

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

**Untersuchung der potentiellen tumorbiologischen Bedeutung von Piccolo beim
Magenkarzinom**

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

Vorgelegt von
Maximilian Bernhardt (geb. Müller)
aus Hamburg

Kiel 2023

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thilo Wedel, Anatomisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2025

Gewidmet meinen Kindern

Amber Marie

Mira Amelia

Jula Katharina

Nuriel Klaus

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Magenkarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie Weltweit	1
1.1.2 Epidemiologie in Deutschland.....	2
1.2 Ätiologie und Pathogenese des Magenkarzinoms	2
1.2.1 Morphologie.....	3
1.3 Helicobacter Pylori	3
1.3.1 Virulenzfaktoren.....	3
1.3.2 Effekte auf die Stammzellen der Magenschleimhaut	4
1.3.3 Eisenhaushalt und Helicobacter pylori.....	5
1.4 Umwelteinflüsse und Lebensführung	5
1.5 Genetische Prädispositionen.....	6
1.6 Weitere Faktoren	6
2. Pathologie des Magenkarzinoms	7
2.1. Klassifikationen	7
2.1.1.1. TNM-Klassifikation	7
2.2. Therapie und Prognose	10
2.2.1. Therapie des Magenfrühkarzinoms.....	10
2.2.2. Chirurgische und multimodale Therapie von resektablen Magenkarzinomen.....	11
2.2.3 Zielgerichtete Therapien beim Magenkarzinom.....	12
3. PCLO: piccolo presynaptic cytomatrix protein	14
4. Fragestellung	15
5. Material und Methoden.....	16
5.1. Ethikvotum	16
5.2. Studienkollektiv.....	16
5.3. Klinisch-pathologische Charakteristika und Infektionsstatus.....	17
5.4. Geräte.....	17
5.5. Chemikalien und Reagenzien	18
5.6. Antikörper	18
5.7. Verbrauchsmaterialien.....	18
5.8. Software	18
5.9. Histologie.....	19

5.9.1.	Immunhistochemische Färbung von Ganzgewebeschnitten	19
5.9.2.	Durchführung der immunhistochemischen Färbung	19
5.9.3.	Auswertung der immunhistologischen Färbung	19
5.10.	Maßnahmen zur Ergebnisvalidierung	21
5.11.	Statistische Auswertung	22
6.	Ergebnisse	24
6.1	Immunhistochemischer Nachweis von Piccolo im Magenkarzinom	24
6.1.1	Korrelation mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika	25
6.2	Überlebenszeitanalyse	25
6.3	Genotyp-Phänotyp-Korrelation	27
7	Diskussion	29
7.1	Piccolo ist heterogen im Magenkarzinom exprimiert	29
7.2	Piccolo ist möglicherweise ein Tumorsuppressor	30
7.3	Molekularpathologische Aspekte von Piccolo	31
7.4	Tumorbiologische Relevanz von Piccolo	32
7.5	Limitationen	33
7.6	Diskussion der Methoden - Immunhistochemie	33
8.	Zusammenfassung	34
	Literaturverzeichnis	36
	Publikationen	41
	Erklärung	42
	Danksagung	43

Abkürzungsverzeichnis

AEG	Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs 2
AJCC	American Joint Committee on Cancer 7
AVAGAST	Avastin in Gastric Cancer Trial 12
BMI	Body Mass Index 6
CagA	Cytotoxin-associated gene A 3
CDH1	Cadherin-1 5
CIN	Chromosomal instabiler Subtyp Magenkarzinom 10
DNA	Desoxyribonukleinsäure 5
EBV	Ebstein-Barr-Virus 10
EGFR	Endothelial growth factor receptor 14
ESCC	Esophageus square cell carcinoma 26
ESD	Endoskopische Submukosadisektion 10
GS	Genomisch stabiler Subtyp Magenkarzinom 10
H. pylori	Helicobacter pylori 3
HE	Hämatoxylin und Eosin 17
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2 12
IHC	Immunhistochemischer Score 18
JAK2	Janus-Kinase 2 11
kDa	Kilo Dalton 13
LGR5	Leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor 5 4
miRNAs	Micro ribonucleinacids 29
MSI	Mikrosatelliten-instabiler Subtyp Magenkarzinom 10
PCH3	Pontocerebellären Hypoplasie Typ III 13
PCLO	Piccolo presynaptic cytomatrix protein 13
PD-L1	Programmed death-ligand 1 11
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat 13
siRNAs	Small interfering ribonukleinacids 29
SNP	Single nucleotide polymorphism 14
TCGA	The Cancer Genome Atlas 11
TNM	Tumor (T), Nodes (N), Metastasen (M) 7
ToGA	Trastuzumab for Gastric Cancer 12
UICC	Union for International Cancer Control 7
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein 15
VacA	Vakuolisierendes Cytotoxin A 3
VEGF-A	vascular endothelial growth factor-A 12
WES	Whole Exome Sequencing 24
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Algorithmus für die Primärtherapie.....	10
Abbildung 2: Hauptmerkmale der Subtypen des Magenkarzinoms.....	12
Abbildung 3: Referenzschnitte.....	20
Abbildung 4: Nachweis von PCLO in Muskel- und Nervenzellen.....	21
Abbildung 5: Immunreaktion von Stroma und Gefäßen.....	25
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve zum gesamtüberleben und tumorspezifischen Überleben.....	26
Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms.....	8
Tabelle 2: UICC-Stadien des Magenkarzinoms.....	9
Tabelle 3: Korrelation des Nachweises von PCLO mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika....	23
Tabelle 4: Korrelation von Genotyp und Phänotyp.....	27

1. Einleitung

Krebs ist eine der weltweit führenden Todesursachen. Nach Schätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist Krebs in 91 von 172 Ländern der Welt Hauptgrund für das Versterben vor dem 70. Lebensjahr. Die Inzidenz und Mortalität von Krebs steigen weltweit an. Die Ursachen dafür sind vielfältig, jedoch spielen das steigende Lebensalter und die allgemein wachsende Bevölkerung eine wichtige Rolle. Die sozioökonomische Entwicklung in den Ländern der Welt verursacht eine dynamische Entwicklung in der Prävalenz von Krebs, ebenso wie eine Verteilung der Hauptrisikofaktoren.

1.1 Das Magenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie Weltweit

Das Magenkarzinom nimmt weltweit den 5. Platz unter allen Krebsneuerkrankungen ein, im Jahr 2018 waren es über eine Million neuerkrankte Menschen. Die Mortalität des Magenkarzinoms ist seit Jahren rückläufig.¹ Einer von 12 Todesfällen geht auf das Magenkarzinom zurück, das entspricht geschätzt 783.000 Todesfällen. Damit ist es der dritthäufigste Grund einer krebsbedingten Todesursache, nach Lungen- und kolorektalen Karzinomen.² In einigen Regionen der Welt ist es sogar *die* häufigste Krebstodesursache, darunter im Iran, Turkmenistan, Kirgistan und weiteren westasiatischen Regionen. Im ostasiatischen Raum steigt die Inzidenz deutlich an, darunter in der Mongolei, Japan und Südkorea. Mehr als die Hälfte der weltweiten Fälle des Magenkarzinoms entfallen auf Ost-Asien.³ Die Neuerkrankungsraten in Amerika und Nordeuropa sind tendenziell leicht rückläufig. Hochentwickelte Länder und Entwicklungs-/Schwellenländer zeigen eine deutliche Diskrepanz in der Inzidenz des Magenkarzinoms. Die altersstandardisierte Erkrankungsrate pro 100.000 männlicher Einwohner liegt in Entwicklungs-/Schwellenländern bei 6,6 während sie sich in hochentwickelten Ländern auf 20,0 mehr als verdreifacht. Der Unterschied in der Mortalität ist etwas weniger ausgeprägt, hier gibt die WHO für die männliche Bevölkerung 5,9 pro 100.000 in Entwicklungs-/Schwellenländern an, in hochentwickelten Ländern 14,3. Bei der weiblichen Bevölkerung zeigt sich ein ähnlicher Trend. Die Inzidenz wird hier mit 3,6 für Entwicklungs-/Schwellenländer und 8,6 für hochentwickelte Länder angegeben. Die Mortalität beträgt 3,2 pro 100.000 weibliche Einwohner in Entwicklungs-/Schwellenländern, etwa das doppelte (6,1) in hochentwickelten Ländern. Im Kontinentalvergleich des Magenkarzinoms liegt Westeuropa etwa im Mittelfeld mit einer Inzidenz von 8,2 (Männlich) bzw. 3,7 (Weiblich) pro 100.000 Einwohner. Die

höchste Inzidenz verzeichnet Ostasien mit 32,1 erkrankten Männern bzw. 13,2 erkrankten Frauen pro 100.000 Einwohner. Spitzenreiter der Länder ist hier Südkorea. Hier wird ein weiterer Anstieg der Inzidenz vorausgesagt. Grund dafür ist unter anderem das schnelle Altern der dortigen Population.⁴ Durchweg die niedrigste Inzidenz des Magenkarzinoms erreicht der afrikanische Kontinent, hier steigt die Erkrankungsrate nicht über 5,4 pro 100.000 Einwohner.

1.1.2 Epidemiologie in Deutschland

In Deutschland erkrankten im Jahr 2018 9.202 Männer und 5.560 Frauen am Magenkarzinom. Das entspricht einer Erkrankungsrate von 14,8 je 100.000 Personen bei Männern und 6,8 je 100.000 Personen bei den Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter lag 2018 bei 71 Jahren bei Männern, Frauen erkrankten durchschnittlich fünf Lebensjahre später. Die relative 5-Jahres Überlebensrate lag 2018 bei nur 34% (Männer) bzw. 37% (Frauen). Nach 10 Jahren reduziert sich die Zahl weiter auf 30% (Männer) bzw. 33% (Frauen). Damit sind die Überlebensaussichten im Vergleich zu anderen malignen Neuerkrankungen eher ungünstig, wenngleich sich die Gesamtüberlebenszeit für das Magenkarzinom in letzter Zeit etwas verbessert hat. Die späte Diagnose des Magenkarzinoms trägt wesentlich zur ungünstigen Prognose bei. Etwa 40% der Fälle werden erst im UICC-Stadium IV diagnostiziert und sind damit schon metastasiert.⁵

1.2 Ätiologie und Pathogenese des Magenkarzinoms

Die Ätiologie des Magenkarzinoms ist vielschichtig und beinhaltet genetische und epigenetische Alterationen von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen, DNA-Reparaturmechanismen, Zellzyklus-Regulationsmechanismen und Signalmolekülen.⁶ Auch wenn das Magenkarzinom oft als eine singuläre Tumorentität beschrieben wird, stecken anatomisch und ätiopathogenetisch eigentlich zwei Tumorarten dahinter, das Karzinom der gastroösophagealen Übergangszone und das distale Magenkarzinom (non-Kardia-Karzinom). Die Inzidenz des non-Kardia-Karzinoms ist rückläufig, was durch den allgemein gestiegenen sozioökonomischen Status in Deutschland, die rückläufige Verbreitung von *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) sowie höhere Standards bei der Lebensmittellagerung und -verarbeitung begründet ist.⁷ Die Adenokarzinome der gastroösophagealen Übergangszone (Kardia und distaler Ösophagus) nehmen weltweit zu, insbesondere in den westlichen Wohlstandsländern. Dabei sind die Tumoren des Ösophagus (AEG I) von denen der Kardia und des proximalen Magens (AEG II und III) zu unterscheiden. Die AEG I-Tumoren haben als Risikofaktoren vor allem Übergewicht, Rauchen und chronischen Säurereflux. Die Metaplasie des orthotopen Plattenepithels zu einem Zylinderepithel führt zur präneoplastischen Barrett-Mukosa. Das Risiko für die Entstehung eines Karzinoms hieraus wurde jedoch lange Zeit überschätzt. Die Karzinogenese der

Adenokarzinome, die nicht aus einer Barretttschleimhaut hervorgehen, erfolgt in Analogie zu den Karzinomen des übrigen Verdauungstrakts sequenziell in mehrstufigen Prozessen über präkanzeröse Zwischenstufen. Die Entwicklung eines Magenkarzinoms erfolgt schrittweise und wurde von Correa wie folgt zusammengefasst: Die histopathologischen Veränderungen der Schleimhaut beginnen bei einer chronisch-atrophischen Gastritis mit Verlust der parietalen Zellmasse. Es folgt eine intestinale Metaplasie und Dysplasie, die möglicherweise in einem Karzinom endet.^{6,8}

1.2.1 Morphologie

Im histologischen Bild finden sich unterschiedlich starke granulozytäre und lymphoplasmazelluläre Infiltrate zumeist in der oberflächlichen Mukosa. Auch Lymphfollikel in den basalen Anteilen der Mukosa sind typisch. Es finden sich simultan Zeichen eines aktiven (Granulozyten) und eines chronischen Entzündungsprozesses (Lymphozyten, Plasmazellen, Lymphfollikel). Aus diesem Grund spricht man von einer chronisch-aktiven Gastritis.¹² Die beschriebenen Veränderungen finden sich vornehmlich im Antrum (Antrumgastritis), selten ist überwiegend das Korpus betroffen (korpusprädominante *H. pylori*-Gastritis). Letztere birgt ein höheres Risiko der malignen Entartung.¹²

1.3 *Helicobacter pylori*

Die Besiedlung der Magenschleimhaut durch *H. pylori* gilt weltweit als einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Magenkarzinoms. *H. pylori* ist ein gramnegatives Stäbchenbakterium, das den Magen besiedelt und zu einer chronischen Entzündung der Magenschleimhaut führen kann. *H. pylori* wird seit 1994 von der WHO als Klasse I Karzinogen eingestuft.⁹ Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung gilt als infiziert mit *H. pylori*.⁶ Besonders verbreitet ist die Infektion in Entwicklungsländern sowie Regionen mit einem niedrigen sozioökonomischen Status.¹⁰

