tyrosin-Protein Kinase Met
Min.	Minuten
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
Muc. Typ	Mucintyp
Mut.	mutiert
neg.	negativ
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OS	Gesamtüberleben
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PDL1	<i>programmed death-ligand 1</i>
PI	Phosphoinositol
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat 3-Kinase
pos.	Positiv
RAS	GTPase Ras
RHOA	<i>Ras homolog gene family member A</i>
SD	Standardabweichung
Shp2	Tyrosinphosphatase SHP2
TIL	Tumorfiltrierende Lymphozyten
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TKR	Tyrosinkinase-Rezeptor
TMA	<i>Tissue micro array</i>
TSS	tumorspezifisches Überleben

UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VacA-s1/m1	<i>VacA</i> toxins from strains 60190
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VISTA	<i>v</i> -domain Ig suppressor of T-cell activation
Wt.	Wildtyp

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1:	Analyse der Überlebenszeit der Patienten anhand verschiedener Definitionen der FGFR2-Positivität	21
Tabelle 2:	Analyse der Überlebenszeit der Patienten anhand verschiedener Definitionen der FGFR2-Positivität getrennt nach der Laurén-Klassifikation.....	26
Tabelle 3:	Analyse der Überlebenszeit der Patienten anhand des Vorhandenseins einer <i>Fgfr2</i> -Genamplifikation oder Polysomie in der CISH	28
Tabelle 4:	Analyse der Überlebenszeit von Patienten anhand des Vorhandenseins einer <i>Fgfr2</i> -Genamplifikation oder Polysomie getrennt nach der Laurén Klassifikation.....	31
Tabelle 5:	Korrelation der klinisch-pathologischen Merkmale mit einer erhöhten FGFR2-Proteinexpression	33

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1:	Verschiedene Intensitäten der Proteinexpression von FGFR2 in der Immunhistochemie	16
Abbildung 2:	Heterogene Proteinexpression in der immunhistochemischen Untersuchung des FGFR2	23
Abbildung 3:	Analyse der Überlebenszeit anhand verschiedener Definitionen der FGFR2-Positivität in der immunhistochemischen Untersuchungen	24
Abbildung 4:	Analyse der Überlebenszeit anhand verschiedener Definitionen der FGFR2-Positivität getrennt nach der Laurén -Klassifikation.....	25
Abbildung 5:	Amplifikation und Cluster in der <i>Fgfr2</i> -Chromagenen in-situ Hybridisierung	29
Abbildung 6:	Analyse der Überlebenszeit der Patienten anhand des Vorhandenseins einer Fgfr2-Genamplifikation oder Fgfr2-Polysomie getrennt nach der Laurén-Klassifikation.....	30

1. Einleitung

In den vergangenen Jahrzehnten ist die Inzidenz des Magenkarzinoms kontinuierlich gesunken. Trotz dessen stellten Karzinome des Magens im Jahr 2012 die fünfhäufigste Tumorentität sowie die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit dar [1]. Im Jahr 2016 erkrankten in Deutschland 15.140 Patienten, darunter 5840 Frauen, an Karzinomen des Magens und des gastroösophagealen Übergangs. Im gleichen Zeitraum starben 9.231 Patienten in Deutschland an Karzinomen des Magens, wodurch etwa 1% aller Sterbefälle im Jahr 2016 auf die Diagnose Magenkrebs zurückzuführen sind. Im Mittel erkranken Männer mit 72 Jahren, Frauen mit 76 Jahren. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Frauen bei 34% und für Männer bei 32% [2]. In der Vergangenheit zeigte sich eine Zunahme der Inzidenz von Karzinomen des Mageneingangs, während sich die Häufigkeit der Karzinome des Magenausgangs (*Antrum* und *Pylorus*) hingegen als rückläufig erwies [3]. Zum Zeitpunkt der Diagnose befinden sich zwei Drittel der Patienten bereits in einem fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung (T3-T4) [4], sodass bei diesen Patienten die Therapieoptionen eingeschränkt sind. In der Mehrzahl solcher Fälle ist die Erkrankung so weit fortgeschritten, dass ein kurativer, chirurgischer Therapieansatz keine Option mehr darstellt. Dahingehend bleibt lediglich die Möglichkeit der palliativen Radio- und Chemotherapie sowie Maßnahmen der Symptomkontrolle [5].

Der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung von intestinalen Magenkarzinomen des Corpus und Pylorus stellt eine Infektion mit *Helicobacter pylori* dar. Insgesamt weisen mehr als 90% aller Patienten mit einem Magenfrühkarzinom eine *Helicobacter pylori*-Gastritis auf [3]. Die Infektion mit *Helicobacter pylori* führt über die Induktion von Inflammation, Proliferation und Apoptose zu einer chronisch-aktiven Gastritis mit Ulzerationen und intestinalen Metaplasien. In der Folge erhöht die Infektion das Magenkarzinomrisiko um das Sechs- bis Zehnfache im Gegensatz zur nicht infizierten Bevölkerung [6]. Kontinuierlicher galliger Reflux in den Magen ist ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung des Magenkarzinoms. Die ständige Aufnahme von Nitraten aus getrockneten, geräucherten oder stark gesalzenen Lebensmitteln, welche durch Bakterien zu krebserregenden Nitriten umgewandelt werden können, stellt ein weiteres Risiko für die Entstehung von Magenkarzinomen dar [3]. Zigaretten- und Alkoholkonsum erhöhen ebenso das Erkrankungsrisiko. Ebenfalls scheint eine gewisse genetische Prädisposition zur Entwicklung eines Magenkarzinoms zu bestehen. So weisen Verwandte ersten Grades der Erkrankten ein zwei- bis dreifach höheres Risiko im Vergleich zur Normalbevölkerung auf, an Magenkrebs zu erkranken [4].

Frühstadien und oberflächliche Magenkarzinome verursachen in der Regel keine klinischen Symptome. Erst mit dem Fortschreiten der Erkrankung treten abhängig von der Lokalisation des Tumors zumeist unspezifische Symptome auf. Bei Pylorustumoren kommt es vermehrt zu Übelkeit und Erbrechen während Patienten mit Kardiatumoren eher unter dyspeptischen Beschwerden leiden. Allgemein klagen die Patienten zumeist über Appetitlosigkeit mit Gewichtsverlust sowie ein schlechtes Unbehagen im Epigastrium, welches von einem postprandialen Völlegefühl bis zu einem starken Schmerz reichen kann. Ein tastbarer Oberbauchtumor ist zumeist ein Zeichen für eine bereits weit fortgeschrittene Erkrankung. Das Magenkarzinom breitet sich per continuitatem durch die Magenwand ins perigastrische Gewebe aus und ist dadurch in der Lage, angrenzende Organe wie Leber, Kolon oder Pankreas direkt zu infiltrieren. Hämatogene Metastasen finden sich primär in der Leber. Häufig tritt eine Metastasierung in intraabdominale und supraklavikuläre Lymphknoten sowie bei Frauen in die Ovarien ("Krukenberg-Tumor") auf [3, 7].

Aktuell stellt die chirurgische und endoskopische Therapie die Grundlage für einen kurativen Behandlungsansatz dar. So sind die auf die Mucosa beschränkten T1 Stadien des Magenkrebses durch endoskopische Mukosektomien therapierbar. Für weiter fortgeschrittene Erkrankungen wie T1-Stadien mit positivem Lymphknotenstatus oder T2-T4 Stadien ist die chirurgische Resektion mit begleitender Lymphadenektomie und neoadjuvanter oder adjuvanter Chemotherapie die Standardtherapie. In den vergangenen Jahren hat sich die D2-Lymphadenektomie als Standard im europäischen Raum etabliert [8]. Ein radikaleres chirurgisches Vorgehen zeigte in einer japanischen Untersuchung keinen klinischen Vorteil für die tumorfreie Überlebenszeit der Patienten, war jedoch mit einer erhöhten prozedurassoziierten Mortalität verbunden [9]. Zur adjuvanten oder neoadjuvanten Chemotherapie des Magenkarzinoms stehen eine Reihe verschiedener Therapieoptionen zur Verfügung. Zur Standardtherapie im europäischen Raum gehört eine Kombinationstherapie aus 5-Fluorouracil, Oxaliplatin, Docetaxel und Folsäure. Die Strahlentherapie spielt in der primären Therapie des Magenkarzinoms eine eher untergeordnete Rolle. In der ARTIST-2 Studie konnte kein Überlebensvorteil für eine Strahlentherapie zusätzlich zur adjuvanten Chemotherapie nachgewiesen werden [10].

Die Sicherung der Diagnose erfolgt meist mittels Videoendoskopie durch die Entnahme von multiplen Biopsien. Zur genaueren Abschätzung der Ausdehnung des Befundes werden Endosonografie, Ultraschalluntersuchungen des Abdomens sowie CT- oder MRT-Untersuchungen von Thorax und Abdomen verwendet [3, 7].

Makroskopisch können Magenkarzinome nach der Borrmann-Klassifikation in polypoide, ulcerierende, diffus wachsende mit Ulzeration und diffus infiltrierend wachsende Tumoren eingeteilt werden [11]. Histologisch wird das Magenkarzinom nach der WHO-Klassifikation eingeteilt. Als Magadenokarzinom werden alle epithelialen Tumoren des Magens mit glandulärer

Differenzierung bezeichnet [12]. Die Unterscheidung der einzelnen Entitäten erfolgt anhand der Tumorarchitektur sowie der Schleimbildung. Unterschieden werden 4 Wachstumsformen: tubuläre, papilläre und muzinöse Karzinome sowie das gering kohäsiv wachsende Karzinom, zu dem auch das Siegelringzellkarzinom zählt. Abzugrenzen davon sind die selten auftretenden Formen der Plattenepithel-, adenosquamösen, kleinzelligen- und undifferenzierten Karzinome. Die Laurén-Klassifikation stellt eine weitere von der WHO aufgenommene histologische Einteilung des Magenkarzinoms dar [13]. Adenokarzinome werden in einen intestinalen und einen diffusen Tumortyp unterteilt. Dem intestinalen Typ werden die gut bis mäßig differenzierten papillären, tubulären und muzinösen Adenokarzinome zugeordnet, sie entstehen zumeist auf der Grundlage einer chronisch-atrophischen Gastritis mit intestinaler Metaplasie. Dem diffusen Typ werden die Siegelringzellkarzinome, undifferenzierten Karzinome sowie die schlecht differenzierten tubulären, papillären oder muzinösen Adenokarzinome zugeordnet. Die Laurén-Klassifikation begründet sich auf der Beobachtung, dass sich mit dem diffusen und interstitiellen Tumortyp klinisch zwei verschiedene Formen des Magenkarzinoms mit unterschiedlicher Ätiologie, Epidemiologie und Ausbreitung differenzieren lassen. Besondere Bedeutung kommt der Laurén-Klassifikation ebenfalls bei der Entscheidung über die Radikalität des gewählten Operationsverfahrens im Falle einer chirurgischen Therapie zu [14]. Etwa 30% der Patienten weisen Tumoranteile sowohl des intestinalen als auch des diffusen Typs auf und werden als gemischter Typ klassifiziert. Ungeachtet der Größe des Anteils gilt die Empfehlung, alle Proben in denen der diffuse Typ vorkommt, als eben solchen zu klassifizieren [6].

Vor allem das Magenkarzinom vom intestinalen Typ entwickelt sich meist sporadisch auf dem Boden einer chronisch-aktiven, Helicobacter pylori-assoziierten Gastritis und selten im Verlauf einer Adenom-Karzinom-Sequenz [15]. Bei dem von Correa beschriebenen Modell kommt es im Verlauf einer chronisch-aktiven Gastritis zu einer Drüsenkörperatrophie in der Magenschleimhaut. Aufgrund von verschiedenen mutagenen Agenzien entsteht in der atrophen Schleimhaut schrittweise eine intestinale Metaplasie (IM), eine low und high grade intraepitheliale Neoplasie und schließlich ein Karzinom [16]. Seltener kann eine Autoimmungastritis ebenfalls über einer Schleimhautatrophie und intestinale Metaplasie zu einem Magenkarzinom führen [17]. Die Pathogenität der Helicobacter pylori-Infektion wird von bestimmten genetischen Subtypen des Bakteriums beeinflusst. So konnten die Bakterien mit den Genotypen CagA- und VacA-S1/M1 vor allem bei Patienten mit weiter fortgeschrittenen Tumorstadien nachgewiesen werden [18]. Die IM der Magenschleimhaut wird in drei Subgruppen unterteilt. Der Typ I stellt mit 70-80% die häufigste Form der IM dar. Er zeichnet sich durch eine komplett enterale Metaplasie mit Saumzellen, Becherzellen, Paneth- und endokrinen Zellen aus, geht jedoch nicht mit einem erhöhten Karzinomrisiko einher. Der Typ II stellt mit 20-30% die zweithäufigste Form der IM da.

Er zeichnet sich durch eine inkomplette Metaplasie mit Becherzellen aus. Diese wird als Zwischenstufe zur Rückbildung in eine normale Mukosa oder der Entstehung einer Typ III IM betrachtet. In der Typ III IM finden sich kryptenartige Drüsen mit voluminösen Becherzellen. Mit ca. 3 % ist es die seltenste Form der IM [6, 17]. Die IM scheint nach neuerer Studienlage jedoch keine obligat präkanzeröse Läsion für die Entstehung des Magenkarzinoms zu sein. Teilweise wird die IM mehr als eine parakanzeröse Läsion beschrieben und die strikte sequenzielle Entwicklung des Magenkarzinoms in Frage gestellt [17]. Diffuse Magenkarzinome wie das Siegelringzellkarzinom entstehen zumeist in nicht atropher Mukosa unabhängig von intestinalen Metaplasien oder Atrophien auf dem Boden einer Gastritis [17].

Adenome sind mit ca. 10-20% aller Polypen des Magens selten. Sie werden in ein intestinales, foveoläres sowie ein Pylorusdrüsenadenom und das sehr seltene Hauptzelladenom unterteilt [15]. Für Adenome mit einem Durchmesser von mehr als 2 cm beträgt die Wahrscheinlichkeit einer malignen Transformation bis zu 50% [12].

Die intraepitheliale Neoplasie (IEN) ist eine prämaligine, auf die Magenschleimhaut begrenzte und die Lamina propria nicht überschreitende Veränderung des Magenepithels. Sie wird in eine low grade IEN mit nur leicht gestörter Mukosaarchitektur mit fehlender luminaler Ausreifung der Zellen und eine high grade IEN mit deutlich gestörter Drüsenarchitektur im gesamten Epithel mit proliferierenden, dicht gelagerten, verzweigungsgestörten Drüsen, die eine Knospenbildung aufweisen können, unterteilt. Die low und high grade IEN sowie das Magadenom gelten als präkanzeröse Läsionen [6]. Wird jedoch eine IEN in der Biopsie gesichert, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass bereits ein invasives Karzinom vorliegt [17].

Differentialdiagnostisch muss eine IEN der Magenschleimhaut von einem reaktiv-hyperplastischen Prozess abgegrenzt werden. Mögliche Auslöser einer reaktiven Hyperplasie können eine NSAR-induzierte medikamentös-toxische Gastritis sowie säureinduzierte Erosionen und Ulzerationen sein. Der Übergang der reaktiven Hyperplasie zur IEN ist jedoch fließend. Generell weist beispielsweise die foveoläre Hyperplasie lediglich korkenzieherartig proliferierende Foveolae mit apikaler Ausreifung auf. In der Regel finden sich bei der foveolären Hyperplasie keine Verzweigungsstörungen, prominente Nucleolen oder deutliche Schwankungen der Kerngröße. Die Anzahl der Mitosen und zytologischen Atypien sollten bei reaktiven Veränderungen im Gegensatz zur IEN eher gering ausfallen. Diese Kriterien stellen jedoch einen kontinuierlichen Prozess dar und können in einer Biopsie heterogen auftreten. Im Zweifel sollte die Diagnose einer „fraglichen intraepithelialen Neoplasie“ gestellt werden [6].

In der Vergangenheit wurden verschiedene genetische Alterationen im Magenkarzinom beschrieben. Nach dem Vorschlag des Cancer Genome Atlas Research Network können Karzinome des Magens genetisch in 4 Kategorien eingeteilt werden. Tumoren mit einem positiven

Nachweis des Epstein-Barr-Virus, Mikrosatelliten-instabile Tumoren, genomisch stabile Tumoren sowie Tumoren mit chromosomaler Instabilität. Genetisch stabile Tumoren treten eher bei jüngeren Patienten und Mikrosatelliten-instabile Tumoren vermehrt bei älteren Patienten auf. Zwischen den 4 Gruppen zeigte sich jedoch kein Unterschied bezüglich der Gesamtüberlebenszeit der Patienten [19].

Für die Entwicklung von zielgerichteten Tumortherapien waren in der Vergangenheit Rezeptor-Tyrosinkinasen von klinischer Relevanz. Insgesamt wurden 58 Tyrosinkinase-Rezeptoren (TKR) im menschlichen Genom beschrieben, die sich in 20 Rezeptorfamilien einteilen lassen, wie die Familien der Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR), vaskulären Endothelwachstumsfaktor-Rezeptoren (VEGFR) oder Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR) [20]. Im Magenkarzinom waren vor allem Rezeptoren wie der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER2), der EGFR, VEGFR, FGFR und der *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) und der Tyrosinproteinkinase Met (MET) von Bedeutung für die Forschung und Entwicklung von zielgerichteten Therapien und für die Behandlung des Magenkarzinoms [21]. Dennoch bleibt die Behandlung mit Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper gegen HER2, die einzige zugelassene Erstlinien-Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI)-Therapie [22]. In der ToGA Studie zeigte sich eine Verbesserung der mittleren Gesamtüberlebenszeit um 2,7 Monate für Patienten, die mit einer Kombination aus Chemotherapie und Trastuzumab behandelt worden waren. Eingeschlossen in die ToGA Studie wurden Patienten mit Tumoren des Magens oder gastroösophagealen Übergangs, die entweder eine Überexpression von HER2 in der Immunhistochemie oder eine HER2-Amplifikation in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung aufwiesen [23]. Eine HER2-Amplifikation findet sich jedoch lediglich in etwa 8% aller Patienten mit einem Magenkarzinom [24], sodass diese Therapieoption nur einem kleinen Teil der Patienten zugutekommt. Die meisten klinischen Studien an anderen TKIs zeigen jedoch keine signifikante Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit der Patienten [25]. Lediglich die RAINBOW Studie konnte einen Überlebensvorteil von 2,2 Monaten für palliative Patienten, die mit einer Kombination aus dem anti-VEGFR-2-Antikörper Ramucirumab und Paclitaxel behandelt wurden gegenüber der Paclitaxel-Monotherapie nachweisen [26].

