

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 tumorbiologische Bedeutung von RNF43 im Magenkarzinom ist komplex und kontextabhängig**

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

vorgelegt von  
BENTE HOLM  
aus RENDSBURG

Kiel 2024

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Röcken

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Kai Bachmann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2024

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 21.08.2024

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

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
1    Einleitung.....	1
1.1    Das Magenkarzinom.....	1
1.1.1    Epidemiologie .....	1
1.1.2    Ätiopathogenese.....	2
1.1.3    Pathologie.....	5
1.1.4    Primärdiagnostik und Staging.....	6
1.1.5    Prognose und Therapie .....	8
1.2    Der Wnt-Signalweg.....	11
1.2.1    Funktion und Aufbau .....	11
1.2.2    Tumoriologische Bedeutung von RNF43.....	13
1.3    Fragestellung.....	15
2    Material.....	16
2.1    Studienkollektive.....	16
2.1.1    Entdeckungsgruppe.....	16
2.1.2    Validierungsgruppe.....	16
2.2    Geräte.....	17
2.3    Software .....	18
2.4    Chemikalien.....	18
2.5    Kitsysteme .....	18
2.6    Antikörper .....	18
2.7    Verbrauchsmaterial .....	18
3    Methoden.....	19
3.1    Immunhistochemie .....	19
3.1.1    Etablierung .....	19
3.1.2    Durchführung.....	19
3.1.3    Auswertung.....	20
3.2    Statistische Auswertung .....	21
4    Ergebnisse.....	22
4.1    Immunhistochemie .....	22
4.2    Expressionsmuster von RNF43.....	23
4.3    Korrelation des RNF43-Status mit den klinisch-pathologischen Eigenschaften der Patienten .....	24
4.4    Überlebenskorrelation in unterschiedlichen Laurén-Phänotypen mit RNF43-Status ..	27
4.5    Multivariate Überlebensanalyse (Cox-Regression) .....	31

4.6	Genotyp-Phänotyp-Korrelation .....	33
5	Diskussion .....	36
5.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse .....	36
5.2	Methodische Diskussion .....	36
5.3	Interpretation und Diskussion der Ergebnisse .....	37
5.3.1	Hintergrund der Untersuchung .....	37
5.3.2	Intra- und intertumorale Heterogenität der Expression von RNF43 im Magenkarzinom 37	
5.3.3	Die Expression von RNF43 im Magenkarzinom ist kontextabhängig .....	38
5.3.4	Ausblick .....	39
6	Zusammenfassung .....	41
7	Literaturverzeichnis .....	43
8	Anhang .....	49
8.1	Ethikvotum .....	49
8.2	Publikationen .....	50
8.3	Danksagung .....	51
9	Erklärung .....	52

## Abkürzungsverzeichnis

Allelfr.	Allelfrequenz
Aminos.-veränd.	Aminosäurenveränderung
APC	Adenomatöse Polyposis coli-Protein
BRCA	Brustkrebs
cag	Cytotoxin-assoziiertes Gen
CDH1	Cadherin 1
KI	Konfidenzintervall
CK1	Casein Kinase 1
CT	Computertomogramm
DAB	Diaminbenzidin
DC	Zerstörungskomplex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVL	Dishevelled
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECOG	<i>Eastern Co-operative of Oncology Group</i>
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
EpICD	Intrazelluläre Domäne von EpCAM
ER	Endoskopische Resektion
FZD	Frizzled Rezeptoren
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
H. pylori	Helicobacter pylori
HE	Hämatoxylin und Eosin
HR	Hazard Ratio
H-score	Histo-Score
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFNy	Interferon gamma
IHC	Immunhistochemie
L	Lymphgefäßinvasion
Lef1	Lymphoider Enhancer-Bindungsfaktor 1
LOH	Verlust der Heterozygotie
LRP	Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein
MLH	MutL homolog
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NGS	Next-Generation Sequenzierung
OS	Gesamtüberleben
PD-L	Programmierter Zelltod-Ligand
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphonat-3-Kinase, katalytische Untereinheit
PS2	Presenilinprotein 2
R	Residualtumor
RHOA	Ras-Homologes Familienmitglied A
RNF43	Ring Finger Protein 43
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SPSS	Statistikpaket für Sozialwissenschaften
STK11	Serin/Threonin-Kinase 11
Tcf1	T-Zell Faktor 1
TP53	Tumor Protein 53
TSS	Tumorspezifisches Überleben
V	Veneninvasion
vac	Vakuolisierendes Cytotoxin
Var	Variantenklasse

WES .....	Gesamtgenomsequenzierung
WHO.....	Weltgesundheitsorganisation
Wnt.....	<i>Wingless Int1</i>
ZNFR3.....	<i>Zinc and Ring Finger 3</i>
β-TrCP.....	Beta-Transducin-Repeat enthaltende E3-Proteinligase

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms .....	7
Tabelle 2: UICC-Stadien des Magenkarzinoms. ....	8
Tabelle 3: Leitlinien und erweiterte Kriterien für Magenfrühkarzinome. ....	10
Tabelle 4: Korrelation der Expression von RNF43 mit klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen bei primär resezierten Magenkarzinomen. ....	25
Tabelle 5: Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der Kombination auf RNF43- und LRP1B-Expression und Tumortyp.....	30
Tabelle 6: Unabhängige Variablen nach der Überlebensanalyse (Cox-Regression). ....	32
Tabelle 7: Korrelation des Genotyps mit dem Phänotyp.....	34

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der bösartigen Neubildungen des Magens nach Lokalisation und Geschlecht.	1
Abbildung 2: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberate nach Geschlecht. ....	2
Abbildung 3: Correa-Kaskade. ....	3
Abbildung 4: Verteilung der UICC-Stadien bei Erstdiagnose eines Magenkarzinoms nach Geschlecht. .....	8
Abbildung 5: Therapiealgorithmus für die Erstlinientherapie des Magenkarzinoms. ....	10
Abbildung 6: Wnt-Signalweg und dessen Regulationsmechanismen. ....	13
Abbildung 7: Referenzschnitte für RNF43-Immunfärbungen im Magenkarzinom. ....	23
Abbildung 8: Expressionsmuster von RNF43. ....	23
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurven, die das Überleben der Patienten in Abhängigkeit vom Laurén-Typ darstellen. ....	28
Abbildung 10: Histologische Bilder der RNF43-Immunfärbungen in Magenkrebs für verschiedene Mutationstypen. ....	33

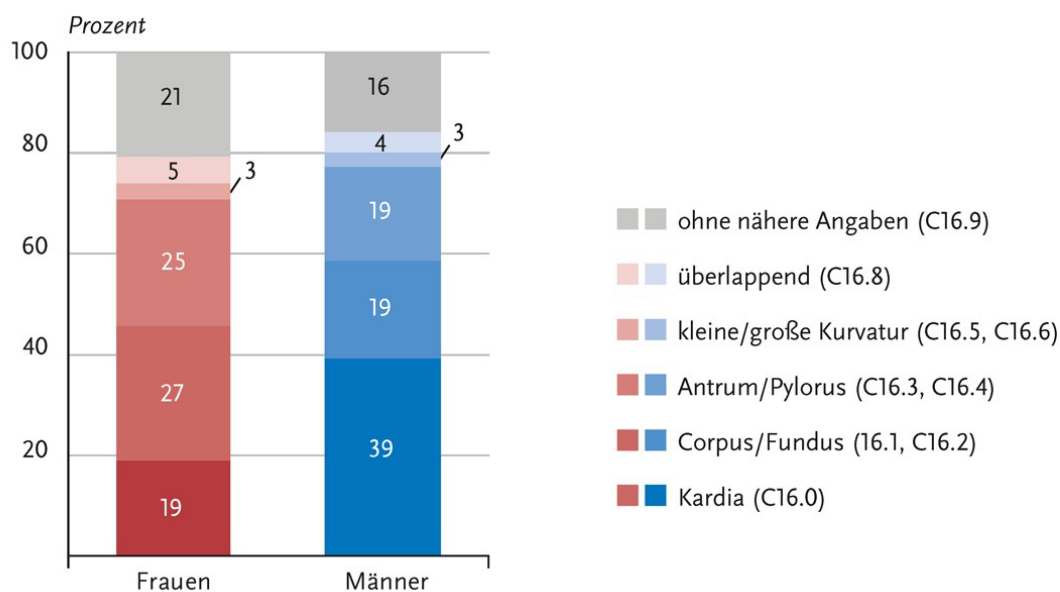


# 1 Einleitung

## 1.1 Das Magenkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

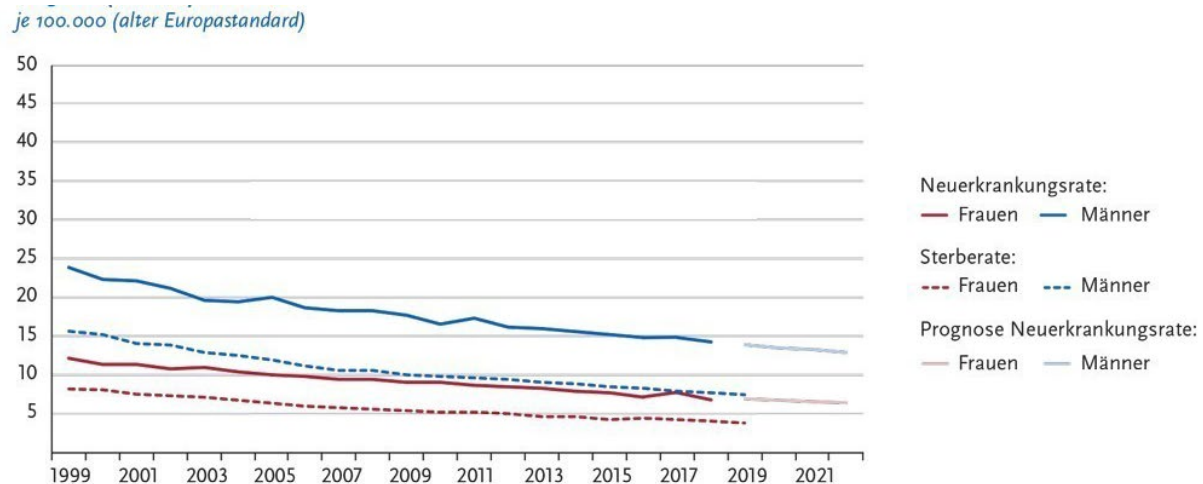
Obwohl die Inzidenz des Magenkarzinoms in Deutschland über die letzten 17 Jahre kontinuierlich gesunken ist, wird in Deutschland jährlich bei über 15.000 Personen ein Magenkarzinom diagnostiziert [1]. Aktuell ist das Magenkarzinom der fünfthäufigste Tumor sowie die dritthäufigste Ursache dafür, an einem Karzinom zu versterben [2]. Es versterben in Deutschland jährlich ca. 9000 Personen an einem Magenkarzinom. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei den Männern bei 71 Jahren und bei den Frauen bei 76 Jahren [3]. Das Erkrankungsrisiko steigt bei beiden Geschlechtern mit zunehmendem Alter an, wobei Männer in der Regel häufiger betroffen sind als Frauen. Auffällig ist weiterhin, dass die Tumoren bei den Männern mit 39% im Vergleich zu den Frauen mit 19% etwa doppelt so häufig am Mageneingang (Kardia) auftreten [3]. Bei den Frauen hingegen sind die Magentumoren am häufigsten im Magenkörper (Corpus) oder im Magengrund (Fundus) mit 27% und am zweithäufigsten im Magenausgang (Antrum) oder am Magenpförtner (Pylorus) mit 25% zu finden (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Verteilung der bösartigen Neubildungen des Magens nach Lokalisation und Geschlecht.**

Gezeigt sind die prozentualen Verteilungen der Lokalisationshäufigkeiten von bösartigen Neubildungen im Magen jeweils für Frauen und für Männer in Deutschland in den Jahren 2017-2018. *Quelle: Robert-Koch-Institut, 2021 [3].*

Die Magenkarzinominzidenzrate der Männer ist etwa doppelt so hoch wie die der Frauen [4]. Mit 9.200 Neuerkrankungen im Jahr 2018 tritt Magenkrebs bei den Männern häufiger auf als bei den Frauen mit 5.560 Neuerkrankungen im Jahr 2018. Weiterhin lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate im Jahr 2018 mit 37% bei den Frauen um 3% höher als bei den Männern mit 34% [3].



**Abbildung 2: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberate nach Geschlecht.**

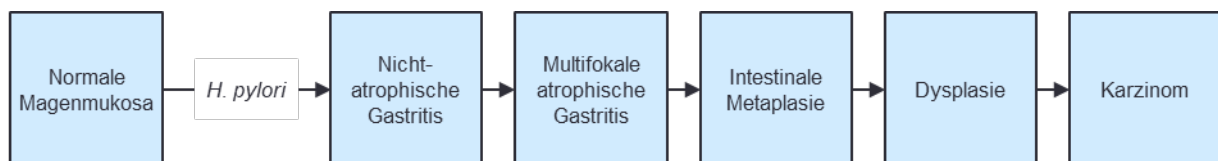
Gezeigt sind die altersstandardisierten Inzidenzen und Mortalitätsraten des Magenkarzinoms pro 100.000 Einwohner in Deutschland für die Jahre 1999-2018/2019 sowie eine Prognose bis 2022. *Quelle: Robert-Koch-Institut, 2021 [3].*

Der Rückgang der Magenkarzinominzidenz und -mortalität (Abbildung 2) ist in erster Linie auf die verbesserten Lebensbedingungen zurückzuführen [3]. Am stärksten ist ein Rückgang der Tumoren des Magenausgangs (Antrum und Pylorus) zu beobachten [3]. Auffällig ist, dass in wirtschaftlich und sozial fortschrittlich entwickelten Regionen wie z. B. Zentraleuropa die Magenkarzinomrate wesentlich geringer ist als in wirtschaftlich und sozial schwächeren Regionen wie beispielsweise in Chile oder in der Mongolei [2]. Die höchsten Inzidenzraten hat Ostasien mit jährlich etwa 40-60 Magenkarzinomfällen pro 100.000 Einwohner [4]. Mit der Möglichkeit der salzfreien Konservierung von Lebensmitteln, der besseren Verfügbarkeit sowie der größeren Vielfalt an Lebensmitteln ging die Inzidenz des Magenkarzinoms in den letzten Jahrzehnten zurück. Ergänzend spielen bessere hygienische Verhältnisse eine entscheidende Rolle. Weiterhin ist die Eradikation von *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) mitverantwortlich für die sinkenden Inzidenzen des Magenkarzinoms [2].

### 1.1.2 Ätiopathogenese

Magenkarzinome können spontan, familiär gehäuft oder auch hereditär auftreten. Mehr als 90% aller Magenkarzinome sind Adenokarzinome [4]. Ein Magenkarzinom entwickelt sich meist aus einer Vorläuferläsion. Dies kann eine intraepitheliale Neoplasie oder ein Adenom sein. Die Entstehung eines Karzinoms ist meist multifaktoriell bedingt. Neben zahlreichen Umweltfaktoren, dem Wechsel von Stammzellpopulationen und dem Mikrobiom spielt vor

allem das gramnegative Bakterium *H. pylori* die entscheidende Rolle [5]. Barry J. Marshall und J. Robin Warren identifizierten *H. pylori* als Auslöser einer chronischen bakteriellen Gastritis (Typ B). Damit wurde deutlich, dass *H. pylori* eine entscheidende Rolle in der Entstehung des Magenkarzinoms zukommt. Daraufhin wurde *H. pylori* 1994 von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als humanes Karzinogen eingestuft [4]. Die *H. pylori*-Infektion wird oft schon in der frühen Kindheit erworben. Schätzungsweise haben ca. 50% aller Erwachsenen weltweit eine Infektion mit *H. pylori*, jedoch entwickeln weniger als 1% ein Karzinom im Laufe ihres Lebens [4]. Bei einer *H. pylori*-Infektion werden freie Sauerstoffradikale (ROS) generiert, die Mutationen in der DNA induzieren können. Weiterhin kommt es zu einer Hypermethylierung der DNA [4]. Bei dieser, durch *H. pylori*-induzierten chronischen Magenschleimhautentzündung, unterscheidet man die Antrum-prädominante Gastritis von der Korpus-prädominanten Gastritis. Während die Antrum-prädominante Gastritis vor allem mit Ulzerationen der Magenschleimhaut, aber keinem erhöhten Entartungsrisiko einhergeht, kommt es bei der Korpus-prädominanten Gastritis zur Atrophie der Schleimhaut und geht daher mit einem erhöhten Entartungsrisiko einher [5, 6]. Das Correa-Modell beschreibt den Prozess der Karzinogenese des sporadisch auftretenden Magenkarzinoms. Ausgehend von einer normalen Magenschleimhaut entwickelt sich zunächst, durch eine chronische Entzündung unterstützt, eine nicht-atrophische Gastritis. Ob die durch *H. pylori*-induzierte nicht-atrophische Gastritis weiterfortschreitet zu einer atrophischen Gastritis, hängt im Wesentlichen von den Virulenzfaktoren des Erregers ab. Während *cagA*-positive *vacA* s2m2-Stämme mit einem erhöhten Magenkarzinomrisiko einhergehen, besteht bei *cagA*-negativen *vacA* s2m2-Stämmen kein erhöhtes Karzinomrisiko. Aus der meist multifokalen atrophischen Gastritis entwickelt sich im weiteren Verlauf eine intestinale Metaplasie, folglich eine hochgradige Dysplasie, bevor am Ende der Correa-Kaskade das Adenokarzinom steht (Abbildung 3) [7].



**Abbildung 3: Correa-Kaskade.**

Schematische Darstellung der klinischen Folgen einer Infektion mit *H. pylori*. Die rechte Seite der Abbildung zeigt die aufeinanderfolgenden Schritte der Präkanzerosekaskade. *Quelle: Abbildung modifiziert nach Correa, Piazzuelo, 2012 [7].*

Genau wie das *H. pylori* wurde auch das Epstein-Barr-Virus (EBV, Humanes Herpesvirus 4), welches ein humanpathogenes doppelsträngiges DNA-Virus ist, von der WHO als Karzinogen der Gruppe I eingestuft. EBV ist die Ursache für Burkitt-Lymphome, Nasopharynxkarzinome sowie für Morbus Hodgkin. Es wird jedoch auch in Zusammenhang mit der Entstehung des Magenkarzinoms vom intestinalen und diffusen Typ gebracht, wobei die EBV-vermittelte

Karzinogenese dieser Magenkarzinome bisher noch nicht verstanden ist [8]. EBV-assoziierte Magenkarzinome haben einen variablen Phänotyp, sind jedoch häufig durch eine ungewöhnlich dichte Entzündungsreaktion gekennzeichnet, weshalb grundsätzlich bei Magenkarzinomen mit dichter Entzündungsreaktion an ein EBV-assoziiertes Magenkarzinom gedacht werden sollte [6].