Das Bakterium *H. pylori* scheint dabei das Karzinom nicht direkt zu verursachen, sondern beschleunigt nur seine Entstehung. Jedoch ist die Krebserkrankung ohne *H. pylori*-Infektion deutlich unwahrscheinlicher. Die Entstehung eines Karzinoms läuft also nicht im Sinne einer Kausalkette mit *H. pylori* als determinierenden Auslöser ab, sondern als komplexes Zusammenspiel.¹¹

1.3.1 Virulenzfaktoren

Durch seine Fähigkeiten Motilität, Chemotaxis, Ureaseproduktion und Weitere schafft sich *H. pylori* eine beschützte Nische in Nähe der Epithelzelloberfläche. Diese Nähe zum Epithel ermöglicht *H. pylori* in die Erkennung und Regulierung der mucosalen Immunabwehr einzugreifen. *H. pylori* interagiert mit dem Epithel und moduliert die Aktivität des Immunsystems und inflammatorische

Antwort durch bakterielle Botenstoffe zu seinen Gunsten. Die beiden wichtigsten bakteriellen Faktoren, die eine Krebsentstehung begünstigen, sind CagA und bestimmte Allele des Toxins VacA.¹³ Diese Interaktion bestimmt auch das Risiko der Karzinomentstehung. Bakterienstämme, welche den Virulenzfaktor *Cag* enthalten, erhöhen das Karzinomrisiko. Ebenso wird das Risiko von Polymorphismen in Genen beeinflusst, die inflammatorische Zytokine kodieren.¹⁴ Die Kombination eines Hochrisiko-assoziierten Wirtsgenoms und Karzinom-begünstigenden *VacA* Allelen bzw. *Cag* Virulenzfaktoren im Bakteriengenom kann das Magenkarzinomrisiko bis auf das 87-Fache erhöhen.¹⁵ CagA hat vielfältige Effekte auf die Epithelzelle. Diese beinhalten weitestgehend eine Stimulation der Zellproliferation über mitotische Signalwege. Weiterhin reduziert CagA die Apoptose durch Unterdrückung von Tumorsuppressorgen wie p53.¹⁶ Die Zellpolarität und der Zell-Zell-Kontakt werden gestört. Zusätzlich zur direkten Auswirkung auf die Epithelzelle wirkt CagA proinflammatorisch. Eine chronische Entzündung fördert ebenfalls die Karzinomentstehung. CagA wurde als bakterielles Onkogen definiert.¹⁷

VacA ist definiert als Poren-formendes Cytotoxin.¹⁸ Die Poren funktionieren als selektive Anionenkanäle und haben unter anderem den Effekt, die Permeabilität der Plasmamembran zu verändern, und durch eine parazelluläre Leckage die Mitochondrien zu verletzen.¹⁹ Durch die Störung der mitochondrialen Integrität wird in vielen Zellen die Apoptose eingeleitet. Zusätzlich zu seiner zytotoxischen Eigenschaft ist VacA ein starkes Immunsuppressant. Alle *H. pylori*-Stämme enthalten *VacA*-Gene, jedoch gibt es verschiedene Allele, welche das Ausmaß der Aktivität bestimmen.

1.3.2 Effekte auf die Stammzellen der Magenschleimhaut

Die Infektion mit *H. pylori* und die inflammatorische Antwort des Körpers führen zur vermehrten Zellteilung und möglicherweise zur Entartung. Der inflammatorische Einfluss der Infektion verursacht eine De-Differenzierung von Epithelzellen in langlebige, replizierende Zellen. Mesenchymale Stammzellen werden durch den Gewebeschaden rekrutiert und zur erhöhten Zellteilung angeregt.²⁰ Erste Studien konnten zeigen, dass *H. pylori* mit Progenitorzellen interagiert und von ihnen internalisiert werden kann. Das könnte bedeuten, dass adulte Stammzellen als schützende Nische für *H. pylori* fungieren.²¹ Im Mausmodell konnten LGR5⁺ Stammzellen markiert und der Effekt von *H. pylori* auf diese Zellen beobachtet werden.²² Es konnte gezeigt werden, dass nach nur zweiwöchiger Infektion, und noch vor dem Auftreten einer Gastritis, *H. pylori* die antralen LGR5⁺ Stammzellen aktiviert hat. Nach zwei Monaten der Infektion hatte sich die Zahl der Stammzellen bereits verdoppelt.²³ Das onkogene Potential von *H. pylori* ist also damit verbunden, dass *H. pylori* sich in den Magendrüssen, nahe der Vorläufer- und Stammzellen, ansiedelt. Dort findet es Schutz und beeinflusst die Zellen zu seinem Vorteil.

1.3.3 Eisenhaushalt und Helicobacter pylori

Klinische Beobachtungen haben gezeigt, dass eine H. pylori-Infektion mit einer Eisenmangelanämie assoziiert ist.²⁴ Weiterhin wurde beobachtet, dass laborchemische Marker eines Eisenmangels mit einem erhöhten Risiko für ein Magenkarzinom einhergehen.²⁵ H. pylori hat verschiedene Mechanismen entwickelt, um sein zum Überleben benötigtes Eisen vom Wirt zu akquirieren. Studien, welche diese Beobachtungen verfolgt haben konnten zeigen, dass eine Korrelation zwischen der Virulenz von H. pylori, dem Risiko eines Magenkarzinoms und Eisenmangel besteht.^{25,26}

1.4 Umwelteinflüsse und Lebensführung

Für Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes spielt die Ernährung eines Menschen eine wichtige Rolle. Die Entstehung eines Karzinoms kann durch die regelmäßige Aufnahme stark gesalzener oder gepökelter Lebensmittel erhöht werden.^{10,20,27,28} Jedoch verursacht eine salzreiche Ernährung alleine noch kein Magenkarzinom, durch eine salzreiche Diät wird lediglich der kanzerogene Effekt von H. pylori potenziert.²⁹ Die Aufnahme von großen Mengen Kochsalz (>6 Gramm pro Tag³⁰) mit der Nahrung wirkt vermutlich stimulierend auf das Wachstum der Magenschleimhaut. Das führt zur atrophischen Gastritis, erhöhten DNA-Synthese und Zellproliferation. Auf Basis dieser Veränderungen wird die Krebsentstehung begünstigt.³¹ Auch Tabakrauch enthält eine Reihe karzinogener Substanzen und trägt dadurch zur Krebsentstehung bei.¹⁰ Insbesondere das enthaltene Nikotin fördert die Proliferation von Magenkarzinomzellen und beschleunigt so das Tumorstadium.³² Der übermäßige Genuss von alkoholischen Getränken ist ein weiterer Risikofaktor.^{31,33,34} Der toxische Effekt von Äthanol und seiner Metabolite fördert eine chronische Entzündung der Magenschleimhaut und schafft so ein förderliches Milieu für die Krebsentstehung.^{35,32} Es gibt jedoch auch Hinweise, dass eine bewusste Ernährung das Risiko an einem Magenkarzinom zu erkranken senken kann. Als Beispiele für protektive Lebensmittel sind etwa Zitrusfrüchte, grüner Tee oder Kreuzblüter (z.B. Brokkoli) relevant.¹⁰ Generell kann eine Ernährung, die reich an Obst- und Gemüse ist, u.a. durch das enthaltene Vitamin C, einer Karzinomentstehung entgegen wirken.^{9,36} Weiterhin wird die chemopräventive Einnahme von Curcumin untersucht. Curcumin, ein Polyphenol der Kurkumawurzel, konnte schon als protektives Nahrungsmittel bei anderen Krebsarten validiert werden.³⁷ Hier konnte ein Versuch mit Ratten eine Senkung der Inzidenz vom Magenkarzinom um bis zu 50% zeigen.³⁸

1.5 Genetische Prädispositionen

Circa 8-10% aller Magenkarzinome weisen eine familiäre Häufung auf und sind entweder hereditäre oder familiäre Magenkarzinome.³² Beim hereditären diffusen Magenkarzinom handelt es sich um ein autosomal-dominant vererbtes Tumorsyndrom mit 70–80%iger Penetranz.³⁹ Vom hereditären diffusen Magenkarzinom betroffene Patienten haben bei Diagnosestellung ein durchschnittliches Alter von 40 Jahren. Sie weisen in 25-40% der Fälle eine Keimbahnmutation im *CDH1*-Gen auf. Dieses Gen codiert für E-Cadherin, ein Transmembranprotein, welches eine Schlüsselfunktion in der Zelladhäsion und in der Signaltransduktion einnimmt. Auch die Zellpolarität und Motilität wird durch die Mutation beeinflusst.³² Dies wiederum begründet den diffus infiltrativen Charakter und die Metastasierungsneigung der hereditären Magenkarzinome vom diffusen Typ. Von den hereditären Magenkarzinomen sind familiär gehäuft auftretende Magenkarzinome zu unterscheiden. Letztere entstehen als Summe der Zusammenkunft unterschiedlicher Risikofaktoren. Durch den multifaktoriellen Charakter der Krebsentstehung ist es möglich, dass Genpolymorphismen im Zusammenwirken mit Umwelt- und genetischen Faktoren die Sensivität eines Organismus für die Erkrankung bestimmen. Bisher konnte eine Verbindung zwischen genetischen Polymorphismen in Zytokinen und der Inzidenz des Magenkarzinoms bewiesen werden. Eine Metaanalyse zeigte die Korrelation zwischen präkanzerösen Läsionen und genetischen Polymorphismen in Zytokinen, beispielsweise im *IL1RN VNTR* Gen.⁴⁰

1.6 Weitere Faktoren

Die Entstehung eines Magenkarzinoms scheint noch durch weitere Faktoren begünstigt zu werden, beispielsweise die Magenteilresektion oder die duodenogastroösophageale Refluxkrankheit.⁹ Eine Metaanalyse von Studien ergab, dass es einen Zusammenhang zwischen Übergewicht und der Entstehung eines Magenkarzinoms gibt. Adipositas mit einem BMI von mindestens 25 erhöht das Risiko, an einem Magenkarzinom zu erkranken. Dabei steigt das Erkrankungsrisiko mit steigendem BMI weiter an.⁴¹ Ist ein Verwandter 1. Grades an einem Magenkarzinom erkrankt, steigt das individuelle Risiko ebenfalls an.⁴² Tritt das Magenkarzinom in der Familienanamnese gehäuft auf, so ist auch das eigene Risiko signifikant erhöht.⁴³ Das Rauchen von Opium und seinen Zubereitungen erhöht vor allem im Nahen Osten das Risiko für ein Magenkarzinom.⁴³ Als weiterer Risikofaktor kann die berufsbedingte Exposition zu Karzinogenen relevant sein. Hier ist vor allem der Kontakt zu Nitraten, ionisierender Strahlung, Chromverbindungen oder kristalliner Kieselsäure von Bedeutung.^{32,44,45}

Das Risiko eines Nonkardia-Adenokarzinoms des Magens bei Menschen mit Blutgruppen A und AB ist signifikant höher im Vergleich zu Blutgruppe O. Das Risiko eines Kardial-Adenokarzinoms ist hingegen nicht erhöht.⁴⁶

2. Pathologie des Magenkarzinoms

2.1. Klassifikationen

Histologisch handelt es sich bei dem weitaus größten Teil der Karzinome des Magens um Adenokarzinome, die gemäß der am weitesten verbreiteten histologischen Klassifikation von Laurén weiter unterteilt werden in den intestinalen, der ca. 54% der Adenokarzinome ausmacht, den diffusen (ca. 32%), den gemischten und den unbestimmten Typ (ca. 15%).⁴⁷ Das Magenkarzinom vom intestinalen Typ ist eher gut differenziert. Es betrifft häufiger Männer, ältere Menschen in Hochrisikogebieten und Afroamerikaner. Der intestinale Typ besteht aus kohäsiv wachsenden Tumorzellen, bildet Drüsen-ähnliche tubuläre Strukturen und ulzeriert häufig. Die Prognose des intestinalen Typs ist eher gut.

Das Magenkarzinom vom diffusen Typ hat eine eher schlechte Prognose. Es betrifft häufiger Frauen, junge Menschen, ist assoziiert mit der Blutgruppe A und indiziert eine genetische Suszeptibilität. Es ist in der Regel schlecht differenziert und makroskopisch u.a. charakterisiert durch eine Verdickung der Magenwand. Diese imponiert als lederartige Oberfläche (sog. *Linitis plastica* oder Feldflaschenmagen). Die neoplastischen Zellen sind diffus verteilt und formen keinen kompakten, kohäsiven Tumorzellverband.⁶

Die von der WHO veröffentlichte Klassifikation unterscheidet sich von der Laurén-Klassifikation und unterteilt die Adenokarzinome des Magens in den tubulären, papillären, muzinösen und gering kohäsiv wachsenden Typ (einschließlich des Siegelringzellkarzinoms). Die vorliegende Arbeit beschränkt sich weitestgehend auf die Betrachtung des Magenkarzinoms entsprechend der Klassifikation nach Laurén.

2.1.1. TNM-Klassifikation

Die Klassifikation der Ausdehnung des Primärtumors und der Metastasierung erfolgt auf der Basis der UICC/AJCC-TNM Kriterien.^{48,49} Seit dem 1. Januar 2017 gilt die 8. Auflage und ist in Tabelle 1 und 2 zusammengefasst.^{50,51}

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms^{48,49}

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

Tabelle 2: UICC-Stadien des Magenkarzinoms. Entsprechend der 8. Auflage TNM: Klassifikation maligner Tumoren.^{48,49} Für eine Erläuterung der Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

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

3. Therapie und Prognose

Die Therapie des Magenkarzinoms sollte in einem qualifizierten multidisziplinären Tumorboard geplant werden. Die Behandlung erfolgt Stadien-adaptiert. Ein Therapiealgorithmus für die Erstlinientherapie ist in Abbildung 1 (unten) dargestellt.