Der FGFR2 ist einer von fünf verschiedenen FGFRs, welche zur Klasse der TKR gehört. Der FGFR2-Komplex besteht aus zwei Rezeptormolekülen sowie einer Heparansulfat-Proteoglykankette. Nach Bindung des Liganden an der Zellaußenseite dimerisieren beide Rezeptormoleküle [27, 28]. Dies führt zu einer intrazellulären Konformationsänderung der Tyrosinkinase-Domänen, welche in einer Transphosphorylierung der Domänen resultiert. Dies erlaubt Adapterproteinen wie FGFR Substrat 2 (FRS2) an die intrazellulären Domänen zu binden. Adapterproteine wie FRS2 verfügen über multiple Phosphorylierungsdomänen, die wiederum

weitere Signalproteine binden. So aktiviert FRS2 wiederum das Wachstumsfaktorrezeptor-gebundene Protein 2 (Grb2) und die Tyrosinphosphatase SHP2 (Shp2). Unter der Verwendung von *Son of Sevenless*, GRB2-assoziertes-Bindungsprotein 1 und die Ubiquitinligase Cbl als Liganden aktiviert Grb2 die Mitogen-aktivierte Proteinkinase 3 (MAPK3) sowie den Phosphoinositid-3-Kinase Signalweg. Shp2 aktiviert ebenfalls den MAPK3-Signalweg [29]. Phospholipase C γ wird unabhängig über einen Phosphotyrosinrest am C-terminalen Ende von FRS2 aktiviert. Über weitere *second messenger*, wie Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat und Diacylglycerol führt dies zur Aktivierung von Proteinkinase C. Beeinflusst durch den zellulären Kontext werden weitere Signalwege, wie *signal transducer and activator of transcription* (STAT) über FGFRs aktiviert [27].

Die Aktivierung ist physiologisch über einen negativen Rückkopplungsmechanismus geregelt, welcher jedoch bis jetzt nur unzureichend verstanden ist. Eine negative Rückkopplung wird auf mehreren Ebenen der Signalübertragung vermittelt. Nach der Aktivierung werden die Rezeptoren internalisiert und infolge dessen deaktiviert. In der Zelle werden sie dann entweder recycelt oder abgebaut [27]. Aktiviertes ERK phosphoryliert einen Threoninrest an FRS2 α und inhibiert so die weitere Rekrutierung von Grb2 [28].

In der Entwicklung von Mausembryonen spielen FGFRs eine wichtige Rolle. *Fgfr*-knockout Mäuse zeigen je nach deaktiviertem Gen der *Fgfr*-Familie verschiedene Defekte, wie eine gestörte Reifung der Lunge, der Extremitäten und anderer Gewebe. Die Phänotypen der entsprechenden *knockout*-Tiere reichen von Deformationen des Schädels oder der Extremitäten im lebenden Tier bis zum Versterben der Tiere intrauterin oder kurz nach der Geburt. Beim Menschen sind Defekte in *Fgfr*-Genen als Auslöser für Skelettkrankheiten wie das Jackson-Weiss- oder Pfeiffer-Syndrom beschrieben [29].

In der Vergangenheit wurde die klinische Bedeutung des FGFR2 im Margenkarzinom in einigen Studien untersucht. So konnten beispielsweise in einer internationalen Studie an drei Kohorten aus China, Korea und Großbritannien gezeigt werden, dass eine *Fgfr2*-Amplifikation einen unabhängigen Prognosefaktor für die Überlebenszeit der Patienten darstellt [30]. Den Standard zur Untersuchung von Genamplifikationen stellt die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) dar, die vom überwiegenden Teil der Autoren zur Untersuchung des *Fgfr2*-Genstatus verwendet wurde [11, 30-36]. Zur Detektion einer Genamplifikation wird bei dieser Methode ein Quotient aus der Anzahl der Signale des Zielgens und der Anzahl der Signale des Centromers des Chromosomes gebildet (*Fgfr2*/Centromer-10-Ratio). In den meisten Studien zur Untersuchung des *Fgfr2* wurde eine durchschnittliche *Fgfr2*/Centromer-10-Ratio von > 2,0 als *Fgfr2*-Amplifikation bewertet. Diese Grenze wurde von der HER2-Diagnostik im Brustkrebs übernommen [37]. Das Vorgehen hier war in einzelnen Untersuchung abweichend und so verwendeten einige Autoren eine Ratio von >2,2 als Definition einer *Fgfr2*-Amplifikation [38]. Ebenfalls bestehen Unterschiede darin, in wie

vielen Tumorzellen eine Amplifikation nachgewiesen werden muss und ob eine Polysomie gesondert bewertet wurde. Neben der FISH wurden auch andere Methoden wie quantitative PCR Untersuchungen und *next generation sequencing* (NGS) verwendet, um Amplifikationen des *Fgfr2*-Gens nachzuweisen. Insgesamt wird das Vorkommen einer *Fgfr2*-Amplifikation mit einer Häufigkeit von 2-9% im Magenkarzinom angegeben [19, 30, 32, 33, 35, 39, 40]. Ebenfalls wurde in früheren Untersuchungen beschrieben, dass auch eine vermehrte FGFR2-Proteinexpression mit einer schlechteren Prognose der Überlebenszeit aller Patienten mit Magenkrebs einhergeht [35]. Eine FGFR2-Überexpression wurde mit einer Häufigkeit von 4-61% in Karzinomen des Magens angegeben [34, 41-47]. Es wurde berichtet, dass eine erhöhte FGFR2-Proteinexpression mit einer schlechteren Gesamt- oder tumorspezifischen Überlebenszeit der Patienten assoziiert ist [34, 42-44]. Einige Autoren sahen eine erhöhte FGFR2-Proteinexpression als einen eigenständigen Prädiktor für eine verkürzte Überlebenszeit aller Patienten mit einem Magenkarzinom [34, 43, 44]. Andere Autoren konnten ausschließlich eine prognostische Bedeutung für einzelne Subgruppen der Laurén-Klassifikation nachweisen [41]. Ebenfalls zeigten sich in den einzelnen Untersuchungen zur Evaluation eines Zusammenhangs zwischen einer erhöhten FGFR2-Proteinexpression und anderen klinisch-pathologischen Parametern wie beispielsweise dem Alter der Patienten, dem TNM-Stadium oder der Koexpression anderer RTKs kein einheitliches Bild [34, 41-44]. In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2019 konnte jedoch gezeigt werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen einer vermehrten FGFR2-Proteinexpression und einem höheren Tumorstadium sowie einem höheren L-Stadium und T-Stadium der TNM-Klassifikation besteht [48]. Ebenfalls beschrieben wurde eine gute Korrelation einer *Fgfr2*-Amplifikation in der FISH und einer FGFR2-Überexpression in der Immunhistochemie [42], sowie eine heterogene Verteilung der *Fgfr2*-Amplifikation in verschiedenen Teilen des Tumors [30, 34]. Der überwiegende Teil der aktuellen Daten zur prognostischen Relevanz des FGFR2 stammt derzeit aus Japan [35, 40-44, 47, 49, 50], Südkorea [30, 32, 34, 39, 45], China [30, 46] und Singapur [31]. Untersuchungen an kauasischen Kohorten mit Daten aus England [30, 33] und den USA [19, 40] sind aktuell unterrepräsentiert. In der Vergangenheit wurden zielgerichtete Therapeutika gegen verschiedene Rezeptoren der FGFR-Familie entwickelt. Die Arbeit an den ersten FGFR-Multikinase-Inhibitoren wurde jedoch aufgrund starker Nebenwirkungen der Präparate und der Schwierigkeit, geeignete Marker für die Auswahl potentieller Patienten zu finden, eingestellt [25]. Aus der zweiten Generation von spezifischen FGFR-Inhibitoren erwies sich bis jetzt einzig AZD4547 als möglicher Kandidat für eine Therapie. Bei AZD4547 handelt es sich um einen oral verabreichten spezifischen Inhibitor der FGFR-Familie, der vor allem FGFR1, -2 und -3 hemmt. Jedoch konnte dieser Wirkstoff in einer ersten klinischen Studie keinen Vorteil für die progressionsfreie Überlebenszeit von mäßig *Fgfr2*-amplifizierten Patienten mit Magenkrebs zeigen [51]. Als Begründung für diese Ergebnisse

wurden Schwierigkeiten in der Übertragung der bisherigen Daten zu prognostischen Relevanz des *Fgfr2* / FGFR2-Status auf die Identifikation von Patienten, die von einer zielgerichteten anti-FGFR2-Therapie profitieren könnten, diskutiert [25]. Aus der Beobachtung, dass eine einfache *Fgfr2*-Amplifikation oder eine erhöhte FGFR2-Proteinexpression mit einer verschlechterten Prognose einhergeht, lässt sich scheinbar nicht zwingend eine Vorhersage treffen, ob diese Patienten auch von einer zielgerichteten Therapie gegen den FGFR2-Rezeptor profitieren. In einer erneuten Analyse der Daten aus der zuvor erwähnten Untersuchung zur klinischen Wirkung des selektiven FGFR-Inhibitors AZD4547 konnte ein klinisches Ansprechen der Therapie in einer kleinen Subgruppe beobachtet werden. Bei dieser Subgruppe handelte es sich jedoch ausschließlich um Patienten mit einer starken *Fgfr2*-Amplifikation, hohen FGFR2-mRNA-Spiegeln oder einer starken FGFR2-Proteinexpression [52]. In den letzten Jahren wurden weitere spezifische und unspezifische FGFR-Inhibitoren zur Therapie des Magenkrebses evaluiert. Von den bis jetzt untersuchten Substanzen wird jedoch aktuell nur Bemarituzumab in einer Phase III Studie auf seine klinische Wirksamkeit überprüft [53]. Trotz dieser Bemühungen ist bis jetzt keiner dieser FGFR-Inhibitoren im routinemäßigen klinischen Einsatz [54]. Als mögliche Gründe für die mangelnde Wirksamkeit wird unter anderem das Wirkprinzip der bis jetzt getesteten FGFR-Inhibitoren angeführt, bei denen es sich überwiegend um ATP-kompetitive Inhibitoren des FGFR handelt. So wird postuliert, dass nichtkompetitive Inhibitoren des FGFR, die eine kovalente Bindung zum Rezeptor aufbauen, weniger anfällig dafür sind, ihre Wirkung infolge von Mutationen der Ligandenbindungsstelle des Rezeptors zu verlieren [55]. Andere Autoren vertreten wiederum die These, dass die bis jetzt verwendeten Schwellenwerte für die Definition einer FGFR2-Überexpression oder *Fgfr2*-Amplifikation für die Auswahl von Patienten für eine zielgerichtete Tumortherapie zu gering gewählt sein könnten und aktuell keine Klarheit über die tatsächliche prognostische Relevanz der FGFR2-Proteinexpression und *Fgfr2*-Amplifikation besteht [25].

1.1. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser retrospektiven Arbeit war es, die bisherigen Daten zur Überlebenszeiten von Patienten mit einer FGFR2-Proteinüberexpression oder *Fgfr2*-Genamplifikation im Magenkarzinom an einer zentraleuropäisch/kaukasischen Kohorte zu validieren und mögliche Abweichungen von den früheren, meist asiatischen Kohorten zu dokumentieren. Die initiale Frage der Arbeit war, ob sich analog zu den asiatischen Daten ein Zusammenhang zwischen der FGFR2-Proteinexpression und dem Gesamt- oder tumorspezifischen Überleben der Patienten zeigt. Zweitens sollte untersucht werden, ob sich dieser Zusammenhang unter der Verwendung verschiedener Definitionen einer erhöhten FGFR2-Proteinexpression zeigt. Drittens war zu klären, ob in der untersuchten Kohorte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der FGFR2-Proteinexpression und der *Fgfr2*-Genamplifikation besteht. Viertens wurde untersucht, ob analog zu den vorangegangen Studien ebenfalls eine heterogene Verteilung der FGFR2-Proteinexpression und *Fgfr2*-Genamplifikation vorkommt. Abschließend sollte beurteilt werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem FGFR2-Status und anderen klinisch-pathologischen Patientencharakteristika besteht. Aus diesen Beobachtungen sollte abgeleitet werden, ob für eine vermehrte FGFR2-Proteinexpression oder *Fgfr2*-Genamplifikation Unterschiede zwischen der untersuchten zentraleuropäisch/kaukasischen Kohorte und den früher untersuchten, größtenteils asiatischen Kohorten festzustellen ist.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten

Untersucht wurden Patienten mit Karzinomen des Magens oder gastroösophagealen Übergangs, die sich im Zeitraum von 1997 bis 2009 einer partiellen oder totalen Gastrektomie im UKSH Kiel unterzogen haben. Die histologischen Proben stammen aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des UKSH, Campus Kiel. Aus den Patientenakten wurden folgende klinische Daten recherchiert: die Art der Operation, das Alter der Patienten bei Diagnosestellung, das Geschlecht, die Tumorlokalisation, der histologische Subtyp des Tumors, das Grading des Tumors, die Tiefe der Tumorinfiltration, die Anzahl der entfernten Lymphknoten sowie die Anzahl der Lymphknoten mit enthaltenen Metastasen. Angaben zu Überlebenszeiten wurden dem epidemiologischem Krebsregister des Landes Schleswig-Holstein entnommen. Angaben zu noch lebenden Patienten wurden anhand der internen Patientenakten und Nachsorgeuntersuchungen sowie durch Anfragen der Hausärzte ermittelt. In die Untersuchung eingeschlossen wurden Patienten mit dem histologischen Nachweis eines Adenokarzinoms des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs, für die Angaben zur Überlebenszeit vorhanden waren.

Ein Ausschluss erfolgte beim Nachweis einer anderen Tumorentität als der eines Adenokarzinoms sowie im Fall, dass die histopathologischen Daten unvollständig waren oder keine Nachbeobachtung stattgefunden hatte. Die Patienten, die ohne Angabe zur Überlebenszeit aus der Nachbeobachtung gefallen waren, wurden in der Kaplan-Maier Analyse als zensiert angegeben. Patienten, die sich zuvor schon einer partiellen Gastrektomie unterzogen hatten (Billroth-II) und ein Tumorrezidiv erlitten, wurden ebenso ausgeschlossen wie Patienten, die mit einer perioperativen Chemotherapie behandelt worden waren. Nach Einschluss der Patienten erfolgte eine Pseudonymisierung der Patientendaten und die Auswertung erfolgte anonym. Die Studie war von der Ethik-Kommission des UKSH, Campus Kiel, genehmigt worden (Referenznummer D 453/10).

2.2. Material

2.2.1. Geräte

Folgende Geräte kamen zum Einsatz: Autostainer BondTM Max System (Leica- Menarini, Berlin, Germany), Rotationsmikrotom Leica RM2245 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland), Leica SCN400 mikroskopischer Voll-Diascanner (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland), Mikroskop Leica DM 1000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), Mikroskop Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Jena, Deutschland), Memmert WNB7 Wasserbad (Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland), ThermoBrite Wärmeplatte (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden Deutschland), Galaxy Mini Zentrifuge C1413V-230EU (VWR International, Wien, Österreich), Eppendorf Research Pipetten 100–1000 µl und 2–20 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), Vortex Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA), Rüttler See saw Rocker SSL4 (Stuart, Cole-Parmer, Stone, Staffordshire, United Kingdom), Inkubationskammer für Objektträger (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland), Labor-Kühlschrank (Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, Deutschland), Medite COP 30 Cooling Plate (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland), Tissue Flotation Bath TFB 45 (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland), Trocken-/Wärmeschränke (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland).

2.2.2. Chemikalien und Reagenzien

Folgende Chemikalien und Reagenzien wurden bei der Durchführung der Versuchsreihen verwendet: Destilliertes Wasser H₂O (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), Ethanol 99% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), Xylol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30%, 250 ml Art-Nr: 8070.2 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Shandon EZ-MountTM (Thermo Scientific Anatomical Pathology, Runcorn, UK), UltraVision Hydrogen Peroxidase Block (Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo USA), UltraVision Protein Block (Thermo Scientific, Lab Vision Corporation, Fremont USA), Antibody-Diluent (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland), N-Histofine Simple Stain MAX PO Polymer (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan), Hämalaunlösung sauer nach Mayer (Dr. K. Hollborn u. Söhne, Leipzig, Deutschland), Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), Trizma Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), Citratpuffer: 3,78 g Zitronensäure Monohydrat (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland) + 24,21g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Für die Immunhistochemie wurde eigenständig TBS-Puffer hergestellt. Hierfür wurden 60,57 g Trizma

Base und 87,66 g NaCl in 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit HCl ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Ebenfalls wurde EDTA-Puffer hergestellt: 0,375 g EDTA wurden in 100 ml deionisiertem Wasser gelöst und anschließend auf eine Gesamtmenge von 1000 ml aufgefüllt. Durch tropfenweise Zugabe von Natronlauge wurde unter kontinuierlicher elektronischer Messung ein pH-Wert von 9,3 eingestellt. Für die Chromogene in-situ Hybridisation wurde der verwendete TBS-Puffer aus 25 ml TBS-Lösung des Herstellers (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland) und 475 ml destilliertem H₂O hergestellt.

2.2.3. Kitsysteme

Folgende Kitsysteme wurde für diese Arbeit verwendet: Unter Zuhilfenahme des Peroxidase Substrat Kit DAB (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) wurde bei der Immunhistochemie (IHC) gearbeitet. Die Analyse der chromogenen in-situ-Hybridisierung (CISH) wurde mithilfe des ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland) durchgeführt. Das zuletzt erwähnte Kit beinhaltet folgende Komponenten: Heat Pretreatment Solution EDTA (HPTS), Pepsin Solution, Wash Buffer SSC, 20x Wash Buffer TBS, Anti-DIG/DNP-Mix, HRP/AP-Polymer-Mix, AP-Red Solution A, AP-Red Solution B, HRP-Green Solution A, HRP-Green Solution B, Nuclear Blue Solution, Mounting Solution.

2.2.4. Antikörper

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde der polyklonale Kaninchen-anti-FGFR2 Antikörper ab10648 in einer Verdünnung von 1:20 (Abcam, Cambridge, MA, USA) verwendet.

2.2.5. Sonde

Als Sonde für die CISH wurde die ZytoDot® 2C SPEC *Fgfr2*/CEN 10 Probe (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland) verwendet.

2.2.6. Verbrauchsmaterialien

Bei den Versuchen wurden folgende Verbrauchsmaterialien genutzt: ep T.I.P.S.® Pipettenspitzen (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling- Berzdorf, Deutschland) sowie Biosphere Filter Tip Pipettenspitzen, (Ref: 70.760.212, Ref: 70.1116.210) unterschiedlicher Größe (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Deutschland). DARKOPEN (Kisker, Dutscher Group, Steinfurt, Deutschland), Glas- und Plastikküvetten (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland), Fixogum (Marabu GmbH & Co. KG, Tamm, Deutschland), Leica Bond Plus Slides Objektträger (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland), Menzel-Gläser, unterschiedlicher Größe (Thermo Sientific, Waltham, USA), SafeSeal Reagiergefäße unterschiedlicher Größe (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland), Mikrotom-Klinge A22 (Feather Safety Razor Co. LTD, Japan), Reagenzgläser (Schott AG, Mainz, Deutschland).

2.2.7. Software

Es wurde folgende Software zur Anfertigung der Arbeit verwendet: Microsoft® Word für Mac Version 16.15 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutlschland), SPSS Version 20.0 (IBM Corpo- ration, Armonk, NY, USA). MacOS Catalina 10.15.7 (Apple Inc., USA), EndNote X20.2 Bld 17373 (Clarivate™, Philadelphia, USA)

2.3. Methoden

2.3.1. Histologische Untersuchungen

Die Gewebeproben wurden in 3,5% neutral gepufferter Formaldehydlösung für mindestens 24 Stunden fixiert. Nach Entwässerung in einem Gewebeautomaten erfolgte die Einbettung in Paraffin. Die auf Objektträgern aufgebrachten Schnitte wurden entparaffiniert und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Dieser Prozess war während der gesamten Studiendauer standardisiert. Die Adenokarzinome der Studienkohorte wurde an Hand der HE-gefärbbten Schnittpräparate entsprechend der Laurén-Klassifikation sowie des Mucin-Phänotyps klassifiziert [13, 56]. Das Tumorstadium (pTNM Status) wurde gemäß der achten Auflage der TNM-Klassifikation der UICC erhoben [57]. Gemäß der achten Auflage zählten alle Tumoren des gastroösophagealen Überganges sowie Tumoren der ersten 5 cm des proximalen Magens mit Ausstrahlung in den Ösophagus zu den Tumoren des Ösophagus. Die zuvor untersuchten Proben

wurden dementsprechend neu klassifiziert. Das Tumorstadium basiert ausschließlich auf der pathologisch-anatomischen Untersuchung.