Nur 5-10% aller Betroffenen haben ein hereditäres Magenkarzinom, welches auf einer Keimbahnmutation beruht. Von den hereditären Magenkarzinomen sind 30-40% vom diffusen Typ und beruhen auf einer Mutation im *CDH1*-Gen, das für E-Cadherin kodiert. Magenkarzinome können aber auch im Rahmen eines hereditären Tumorleidens auftreten. An dieser Stelle sind das Lynch-Syndrom (*hMLH1*, *hMLH2*), das Cowden-Syndrom (*PTEN*), die familiäre-adenomatöse Polypose (*APC*), das Peutz-Jeghers-Syndrom (*STK11*), das Li-Fraumeni-Syndrom (*TP53*), *MUTYH*-assoziierte adenomatöse Polypose (*MUTYH*) und hereditärer Brust- und Eierstockkrebs (*BRCA1*, *BRCA2*) anzuführen [6, 9].

Der Nachweis von Polypen, Adenomen und intraepithelialen Neoplasien hat eine enorme prognostische Relevanz. Mit Hilfe der Wien-Klassifikation lässt sich eine Aussage über die Sicherheit des Nachweises machen. In Kategorie 1 fallen Befunde, bei denen kein Nachweis einer intraepithelialen Neoplasie erfolgt. In der Kategorie 2 befinden sich histologisch nachgewiesene Veränderungen der Schleimhaut, deren Einordnung unsicher ist, wohingegen in Kategorie 3 alle histologisch sicher *low-grade* intraepithelialen Neoplasien fallen. *High-grade* intraepitheliale Neoplasien sind der Kategorie 4 zuzuordnen und in die Kategorie 5 sind schließlich die invasiv wachsenden Karzinome einzuordnen [10].

Wie oben bereits erwähnt ist die Entstehung eines Karzinoms häufig multifaktoriell bedingt. So gibt es einige Ernährungsfaktoren sowie Umwelteinflüsse, die als Risikofaktoren die Entstehung eines Magenkarzinoms bzw. einer Vorläuferläsion begünstigen. Erhöhter Nitratkonsum durch den übermäßigen Verzehr von gesalzenen oder geräucherten Speisen stellt einen nachgewiesenen Risikofaktor für die Entstehung eines Magenkarzinoms dar. Durch eine bakterielle Umwandlung von Nitraten zu Nitriten bilden sich karzinogene Nitrosamine, die zu Schleimhautschäden führen können und *H. pylori*-Infektionen begünstigen können [11]. Der regelmäßige Tabakkonsum ist ebenfalls ein Risikofaktor für ein Magenkarzinom. Mit Sicherheit schädlich, jedoch nicht für das Magenkarzinom spezifisch nachgewiesen, ist auch der übermäßige Verzehr von Alkohol. Darüber hinaus ist Adipositas ein wichtiger Risikofaktor für das Adenokarzinom der Magenkardia. Der genaue pathologische Mechanismus hierfür ist bisher noch unklar, jedoch sind das mit dem Übergewicht einhergehende erhöhte Risiko für ösophagealen Reflux, Insulinresistenz, fettleibigkeitsbedingte Entzündungsmarker und oxidativer Stress postulierte Mechanismen [12]. Hingegen gibt es auch einige protektive Faktoren, wie beispielsweise der regelmäßige

Konsum von frischen Früchten und Gemüse sowie Zitrusfrüchten mit hohem Vitamin C-Gehalt [4, 13]. Vitamin C fungiert als Radikalfänger und hemmt damit die Bildung von potenziell schädlichen Nitroverbindungen [8, 11]. Zusammenfassend ist es eine Synergie aus exogenen und endogenen Risikofaktoren, die die Entstehung eines Magenkarzinoms begünstigen.

### **1.1.3 Pathologie**

Der häufigste bösartige Tumor des Magens ist das Adenokarzinom. Gastrointestinale Stromatumoren und neuroendokrine Tumoren liegen nur in 4-5% der Fälle vor, sind jedoch bei Frauen häufiger zu finden als bei Männern.

Verschiedene Klassifikationssysteme geben Anhaltspunkte für Behandlungsziele und Therapiemöglichkeiten für den individuellen Patienten [14]. Darüber hinaus ist die Kenntnis der makroskopischen Wachstumsform des Tumors sowie der histologischen Klassifikation mit von entscheidender Bedeutung für die Prognosebeurteilung. Eine weit verbreitete histologische Klassifikation für Magentumoren ist die Laurén-Klassifikation aus dem Jahre 1965. Hier werden die Tumoren in den intestinalen und diffusen Typen unterteilt. Später wurde die Klassifikation um den gemischten Typ und den unklassifizierbaren Typ erweitert [15]. Während Tumoren vom intestinalen Typ häufig ein eher adhäsives Wachstumsverhalten mit tubulären Drüsen, meist guter Differenzierung und scharfer Begrenzung aufweisen, zeigen Tumoren vom diffusen Typ ein eher infiltratives Wachstum mit geringer Differenzierung. Daher haben Tumoren vom diffusen Typ meist eine schlechtere Prognose als Tumoren vom intestinalen Typ. Des Weiteren sind Tumoren vom intestinalen Typ mit einer intestinalen Metaplasie sowie mit *H. pylori* assoziiert. Nachweislich finden sich diese Tumoren vor allem bei älteren, männlichen Patienten, diffuse Tumoren hingegen vor allem bei jüngeren, weiblichen Patientinnen [15].

Eine neuere und erweiterte Klassifikation bietet die WHO: Hier werden die malignen Tumoren in tubuläre, papilläre, muzinöse und gemischte Adenokarzinome sowie das gering kohäsive Adenokarzinom, zu denen auch das Siegelringzellkarzinom zählt, unterteilt [6, 15]. Das Siegelringzellkarzinom geht meist mit einer deutlich schlechteren Prognose einher. Weiterhin werden in der WHO-Klassifikation das adenosquämöse Karzinom, das Karzinom mit lymphoidem Stroma, das hepatoide Adenokarzinom, das Plattenepithelkarzinom sowie das undifferenzierte Karzinom unterschieden [6, 16].

Neben diesen beiden gebräuchlichen, auf der Histomorphologie basierenden Klassifikationssystemen, hat sich eine weitere Klassifikation nach molekularen Subtypen etabliert. So werden die Adenokarzinome des Magens in vier molekulare Subtypen unterteilt: chromosomal instabil, genomisch stabil, Epstein-Barr-Virus-assoziiert und

mikrosatelliteninstabil. Chromosomal instabile Magenkarzinome weisen häufig eine intestinale Histologie auf sowie Mutationen im *p53*-Tumorsuppressorgen. Die genomisch stabilen Tumoren des Magens hingegen haben häufig eine diffuse Histologie und Mutationen in den Genen *CDH1* und *RHOA*. Darüber hinaus lassen sich in Epstein-Barr-Virus-assoziierten Magenkarzinomen oft *PIK3CA*-Mutationen sowie eine Überexpression von PD-L1/2 finden. Das mikrosatelliteninstabile Karzinom ist mit einer Hypermethylierung des DNA-Reparaturgens *MLH1* assoziiert. Sowohl das Epstein-Barr-Virus-assoziierte Magenkarzinom als auch das mikrosatelliteninstabile Karzinom haben meist einen ungewöhnlichen Phänotyp [17]. Mit der Unterscheidung dieser vier molekularen Subtypen wird erstmals eine Verbindung zwischen verschiedenen molekularen Genotypen des Magenkarzinoms und seinen Phänotypen hergestellt und damit möglicherweise auch Raum für neue Therapieansätze des Magenkarzinoms geschaffen [6].

#### **1.1.4 Primärdiagnostik und Staging**

Der klinische Verdacht auf das Vorliegen einer Neoplasie des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs besteht bei dem Auftreten von folgenden Symptomen: Dysphagie, rezidivierendes Erbrechen, Inappetenz, unklarer Gewichtsverlust, gastrointestinale Blutung oder unklarer Eisenmangelanämie. Zur Primärdiagnostik sollte frühzeitig eine Ösophagogastroduodenoskopie mit der Entnahme von mindestens acht Biopsien aus malignomsuspekten Arealen erfolgen. Bei Patienten mit großen malignomsuspekten Läsionen sollten mindestens zehn Biopsien plus vier zusätzliche Biopsien, zwei aus dem Magenantrum und zwei aus dem Magencorpus, entnommen werden. Die diagnostische Genauigkeit erhöht sich mit der Anzahl der Biopsien aus den suspekten Arealen. Bei der histologischen Diagnose jeder intraepithelialen Neoplasie soll der Prozess einer kompetenten pathologischen Zweitmeinung im Sinne des Vier-Augen-Prinzips durchgeführt werden. Im Falle einer negativen Histologie bei makroskopisch tumorverdächtiger Läsion sollten erneut multiple Biopsien entnommen werden oder die endoskopische Ultraschalluntersuchung zur Diagnosesicherung herangezogen werden. Zur weiteren Diagnostik und zum *Staging* eines Magenkarzinoms gehört die Sonographie des Abdomens zur Detektion von Lebermetastasen sowie die Sonographie des Halses zur Detektion von Lymphknotenmetastasen. Zur Detektion von Fernmetastasen sollte ein CT des Thorax und des Abdomens inklusive Becken mit intravenösem Kontrastmittel und Distension des Magens mit oralem Kontrastmittel oder Wasser erfolgen. Eine Laparoskopie zum *Staging* sollte bei den lokal fortgeschrittenen Magenkarzinomen (cT3, cT4) vor Beginn einer neoadjuvanten Therapie durchgeführt werden, um eine mögliche Peritonealkarzinose zu detektieren und ein adäquates Behandlungskonzept festlegen zu können. Bisher gibt es für die Primärdiagnostik keine Evidenz für den Nutzen der Bestimmung von Tumormarkern [18].

Die Stadieneinteilung und histologische Klassifikation der Magenkarzinome erfolgt nach der TNM-Klassifikation der UICC sowie nach der WHO-Klassifikation. Die intraepithelialen Neoplasien des Magens und des gastroösophagealen Übergangs werden nach der WHO-Klassifikation in *low-grade* und *high-grade* unterschieden [18]. Die TNM-Klassifikation beschreibt die Ausdehnung eines malignen Tumors und die UICC das entsprechende Krankheitsstadium. Die T-Kategorie ist ein Maß für die Ausdehnung des lokalen Tumorwachstums, die N-Kategorie erfasst das Vorhandensein und die Anzahl der befallenen regionalen Lymphknoten und die M-Kategorie das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen. Tabelle 1 gibt die TNM-Klassifikation für das Magenkarzinom wieder und Tabelle 2 zeigt die UICC-Stadien des Magenkarzinoms. Bei der Erstdiagnose eines Magenkarzinoms sind 40% der Karzinome der Frauen und 39% der Karzinome der Männer bereits im UICC-Stadium IV, es sind dementsprechend bereits Fernmetastasen vorhanden. 24% der Magenkarzinome der Frauen und 30% der Magenkarzinome der Männer sind bei der Erstdiagnose im UICC-Stadium III (Abbildung 4). Die Zahlen veranschaulichen, dass sich ein Großteil der Magenkarzinome bereits bei der Erstdiagnose in einem fortgeschrittenen Tumorstadium befinden [3]. Dies erschwert einen kurativen Therapieansatz und geht daher mit einer schlechten Prognose einher.

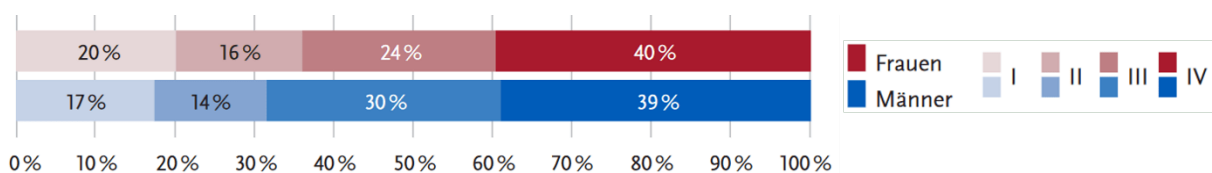
**Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms**

Quelle: Wittekind et al., 2020 [19].

T-Primärtumor	
T1	Oberflächlich infiltrierender Tumor
T1a	Tumor infiltriert Lamina propria oder Muscularis Mucosae
T1b	Tumor infiltriert Submucosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Subserosa ohne Invasion des viszerale Peritoneums
T4a	Tumor perforiert Subserosa (viszerale Peritoneum)
T4b	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen
N-Regionäre Lymphknoten	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-2 Lymphknoten
N2	Metastasen in 3-6 Lymphknoten
N3a	Metastasen in 7-15 Lymphknoten
N3b	Metastasen in 16 oder mehr Lymphknoten
M-Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen oder positive peritoneale Zytologie

**Tabelle 2: UICC-Stadien des Magenkarzinoms.***Quelle: Wittekind et al., 2020 [19].*

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

**Abbildung 4: Verteilung der UICC-Stadien bei Erstdiagnose eines Magenkarzinoms nach Geschlecht.**

Dargestellt sind die Häufigkeiten der UICC-Stadien bei Erstdiagnose eines Magenkarzinoms nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation nach Geschlecht in Deutschland in den Jahren 2017-2018. *Quelle: Robert-Koch-Institut, 2021 [3].*

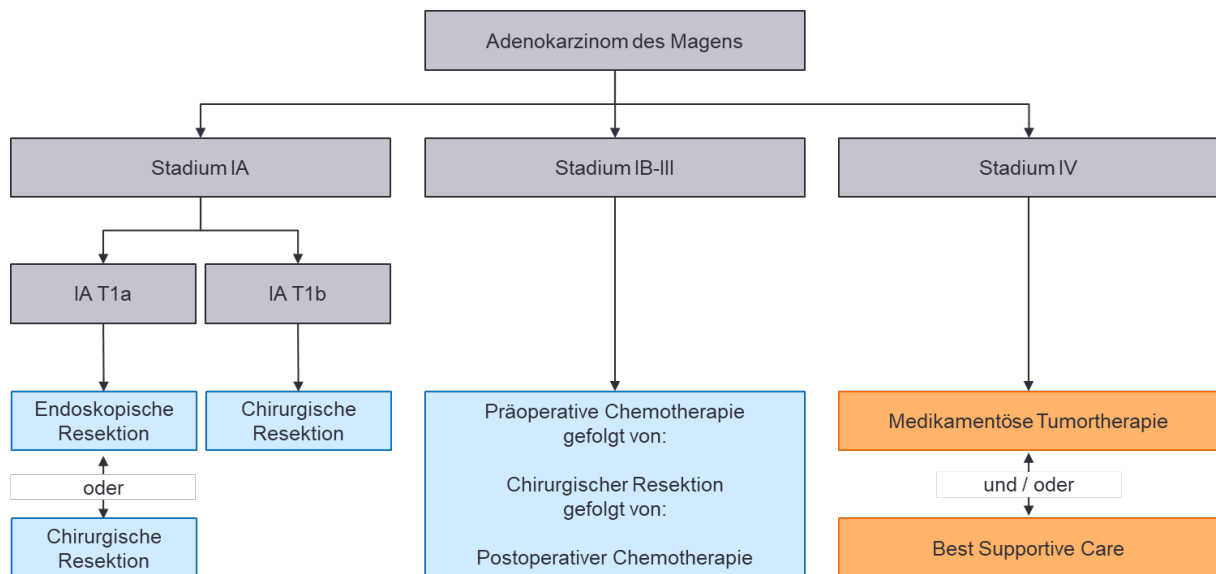
### 1.1.5 Prognose und Therapie

Trotz sinkender Inzidenz des distalen Magenkarzinoms ist dessen Prognose unverändert schlecht, da der Großteil der Fälle erst im fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert wird (Abbildung 4), bei dem ein kurativer Therapieansatz nicht mehr möglich ist [3, 20]. Die 5-



Jahres-Überlebensrate ist stark von dem Alter und dem Tumorstadium bei Erstdiagnose abhängig. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 83% bei Personen, die jünger als 65 Jahre sind und einen Tumor im Stadium I vorweisen, und 3% bei Personen über 75 Jahren und einem Tumor im Stadium IV. Neben dem Tumorstadium sind der Tumortyp nach Laurén, die Lage des Tumors, Lymphgefäßinvasion, Veneninvasion, perineurale Invasion, das *Grading*, der Tumorregressionsgrad und die extranodale Extension prognoserelevant [14, 18, 21]. Die schlechte Prognose bei fortgeschrittenem Magenkarzinom betont die Wichtigkeit der frühen Diagnosestellung einerseits sowie die frühzeitige Identifizierung von Risikofaktoren und Sicherstellung präventiver Maßnahmen andererseits.

Das Behandlungsziel (kurativ vs. palliativ) und die Therapiemöglichkeiten des Magenkarzinoms hängen von der Tumorlokalisation, dem TNM-Stadium, dem histologischen Typ und dem Allgemeinzustand des Patienten ab. Die Therapie des Magenkarzinoms erfolgt Stadien-adaptiert (Abbildung 5). Während bei Karzinomen im UICC-Stadien IA-III ein kuratives Therapiekonzept angestrebt wird, werden Karzinome im UICC-Stadium IV mit einem palliativen Therapiekonzept behandelt. Mukosale Magenfrühkarzinome (Stadium IA, T1a), die < 2cm Durchmesser haben, nicht ulzeriert sind und vom intestinalen Laurén-Typ sind, werden endoskopisch en-bloc-reseziert. Dies erlaubt eine vollständige histologische Beurteilung der lateralen und basalen Ränder. Submukosale Magenfrühkarzinome (Stadium IA, T1b) haben bereits ein Risiko für Lymphknotenmetastasen von 25-28% [18]. Deshalb ist für diese Karzinome, eine chirurgische Resektion mit Lymphadenektomie anzustreben (Tabelle 3). In den UICC-Stadien IB-III sollte eine radikale Gastrektomie in Kombination mit einer D2-Lymphadenektomie durchgeführt werden. Ziel der kurativen Chirurgie des Magenkarzinoms ist eine R0-Resektion. Um tumorfreie Resektionsränder bei der chirurgischen Resektion zu erreichen, sollte ein proximaler Sicherheitsabstand von 5 cm bei den intestinalen Magenkarzinomen und von 8 cm bei den diffusen Magenkarzinomen eingehalten werden. Zusätzlich ist bei lokalisierten Adenokarzinomen des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs mit der Kategorie cT2 oder cT3 und resektablen cT4 Karzinomen eine perioperative Chemotherapie nach dem FLOT4-Schema (5-Fluorouracil/Folinsäure/Oxaliplatin/Docetaxel) indiziert [22]. Magenkarzinome im UICC-Stadium IV werden palliativ behandelt. Patienten in einem guten Allgemeinzustand (ECOG <2) sollte eine systemische Chemotherapie angeboten werden. Vor dem Einsatz einer medikamentösen Tumorthherapie gilt es den HER2-Status zu bestimmen, um die Möglichkeit einer Therapie mit Trastuzumab zu bewerten. Die palliative medikamentöse Erstlinientherapie ist eine Platin-/Fluoropyrimidinhaltige Kombinationstherapie. Das übergeordnete Ziel dieser palliativen medikamentösen Therapie ist neben der Verbesserung des Überlebens vor allem der Erhalt von Lebensqualität [18].



**Abbildung 5: Therapiealgorithmus für die Erstlinientherapie des Magenkarzinoms.** Dargestellt ist der Stadien-adaptierte Therapiealgorithmus des Magenkarzinoms. Hellblau hinterlegt sind kurativ intendierte Therapiekonzepte und orange hinterlegt sind palliativ intendierte Therapiekonzepte. Quelle: Onkopedia, 2022 [23].