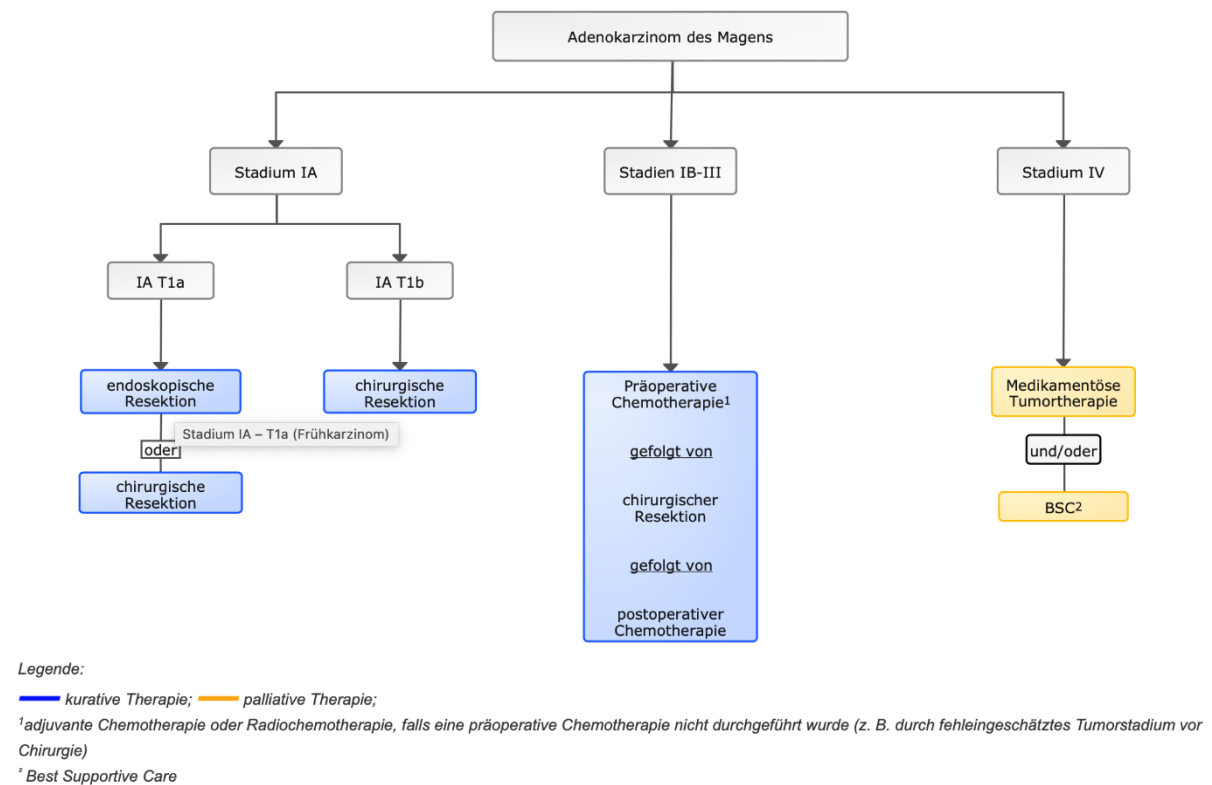


Abbildung 1: Algorithmus für die Primärtherapie.

Übernommen von Onkopedia.de, zuletzt abgerufen am 12.01.2022,

<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/magenkarzinom/@@guideline/html/index.html>

Die chirurgische Behandlung ist ein integraler Bestandteil der Magenkarzinom-Therapie. Das Ausmaß der chirurgischen Intervention ist dabei vom präoperativen Tumorstadium abhängig. In einem sehr frühen Stadium ist möglicherweise die endoskopische Abtragung der Mucosa ausreichend, sofern der Tumor auf diese Struktur limitiert und gut differenziert ist. In Deutschland sollte das Magenkarzinom nach den Richtlinien der S3-Leitlinie „Magenkarzinom“ therapiert werden. Aktuell ist die Version vom August 2019.

3.1. Therapie des Magenfrühkarzinoms

Da die Wahrscheinlichkeit einer Lymphknotenmetastasierung beim mukosalen Magenkarzinom (T1a) sehr gering ist, kann eine endoskopische Resektion (ER) als ausreichend angesehen werden.⁵² Falls

die histopathologische Aufarbeitung nach endoskopischer Resektion ergibt, dass die Tumorinfiltration bis in die Submukosa reicht (T1b), soll eine chirurgische Resektion mit systematischer Lymphadenektomie erfolgen, da dann in bis zu 30% der Fälle bereits Lymphknotenmetastasen vorliegen. Entsprechend der S3-Leitlinie (2019) sollen intraepitheliale Neoplasien jeglicher Größe sowie Magenfrühkarzinome, die alle vier folgenden Kriterien erfüllen, endoskopisch en-bloc reseziert werden: < 2cm Durchmesser, nicht ulzeriert, Mukosakarzinom und intestinaler Typ bzw. histologischer Differenzierungsgrad gut oder mäßig (G1/G2).⁵³

Magenfrühkarzinome mit maximal einem „erweiterten Kriterium“ können endoskopisch kurativ reseziert werden. Zur Resektion soll die ESD eingesetzt werden. Liegt mehr als ein erweitertes Kriterium vor, soll eine onkologisch-chirurgische Nachresektion erfolgen. Dabei sind die erweiterten Kriterien wie folgt definiert: differenziertes Mukosakarzinom (G1/2) ohne Ulceration und Größe > 2 cm, differenziertes Mukosakarzinom mit Ulceration und Größe <3cm, gut differenzierte Karzinome mit Submukosainvasion <500µm und Größe <3cm und undifferenziertes Mukosakarzinom <2cm Durchmesser, sofern bioptisch kein Nachweis von Tumorzellen im Abstand ≤1cm besteht.

Da einige Kriterien (Grading, Submukosainvasion) erst nach genauer histopathologischer Diagnose vorliegen, kann die endoskopische Resektion zunächst unter diagnostischen Aspekten durchgeführt werden. Hierbei ist jedoch darauf zu achten, dass dies mit dem Ziel einer en-bloc R0-Resektion erfolgen soll (*Modifiziert aus „S3 Leitlinie Magenkarzinom, Version 2.0, August 2019, S. 75 ff.“*).

3.1.1. Chirurgische und multimodale Therapie von resektablen Magenkarzinomen

Die chirurgische Resektion stellt bislang die einzige Möglichkeit zur kurativen Behandlung und damit die Standardtherapie für alle potentiell resektablen Magenkarzinome dar. Eine Ausnahme stellen die endoskopisch kurativ resezierbaren Frühkarzinome dar. Generell scheint die Gabe von Chemotherapeutika begleitend zur chirurgischen Operation einen deutlichen Vorteil zu bringen, wobei im globalen Vergleich unterschiedliche Schemata angewendet werden. Studien konnten einen Überlebensvorteil für eine adjuvante Radiochemotherapie oder Chemotherapie zeigen, während für eine alleinige adjuvante Radiatio kein Überlebensvorteil gezeigt werden konnte.⁵⁴ Eine präoperative Radiochemotherapie oder präoperative Antikörper-Therapie ist in Deutschland nur innerhalb von klinischen Studien empfohlen.⁵³ Dem multimodalen Therapieansatz zum Trotz ist das Outcome der Patienten nach wie vor eher ungünstig. Die Ursache dafür sind möglicherweise mikroskopische loco-regionäre- oder Fernmetastasen, die zum Zeitpunkt der Behandlung noch nicht erkannt waren.⁵⁵

3.1.2. Zielgerichtete Therapien beim Magenkarzinom

Die molekulare Phänotypisierung von Tumoren rückt immer weiter in den Fokus der Diagnostik, da damit die Hoffnung zielgerichteter Therapien verbunden ist.⁶ Die vom „The Cancer Genome Atlas (TCGA)“ veröffentlichten Studienergebnisse zum Magenkarzinom haben auf der Grundlage umfassender Untersuchungen des Genoms, Transkriptoms, Epigenoms und Proteoms vier Subtypen vorgeschlagen: das chromosomal instabile (CIN), das Epstein-Barr-Virus (EBV)-assoziierte, das mikrosatelliteninstabile (MSI) und das genomisch stabile (GS) Magenkarzinom.

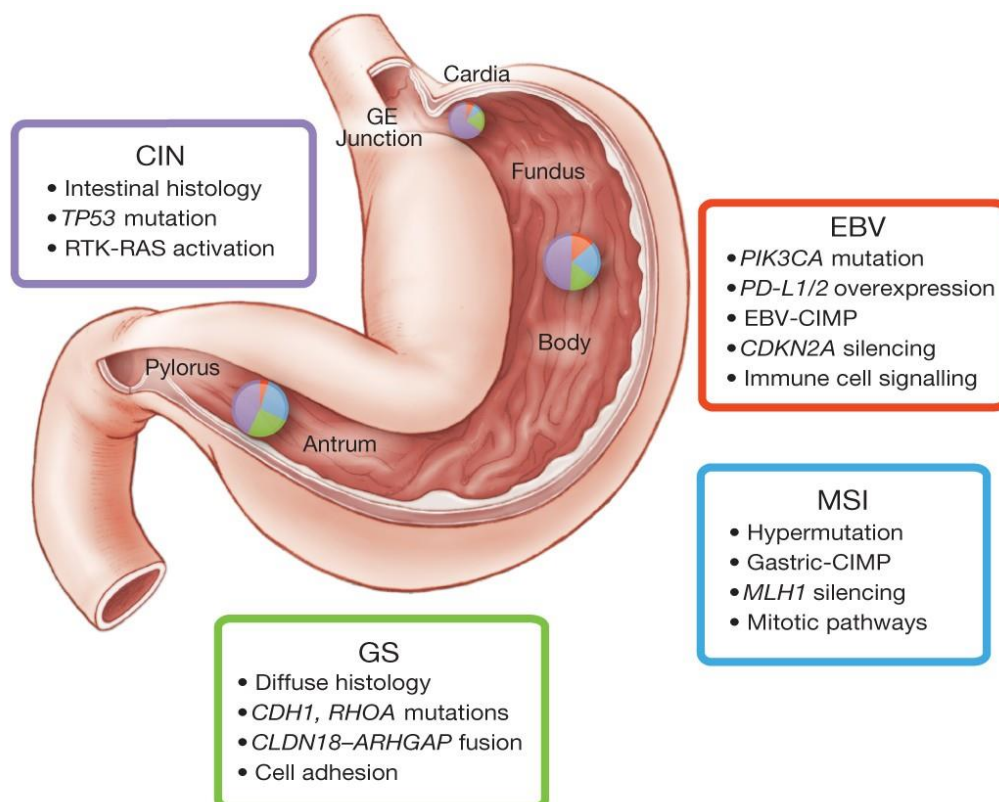


Abbildung 2: Hauptmerkmale der Subtypen des Magenkarzinoms. Unverändert übernommen aus The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. Nature 513, 202–209 (2014). <https://doi.org/10.1038/nature13480>. Die Arbeit ist lizenziert mit einer Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported Lizenz. ©Springer Nature limited.

Charakterisiert wird das CIN-Magenkarzinom durch ausgeprägte Aneuploidie und fokale Amplifikation von Rezeptortyrosinkinasen; das EBV-assoziierte Magenkarzinom durch sich wiederholende *PIK3CA*-Mutationen, extreme DNA-Hypermethylierung und Amplifikation von *JAK2*, *PD-L1* und *PD-L2*; das MSI-Magenkarzinom durch erhöhte Mutationsraten insbesondere für

beeinflussbare onkogene Signalproteine; und das GS-Magenkarzinom durch gehäufte Varianten und Mutationen von *RHOA* oder Fusionen der *RHO*-zugehörigen GTPase-aktivierenden Proteine.

Bislang hat diese molekulare Subklassifikation noch keine Auswirkungen auf die Auswahl der Behandlung.⁵⁶

In Zukunft könnte somit das molekulare Profil eines Tumors mehr über die Lebenserwartung und den Therapieerfolg aussagen als bisherige Klassifikationen. Weiterhin können durch molekularpathologische Klassifizierungen neue, zielgerichtete Therapien eingesetzt werden, die einen verbesserten Behandlungserfolg versprechen. Nachfolgend werden einige Beispiele aufgeführt.

Bei Patienten mit einem Magenkarzinom konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *vascular endothelial growth factor-A* (**VEGF-A**) mit einer ungünstigen Prognose und erhöhter Aggressivität des Tumors assoziiert ist.^{57,58} Die randomisierte Phase III Studie AVAGAST untersuchte die Bedeutung von Bevacicumab (einem humanisierten, monoklonalen Antikörper gegen VEGF-A) in 774 Patienten mit fortgeschrittenen Magenkarzinom. Obwohl keine Verbesserung des Gesamtüberleben gezeigt werden konnte, wurden die Ansprechrate und das progressionsfreie Überleben signifikant optimiert.⁵⁹

Ein Meilenstein in der personalisierten Therapie des Magenkarzinoms lieferte die ToGA-Studie (**T**rastuzumab **f**or **G**astric **C**ancer) 2010. Bei der ToGA-Studie handelt es sich um eine internationale, randomisiert-kontrollierte Phase-III-Studie, welche an 122 Zentren in 24 Ländern durchgeführt wurde. Patienten mit einem Magenkarzinom oder Karzinom des gastro-ösophagealen Überganges wurden inkludiert, sofern der Tumor HER2 überexprimierte. In zwei Gruppen randomisiert erhielten die Patienten entweder eine klassische Chemotherapie oder eine Chemotherapie plus Trastuzumab. Primärer Endpunkt war das Gesamtüberleben.

Die Trastuzumab-Gruppe lebte im Mittel 2,7 Monate länger als die Vergleichsgruppe, weshalb die palliative Behandlung HER2-positiver Magenkarzinome mit Trastuzumab zugelassen wurde und sich in den letzten Jahren in der Behandlung des fortgeschrittenen Magenkarzinoms fest etablieren konnte.⁶⁰

Magenkarzinome mit **MSI** und **EBV** weisen typischerweise eine starke lokale Entzündungsreaktion auf und sprechen gut auf Therapien mit Immune-Checkpoint-Inhibitoren an, die z.B. gegen **PD-1** oder **PD-L1** gerichtet sind.