2.3.2. Immunhistochemie (IHC)

2.3.2.1. *Immunhistochemisches Färbeprotokoll mittels Peroxidase*

Für den immunhistochemischen Nachweis von FGFR2 wurden 2 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Diese wurden über Nacht bei 54 °C getrocknet. Am Folgetag erfolgte die Entparaffinierung und Rehydrierung, indem die Paraffinschnitte für 2x 10 Min. in Xylol, anschließend 2x 2 Min. in 96-prozentigem Ethanol, 2x 2 Min. in 70-prozentigem Ethanol, 2x 2 Min. in 50-prozentigem Ethanol gestellt und zuletzt 2x in destilliertem Wasser gewaschen wurden. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in einer mit Citratpuffer befüllten Plastikküvette in einen Schnellkochtopf mit destilliertem Wasser (zu ca. 1/3 des Volumens befüllt) gestellt. Die Präparate wurden kurz aufgekocht und schließlich mit Leitungswasser abgekühlt. In einem weiteren Waschschritt wurde die Küvette 5 Min. mit TBS gespült. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden anschließend auf jeden Schnitt 2 bis 3 Tropfen Hydrogen Peroxidase Block gegeben und 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen für 3x 5 Min. mit TBS wurden zur Proteinblockierung 2 bis 3 Tropfen Ultra V Block auf jedes Präparat gegeben, für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und erneut mit TBS für 3x 2 Min. gespült. Der Primärantikörper (polyklonaler anti-FGFR2-Antikörper) wurde zuvor mit Antibody-Diluent auf die gewünschte Konzentration von 1:20 verdünnt. Auf jeden Schnitt wurden 150 µl der Antikörperlösung pipettiert und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Inkubation in einem Kühlschrank bei 4 °C über Nacht fortgesetzt. Das Gewebe wurde vorher mit einem DARKOPEN (hydrophober Stift) markiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Präparate 3x 5 Min. in TBS gespült. Die Antigendemaskierung erfolgte durch Bedecken des Gewebes mit der ER1-Antigen-Retrieval-Lösung (Polymer Simple Stain MAX PO von Histofine) für 20–30 Min. Das hinzugefügte Polymer diente sowohl als Träger des Sekundärantikörpers als auch als Träger der Peroxidase. Nach einem erneuten Waschgang in TBS wurden die Schnitte für 5-10 Min. mit 150 µl DAB-Substrat inkubiert. Zum Stoppen des Färbevorgangs wurden die Schnitte in deionisiertem Wasser gespült. Zuletzt wurden die Präparate zur Kernfärbung noch für jeweils 1 Min. in Hämalaun inkubiert und anschließend 5 Min. unter fließendem warmem Leitungswasser geblättert. Im letzten Schritt erfolgte die Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe bis hin zum Xylol und die Konservierung mittels des xylollöslichen Eindeckmittels EZ-Mount. Nach Etablierung der manuellen Färbung kam das Autostainer Bond™Max-System (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) zum Einsatz. Die automatische Antigendemaskierung erfolgte hier mit

der Bond Epitope Retrieval Solution 1 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland) für 20 min bei einem pH von 6,0. Zur Detektion der Antikörper wurde das BondTM Polymer Refine Detection Kit der Firma Leica (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland) verwendet.

2.3.2.2. Auswertung der Immunhistochemie

Zu Beginn der Untersuchung der Immunhistochemie wurden alle Proben gesichtet und die Intensität der Färbung in 3 Stufen eingeteilt (FGFR2-IHC 0, 1⁺, 2⁺ und 3⁺) FGFR2-IHC 0 wurde als die Abwesenheit jeglicher Immunreaktion definiert. FGFR2-IHC 1⁺ wurde als schwache, FGFR2-IHC 2⁺ wurde als mittelstarke und FGFR2-IHC 3⁺ als starke Immunreaktion definiert. Zur Sicherstellung einer gleichbleibenden Bewertung der Färbeintensität wurden für alle Intensitäten repräsentative Fälle ausgewählt, die zum Vergleich der Bewertung aller Proben dienten (Abbildung 1). Die Untersuchung der FGFR2-Expression wurde wie einmal für den Östrogenrezeptor beschrieben mithilfe des H-Scores (Histoscores) vorgenommen [58].

Für diesen Score wurden die prozentualen Anteile (P FGFR2-IHC 0, 1⁺, 2⁺, 3⁺) der verschiedenen Intensitäten der IHC-Färbung am gesamten Tumor dokumentiert. Die Summe aller Intensitäten ergab immer 100 Prozent. Die prozentualen Anteile der IHC-Färbung wurden daraufhin mit der IHC-Intensität multipliziert und ergaben den H-Score nach folgender Formel:

$$0x(P \text{ } FGFR2 - IHC \text{ } 0) + 1x(P \text{ } FGFR2 - IHC \text{ } 1^+) + 2x(P \text{ } FGFR2 - IHC \text{ } 2^+) \\ + 3x(P \text{ } FGFR2 - IHC \text{ } 3^+) = HScore.$$

Während der mikroskopischen Untersuchung der FGFR2-IHC-Färbung wurden ebenso die Heterogenität der FGFR2-Expression, die Verteilung FGFR2-exprimierender Zellen innerhalb des Tumors, die FGFR2-Expression von gesundem Gewebe, die Lokalisation der FGFR2-Expression innerhalb der Tumorzelle sowie die FGFR2-Expression von Stromazellen des Tumors dokumentiert. Die weitere Unterteilung der FGFR2-IHC-Färbung innerhalb der Tumorzelle in membranständig, zytoplasmatisch oder nuklear wurde nicht zur weiteren Differenzierung der Patienten verwendet.

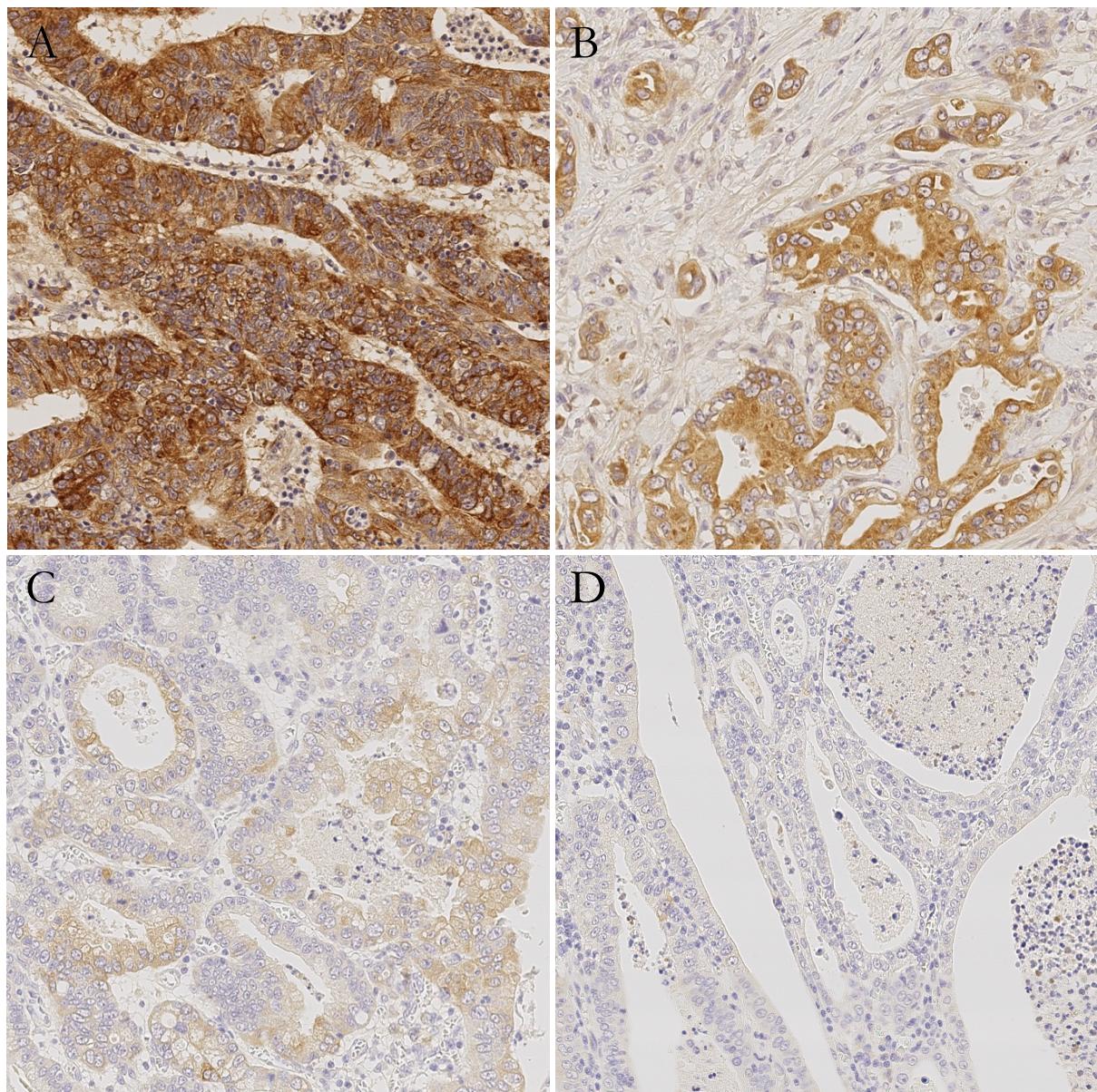


Abbildung 1: Verschiedene Intensitäten der Proteinexpression von FGFR2 in der Immunhistochemie

Die Untersuchung der FGFR2-Proteinexpression erfolgte mittels immunhistochemischer Anfärbung des FGFR2-Rezeptors, wie im Abschnitt 2.2.2 aufgeführt wurde. In dieser Färbung resultiert eine höhere Proteinkonzentration in einer stärkeren Braunfärbung der FGFR2-exprimierenden Zellkompartimente. Es erfolgte zunächst eine Sichtung der gesamten Kohorte und Einteilung der Intensität der Färbung in 4 Kategorien von 0 bis 3⁺. Zum besseren Vergleich wurden repräsentative Fälle mit einer Intensität von FGFR-IHC 3⁺ (A), FGFR-IHC 2⁺ (B), FGFR-IHC 1⁺ (C) und FGFR-IHC 0 (D) ausgewählt und während der gesamten Untersuchung als Referenz verwendet. Originalvergrößerung, 200-fach (A-D).

2.3.3. Chromogene in-situ Hybridisation (CISH)

2.3.3.1. Färbeprotokoll

Die Proben wurden manuell im Labor jeweils über einen Zeitraum von 2 Tagen bearbeitet. Für die Untersuchung wurden erneut Großflächenschnitte mit einer Stärke von 4 µm angefertigt, die auf beschichteten Objekträgern bei 60 °C im Thermobrite für mindestens 2 Stunden getrocknet wurden. Das Entparaffinieren der Proben erfolgte für 2x 15 Min. in Xylol. Im Anschluss erfolgte eine Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe für 2x 5 Min. in 100-prozentigem Ethanol, 1x 5 Min. in 96-prozentigem Ethanol und 1x 5 Min. in 70-prozentigem Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte einer 5-minütigen Behandlung mit 3-prozentigem H₂O₂ auf einem Rüttler unterzogen. Nach zweimaligem Spülen der Proben mit destilliertem H₂O wurden die Proben zur Hitzedenaturierung und Aufbrechen der DNA in Einzelstränge für 15 Min. bei 95 °C mit HPT-Solution behandelt. Im Anschluss wurden die Proben weitere 2x mit destilliertem H₂O gespült und für 5 Min. mit je 4 bis 5 Tropfen Pepsinlösung bei 37 °C behandelt. Nach einmaligem erneutem Spülen der Proben mit destilliertem H₂O sowie einer darauffolgenden Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe, einmalig 1x 1 Min. in 70-prozentigem, 1x 1 Min. in 96-prozentigem und 1x 1 Min. in 100-prozentigem Ethanol, wurden die Schnitte luftgetrocknet. Je nach Größe des Schnitts wurden 5 bis 10 µl der Zytodot® 2C SPEC/CEN 10 Probe auf ein Deckglas pipettiert und auf die Schnitte aufgebracht. Nach dem Aufbringen der Deckgläser und dem luftdichten Verschließen der Proben mittels Fixogum Kleber wurden die Proben für 5 Min. auf 80 °C erwärmt und danach über Nacht (mindestens 12 Stunden) bei 37 °C hybridisiert.

Nach Abschluss der Hybridisierung erfolgte am Folgetag zunächst die Abnahme der Deckgläser. Hierzu wurden die Proben nach Entfernung des Fixogums für 5 Min. in einer Glasküvette mit SSC Puffer bei Raumtemperatur auf einem Rüttler gewaschen. Nach dem Ablösen der Deckgläser erfolgte eine Behandlung der Schnitte für 5 Min. in 75 °C warmem SSC-Puffer. Im Anschluss wurden die Schnitte zunächst für 2x 1 Min. in destilliertem H₂O gewaschen. Nach Vorbereitung der Schnitte für 1 Min. in TBS-Puffer und Abnehmen des überschüssigen Puffers mittels eines Papiertuchs erfolgte die Gabe von 3 bis 4 Tropfen der DIG/DNP-Mixtur auf jedes Präparat. Der verwendete TBS-Puffer wurde aus 25 ml TBS-Lösung des Herstellers und 475 ml destilliertem H₂O hergestellt. Anschließend wurden die Schnitte für 15 Min. bei 37 °C im Thermobrite inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Präparate erneut für 3x 1 Min. in TBS-Puffer gewaschen. Analog zur Applikation der DIG/DNP-Mixtur erfolgte die Applikation von 3 bis 4 Tropfen HRP/AP-Mixtur mit anschließender Inkubation für 15 Min. bei 37 °C im Thermobrite. Anschließend wurden die Schnitte erneut für 3x 1 Min. in TBS-Puffer gewaschen. Auf jedes

Präparat wurde nach Entfernung des restlichen TBS-Puffers mit einem Papiertuch 250 µl AP Red Solution aufgetragen und diese für 10 Min. in einer abgedunkelten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Anfertigung der AP Red Solution erfolgte aus 30 µl AP Red A und 970 µl AP Red B. Zum Entfernen der Lösung wurden die Schnitte 2 Min. in destilliertem H₂O gewaschen. Analog zur Applikation der AP Red Solution erfolgte im Anschluss die Applikation von 250 µl HRP Green Solution auf jeden Schnitt und anschließende Inkubation für 7 Min. in einer abgedunkelten Kammer. Die Anfertigung der HRP Green Solution erfolgte aus 40 µl HRP Green A und 960 µl HRP. Die Gegenfärbung erfolgte nach dem Waschen der Schnitte für 2 Min. in destilliertem H₂O durch Applikation von 250 µl Nuclear Blue Solution pro Schnitt und anschließende Inkubation für 3 Min. in einer abgedunkelten Kammer. Zum Entfernen der Nuclear Blue Solution wurden die Schnitte ausgiebig mit Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Schnitte für 3x 30 Sekunden in 100-prozentigem Ethanol und 2x 20 Sekunden in Xylol entwässert. Abschließend erfolgte die Fixierung von Deckgläsern auf den Präparaten mithilfe der Mounting Solution.

2.3.3.2. Auswertung der CISH

Zur Auswertung der CISH wurden die Großflächenschnitte zunächst nach einem heterogenen Verteilungsmuster der *Fgfr2*-Genexpression abgesucht, um Areale mit einer erhöhten *Fgfr2*-Amplifikation ausfindig zu machen.

Darauffolgend wurden die *Fgfr2*- und Centromer-10-Signale von mindestens 20 repräsentativen Zellkernen gezählt und das Verhältnis von *Fgfr2*- zu Centromer-10-Signalen ermittelt (*Fgfr2/Centromer-10-Ratio*). Die Definition einer Genamplifikation wurde von der HER2 Diagnostik im Brustkrebs übernommen [37]. Fälle mit einer Ratio von mehr als 2,2 wurden als amplifiziert klassifiziert. Fälle mit einer Ratio von weniger als 1,8 wurden als nicht amplifiziert klassifiziert. Ergab sich nach dieser Zählung eine Ratio zwischen 1,8 und 2,2 wurden weitere 20 Zellkerne ausgezählt und erneut die *Fgfr2/Centromer-10-Ratio* gebildet. Nach der Auszählung von 40 Kernen wurden Fälle mit einer Ratio von >2 als amplifiziert und ≤2 als nicht amplifiziert klassifiziert. Fälle mit durchschnittlich >4 *Fgfr2*-Signalen pro Zellkern wurden als *Fgfr2*-Polysomie definiert. Das Vorliegen von *Fgfr2*-Clustern wurde dokumentiert. Als Cluster wurde eine so starke *Fgfr2*-Amplifikation definiert, dass eine sichere Abgrenzung der einzelnen *Fgfr2*-Signale nicht mehr möglich war.

2.4. Pathologisch-anatomische Patientenmerkmale

Für die Korrelationen der klinisch-pathologischen Patientenmerkmale wurden freundlicherweise Daten aus vorherigen Veröffentlichungen zu der hier untersuchten Patientenkohorte zur Verfügung gestellt. Das waren im einzelnen der E-cadherin- und β -Catenin-Status [59], der Mucin-[59], KRAS-[59], RIK3CA- [59], MSI- [59], EBV- [59], H. Pylori- [59], MET- [60], Her2/neu- [61], VISTA- [62], PD-L1- und *RHOA*-Status [63] der untersuchten Kohorte.

2.5. Statistik

Zur statistischen Analyse wurde SPSS in der Version 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) verwendet. Kontinuierliche Variablen wurden am Mittelwert dichotomiert. Ordinalskalierte Variablen wurden in einzelne Kategorien oder Gruppen unterteilt. Die mittlere Überlebenszeit wurde mithilfe des Kaplan-Meier-Schätzers ermittelt und zur Untersuchung von Unterschieden in der mittleren Überlebenszeit wurde der Log-Rank Test verwendet. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden die 95% Konfidenzintervalle berechnet. Zur Einschätzung der prognostischen Relevanz wurden alle Ergebnisse mit einem $p < 0,10$ in eine Cox-Regressionsanalyse eingeschlossen. Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen dem *Fgr2*-CISH-Status und dem H-Score wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet.