**Tabelle 3: Leitlinien und erweiterte Kriterien für Magenfrühkarzinome.**

Quelle: S3-Leitlinie Magenkarzinom [24].

Tiefe	Mukosakarzinom				Submukosakarzinom	
	Nicht ulzeriert		ulzeriert		SM1	SM2
	≤ 20mm	> 20mm	≤ 30mm	> 30mm	≤ 30mm	beliebige Größe
Histologie						
intestinal	Leitlinienkriterien für ER	Erweiterte Kriterien für ER	Erweiterte Kriterien für ER	Magensektion mit Lymphknotendissektion	Erweiterte Kriterien für ER	Magensektion mit Lymphknotendissektion
diffus	Operation in Betracht ziehen	Magensektion mit Lymphknotendissektion	Magensektion mit Lymphknotendissektion	Magensektion mit Lymphknotendissektion	Magensektion mit Lymphknotendissektion	Magensektion mit Lymphknotendissektion

Legend:

- Leitlinienkriterien für ER (Light blue)
- Erweiterte Kriterien für ER (Orange)
- Operation in Betracht ziehen (Purple)
- Magensektion mit Lymphknotendissektion (Brown)

## 1.2 Der Wnt-Signalweg

### 1.2.1 Funktion und Aufbau

Der Wnt-Signalweg beteiligt sich an der Entwicklung und Homöostase verschiedener Gewebearten und spielt eine zentrale Rolle bei der Stammzellregulation. Er nimmt auch eine Schlüsselrolle bei der Initiation und Entwicklung von Karzinomen ein [25, 26]. Der Wnt-Signalweg ist ein fundamentaler Signalweg der Wachstumskontrolle und weist eine Vielzahl aktivierender und inaktivierender Faktoren auf, um dessen Balance präzise zu modulieren [27].

Als erstes Mitglied der Wnt-Familie wurde in einer Maus das Protoonkogen „*Int-1*“ entdeckt, ca. 5 Jahre später entdeckte man dann das homologe „*wingless*“-Gen, welches ein wichtiger Regulator in der *Drosophila melanogaster* ist. Letztendlich fusionierte man die beiden Namen zu dem heute gebräuchlichen Namen „*wnt*“ [28]. Die humane Wnt-Proteinfamilie besteht aus 19 verschiedenen cysteinreichen Glycoproteinen, die als Liganden für mehr als 15 Rezeptoren und Korezeptoren dienen [29]. Die Proteine der Wnt-Familie sind wichtige Wachstumsfaktoren für die Zellproliferation, die durch einen Lipidanteil, eine Acylgruppe und eine Palmitoleinsäure modifiziert worden sind [30, 31].

Drei verschiedene Typen des Wnt-Signalwegs werden unterschieden. Der Erste ist der kanonische oder  $\beta$ -Catenin-abhängige Signalweg, der in die Stabilisierung des  $\beta$ -Catenins involviert ist. Der Zweite ist der nichtkanonische planare Zellpolaritätsweg, der kein  $\beta$ -Catenin beinhaltet, und in die Zytoskelettstrukturierung involviert ist. Der dritte Signalweg ist der nichtkanonische/Kalzium-Weg. Dieser beinhaltet auch kein  $\beta$ -Catenin und hat die Aufgabe, die Kalziumfreisetzung zu regulieren und die intrazellulären Kalziumspiegel zu kontrollieren [32].

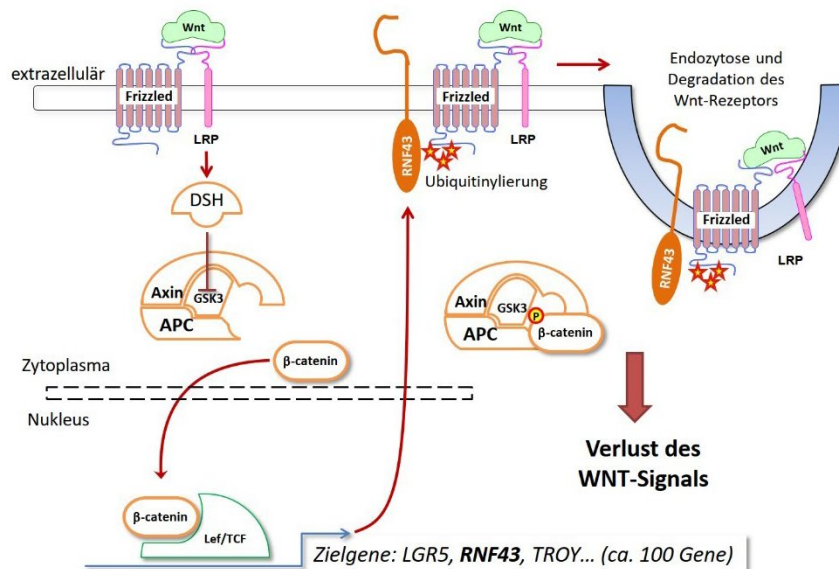
Die Wnt-Proteine binden an einen Rezeptorkomplex, der aus Frizzled-Rezeptoren (FZD) und den Korezeptoren *low-density lipoprotein receptor-related protein group* (LRP5/6) besteht. Die FZD-Proteine weisen sieben Transmembrandomänen und eine extrazelluläre N-terminale cysteinreiche Domäne auf. Diese kooperieren mit ihren Korezeptoren LRP5/6, sodass der Wnt-Ligand durch seine Bindung eine Dimerisierung der beiden Rezeptoren initiiert. Es kommt zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren, der zytoplasmatische Teil des Korezeptors LRP rekrutiert das Protein Axin nach eigener Phosphorylierung durch die Proteinkinasen GSK3 und CK1 [33]. Der zytoplasmatische Teil von FZD wiederum bindet Dishevelled (DVL) und stellt damit eine geeignete Plattform für die Interaktion zwischen LRP und Axin durch die DIX Domäne von DVL [26, 34, 35]. DVL sorgt bei der Bindung eines Wnt-Liganden für die Inhibierung des *Destruction Complex* (DC) [36].

Die Aktivität des Wnt-Signalweges wird von extrazellulären Proteinen reguliert, die den Wnt-Liganden antagonisieren, indem sie beispielsweise LRP5/6 binden und die Dimerisierung mit FZD verhindern [37]. So regulieren auch RNF43 und ZNFR3 über den negativen

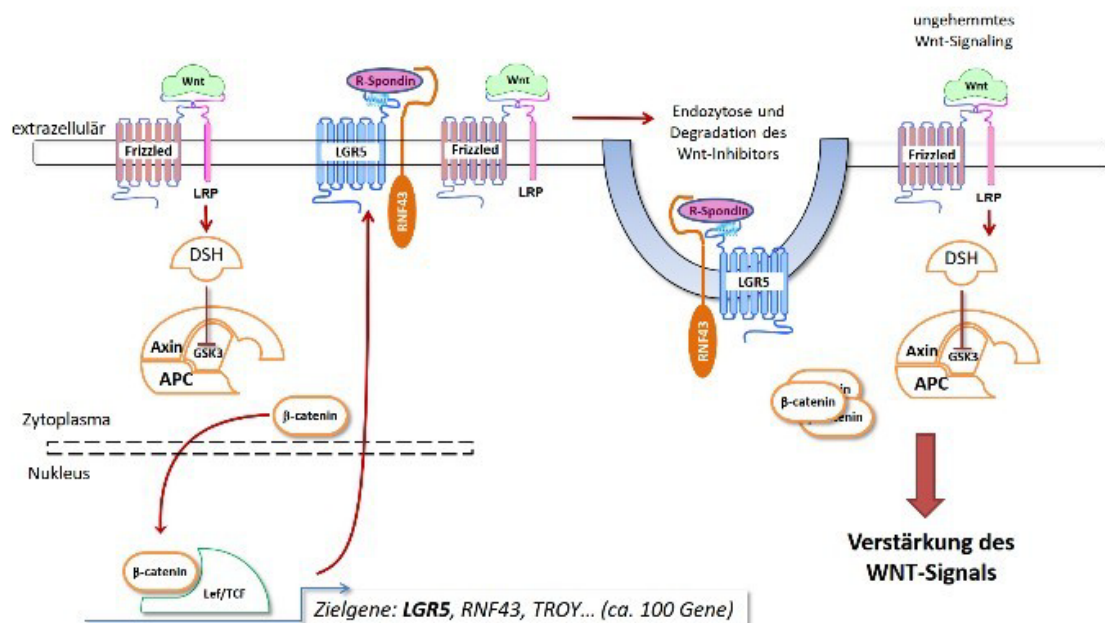
Feedbackmechanismus den Wnt-Signalweg. Diese beiden Tumorsuppressoren ubiquitinieren FZD und induzieren dadurch die Endozytose sowie lysosomale Zerstörung der Wnt-Rezeptoren [38]. Gegensätzlich zu RNF43 und ZNFR3 können Lgr4, Lgr5 und Lgr6 mit hoher Affinität das Signalmolekül R-Spondin binden und dadurch das Wnt-Signal verstärken [39].

Das im Wnt-Signalweg entscheidende Signalmolekül ist  $\beta$ -Catenin. Dessen Stabilität wird vor allem von dem DC kontrolliert. Der DC beinhaltet neben dem Tumorsuppressorprotein Axin, das phosphorylierte  $\beta$ -Catenin, den Tumorsuppressor APC sowie zwei Serin-Threonin-Kinasen (CK1 und GSK3) [40]. Aus der Stimulation des FZD-LRP5/6-Komplexes resultiert eine Hochregulation des  $\beta$ -Catenin-Spiegels. Bindet kein Ligand an den FZD-LRP5/6-Komplex, kommt es zur Degradation von  $\beta$ -Catenin durch den DC [36]. Der Signalweg ist also inaktiv, wenn kein Wnt-Ligand an die FZD/LRP-Rezeptoren gebunden hat. Dann phosphorylieren die Kinasen CK1 und GSK3 das Axin-gebundene  $\beta$ -Catenin, bevor die E3 Ubiquitin-Ligase  $\beta$ -TrCP  $\beta$ -Catenin ubiquitiniert und es schließlich im Proteasom abgebaut wird [41]. Im Gegensatz hierzu ist der Signalweg aktiv, wenn der Wnt-Ligand an FZD bindet. Wie bereits oben beschrieben kommt es nun zu einer Dimerisierung der Rezeptoren und anschließend zur Inhibition des DC durch Dishevelled. Der  $\beta$ -Catenin-Spiegel steigt an und  $\beta$ -Catenin transloziert in den Zellkern. Hier aktiviert  $\beta$ -Catenin gezielt bestimmte Gene, z.B. Transkriptionsfaktoren wie *Tcf1* und *Lef1* [42–45]. Die ständige Aktivierung des Wnt-Signalweges ist stark mit Karzinomen assoziiert [40]. So spielt der Wnt-Signalweg eine kritische Rolle in der Stammzellproliferation und unterstützt die Entwicklung von Krebsstammzellen [46]. In der Arbeit von Ooi et al. fand sich in über 70% aller Magenkarzinome eine Dysregulation des Wnt-Signalweges, was bereits die Bedeutung dieses Signalweges im Magenkarzinom hervorhebt [47].

## A WNT-Signaling & negatives Feedback



## B WNT-Signaling & positives Feedback



**Abbildung 6: Wnt-Signalweg und dessen Regulationsmechanismen.**

Der Wnt-Ligand bindet an den FZD-LRP5/6 Komplex. DVL inhibiert den DC, so dass  $\beta$ -Catenin nicht degradiert wird, sondern im Zytoplasma akkumuliert, in den Zellkern transloziert und dort Transkriptionsfaktoren aktiviert. RNF43 agiert als negativer Regulator des Wnt-Signalweges (A). Mutationen oder der Verlust von RNF43 führen zu einem verstärkten Wnt-Signal (B).  
Quelle: Holm et al. [48].

### 1.2.2 Tumoriologische Bedeutung von RNF43

Das Ring Finger Protein 43 (RNF43) ist ein integrales Membranprotein Typ 1 mit einer extrazellulären Domäne aus 175 Aminosäuren, einer Transmembrandomäne sowie einer

intrazellulären Domäne bestehend aus 565 Aminosäuren und der Ring Finger E3 Ligase-Domäne [49]. RNF43 zählt zu den Tumorsuppressorgenen und spielt eine Rolle im Wnt-Signalweg. So wird durch RNF43 der Wnt-Signalweg negativ reguliert [50]. Der Tumorsuppressor hemmt den Wnt-Signalweg auf der Ebene des Frizzled-Rezeptors, indem er die FZD-Rezeptoren ubiquitiniert und somit deren Abbau veranlasst [49, 51, 51].

In den letzten Jahren konnten in verschiedenen Tumorentitäten Mutationen von *RNF43* nachgewiesen werden. Dies geht mit einer Dysregulation des Wnt-Signalweges einher. So ist *RNF43* am häufigsten in Kolon-, Endometrium-, Pankreas-, und Magenkarzinomen mutiert mit Prävalenzen von 10,9%, 15,2%, 7,3% und 11,9% [49]. Die Expression von RNF43 im Gewebe zeigt eine positive Korrelation mit der histologischen Differenzierung, der Anzahl an Metastasen in regionalen Lymphknoten, der Invasionstiefe des Tumors, dem TNM-Stadium sowie dem Überleben [52]. Im Tumorgewebe kann häufig eine verminderte Expression von RNF43 festgestellt werden, weiterhin zeigen besonders große Tumoren eine sehr geringe Expression von RNF43 [52]. Der Verlust bzw. die geringere Expression von RNF43 ist ein zentrales Ereignis bei der Transition von einem Adenom zu einem Karzinom [50]. Weiterhin geht eine geringe RNF43-Expression mit einer vermehrten Zellproliferation und verminderter Apoptose einher [52]. Es kommt im Tumorgewebe zu unabhängigem Wachstum, vermehrter Proliferation der Zellen sowie steigender Fähigkeit der Invasion [53]. Dass RNF43-negative Krebszellen eine höhere Proliferationsaktivität aufweisen, beweist auch die negative Korrelation mit dem Marker für Zellproliferation Ki-67 [52]. Nachweislich prognostiziert eine geringe RNF43-Expression im Tumor ein geringes Überleben [50, 52]. Vor allem in schlecht differenzierten Magenkarzinomen ist RNF43 eher gering exprimiert [50]. Im Gegensatz zu einer geringen Expression steht die Überexpression von RNF43, die eine positive Korrelation mit besserem Überleben zeigt und wo die Zellproliferation unterdrückt wird [52].

Die Mehrheit der *RNF43*-Mutationen sind *nonsense*- oder *frameshift*-Mutationen [54, 55]. Darüber hinaus lassen sich *RNF43*-Mutationen gehäuft in mikrosatelliteninstabilen Tumoren finden, die eine verminderte Expression des DNA-Mismatch-Reparaturgens *MLH1* aufweisen [17]. In einer Studie an einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer *RNF43*-Mutation im Magen eine verdickte Mukosa, eine Hyperplasie der Magenschleimhaut und zahlreiche zelluläre Atypien haben. Dies unterstreicht die Bedeutung von *RNF43* als Tumorsuppressor [53, 56]. Aus einer weiteren Studie geht hervor, dass das mutierte *RNF43* mit vermehrter Entzündung, Lymphozyteninfiltration und IFN $\gamma$ -Produktion in Verbindung steht. So machen *RNF43*-Mutationen die Magenmukosa empfänglicher für Infektionen mit *H. pylori* [50].

Abschließend lässt sich festhalten, dass der Tumorsuppressor *RNF43* in seiner mutierten Form eine zentrale Rolle in der Tumorgenese spielt. Trotz seiner mutmaßlichen

tumorbiologischen Rolle liegen bisher jedoch nur wenige Daten über die Expression von RNF43 im Magenkarzinom vor. Um diese Informationslücke zu schließen, untersuchte ich in dieser Arbeit die tumorbiologische Bedeutung von RNF43 in einer großen und umfassend charakterisierten Kohorte von therapienaiven Magenkarzinomen mittels Immunhistochemie.

### 1.3 Fragestellung

Das Magenkarzinom stellt weltweit die dritthäufigste karzinombedingte Todesursache dar. Mit einer 5-Jahres- Überlebensrate zwischen 31-35% ist die Prognose schlecht [57].

Wie bereits im oberen Abschnitt beschrieben, spielt der Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Initiation und Entwicklung von Magenkarzinomen. Eine dauerhafte Aktivierung dieses Signalweges führt zu einer unkontrollierten Zellproliferation sowie zur Entwicklung von Krebsstammzellen. Anlass für diese Dissertation gab die Arbeit von Röcken et al. [58], in der mittels Gesamtgenomsequenzierung (WES) in 44% der Magenkarzinomfälle eine Mutation von dem im Wnt-Signalweg eine Rolle spielenden Tumorsuppressorgen *RNF43* nachgewiesen wurde. Ein Ziel der vorliegenden Dissertation beruht daher auf der Hypothese, dass der Tumorsuppressor *RNF43* beim Magenkarzinom tumorbiologisch relevant ist. Interessanterweise war *RNF43* in der Arbeit von Röcken et al. [58] teilweise in allen entnommenen Tumorproben mutiert und teilweise nur in einzelnen Tumorproben. Deshalb ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die intratumorale Heterogenität der Expression von RNF43 im Magenkarzinom zu prüfen. Des Weiteren werden in dieser Arbeit mögliche Zusammenhänge der RNF43-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern wie beispielsweise Tumorausdehnung, Resektionsausmaß, dem Grad der Differenzierung und dem Überleben untersucht. Zusammenfassend werden in dieser Dissertation folgende Hypothesen geprüft:

1. RNF43 hat eine tumorbiologische Relevanz im Magenkarzinom.
2. Die Expression von RNF43 weist im Magenkarzinom eine intratumorale Heterogenität auf.
3. Es gibt einen Unterschied hinsichtlich der Expression von RNF43 und dem histologischen Typ nach Laurén beim Magenkarzinom.

Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Magenkarzinomprogression sowie der Signalwege kann helfen, neue Therapieansätze der Tumorthherapie zu identifizieren.

## **2 Material**

### **2.1 Studienkollektive**

#### **2.1.1 Entdeckungsgruppe**

Als Entdeckungsgruppe standen neun prospektiv gesammelte Patienten mit einem Adenokarzinom des Magens oder ösophagogastralen Übergangs zur Verfügung, die zwischen 2016 und 2017 am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, aufgenommen und operiert worden waren. Alle Patienten waren kaukasische Patienten aus Norddeutschland. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 68 Jahren, die Altersspanne reichte von 50 bis 85 Jahren. Die Einschlusskriterien waren eine ausreichende Größe des Primärtumors (Durchmesser > 3 cm), um eine multiregionale Gewebeentnahme zu ermöglichen, ohne die pathologisch-anatomische Begutachtung des Resektates zu beeinträchtigen. Nach der Resektion des Tumors wurden die Proben auf Eis in das Institut für Pathologie geliefert. Je nach Größe des Primärtumors wurden zwischen 3 und 10 Proben mit einer Hohlnadelbiopsie aus dem Primärtumor entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Vom Resektat wurden vor und nach der Gewebeentnahme makroskopische Bilder angefertigt, um die anatomische Rekonstruktion des Entnahmeverfahrens und die Korrelation mit Paraffinblöcken zu erleichtern. Insgesamt wurden 44 Proben aus den Primärtumoren gewonnen. In einem einzigen Fall wurden drei Proben von drei verschiedenen Lymphknotenmetastasen entnommen. Schließlich wurden insgesamt 47 Tumorproben zur WES weitergeleitet [58]. Die Ergebnisse der WES wurden bereits veröffentlicht und mir für meine Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt [58].