Weitere therapeutische Targets wie z.B. **MET** und **FGFR2** wurden in der Vergangenheit in kleinen Gruppen von Magenkarzinompatienten identifiziert. Diese Veränderungen könnten möglicherweise die Treibermutationen auf zellulärer Ebene sein.⁵⁵

Eine große Zahl weiterer molekularer Marker wird derzeit klinisch getestet, ist aber bislang noch nicht in praktischer Anwendung.¹¹

Mittels *next generation sequencing* wurden weitere Mutationen entdeckt und mit dem Magenkarzinom in Verbindung gebracht. *CDH1*-, *RhoA*- und *ARID1A*-Mutationen traten gehäuft beim diffusen Subtyp des Magenkarzinoms auf.⁶¹ Weiterhin wurden *TP53*, *TGFBR2*, *SYNE1* und *TMPRSS2* immer wieder beim Magenkarzinom als mutiert identifiziert. *ERBB2*-, *CCNE1*-, *CCND1*- und *EGFR*-Amplifikationen könnten als Treibermutationen im Magenkarzinom funktionieren.⁶² Die zuvor erwähnte *HER2*-Mutation tritt ebenfalls häufig auf und ist aufgrund des verfügbaren Therapieregimes klinisch relevant.

Eine Studie von Wang et. Al (2020) suchte nach weiteren Treibermutationen. Unter 376 Treibergenen waren *TN*, *TP53*, *LRP1B*, *CSMD3*, *OBSCN*, *ARID1A*, *FAT4*, *FLG*, ***PCLO*** und *CSMD1* die 10 häufigsten mutierten Gene im Magenkarzinom mit einer Frequenz von 62%, 48.6%, 29.2%, 28.7%, 28.7%, 26.1%, 25.8%, 25.8%, **24%** und 23.3%.⁶³

4. *PCLO*: piccolo presynaptic cytomatrix protein

Das *piccolo presynaptic cytomatrix protein (PCLO)* ist ein proteincodierendes Gen und Teil der präsynaptischen zytoskeletalen Matrix. Diese Matrix ist in der Einrichtung von aktiven synaptischen Zonen, am Vesikeltransport und an der Freisetzung von monoaminen Neurotransmittern beteiligt.^{64,65} Zwei Transkriptvarianten, welche für verschiedene Isoformen codieren, wurden bislang gefunden. Das Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 7 lokalisiert (Position 7q21.11). Alias für das Gen sind KIAA0559, DKFZp779G1236, ACZ („aczonin“). Das Gen wird regelhaft im Gehirn exprimiert, mit absteigender Häufigkeit in den Nebennieren und der Schilddrüse. Im Magengewebe ist die Expression physiologisch gering.

Piccolo, das Genprodukt, enthält eine PDZ-Domäne, Ca²⁺/Phospholipid-bindende Domänen (C2A und C2B) und Zink-Finger Domänen.⁶⁶ Die PDZ-Domäne interagiert möglicherweise mit anderen präsynaptischen Molekülen, welche in die molekulare Verankerung und Versammlung in der aktiven Zone involviert sind.⁶⁷ Die C2A-Domäne hat die Fähigkeit, intrazelluläre Ca²⁺-Veränderungen zu detektieren und als Antwort mit membranständigen Phospholipiden zu assoziieren.⁶⁸ Interessanterweise interagiert Piccolo auch mit Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP2).⁶⁹ PIP2

steht in Verbindung zu Aktinfilamenten und kann so Membranfusionen und -bewegungen auslösen. Diese einmaligen molekularen Eigenschaften von Piccolo lassen vermuten, dass es eine wichtige Rolle im Transport durch die Zellmembran und in der Endozytose von verschiedenen Membranrezeptoren wie z.B. Tyrosinkinaserzeptoren spielt.

Piccolo wurde erstmals von Cases-Langhoff et al. beschrieben. Sie berichteten von einem 420 kDa Protein, das in den Hirnsynapsen von Ratten nachgewiesen wurde.⁷⁰ Der Verlust von Piccolo liegt der pontocerebellären Hypoplasie Typ III (PCH3) zugrunde, bei der eine homozygote nonsense *PCLO*-Mutation der PCH3-Domäne ursächlich ist. Piccolo spielt offenbar eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und dem Überleben neuronaler Zellen im menschlichen Gehirn.⁷¹ Untersuchungen von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) zeigten, dass Piccolo die Dopamin- und Serotoninwiederaufnahme reguliert und über diesen Mechanismus mit Suchtverhalten, Drogenabusus und psychiatrischen Erkrankungen assoziiert ist.⁷² Als potentieller serologischer Marker für die Rekonvaleszenz vom Guillain-Barré Syndrom (GBS) konnten 2016 Mateos-Hernández et al. eine Korrelation zu *PCLO* herstellen.⁷³ 2017 konnten Mbarek et al. eine Bedeutung von *PCLO* bei Patienten mit schwerer Depression feststellen.⁷⁴ Ein Zusammenhang zwischen *PCLO* und Krebs wiesen erstmals Zhang et al. 2017 bei Plattenepithelzellkarzinomen des Ösophagus (ESCC) nach.⁷⁵ Es gibt Hinweise, dass Piccolo als Modulator im Membrantransport und in der Endozytose von EGFR fungiert. Die Elimination von Piccolo in Zellen begünstigt eine Translokation von EGFR im späten Endosom/Lysosom, was durch ein reduziertes Recycling von EGFR eine verminderte Zellkonzentration zur Folge hat.⁷⁵ Auch beim Glioblastom konnte gezeigt werden, dass Piccolo mit einem schlechteren Überleben assoziiert ist.⁷⁶ Somatische *PCLO*-Mutationen wurden bei schlecht differenzierten hepatozellulären Karzinomen⁷⁷ und bei diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen nachgewiesen.⁷⁸

5. Fragestellung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war eine multiregionale Genomsequenzierung von neun Magenkarzinomen, die von der Arbeitsgruppe um Professor Röcken durchgeführt worden war.⁷⁹ Von den neun Magenkarzinomen wurden an unterschiedlichen Lokalisationen 3-10 Proben entnommen und einer kompletten Exom-Sequenzierung zugeführt. Dabei wiesen 23 (47,9%) von 48 untersuchten Tumorproben eine Mutation in *PCLO* auf, was einer ungewöhnlich hohen Prävalenz entspricht. Nicht jede genetische Mutation ist gleichbedeutend in der Tumorentstehung⁸⁰ und die vorliegende Arbeit sollte die Hypothese prüfen, dass Piccolo im Magenkarzinom eine tumorbiologische Relevanz aufweist und möglicherweise auch von prognostischer Bedeutung ist. Um meine Hypothese zu prüfen, wurden immunhistologische Untersuchungen an einem umfassend charakterisierten

Magenkarzinomkollektiv durchgeführt und die Expression von Piccolo mit zahlreichen verschiedenen klinisch-pathologischen Patientencharakteristika, einschließlich Überleben, korreliert. Anschließend erfolgte die Korrelation von Genotyp und Phänotyp.

6. Material und Methoden

6.1. Ethikvotum

Die Studie war von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität genehmigt worden (Referenznummer D 453/10 und D 549/20, Kopie des Ethikvotums siehe Anhang).

6.2. Studienkollektive

6.2.1. Entdeckungskohorte

Für die Entdeckungskohorte wurden prospektiv zwischen 2016 und 2017 neun Patienten mit einem Adenokarzinom des Magens oder ösophagogastralen Übergangs am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, eingeschlossen. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 68 Jahre mit einer Spanne von 50 bis 85 Jahren. Einschlusskriterium war eine ausreichende Größe des Primärtumors (Durchmesser > 3 cm), um eine multiregionale Gewebeentnahme zu ermöglichen ohne die pathologische Auswertung des Resektionspräparats zu beeinträchtigen. Nach der Tumorresektion wurden die Proben auf Eis an das pathologische Institut geschickt. Je nach Größe des Primärtumors wurden zwischen 3 und 10 Proben aus dem Primärtumor durch Feinnadelbiopsie entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Vor und nach der Gewebeentnahme wurden makroskopische Bilder des Resektats angefertigt, um die anatomische Rekonstruktion des Tumors und die Korrelation mit Paraffinblöcken zu erleichtern. Insgesamt wurden 45 Proben von den Primärtumoren entnommen. In einem Fall wurden drei zusätzliche Proben von drei separaten Lymphknotenmetastasen entnommen. Schließlich wurden insgesamt 48 Tumorproben zur kompletten Exom-Sequenzierung (WES) eingesandt. Die detaillierten genomischen Daten dieser Kohorte wurden bereits beschrieben.⁷⁹

6.2.2. Validierungskohorte

Aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel, wurden alle Gewebeproben von Patienten herausgesucht, die zwischen 1997 und 2009 entweder einer totalen oder einer partiellen Gastrektomie aufgrund eines Adenokarzinoms des Magens oder des ösophagogastralen Übergangs unterzogen worden waren. Folgende Einschluss- und Ausschlusskriterien wurden festgelegt: Patienten wurden in das Studienkollektiv aufgenommen, sofern: 1) Die histologische Begutachtung die Diagnose eines Adenokarzinoms des Magens oder des ösophagogastralen Übergangs bestätigte, 2) der Todeszeitpunkt oder Überlebenszeitdaten vorlagen. Patienten wurden aus dem Kollektiv ausgeschlossen, sofern: 1) histologisch ein anderer Tumor als ein Adenokarzinom vorlag, 2) die histopathologischen Daten nicht vollständig waren oder nicht vollständig erhoben werden konnten, 3) die Patienten zuvor wegen eines Tumorrezidivs im Restmagen nach Billroth-II-Operation operiert worden waren, und/oder 4) keine Daten zum Todeszeitpunkt oder zur Überlebenszeit vorlagen. 5) Patienten mit perioperativ durchgeführter Chemotherapie wurden ebenfalls ausgeschlossen. Die folgenden Patientendaten wurden erhoben: Art der Operation, Alter bei Diagnosestellung, Geschlecht, Tumorlokalisation, Tumorgroße, histologischer Phänotyp (s.u.), T-Kategorie, N-Kategorie, UICC-Tumorstadium und Differenzierungsgrad.

Die Sterbedaten der Patienten wurden vom Epidemiologischen Krebsregister des Landes Schleswig-Holstein, Deutschland, bezogen. Die Follow-up-Daten der noch lebenden Patienten wurden aus den Krankenhausaufzeichnungen und bei den Hausärzten erfragt. Alle Patienten wurden nach Studieneinschluss pseudonymisiert, die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte in kumulativer Form.

6.3. Klinisch-pathologische Charakteristika und Infektionsstatus

Die Daten der Fälle zu H. pylori-, MSI-, EBV-, HER2-, MET-, *PIK3CA*-, PD-L1- und PD-1 Status wurden bereits in vorherigen Arbeiten von der Arbeitsgruppe um Professor Röcken beschrieben und freundlicherweise für diese Studie zur Verfügung gestellt.^{81–85}

6.4. Geräte

Folgende Geräte kamen zum Einsatz: Leica BOND-MAX (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany), Leica SCN400 mikroskopischer Scanner (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland), Eppendorf Research Pipetten 100–1000 µl und 2–20 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), Mikroskop Zeiss, Axioplan 2 (Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Jena, Deutschland), Vortex Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA), Mikroskop Leica DM 1000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), Labor-

Kühlschrank (Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, Deutschland), Rotationsmikrotom Leica RM2245 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany).

6.5. Chemikalien und Reagenzien

Folgende Chemikalien und Reagenzien wurden bei der Durchführung der Versuchsreihen verwendet: Destilliertes Wasser H₂O (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), Äthanol 99 % (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland), Xylol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 %, 250 ml Art-Nr: 8070.2 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Shandon EZ-MountTM (Thermo Scientific Anatomical Pathology, Runcorn, UK), UltraVision Hydrogen Peroxidase Block (Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo USA), Bond Polymer Refine Detection, Antibody-Diluent (beides Leica Biosystems, Wetzlar, Germany).

6.6. Antikörper

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde der polyklonale Kaninchen-Antikörper Anti-Piccolo von Abcam genutzt (ab110427; Abcam plc; Discovery Drive, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, CB2 0AX, UK).

6.7. Verbrauchsmaterialien

Folgende Materialien wurden verwendet: Pipettenspitzen (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling- Berzdorf, Deutschland) sowie Biosphere Filter Tip Pipettenspitzen, (Ref: 70.760.212, Ref: 70.1116.210) unterschiedlicher Größe (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Deutschland), Glas- und Plastikkuvetten (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland), Leica Bond Plus Slides Objektträger (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland), Menzel-Gläser, unterschiedlicher Größe (Thermo Scientific, Waltham, USA), SafeSeal Reagiergefäße unterschiedlicher Größe (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland).

6.8. Software

Folgende Software fand Verwendung: Microsoft® Office 2021 Home and Student (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim), SPSS Version 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA), MacOS Catalina Version 10.15.7 (Apple Inc., USA), Parallels Desktop for Mac 15 (Parallels International GmbH, 110 110th Ave NE, #410, Bellevue, WA 98004, USA).

6.9. Histologie

Alle zur histologischen Begutachtung verwendeten Gewebeproben waren in 10 % neutral gepuffertem Formalin für mindestens 24 Stunden fixiert, in einem Gewebe-Einbettautomaten entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet worden. Die Formalinfixierung war während der Studiendauer standardisiert. Die Abschnitte, welche dem Tumor entnommen worden waren, enthielten Anteile der Schleimhautoberfläche, des Tumorzentrums und der Invasionsfront. Entparaffinierte Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt und gemäß der Laurén-Klassifikation⁴⁷ und dem Mucin-Phänotyp⁸⁶ klassifiziert. Das Tumorstadium aller Tumoren wurden nach der 8. Auflage der Union internationale contre le cancer (UICC)⁸⁷ klassifiziert und beruht ausschließlich auf histopathologischen Untersuchungen.

6.9.1. Immunhistochemische Färbung von Ganzgewebeschnitten

Es wurden ausschließlich Flächenschnitte des Magenkarzinom-Kollektivs gefärbt. Die mögliche Heterogenität der PCLO-Expression innerhalb des Tumors gebot eine Färbung an Ganzgewebeschnitten. Ein „Ganzgewebeschnitt“ entspricht der in eine Gewebeeinbettkassette passenden Gewebeprobe (ca. 1,5 bis 3 cm²) und unterscheidet sich durch die deutliche größere zu untersuchende Gewebefläche im Vergleich zu den für die Herstellung von Tissue Mikroarrays entnommenen, wesentlich kleineren Gewebemengen.