Zur Untersuchung statistisch signifikanter Korrelationen der klinisch-pathologischen Parameter und den untersuchten Biomarkern wurde der Fisher's-Exact-Test verwendet. Für nicht dichotome ordinalskalierte Parameter wie z.B. TNM-Klassifikation oder Tumorstadium wurde der Kendall's-tau-Test angewendet. Ein $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Zur Berücksichtigung des multiplen Testens wurde ein exploratives Simes (Benjamini-Hochberg)-Verfahren verwendet. Die p -Werte wurden unverändert angegeben und markiert für den Fall, dass sie nach der Korrektur über das Fehlerniveau von 5% steigen. Die Überlebenszeiten werden in der gesamten Arbeit in Monaten angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Immunohistochemie

Insgesamt standen 493 Fälle für die Untersuchung zur Verfügung. In 251 Fällen (50,9%) zeigte sich kein Nachweis einer vermehrten FGFR2-Proteinexpression. Eine schwache Immunfärbung (FGFR2-IHC 1⁺) fand sich in 198 Fällen (40,2%), eine moderate (FGFR2-IHC 2⁺) in 145 Fällen (29,4%) und eine starke (FGFR2-IHC 3⁺) in 108 Fällen (21,9%). In 50 Fällen mit starker Immunfärbung (FGFR2-IHC 3⁺) zeigte sich eine starke Färbung in maximal 1% der Tumorzellen. In 491 Fällen (99,6%) wurden anteilig Tumorzellen gefunden, die keine Anfärbung aufwiesen. Eine Anfärbung von $\geq 50\%$ der Zellen mit einer Intensität von FGFR2-IHC $\geq 1^+$ war lediglich in 39 Fällen (7,6%) nachweisbar. Überwiegend war eine sehr heterogene Kombination aus unterschiedlichen Färbeintensitäten und Flächenanteilen zu beobachten (Abbildung 2). Eine homogene Verteilung der FGFR2-Proteinexpression im gesamten Tumor ließ sich ausschließlich in 3,3% der Proben mit einer vermehrten FGFR2-Proteinexpression (Nachweis von FGFR2-IHC $\geq 1^+$) erkennen. In den meisten Fällen mit einer vermehrten FGFR2-Proteinexpression [240 Fälle (99,1%)] fiel eine variable Kombination aus Färbeintensitäten auf. In mehr als der Hälfte [137 (56,6%)] dieser Fälle waren zwei oder mehr als zwei verschiedene Färbeintensitäten zu beobachten. So zeigten sich beispielsweise die Kombinationen FGFR2-IHC 0/1⁺ in 83 Fällen (16,8%), FGFR2-IHC 0/2⁺ in 8 Fällen (1,6%), FGFR2-IHC 0/1⁺/2⁺ in 40 Fällen (8,1%), FGFR2-IHC 0/3⁺ in 12 Fällen (2,4%), FGFR2-IHC 0/1⁺/3⁺ in 2 Fällen (0,4%), FGFR2-IHC 0/2⁺/3⁺ in 22 Fällen (4,5%) oder FGFR2-IHC 0/1⁺/2⁺/3⁺ in 73 Fällen (14,8%).

Unter der Verwendung des Kaplan-Meier-Schätzers wurden verschiedene Cutoff-Werte getestet, um einen Unterschied in der Gesamt- oder tumorspezifischen Überlebenszeit der Patienten zu evaluieren (Tabelle 1, Abbildung 3). Insgesamt wurden 4 verschiedene Trennungen untersucht. Initial sollte die Teilung der Kohorte am Median des H-Scores erfolgen. Da sich jedoch in über der Hälfte (50,9%) der Fälle keine FGFR2-Expression fand, wurde die Teilung bei einem H-Score von >0 vorgenommen [n= 243 neg. (H-Score = 0); n= 230 pos. (H-Score ≥ 1)]. Es ergab sich kein Unterschied der mittleren Überlebenszeit mit dieser Trennung der Kohorte (Tabelle 1). Des Weiteren erfolgte eine Untersuchung der Gesamt- und tumorspezifischen Überlebenszeit der Patienten getrennt nach dem Vorkommen einer Proteinexpression von FGFR2-IHC 2⁺ oder FGFR2-IHC 3⁺, sowie dem Vorkommen einer Proteinexpression von FGFR2-IHC 3⁺. Ebenfalls wurde das 95. Perzentil des H-Scores gegen den Rest der Kohorte verglichen. Wie in Tabelle 1 dargestellt und in der Abbildung 3 ersichtlich konnten unter der Verwendung dieser verschiedenen

Definitionen einer FGFR2-Positivität keine Unterschiede in der Gesamt- oder tumorspezifischen Überlebenszeit beobachtet werden.

Tabelle 1: Analyse der Überlebenszeit der Patienten anhand verschiedener Definitionen der FGFR2-Positivität

Cutoff	Positiv			Negativ			p	
	Events (Cens.)	Events (Cens.)	Median (SD)	Events (Cens.)	Events (Cens.)	Median (SD)		
	Median (SD)	95% Conf. Int.	95% Conf. Int.	Median (SD)	95% Conf. Int.	95% Conf. Int.		
H-Score >0	OS	230 (47)	243 (53)	0,254	IHC 3+ Vorhanden	104 (17)	369 (83)	0,598
		14,03 (1,3)	15,47 (1,7)			14,65 (1,5)	14,98 (1,4)	
	TSS	11,50/16,56	12,23/18,71			11,64/17,66	12,29/17,68	
		230 (70)	243 (67)	0,813	TSS	94 (29)	349 (108)	
FGFR2-IHC 2 ⁺ oder 3 ⁺ Vorhanden	OS	16,36 (2,1)	16,59 (1,7)			15,64 (2,2)	16,59 (1,7)	0,835
		12,34/20,39	13,29/19,90			11,38/19,90	13,27/19,91	
	TSS	152 (28)	321 (72)	0,245	0,95-Perzentil des H-Score	25 (5)	448 (95)	0,544
		13,57 (1,6)	15,90 (1,4)			10,51 (11,5)	14,88 (1,1)	
	TSS	10,52/16,62	13,17/18,63			0,00/32,96	12,80/16,97	
		138 (42)	305 (95)	0,475		25 (6)	418 (131)	
		15,47 (2,3)	17,05 (1,8)			20,04 (11,7)	16,53 (1,4)	
		11,07/19,88	13,46/20,64			0,00/42,89	13,89/19,17	

OS: Overall survival (Gesamtüberlebenszeit), TSS: Tumor specific survival (tumorspezifische Überlebenszeit), Zeit in Monaten

Anschließend wurde eine erneute Analyse der Überlebenszeit getrennt nach den Subgruppen der histologischen Laurén-Klassifikation vorgenommen. (Tabelle 2, Abbildung 4). Als Trennung wurde erneut der H-Score Median (H-Score 0 vs. >0) verwendet. Für Patienten mit diffusem Magenkarzinom ergab sich unter der Verwendung dieser Trennung eine signifikant schlechtere Gesamt- und tumorspezifische Überlebenszeit (Tabelle 2). Diese Beobachtungen ergaben sich nicht für intestinale, gemischte oder unklassifizierte Subtypen. Als weiterer Cutoff-Wert wurde das Vorkommen von FGFR-IHC 2⁺ oder FGFR2-IHC 3⁺ gegen das Fehlen von FGFR-IHC 2⁺ oder FGFR2-IHC 3⁺ verglichen. Die Verwendung dieser Trennung ergab ebenfalls eine signifikant kürzere Überlebenszeit von 9,38 (OS) und 9,33 (TSS) Monaten für Patienten mit diffusen Magenkarzinomen (OS log rank **p**=0,021; TSS log rank **p**=0,004). Wie bei der Verwendung der vorherigen Trennungen zeigte sich diese Beobachtung nicht für den intestinalen, gemischten oder unklassifizierten Subtyp des Magenkarzinoms (Tabelle 2). Die gleiche Beobachtung konnte beim Vergleich der Überlebenszeit des 95. Perzentils des H-Scores gegen den Rest der Kohorte beobachtet werden. Hier zeigte sich ebenfalls eine signifikant

schlechtere Gesamt- oder tumorspezifische Überlebenszeit ausschließlich im diffusen Tumortyp. Abschließend wurden die FGFR2-IHC und *Fgfr2*-CISH kombiniert, indem die Überlebenszeit aller Patienten mit dem Nachweis von FGFR2-IHC 3⁺ und aller Patienten mit dem Nachweis von FGFR2-IHC 2⁺ und *Fgfr2*-CISH Amplifikation gegen die Überlebenszeit der anderen Patienten verglichen wurde (FGFR2-IHC 3⁺, FGFR2-IHC 2⁺ & *Fgfr2*-CISH vs. Rest). Für diesen Algorithmus zeigte sich in keinem der Tumortypen ein signifikanter Unterschied in der Gesamt- oder tumorspezifischen Überlebenszeit der Patienten (Tabelle 2).

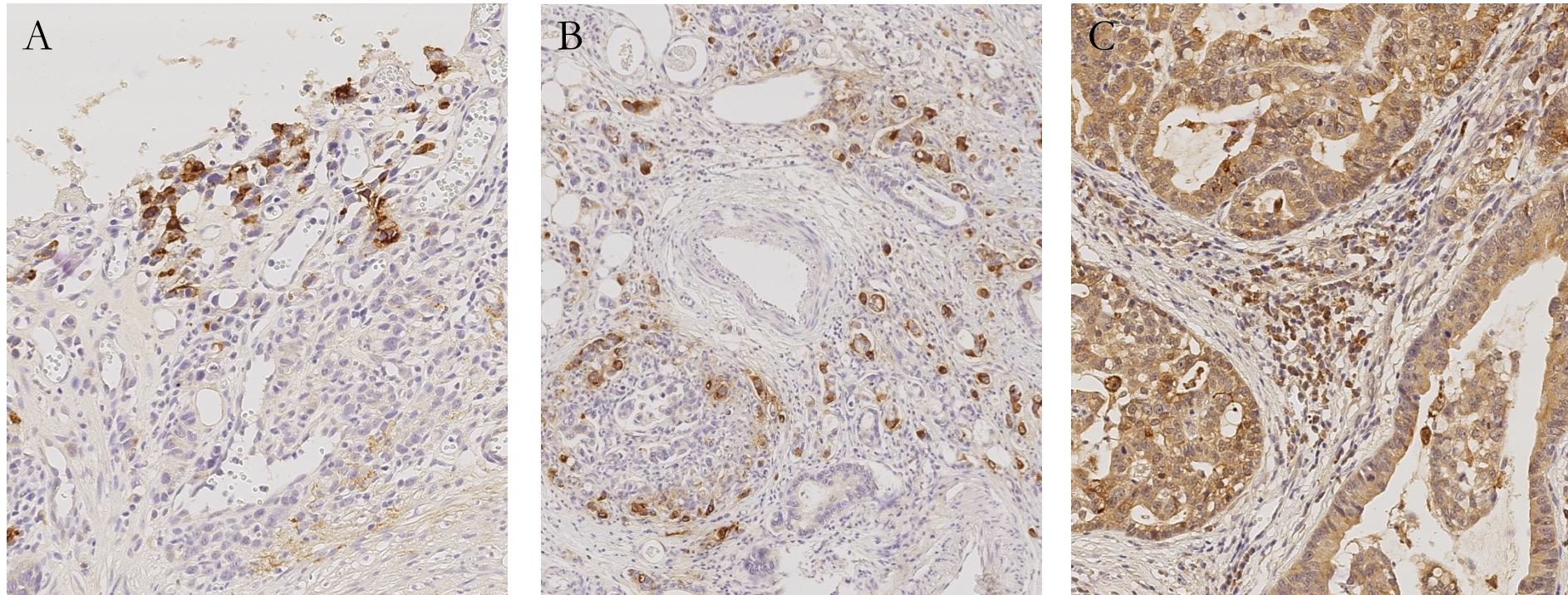


Abbildung 2: Heterogene Proteinexpression in der immunhistochemischen Untersuchung des FGFR2

Während der immunhistochemischen Untersuchung des FGFR2 zeigte sich in der überwiegenden Zahl der Fälle mit erhöhter FGFR2-Proteinexpression eine heterogene Verteilung der Proteinexpression (A-B). So wurde in 50 Fällen mit einer starken Proteinexpression von FGFR-IHC 3⁺ diese lediglich in <1% der Tumorzellen beobachtet (A). Die Heterogenität der FGFR2-Proteinexpression zeigte sich jedoch nicht ausschließlich in dem Vorkommen von kleinen Zellpopulationen mit einer hohen Proteinexpression, ebenfalls waren Fälle mit einem im gesamten Tumor unterschiedlichen FGFR2-Expressionsmuster nachzuweisen (B). Ebenfalls fielen während der Untersuchung in 92 (18,5%) Fällen stark FGFR2-positive Stromazellen auf (C). Originalvergrößerung 100-fach (B), 200-fach (C), 400-fach (A).

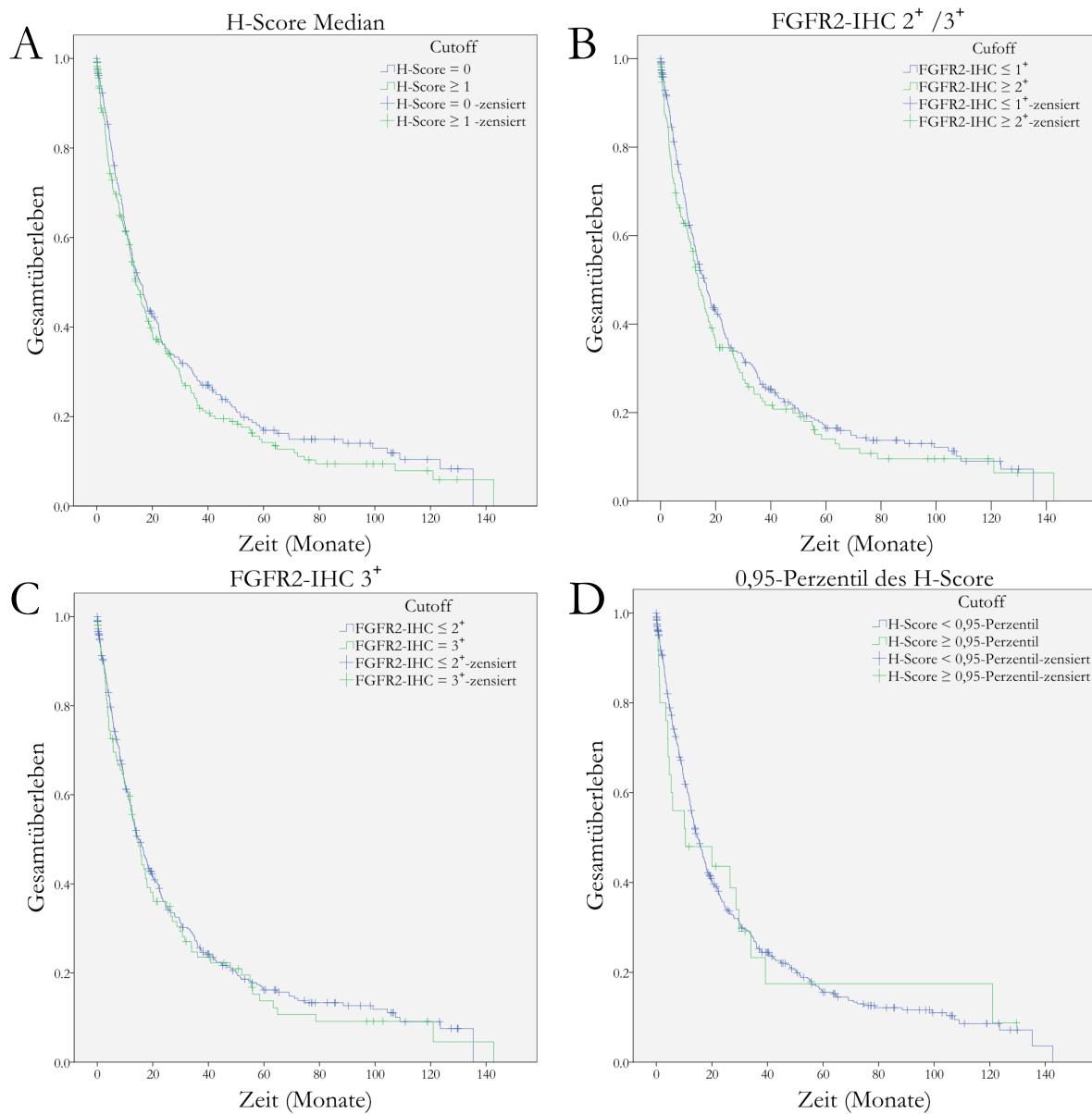


Abbildung 3: Analyse der Überlebenszeit anhand verschiedener Definitionen der FGFR2-Positivität in der immunhistochemischen Untersuchungen.

Die Analyse der Überlebensdaten erfolgte zunächst für die gesamte Kohorte. Unter der Verwendung verschiedener Schwellenwerte für die Definition einer vermehrten FGFR2-Proteinexpression zeigte sich kein Unterschied in der Gesamt- oder tumorspezifischen Überlebenszeit der Patienten (Tabelle 1). Initial wurde der Median des H-Scores als Cutoff verwendet (A). Das Vorkommen von FGFR2-IHC 2⁺ oder 3⁺ (B) sowie das ausschließliche Vorkommen von FGFR2-IHC 3⁺ (C) wurden ebenfalls untersucht. Abschließend wurde das 0,95-Perzentil des H-Scores als Cutoff verwendet (D).

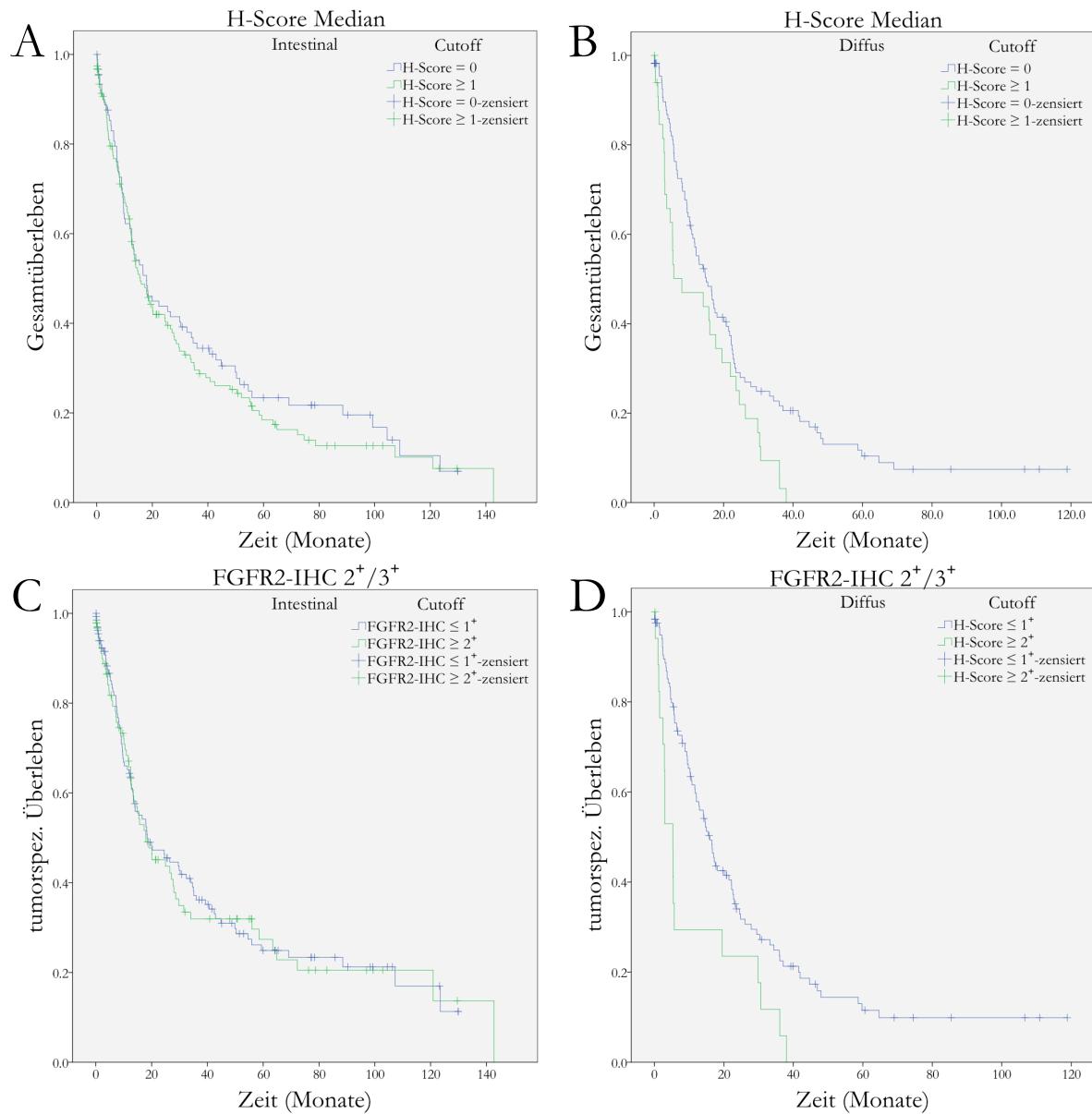


Abbildung 4: Analyse der Überlebenszeit anhand verschiedener Definitionen der FGFR2-Positivität getrennt nach der Laurén -Klassifikation.