#### **2.1.2 Validierungsgruppe**

Als Validierungsgruppe (=Studienkollektiv) dienten 446 Ganzgewebeschnitte aus in Formalin-fixierten Gewebe, an welchen eine Expressionsanalyse von RNF43 mittels Immunhistochemie durchgeführt wurde. Das Kollektiv stammt aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Kiel und umfasst Magenkarzinome aus den Jahren 1997 bis 2009. Eingeschlossen wurden alle Patienten, die sich einer partiellen oder totalen Gastrektomie aufgrund eines Adenokarzinoms des Magens oder gastroösophagealen Übergangs unterzogen hatten. Die Gewebeproben stammten aus routinemäßigen Eingriffen, für die alle Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben hatten. Jedes Resektat wurde von Fachärzt\*innen für Pathologie histologisch untersucht. Aus dem Studienkollektiv ausgeschlossen wurden Patienten, die kein gesichertes Adenokarzinom hatten oder bei denen nach erfolgter Resektion noch Tumorreste nachgewiesen werden konnten. Weiterhin wurden Patienten, die im Rahmen der Therapie eine perioperative Chemotherapie erhalten hatten, ausgeschlossen.



Im Rahmen der Erstellung dieses Kollektivs wurden zahlreiche klinische und pathologische Charakteristika erfasst. Neben der Art der Operation, wurden das Geschlecht sowie das Alter bei Erstdiagnose dokumentiert. Ergänzend wurden Tumorgröße, Tumorlokalisation und der histologische Typ des Tumors sowie der Differenzierungsgrad bestimmt. Auch wurde die Ausbreitung des Tumors untersucht, indem die Invasionstiefe und die Anzahl der resezierten Lymphknoten sowie das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen notiert wurde. Weiterhin wurde der Fernmetastasenstatus, die Lymphgefäß- und Veneninvasion sowie der Residualtumorstatus erfasst. Die Sterbedaten wurden vom Epidemiologischen Krebsregister des Landes Schleswig-Holstein bezogen. Die Nachbeobachtungsdaten der noch lebenden Patienten wurden aus Krankenhausakten entnommen oder von Hausärzten erfasst.

In vorherigen Studien wurden bereits an diesem Kollektiv Daten zur Expression von mehreren Biomarkern, z.B. FZD7, HER2, MSI, EpCAM und PS2, erhoben, die mir freundlicherweise für meine Auswertung zur Entdeckung möglicher Zusammenhänge mit der Expression von RNF43 in diesem Kollektiv zur Verfügung gestellt wurden [58–61].

Alle Patientendaten wurden nach Aufnahme in die Studie pseudonymisiert und die Auswertung erfolgte in kumulativer Form.

Die Studie wurde von der Ethikkommission des UKSH, Campus Kiel, genehmigt (Referenznummern: D 549/20, Kopie des Ethikvotums siehe Anhang).

## **2.2 Geräte**

Folgende Geräte sind zum Einsatz gekommen: Autostainer Bond™ Max System (Leica-Menarini, Berlin, Deutschland), Autostainer Bond-III™ (Leica-Menarini, Berlin, Deutschland), Leica SCN400 mikroskopischer Voll-Diascanner (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland), Eppendorf Research Pipetten 100-1000µl und 2-20µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), Mikroskop Leica, DM 1000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), Coverslipping Machine Promounter® RCM 2000 (MEDITE Medical GmbH, Burgdorf), Cognitive TPG (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland), Tissue Flotation Bath TFB 45 (MEDITE Medical GmbH, Burgdorf), Trocken-/Wärmeschrank (Binder GmbH + Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), Memmert WNB7 Wasserbad (Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland), Galaxy Mini Zentrifuge C1413V-230EU (VWR International, Wien, Österreich), Inkubationskammer für Objektträger (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland), Labor-Kühlschrank (Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, Deutschland), Rotationsmikrotom Leica RM2245 (Leica Biosystems Nussloch GmbH + Co. KG, Deutschland), Medite COP 30 Cooling Plate (MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland).

## **2.3 Software**

Folgende Software hat Verwendung gefunden: Microsoft® 365 Apps for Business Version 2210 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim), SPSS Version 27.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Zur Darstellung der Bilder wurde das Viewer-Programm Aperio ImageScope Version 12.4.3 (Leica Biosystems GmbH + Co. KG, Nussloch, Deutschland) verwendet.

## **2.4 Chemikalien**

Folgende Chemikalien und Reagenzien wurden bei der Durchführung der Versuchsreihen verwendet: Deionisiertes Wasser (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), Xylol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), Äthanol 70%, 96% und 100% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), BOND Wash Solution (Leica Biosystems GmbH + Co. KG, Nussloch, Deutschland), BOND Epitope Retrieval Solution 1 und 2 (Leica Biosystems GmbH + Co. KG, Nussloch, Deutschland), BOND Primary Antibody Diluent (Leica Biosystems GmbH + Co. KG, Nussloch, Deutschland), BOND Dewax Solution (Leica Biosystems GmbH + Co. KG, Nussloch, Deutschland), Pertex® (MEDITE Medical, GmbH, Burgdorf, Deutschland)

## **2.5 Kitsysteme**

Es wurden folgende Kitsysteme verwendet: Die immunhistochemischen Färbungen wurden unter Zuhilfenahme des BOND Polymer Refine Detection Kit DAB (Leica Biosystems GmbH + Co. KG, Nussloch, Deutschland) durchgeführt.

## **2.6 Antikörper**

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde der polyklonale RNF43 Antikörper ab 217787 (Abcam, Berlin, Deutschland) verwendet.

## **2.7 Verbrauchsmaterial**

Bei der Durchführung der Versuche wurden folgende Verbrauchsmaterialien verwendet: Leica BOND Plus Slides Objektträger (Leica Biosystems GmbH + Co. KG, Nussloch, Deutschland), BOND Universal Covertiles® (Leica Biosystems GmbH + Co. KG, Nussloch, Deutschland), BOND Open Containers 30ml (Leica Biosystems GmbH + Co. KG, Nussloch, Deutschland), Glas- und Plastikkuvetten (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland), Deckgläser NR.1, ca. 24x50mm (Th. Geyer GmbH + Co. KG, Renningen, Deutschland), BOND Printer Ribbon and Labels (Leica Biosystems GmbH + Co. KG, Nussloch, Deutschland), ep T.I.P.S.® Pipettenspitzen (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland), Mikrotom-Klinge A22 (Feather Safety Razor Co. LTD, Japan), Reagenzgläser (Schott AG, Mainz, Deutschland).

## **3 Methoden**

### **3.1 Immunhistochemie**

#### **3.1.1 Etablierung**

Zur Etablierung des Antikörpers RNF43 wurde eine Austestung an mehreren hauseigenen Gewebeschnitten von Magenkarzinomen und Kolonkarzinomen durchgeführt. Durch diese Testreihen wurde die Spezifität des Antikörpers geprüft. Es wurden mit Hilfe des Bond Primary Antibody Diluent vier verschiedene Verdünnungen (1:50, 1:80, 1:100, 1:200) hergestellt. Die Gewebeschnitte wurden anschließend mit Hilfe des Autostainer Bond™ Max Systems gefärbt. Nach Bewertung der gefärbten Schnitte wurde dann die Verdünnung von 1:100 für die durchgeführte Versuchsreihe an Magenkarzinomschnitten festgelegt. Durch sorgfältige Etablierung bzw. Verifizierung des Antikörpers RNF43 sind Stabilität, Spezifität und Reproduzierbarkeit für diese Versuchsreihe gewährleistet.

#### **3.1.2 Durchführung**

Alle für die Versuchsreihe verwendeten Gewebeproben waren in 10% neutral gepufferten Formalin für mindestens 24 Stunden fixiert worden, anschließend in einem Gewebeeinbettautomaten schrittweise entwässert und schließlich in Paraffin eingebettet worden. Die Formalinfixierung war im Institut für Pathologie standardisiert. Die entnommenen Gewebeproben enthielten Abschnitte der Schleimhautoberfläche, des Tumorzentrums und der Invasionsfront. Entparaffinierte Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Bei allen Fällen wurde eine erneute histologische Untersuchung der primären Gewebeschnitte durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Einschlusskriterien erfüllt waren. Die Tumoren wurden nach Laurén klassifiziert [62]. Das pTNM-Stadium aller Patienten wurde gemäß der 8. Auflage der UICC-Leitlinien bestimmt und basiert auf histopathologischen Untersuchungen [63].

Aufgrund der in vorangehenden Studien bereits gezeigten möglichen Heterogenität wurden in der vorliegenden Arbeit auch für RNF43 Ganzgewebeschnitte gefärbt [58, 60].

Für den immunhistochemischen Nachweis von RNF43 im Gewebe des Magens wurden 2µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Hierfür wurde die Paraffinblöcke des eingebetteten Magengewebes zunächst für 30 Minuten auf einer Kühlplatte bei -15 °C gekühlt. Anschließend wurden mit Hilfe des Rotationsmikrotoms 2µm dicke Schnitte hergestellt, die dann kurz ein Wasserbad durchliefen, bevor die Schnitte auf den Objektträger aufgezogen wurden. Um die Schnitte zu strecken, gelangten diese in ein Wärmebad mit 52 °C. Zuletzt kamen die Schnitte über Nacht in einen Wärmeschrank mit 54 °C.

Die immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte des Primärtumors erfolgte vollautomatisiert mit Hilfe des Autostainer Bond™ Max System und dem Autostainer Bond-III™ und dem polyklonalen Antikörper gegen RNF43 in einer Verdünnung von 1:100. Durch die Bond Dewax Solution wurden die Schnitte entparaffiniert und anschließend rehydriert. Alle Gewebeschnitte wurden 20 Minuten lang zur Antigendemaskierung mit einer ER1-Antigen-Retrieval-Lösung vorbehandelt. Für die Visualisierung wurde in dieser Versuchsreihe das Bond Polymer Refine Detection Kit (DAB) verwendet. Die Gegenfärbung wurde mit Hämotoxylin durchgeführt [64, 65]. Im letzten Schritt erfolgte manuell die Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis hin zum Xylol und die anschließende Konservierung mit xylollöslichen Eindeckmittel mit Hilfe des Eindeckautomaten.

### 3.1.3 Auswertung

Für die Auswertung der Immunreaktion wurde der Histo-Score (H-Score) herangezogen, der zwei verschiedene Parameter umfasste: die Intensität der Immunfärbung und die prozentuale Verteilung der gefärbten Zellen. Hierfür wurde die Intensität der zytosolischen Immunreaktion dokumentiert, welche von 0 (keine Immunreaktion, RNF43-IHC 0) über 1+ (schwache Immunreaktion, RNF43-IHC 1+) bis zu 2+ (mittlere Immunreaktion, RNF43-IHC 2+) reichte. In dem in dieser Arbeit untersuchten Studienkollektiv fand sich jedoch keine starke Immunreaktion (RNF43-IHC 3+), sodass nur die Färbeintensitäten 0, 1+ und 2+ zu finden waren. Der zweite Parameter schätzte den Prozentsatz der jeweils positiven Tumorzellen jeder Färbeintensität (0, 1+ ,2+). Die Unterteilung erfolgte in 10%-Schritten. Die Summe aller in einem einzelnen Gewebeschnitt gefundenen Färbeintensitäten ergab immer 100% der Tumorfläche:  $P(\text{RNF43-IHC } 0) + P(\text{RNF43-IHC } 1+) + P(\text{RNF43-IHC } 2+) = 100\%$ . Der H-Score errechnete sich dann mit der folgenden Formel:  $0 \times (\% \text{ immunnegativer Tumorzellen}) + 1 \times (\% \text{ schwach positiver Tumorzellen}) + 2 \times (\% \text{ mittelstark positiver Tumorzellen}) = \text{H-Score}$ , woraus sich ein möglicher H-Score zwischen 0 und 200 für RNF43 ergab. Der maximal erreichbare H-Score betrug 200 ( $0 \times 0 + 1 \times 0 + 2 \times 100 = 200$ ).

Als Referenzstandard wurden nach dem erstmaligen Mikroskopieren der gesamten Kohorte drei Referenzschnitte festgelegt. Dafür wurde jeweils ein repräsentativer Schnitt für die unterschiedlichen Intensitäten (RNF43-IHC 0-2+) ausgewählt. Diese Referenzschnitte waren die Grundlage für die anschließende Bewertung des gesamten Magenkollektivs bestehend aus 446 Ganzgewebeschnitten.

Zur Beurteilung der Expressionsmuster von RNF43 in den unterschiedlichen Ganzgewebeschnitten kategorisierte ich die Schnitte in „homogen weiß“, „homogen schwarz“, „homogen grau“ und in „heterogen“. In die Kategorie „homogen weiß“ gehörten alle Ganzgewebeschnitte, die keine Immunreaktion (RNF43-IHC 0) zeigten, entsprechend einen

vollständigen Verlust von RNF43 aufwiesen. Alle Ganzgewebeschnitte, die ausschließlich eine mittlere Immunreaktion (RNF43-IHC 2+) zeigten, entsprechend RNF43 im gesamten Ganzgewebeschnitt mittelstark exprimierten, wurden der Kategorie „homogen schwarz“ zugeordnet. „Homogen grau“ entsprach den Ganzgewebeschnitten, die eine schwache Immunreaktion (RNF43-IHC 1+) aufwiesen, entsprechend RNF43 im gesamten Ganzgewebeschnitt schwach exprimierten. Ganzgewebeschnitte, die mehrere unterschiedliche Färbeintensitäten in ein und demselben Gewebeschnitt aufwiesen, wurden als „heterogen“ eingestuft.

### **3.2 Statistische Auswertung**

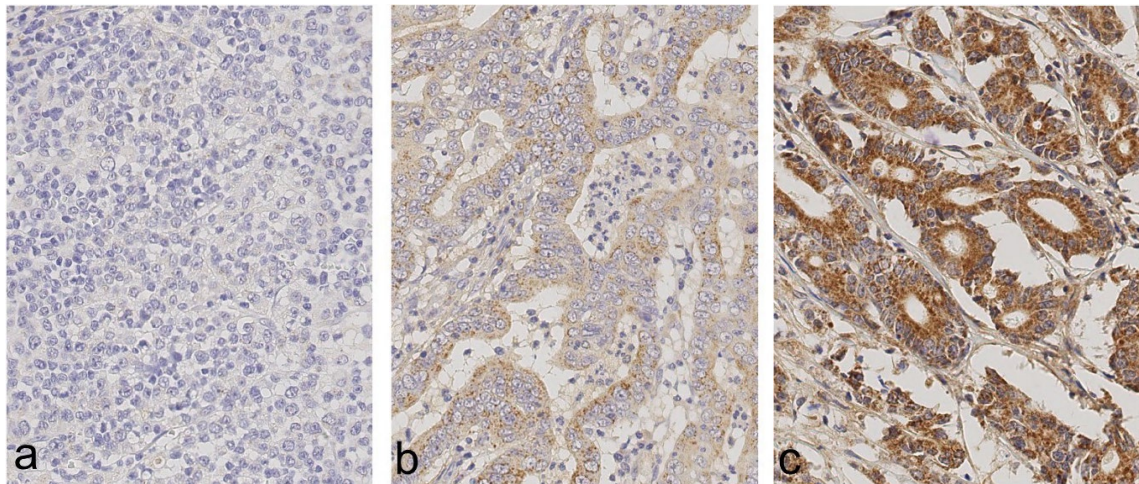
Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS, Version 27.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA). Zunächst wurden die Fälle durch die Trennung am Medianwert in zwei Gruppen unterteilt: RNF43 hoch und RNF43 niedrig. Der Fisher's Exact-Test wurde verwendet, um die Korrelation zwischen klinisch-pathologischen Patientencharakteristika und der Expression von RNF43 auszudrücken. Für die Parameter der ordinalen Skala (T-Kategorie, N-Kategorie, UICC-Tumorstadium) fand der Kendall-Tau-Test Anwendung. Ich nahm ein Signifikanzniveau von 0,05 an. Um die Rate an Falschentdeckungen unter den Korrelationen zu kompensieren, wurde das explorative Simes (Benjamini-Hochberg) -Verfahren angewandt. Alle p-Werte sind unkorrigiert. Die p-Werte, die nach dem Simes-Verfahren signifikant blieben, sind in Tabelle 4 markiert. Das mediane Gesamtüberleben (OS) und das mediane tumorspezifischen Überleben (TSS) mit 95% Konfidenzintervallen wurden durch die Kaplan-Meier-Methode grafisch dargestellt und Unterschiede zwischen den Überlebensdaten wurden mit dem Log-Rank-Test getestet. Variablen mit einem  $p < 0,100$  in der univariaten Überlebensanalyse wurden in eine multivariate Überlebensanalyse einbezogen (Cox-Regression, Rückwärts-LR-Methode).

## 4 Ergebnisse

Die klinisch-pathologischen Patientenmerkmale meiner Studienkohorte sind in Tabelle 4 zusammengefasst. In 446 Magenkarzinomen war RNF43 immunhistochemisch nachweisbar. Das Alter bei der Erstdiagnose reichte von 28,4 bis 92,1 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 67,9 Jahren. Nach der Laurén-Klassifikation wurde in 226 Fällen (50,7%) ein intestinaler Phänotyp, in 140 Fällen (31,4%) ein diffuser, in 31 Fällen (7,0%) ein gemischter und in 49 Fällen (11,0%) ein nicht klassifizierbarer Phänotyp festgestellt. Daten zum OS und TSS lagen für 434 (97,3%) und 406 (91,0%) Fälle vor. Das mediane OS lag bei 14,7 Monaten und das mediane TSS bei 16,0 Monaten. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 78,5 Monate, berechnet mit der Kaplan-Meier-Schätzung der möglichen Nachbeobachtung (KM-PF) (umgekehrte Kaplan-Meier) [66].

### 4.1 Immunhistochemie

Der immunhistochemisch geführte Nachweis von RNF43 im Magenkarzinom zeigte eine zytoplasmatische Färbung in der nicht-neoplastischen Mukosa, Endothelzellen, Lymphozyten, Tumorzellen sowie in Stromazellen. Die Färbeintensität reichte von 0 (keine Färbung) bis 2+ (moderate Färbung) (Abbildung 5). Von insgesamt 446 Fällen wiesen 431 (96,6%) eine RNF43-Immunfärbung auf, während 15 Fälle (3,4%) keine RNF43-Expression (RNF43-IHC 0) zeigten. Eine schwache Immunfärbung (RNF43-IHC 1+) fand sich in 426 (95,4%) Fällen und eine mittlere (RNF43-IHC 2+) in 181 (40,6%) Fällen. In den überwiegenden Fällen fand sich eine Kombination von zwei oder drei Färbeintensitäten. Der prozentuale Anteil an gefärbten Tumorzellen reichte von 0% bis zu 100%. In meiner Studie reichte der H-Score von 0 bis 200 mit einem Median von 90. Dies gibt bereits erste Hinweise auf eine eher geringe Expressionsstärke und damit auf einen Verlust von RNF43 im Magenkarzinom.