6.9.2. Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Die Immunhistochemie wurde mittels eines automatischen Färbeprotokolls (ER2-20) am Leica BOND-MAX (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die Vorbehandlung mit BOND Epitope Retrieval Solution 2 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) für 20 Minuten durchgeführt, anschließend folgte die Inkubation mit dem Anti-Piccolo Antikörper. Der Antikörper wurde im Verhältnis 1:200 mit Bond Primary Antibody Diluent (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) verdünnt. Zur Färbereaktion wurde das Bond Polymer Refine Detection Kit (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) verwendet.

6.9.3. Auswertung der immunhistologischen Färbung

Zur Beurteilung der immunhistochemischen Färbeintensität wurde ein immunhistochemischer Score (IHC) etabliert. Kriterien waren der prozentuale Anteil positiver vitaler Tumorzellen an allen vitalen Tumorzellen und die Einordnung der Färbeintensität der vitalen Tumorzellen mit IHC 0 (keine Immunreaktion vorhanden), 1+ (schwache Immunreaktion), 2+ (mäßig starke Immunreaktion) und 3+ (starke Immunreaktion; Abb. 3). Diese Werte wurden abgeschätzt und untereinander zur Prüfung der

Plausibilität verglichen. Nerven- und Muskelzellen zeigten regelhaft eine starke Immunreaktion mit dem gegen Piccolo gerichteten Antikörper und wurden deshalb als interne Positivkontrolle für die maximale Immunreaktion (3+) herangezogen (Abb. 4). Tumorzellen wurden demnach mit 3+ bewertet, wenn ihre Intensität der Immunreaktion der von Muskel- und Nervenzellen glich. War die Reaktion weniger intensiv aber dennoch deutlich sichtbar, wurde der Wert 2+ vergeben. Tumorzellen, welche eher eine geringe Immunreaktion aufwiesen, sich aber von negativen Tumorzellen unterschieden, wurden mit 1+ bewertet. Tumorzellen ohne Immunreaktion waren negativ (Wert 0).

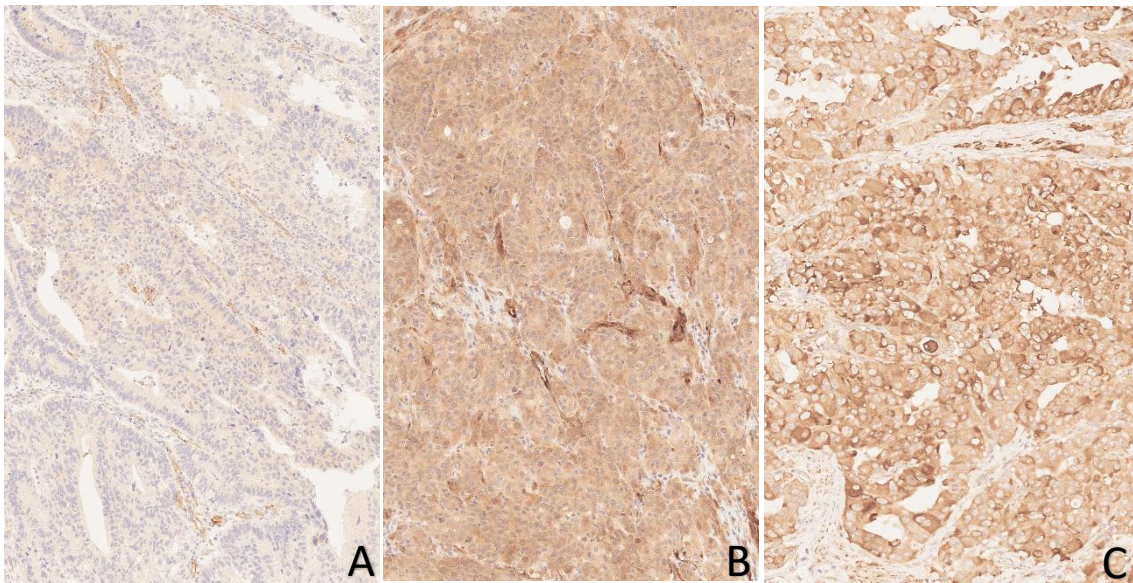


Abbildung 3: Referenzschnitte. Die Abbildung zeigt Aufnahmen der während der Auswertung verwendeten Referenzschnitte mit drei verschiedenen Intensitäten der anti-Piccolo-Immunreaktion, d.h. 1+ (A), 2+ (B) und 3+ (C). Anti-Piccolo-Antikörper, Hämalaun-Gegenfärbung; 400-fache Originalvergrößerung.

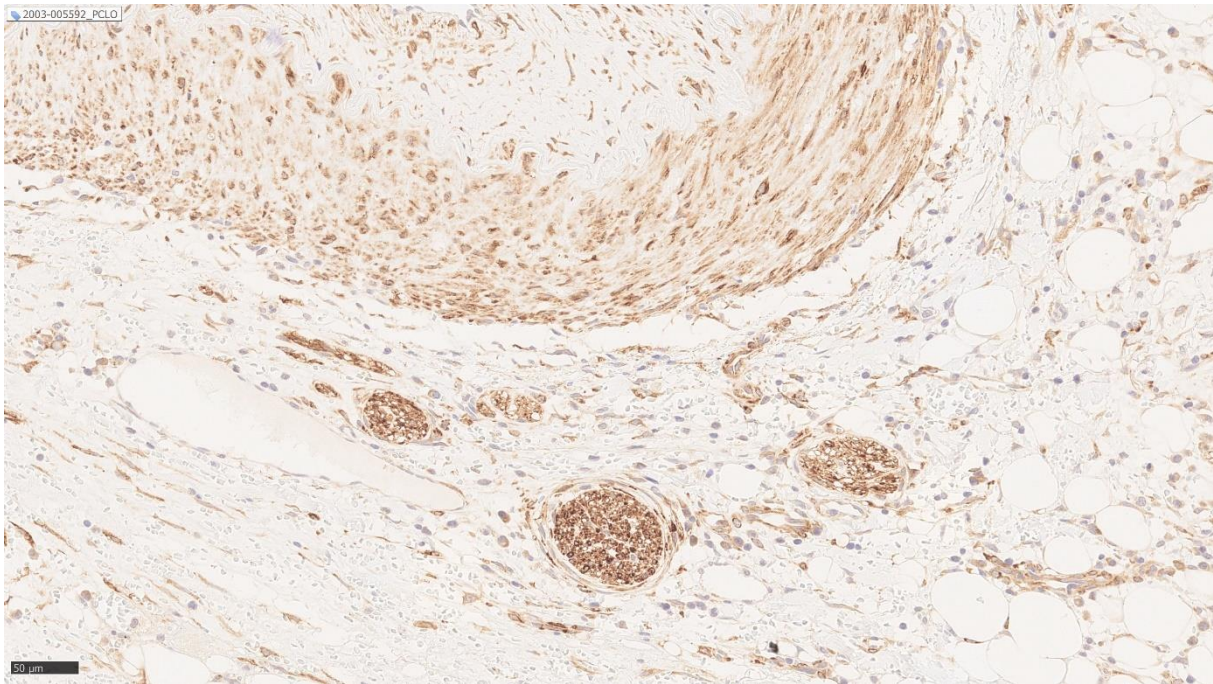


Abbildung 4: Nachweis von Piccolo in Muskel- und Nervenzellen. Die Muskel- und Nervenzellen zeigten regelhaft eine deutliche Anfärbbarkeit und wurden als interne Positivkontrolle einer erfolgreichen Färbung gewertet. Gleichzeitig diente die Färbintensität als Referenz für die maximale Farbintensität in dem jeweiligen Gewebe. Anti-Piccolo-Antikörper; Hämalun-Gegenfärbung; 400-fache Originalvergrößerung.

Um eine Vergleichbarkeit der immungefärbten Schnitte untereinander zu gewährleisten, wurden Referenzschnitte bestimmt. Kriterium für ein Referenzschnitt war eine möglichst großflächige, homogene Färbung in der jeweiligen Intensitätsstufe. Anschließend wurde der prozentuale Anteil gefärbter Tumorzellen für die jeweilige Färbintensität bewertet, wobei die Summe der Prozentwerte immer 100% ergeben musste (%-Anteil nicht gefärbter Tumorzellen + %-Anteil schwach gefärbter Tumorzellen + %-Anteil mittelstark gefärbter Tumorzellen + %-Anteil stark gefärbter Tumorzellen = 100%). Schließlich wurde ein HScore nach der folgenden Formel errechnet:

$$HScore = (1 \times \text{Wert 1} +) + (2 \times \text{Wert 2} +) + (3 \times \text{Wert 3} +)$$

Die Skala konnte Werte von 0 (keine immunhistochemische Reaktion auf 0% der Tumorzellen) bis 300 (immunhistochemische Reaktion Grad 3/3 auf 100% der Tumorzellen) erreichen. Der beschriebene Auswertungsalgorithmus wurde auf alle Schnittpräparate angewandt.

6.10. Maßnahmen zur Ergebnisvalidierung

Zur Bestimmung der prozentual gefärbten Fläche verschaffte ich mir zunächst einen Überblick über die gesamt sichtbare Tumorfläche auf dem Objektträger. Anschließend habe ich im Gesamtblick mit 100-facher Vergrößerung abgeschätzt, wie viel Prozent der Tumorfläche gefärbt ist. Diese erste

Schätzung wurde mit größer Vergrößerung (400-fach) validiert, indem die gefärbten Zellen pro Blickfeld prozentual abgeschätzt wurden. Waren also beispielsweise von 10 identifizierten Tumorzellen 5 gefärbt, entsprach es einem Anteil von 50%. Dieses Vorgehen wurde an mehreren Lokalisationen im Tumor wiederholt, um eine intratumorale Heterogenität der Färbereaktion auszuschließen. Anschließend beurteilte ich das identifizierte Tumorareal nach dem Grad seiner Färbeintensität. Eine interne Validierung erfolgte durch Muskel- und Nervenzellen im Präparat, die stets die maximale Färbeintensität Grad 3 erreichten. Für Färbeintensität 1+, 2+ und 3+ wurde jeweils ein Referenzschnitt definiert. Die definierten Referenzschnitte wurden zu Beginn einer jeden Auswertungseinheit angesehen, um meine Einschätzung zu bestätigen. Weiterhin zog ich die Referenzschnitte bei unklaren Färbeintensitäten zur Hilfe.

Als weitere Maßnahme zur Sicherung der Ergebnisse wurden diese von einem erfahrenen Pathologen validiert. Dazu wurden in regelmäßigen Abständen von mir alle Präparate mit uneindeutigen oder schwer zu bewertenden Färbeergebnis sowie Stichproben von negativ bewerteten Präparaten vorgelegt und noch einmal im Vier-Augen-Prinzip bewertet.

6.11. Statistische Auswertung

Der HScore wurde in Excel-Übersichtstabellen eingepflegt. Zur Auswertung wurde die Software SPSS v20.0 verwendet. Der HScore wurde am Median geteilt in negativ/low und positiv/high und anschließend mit den klinisch-pathologischen Patientencharakteristika korreliert. Hierbei wurde der Tau-Test nach Kendall und der exact-Test nach Fisher angewandt. Für ordinal skalierte Kategorien wurde auf den Kendall's tau-Test zurückgegriffen, bei Nominalskalierung auf den Fisher's Exact Test. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ festgelegt. Sofern für ein auf Korrelation zu prüfendem klinischem Merkmal für einen Fall nicht vorlag, bzw. nicht erhoben wurde, wurden die entsprechenden Fälle nicht in der Statistik berücksichtigt. Weiterhin wurden Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier erstellt. Hieran wurde eine Signifikanzprüfung mittels Log-Rank-Test nach Mantel-Cox durchgeführt. Als Korrektur für multiples Testen wurde die Simes (Benjamini-Hochberg) Prozedur angewendet.⁸⁸

Tabelle 3: Korrelation des Nachweises von PCLO mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika.