Die weitere Analyse der Überlebenszeit wurde getrennt nach den Subgruppen der Laurén-Klassifikation vorgenommen. Initial wurde ebenfalls der Median des H-Scores als Cutoff verwendet (A-B). Für den intestinalen Typ (A) zeigte sich kein Unterschied. Für den diffusen Typ (B) zeigte sich eine signifikant schlechtere Gesamt- und tumorspezifische Überlebenszeit für Patienten mit einer vermehrten FGFR2-Expression (Tabelle 2). Die gleiche Tendenz wurde bei der Verwendung des Vorkommens von FGFR2-IHC 2⁺ oder 3⁺ (C-D) als Cutoff gesehen. Hier zeigte sich ebenfalls bei Patienten mit einem Karzinom vom intestinalen Typ (C) kein Unterschied in der Gesamt- oder tumorspezifischen Überlebenszeit der Patienten. Bei Patienten mit einem diffusen Magenkarzinom (D) und einer vermehrten FGFR2-Expression wurde eine signifikant schlechtere Gesamt- und tumorspezifische Überlebenszeit beobachtet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Analyse der Überlebenszeit der Patienten anhand verschiedener Definitionen der FGFR2-Positivität getrennt nach der Laurén-Klassifikation.

Cutoff	Intestinal			Diffus			Gemischt			Unklassifiziert			
	Positiv		Negativ	Positiv		Negativ	Positiv		Negativ	Positiv		Negativ	
	Events	(Cens.)	Events	(Cens.)	<i>p</i>	Events	(Cens.)	Events	(Cens.)	<i>p</i>	Events	(Cens.)	<i>p</i>
	Median	(SD)	Median	(SD)		Median	(SD)	Median	(SD)		Median	(SD)	
H-Score Median													
	OS	117 (36)	71 (20)	0,438	32 (2)	91 (22)	0,015	14 (2)	12 (3)	0,438	20 (7)	16 (8)	0,342
		15,64 (2,1)	17,91 (3,4)		7,98 (6,3)	14,98 (3,4)		6,74 (4,8)	9,99 (5,0)		16,00 (4,9)	19,61 (7,5)	
		11,47/19,81	11,32/24,50		0,00/20,19	10,60/19,36		0,00/16,14	0,12/19,86		6,36/25,64	4,97/34,26	
	TSS	90 (51)	61 (26)	0,864	27 (5)	80 (28)	0,021	10 (2)	12 (3)	0,591	14 (12)	10 (10)	0,797
		18,99 (3,9)	17,97 (6,5)		5,68 (1,8)	15,47 (2,0)		6,74 (4,2)	9,99 (5,0)		16,79 (47)	24,41 (14,8)	
		11,44/26,54	5,28/30,66		2,08/9,28	11,52/19,43		0,00/14,88	0,12/19,86		7,59/25,99	0,00/53,34	
0,95-Perzentil des H-Score													
	OS	99 (30)	89 (26)	0,344	26 (1)	97 (23)	0,019	12 (2)	14 (3)	0,43	17 (6)	19 (9)	0,521
		15,47 (2,2)	17,97 (5,0)		7,98 (5,6)	14,62 (1,9)		6,74 (4,9)	9,99 (5,4)		16,00 (4,4)	19,61 (4,6)	
		11,12/19,83	8,2/27,74		0,00/18,96	10,88/18,36		0,00/16,37	0/20,59		7,34/24,66	10,56/28,67	
	TSS	75 (42)	76 (35)	0,647	21 (4)	86 (29)	0,033	9 (2)	13 (3)	0,744	11 (11)	15 (11)	0,814
		18,76 (4,1)	18,27 (6,9)		5,68 (2,0)	14,69 (1,9)		9,30 (3,6)	4,53 (2,7)		16,70 (12,2)	19,88 (7,1)	
		10,64/26,88	4,74/31,79		1,69/9,68	10,93/18,45		2,26/16,33	0,00/9,90		0,00/40,71	5,90/33,86	
IHC 2+ oder 3+ Vorhanden													
	OS	82 (21)	106 (35)	0,401	18 (1)	105 (23)	0,021	9 (1)	17 (4)	0,374	15 (5)	21 (10)	0,357
		15,47 (2,4)	17,97 (3,5)		5,29 (2,5)	14,62 (1,9)		4,04 (3,0)	9,99 (4,6)		16,00 (4,5)	19,61 (7,9)	
		10,72/22,23	11,04/24,90		0,44/10,14	10,88 /18,36		0,00/10	0,89/19,09		7,14/24,87	4,14/35,09	
	TSS	61 (32)	90 (45)	0,865	17 (1)	90 (32)	0,004	6 (1)	16 (4)	0,281	12 (8)	14 (14)	0,368
		17,94 (4,7)	18,43 (4,9)		5,29 (1,3)	14,67 (1,9)		4,04 (3,6)	9,99 (4,6)		16,36 (4,2)	24,41 (16,2)	
		8,65 / 27,22	8,91 / 27,95		2,81/7,77	10,93/18,45		0,00/11,04	1,07/18,91		8,12/24,60	0,00/56,15	
Algorithmus I													
	OS	107 (36)	61 (23)	0,296	10 (0)	108 (23)	0,224	6 (1)	17 (4)	0,911	11 (3)	21 (10)	0,504
		17,97 (3,57)	15,47 (2,26)		2,99 (1,70)	14,69 (1,88)		13,57 (8,95)	9,99 (4,64)		11,89 (6,09)	19,61 (7,89)	
		10,98/24,95	11,04/19,91		0,00/6,32	10,99/18,38		0,00/31,11	0,89/19,09		0,00/23,82	4,14/35,09	
	TSS	44 (23)	91 (46)	0,810	9 (0)	93 (32)	0,071	3 (1)	16 (4)	0,989	9 (5)	14 (14)	0,457
		17,94 (2,79)	18,43 (5,05)		2,99 (0,39)	14,98 (1,78)		6,74 (6,47)	9,99 (4,55)		11,89 (6,30)	24,41 (16,20)	
		12,47/23,41	8,83/28,33		2,22/3,76	11,49/18,47		0,00/19,42	1,07/18,91		0,00/24,24	0,00/56,15	

Algorithmus I: Als positiv deklariert wurden alle Fälle mit entweder FGFR-IHC 3+ oder FGFR2-IHC 2+ und Amplifikation in der *Fgfr2*-CISH

OS: Overall survival (Gesamtüberlebenszeit), TSS: Tumor specific survival (tumorspezifische Überlebenszeit), Zeit in Monaten

3.2. Chromagene in-situ Hybridisierung

Die *Fgfr2*-Amplifikation wurde mittels Chromagener in-situ-Hybridisierung in allen Fällen mit starker FGFR2-IHC-Färbung untersucht. Als starke Färbung wurde das Vorkommen von $\geq 5\%$ FGFR2-IHC 3⁺ oder $\geq 15\%$ FGFR2-IHC 2⁺ definiert. Insgesamt wurden 50 Fälle mittels CISH untersucht. Zwei Fälle mussten aufgrund einer unzureichenden Qualität der CISH von der Auswertung ausgeschlossen werden. In den verbleibenden 48 Fällen wurden minimal 1,75 *Fgfr2*-Signale/Zellkern und maximal 32,5 *Fgfr2*-Signale/Zellkern beobachtet. Durchschnittlich zeigten sich 6,01 *Fgfr2*-Signale/Zellkern. In der Auswertung der Centromer-10-Signale wurden minimal 1,55 Centromer-10-Signale/Zellkern und maximal 4,55 Centromer-10-Signale/Zellkern beobachtet. Durchschnittlich wurden 2,33 Centromer-10-Signale/Zellkern gesehen. Cluster von *Fgfr2*-Signalen in Tumorzellen wurden in 18 Fällen gefunden (Abbildung 5 B). Die *Fgfr2*/Centromer-10-Ratio reichte von minimal 0,78 bis maximal 13,16 mit einem Gesamtdurchschnitt von 2,64. 20 Fälle mit einer *Fgfr2*/Centromer-10-Ratio von $> 2,2$ wurden als amplifiziert definiert. In 27 Fällen wurden durchschnittlich mehr als 4 *Fgfr2*-Signale pro Zellkern gezählt, diese Fälle wurden als *Fgfr2*-Polysomie definiert. Die *Fgfr2*-Amplifikation erwies sich in der Untersuchung als heterogen. In der gesamten Kohorte ließen sich amplifizierte und nicht amplifizierte Tumorzellen in direkter Zell-zu-Zell Nachbarschaft zueinander nachweisen (Abbildung 5 B). Unspezifische Cluster von *Fgfr2*-Signalen in nicht-Tumorzellen wurden in 14 Fällen beobachtet (Abbildung 5 C). Der Mediane H-Score lag für *Fgfr2*-CISH positive Patienten bei 24,0 für *Fgfr2*-CISH negative Patienten lag dieser bei 32,4 und somit höher. Im Mann-Whitney-U Test zeigte sich dieser Unterschied als Signifikant $U=269,5$, $p=0,001$.

In der Auswertung der Gesamt- und tumorspezifischen Überlebenszeit zeigte sich kein Unterschied zwischen Patienten mit Nachweis einer *Fgfr2*-Amplifikation und ohne Nachweis einer *Fgfr2*-Amplifikation (Tabelle 3). Die gleiche Beobachtung zeigte sich bei der Untersuchung der Gesamt- und tumorspezifischen Überlebenszeit von Patienten mit Nachweis einer *Fgfr2*-CISH-Polysomie und ohne Nachweis einer *Fgfr2*-CISH-Polysomie (Tabelle 3).

Tabelle 3: Analyse der Überlebenszeit der Patienten anhand des Vorhandenseins einer *Fgfr2*-Genamplifikation oder Polysomie in der CISH

	Positiv			Negativ				Positiv			Negativ		
Cutoff	Events (Cens.)	Events (Cens.)	<i>p</i>	Cutoff	Events (Cens.)	Events (Cens.)	<i>p</i>	Cutoff	Events (Cens.)	Events (Cens.)	<i>p</i>		
	Median (SD)	Median (SD)			Median (SD)	Median (SD)			Median (SD)	Median (SD)			
	95% Conf. Int.	95% Conf. Int.			95% Conf. Int.	95% Conf. Int.			95% Conf. Int.	95% Conf. Int.			
<i>Fgfr2</i> Amplifikation													
Pos./Neg.													
OS	17 (2)	29 (6)	<i>0,347</i>	OS	23 (2)	23 (6)	<i>0,450</i>	OS	14,00 (8,4)	7,95 (3,2)			
	26,25 (10,2)	7,95 (3,5)			0,00/30,52	1,60/14,30							
	6,35/46,15	1,05/14,85											
TSS	14 (2)	24 (9)	<i>0,579</i>	Pos./Neg.	19 (2)	19 (9)	<i>0,820</i>	TSS	12,52 (8,5)	10,51 (3,3)			
	20,04 (14,0)	10,51 (3,06)			0,00/29,08	4,13/16,89							
	0,00/47,47	4,51/16,52											

OS: Overall survival (Gesamtüberlebenszeit), TSS: Tumor specific survival (tumorspezifische Überlebenszeit), Zeit in Monaten

Analog zur Untersuchung der FGFR2-IHC wurde die Analyse der Gesamt- und tumorspezifischen Überlebenszeit für den *Fgfr2*-Status ebenfalls getrennt nach den histologischen Tumortypen der Laurén-Klassifikation vorgenommen. In der Kohorte des diffusen Magenkarzinoms ließ sich eine signifikant längere Gesamtüberlebenszeit der Patienten mit einer *Fgfr2*-Amplifikation gegenüber den Patienten ohne *Fgfr2*-Amplifikation beobachten (Tabelle 4, Abbildung 6). Die gleiche Tendenz zeigte sich bei der Untersuchung der tumorspezifischen Überlebenszeit, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Die Betrachtung der Patienten mit einer *Fgfr2*-Polysomie ergab das gleiche Bild einer signifikant längeren Gesamt- und tumorspezifischen Überlebenszeit für Patienten mit einer *Fgfr2*- Polysomie (Tabelle 4, Abbildung 6). Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied in der mittleren Gesamt- oder tumorspezifischen Überlebenszeit in einem anderen histologischen Subtyp beobachtet.

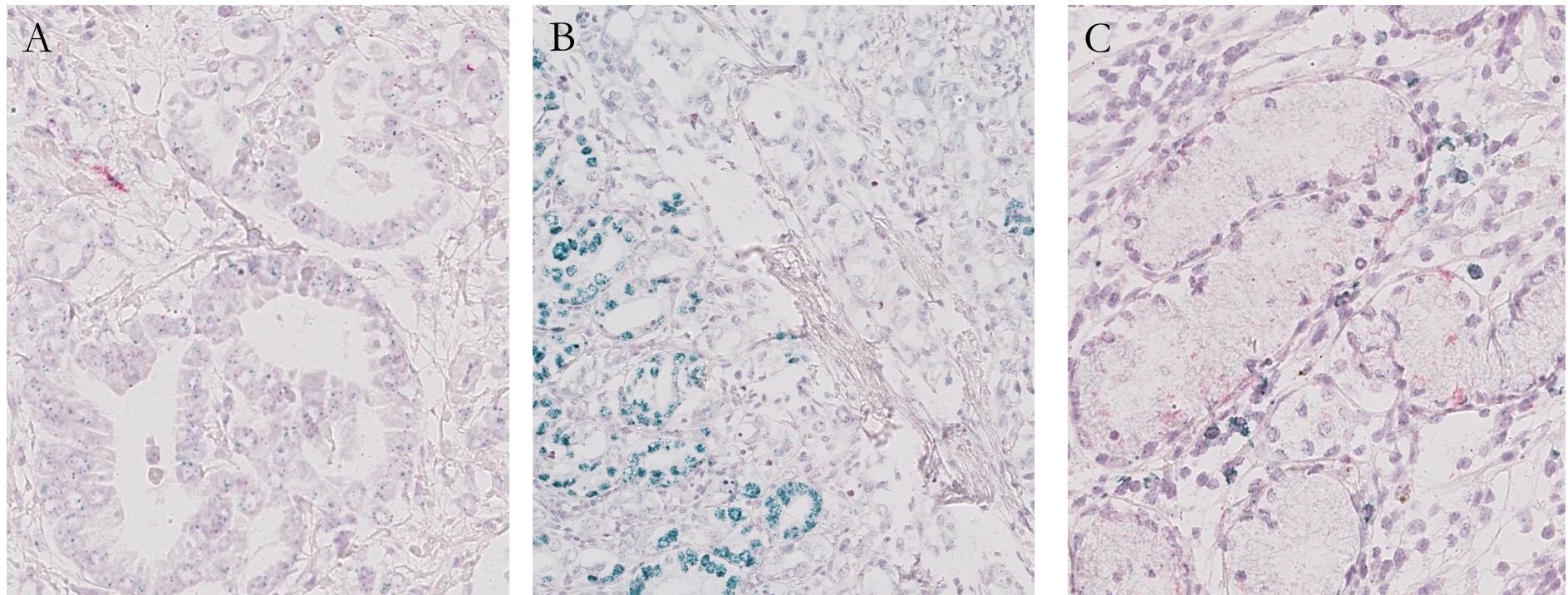


Abbildung 5: Amplifikation und Cluster in der *Fgfr2*-Chromagenen in-situ Hybridisierung

Es wurden 50 Fälle mit einer starken FGFR2-Proteinexpression mittels Chromagener in-situ Hybridisierung auf eine *Fgfr2*-Amplifikation untersucht. Die Signale der *Fgfr2*-Gene zeigten sich grün. Die Signale des Centromer 10 zeigten sich rot (A). Cluster von *Fgfr2*-Amplifikationen in Tumorzellen wurden in 18 der untersuchten Fälle gefunden (B). Diese Cluster von *Fgfr2*-Amplifikationen zeigten sich auch in direkter Nachbarschaft zu nicht amplifizierten Tumorzellen (B). Nicht-Tumorzellen mit vermehrten *Fgfr2*-Signalen wurden in 14 Fällen beobachtet. Originalvergrößerung 200-fach (B), 400-fach (A, C).

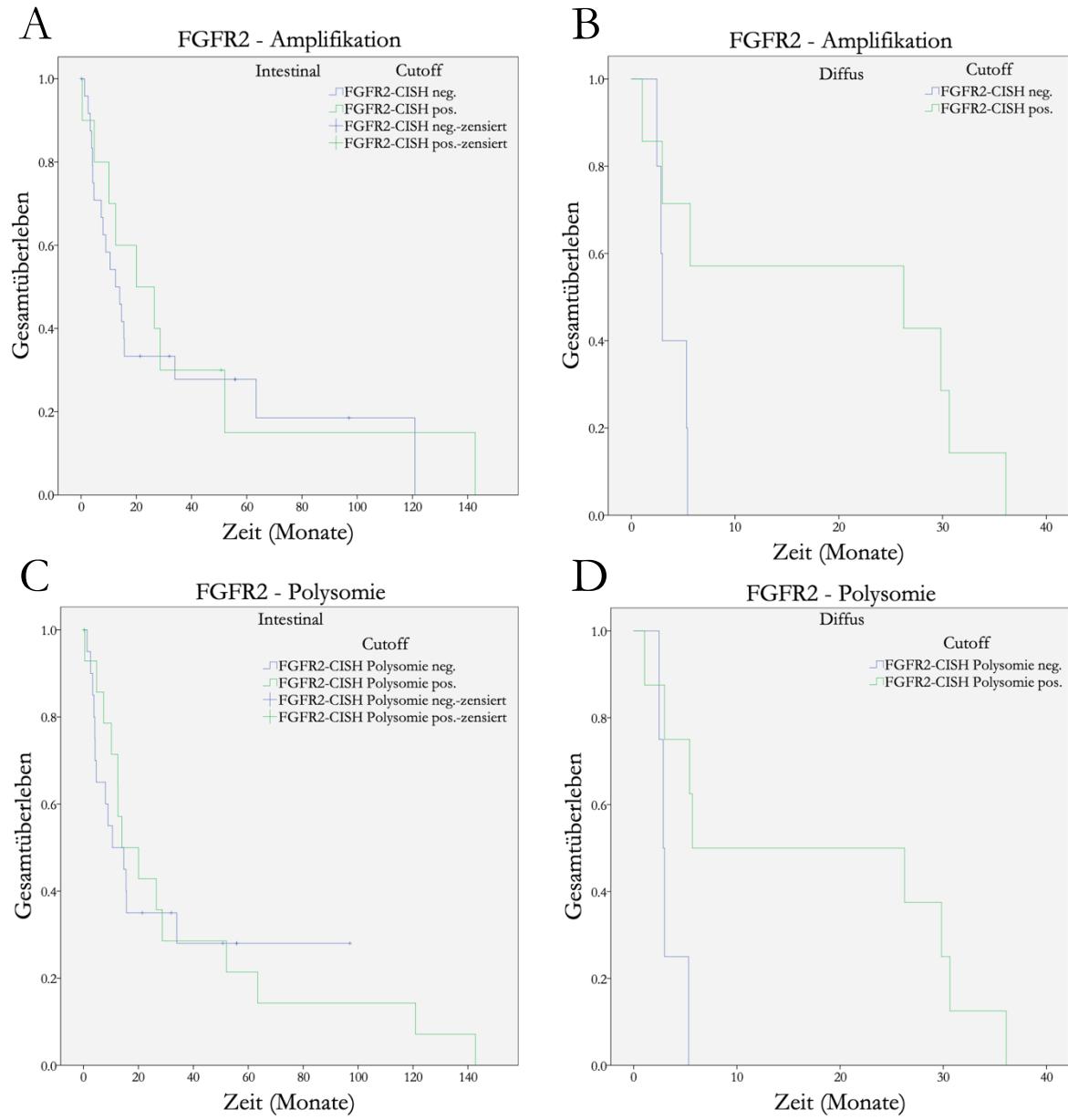


Abbildung 6: Analyse der Überlebenszeit der Patienten anhand des Vorhandenseins einer Fgfr2-Genamplifikation oder Fgfr2-Polysomie getrennt nach der Laurén-Klassifikation.