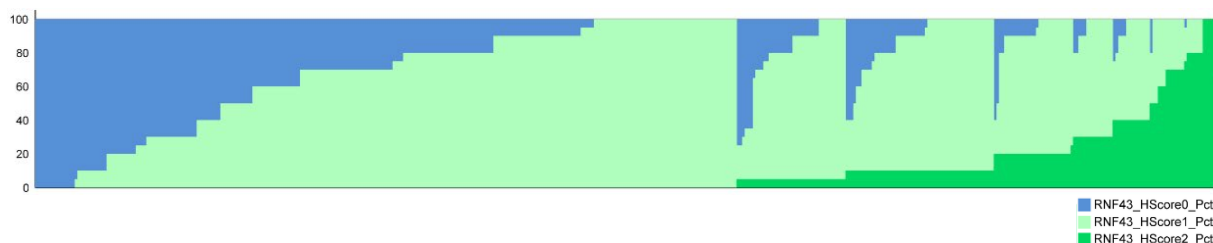


**Abbildung 7: Referenzschnitte für RNF43-Immunfärbungen im Magenkarzinom.**

Die Expression von RNF43 wurde mittels Immunhistochemie untersucht. Die gesamte Magenkarzinomkohorte wurde gescreent und es wurden drei repräsentative Schnitte ausgewählt. Die Färbeintensitäten von RNF43 reichten von 0 (a; negative) über 1+ (b; schwache Immunfärbung) bis 2+ (c; moderate Immunfärbung). Anti-RNF43-Immunfärbung, Hämatoxylin-Gegenfärbung; Originalvergrößerung: x400. *Quelle: Holm et al. [48].*

## 4.2 Expressionsmuster von RNF43

Um die Expressionsmuster von RNF43 in meiner Kohorte weiter zu bewerten, kategorisierte ich die Immunfärbungen als „homogen“ und „heterogen“. Ein vollständiger Verlust der RNF43-Expression, d.h. „homogen weiß“ wurde in 15 (3,4%) Fällen beobachtet. Dies zeigt, dass ein vollständiger Verlust von RNF43 im Magenkarzinom eher die Ausnahme als die Regel ist. Im Gegenteil waren nur 5 (1,1%) Fälle „homogen schwarz“ für RNF43. Die Mehrheit der Magenkarzinome wies eine unterschiedlich reduzierte Expression von RNF43, sprich Graustufen, auf. Das Spektrum der Färbeintensitäten reichte von zwei (63,0%) bis zu drei (20,4%) verschiedenen Färbeintensitäten in einem einzigen Fall (Abbildung 6). Insgesamt belegen diese Daten, dass die Expression von RNF43, also die Kombination der Intensität der Immunfärbung und die Menge der immunpositiven Tumorzellen im Magenkarzinom, intratumoral einer heterogenen Verteilung unterliegen.



**Abbildung 8: Expressionsmuster von RNF43.**

Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der Immunhistochemie (RNF43-IHC; lineare Darstellung) für jeden der 446 Einzelfälle. Die verschiedenen Farben veranschaulichen die unterschiedlichen Färbeintensitäten: RNF43-IHC 0 (blau), RNF43-IHC 1+ (hellgrün) und RNF43-IHC 2+ (mittelgrün). Die Summe aller in einem Fall gefundenen Färbeintensitäten ergab immer einen Gesamt-H-Score von 100% nach der folgenden Formel:  $P(\text{RNF43-IHC } 0) + P(\text{RNF43-IHC } 1+) + P(\text{RNF43-IHC } 2+) = 100\%$ . *Quelle: Holm et al. [48].*

#### 4.3 Korrelation des RNF43-Status mit den klinisch-pathologischen Eigenschaften der Patienten

Um die tumorbiologische Relevanz von RNF43 zu untersuchen, habe ich die Korrelation der Expression von RNF43 mit verschiedenen klinisch-pathologischen Charakteristika geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Da kein genauer Grenzwert von RNF43, bei dem die Expression von RNF43 tumorbiologisch relevant sein könnte, bekannt war, entschied ich mich für ein schrittweises Vorgehen.

Zunächst unterteilte ich meine Validierungsgruppe anhand des medianen H-Scores in eine Untergruppe mit geringer und eine Untergruppe mit hoher RNF43-Expression. Die gesamte Kohorte betrachtend fand sich eine signifikante Korrelation des RNF43-Status mit dem Phänotyp nach Laurén ( $p < 0,001$ ), wobei ein Verlust der Expression häufiger bei Magenkarzinomen vom diffusen Typ im Vergleich zu Magenkarzinomen vom intestinalen Typ beobachtet wurde. Eine verminderte oder verlorene Expression von RNF43 wurde auch häufiger bei schlecht differenzierten Tumoren, HER2-negativen, MSI-, FZD7-, EPCD- und PS2-niedrigen Magenkarzinomen beobachtet. Es wurden auch Moleküle des EpCAM-Signalweges, von denen gezeigt wurde, dass diese mit dem Wnt-Signalweg interagieren, berücksichtigt [61].

In einem zweiten Schritt habe ich eine Analyse der Untergruppen -intestinal und diffus- nach Laurén durchgeführt. Obwohl sich die von mir beobachteten Zusammenhänge nach der Korrektur für multiple Testung als nicht mehr signifikant erwiesen, lassen sich einige interessante Korrelationen beobachten. Bei den Magenkarzinomen vom intestinalen Typ wurde eine reduzierte oder verlorene Expression von RNF43 häufiger bei Magenkarzinomen ohne Veneninvasion und Magenkarzinomen mit niedriger FZD7-Expression gefunden. Bei diffusen Magenkarzinomen wurde kein Zusammenhang zwischen der RNF43-Expression und klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen festgestellt.

Schließlich untersuchte ich die Korrelation zwischen *RNF43* und *LRP1B*, einem weiteren Tumorsuppressor des Wnt-Signalweges. Die Daten zur Expression von LRP1B im Magenkarzinom wurden mir freundlicherweise von Herrn Barsuhn zur Verfügung gestellt. Eine reduzierte oder verlorene Expression von RNF43 korrelierte signifikant mit einer reduzierten oder verlorenen Expression von LRP1B ( $p < 0.001$ ) [48]. Die gleiche Korrelation wurde separat für die intestinalen und diffusen Magenkarzinome gefunden, die nach Korrektur für multiples Testen jedoch an Signifikanz verlor.

Zusammenfassend sind der Laurén-Phänotyp und LRP1B die klinisch-pathologischen Parameter, die auch nach der Korrektur für multiple Testung einen signifikanten Zusammenhang zu der Expression von RNF43 im Magenkarzinom zeigten.



**Tabelle 4: Korrelation der Expression von RNF43 mit klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen bei primär resezierten Magenkarzinomen.**

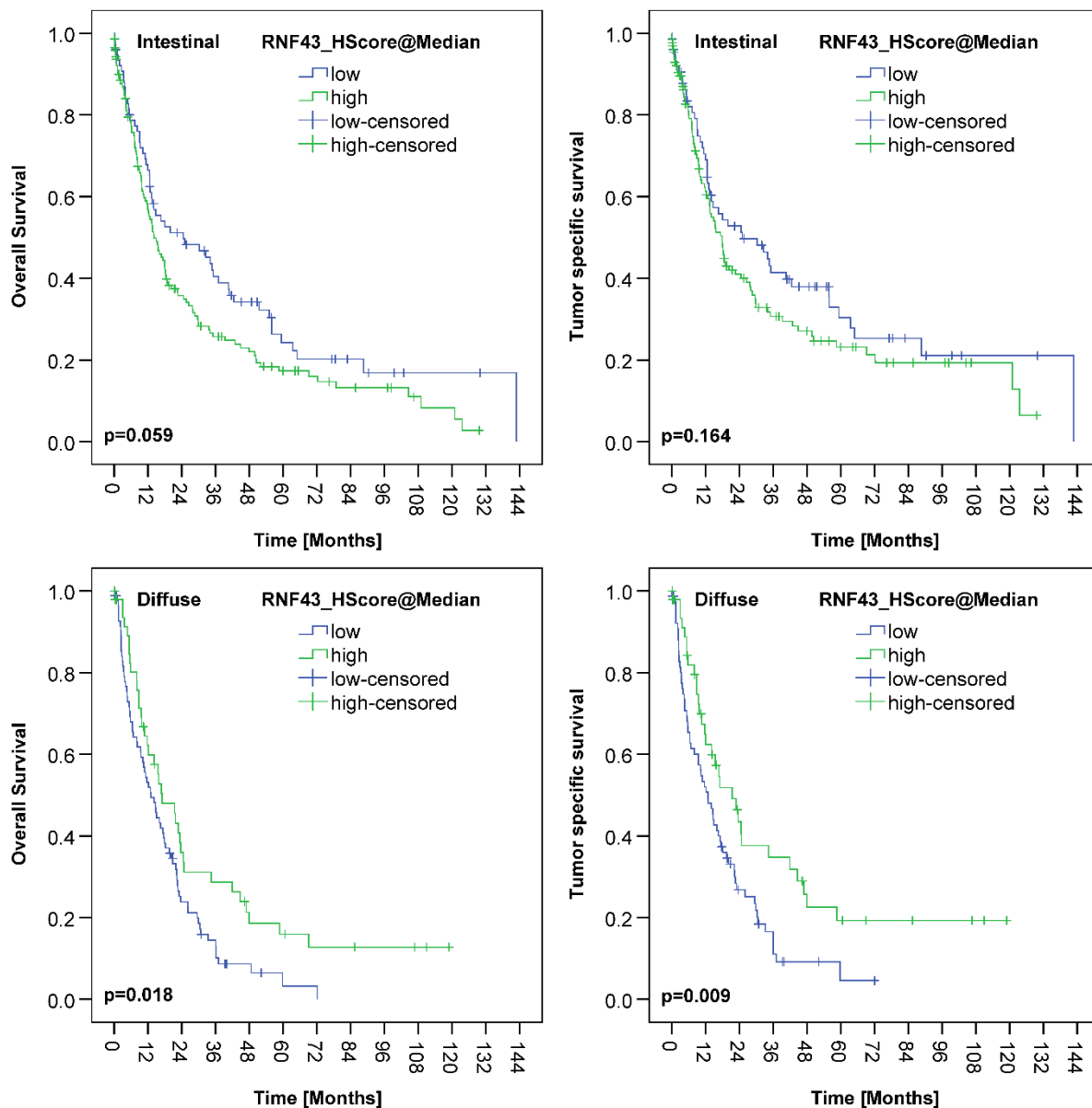
Die p-Werte wurde mittels (a) Fisher's exact Test, (b) Kendall's Tau-Test und (c) Log-Rank-Test ermittelt. (d) Signifikant nach FDR-Korrektur. *Quelle: Holm et al. [48].*

		Gesamt RNF43 Expression			Intestinal RNF43 Expression			Diffus RNF43 Expression		
		Niedrig H-Score<90		Hoch H-Score≥90	Niedrig H-Score<90		Hoch H-Score≥90	Niedrig H-Score<90		Hoch H-Score≥90
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Gesamt</b>		446 (100,0)								
<b>Geschlecht</b>	<b>n p<sup>(a)</sup></b>	446		0,079	226		1,000	140		0,860
Weiblich		168 (37,7)	87 (51,8)	81 (48,2)	22 (35,5)	40 (64,5)	50 (62,5)	30 (37,5)		
Männlich		278 (62,3)	120 (43,2)	158 (56,8)	57 (34,8)	107 (65,2)	39 (65,0)	21 (35,0)		
<b>Alter</b>	<b>n p<sup>(a)</sup></b>	446		1,000	226		0,320	140		1,000
< 64 Jahre		223 (50,0)	103 (46,2)	120 (53,8)	28 (30,8)	63 (69,2)	57 (63,3)	33 (36,0)		
≥ 64 Jahre		223 (50,0)	104 (46,6)	119 (53,4)	51 (37,8)	84 (62,2)	32 (64,0)	18 (36,4)		
<b>Lokalisation</b>	<b>n p<sup>(a)</sup></b>	444		0,760	225		0,262	139		0,200
Proximaler Magen		141 (31,8)	67 (47,5)	74 (52,5)	37 (39,4)	57 (60,6)	14 (77,8)	4 (22,2)		
Distaler Magen		303 (68,2)	139 (45,9)	164 (54,1)	42 (32,1)	89 (67,9)	74 (61,2)	47 (38,8)		
<b>Laurén Phänotyp</b>	<b>n p<sup>(a)</sup></b>	446		<0,001 <sup>d</sup>						
Intestinal		226 (50,7)	79 (35,0)	147 (65,0)						
Diffus		140 (31,4)	89 (63,6)	51 (36,4)						
Gemischt		31 (7,0)	19 (61,3)	12 (38,7)						
Unklassifiziert		49 (11,0)	20 (40,8)	29 (59,2)						
<b>Graduierung</b>	<b>n p<sup>(a)</sup></b>				226		0,575			
Niedrig		98 (43,4)			32 (32,7)	66 (67,3)				
Hoch		128 (56,6)			47 (36,7)	81 (63,3)				
<b>pT Kategorie</b>	<b>n p<sup>(b)</sup></b>	446		0,373	226		0,294	140		0,450
T1a / T1b		51 (11,4)	24 (47,1)	27 (52,9)	16 (42,1)	22 (57,9)	6 (54,5)	5 (45,5)		
pT2		51 (11,4)	20 (39,2)	31 (60,8)	9 (29,0)	22 (71,0)	7 (63,6)	4 (36,4)		
pT3		177 (39,7)	81 (45,8)	96 (54,2)	35 (38,5)	56 (61,5)	32 (61,5)	20 (38,5)		
pT4a / T4b		167 (37,4)	82 (49,1)	85 (50,9)	19 (28,8)	47 (71,2)	44 (66,7)	22 (33,3)		
<b>pN Kategorie</b>	<b>n p<sup>(b)</sup></b>	445		0,403	226		0,237	140		0,123
pN0		124 (27,9)	56 (45,2)	68 (54,8)	33 (43,4)	43 (56,6)	18 (54,5)	15 (45,5)		
pN1		62 (13,9)	27 (43,5)	35 (56,5)	10 (31,3)	22 (68,8)	13 (61,9)	8 (38,1)		
pN2		81 (18,2)	35 (43,2)	46 (56,8)	8 (21,1)	30 (78,9)	15 (60,0)	10 (40,0)		
pN3a/b		178 (40,0)	88 (49,4)	90 (50,6)	28 (35,0)	52 (65,0)	43 (70,5)	18 (29,5)		
<b>pM Kategorie</b>	<b>n p<sup>(a)</sup></b>	446		0,811	226		0,067	140		0,844
pM0		359 (80,5)	168 (46,8)	191 (53,2)	73 (37,4)	122 (62,6)	66 (64,1)	37 (35,9)		
pM1		87 (19,5)	39 (44,8)	48 (55,2)	6 (19,4)	25 (80,6)	23 (62,2)	14 (37,8)		
<b>UICC Stadium</b>	<b>n p<sup>(b)</sup></b>	445		0,935	226		0,063	140		0,750
IA/B		74 (16,6)	33 (44,6)	41 (55,4)	22 (41,5)	31 (58,5)	9 (56,3)	7 (43,8)		
IIA/B		95 (21,3)	44 (46,3)	51 (53,7)	19 (38,0)	31 (62,0)	18 (62,1)	11 (37,9)		
IIIA/B/C		189 (42,5)	90 (47,6)	99 (52,4)	32 (34,8)	60 (65,2)	39 (67,2)	19 (32,8)		
IV		87 (19,6)	39 (44,8)	48 (55,2)	6 (19,4)	25 (80,6)	23 (62,2)	14 (37,8)		
<b>LN Verhältnis</b>	<b>n p<sup>(a)</sup></b>	445		0,569	226		0,327	140		0,381
Niedrig (<0.189)		214 (48,1)	96 (44,9)	118 (55,1)	47 (38,2)	76 (61,8)	35 (59,3)	24 (40,7)		
Hoch (≥0.189)		231 (51,9)	110 (47,6)	121 (52,4)	32 (31,1)	71 (68,9)	54 (66,7)	27 (33,3)		
<b>pL Kategorie</b>	<b>n p<sup>(a)</sup></b>	427		0,334	217		0,478	132		0,147
L0		206 (48,2)	91 (44,2)	115 (55,8)	43 (38,1)	70 (61,9)	35 (56,5)	27 (43,5)		
L1		221 (51,8)	108 (48,9)	113 (51,1)	34 (32,7)	70 (67,3)	49 (70,0)	21 (30,0)		
<b>pV Kategorie</b>	<b>n p<sup>(a)</sup></b>	426		0,439	216		<b>0,020</b>	132		0,421
V0		379 (89,0)	179 (47,2)	200 (52,8)	73 (37,8)	120 (62,2)	78 (62,4)	47 (37,6)		
V1		47 (11,0)	19 (40,4)	28 (59,6)	3 (13,0)	20 (87,0)	6 (85,7)	1 (14,3)		
<b>R-Status</b>	<b>n p<sup>(1)</sup></b>	442		0,570	224		0,605	138		0,494
R0		386 (87,3)	177 (45,9)	209 (54,1)	72 (34,8)	135 (65,2)	73 (64,6)	40 (35,4)		
R1 / R2		56 (12,7)	28 (50,0)	28 (50,0)	7 (41,2)	10 (58,8)	14 (56,0)	11 (44,0)		