		Total n (%)	PLCO Expression		PLCO Expression im Stroma		PLCO Expression in Blutgefäßen	
			Low/negativ (HScore=0) n (%)	High/positiv (HScore>0) n (%)	nicht vorhanden n (%)	vorhanden n (%)	nicht vorhanden n (%)	vorhanden n (%)
Total		466 (100)	291 (62,4)	175 (37,6)	360 (77,3)	106 (22,7)	382 (82,0)	84 (18,0)
Geschlecht	n p ⁽¹⁾		466	0,844	466	0,734	466	0,173
Weiblich		179 (38,4)	113 (63,1)	66 (36,9)	140 (78,2)	39 (21,8)	141 (78,8)	38 (21,2)
Männlich		287 (61,6)	178 (62,0)	109 (38,0)	220 (76,7)	67 (23,3)	241 (84,0)	46 (16,0)
Altersgruppe	n p ⁽¹⁾		466	0,104	466	0,378	466	0,149
< 68 Jahre		234 (50,2)	155 (66,2)	79 (33,8)	185 (79,1)	49 (20,9)	198 (84,6)	36 (15,4)
>= 68 Jahre		232 (49,8)	136 (58,6)	96 (41,4)	175 (75,4)	57 (24,6)	184 (79,3)	48 (20,7)
Lokalisation	n p ⁽¹⁾		463	0,836	463	0,905	463	1000
Proximaler Magen		145 (31,1)	92 (63,4)	53 (36,6)	112 (77,2)	33 (22,8)	119 (82,1)	26 (17,9)
Distaler Magen		318 (68,2)	197 (61,9)	121 (38,1)	247 (77,7)	71 (22,3)	261 (82,1)	57 (17,9)
Laurén Phenotyp	n p ⁽¹⁾		466	0,015	466	0,315	466	0,788
Intestinal		239 (51,3)	135 (56,5)	104 (43,5)	179 (74,9)	60 (25,1)	192 (80,3)	47 (19,7)
Diffus		146 (31,3)	106 (72,6)	40 (27,4)	111 (76,7)	34 (23,3)	122 (83,6)	24 (16,4)
Gemischt		31 (6,7)	20 (64,5)	11 (35,5)	27 (87,1)	4 (12,9)	27 (87,1)	4 (12,9)
Unklassifizierbar		50 (10,7)	30 (60,0)	20 (40,0)	42 (84,0)	8 (16,0)	41 (82,0)	9 (18,0)
Grading	n p ⁽¹⁾		466	0,043	466	0,364	466	0,573
G1 / G2		111 (23,8)	60 (54,1)	51 (45,9)	82 (73,9)	29 (26,1)	89 (80,2)	22 (19,8)
G3 / G4		355 (76,2)	231 (65,1)	124 (34,9)	278 (78,3)	77 (21,7)	293 (82,5)	62 (17,5)
pT	n p ⁽²⁾		466	0,011	466	0,800	466	0,858
pT1a / T1b		59 (12,7)	30 (50,8)	29 (49,2)	48 (81,4)	11 (18,6)	49 (83,1)	10 (16,9)
pT2		53 (11,4)	32 (60,4)	21 (39,6)	42 (79,2)	11 (20,8)	46 (86,8)	7 (13,2)
pT3		185 (39,7)	112 (60,5)	73 (39,5)	128 (74,6)	47 (25,4)	145 (78,4)	40 (21,6)
pT4a / T4b		169 (36,3)	117 (69,2)	52 (30,8)	132 (78,1)	37 (21,9)	142 (84,0)	27 (16,0)
pN	n p ⁽²⁾		465	0,263	465	0,871	465	0,849
pN0		136 (29,2)	82 (60,3)	54 (39,7)	108 (79,4)	28 (20,6)	115 (84,6)	21 (15,4)
pN1		62 (13,3)	35 (56,5)	27 (43,5)	44 (71,0)	18 (29,0)	44 (71,0)	18 (29,0)
pN2		82 (17,6)	52 (63,4)	30 (36,6)	61 (74,4)	21 (25,6)	68 (82,9)	14 (17,1)
pN3a/b		185 (39,7)	121 (65,4)	64 (34,6)	146 (78,9)	39 (21,1)	154 (83,2)	31 (16,8)
pM	n p ⁽¹⁾		466	0,299	466	0,672	466	0,646
pM0		379 (81,3)	234 (61,7)	145 (38,3)	291 (76,8)	88 (23,2)	312 (82,3)	67 (17,7)
pM1		87 (18,7)	57 (65,5)	30 (34,5)	69 (79,3)	18 (20,7)	70 (80,5)	17 (19,5)
Tumorstadium	n p ⁽²⁾		465	0,130	465	0,851	465	0,778
IA / IB		82 (17,6)	46 (56,1)	36 (43,9)	65 (79,3)	17 (20,7)	69 (84,1)	13 (15,9)
IIA / IIB		99 (21,2)	59 (59,6)	40 (40,4)	74 (74,7)	25 (25,3)	79 (79,8)	20 (20,2)
IIIA / IIIB / IIIC		197 (42,3)	128 (65,0)	69 (35,0)	151 (76,6)	46 (23,4)	163 (82,7)	34 (17,3)
IV		87 (18,7)	57 (65,5)	30 (34,5)	69 (79,3)	18 (20,7)	70 (80,5)	17 (19,5)
LN Ratio	n p ⁽¹⁾		465	0,088	465	0,659	465	0,399
Niedrig (<0,189)		227 (48,7)	134 (59,0)	93 (41,0)	173 (76,2)	54 (23,8)	182 (80,2)	45 (19,8)
Hoch (≥0,189)		238 (51,1)	156 (65,5)	82 (34,5)	186 (78,2)	52 (21,8)	199 (83,6)	39 (16,4)
pL	n p ⁽¹⁾		448	0,267	448	0,736	448	1000
pL0		218 (46,8)	138 (63,3)	80 (36,7)	166 (76,1)	52 (23,9)	178 (81,7)	40 (18,3)
pL1		230 (49,4)	138 (60,0)	92 (40,0)	179 (77,8)	51 (22,2)	188 (81,7)	42 (18,3)
pV	n p ⁽¹⁾		447	0,644	447	0,595	447	0,702
pV0		397 (85,2)	246 (62,0)	151 (38,0)	307 (77,3)	90 (22,7)	325 (81,9)	22 (18,1)
pV1		50 (10,7)	29 (58,0)	21 (42,0)	37 (74,0)	13 (26,0)	40 (80,0)	10 (20,0)
pR	n p ⁽¹⁾		461	0,883	461	0,494	461	0,142
pR0		405 (86,9)	252 (62,2)	153 (37,8)	312 (77,0)	93 (23,0)	328 (81,0)	77 (19,0)
pR1 / R2		56 (12,0)	36 (64,3)	20 (35,7)	46 (82,1)	10 (17,9)	50 (89,3)	6 (10,7)
Her2 Status	n p ⁽¹⁾		437	1000	437	0,531	437	0,365
Negativ		401 (86,1)	254 (63,3)	147 (36,7)	312 (77,8)	89 (22,2)	328 (81,8)	73 (18,2)
Positiv		36 (7,7)	23 (63,9)	13 (36,1)	30 (83,3)	6 (16,7)	32 (88,9)	4 (11,1)
Met-Status	n p ⁽¹⁾		455	1000	455	0,825	455	0,812
Negativ		424 (91,0)	266 (62,7)	158 (37,3)	325 (76,7)	99 (23,3)	347 (81,8)	77 (18,2)
Positiv		31 (6,7)	20 (64,5)	11 (35,5)	25 (80,6)	6 (19,4)	25 (80,6)	6 (19,4)
H. Pylori-Status	n p ⁽¹⁾		395	0,015	395	0,148	395	0,009
Negativ		333 (71,5)	213 (64,0)	120 (36,0)	256 (76,9)	77 (23,1)	276 (82,9)	57 (17,1)
Positiv		62 (13,3)	29 (46,8)	33 (53,2)	42 (67,7)	20 (32,3)	42 (67,7)	20 (32,3)
EBV-Status	n p ⁽¹⁾		452	0,105	452	0,586	452	0,227
Negativ		432 (92,7)	266 (61,6)	166 (38,4)	334 (77,3)	98 (22,7)	352 (81,5)	80 (18,5)
Positiv		20 (4,3)	16 (80,0)	4 (20,0)	17 (85,0)	3 (15,0)	19 (95,0)	1 (5,0)
MSI-Status	n p ⁽¹⁾		451	0,279	451	0,835	451	0,249
MSS		416 (89,3)	265 (63,7)	151 (36,3)	323 (77,6)	93 (22,4)	344 (82,7)	72 (17,3)
MSI		35 (7,5)	19 (54,3)	16 (45,7)	28 (80,0)	7 (20,0)	26 (74,3)	9 (25,7)
PIK3CA-Genotyp	n p ⁽¹⁾		459	0,668	459	0,804	459	1000
Wildtyp		435 (93,3)	274 (63,0)	161 (37,0)	336 (77,2)	99 (22,8)	355 (81,6)	80 (18,4)
Mutiert		24 (5,2)	14 (58,3)	10 (41,7)	18 (75,0)	6 (25,0)	20 (83,3)	4 (16,7)
KRAS-Genotyp	n p ⁽¹⁾		459	0,794	459	0,135	459	0,326
Wildtyp		443 (95,1)	277 (62,5)	166 (37,5)	339 (76,5)	104 (23,5)	360 (81,3)	83 (18,7)
Mutiert		16 (3,4)	11 (58,8)	5 (31,3)	15 (93,8)	1 (6,3)	15 (93,8)	1 (6,3)
RHOA-Genotyp	n p ⁽¹⁾		402	0,186	402	0,209	402	0,483
Wildtyp		387 (83,0)	241 (62,3)	146 (37,7)	302 (78,0)	85 (22,0)	320 (82,7)	67 (17,3)
Mutiert		15 (3,2)	12 (80,0)	3 (20,0)	14 (93,3)	1 (6,7)	14 (93,3)	1 (6,7)
Gesamtüberleben (Monate)	p ⁽³⁾		454	0,204	454	0,984	454	0,970
Total / events / censored		454 (22,0)	284 / 225 / 59	170 / 129 / 41	352 / 273 / 79	102 / 81 / 21	372 / 286 / 86	82 / 68 / 14
Mittleres Überleben		15,0 ± 1,1	14,0 ± 1,4	16,0 ± 1,8	15,6 ± 1,2	14,1 ± 1,8	14,1 ± 1,3	16,7 ± 1,8
95% C.I.		12,9 - 17,1	11,3 - 16,7	12,4 - 19,6	13,2 - 18,1	10,6 - 17,6	11,4 - 16,7	13,1 - 20,3
Tumorspezifisches Überleben (Monate)	p ⁽³⁾		425	0,086	425	0,367	425	0,449
Total / events / censored		425 (31,8)	270 / 192 / 78	155 / 98 / 57	329 / 229 / 100	96 / 61 / 35	348 / 238 / 110	77 / 52 / 25
Mittleres Überleben		16,6 ± 1,4	15,0 ± 1,6	17,9 ± 3,6	16,6 ± 1,6	16,6 ± 4,5	15,6 ± 1,6	17,9 ± 4,1
95% C.I.		13,8 - 19,4	11,8 - 18,2	13,8 - 19,4	13,5 - 19,7	7,8 - 25,4	12,4 - 18,9	13,8 - 25,9

(1) Fisher's Exakttest, (2) Kendall's Tau-Test, (3) log-rank Test

7. Ergebnisse

Insgesamt erfüllten 466 Fälle die Studieneinschlusskriterien. Die klinisch-pathologischen Patientencharakteristika sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Unter allen Fällen waren 239 (51,3%) vom intestinalen Typ nach Laurén, 146 (31,3%) vom diffusen Typ, 31 (6,7%) vom gemischten Typ und 50 (10,7%) als unklassifizierbar eingestuft. Der EBV-Status war in 20 Fällen (4,3%) positiv. In 35 Fällen (7,5%) wurde eine MSI nachgewiesen. Ein positiver H. pylori-Nachweis lag in 62 Fällen (13,3%) vor. Daten zum Gesamtüberleben und tumorspezifischen Überleben lagen retrospektiv bei 454 bzw. 425 Fällen vor, wobei die mittlere follow-up Zeit 12,8 Monate (0 bis 142,7 Monate) betrug. Das mittlere Gesamtüberleben betrug 15,0 Monate und das tumorspezifische 16,6 Monate.

7.1. Immunhistochemischer Nachweis von Piccolo im Magenkarzinom

Der immunhistologische Nachweis von Piccolo erfolgte an Ganzgewebeschnitten. Piccolo konnte zytoplasmatisch in Tumorzellen, Stromazellen, in Gefäßendothel und in Nerven- und Muskelzellen nachgewiesen werden.

Der Nachweis von Piccolo in Tumorzellen gelang in 175 Fällen (37,6%). In 291 Fällen (62,4%) war kein PCLO in den Tumorzellen nachweisbar. Der immunreaktive Anteil erreichte Werte von 0% bis 100%, wobei in 58 Fällen (12,4%) nur ein geringer Anteil von 10% positive Zellen nachgewiesen werden konnte. Bei überwiegend negativ bewerteten Fällen lag der Median bei 0.

172 Fälle wiesen einen IHC von 1+ in mindestens 5% der Tumorfläche auf, 60 Fälle einen IHC von 2+ in mindestens 5% der Tumorfläche, und weitere 16 Fälle einen IHC von 3+ in mindestens 5% der Tumorfläche.

Die Verrechnung zu einem HScore ergab Werte zwischen 0 und 190. Entsprechend aller negativen Fälle lag bei 291 Fällen ein HScore von 0 vor, weitere 59 Fälle erreichten einen HScore von 10. Das Maximum von 190 Punkten wurde von zwei Fällen erreicht. Die Errechnung des Medians und anschließende Einteilung in Quartile kam zu dem Ergebnis, dass bei überwiegend negativen Fällen der Median bei 0 lag und die Quartile 1 und 2 zusammenfielen (62,4% aller Fälle). Quartil 3 zählt 60 Fälle (12,9%) und Quartil 4 115 Fälle (24,7%).

Weiterhin war Piccolo in Stroma- und Gefäßendothelzellen nachweisbar (Abb. 4): Es fand sich im Stroma von 106 Fällen (22,7%) und in Gefäßendothelien von 84 Fällen (18,0%) .

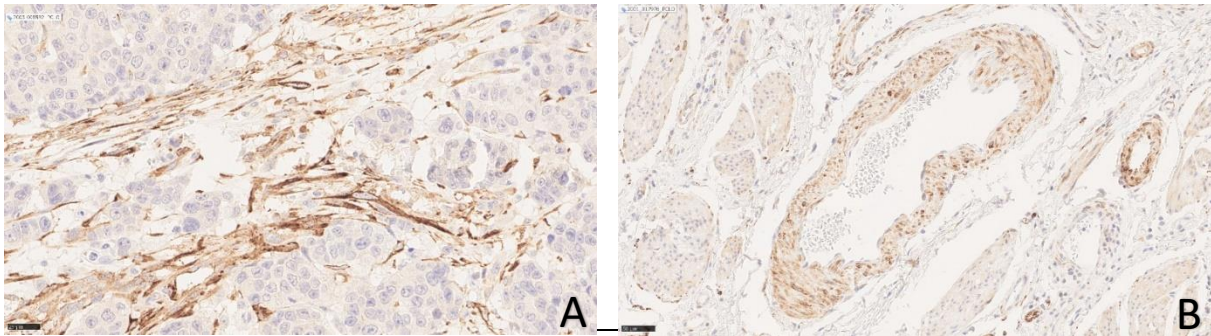


Abbildung 5: Immunreaktion von Stroma und Gefäßen. In (A) ist eine deutliche Immunreaktion im Stroma zu sehen, während der Tumor immunnegativ ist. In (B) ist eine Immunreaktion des Gefäßendothels bei immunnegativem Tumor dargestellt. Anti-Piccolo-Antikörper; Hämalaun-Gegenfärbung; 400-fache Originalvergrößerung.