Analog zur Untersuchung der FGFR2-Proteinexpression konnte kein Unterschied in der Gesamt- oder tumorspezifischen Überlebenszeit der Patienten mit einer Fgfr2-Amplifikation beobachtet werden (Tabelle 4). Getrennt nach den Subtypen der Laurén-Klassifikation wurde für die Patienten mit einem diffusen Magenkarzinom und einer Fgfr2-Amplifikation (B) oder Polysomie (D) eine bessere Gesamt- und tumorspezifische Überlebenszeit beobachtet. Für die Patienten mit einem Magenkarzinom vom intestinalen Typ zeigten sich keine Unterschiede in der Gesamt- oder tumorspezifischen Überlebenszeit, weder für eine Fgfr2-Amplifikation (A) noch für eine Fgfr2-Polysomie (C).

Tabelle 4: Analyse der Überlebenszeit von Patienten anhand des Vorhandenseins einer *Fgfr2*-Genamplifikation oder Polysomie getrennt nach der Laurén Klassifikation

Cutoff		Intestinal			Diffus		
		Positiv		Negativ	Positiv		Negativ
		Events Median 95% Conf. Int.	(Cens.) (SD)	p	Events Median 95% Conf. Int.	(Cens.) (SD)	p
CISH Amplifikation Pos./Neg.	OS	10 20,04 0,00/41,73	(1) (11,1) 5,62/19,35	25 12,49 5,62/19,35	(6) (3,5) 0,00/79,03	0,622 26,25 0,00/79,03	7 2,99 2,71/3,27
		9 20,04 0,00/42,02	(1) (11,2) 10,93/20,02	23 15,47 10,93/20,02	(8) (2,3) 0,00/37,90	0,944 5,68 0,00/37,90	6 5 2,71/3,27
		15 14,00 0,20/27,79	(1) (7,0) 0,00/23,04	20 10,51 0,00/23,04	(6) (6,4) 0,00/23,04	0,903 5,68 0,00/34,55	8 2,86 2,34/3,37
	TSS	13 12,52 0,00/25,34	(1) (6,5) 8,67/22,28	19 15,47 8,67/22,28	(8) (3,47) 0,00/6,36	0,688 5,68 5,01/6,36	7 4 2,34/3,37
							0,031 0,061 0,021
							0,037

OS: Overall survival (Gesamtüberlebenszeit), TSS: Tumor specific survival (tumorspezifische Überlebenszeit)

Zeit in Monaten

3.3. Korrelation des FGFR2-IHC-Rezeptorstatus mit klinisch-pathologischen Parametern

Die Untersuchung der Korrelation des FGFR2-Rezeptorstatus mit anderen klinisch-pathologischen Parametern erfolgte wie in den vorherigen Untersuchungen zunächst für die gesamte Kohorte (Tabelle 5). Als Cutoff für die Definition einer positiven FGFR2-Proteinexpression wurde erneut der Median des H-Scores verwendet. So wurden alle Fälle, in denen mindestens eine Intensität der FGFR2-IHC $\geq 1^+$ beobachtet wurde, als FGFR2-positiv definiert. Eine erhöhte FGFR2-Proteinexpression war mit einem niedrigerem Grading assoziiert. Ebenfalls war eine erhöhte FGFR2-Proteinexpression signifikant häufiger in Tumoren vom intestinalen Tumortyp nachzuweisen. Diese Ergebnisse waren auch nach einer Korrektur des *p*-Werts für multiples Testen nach dem explorativem Simes-Verfahren weiter signifikant. Wie in Tabelle 5 aufgeführt konnte keine anderweitige Assoziation beobachtet werden. Anschließend erfolgte eine erneute Untersuchung getrennt nach den histologischen Subgruppen der Laurén-Klassifikation (Tabelle 5). Hier war in Tumoren vom intestinalen Typ eine Assoziation mit einem positiven VISTA-Status zu beobachten. In Tumoren des diffusen Typs war eine Assoziation mit einem höheren L-Stadium der TNM-Klassifikation sowie einem positiven MET-Status nachzuweisen. Nach Korrektur des *p*-Werts für multiples Testen war jedoch keine dieser Beobachtungen als statistisch signifikant zu werten. Anderweitig zeigten sich wie in Tabelle 5 dargestellt keine weiteren Assoziationen.

Tabelle 5: Korrelation der klinisch-pathologischen Merkmale mit einer erhöhten FGFR2-Proteinexpression

Kohorte	Gesamt			Intestinal			Diffus			Gemischt			Unklassifiziert			
	N	Pos.	<i>p</i>	Neg.	Pos.	<i>p</i>	Neg.	Pos.	<i>p</i>	Neg.	Pos.	<i>p</i>	Neg.	Pos.	<i>p</i>	
Geschlecht	F	10	80	0,063	24	46	0,54	67	21	0,85	4	3	0,68	9	10	1
	M	14	162		71	114		49	17		11	13		16	18	
Alter	<68 J	12	112	0,319	36	64	0,69	74	23	0,84	5	8	0,47	14	17	0,78
	>68 J	12	126		59	93		40	14		10	8		11	11	
Lokalisation	Prox.	66	82	0,075	39	60	0,58	16	4	0,78	3	7	0,25	8	11	0,77
	Dist.	17	154		51	94		98	34		15	16		17	17	
pT – Stadium	1	33	28	0,358	21	25	0,58	12	1	0,46	0	1	0,87	0	2	0,40
	2	24	33		11	25		8	4		7	5		5	3	
	3	97	98		37	64		44	14		8	10		9	15	
	4	97	82		26	45		52	19		15	16		11	8	
pN – Stadium	0	70	69	0,787	34	55	0,99	27	6	0,44	1	1	0,52	8	7	0,32
	1	40	32		17	24		18	4		6	4		5	4	
	2	38	48		11	30		17	10		8	11		4	4	
	3	10	91		33	49		53	18					8	13	
pM – Stadium	0	20	194	0,731	84	137	0,57	89	25	0,20	11	11	1	21	21	0,50
	1	46	48		11	23		27	13		4	5		4	7	
UICC -Stadium (8. Version)	I	42	41	0,787	25	37	0,43	15	1	0,10	0	0	0,87	2	3	0,40
	II	56	51		23	36		23	8		1	1		9	6	
	III	10	99		36	62		50	16		10	9		10	12	
	IV	46	48		11	23		27	13		4	5		4	7	
L – Status	0	11	102	0,226	48	75	0,49	55	10	0,02	2	5	0,39	14	12	0,57
	1	11	123		37	72		53	26		13	10		11	15	
V – Status	0	20	198	0,549	76	131	0,82	100	35	0,45	10	11	1	23	21	0,25
	1	23	225		8	16		8	1		5	4		2	6	
G – Status	G1/G2	40	78	<0,001	39	74	0,36	1	2	0,15	15	16		0	2	0,49
	G3/G4	21	161		56	83		114	36		15	16		25	26	
R – Status	0	21	204	0,536	83	139	1	93	30	1	11	11	1	23	24	0,67
	1	33	27		7	11		20	7		4	5		2	4	
E-Cadherin	neg.	17	161	0,597	57	92	0,78	87	33	0,31	5	3	0,67	4	4	1
	pos.	59	63		32	54		18	2		13	16		23	27	
β -Catenin	pos.	13	119	0,221	34	62	0,08	75	28	0,15	7	10	0,68	19	19	0,75
	neg.	95	106		53	87		31	6		6	5		5	8	
Muc Typus	Int.	61	63	0,227	33	42	0,26	20	5	0,67	1	4	0,46	7	12	0,60
	Gas.	35	30		9	19		21	7		1	2		4	2	
	Mix.	10	64		26	85		42	15		7	6		11	7	

	Unc.	21	214		13	21		18	6		3	4		1	4	
MSI	Stabil	22	217	0,927	85	141	0,81	110	37		12	16	0,44	17	23	0,33
	Instabil	18	18		9	13		0	0		1	0		8	5	
EBV	neg.	22	226	0,828	87	149	0,15	108	37	0,26	12	15	0,46	22	25	1
	pos.	12	10		8	6		0	1		1	0		3	3	
H. pylori	neg.	18	175	0,634	65	117	0,68	85	24	0,35	10	14	0,37	21	20	0,25
	pos.	29	32		12	18		11	6		4	2		2	6	
KRAS	Wt.	24	231	0,488	91	153	1	114	38	1	14	15	1	24	25	0,61
	Mut.	8	11		4	7		2	0		1	1		1	3	
PIK3CA	Wt.	24	228	0,541	89	151	1	114	37	1	14	15	1	23	25	1
	Mut.	11	14		6	9		2	1		1	1		2	3	
RHOA	Wt.	20	193	0,078	78	129	1	93	32	0,45	14	13	1	22	19	1
	Mut.	12	4		2	2		8	1		1	0		1	1	
MET	neg.	23	219	0,155	90	151	1	109	32	0,02	12	13	1	24	23	0,11
	pos.	13	21		5	8		5	6		3	3		0	4	
HER2	neg.	21	198	0,165	71	126	0,68	103	29	0,01	14	15	1	24	28	0,47
	pos.	14	22		12	15		1	4		0	1		1	0	
PDL1 in Tumorzelle	neg.	18	163	0,155	56	108	0,37	101	33	0,69	14	13	0,60	11	9	0,77
	pos.	49	61		28	41		6	3		1	3		14	14	
PDL1 in TIL	≤1	14	150	0,327	52	93	1	70	31	0,02	10	13	0,43	12	13	0,57
	≥1	87	74		32	56		37	5		5	3		13	10	
VISTA	neg.	20	208	0,744	65	138	,007	105	34	0,57	14	14	0,48	22	22	1
	pos.	22	19		17	12		2	2		0	2		3	3	
Laurén-Klassifikation	Int.	95	160	<,0001*												
	Diff.	11	38													
	Mix.	15	16													
	Uncl.	25	28													

*Weiter signifikant nach der Korrektur des p-Werts mittels des explorativen Simes-Verfahren für multiples Testen

4. Diskussion

Der FGFR2 spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Zellfunktionen wie der Migration, Zellproliferation und Angiogenese und besitzt eine anti-apoptotische Wirkung. Aufgrund der physiologischen Expression in vielen Geweben ist der FGFR2-Signalweg anfällig für Veränderungen in Tumoren. Die Auswirkung von Veränderungen des FGFR2-Signalwegs oder des Rezeptors sind kontextabhängig und können sowohl tumorsuppressiv wie -fördernd wirken. Es wurden zahlreiche genetische Veränderungen wie Genamplifikationen, aktivierende Mutationen, chromosomale Translokationen, *single nucleotide polymorphisms* und alternatives Splicing auf post-transkriptionaler Ebene beschrieben. Die meisten dieser Mutationen bewirken eine Liganden-unabhängige Aktivierung des FGFR2. In diesem Zusammenhang spielen jedoch auch auto- und parakrine Überstimulation eine wichtige Rolle [27]. Amplifikationen und Mutationen von FGFR2 wurden in Brust-, Lungen- und Magenkrebs beschrieben [64]. Diese Eigenschaften führen dazu, dass eine *Fgfr2*-Genamplifikation oder vermehrte FGFR2-Proteinexpression eine wichtige Rolle in der biologischen Aggressivität von Tumoren spielen können.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse aus früheren Studien über den FGFR2 im Magenkarzinom an einer großen zentraleuropäisch-kaukasischen Kohorte zu validieren und mögliche Unterschiede zu den bereits untersuchten Kohorten zu dokumentieren. Dies erscheint wichtig, da der überwiegende Teil der aktuell verfügbaren Daten zum FGFR2 im Magenkrebs aus Studienkohorten des asiatischen Raumes stammt. So wurden in einer 2019 veröffentlichten Metanalyse zur prognostischen Bedeutung der FGFR2-Proteinexpression, welche 4294 Patienten mit einem Magenkarzinom einschloss, überwiegend Patienten aus Japan, Südkorea und China untersucht. Daten zu kaukasischen Patienten stammten lediglich aus einer der wenigen eingeschlossenen Studien, in denen neben japanischen auch nordamerikanische Patienten untersucht worden waren. Daten aus einer europäischen Kohorte bezüglich der FGFR2-Proteinexpression im Magenkarzinom konnten die Autoren in ihrer Literaturrecherche nicht finden [48]. Dieser unterschiedliche Fokus der Forschung ist angesichts der deutlich höheren Inzidenz und Prävalenz der Erkrankung im asiatischen Raum nachzuvollziehen [65]. So zählen China, Japan und Südkorea auch in Asien zu den Ländern mit den höchsten Inzidenzen von Magenkarzinomen [66]. Dieses Missverhältnis in der vorhandenen Literatur birgt jedoch die Möglichkeit, dass Ergebnisse ohne Reflexion von einer asiatischen auf eine kaukasische Population übertragen werden. Diese sind jedoch nicht zwingend gleich. Es bestehen zwischen den Populationen beispielsweise Unterschiede in der Prävalenz der Laurén-Subtypen. In einer 2012 veröffentlichten Arbeit, welche sowohl englische, chinesische als auch südkoreanische Patienten einschloss, fiel in der englischen Kohorte eine deutlich höhere Prävalenz des intestinalen Tumortyps mit 59,8% im Vergleich zur chinesischen Kohorte mit 33,5% auf. Der diffuse

Tumortyp war wiederum mit einer Prävalenz von 44,2 % in China und 48,3% in Südkorea in den asiatischen Ländern häufiger als in England, wo die Prävalenz nur 23,5% betrug [30]. Ebenfalls gibt es Unterschiede in der Prävalenz von *Helicobacter pylori*, einem der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung des Magenkarzinoms. In Deutschland liegt die Prävalenz von Antikörpern gegen *H. pylori* bei durchschnittlich 40% wobei ein Anstieg der Seroprävalenz von 20,8% bei jungen Patienten zwischen 18-29 Jahren bis zu 57,0% bei Patienten im Alter zwischen 70-79 Jahren auffällt [67]. In China liegt die durchschnittliche Prävalenz von *H. pylori*-Infektionen mit 58% und in Südkorea mit 59,6% der Bevölkerung deutlich höher als in Deutschland. Jedoch zeigt sich auch in den ostasiatischen Ländern eine niedrigere Prävalenz in der jüngeren Bevölkerung im Gegensatz zur älteren Bevölkerung. Ebenfalls konnte in Ländern wie Japan ein deutlicher Rückgang der *H. pylori*-Prävalenz beobachtet werden, so sank diese von 72,2% im Jahr 1974 auf 39,3% im Jahr 1994 [66]. Die Prävalenz von *H. pylori* in einer Bevölkerung scheint nicht den einzigen Faktor für die Entstehung von Magenkarzinomen darzustellen. Neben der Prävalenz der Infektion mit *H. pylori* könnten auch die Virulenzfaktoren des Erregers eine Rolle in der Entstehung von Magenkarzinomen spielen. So konnten wie zuvor bereits erwähnt González et al. zeigen, dass die *H. pylori* Genotypen cagA, vacA s1, und vacA m1 vermehrt bei Patienten mit weiter fortgeschrittenen Tumorstadien nachzuweisen waren. Dieses könnte auf eine stärkere Pathogenität dieser Genotypen hinweisen [18]. Bis jetzt wurde kein Zusammenhang zwischen der FGFR2-Proteinexpression oder *Fgfr2*-Genexpression und dem Vorkommen einer *H. pylori*-Infektion beschrieben. Die unterschiedlichen Virulzenzen von *H. pylori* könnten jedoch einen möglichen Confounder für die Aggressivität des Magenkarzinomes in verschiedenen geographischen Regionen darstellen.

In dieser Arbeit wurde der FGFR2-Status bei 493 kaukasischen/zentraleuropäischen Patienten mit Magenkrebs mittels Immunhistochemie und CISH untersucht. Das Vorhandensein einer FGFR2-Expression in der Immunhistochemie (FGFR2-IHC 1⁺, 2⁺ oder 3⁺) konnte in 242 Fällen (49,8%) nachgewiesen werden. Unter der Verwendung verschiedener Schwellenwerte, wie in Tabelle 1 ersichtlich, lag das Vorkommen einer FGFR2-Überexpression zwischen 21,9% und 32,1% in dieser Kohorte. Die gefundenen Prävalenzen der FGFR2-Überexpression decken sich mit den bereits in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten. Eine FGFR2-Überexpression wurde in früheren Arbeiten mit einer Häufigkeit von 4% bis 56,3% in Karzinomen des Magens angegeben [34, 41, 42, 44]. Unter der Verwendung des gleichen Cutoff-Werts (Vorhandensein einer FGFR2-IHC 3⁺) war die Prävalenz einer vermehrten FGFR2-Expression in der untersuchten Kohorte mit 22 % etwas geringer als zuvor von Hosada et. al mit 31,9% berichtet [43]. Die weite Streuung der Prävalenzen lässt sich zu einem gewissen Teil durch die Unterschiede in den untersuchten Kohorten erklären, jedoch war auffallend, dass in den verschiedenen Arbeiten jeweils

unterschiedliche Schwellenwerte für die Beurteilung der Untersuchungsergebnisse angewandt wurden. Beispielsweise verwendeten Murase et al. einen semiquantitativen Score aus einer Kombination von Flächenanteil und Intensität der FGFR2-Färbung [42]. Bei diesem Score wurde der flächenmäßige Anteil der FGFR2-Expression sowie die Intensität der FGFR2-Färbung in je 4 Kategorien von 0 bis 3 eingeordnet. Ergab die Summe dieser beiden Kategorien einen Wert von ≥ 4 wurden die untersuchte Probe als überexprimiert bewertet [42]. Andere Autoren verwendeten ebenfalls eine Einteilung der Färbeintensität in eine Kategorie von 0 bis 3 und bewerteten diese ab einem Wert von 2 als positiv, jedoch ausschließlich, wenn diese Färbung in mehr als 50% der Tumorzellen nachweisbar gewesen war [44]. Festzustellen war, dass sich in der Literatur kein einheitliches Bewertungssystem vor allem für die Interpretation der FGFR2-Überexpression zeigte. Diese Tatsache erschwerte es, die berichteten Ergebnisse zu interpretieren. Zu den deutlichen Unterschieden der Prävalenz einer FGFR2-Überexpression könnte ebenfalls beitragen, dass in den Untersuchungen zum Teil verschiedene anti-FGFR2-Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität verwendet wurden. So wurde in einer südkoreanischen Kohorte von 362 Patienten unter Verwendung eines spezifischen anti-FGFR2-IIIb-Antikörpers eine vermehrte FGFR2-Proteinexpression bei 5,8% der Patienten und unter Verwendung eines unspezifischen FGFR2-Antikörpers eine vermehrte FGFR2-Proteinexpression bei 22% der Patienten beobachtet [45]. Ein weiterer Grund für die verschiedenen Prävalenzen der vermehrten FGFR2-Proteinexpression ist die Verwendung von unterschiedlichem Probenmaterial. Es wurden sowohl Großflächenschnitte als auch *tissue micro arrays* (TMAs) in den verschiedenen Arbeiten verwendet. Vor allem die Verwendung von TMAs birgt bei der Untersuchung von nicht homogen verteilten Alterationen immer die Gefahr eines Stichprobenfehlers und führt so im Einzelfall zu einer deutlichen Über- oder Unterschätzung der untersuchten Alteration [24]. Um dieses Problem zu umgehen, wurden in dieser Arbeit alle Untersuchungen zur besseren Beobachtung einer heterogenen Verteilung von Genamplifikation und Proteinüberexpressionen an Großflächenschnitten der Tumoren vorgenommen.