<b>HER2-Status</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(a)</sup></b>	419	<b>0,048</b>	212	1,000	128	0,060
Negativ	385	(91,9)	184 (47,8)	201 (52,2)	66 (35,7)	119 (64,3)	80 (65,0)	43 (35,0)
Positiv	34	(8,1)	10 (29,4)	24 (70,6)	9 (33,3)	18 (66,7)	1 (20,0)	4 (80,0)
<b>H.pylori-Status</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(a)</sup></b>	381	0,777	191	0,667	115	0,189
Negativ	322	(84,5)	145 (45,0)	177 (55,0)	57 (35,0)	106 (65,0)	58 (59,8)	39 (40,2)
Positiv	59	(15,5)	28 (47,5)	31 (52,5)	8 (28,6)	20 (71,4)	14 (77,8)	4 (22,2)
<b>EBV-Status</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(1)</sup></b>	433	0,816	222	0,200	134	0,366
Negativ	414	(95,6)	191 (46,1)	223 (53,9)	72 (34,1)	139 (65,9)	85 (63,9)	48 (36,1)
Positiv	19	(4,4)	8 (42,1)	11 (57,9)	6 (54,5)	5 (45,5)	0 (0,0)	1 (100,0)
<b>MSI-Status</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(a)</sup></b>	433	<b>0,013</b>	220	0,245	135	
MSS	398	(91,9)	191 (48,0)	207 (52,0)	72 (36,4)	126 (63,6)	86 (63,7)	49 (36,3)
MSI	35	(8,1)	9 (25,7)	26 (74,3)	5 (22,7)	17 (77,3)	86 (63,7)	49 (36,3)
<b>PIK3CA</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(a)</sup></b>	445	0,213	226	0,584	139	1,000
Wildtyp	421	(94,6)	198 (47,0)	223 (53,0)	75 (35,5)	136 (64,5)	86 (63,2)	50 (36,8)
Mutiert	24	(5,4)	8 (33,3)	16 (66,7)	4 (26,7)	11 (73,3)	2 (66,7)	1 (33,3)
<b>E-Cadherin</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(a)</sup></b>	414	0,090	210	0,286	128	0,599
Niedrig	308	(74,4)	150 (48,7)	158 (51,3)	51 (37,0)	87 (63,0)	70 (63,6)	40 (36,4)
Hoch	106	(25,6)	41 (38,7)	65 (61,3)	21 (29,2)	51 (70,8)	13 (72,2)	5 (27,8)
<b>β-Catenin</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(a)</sup></b>	416	0,198	212	0,471	129	0,299
Niedrig	237	(57,0)	116 (48,9)	121 (51,1)	34 (38,2)	55 (61,8)	63 (65,6)	33 (34,4)
Hoch	179	(43,0)	76 (42,5)	103 (57,5)	41 (33,3)	82 (66,7)	18 (54,5)	15 (45,5)
<b>LGR5</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(a)</sup></b>	84	1,000	82	1,000		
Niedrig	42	(50,0)	14 (33,3)	28 (66,7)	13 (32,5)	27 (67,5)		
Hoch	42	(50,0)	13 (31,0)	29 (69,0)	13 (32,5)	29 (69,0)		
<b>ADAM17</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(a)</sup></b>	420	0,323	214	0,101	130	0,564
Niedrig	305	(72,6)	145 (47,5)	160 (52,5)	62 (38,8)	98 (61,3)	57 (64,0)	32 (36,0)
Hoch	115	(27,4)	48 (41,7)	67 (58,3)	14 (25,9)	40 (74,1)	24 (58,5)	17 (41,5)
<b>FZD7</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(a)</sup></b>	419	<b>0,002</b>	217	<b>0,015</b>	129	0,381
Niedrig	272	(64,9)	139 (51,1)	133 (48,9)	54 (42,2)	74 (57,8)	66 (66,0)	34 (34,0)
Hoch	147	(35,1)	52 (35,4)	95 (64,6)	23 (25,8)	66 (74,2)	16 (55,2)	13 (44,8)
<b>EpEx</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(a)</sup></b>	417	0,238	214	0,234	131	0,836
Niedrig	293	(70,3)	143 (48,8)	150 (51,2)	54 (39,1)	84 (60,9)	63 (64,9)	34 (35,1)
Hoch	124	(29,7)	52 (41,9)	72 (58,1)	23 (30,3)	53 (69,7)	21 (61,8)	13 (38,2)
<b>EpiCD</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(a)</sup></b>	419	<b>0,046</b>	216	0,051	127	0,581
Niedrig	134	(32,0)	72 (53,7)	62 (46,3)	21 (48,8)	22 (51,2)	41 (61,2)	26 (38,8)
Hoch	285	(68,0)	122 (42,8)	163 (57,2)	56 (32,4)	117 (67,6)	40 (66,7)	20 (33,3)
<b>PS2</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(a)</sup></b>	360	<b>0,020</b>	184	0,053	112	0,182
Niedrig	187	(51,9)	96 (51,3)	91 (48,7)	30 (42,3)	41 (57,7)	51 (61,4)	32 (38,6)
Hoch	173	(48,1)	67 (38,7)	106 (61,3)	31 (27,4)	82 (72,6)	22 (75,9)	7 (24,1)
<b>LRP1B</b>	<b>n</b>	<b>p<sup>(a)</sup></b>	446	<0,001 <sup>d</sup>	226	<b>0,003</b>	140	<b>0,013</b>
Niedrig	229	(51,3)	135 (59,0)	94 (41,0)	40 (47,6)	44 (52,4)	69 (70,4)	29 (29,6)
Hoch	217	(48,7)	72 (33,2)	145 (66,8)	39 (27,5)	103 (72,5)	20 (47,6)	22 (52,4)
<b>Gesamtüberleben [Monate]</b>	<b>p<sup>(c)</sup></b>			0,278		0,59		<b>0,018</b>
Ges. / Events / zensiert	434/ 341/ 93	202/ 166/ 36	232/ 175/ 57	77/ 56/ 21	143/ 113/ 30	86/ 75/ 11	50/ 37/ 13	
Überlebens-Median	14,7 ± 1,1	13,8 ± 1,5	15,5 ± 1,6	24,5 ± 9,6	14,1 ± 2,0	12,9 ± 2,1	17,1 ± 3,9	
95% K.I.	12,6 – 16,7	10,9 – 16,8	12,4 – 18,5	5,6 – 43,4	10,2 – 18,0	8,9 – 17,0	9,3 – 24,8	
<b>Tumorspezifisches Überleben [Monate]</b>	<b>p<sup>(c)</sup></b>			0,082		0,164		<b>0,009</b>
Ges. / Events / zensiert	406/278/128	192/ 143/ 49	214/ 135/ 79	75/ 49/ 26	131/ 87/ 44	80/ 65/ 15	49/ 31/ 18	
Überlebens-Median	16,0 ± 1,3	14,0 ± 1,5	18,2 ± 2,5	25,0 ± 9,5	17,9 ± 2,1	18,2 ± 3,4	21,5 ± 4,6	
95% K.I.	13,5 – 18,5	11,2 – 16,9	13,3 – 23,1	6,3 – 43,7	13,8 – 22,0	8,6 – 17,1	12,4 – 30,6	

#### **4.4 Überlebenskorrelation in unterschiedlichen Laurén-Phänotypen mit RNF43-Status**

Weiterhin sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der RNF43-Expression und dem Patientenüberleben untersucht werden. Auch hierbei betrachtete ich die Magenkarzinome vom intestinalen und diffusen Typ separat voneinander, um die mögliche Bedeutung des Laurén-Phänotyps für das Überleben in RNF43-exprimierenden Magenkarzinomen zu prüfen. Interessanterweise konnte ich bei der RNF43-Expression Unterschiede zwischen den intestinalen und diffusen Magenkarzinomen in Bezug auf das Überleben feststellen. Erstaunlicherweise zeigte die Überlebensanalyse der Magenkarzinome vom intestinalen Typ, dass Magenkarzinome mit niedriger RNF43-Expression im Vergleich zu Magenkarzinomen mit hoher RNF43-Expression tendenziell ein längeres Überleben (24,5 Monate OS und 25,0 Monate TSS vs. 14,1 Monate OS ( $p=0,059$ ) und 17,9 Monate TSS ( $p=0,164$ )) hatten. Im Gegensatz dazu hatten Magenkarzinome vom diffusen Typ nach Laurén mit niedriger RNF43-Expression ein kürzeres Überleben als Magenkarzinome mit hoher RNF43-Expression (12,9 Monate OS und 18,2 Monate TSS vs. 17,1 Monate OS ( $p=0,018$ ) bzw. 21,5 Monate TSS ( $p=0,009$ )) (Abbildung 7).



**Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurven, die das Überleben der Patienten in Abhängigkeit vom Laurén-Typ darstellen.**

Weder für die intestinalen Magenkarzinomfälle noch für die diffusen Magenkarzinomfälle bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der RNF43-Expression und dem OS oder TSS. Ein interessanter Trend ist jedoch, dass die Patienten mit einem intestinalen Magenkarzinom mit geringer RNF43-Expression ein längeres Überleben zeigten, als solche mit hoher RNF43-Expression. Bei den diffusen Magenkarzinomen lebten die Patienten mit hoher RNF43-Expression tendenziell länger. *Quelle: Holm et al. [48].*

Auf der Grundlage der signifikanten Korrelationen zwischen RNF43 und LRP1B (vgl. 4.3) untersuchte ich ergänzend die Beziehung zwischen RNF43 und LRP1B in Bezug auf das OS sowie TSS (Tabelle 5). In einer vorherigen, an derselben, sehr gut charakterisierten zentraleuropäischen Studienkohorte durchgeführten Studie wurde die Expression und Bedeutung von LRP1B im Magenkarzinom untersucht [48]. Genauso wie *RNF43* fungiert auch *LRP1B* als Tumorsuppressor im Wnt-Signalweg. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *LRP1B* in Kolonkarzinomen herunterreguliert ist. *LRP1B* interagiert mit DVL2 und inhibiert

damit das  $\beta$ -Catenin/TCF-Signal [67]. Für meine Studienkohorte mit 446 Magenkarzinomfällen hatte ich sowohl Daten für die Expression von RNF43 als auch für die Expression von LRP1B vorliegen. Letztere wurden mir freundlicherweise von Herrn Barsuhn zur Verfügung gestellt. Im Zuge der Kombination der Daten dieser zwei Studien, konnten wir eine signifikante Korrelation der RNF43-Expression mit der Expression von LRP1B in Magenkrebszellen zeigen ( $p < 0.001$ ). Es zeigte sich, dass ein Verlust oder eine verminderte Expression von RNF43 bzw. LRP1B die Überlebenswahrscheinlichkeit in der gesamten Kohorte verringerte. Obwohl der Verlust von RNF43 und/oder LRP1B im Allgemeinen die Überlebenswahrscheinlichkeit verringerte, wurden subtile Unterschiede in Bezug auf die Größe des Effektes von RNF43 und LRP1B bei den verschiedenen Laurén-Phänotypen festgestellt. Betrachtet man die Gesamtkohorte, so zeigte RNF43 den stärksten Einfluss auf das Überleben. Während Patienten mit hoher Expression von RNF43 und LRP1B ein medianes OS von 17,9 Monaten und ein TSS von 22,6 Monaten aufwiesen, lebten Patienten, deren Karzinome RNF43 niedrig und LRP1B hoch exprimierten, mit einem Median von 10,1 bzw. 11,3 Monaten am kürzesten. Bei den intestinalen Magenkarzinomen hatte LRP1B den stärksten Einfluss auf das Überleben. Ebenso zeigten Patienten mit Magenkarzinomen vom intestinalen Typ mit 35,2 Monaten im Median das längste OS und TSS, wenn RNF43 und LRP1B beide niedrig exprimiert waren. Im Gegensatz dazu zeigte die Kombination von hoher RNF43- und niedriger LRP1B-Expression das kürzeste mittlere OS von 8,2 Monaten und TSS von 9,6 Monaten. Bei diffusen Magenkarzinomen zeigte RNF43 den größten Einfluss auf das Überleben. Das längste mediane Überleben von 17,1 Monaten wurde bei Patienten beobachtet, deren Tumoren sowohl RNF43 hoch als auch LRP1B hoch exprimierten. Die Kombination aus niedriger RNF43-Expression und hoher LRP1B-Expression zeigte das kürzeste mediane Überleben mit 6,8 Monaten.

Des Weiteren korrelierten wir einige Kombinationen von RNF43/LRP1B-Expression mit klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen. Bei Magenkarzinomen vom intestinalen Typ korrelierten jene mit niedriger RNF43- sowie niedriger LRP1B-Expression signifikant mit weniger Lymphknotenmetastasen ( $p = 0,006$ ) und Fernmetastasen ( $p = 0,027$ ), einem niedrigen UICC-Stadium ( $p = 0,032$ ) und einem niedrigeren Lymphknotenverhältnis ( $p = 0,004$ ) im Vergleich zu Magenkarzinomen, die RNF43 hoch und LRP1B niedrig exprimieren.

**Tabelle 5: Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der Kombination auf RNF43- und LRP1B-Expression und Tumortyp.***Quelle: Holm et al. [48].*

		Gesamtüberleben [Monate]			Tumorspezifisches Überleben [Monate]		
		95% Konfidenzintervall			95% Konfidenzintervall		
	RNF43 x LRP1B	Prognose	Untergrenze	Obergrenze	Prognose	Untergrenze	Obergrenze
Gesamt	RNF43 hoch/LRP1B hoch	17,873	13,821	21,924	22,604	14,436	30,771
	RNF43 niedrig/LRP1B niedrig	14,686	10,879	18,493	14,686	10,621	18,751
	RNF43 hoch/LRP1B niedrig	11,729	7,866	15,592	12,846	7,148	18,544
	RNF43 niedrig/LRP1B hoch	10,119	5,209	15,029	11,302	5,870	16,734
Intestinal	RNF43 hoch/LRP1B hoch	17,281	13,217	21,346	20,271	10,379	30,163
	RNF43 niedrig/LRP1B niedrig	35,154	17,764	52,544	35,154	13,175	57,133
	RNF43 hoch/LRP1B niedrig	8,246	4,275	12,218	9,626	5,134	14,119
	RNF43 niedrig/LRP1B hoch	12,583	5,077	20,090	13,240	4,937	21,544
Diffus	RNF43 hoch/LRP1B hoch	17,051	3,130	30,972	17,051	3,130	30,972
	RNF43 niedrig/LRP1B niedrig	14,620	8,877	20,364	14,062	10,432	17,691
	RNF43 hoch/LRP1B niedrig	16,690	6,931	26,449	23,589	12,575	34,603
	RNF43 niedrig/LRP1B hoch	6,768	1,810	11,726	6,768	2,496	11,040

#### 4.5 Multivariate Überlebensanalyse (Cox-Regression)

In die multivariate Überlebensanalyse (Cox Regression) wurden alle Variablen mit  $p < 0.100$  in der univariaten Überlebensanalyse (Log-Rank-Test) eingeschlossen (Tabelle 6). Dazu gehörten das UICC-Stadium, das Lymphknotenverhältnis, die L-Kategorie, die V-Kategorie, der R-Status, der HER2-Status und RNF43 für die diffuse Kohorte sowie das UICC-Stadium, das Lymphknotenverhältnis, die L-Kategorie, der R-Status, der FZD7-Status und RNF43 für die intestinale Kohorte. Interessanterweise zeigte sich der Tumorsuppressor *RNF43* niedrig vs. hoch bei der multivariaten Analyse (Cox Regression) als ein unabhängiger Prognosefaktor für das Überleben beim diffusen Magenkarzinom (*Hazard Ratio* (HR) für OS HR = 2,393 (95 % KI: 1,333-3.226) und HR = 2,398 (95 % KI: 1,488-3,861) für TSS). Im Gegensatz dazu war *RNF43* kein unabhängiger Prognosefaktor für das Überleben beim Magenkarzinom vom intestinalen Typ.

**Tabelle 6: Unabhängige Variablen nach der Überlebensanalyse (Cox-Regression).**

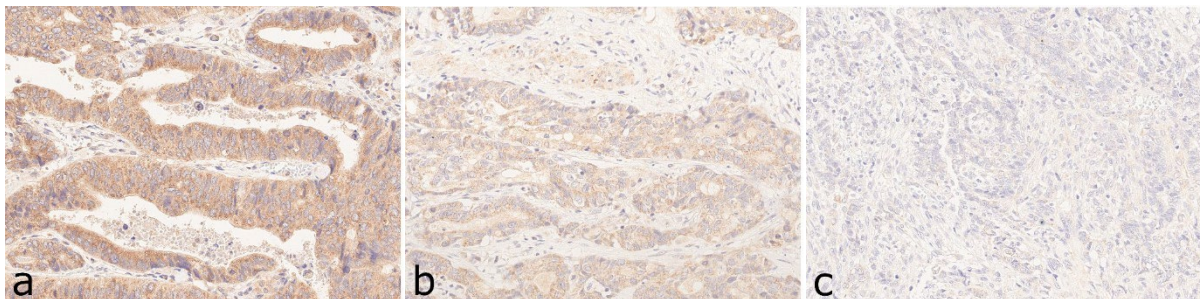
Eingeschlossen wurden alle Variablen mit  $p < 0,100$  in der univariaten Überlebensanalyse (Log-Rank-Test), d.h. UICC-Stadium, Lymphknotenverhältnis, L-Kategorie, V-Kategorie, R-Status, HER2-Status und RNF43 für die diffuse Kohorte und UICC-Stadium, Lymphknotenverhältnis, L-Kategorie, R-Status, FZD7-Status und RNF43 für die intestinale Kohorte. *Quelle: Holm et al. [48].*

	Magenkrebs - Diffuser Typ						Magenkrebs - Intestinaler Typ		
	Gesamtüberleben			Tumorspezifisches Überleben			Gesamtüberleben		
	HR	95% K.I.	p-Wert	HR	95% K.I.	p-Wert	HR	95% K.I.	p-Wert
Stadium			<0,001			<0,001			0,002
II vs. I	3,290	0,761 – 14,218	0,111	5,877	0,775 – 44,590	0,087	2,511	1,411 – 4,470	0,002
III vs. I	7,240	1,745 – 30,036	0,006	15,231	2,072 – 112,0	0,007	2,679	1,427 – 5,030	0,002
IV vs. I	9,557	2,225 – 41,056	0,002	19,337	2,581 – 144,9	0,004	3,828	1,855 – 7,900	<0,001
Lymphknotenverhältnis (hoch vs. niedrig)							2,149	1,351 – 3,420	0,001
V (V1 vs. V0)	2,268	1,014 – 5,071	0,046						
R (R1/R2 vs. R0)	3,030	1,731 – 5,302	<0,001	3,160	1,811 – 5,512	<0,001	2,558	1,406 – 4,655	0,002
HER2-Status (positiv vs. negativ)	4,238	1,493 – 12,032	0,007	3,767	1,330 – 10,670	0,013			
FZD7-Status							1,567	1,126 – 2,180	0,008
RNF43 (niedrig vs. hoch)	2,393	1,333 – 3,226	0,001	2,398	1,488 – 3,861	<0,001			



#### 4.6 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Schließlich korrelierte ich den Genotyp mit dem Phänotyp in neun Fällen der Entdeckungsgruppe, die zuvor einer multiregionalen Sequenzierung unterzogen worden waren (n=47 Tumorproben) (Tabelle 7) [58]. In der ergänzenden Tabelle 7 sind alle 9 Fälle mit 3 bis 10 Gewebeproben pro Fall und den mittels WES nachgewiesenen Mutationen (*Missense*-, *Frameshift*- und *Nonsense*-Mutation) aufgeführt. Von den 9 Fällen wiesen vier Fälle *RNF43*-Mutationen auf, wobei innerhalb eines einzigen Falles mehrere verschiedene Mutationen nachgewiesen worden waren, was auf eine genetische intratumorale Heterogenität hindeutet [58]. Um den Genotyp mit dem Phänotyp zu korrelieren, führte ich eine immunhistochemische Färbung von 47 Paraffinblöcken durch, die die anatomischen Regionen abdeckten und aus denen Gewebeproben für die WES entnommen worden waren. Der Histoscore wurde für jeden Paraffinblock bestimmt. Für *RNF43* betrug der mittlere Histoscore in der Validierungsgruppe 106. Interessanterweise variierte der Histoscore für *RNF43* blockweise, was mit einer intratumoralen Heterogenität auf phänotypischer Ebene vereinbar ist. Darüber hinaus war ein deutlicher Verlust der Proteinexpression für *RNF43* in Fällen mit *Missense*-Mutationen zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu wies der Wildtyp eine deutlich höhere Proteinexpression für *RNF43* auf. Die *Frameshift*-Mutation zeigte eine reduzierte Proteinexpression im Vergleich zum Wildtyp, aber keinen vollständigen Verlust der Expression von *RNF43* (Abbildung 8).