7.2. Korrelation mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika

Um die tumorbiologische Relevanz zu prüfen, wurde der Nachweis von Piccolo mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika korreliert. Dafür wurde die Kohorte am Median des HScore in Piccolo low/negativ und Piccolo high/positiv dichotomiert.

Piccolo high/positiv korrelierte auffällig mit dem Laurén-Typ, dem Grading der Tumore, der Tumorgroße (T-Kategorie) sowie dem H. pylori-Status. Die auffällige Korrelation erreichte nach Korrektur für multiples Testen keine Signifikanz.

Der positive/high Nachweis von Piccolo korrelierte nicht mit dem EBV- (n=20), MSI- (n=35), HER2- (n=36), MET- (n=31), KRAS- (n=16), RHOA- (n=15) oder PIK3CA-Status (n=24) (Tabelle 3).

Der Nachweis von Piccolo in Stromazellen und Gefäßendothelien korrelierte mit keinem der hier untersuchten klinisch-pathologischen Patientencharakteristika (Tabelle 3).

7.3. Überlebenszeitanalyse

Getestet wurden die Gesamtüberlebenszeit sowie das tumorspezifische Überleben. Zur Analyse nach Piccolo-Status wurden in einem ersten Schritt die Daten am Median geteilt und nach Piccolo negativ/low und positiv/high getestet. Der Nachweis von Piccolo korrelierte nicht mit dem Gesamtüberleben oder dem tumorspezifischen Überleben (Tabelle 1). Die Gesamtüberlebenszeit betrug in der Piccolo-negativen Gruppe im Mittel 14,0 Monate (95%-Konfidenzintervall 11,3 - 16,7 Monate). Für die PCLO-positive Gruppe ergab sich ein medianes Überleben von 16,0 Monaten (95%-Konfidenzintervall 12,4 - 19,6 Monate) (p=0,204). Die mediane tumorspezifische Überlebenszeit betrug in der Piccolo-negativen Gruppe 15,0 Monate (95%-Konfidenzintervall 11,8 - 18,2 Monate). In

der Piccolo-positiven Gruppe verlängerte sich die mediane Überlebenszeit auf 17,9 Monate (95%-Konfidenzintervall 10,9 - 24,9 Monate) ($p=0,086$) (siehe Abbildung 5).

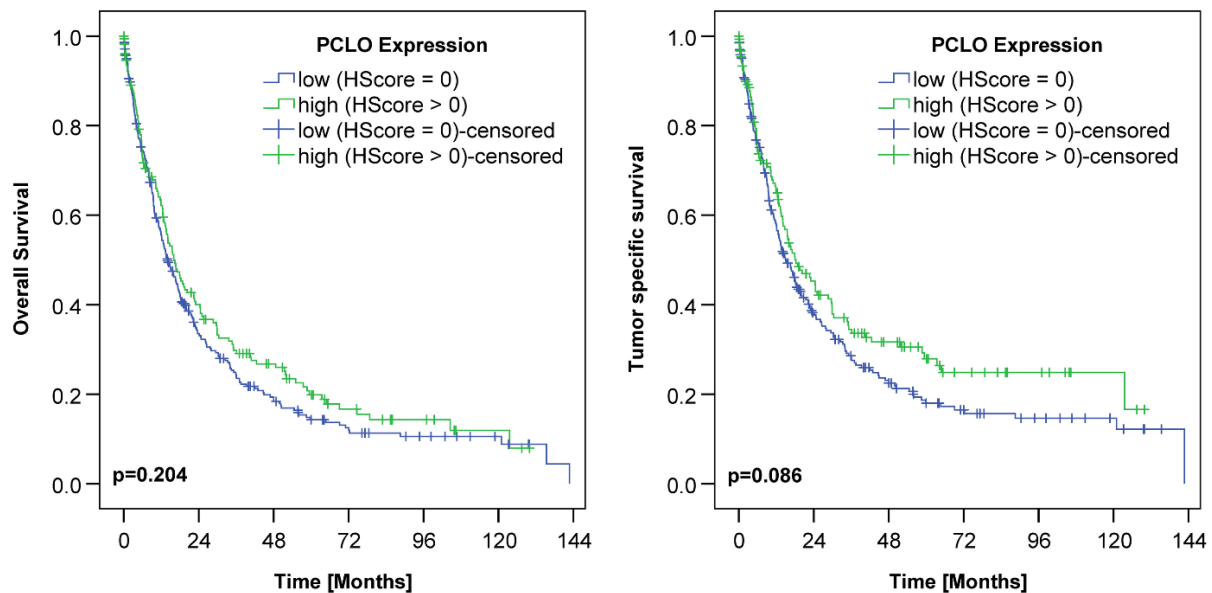


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben und tumorspezifischen Überleben nach PCLO positiv und negativ. Grün = PCLO-positive Fälle, blau = PCLO-negative Fälle.

Im zweiten Schritt wurde die Piccolo-Expression wieder am Median geteilt und für die Laurén-Typen intestinal und diffus separat untersucht. Hier konnte ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Die mediane Gesamtüberlebenszeit betrug beim intestinalen Magenkarzinom 15,4 Monate in der Piccolo-negativen Gruppe und 18,3 Monate in der Piccolo-positiven Gruppe ($p=0,716$). Beim Magenkarzinom vom diffusen Typ betrug die mediane Überlebenszeit 14,6 Monate in der Piccolo-negativen Gruppe und 16,0 Monate in der Piccolo-positiven Gruppe ($p=0,187$). Auch beim tumorspezifischen Überleben konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden. Beim intestinal differenzierten Magenkarzinom lag das mediane Überleben bei 17,9 Monaten (Piccolo-negative Fälle) und 24,5 Monaten (Piccolo-positiv) ($p=0,221$). Beim diffus wachsenden Magenkarzinom lag das mediane tumorspezifische Überleben bei 14,6 Monaten (Piccolo-negativ) und 15,5 Monaten (Piccolo-positiv) ($p=0,374$).

In einem dritten Schritt wurden die Piccolo-Expression in Quartile eingeteilt und mit der Überlebenszeit korreliert. Weder in der Korrelation der Quartile mit Piccolo ($p=0,352$) noch im paarweisen Vergleich der Quartile untereinander konnte ein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden (Vergleich Q1/Q2 mit Q3 $p=0,755$; Vergleich Q1/Q2 mit Q4 $p=0,146$; Vergleich Q3 mit Q4 $p=0,485$).

Der Vergleich des Gesamtüberleben und tumorspezifischen Überleben mit der Piccolo-Expression in Stroma und Gefäßen blieb ebenfalls ohne Signifikanz.

7.4. Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Zur Korrelation von Genotyp und Phänotyp wurden neun Fälle, die zuvor einer multiregionalen Sequenzierung unterzogen worden waren (n= 48 Tumorproben), untereinander korreliert.⁷⁹

In Tabelle 4 sind alle neun Fälle mit je 3 bis 10 Gewebeproben pro Fall und den durch WES nachgewiesenen Mutationen (Missense-Mutationen und Nonsense-Mutationen) aufgeführt. Von den neun Fällen wiesen fünf *PCLO*-Mutationen auf. In drei Fällen wiesen alle Tumorproben eine *PCLO*-Mutation auf (Fall 3, 6 und 9). Zwei Fälle (Fall 4 und 8) wiesen eine Mutation in einigen, aber nicht in allen Proben auf, und vier Fälle (Fall 1, 2, 5 und 7) hatten keine *PCLO*-Mutationen. Interessanterweise wiesen zwei Fälle (Fall 6 und 9) zwei verschiedene Mutationen auf. Diese Daten sind ein Beleg für die intratumorale genetische Heterogenität von *PCLO* im Magenkarzinom.

Um den Genotyp mit dem Phänotyp zu korrelieren, führte ich eine immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten aus 48 Paraffinblöcken (=Proben) durch, die die anatomischen Regionen der Tumoren abdeckten, aus denen die Gewebeproben für die WES gewonnen worden waren. Der Histoscore wurde für jede Probe bestimmt (Tabelle 4, Korrelation von Genotyp und Phänotyp). Für *PCLO* reichte der Histoscore von 0 bis 140. Bei 27 (56,3 %) negativen Proben lag der Median bei 0. Zehn Proben aus zwei Fällen waren vollständig immunnegativ (Fall Nr. 4 und Nr. 9). Gewebeproben aus sieben Fällen zeigten ein heterogenes Immunfärbungsmuster, es wurde kein direkter Zusammenhang zwischen Proteinexpression und Missense- oder Nonsense-Mutationen gefunden.

Tabelle 4: Korrelation von Genotyp und Phänotyp: Dargestellt sind die H-Scores der PCLO von 48 Tumorproben von 9 Patienten aus der genomsequenzierten Kohorte mit bekanntem Mutationsstatus.

Fallnummer	Probe	Gen	Art der Mutation	Aminosäure	Allelfrequenz	Gen	Art der Mut.	AA	Allelfrequenz	PCLO_Hscore
#1	G13406									0
	G13407									20
	G13408									0
	G13409									0
#2	G13401									10
	G13402									0
	G13404									80
#3	G04240	PCLO	nonsense	p.Q375Pfs*6	0,1695					30
	G04241	PCLO	nonsense	p.Q375Pfs*6	0,210191083					10
	G04242	PCLO	nonsense	p.Q375Pfs*6	0,242990654					20
	G04244	PCLO	nonsense	p.Q375Pfs*6						70
	G04245	PCLO	nonsense	p.Q375Pfs*6						10
	G04283	PCLO	nonsense	p.Q375Pfs*6						30
#4	G09209									0
	G09210	PCLO	missense	p.A497T	0,0759					0
	G09211									0
	G09212									0
	G13370	PCLO	missense	p.A497T	0,0289					0
#5	G13389									40
	G13390									0
	G13391									100
	G13392									0
	G13393									0
	G13394									0
	G13395									10
	G13396									60
	G13397									0
	G13398									0
#6	G13383	PCLO	missense	p.P2517L	0,1429					0
	G13384	PCLO	missense	p.P2517L	0,1421					0
	G13385	PCLO	missense	p.P2517L	0,125	PCLO	missense	p.A885T	0.125	0
	G13386	PCLO	missense	p.P2517L	0,2222					130
	G13387	PCLO	missense	p.P2517L	0,1088					50
#7	G13378									0
	G13379									0
	G13380									0
	G13381									120
#8	G09201	PCLO	missense	p.S496P	0,034188034					40
	G09202	PCLO	missense	p.S496P	0,034482759					140
	G09203	PCLO	missense	p.S496P	0,03875969					20
	G09204	PCLO	missense	p.S496P	0,063583815					100
	G09205	PCLO	missense	p.S496P	0,017647059					40
	G09206									0
#9	G13372	PCLO	missense	p.S496P	0,0787	PCLO	missense	p.A497T	0	0
	G13373	PCLO	missense	p.S496P	0,04624277	PCLO	missense	p.A497T	0,027472527	0
	G13374	PCLO	missense	p.S496P	0,02953586					0
	G13375	PCLO	missense	p.S496P	0,04166667	PCLO	missense	p.A497T	0	0
	G13376	PCLO	missense	p.S496P	0,07734807	PCLO	missense	p.A497T	0,0833	0

8. Diskussion

Die umfangreichen genetischen Untersuchungen maligner Tumoren weisen Mutationen in Genen nach, deren tumorbiologische Bedeutung u.U. für die jeweilige Tumorentität unbekannt oder bestenfalls lückenhaft ist. Ausgangspunkt meiner Studie war die Beobachtung, dass *PCLO* in Magenkarzinomen häufig mutiert ist. Im Rahmen einer multiregionalen Sequenzierung von neun Fällen eines Adenokarzinoms des Magens bzw. der ösophagogastralen Übergangszone wiesen immerhin 23 von 48 untersuchten Tumorproben eine Mutation in *PCLO* auf. Dazu zählten sechs Nonsense-Mutationen (p.Q375Pfs*6) und 22 Missense-Mutationen (zehn p.S496P, sechs p.A497T, fünfmal p.P2517L und einmal p.A885T).⁷⁹ Darüber hinaus wiesen sogar zwei Fälle jeweils zwei verschiedene Mutationen von *PCLO* auf.⁷⁹ Auch die Studie von Wang et al. (2020) zeigte, dass *PCLO* unter den zehn häufigsten mutierten Genen im Magenkarzinom zählt.⁶³ Aus diesen Beobachtungen heraus stellte ich die Hypothese auf, dass das Genprodukt Piccolo eine tumorbiologische Bedeutung beim Adenokarzinom des Magens und ösophagogastralen Adenokarzinoms hat. Um meine Hypothese zu prüfen, habe ich eine umfassende immunhistologische Untersuchung an einer gut charakterisierten Patientenkohorte Therapie-naiver Magenkarzinome durchgeführt.

8.1. Piccolo ist heterogen im Magenkarzinom exprimiert

Das Adenokarzinom des Magens weist eine ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität auf, die zu einer heterogenen Expression von Tumorgenen führt. Dabei findet sich eine hohe Variabilität zwischen den Tumoren verschiedener Patienten (intertumorale Heterogenität) als auch innerhalb desselben Tumors (intratumorale Heterogenität), was sowohl den Phänotyp als auch den Genotyp anbelangt.⁸⁹ Die Arbeitsgruppe von Professor Röcken beschrieb z.B. bei EBV-positiven Magenkarzinomen eine intratumorale genetische Heterogenität für *PIK3CA*-Mutationen, indem ein Patient sogar fünf verschiedene *PIK3CA*-Genotypen innerhalb eines einzigen Tumors aufwies, und wies auch auf Proteinebene eine heterogene Her2/neu-Expression nach.⁸² Dies lässt vermuten, dass auch andere genetische Alterationen auf molekularer und funktioneller Ebene räumliche Unterschiede im selben Tumor aufweisen. Die o.g. multiregionale Sequenzierung konnte das für *PCLO* nachweisen. Es fand sich eine intertumorale Heterogenität mit sechs verschiedenen Mutationen als auch eine intratumorale Heterogenität, indem zwei Tumoren mehr als einen *PCLO*-Genotyp aufwiesen.