Frühere Untersuchungen berichteten, dass eine vermehrte FGFR2-Expression mit einer schlechteren Prognose der Langzeitüberlebenszeit aller Patienten mit Magenkrebs einhergeht [34, 35, 42, 44, 45, 48]. Unter der Verwendung verschiedener Definitionen der FGFR2-Überexpression gelang es in der hier untersuchten Kohorte nicht, diese Ergebnisse zu reproduzieren. So wurden trotz Verwendung unterschiedlicher Schwellenwerte beginnend am Median des H-Scores keine Unterschiede für die Gesamt- oder tumorspezifische Überlebenszeit der Patienten gesehen (Tabelle 1). In der Literatur zum FGFR2 finden sich jedoch ebenfalls Untersuchungen in denen der FGFR2-Expressionsstatus nicht mit einer schlechteren Prognose für alle Patienten einhergeht

und eine verkürzte Überlebenszeit ausschließlich in einer Subgruppe der Laurén-Klassifikation nachgewiesen werden konnte [41, 43].

Infolge dieser Ergebnisse wurde die Untersuchung der Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Expression des FGFR2 nach den Subgruppen der Laurén-Klassifikation getrennt erneut vorgenommen. Unter der Verwendung verschiedener Definitionen der FGFR2-Überexpression, erneut beginnend beim Median des H-Scores, ergab sich in diesem Fall ein konstantes Bild der signifikanten Korrelation einer erhöhten FGFR2-Expression mit einer schlechten Prognose für die Gesamt- und tumorspezifische Überlebenszeit von Patienten mit einem diffusen Tumortyp nach Laurén (Tabelle 2). Bei Patienten mit einem intestinalen, gemischten oder unklassifizierten Tumortyp konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen decken sich mit den Erkenntnissen von Inokuchi und Kollegen, welche ebenfalls ausschließlich eine prognostische Bedeutung der FGFR2-Expression für Patienten mit einem diffusen Magenkarzinom zeigen konnten [41]. Eine mögliche Erklärung dafür, dass dieser Unterschied in früheren Untersuchungen nicht aufgefallen war, könnte die höhere Prävalenz des diffusen Magenkarzinoms bei asiatischen Patienten im Gegensatz zu europäischen Patienten darstellen. Diese Ergebnisse können dazu beitragen, die Verwendung der FGFR2-Expression als ein Screening-Instrument für klinische Studien zu spezifizieren und eine genauere Risikoabschätzung für Patienten mit Magenkarzinomen abzugeben. So scheint es, dass in einer zentraleuropäisch-kaukasischen Kohorte eine vermehrte FGFR2-Proteinexpression ausschließlich eine prognostische Relevanz für Patienten mit einem Magenkarzinom vom diffusen Tumortyp besitzt. Jedoch sind weitere Untersuchungen an anderen europäischen Kohorten notwendig, um dieses zu bestätigen.

In der Literatur zeigte sich die Tendenz, dass eine *Fgfr2*-Genamplifikation in Magenkarzinomen mit einer verkürzten Überlebenszeit der Patienten verbunden war [30, 32, 33, 39, 40]. Jedoch konnte diese Beobachtung nicht in allen Untersuchungen zur *Fgfr2*-Genamplifikation in der gleichen Stärke nachgewiesen werden. So zeigte sich in anderen Arbeiten ausschließlich eine nicht signifikante Tendenz zu einer verkürzten Überlebenszeit [35, 36]. Diese Unterschiede zeigten sich auch regional. In der bereits erwähnten Arbeit, in welcher *Fgfr2*-Amplifikationen in drei Kohorten aus Großbritannien, China und Südkorea untersucht worden waren, konnte eine schlechtere Prognose ausschließlich in den Kohorten aus Großbritannien und Südkorea nachgewiesen werden. Die chinesische Kohorte wies lediglich eine nicht signifikante Tendenz zu einer schlechteren Überlebenszeit auf [30].

In der in dieser Arbeit untersuchten kaukasischen/zentraleuropäischen Kohorte wurde eine Amplifikation des *Fgfr2*-Gens in 20 von 55 untersuchten Patienten festgestellt. Eine Polysomie des *Fgfr2*-Gens wurde in 27 von 58 Patienten beobachtet, die eine starke FGFR2-Proteinexpression

aufwiesen. In früheren Untersuchungen wurden *Fgfr2*-Amplifikationen in 2% bis 9% der Patienten mit Magenkarzinomen beschrieben [19, 30, 32, 33, 35, 39, 68]. Aufgrund der Vorselektion durch die Immunhistochemie in dieser Untersuchung, die festgelegt hat, welche Patienten auf eine *Fgfr2*-Genamplifikation untersucht wurden, lassen sich diese Ergebnisse nur schwer vergleichen. Analog zu den Ergebnissen der Immunhistochemie konnte kein Zusammenhang zwischen dem *Fgfr2*-Amplifikationsstatus und der Überlebenszeit der Patienten nachgewiesen werden. In früheren Untersuchungen wurde jedoch eine Amplifikation des *Fgfr2*-Gens als ein möglicher prognostischer Parameter in Magenkarzinompatienten beschrieben und korrelierte mit einem reduzierten Langzeitüberleben der Patienten [30, 69]. Zur weiteren Untersuchung und aufgrund der Ergebnisse der Immunhistochemie wurde die Analyse nach dem Laurén-Subtyp getrennt erneut durchgeführt. In dieser Untersuchung wurde für die diffusen Magenkarzinome ein inverser Zusammenhang zwischen einer *Fgfr2*-Amplifikation und der Gesamtüberlebenszeit beobachtet. Patienten mit *Fgfr2*-Amplifikation und einem Magenkarzinom vom diffusen Typ lebten signifikant länger als Patienten ohne *Fgfr2*-Amplifikation (OS $26,25 \pm 26,9$ vs. $2,99 \pm 0,1$ Monate, log rank $p=0,031$) (Abbildung 6, Tabelle 4). Der gleiche, inverse Zusammenhang ergab sich für Patienten mit *Fgfr2*-Polysomie sowohl für die Gesamt- wie auch die tumorspezifische Überlebenszeit (OS $5,68 \pm 14,7$ Monate vs. $2,8 \pm 0,3$ Monate; log rank $p=0,021$; TSS $5,68 \pm 0,3$ Monate vs. $2,86 \pm 0,3$ Monate; log rank $p=0,037$). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Erkenntnissen. In bisherigen Untersuchungen stellte eine Amplifikation des *Fgfr2*-Gens einen möglichen negativen prognostischen Marker dar und korrelierte mit einer reduzierten Überlebenszeit der Patienten [30, 69]. Jedoch bestehen in der Auswahl der untersuchten Patienten deutliche Unterschiede zwischen den vorherigen Untersuchungen und dieser. Wie bereits beschrieben wurden in dieser Untersuchung ausschließlich Proben von Patienten mit hoher FGFR2-Proteinexpression auf eine *Fgfr2*-Genamplifikation untersucht. In vorangegangenen Untersuchungen wurde zumeist die gesamte zu untersuchende Kohorte auf Amplifikationen überprüft [30, 32, 33, 35]. Der FGFR2-Expressionsstatus wurde in diesen Untersuchungen zumeist nicht erhoben. Die Entscheidung, einen Tumor auf eine genetische Amplifikation zu testen, wurde somit nicht anhand der Immunhistochemie getroffen. Dieser Ansatz bildet jedoch eher das standardmäßige diagnostische Vorgehen in der Pathologie ab. So werden beispielsweise in der Diagnostik des HER2-Rezeptors im Brustkrebs ausschließlich Patienten mit dem Nachweis einer 2^+ Proteinexpression in der Immunhistochemie auf eine Amplifikation des *HER2*-Gens untersucht [70]. Jedoch lassen sich aufgrund dieser Vorauswahl, die definiert, welche Patienten einer Kohorte auf eine Amplifikation untersucht werden, keine Rückschlüsse darauf ziehen, was eine Amplifikation für eine eigenständige, prognostische Bedeutung für die gesamte Kohorte besitzt. Somit sind diese Ergebnisse nicht auf alle in dieser Untersuchung eingeschlossenen Patienten übertragbar und

stehen nicht zwingend im Widerspruch zu den bereits gewonnenen Erkenntnissen. Ein weiterer Unterschied zu früheren Untersuchungen besteht darin, dass in diesen die Analysen der Überlebenszeit der Patienten nicht getrennt nach den Subgruppen der Laurén-Klassifikation vorgenommen wurden. In den Ergebnissen zeigt sich eine bessere Gesamtüberlebenszeit für Patienten die sowohl eine vermehrte FGFR2-Proteinexpression sowie eine *Fgfr2*-Genamplifikation aufweisen. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass die FGFR2-Überexpression dieser Patienten durch andere genetische, endokrine oder parakrine Alterationen verursacht wird. In der Untersuchung der Korrelation des H-Scores mit dem *Fgfr2*-Amplifikationsstatus lag der mediane H-Score für *Fgfr2*-amplifizierte Patienten bei 24,0 und für *Fgfr2*-nichtamplifizierte Patienten lag dieser bei 32,0. Dieser Unterschied zeigte sich im Mann-Whitney-U Test als signifikant ($U=269,5 \ p=0,001$). So war eine *Fgfr2*-Amplifikation in dieser Untersuchung mit einer geringeren FGFR2-Proteinexpression assoziiert. Ebenfalls fiel auf, dass von den 55 untersuchten Patienten mit den höchsten H-Scores, die mittels CISH untersucht wurden, lediglich 20 Patienten eine *Fgfr2*-Amplifikation aufwiesen und lediglich 27 eine *Fgfr2*-Polysomie hatten. Bereits in früheren Untersuchungen war auffallend, dass nicht alle Patienten mit einer vermehrten FGFR2-Proteinexpression, auch eine *Fgfr2*-Genamplifikation aufwiesen. So war in einer südkoreanischen Studie von 9 Patienten mit einer vermehrten FGFR2-Proteinexpression nur bei 5 Patienten auch eine *Fgfr2*-Genamplifikation nachweisbar [45]. Diese Beobachtungen widersprechen der Theorie, dass eine Amplifikation oder Polysomie des *Fgfr2*-Gens für eine Überexpression des FGFR2 verantwortlich sein muss. Die Menge an FGFR2-Protein, welches auf der Oberfläche einer Zelle nachzuweisen ist, hängt, wie hier gezeigt werden konnte, nicht allein von der Zahl an *Fgfr2*-Genen in einer Zelle ab. Diese Theorie wird durch Untersuchungen der posttranskriptionellen Modifikation unterstützt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die DEAD-Box Protein RNA-Helikase DDX6 mittels posttranskriptioneller Modifikation die Expression von FGFR2 und HER2 in Zellen des Magenkarzinoms regulieren kann. Ein Knockout dieser Helikase bewirkt eine verminderte Proteinexpression von FGFR2 und HER2 trotz gleichbleibender Genetik der Zellen [71]. Die erhobenen Ergebnisse legen nahe, dass eine hohe FGFR2-Expression aufgrund einer *Fgfr2*-Amplifikation eine andere biologische Wertigkeit besitzt als eine erhöhte FGFR2-Expression, die auf andere Alterationen zurückzuführen ist. Diese Alterationen scheinen dem Tumor einen schnelleren Progress zu erlauben und verringern somit die Überlebenszeit der Patienten. Unter Beachtung einer erhöhten Mortalität dieser Patienten, die eine FGFR2-Überexpression ohne Nachweis einer Genamplifikation aufweisen, könnten diese Alterationen eine größere biologische Bedeutung für Patienten besitzen als die reine *Fgfr2*-Amplifikation oder Polysomie. Nichtsdestotrotz stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, welche einen starken Zusammenhang zwischen *Fgfr2*-Amplifikation und

FGFR2-Expression beschriebenen haben [34]. Es bedarf jedoch weiterer Forschung und eines tieferen Verständnisses der biochemischen Vorgänge im Magenkarzinom, um diese These zu überprüfen.

Während der Auswertung der Immunhistochemie fiel eine deutliche Tendenz der FGFR2-Proteinexpression zur Heterogenität auf. Das Vorkommen einer homogenen FGFR2-Expression in allen Tumorzellen war selten und wurde in lediglich 8 Fällen (1,6%) beobachtet. Die Heterogenität der FGFR2-Expression äußerte sich sowohl in einer unterschiedlichen Stärke der FGFR2-Expression wie auch in einer heterogenen Verteilung innerhalb der Tumorzellen. In 196 Fällen (39,8%) wurden FGFR2-exprimierende Zellen ausschließlich zentral im Tumor oder in der Invasionsfront gefunden. Dieser Trend zur Heterogenität war auch in der CISH bei der Untersuchung von *Fgfr2*-Amplifikationen zu beobachten. In 18 der 48 untersuchten Proben waren Cluster von *Fgfr2*-Genamplifikationen nachweisbar. So war in diesen Clustern eine deutliche Amplifikation des *Fgfr2*-Gens nachweisbar, während Tumorzellen in direkter Nachbarschaft keine Veränderungen aufwiesen (Abbildung 5).

Während andere Tumorentitäten wie maligne Melanome oder Adenokarzinome der Lunge einen hohen Grad an Homogenität bezüglich der Verteilung von Mutationen und vermehrter Proteinexpression aufweisen, lässt sich diese Beobachtung in Adenokarzinomen des gastroösophagealen Übergangs und Magens nicht nachvollziehen [72]. Die Verteilung von verschiedenen TKRs, wie HER2, MET und FGFR2 wurde als heterogen in Tumoren des Magens und gastroösophagealen Übergangs beschrieben [24, 30, 60]. Ebenfalls bestehen Unterschiede in der Verteilung von Alterationen zwischen Primärtumor und Tumormetastasen. Bei Untersuchungen an Tumoren des gastroösophagealen Übergangs, in denen relevante genetische Alterationen von Protoonkogenen in Primärtumoren und Metastasen evaluiert wurden, zeigte sich nur eine begrenzte Übereinstimmung der Alterationen zwischen Metastasen und Primärtumor. So konnten Pectasides et. al nur in 58% der untersuchten Proben eine Übereinstimmung von Genmutation und in 37% eine Übereinstimmung von Genamplifikationen zwischen Primärtumoren und Metastasen des Tumors nachweisen [72]. Das Vorhandensein einer intratumoralen genetischen Heterogenität ist ebenfalls mit einer verschlechterten Prognose für die Patienten assoziiert. In einer retrospektiven Untersuchung an 41 Patienten mit Tumoren des gastroösophagealen Übergangs war eine erhöhte intratumorale Heterogenität mit einer signifikant schlechteren Überlebenszeit der Patienten assoziiert [73]. Diese Heterogenität wird von manchen Autoren als Begründung für das Scheitern von klinischen Studien zu neuen zielgerichteten Therapieverfahren angesehen [51]. So birgt vor allem die Untersuchung des FGFR2-Status unter Verwendung von TMAs und Oberflächenbiopsien die Gefahr einer Unter- oder Überbewertung [24]. Als mögliche Strategien zur Lösung dieses Problems werden repetitive Biopsien zur

Untersuchung des Tumorstatus unter der Therapie oder die Messung von zellfreier DNA im Blut der Patienten postuliert [72]. Es scheint jedoch klar, dass ein besseres Verständnis der Tumorbioologie und der zugrundeliegenden Ursachen dieser Heterogenität essenziell ist, um die Therapie von Patienten mit Magenkarzinomen zu verbessern.

Bei der Assoziation mit anderen klinisch-pathologischen Parametern fällt in der Literatur auf, dass in mehreren Untersuchungen eine signifikante Korrelation des FGFR2-Status mit dem N-Status der TNM-Klassifikation besteht [30, 32, 34, 39, 42, 49]. Die Assoziation mit anderen Kategorien der TNM-Klassifikation zeigt sich variabel und ohne einheitliches Bild. Manche Autoren berichten, dass ein positiver FGFR2-Status vermehrt bei älteren Patienten zu beobachten ist [35, 43]. Dies konnte in der untersuchten Kohorte nicht nachvollzogen werden (Tabelle 5). Auch unter der Verwendung verschiedener Schwellenwerte und nach Trennung der Kohorte nach der Laurén-Klassifikation zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang mit Geschlecht, Alter, der Lokalisation, Grading, der TNM-Klassifikation oder dem Tumorstadium mit dem FGFR2-Status (Tabelle 5).

In der weiteren Untersuchung zeigte sich jedoch eine hochsignifikante Korrelation zwischen einer erhöhten FGFR2-Expression und dem intestinalen Tumortyp ($p<0,0001$). In früheren Untersuchungen an Zellkulturen war eine erhöhte FGFR2-Expression vor allem in undifferenzierten Magenkarzinomen nachweisbar [74, 75]. Ebenfalls konnten Seo et al. eine signifikante Korrelation einer *Fgfr2*-Amplifikation mit schlecht differenzierten Tumoren nachweisen [39]. Jedoch zeigt sich in der überwiegenden Mehrzahl der Untersuchungen kein Zusammenhang zwischen der Tumordifferenzierung und dem FGFR2-Status. Das in der untersuchten Kohorte eine Korrelation vor allem mit dem intestinalen Tumortyp nach Laurén besteht, ist vor allem unter dem Gesichtspunkt interessant, dass für diese Tumoren keine biologische Relevanz im Sinne einer verkürzten Überlebenszeit der Patienten festzustellen war.