**Abbildung 10: Histologische Bilder der RNF43-Immunfärbungen in Magenkrebs für verschiedene Mutationstypen.**

Der Wildtyp zeigt eine starke Proteinexpression von *RNF43* (a). Die *Frameshift*-Mutation zeigt eine abgeschwächte Proteinexpression von *RNF43* (b) und die *Missense*-Mutation zeigt einen fast vollständigen Verlust der Proteinexpression von *RNF43* (c). Anti-*RNF43*-Immunfärbung, Hämatoxylin-Gegenfärbung. Originalvergrößerungen x400. Quelle: Holm et al. [48].

Dargestellt sind die H-Scores von RNF43 von 47 Tumorproben von 9 Patienten aus der Entdeckungskohorte bei bekannten Mutationsstatus.  
Quelle: Holm et al. [48].

[illegible]

G13396													135	65								
													80	110								
													100	80								
#6											RNF43	frameshift	p.G659Vfs* 41	0,1709	RNF43	missense	.	0,099	180	110		
											RNF43	frameshift	p.G659Vfs* 41	0,1484	RNF43	missense	.	0,1773	80	110		
											RNF43	frameshift	p.G659Vfs* 41	0,1092	RNF43	missense	.	0,1531	115	110		
	LRP1B	missense	p.D2806 N	0,1364	LRP1B	missense	p.R3876I	0,0952	LRP1B	missense	p.C3300W	0,069	RNF43	frameshift	p.G659Vfs* 41	0,2	RNF43	missense	.	0,1364	120	100
	LRP1B	missense	p.C1163 Y	0,0903									RNF43	frameshift	p.G659Vfs* 41	0,2087	RNF43	missense	.	0,129	110	100
#7	LRP1B	.	.	0,1111																120	90	
																				120	110	
																				130	100	
																				140	110	
#8																				100	100	
																				95	100	
																				20	90	
	RNF43	missense	p.H565R	0,1053																40	60	
																				70	80	
#9	LRP1B	missense	p.Q30R	0,0259 74026																20	100	
	LRP1B	missense	p.Q30R	0,0549																80	100	
																				40	90	
	LRP1B	missense	p.Q30R	0,0366																20	90	
	LRP1B	missense	p.Q30R	0,05																30	100	

## 5 Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Die umfassende molekulare Charakterisierung von Magenkarzinomen liefert wichtige Einblicke in das Krebsgenom. *RNF43* gehört zu den Genen, das mit 3-44% bei Magenkarzinomen am häufigsten mutiert ist, was die Hypothese stützt, dass dieses Gen für die Krebsentstehung und/oder -progression beim Magenkarzinom wichtig ist [49]. *RNF43* ist ein Tumorsuppressorgen und gehört zum Wnt-Signalweg. Der Wnt-Signalweg ist einer der am häufigsten veränderten Signalwege in der Krebsbiologie im Allgemeinen und beim Magenkarzinom im Besonderen. Tumorsuppressoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung, Entwicklung und dem Fortschreiten von Krebs. Die Dysregulation des Wnt-Signalwegs beim Magenkarzinom ist ein wichtiger Treiber und kann die Proteinexpression durch regulatorische Netzwerke beeinflussen (Abbildung 4) [47].

Mit dieser Studie konnte ich zeigen, dass *RNF43* im Magenkarzinom exprimiert wird und eine tumorbiologische Bedeutung hat. *RNF43* wurde von Tumorzellen in unterschiedlichen Mengen exprimiert und ich fand Hinweise auf eine intra- und intertumorale Heterogenität der Expression. Der Verlust der Expression von *RNF43* stand in Zusammenhang mit anderen klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen wie beispielsweise dem Verlust von anderen Mitgliedern des Wnt-Signalwegs, wie *FZD7*. Weiterhin beobachtete ich eine reduzierte *RNF43*-Expression vor allem bei HER2-negativen, *EpiCD*-negativen und *PS2*-negativen Magenkarzinomen. Interessanterweise war die prognostische Bedeutung von *RNF43* bei den intestinalen und den diffusen Magenkarzinomen unterschiedlich und seine Wirkung auf die Magenkarzinom-Biologie scheint kontextabhängig zu sein. Darüber hinaus konnte ich nachweisen, dass *RNF43* ein unabhängiger Prognosefaktor für das Überleben bei Patienten mit einem diffusen Magenkarzinom ist.

### 5.2 Methodische Diskussion

In dieser Forschungsarbeit wurde die tumorbiologische Bedeutung und die klinisch-pathologischen Eigenschaften von *RNF43*-positiven Magenkarzinomen untersucht. Wie in vielen anderen Studien bediente ich mich bei der Durchführung der Immunhistochemie. In meiner Arbeit wurde keine *RNF43*-Immunfärbung (0) in 3,4% der Fälle, eine schwache Immunfärbung (1+) in 95,4% der Fälle sowie eine mittlere Immunfärbung (2+) in 40,6% der Fälle gefunden. Es zeigt sich eine wesentliche intra- und intertumorale Variabilität der *RNF43*-Immunfärbungen. Die systematische Analyse über die *RNF43*-Expression im Magenkarzinom wurde mit dem H-Score durchgeführt. In Hinblick auf die unterschiedlichen Kombinationen von Färbeintensitäten (*RNF43*-IHC 0, 1+, 2+) und den unterschiedlichen Prozentsätzen positiver Tumorbereiche in einem Ganzgewebeschnitt sowie der damit einhergehenden intratumoralen

Heterogenität, zeigt sich die Anwendung der Immunfärbung als prädiktiver Biomarker problematisch [69]. Bereits in vorherigen Studien konnte belegt werden, dass die wohlbekannte Tumorerogenität mit einem Stichprobenfehler einhergehen kann und als Alternative für die Immunfärbungen ein prädiktiver Biomarker gesucht werden sollte, der weniger empfindlich auf Probeentnahmeverfahren ist [60].

### **5.3 Interpretation und Diskussion der Ergebnisse**

#### **5.3.1 Hintergrund der Untersuchung**

Durch die mittlerweile breit verfügbare und nur noch wenig zeitaufwändige Methode der NGS von bösartigen Tumoren gibt es eine Fülle von Daten über die Tumorgenetik. Diese Daten werden zunehmend für eine maßgeschneiderte, patientenindividuelle Behandlung genutzt, insbesondere in der Palliativmedizin: Molekulare Tumorboards stützen sich in hohem Maße auf veröffentlichte Daten über die mutmaßliche tumorbiologische Bedeutung der mutierten Zielgene. Es besteht jedoch nach wie vor eine große Lücke zwischen der Verfügbarkeit von genetischen Daten und Validierungsstudien, die die mutmaßliche tumorbiologische Bedeutung des jeweiligen Genprodukts darlegen. Um diese Informationslücke zu schließen, habe ich die bisherige genetische Forschung zum Magenkrebs erweitert, indem ich die tumorbiologische Bedeutung von einem im Magenkarzinom häufig mutierten Gen untersucht habe.

#### **5.3.2 Intra- und intertumorale Heterogenität der Expression von RNF43 im Magenkarzinom**

Viele frühere Studien für verschiedene Biomarker, durchgeführt an demselben Studienkollektiv, haben eine erhebliche intra- und intertumorale Heterogenität beim Magenkarzinom gezeigt, die entweder auf intra- und intertumorale genetische Heterogenität oder auf die Plastizität der Krebszellen zurückzuführen ist [60, 69–71]. Meine Studie zeigt, dass die Expression von RNF43 im Magenkarzinom ebenfalls eine intra- und intertumorale Heterogenität aufweist. Die Mehrheit meiner Fälle (83,4%) wies mindestens zwei unterschiedliche Färbintensitäten für RNF43 auf. Es gibt mehrere mögliche Erklärungsansätze für diese intra- und intertumorale Heterogenität.

Die multiregionale Sequenzierung hat gezeigt, dass Mutationen von *RNF43* klonal oder subklonal sein können [58]. Subklonale Mutationen tragen zur intratumoralen genetischen Heterogenität bei und damit zu divergierenden histologischen und phänotypischen Merkmalen. Es resultiert daraus eine enorme Vielfalt an unterschiedlichen Phänotypen.

Neben der intratumoralen Heterogenität weist RNF43 auch eine erhebliche intertumorale Heterogenität beim Magenkarzinom auf. In der Cosmic-Datenbank sind 512 auf *RNF43* untersuchte Magenkarzinomfälle hinterlegt, von denen 144 (28,2%) mutiert waren und 171 verschiedene *RNF43*-Mutationen aufwiesen [72]. Diese Daten unterstreichen die intra- und

intertumorale Heterogenität von RNF43 im Magenkarzinom. Die zahlreichen unterschiedlichen Genotypen, die durch die verschiedenen Mutationen entstehen, führen zu einer komplexen subklonalen Architektur und prägen die intratumorale Heterogenität. Angesichts der vermeintlich hohen Prävalenz von *RNF43*-Mutationen beim Magenkarzinom bedeutet dies jedoch offensichtlich keinen vollständigen Verlust der Expression von RNF43. Darüber hinaus sind nicht alle Mutationen biologisch relevant. Vielmehr müssen verschiedene kontextbezogene Faktoren, wie beispielsweise der Tumortyp (intestinal, diffus, gemischt), berücksichtigt werden. Ein mutiertes *RNF43* wird möglicherweise transkribiert und translatiert: Es wurde gezeigt, dass die rekurrente Mutation von *RNF43* (*p.G659Vfs\*41*) voll funktionsfähig ist [49]. Die Analyse von Expressionsmustern sowie der Tumorkontext (z.B. intestinaler vs. diffuser Typ) kann daher wertvolle zusätzliche Informationen liefern. Die alleinige Konzentration auf die vorliegende Mutation ist daher nicht ausreichend, um die Tumorbilogie zu verstehen.

Intra- und intertumorale Heterogenität kann auch auf Unterschiede in der Genexpression zwischen verschiedenen Tumorsubklonen zurückzuführen sein. Das Spektrum der Expressionsmuster (Färbeintensität und Prozentsatz der gefärbten Tumorzellen) war in meiner Studienkohorte für RNF43 sehr variabel. Es zeigte sich kein klares „Schwarz-Weiß-Muster“, wie man es hätte erwarten können, wenn alles auf (subklonale) Genmutationen zurückzuführen gewesen wäre.

Nach dem Knudson-Two-Hit-Modell müssen beide Allele eines Tumorsuppressors inaktiviert werden, z. B. durch eine Mutation, den Verlust der Heterozygotie (LOH) oder ein epigenetisches Silencing, um eine Veränderung des Phänotyps zu bewirken. Die Ergebnisse meiner Validierungsgruppe konnten zeigen, dass *Missense*-Mutationen mit einem Verlust der Proteinexpression von RNF43 verbunden sind. Dieser Befund unterstützt die Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp besteht (Tabelle 7). Da ich den LOH- und Methylierungsstatus in meiner Entdeckungskohorte nicht untersucht habe, kann ich nicht ausschließen, dass das zweite Allel noch funktionell war. Die Entdeckungskohorte bestätigte jedoch das Vorhandensein einer intratumoralen Heterogenität auf genetischer und phänotypischer Ebene.

Abschließend bestätigt sich meine ursprüngliche Hypothese einer komplexen heterogenen Expression von RNF43 im Magenkarzinom. RNF43 scheint als einfacher prognostischer und prädiktiver Biomarker ungeeignet zu sein.

### **5.3.3 Die Expression von RNF43 im Magenkarzinom ist kontextabhängig**

Die Expression von RNF43 korrelierte signifikant mit dem Tumortyp nach Laurén, d.h. die RNF43-Expression war im diffusen Magenkarzinomtyp signifikant reduziert. Dies fügt RNF43

zu einer immer länger werdenden Liste von Wnt-Molekülen hinzu, die im diffusen und intestinalen Magenkarzinom unterschiedlich mutiert und exprimiert sind. Vorherige Studien zeigten, dass die Expression von E-Cadherin,  $\beta$ -catenin, FZD7 sowie anderen Mitgliedern des Wnt-Signalwegs beim Magenkarzinom vom diffusen Typ ebenfalls verringert sind [73]. Darüber hinaus finden sich beim Magenkarzinom vom diffusen Typ häufiger *CDH1*-Mutationen [74]. Zusammengefasst zeigen die Daten meiner Studie, dass (1) die Dysregulation des Wnt-Signalwegs bei den beiden Laurén-Typen intestinal bzw. diffus unterschiedlich ist, (2) dass die Mutations- und Expressionsmuster der verschiedenen Wnt-Moleküle voneinander abhängig sind und (3) dass RNF43 für intestinale und diffuse Magenkarzinome getrennt untersucht werden muss, wenn es um korrelative Analysen mit klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen geht.

Zur Untermauerung dieser Behauptung, zeigte sich in meiner Studie, dass die Korrelation zwischen RNF43-Expression und dem Überleben der Patienten zwischen den beiden Tumortypen unterschiedlich war. Patienten mit intestinalen Magenkarzinom und geringer Expression von RNF43 lebten länger (medianes OS 24,5 Monate) als Patienten mit intestinalen Magenkarzinom und hoher Expression von RNF43 (medianes OS 14,1 Monate). Da *RNF43* als Tumorsuppressor fungiert und folglich den Wnt-Signalweg negativ reguliert, hätte ich erwartet, dass eine hohe Expression von RNF43 im intestinalen Magenkarzinom mit einem weniger aktiven Wnt-Signalweg und einem besseren Überleben im Vergleich zum diffusen Magenkarzinomtyp verbunden wäre. Wenn Tumorzellen mehr RNF43 exprimieren, sollte der Wnt-Signalweg weniger aktiv sein, da er von RNF43 über einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert wird. RNF43 bewirkt durch Ubiquitylierung von FZD die Endozytose und den Abbau des Wnt-Rezeptors, was zum Verlust der Wnt-Signalübertragung führt (Abbildung 4) [38]. Diese Erwartungen scheinen jedoch nur für die Magenkarzinome vom diffusen Typ zu gelten, bei dem eine verringerte oder verlorene Expression von RNF43 mit einem etwas schlechteren Überleben (medianes OS 12,9 Monate) im Vergleich zu Fällen mit hoher RNF43-Expression (medianes OS 17,1 Monate) verbunden war (Abbildung 7). Die isolierte Betrachtung von *RNF43* als Tumorsuppressor scheint nicht ausreichend zu sein. Vielmehr hängt die vermutete tumorbiologische Bedeutung vom Tumortyp und dem Zusammenspiel der verschiedenen Mitglieder des Wnt-Signalwegs ab (Abbildung 4). Beide Aspekte sollten in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

#### 5.3.4 Ausblick

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse meiner Arbeit die tumorbiologische Bedeutung von RNF43 im Magenkarzinom bestätigen und dessen Potential im Zusammenhang mit möglichen neuen, maßgeschneiderten diagnostischen und therapeutischen Konzepten unterstützt. Jedoch sind weitere umfassende Untersuchungen

nötig, um die Bedeutung von RNF43 im Magenkarzinom näher einzugrenzen. Insbesondere das Zusammenwirken aller Mitglieder des Wnt-Signalweges sollte genauer untersucht werden. Die alleinige Betrachtung von RNF43 scheint nicht ausreichend zu sein, um dessen Funktion und Wirkung im dysregulierten Wnt-Signalweg im Magenkarzinom zu verstehen. Vielmehr gilt es, RNF43 im Kontext des komplex regulierten Wnt-Signalweges zu betrachten.



## 6 Zusammenfassung

Immer noch hat das Magenkarzinom aufgrund einer häufig erst spät gestellten Diagnose eine sehr schlechte Prognose. Somit rücken das Verständnis molekularer Signalwege sowie die Identifizierung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansatzpunkte bzw. Zielstrukturen in den Mittelpunkt der heutigen Forschung. Als Anlass für diese Arbeit diente die Arbeit von Röcken et al. [59], in der mittels WES in 44% der Magenkarzinomfälle eine *RNF43*-Mutation nachgewiesen wurde. *RNF43* war teilweise in allen Tumorproben eines Patienten mutiert und teilweise nur in einzelnen Tumorproben eines Patienten. Auf Grundlage dieser Arbeit sollte in der vorliegenden Dissertation geprüft werden, inwieweit *RNF43* im Magenkarzinom tumorbiologisch relevant ist, inwieweit die *RNF43*-Expression im Magenkarzinom eine intratumorale Heterogenität aufweist, inwieweit die *RNF43*-Expression mit weiteren klinisch-pathologischen Parametern korreliert und inwieweit es einen Unterschied hinsichtlich der Expression von *RNF43* in den verschiedenen Laurén-Phänotypen des Magenkarzinoms gibt. Hierfür wurde eine Expressionsanalyse von *RNF43* an 446 Ganzgewebeschnitten der Validierungsgruppe mittels Immunhistochemie unter Verwendung des Histo-Scores durchgeführt. Die Validierungsgruppe wurde anhand des Medianwertes in eine Gruppe mit niedriger/fehlender *RNF43*-Expression und einer Gruppe mit hoher *RNF43*-Expression unterteilt. Zur Beurteilung der Expressionsmuster von *RNF43* wurden die Ganzgewebeschnitte in die Kategorien „homogen weiß“, „homogen grau“, „homogen schwarz“ oder „heterogen“ eingeteilt. Neben der Untersuchung aller Magenkarzinomfälle, wurden die intestinalen und die diffusen Magenkarzinome zusätzlich separat untersucht. In den 446 Magenkarzinomfällen war *RNF43* immunhistochemisch nachweisbar. In der überwiegenden Mehrheit der Fälle bestand jedoch eine Kombination aus zwei oder drei Färbintensitäten, was verdeutlicht, dass die Expression von *RNF43* im Magenkarzinom einer intratumoralen heterogenen Verteilung unterliegt. In der Gesamtgruppe korrelierte die *RNF43*-Expression signifikant mit dem Laurén-Typ und dem Tumorsuppressor *LRP1B*. Des Weiteren zeigte sich eine verminderte Expression von *RNF43* häufiger bei schlecht differenzierten Tumoren, HER2-negativen, MSI-, FZD7-, EPCD- und PS2-negativen Magenkarzinomen. Bei den intestinalen Magenkarzinomen ging eine niedrige Expression von *RNF43* mit einem besseren Überleben einher, wohingegen bei den diffusen Magenkarzinomen eine hohe *RNF43*-Expression mit einem besseren Überleben einherging. Die multivariate Analyse ergab, dass *RNF43* ein unabhängiger Prognosefaktor für das Überleben beim diffusen Magenkarzinom ist. Zusätzlich konnte eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation nachgewiesen werden, indem sich ein Verlust der *RNF43*-Proteinexpression in Fällen einer *Missense*-Mutation zeigte.

Zusammenfassend beweist diese Studie die tumorbiologische Bedeutung von *RNF43* im Magenkarzinom. Es konnte sowohl auf genetischer als auch auf phänotypischer Ebene eine

ausgeprägte intra- und intertumorale Heterogenität der Expression von RNF43 im Magenkarzinom festgestellt werden. Komplexe regulatorische Netzwerke des Wnt-Signalweges scheinen das Expressionsmuster von RNF43 im Magenkarzinom sowie dessen tumorbiologische Bedeutung zu modulieren, die wiederum vom Tumortyp abhängig zu sein scheint. Summierend ist RNF43 kein einfach zu verwendender prognostischer oder prädiktiver Biomarker beim Magenkarzinom. Möglicherweise erfordert es die gleichzeitige Analyse mehrerer Mitglieder des Wnt-Signalweges in Abhängigkeit vom Tumortyp.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Hermann, S., Jansen, L., Barnes, B. et al. (2020) Epidemiologie des Magenkarzinoms in Deutschland. <https://doi.org/10.1007/s00761-020-00835-1>.
2. Balakrishnan, M., George, R., Sharma, A. et al. (2017) Changing Trends in Stomach Cancer Throughout the World. *Current Gastroenterology Reports* 19(8):36. doi: 10.1007/s11894-017-0575-8
3. Robert-Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V. (2021) Krebs in Deutschland für 2017/2018
4. Correa, P. (2013) Gastric cancer: Overview. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2013.01.002>
5. Amieva, M., Peek, RM. (2016) Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. *Gastroenterology* 150(1):64–78. doi: 10.1053/j.gastro.2015.09.004.
6. Röcken, C. (2017) Tumoren und Tumorstufen des Magens (Gastric tumors and tumor precursors). *Pathologe* 38(2):75–86. doi: 10.1007/s00292-016-0259-4
7. Correa, P., Piazuelo, MB. (2012) The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis* 13(1):2–9. doi: 10.1111/j.1751-2980.2011.00550.x.
8. Carl-McGrath, S., Ebert, M., Röcken, C. (2007) Gastric adenocarcinoma: Epidemiology, pathology and pathogenesis. *Cancer Therapy* 5:877–894
9. Yusefi, AR., Bagheri, Lankarani, K., Bastani, P. et al. (2018) Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev* 19(3):591–603. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.3.591
10. Stolte, M. (2003) The new Vienna classification of epithelial neoplasia of the gastrointestinal tract: Advantages and disadvantages. *Virchows Archiv* 442(2):99–106. doi: 10.1007/s00428-002-0680-3
11. Ang, TL., Fock, KM. (2014) Clinical epidemiology of gastric cancer. *Singapore Med J* 55(12):621–628. doi: 10.11622/smedj.2014174
12. Yang, P., Zhou, Y., Chen, B. et al. (2009) Overweight, obesity and gastric cancer risk: Results from a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer* 45(16):2867–2873. doi: 10.1016/j.ejca.2009.04.019
13. Lunet, N., Valbuena, C., Vieira, AL. et al. (2007) Fruit and vegetable consumption and gastric cancer by location and histological type: Case-control and meta-analysis. *Eur J Cancer Prev* 16(4):312–327. doi: 10.1097/01.cej.0000236255.95769.22
14. Chia, N-Y., Tan, P. (2016) Molecular classification of gastric cancer. *Ann Oncol* 27(5):763–769. doi: 10.1093/annonc/mdw040

15. Berlth, F., Bollschweiler, E., Drebber, U. et al. (2014) Pathohistological classification systems in gastric cancer: Diagnostic relevance and prognostic value. *World J Gastroenterol* 20(19):5679–5684. doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5679
16. Bosman, FT. (ed) (2010) WHO classification of tumours of the digestive system: [reflects the views of a working group that convened for an editorial and consensus conference at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, December 10 - 12, 2009 ; third volume of the 4th edition of the WHO series on histological and genetic typing of human tumours], 4. ed., 1. print run. World Health Organization classification of tumours, 3 (der 4. ed.). IARC, Lyon
17. The Cancer Genome Atlas Research Network. (2014) Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 513(7517):202–209. doi: 10.1038/nature13480
18. Leitlinienprogramm Onkologie (2019) S3 Leitlinie Magenkarzinom, Kurzversion 2.0
19. Wittekind, C. (ed) (2020) TNM Klassifikation maligner Tumoren, Achte Auflage, korrigierter Nachdruck 2020 mit allen Ergänzungen der UICC aus den Jahren 2017 bis 2019. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
20. Jain, VK., Cunningham, D., Rao, S. (2011) Chemotherapy for operable gastric cancer: Current perspectives. *Indian journal of surgical oncology* 2(4):334–342. doi: 10.1007/s13193-012-0139-1
21. Becker, K., Langer, R., Reim, D. et al. (2011) Significance of histopathological tumor regression after neoadjuvant chemotherapy in gastric adenocarcinomas: A summary of 480 cases. *Ann Surg* 253(5):934–939. doi: 10.1097/SLA.0b013e318216f449
22. Al-Batran, S-E., Homann, N., Pauligk, C. et al. (2019) Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): A randomised, phase 2/3 trial. *Lancet* 393(10184):1948–1957. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32557-1
23. Lordick, F., Al-Batran, S-E., Arnold, D., Borner, M., et al. (2022) Magenkarzinom. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/magenkarzinom/@@guideline/html/index.html>
24. Möhler, M., Al-Batran, S-E., Andus, T. et al. (2011) S3-Leitlinie "Magenkarzinom" - Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs: German S3-guideline "Diagnosis and treatment of esophagogastric cancer". *Zeitschrift für Gastroenterologie* : offizielles Organ: Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Gastroenterologische Endoskopie, Österreichische Gesellschaft für Gastroenterologie und Hepatologie, Ungarische

- Gesellschaft für Gastroenterologie und Hepatologie 49(4):461–531. doi: 10.1055/s-0031-1273201
25. Herr, P., Hausmann, G., Basler, K. (2012) WNT secretion and signalling in human disease. *Trends Mol Med* 18(8):483–493. doi: 10.1016/j.molmed.2012.06.008
  26. Tran, FH., Zheng, JJ. (2017) Modulating the wnt signaling pathway with small molecules. *Protein Sci* 26(4):650–661. doi: 10.1002/pro.3122
  27. Duchartre, Y., Kim, Y-M., Kahn, M. (2016) The Wnt signaling pathway in cancer
  28. Baker, NE. (1987) Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in *Drosophila*: The spatial distribution of a transcript in embryos. *EMBO J* 6(6):1765–1773
  29. Mlodzik, M. (2002) Planar cell polarization: Do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends Genet* 18(11):564–571. doi: 10.1016/s0168-9525(02)02770-1
  30. Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., 3rd, and Nusse, R. (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423:448–452
  31. Niehrs, C., Acebron, SP. (2012) Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J* 31(12):2705–2713. doi: 10.1038/emboj.2012.124
  32. Molaei, F., Forghanifard, MM., Fahim, Y. et al. (2018) Molecular Signaling in Tumorigenesis of Gastric Cancer. *Iran Biomed J* 22(4):217–230. doi: 10.22034/ibj.22.4.217
  33. Janda, CY., Waghray, D., Levin, AM. et al. (2012) Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337(6090):59–64. doi: 10.1126/science.1222879
  34. Tauriello, DVF., Jordens, I., Kirchner, K. et al. (2012) Wnt/ $\beta$ -catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(14):E812–20. doi: 10.1073/pnas.1114802109
  35. Schwarz-Romond, T., Merrifield, C., Nichols, BJ. et al. (2005) The Wnt signalling effector Dishevelled forms dynamic protein assemblies rather than stable associations with cytoplasmic vesicles. *J Cell Sci* 118(Pt 22):5269–5277. doi: 10.1242/jcs.02646
  36. Taciak, B., Pruszyńska, I., Kiraga, L. et al. (2018) Wnt signaling pathway in development and cancer. <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.2.07>
  37. Cruciat, C-M., Niehrs, C. (2013) Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(3):a015081. doi: 10.1101/cshperspect.a015081
  38. Koo, B-K., van Es, JH., van den Born, M. et al. (2015) Porcupine inhibitor suppresses paracrine Wnt-driven growth of Rnf43; Znf3-mutant neoplasia. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508113112>

39. Carmon, KS., Gong, X, Lin, Q. et al. (2011) R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(28):11452–11457. doi: 10.1073/pnas.1106083108
40. Nusse, R., Clevers, H. (2017) Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169(6):985–999. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.016
41. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J. et al. (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16(13):3797–3804. doi: 10.1093/emboj/16.13.3797
42. Li, VSW., Ng, SS., Boersema, PJ. et al. (2012) Wnt signaling through inhibition of  $\beta$ -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 149(6):1245–1256. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.002
43. Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S. et al. (2014) YAP/TAZ incorporation in the  $\beta$ -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* 158(1):157–170. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.013
44. Tsukiyama, T., Fukui, A., Terai, S. et al. (2015) Molecular Role of RNF43 in Canonical and Noncanonical Wnt Signaling. *Mol Cell Biol* 35(11):2007–2023. doi: 10.1128/MCB.00159-15
45. Nojima, M., Suzuki, H., Toyota, M. et al. (2007) Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene* 26(32):4699–4713. doi: 10.1038/sj.onc.1210259
46. Chiurillo, MA. (2015) Role of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review. *World journal of experimental medicine* 5(2):84–102. doi: 10.5493/wjem.v5.i2.84
47. Ooi, CH., Ivanova, T., Wu, J. et al. (2009) Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000676>
48. Holm, B., Barsuhn, S., Behrens, H-M. et al. (2023) The tumor biological significance of RNF43 and LRP1B in gastric cancer is complex and context-dependent. *Sci Rep* 13(1):3191. doi: 10.1038/s41598-023-30294-8
49. Tu, J., Park, S., Yu, W. et al. (2019) The most common RNF43 mutant G659Vfs\*41 is fully functional in inhibiting Wnt signaling and unlikely to play a role in tumorigenesis. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54931-3>
50. Neumeyer, V., Vieth, M., Gerhard, M. et al. (2019) Mutated Rnf43 Aggravates Helicobacter Pylori-Induced Gastric Pathology. <https://doi.org/10.3390/cancers11030372>
51. Jiang, X., Hao, H-X., Gowney, JD. et al. (2013) Inactivating mutations of RNF43 confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(31):12649–12654. doi: 10.1073/pnas.1307218110

52. Niu, L., Qin, H-Z., Xi, H-Q. et al. (2015) RNF43 Inhibits Cancer Cell Proliferation and Could be a Potential Prognostic Factor for Human Gastric Carcinoma. <https://doi.org/10.1159/000430154>
53. Neumeyer, V., Grandl, M., Dietl, A. et al. (2019) Loss of endogenous RNF43 function enhances proliferation and tumour growth of intestinal and gastric cells. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy152>
54. Tate, JG., Bamford, S., Jubb, HC. et al. (2019) COSMIC: The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res* 47(D1):D941-D947. doi: 10.1093/nar/gky1015
55. Giannakis, M., Hodis, E., Jasmine, Mu. et al. (2014) RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nature Genetics* 46(12):1264–1266. doi: 10.1038/ng.3127.
56. Lau, W de., Peng, WC., Gros, P. et al. (2014) The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: Regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev* 28(4):305–316. doi: 10.1101/gad.235473.113.
57. Robert-Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V. (2019) Krebs in Deutschland 2015/2016
58. Röcken, C., Amallraja, A., Halske, C. et al. (2021) Multiscale heterogeneity in gastric adenocarcinoma evolution is an obstacle to precision medicine. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00975-y>
59. Warneke, VS., Behrens, H-M., Haag, J. et al. (2013) Members of the EpCAM signalling pathway are expressed in gastric cancer tissue and are correlated with patient prognosis. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.536>
60. Warneke, VS., Behrens, H-M., Böger, C. et al. (2013) Her2/neu testing in gastric cancer: Evaluating the risk of sampling errors. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds528>
61. Mathiak, M., Warneke, VS., Behrens, H-M. et al. (2017) Clinicopathologic Characteristics of Microsatellite Instable Gastric Carcinomas Revisited: Urgent Need for Standardization. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000264>
62. LAUREN, P. (1965) THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. <https://doi.org/10.1111/apm.1965.64.1.31>
63. Brierley, J., Gospodarowicz, MK., Wittekind, C. (eds) (2017) TNM classification of malignant tumours, Eighth edition. John Wiley & Sons Inc, Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ
64. Vision BioSystems Pty Ltd 2007 (ed) (2007) Bond-System Benutzerhandbuch Rev G01

65. Yamashita, S. (2007) Heat-induced antigen retrieval: Mechanisms and application to histochemistry. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 41(3):141–200. doi: 10.1016/j.proghi.2006.09.001
66. Schemper, M., Smith, T.L. (1996) A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Controlled Clinical Trials* 17(4):343–346. doi: 10.1016/0197-2456(96)00075-X
67. Wang, Z., Sun, P., Gao, C. et al. (2017) Down-regulation of LRP1B in colon cancer promoted the growth and migration of cancer cells. *Exp Cell Res* 357(1):1–8. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.04.010
68. Behrens, H-M., Warneke, V.S., Böger, C. et al. (2015) Reproducibility of Her2/neu scoring in gastric cancer and assessment of the 10% cut-off rule. <https://doi.org/10.1002/cam4.365>
69. Böger, C., Behrens, H-M., Mathiak, M. et al. (2016) PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8169>
70. Böger, C., Behrens, H-M., Röcken, C. (2016) Ki67--An unsuitable marker of gastric cancer prognosis unmasks intratumoral heterogeneity. <https://doi.org/10.1002/jso.24104>
71. Metzger, M-L., Behrens, H-M., Böger, C. et al. (2016) MET in gastric cancer--discarding a 10% cutoff rule. <https://doi.org/10.1111/his.12745>
72. Cosmic-Sanger (2021) COSMIC-Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>. Accessed 31 Oct 2021
73. Ebert, MPA., Yu. J., Hoffmann, J. et al. (2003) Loss of beta-catenin expression in metastatic gastric cancer. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.10.017>
74. Ascaño, J.J., Frierson, H., Moskaluk, C.A. et al. (2001) Inactivation of the E-cadherin gene in sporadic diffuse-type gastric cancer. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880416>



## 8 Anhang

### 8.1 Ethikvotum

<b>MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL</b>		<b>EINGEGANGEN</b> <b>12. AUG. 2020</b>	 <small>A.D. 1665</small>
<b>ETHIK-KOMMISSION</b>			
<small>Ethik-Kommission · Schwaneerweg 20 · 24105 Kiel</small> <b>Prof. Dr. med. Christoph Röcken</b> UKSH, Campus Kiel Institut für Pathologie Arnold-Heller-Straße 3, Haus U33 24105 Kiel		<small>Postadresse:          Arnold-Heller-Straße 3 / Haus U 27          D-24105 Kiel          Telefon: 04 31 / 500-14 191          Telefax: 04 31 / 500-14 195          ethikkomm@email.uni-kiel.de</small> <small>Datum: 10. August 2020</small>	
<b>AZ:</b> <b>Studienplan:</b>	<b>D 549/20 (bitte stets angeben)</b> <b>Exploitation of evolutionary trajectories in gastric cancer by multiregional sequencing</b> <small>Anschreiben und Projektbeschreibung v. 20.07.20; Basisformular v. 20.07.20</small>		
<b>Studienleiter lokal und Antragsteller:</b> <b>In Kooperation:</b> <b>Antrag vom:</b>	<b>Prof. Dr. Christoph Röcken, UKSH Kiel</b> <b>Prof. Dr. Jan-Hendrik Egberts, UKSH Kiel</b> <b>20. Juli 2020 (Eingang: 23. Juli 2020)</b>		

Sehr geehrter Herr Kollege Röcken,


wir bestätigen den Eingang des obengenannten Antrages zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.


**Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:**

1. Es wird darauf hingewiesen, dass Patientendaten für die Studie nur ausgewertet dürfen, wenn eine allgemeine Einwilligungserklärung zur Forschung mit routinemäßig erhobenen Patientendaten sowie Restmaterial unterschrieben wurde oder wenn vor der Weitergabe/Auswertung der Daten eine Anonymisierung erfolgt. Ist dies nicht der Fall, ist eine Verarbeitung der Patientendaten zu Forschungszwecken nur zulässig, wenn ein überwiegendes Forschungsinteresse besteht und der Forschungszweck nicht oder nur mit unverhältnismäßigem Aufwand auf andere Weise erreicht werden kann (Art. 89 Abs. 1 DSGVO i.V.m. § 13 Abs. 1 LDSG). Dies muss gegenüber der Ethik-Kommission dargelegt werden.
2. Es wird darauf hingewiesen, dass datenschutzrechtliche Aspekte grundsätzlich nur kurssorisch durch die Ethik-Kommissionen geprüft werden. Dieses Votum ersetzt nicht die Konsultation des zuständigen Datenschutzbeauftragten.
3. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
4. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Studienleiter.
5. Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass für eventuell in Zukunft teilnehmende Zentren eine berufsrechtliche Beratung bei der jeweils für sie zuständigen Ethik-Kommission erforderlich ist.
6. Gemäß Deklaration von Helsinki muss der Ethik-Kommission nach Studienende ein Abschlussbericht vorgelegt werden, der eine Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Studie enthält.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

  
 Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn  
 Vorsitzender der Ethik-Kommission

  
 Dr. med. Christine Glinicke  
 Geschäftsführung der Ethik-Kommission

## 8.2 Publikationen

- 09.06.2022      Vortrag: 105. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., Münster: The expression and biological effect of RNF43 and LRP1B in gastric cancer is context-dependent.
- 23.02.2023      Artikel: The tumor biological significance of RNF43 and LRP1B in gastric cancer is complex and context-dependent.
- Holm, B.**, Barsuhn, S., Behrens, HM., Krüger, S., Röcken, C. Scientific Reports (2023) 13:3191

### 8.3 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Christoph Röcken, Direktor und Leiter des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Herr Professor Röcken stellte mir das Thema dieser Arbeit zur Verfügung und ermöglichte mir hervorragende Arbeitsbedingungen in seinen Laboratorien. Seine engagierte wissenschaftliche Betreuung und ermutigende Unterstützung haben mich sowohl während der praktischen als auch während der theoretisch-schriftlichen Phase dieser Arbeit stets begleitet.

Für Rat und Tat im Labor möchte ich Frau Sandra Krüger sowie Frau Maren Dirks herzlich danken, beide waren mir während der immunhistochemischen Färbevorgänge eine große Unterstützung. Ferner danke ich Herrn Dr. rer. medic. Hans-Michael Behrens für die geduldige und motivierende Unterstützung bei der statistischen Arbeit sowie der anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei allen denjenigen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben:

Ein ganz besonderer Dank gilt dabei meinem Bruder, B.A. Finn Holm, für die zahlreichen anregenden Diskussionen. Er war mir während der gesamten Zeit, in der ich mich mit der vorliegenden Arbeit beschäftigt habe, eine große moralische und fachliche Stütze. Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, Herrn Matthias Holm und Frau Andrea Holm, von ganzem Herzen bedanken. Sie standen mir während der Anfertigung der Doktorarbeit immer liebevoll und unterstützend zur Seite und haben mir durch ihren Rückhalt den nötigen Freiraum für meine Arbeit gegeben.

## 9 Erklärung

Bente Holm  
Dorfstraße 19  
24594 Nindorf

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

-----

Datum, Ort

-----

Unterschrift