In früheren Untersuchungen zum Zusammenhang des FGFR2 mit anderen TKRs im Magenkrebs zeigte sich, dass eine gemeinsame Genamplifikation von *Fgfr2* und anderen Genen von TKRs wie *HER2*, *MET* oder *EGFR* sehr selten zusammen auftritt. Das Vorkommen der Genamplifikation eines TKR-Gens schließt grundsätzlich die Genamplifikation eines anderen TKR-Gens aus [31, 69]. In Einzelfällen ist es jedoch beschrieben worden, dass eine Amplifikation von *Fgfr2* in einem Teil des Tumors vorkommt und in einem anderen Teil des Tumors eine Amplifikation von *HER2* nachweisbar war. Eine Genamplifikation verschiedener TKR-Gene in einer Tumorzelle wurde bis jetzt jedoch nicht beschrieben und scheint sich gegenseitig auszuschließen [30]. Ein anderes Bild zeigt sich jedoch bei der Proteinexpression. So schließt eine erhöhte Proteinexpression von FGFR2 nicht die Expression anderer TKRs aus [44]. Ebenfalls wurde beschrieben, dass trotz der Genamplifikation eines TKRs eine vermehrte Expression anderer TKRs auf der Zelloberfläche

möglich ist [33, 36]. So wurden beispielsweise Patienten mit einer *Fgfr2*-Amplifikation und einer gleichzeitigen Überexpression von MET beschrieben [33]. In der untersuchten Kohorte konnte eine Korrelation von FGFR2- und MET- Expression nachgewiesen werden ($p=0,029$ / $p=0,008$ Tabelle 5), auch wenn diese Ergebnisse nach Anpassung des p -Werts für multiples Testen nach dem explorativen Simes-Verfahren nicht signifikant waren. Diese Beobachtungen zeigen dennoch, dass sich im Gegensatz zu Amplifikationen, die vermehrte Proteinexpression von FGFR2 und anderer TKRs wie MET im Magenkarzinom nicht ausschließt. Ob diese vermehrte Proteinexpression jedoch in gleichen Zellen oder in unterschiedlichen Bereichen des Tumors auftritt, kann aufgrund von fehlenden Serienschnitten nicht beurteilt werden und bleibt eine offene Frage für weitere Forschung an diesem Thema.

5. Zusammenfassung

Bisherige Daten über die Bedeutung der FGFR2-Proteinüberexpression oder *Fgfr2*-Genamplifikation im Magenkarzinom stammen überwiegend aus asiatischen Kohorten. Ziel dieser Arbeit war einen möglichen Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit von Patienten und einer FGFR2-Proteinüberexpression oder *Fgfr2*-Genamplifikation im Magenkarzinom an einer zentraleuropäisch/kaukasischen Kohorte zu validieren. Hierzu wurde in dieser retrospektiven Kohortenstudie der Status der FGFR2-Expression von 493 kaukasischen/zentraleuropäischen Patienten mit einem Magenkarzinom mittels Immunhistochemie erhoben. Nach dieser Evaluation wurden 50 Patienten mit einer hohen Expression von FGFR2 mittels CISH auf eine *Fgfr2*-Genamplifikation oder *Fgfr2*-Polysomie untersucht. Unter Verwendung verschiedener Schwellenwerte wurde eine vermehrte Expression von FGFR2 in 21,9% bis 32,1% der Patienten nachgewiesen. Eine tumorbiologische Relevanz dieser Überexpression zeigte sich ausschließlich für Patienten mit einem diffusen Magenkarzinom nach Laurén. Diese Subgruppe von Patienten wies eine deutlich schlechtere tumorspezifische Überlebenszeit auf ($5,29 \pm 1,3$ vs. $14,67 \pm 1,9$ Monate, Log Rank $p=0,004$) (Tabelle 2). Eine Genamplifikation konnte in 20, eine Polysomie in 27 von 50 Patienten mit einer hohen FGFR2-Expression nachgewiesen werden. Der mediane H-Score lag für *Fgfr2*-amplifizierte Patienten mit 24,0 Punkten signifikant niedriger (Mann-Whitney-U Test $U=269,5$, $p=0,001$) als der H-Score von *Fgfr2*-nicht amplifizierter Patienten mit 32 Punkten. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten wurde hier eine inverse Korrelation zwischen der FGFR2-Proteinexpression und *Fgfr2*-Genamplifikation beobachtet. Darüber hinaus war das Fehlen einer *Fgfr2*-Genamplifikation oder -Polysomie bei den Patienten mit einer starken FGFR2-Expression signifikant mit einer schlechteren Gesamt- und tumorspezifischen Überlebenszeit der Patienten verbunden. Wie bereits für den FGFR2 beschrieben, wurde in dieser Untersuchung ein großes Maß an intratumoraler Heterogenität sowohl der Proteinexpression wie auch der Genamplifikationen von *Fgfr2* beobachtet. Das Vorkommen einer FGFR2-Expression konnte im Gegensatz zu früheren Untersuchungen signifikant häufiger in Tumoren vom intestinalen Tumortyp beobachtet werden, auch wenn für diesen Typ keine tumorbiologische Relevanz zu erkennen war. Abschließend wurde in dieser Untersuchung auch gezeigt, dass eine vermehrte Proteinexpression von FGFR2 im diffusen Magenkarzinom mit einer vermehrten Proteinexpression von MET im selben Tumor einhergehen kann und sich dieses nicht gegenseitig ausschließt.

6. Literaturverzeichnis

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. 2019, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): Berlin.
3. Scherübl, H., *Magentumoren*, in *Harrisons Innere Medizin*, N. Suttorp, et al., Editors. 2016, ABW Verlag.
4. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland für die Jahre 2013/2014*. 2017, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): Berlin.
5. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2016. **27**(suppl 5): p. v38-v49.
6. Tannapfel, A., *Karzinom des Magens*, in *Pathologie: Verdauungstrakt und Peritoneum*, M. Stolte, J. Rüschoff, and G. Klöppel, Editors. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 251-280.
7. Herold, G., W. Saure, and J. Truckenbrodt, *Magenkarzinom*, in *Innere Medizin: Eine Vorlesungsorientierte Darstellung* G.H.u. Mitarbeiter, Editor. 2018, Herod: Köln. p. 450 - 453.
8. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2020. **396**(10251): p. 635-648.
9. Sasako, M., et al., *D2 lymphadenectomy alone or with para-aortic nodal dissection for gastric cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 453-62.
10. Park, S.H., et al., *ARTIST 2: Interim results of a phase III trial involving adjuvant chemotherapy and/or chemoradiotherapy after D2-gastrectomy in stage II/III gastric cancer (GC)*. Journal of Clinical Oncology, 2019. **37**(15_suppl): p. 4001-4001.
11. Borrmann, R., *Geschwülste des Magens*, in *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, F. Henke and O. Lubarsch, Editors. 1926, Springer: Berlin.
12. Bosman, F., et al., *WHO Classification of Tumours of the digestive systems*. World Health Organization classification of tumours, 4th edition. Vol. 3. 2010, Lyon: IARC Press.
13. Lauren, P., *The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1965. **64**: p. 31-49.
14. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF). *S3-Leitlinie Magenkarzinom*. 2019 [cited 2020 29.11.2020]; Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/magenkarzinom/>.

15. Langner, C., *Precursors of gastric cancer : Dysplasia and adenoma*. Pathologe, 2017. **38**(2): p. 67-74.
16. Correa, P., *A human model of gastric carcinogenesis*. Cancer Res, 1988. **48**(13): p. 3554-60.
17. Meining, A., et al., *Atrophy-metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in the stomach: a reality or merely an hypothesis?* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2001. **15**(6): p. 983-98.
18. González, C.A., et al., *Helicobacter pylori cagA and vacA genotypes as predictors of progression of gastric preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(5): p. 867-74.
19. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
20. Robinson, D.R., Y.M. Wu, and S.F. Lin, *The protein tyrosine kinase family of the human genome*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5548-57.
21. Morishita, A., J. Gong, and T. Masaki, *Targeting receptor tyrosine kinases in gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(16): p. 4536-45.
22. Yuan, D.D., et al., *Targeted therapy for gastric cancer: Current status and future directions (Review)*. Oncol Rep, 2016. **35**(3): p. 1245-54.
23. Bang, Y.J., et al., *Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial*. Lancet, 2010. **376**(9742): p. 687-97.
24. Warneke, V.S., et al., *Her2/neu testing in gastric cancer: evaluating the risk of sampling errors*. Ann Oncol, 2013. **24**(3): p. 725-33.
25. Hierro, C., et al., *Targeting the fibroblast growth factor receptor 2 in gastric cancer: promise or pitfall?* Ann Oncol, 2017. **28**(6): p. 1207-1216.
26. Wilke, H., et al., *Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial*. The Lancet Oncology, 2014. **15**(11): p. 1224-1235.
27. Turner, N. and R. Grose, *Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(2): p. 116-29.
28. Gotoh, N., *Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins*. Cancer Sci, 2008. **99**(7): p. 1319-25.
29. Eswarakumar, V.P., I. Lax, and J. Schlessinger, *Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 139-49.
30. Su, X., et al., *FGFR2 amplification has prognostic significance in gastric cancer: results from a large international multicentre study*. Br J Cancer, 2014. **110**(4): p. 967-75.

31. Das, K., et al., *Mutually exclusive FGFR2, HER2, and KRAS gene amplifications in gastric cancer revealed by multicolour FISH*. Cancer Lett, 2014. **353**(2): p. 167-175.
32. Jung, E.J., et al., *Fibroblast growth factor receptor 2 gene amplification status and its clinicopathologic significance in gastric carcinoma*. Hum Pathol, 2012. **43**(10): p. 1559-66.
33. Betts, G., et al., *FGFR2, HER2 and cMet in gastric adenocarcinoma: detection, prognostic significance and assessment of downstream pathway activation*. Virchows Arch, 2014. **464**(2): p. 145-56.
34. Ahn, S., et al., *FGFR2 in gastric cancer: protein overexpression predicts gene amplification and high H-index predicts poor survival*. Mod Pathol, 2016. **29**(9): p. 1095-103.
35. Matsumoto, K., et al., *FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer*. Br J Cancer, 2012. **106**(4): p. 727-32.
36. Wang, H., et al., *Establishment of patient-derived gastric cancer xenografts: a useful tool for preclinical evaluation of targeted therapies involving alterations in HER-2, MET and FGFR2 signaling pathways*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 191.
37. Hofmann, M., et al., *Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study*. Histopathology, 2008. **52**(7): p. 797-805.
38. Smyth, E., et al., *FGFR: Proof-of-concept study of AZD4547 in patients with FGFR1 or FGFR2 amplified tumours*. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**: p. TPS2626-TPS2626.
39. Seo, S., et al., *Prognostic impact of fibroblast growth factor receptor 2 gene amplification in patients receiving fluoropyrimidine and platinum chemotherapy for metastatic and locally advanced unresectable gastric cancers*. Oncotarget, 2017. **8**(20): p. 33844-33854.
40. Hur, J.Y., et al., *High-level FGFR2 amplification is associated with poor prognosis and Lower response to chemotherapy in gastric cancers*. Pathol Res Pract, 2020. **216**(4): p. 152878.
41. Inokuchi, M., et al., *Different clinical significance of FGFR1-4 expression between diffuse-type and intestinal-type gastric cancer*. World J Surg Oncol, 2017. **15**(1): p. 1-9.
42. Murase, H., et al., *Prognostic significance of the co-overexpression of fibroblast growth factor receptors 1, 2 and 4 in gastric cancer*. Mol Clin Oncol, 2014. **2**(4): p. 509-517.
43. Hosoda, K., et al., *Prognostic relevance of FGFR2 expression in stage II/III gastric cancer with curative resection and S-1 chemotherapy*. Oncol Lett, 2018. **15**(2): p. 1853-1860.
44. Nagatsuma, A.K., et al., *Expression profiles of HER2, EGFR, MET and FGFR2 in a large cohort of patients with gastric adenocarcinoma*. Gastric Cancer, 2015. **18**(2): p. 227-38.
45. Han, N., et al., *Evaluation of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Expression, Heterogeneity and Clinical Significance in Gastric Cancer*. Pathobiology, 2015. **82**(6): p. 269-79.
46. Jia, Y.X., et al., *The coexpression and prognostic significance of c-MET, fibroblast growth factor receptor 2, and human epidermal growth factor receptor 2 in resected gastric cancer: a retrospective study*. Onco Targets Ther, 2016. **9**: p. 5919-5929.

47. Tokunaga, R., et al., *Fibroblast growth factor receptor 2 expression, but not its genetic amplification, is associated with tumor growth and worse survival in esophagogastric junction adenocarcinoma*. Oncotarget, 2016. **7**(15): p. 19748-61.
48. Kim, H.S., et al., *Pathological and Prognostic Impacts of FGFR2 Overexpression in Gastric Cancer: A Meta-Analysis*. J Cancer, 2019. **10**(1): p. 20-27.
49. Ueki, T., et al., *Expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor in advanced gastric carcinoma*. The Journal of Pathology, 1995. **177**(4): p. 353-361.
50. Hattori, Y., et al., *Immunohistochemical detection of K-sam protein in stomach cancer*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(8): p. 1373-81.
51. Van Cutsem, E., et al., *A randomized, open-label study of the efficacy and safety of AZD4547 monotherapy versus paclitaxel for the treatment of advanced gastric adenocarcinoma with FGFR2 polysomy or gene amplification*. Ann Oncol, 2017. **28**(6): p. 1316-1324.
52. Pearson, A., et al., *High-Level Clonal FGFR Amplification and Response to FGFR Inhibition in a Translational Clinical Trial*. Cancer Discov, 2016. **6**(8): p. 838-851.
53. Catenacci, D.V., et al., *Bemarituzumab with modified FOLFOX6 for advanced FGFR2-positive gastroesophageal cancer: FIGHT Phase III study design*. Future Oncology, 2019. **15**(18): p. 2073-2082.
54. Gambardella, V., et al., *Precision Medicine to Treat Advanced Gastroesophageal Adenocarcinoma: A Work in Progress*. J Clin Med, 2020. **9**(9).
55. Sootome, H., et al., *Futibatinib Is a Novel Irreversible FGFR 1-4 Inhibitor That Shows Selective Antitumor Activity against FGFR-Deregulated Tumors*. Cancer Res, 2020. **80**(22): p. 4986-4997.
56. Namikawa, T. and H. Kazuhiro, *Mucin phenotype of gastric cancer and clinicopathology of gastric-type differentiated adenocarcinoma*. World Journal of Gastroenterology, 2010. **16**(37): p. 4634-4639.
57. Gospodarowicz, M.K., C. Wittekind, and J.D. Brierley, *TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition*. TNM Classification of Malignant Tumours, ed. t. Edition. January 2017: Wiley-Blackwell. 272.
58. Detre, S., G. Saclani Jotti, and M. Dowsett, *A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas*. J Clin Pathol, 1995. **48**(9): p. 876-8.
59. Warneke, V.S., et al., *Prognostic and putative predictive biomarkers of gastric cancer for personalized medicine*. Diagn Mol Pathol, 2013. **22**(3): p. 127-37.
60. Metzger, M.L., et al., *MET in gastric cancer--discarding a 10% cutoff rule*. Histopathology, 2016. **68**(2): p. 241-53.
61. Balluff, B., et al., *Classification of HER2/neu status in gastric cancer using a breast-cancer derived proteome classifier*. J Proteome Res, 2010. **9**(12): p. 6317-22.

62. Böger, C., et al., *The novel negative checkpoint regulator VISTA is expressed in gastric carcinoma and associated with PD-L1/PD-1: A future perspective for a combined gastric cancer therapy?* Oncoimmunology, 2017. **6**(4): p. e1293215.
63. Röcken, C., et al., *Clinicopathological characteristics of RHOA mutations in a Central European gastric cancer cohort.* J Clin Pathol, 2016. **69**(1): p. 70-5.
64. Dienstmann, R., et al., *Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumors.* Ann Oncol, 2014. **25**(3): p. 552-63.
65. Ferlaym, J., et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Today.* 2018 01.03.2019 [cited 2021 06.04.2021]; Available from: <https://gco.iarc.fr/today>.
66. Rahman, R., A.W. Asombang, and J.A. Ibdah, *Characteristics of gastric cancer in Asia.* World J Gastroenterol, 2014. **20**(16): p. 4483-90.
67. Seher, C., W. Thierfelder, and R. Dortschy, *Helicobacter pylori - Prävalenz in der deutschen Bevölkerung.* Gesundheitswesen, 2000. **62**(11): p. 598-603.
68. Park, Y.S., et al., *FGFR2 Assessment in Gastric Cancer Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, Fluorescent In Situ Hybridization, and Immunohistochemistry.* American Journal of Clinical Pathology, 2015. **143**(6): p. 865-872.
69. Deng, N., et al., *A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets.* Gut, 2012. **61**(5): p. 673-684.
70. Rüschoff, J., et al., *HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing.* Virchows Arch, 2010. **457**(3): p. 299-307.
71. Tajirika, T., et al., *DEAD-Box Protein RNA-Helicase DDX6 Regulates the Expression of HER2 and FGFR2 at the Post-Transcriptional Step in Gastric Cancer Cells.* Int J Mol Sci, 2018. **19**(7).
72. Pectasides, E., et al., *Genomic Heterogeneity as a Barrier to Precision Medicine in Gastroesophageal Adenocarcinoma.* Cancer Discovery, 2018. **8**(1): p. 37-48.
73. Chao, J., et al., *Association Between Spatial Heterogeneity Within Nonmetastatic Gastroesophageal Adenocarcinomas and Survival.* JAMA Network Open, 2020. **3**(4): p. e203652-e203652.
74. Nakatani, H., et al., *Isolation of an amplified DNA sequence in stomach cancer.* Jpn J Cancer Res, 1990. **81**(8): p. 707-10.
75. Kunii, K., et al., *FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival.* Cancer Res, 2008. **68**(7): p. 2340-8.

7. Anhang

7.1. Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik - Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

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

EINGEGANGEN
01. Nov. 2010

Schwanenweg 20
D-24105 Kiel

Telefon 0431 / 597-18 09
Telefax 0431 / 597-18 31

Datum: 22.10.2010

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

Studienplan: Prädiktive Biomarker des Magenkarzinoms
Anschreiben mit Studienplan

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

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

Sehr geehrter Herr Kollege Röcken,

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

Mit freundlichen kollegialen Grüßen



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



Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsleitung der Ethik-Kommission

8. Publikation

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden in der folgenden Arbeit Veröffentlicht.

FGFR2 overexpression and compromised survival in diffuse-type gastric cancer in a large central European cohort

Schrumpf T, Behrens HM, Haag J, Krüger S, Röcken C (2022)

FGFR2 overexpression and compromised survival in diffuse-type gastric cancer in a large central European cohort.

PLOS ONE 17(2): e0264011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264011>

9. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christoph Röcken bedanken, für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Pathologie des UKSH Kiels zu schreiben. Ich möchte mich insbesondere für die gute Betreuung sowie das kollegiale Miteinander und die immer vorhandene Unterstützung und Arbeitsbereitschaft bedanken, ohne die die Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiter möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. rer. medic. Hans-Michael Behrens bedanken für die große Unterstützung im Bereich der statistischen und technischen Umsetzung dieser Arbeit. Ohne seine Hilfe wären die umfangreichen statistischen Auswertung, sowie die Visualisierung dieser Arbeit nicht in dieser Qualität möglich gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Jochen Haag und Frau Sandra Krüger für die Unterstützung bei der technischen Umsetzung unserer Fragestellung bedanken. Ich danke für die Einführung in die Arbeit im Labor sowie die Organisation und Verwaltung aller benötigten Proben und Präparate sowie die Bereitstellung aller nötigen Ressourcen zur Umsetzung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt weiter Dr. med. Benedikt Kolbrink für die Durchsicht, Überprüfung und Kritik des Manuskriptes sowie der Beratung bezüglich der Abfassung der Dissertation, ohne seine Hilfe hätte diese Arbeiten nicht in der vorliegenden Form entstehen können.