Meine eigenen Untersuchungsergebnisse weisen nun nach, dass offenbar auch auf Proteinebene eine inter- und intratumorale Heterogenität für Piccolo vorliegt. Ich fand bei vielen Tumoren unterschiedliche Intensitätsstufen des immunhistologisch geführten Nachweises von Piccolo nebeneinander (0, 1+, 2+ 3+), was ich als Ausdruck einer intratumoralen Heterogenität interpretiere.

Diese kann Folge „subklonaler“ Mutationen von *PCLO* sein, wie es in der multiregionalen Sequenzierung beobachtet wurde,⁷⁹ aber auch Folge einer differentiellen Genregulation innerhalb eines Tumors.

8.2. *Piccolo* ist möglicherweise ein Tumorsuppressor

Zu Beginn meiner Arbeit war die Rolle von *Piccolo* im Magenkarzinom noch unklar. Erste Hinweise auf einen möglichen tumorbiologischen Mechanismus lieferten Zhang et al. (2017) für das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (ESCC). Die Gruppe kam zu dem Ergebnis, dass *Piccolo* über eine Stabilisierung des EGFR-Signalweges die Malignität des ESCC erhöht und das Gesamtüberleben reduziert.⁷⁵ Im Tierversuch mit monoklonalen Mausantikörpern gegen *Piccolo* konnte die Zellproliferation dosisabhängig reduziert werden.⁹⁰ Forschungsarbeiten zur Rolle von *Piccolo* in Adenokarzinomen gab es zu Beginn meiner Untersuchungen nicht.

Einen Hinweis auf die mögliche tumorbiologische Bedeutung fand ich in der Assoziation von *Piccolo* mit dem Tumortyp, dem lokalen Tumorwachstum (T-Kategorie) und dem Differenzierungsgrad. Mit zunehmenden lokalen Tumorwachstum reduzierte sich der Anteil *Piccolo*-positiver Tumoren. Das kann darauf hinweisen, dass ein Verlust von *Piccolo* für die Tumorprogression wichtig ist und *Piccolo* damit insgesamt einen tumorsuppressiven Effekt hat. Das könnte auch erklären, warum in einigen Fällen mehrere Mutationen von *PCLO* im selben Tumor nachgewiesen wurden.⁷⁹ Der Verlust von *Piccolo* wäre ein späteres, subklonales Ereignis im Tumorgeschehen.

Piccolo wurde viel seltener bei Adenokarzinomen des diffusen Typs nachgewiesen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass dessen Expression auch vom Phänotyp abhängt. Insgesamt haben Adenokarzinome des diffusen Typs eine schlechtere Prognose als Adenokarzinome des intestinalen Typs, was die tumorsuppressive Bedeutung von *Piccolo* weiter unterstreicht.

Bemerkenswert ist der verminderte Nachweis von *Piccolo* bei *H. pylori*-negativen Karzinomen. Zum einen kann das ein Epiphänomen sein, da in meiner Untersuchungskohorte *H. pylori* insgesamt seltener bei Tumoren des diffusen Typs nachgewiesen wurde.⁹⁴ Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Pathogenese von *H. pylori*-positiven und -negativen Adenokarzinomen sich unterscheidet und das wiederum die Expression von *Piccolo* beeinflusst.

Die Tumorentstehung eines Adenokarzinoms in Gegenwart von *H. pylori* wird gerade erst im Anfang verstanden. Die am häufigsten aufgeführte Annahme besteht gegenwärtig in dem inflammatorischen Prozess als Auslöser der Tumorentstehung. Die Inflammation verursacht die Bildung von freien Radikalen⁹¹, das erhöhte apoptotische und nekrotische Absterben endothelialer Zellen⁹² sowie vermehrte Zellproliferation.⁹³ Verkomplizierend kommt hinzu, dass *H. pylori* die DNA-Reperaturmechanismen *in vitro* und *in vivo* behindert.^{96,97}

In Abwesenheit von *H. pylori* entsteht das Magenkarzinom ebenfalls mittels eines entzündlichen Prozesses, jedoch ist die chronisch-atrophische Gastritis mit konsekutivem Verlust der Drüsenarchitektur und metaplastischem Umbau eher die Folge von angeborenen genetischen Polymorphismen und erworbenen molekularen Veränderungen sowie Umwelteinflüssen.⁹⁸

Das von Corea vorgestellte Konzept der *H. pylori*-assoziierten Kanzerogenese scheint somit zunächst zu keinem Verlust der Expression von Piccolo zu führen. Somit ist PCLO bei *H. pylori*-positiven Karzinomen nicht in der Tumorentstehung beteiligt, sondern möglicherweise erst im späteren Stadium in der Tumorprogression (s.o.). Anders verhält es sich möglicherweise bei *H. pylori*-negativen Karzinomen. Hier könnte ein früher(er) Verlust von Piccolo bereits an der Tumorentstehung beteiligt sein.

Die Ergebnisse meiner Studie weisen auf die Möglichkeit hin, dass der Verlust einer Expression von Piccolo in Abhängigkeit vom Tumortyp und bezogen auf die Tumorentstehung und -progression sowohl ein frühes als auch ein späteres Ereignis sein kann. In beiden Fällen untermauert es die Bedeutung von Piccolo und liefert Erklärungen, warum PCLO so häufig in Magenkarzinomen mutiert ist. Diese unterschiedlichen Effekte könnten auch erklären, warum der Einfluss auf das Überleben so schwach ist (s.u.).

8.3. Molekularpathologische Aspekte von Piccolo

Bislang ist die Datenlage zu den möglichen Pathomechanismen, mit denen Piccolo seine tumorsuppressive Wirkung entfaltet, schwach. Ein möglicher Pathomechanismus ist die Wechselwirkung mit dem EGFR-Signalweg, siehe hierzu die Arbeit von Zhang et al (2017)⁷⁵. Die Forscher untersuchten den Einfluss von PCLO im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und zeigten bei PCLO-überexprimierten Fällen eine insgesamt schlechtere Prognose. Eine mögliche Erklärung lieferte die Korrelation mit dem EGFR-Nachweis im Tumor. ESCC-Patienten mit hoher Expression von Piccolo als auch EGFR wiesen eine schlechtere Prognose auf, als Patienten mit nur einem der beiden. Piccolo scheint im Stande zu sein, die Internalisierung des EGFRs zu beeinträchtigen. Der Verlust der Expression von Piccolo verursacht ein gesteigertes EGFR-Recycling, als Resultat erhöht sich der EGFR-Spiegel. Vermittelt wird das gesteigerte Recycling durch reduzierte EGFR-Ubiquitinierung⁷⁵. Piccolo beeinflusst somit indirekt über den EGFR-Signalweg die Tumorbiologie, indem sein Verlust zu mehr Zellwachstum, Koloniebildung, Migration und Invasion beiträgt⁹⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurden die EGFR-Expression nicht untersucht, jedoch erscheint der tumorsuppressive Charakter von PCLO im Magenkarzinom zunächst konträr.

Dieser Widerspruch kann möglicherweise durch relevante Unterschiede der Entitäten im Hinblick auf EGFR erklärt werden, Zhang et al. führten ihre Untersuchungen ausschließlich an Plattenepithelien durch, die untersuchten Magenkarzinome waren Adenokarzinome.

Monoklonale Antikörper mit dem Ziel der EGFR-Inhibition werden bereits klinisch in verschiedenen Tumorentitäten erfolgreich therapeutisch eingesetzt. Bisherige Phase-3-Studien zur klinischen Anwendung von monoklonalen Antikörpern gegen EGFR im Magenkarzinom bei unselektierten Patienten blieben ohne signifikanten Erfolg. In der REAL-3- (first-line Chemotherapie mit oder ohne Panitumumab; ClinicalTrials.gov identifier NCT00824785), EXPAND- (first line Chemotherapie mit oder ohne Cetuximab; ClinicalTrials.gov identifier NCT00678535), und der COG-Studie (second-line gefitinib vs placebo; ISRCTN 29580179), konnte die EGFR-Inhibition das Überleben nicht verlängern^{103–105}.

Diese Beobachtungen bestätigen zum einen zwar die potentielle Wechselbeziehung zwischen Piccolo und EGFR, weisen jedoch auf entitätsspezifische Unterschiede und Kontext-abhängige Effekte hin.

8.4. Tumorbologische Relevanz von Piccolo

Ein weiterer wichtiger Hinweis auf die tumorbologische Bedeutung eines differentiell exprimierten Gens ist die Korrelation der Expression mit dem Patientenüberleben. Auch wenn ich in meiner Studie keinen signifikanten Zusammenhang nachweisen konnte, so zeigte sich immerhin, dass eine verminderte Expression/ein Verlust von Piccolo mit einem schlechteren Überleben von rund zwei Monaten einherging. Die Differenz der Gesamtüberlebenszeit betrug im Median 2,0 Monate zwischen den Gruppen Piccolo negativ/low und positiv/high. Die tumorspezifische Überlebenszeit lag im Median sogar um 2,9 Monate niedriger als bei einer erhaltenen Expression. Diese Daten bestätigen die tumorsuppressive Wirkung von Piccolo und auch die umgekehrte Korrelation mit dem lokalen Tumorwachstum. Auch wenn diese Unterschiede nach der Korrektur für multiples Testen keine Signifikanz aufwiesen, so liefern sie jedoch wichtige Hinweise auf die potenzielle tumorbologische Relevanz. Die Unterschiede zur Studie von Zhang et al. weisen außerdem auf die Möglichkeit hin, dass die tumorbologische Bedeutung von Piccolo entitätsabhängig sein kann. In der Tat findet sich eine EGFR-Expression häufiger bei Plattenepithelkarzinomen als bei Adenokarzinomen des Magens und ösophagogastralen Übergangs.⁹⁹

Die Ergebnisse aus der nun durchgeführten Forschungsarbeit konnten zeigen, dass Erkenntnisse zu Piccolo im Ösophaguskarzinom nicht ohne weiteres auf das Magenkarzinom übertragbar sind.

8.5. Limitationen

Die intratumorale Heterogenität kann u.U. die Ermittlung der tumorbiologischen Bedeutung von *Piccolo* beeinträchtigen. Um dieses Risiko zu verringern, wurden Ganzgewebeschnitte verwendet, die eine größere Tumorfläche abbilden, als z.B. Tissue Microarrays. Am Beispiel des HER2-Status konnte die Arbeitsgruppe um Professor Röcken den Vorteil des Ganzgewebeschnitts gegenüber Tissue Microarrays zeigen (siehe Warneke et al.).⁸⁴ Gleichzeitig bedeutet es auch, dass Biopsate aus einem Magenkarzinom auch bei *Piccolo* ein nicht zu vernachlässigendes Risiko des Stichprobenfehlers bergen, wie es inzwischen für viele Biomarker des Magenkarzinoms belegt ist (FGFR2, Her2/neu, MET, PD-L1 u.a.m.).¹⁰⁶⁻¹⁰⁹

Der Fokus auf Mutationen allein kann irreführend sein, denn die Analyse von Expressionsmustern und der Tumorkontext (d. h. intestinaler vs. diffuser Typ) liefern wertvolle zusätzliche Informationen. Nach dem Two-Hit-Modell von Knudson müssen beide Allele eines Tumorsuppressors inaktiviert sein, z. B. durch Mutation, Verlust der Heterozygotie (LOH) oder epigenetisches Silencing, um eine phänotypische Veränderung zu bewirken. Unsere Validierungskohorte lieferte keine direkten Beweise dafür, dass Missense-Mutationen mit dem Verlust der Proteinexpression von *PCLO* verbunden sind. Da ich jedoch den LOH- und Methylierungsstatus in unserer Entdeckungskohorte nicht untersucht habe, kann ich nicht ausschließen, dass das zweite Allel noch funktionell war. In jedem Fall gibt die Entdeckungskohorte Hinweis auf das Vorhandensein einer intratumoralen Heterogenität auf genetischer und phänotypischer Ebene.

Meine Beobachtungsstudie liefert keine funktionellen Daten, weshalb ich keine Aussage dazu treffen kann, welche Auswirkungen Nonsense- und Missense-Mutationen auf die Biologie von Magenkarzinomen haben könnten. Es kann sehr komplex sein, hier einen validen Nachweis zu erbringen, da die COSMIC-Datenbank >400 verschiedene *PCLO*-Mutationen beim Magenkarzinom auflistet, von denen die große Mehrheit Punktmutationen sind. Die Eingabe der Suchbegriffe "cancer" und "PCLO" in PubMed liefert nur eine begrenzte Anzahl von Studien. Keine davon befasste sich mit der biologischen Bedeutung von *PCLO* in Adenokarzinomen des Magens.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vorliegende Studie Hinweise darauf liefert, dass *PCLO* im Magenkarzinom unterschiedlich exprimiert wird und möglicherweise eine kontextabhängige tumorsuppressive Funktion hat. Weitere Studien zu diesem häufig mutierten Gen sind wünschenswert.

8.6. Diskussion der Methoden - Immunhistochemie

Forschungsergebnisse in den letzten Jahren haben deutlich gemacht, dass das Maß der Transkription eines Genes nicht immer mit der Quantität seines Proteinproduktes gleichzusetzen ist. Die

energieaufwendige Proteinsynthese wird von der Zelle ökonomisch an den Bedarf adaptiert. Dies geschieht unter anderem durch die Signalübertragung mittels RNA-bindender Proteine, den *small interfering RNAs* (siRNAs).¹⁰⁰ Vor allem die kleinen MicroRNAs (miRNAs) sind hier relevant. Sie sind kleine, 19 bis 25 Nukleotide umfassende, nicht-kodierende RNA-Moleküle und beeinflussen die Expression eines Gens sowohl auf translationaler als auch auf transkriptioneller Ebene.¹⁰¹ Neben der physiologischen Bedeutung der miRNAs konnte auch eine Relevanz für die Entstehung des Magenkarzinoms nachgewiesen werden, wenn diese dysreguliert sind.¹⁰²

Die Immunhistochemie konnte standardisiert auf alle Fälle angewendet werden und lieferte distinkte Färbeargebnisse. Mittels Algorithmus zur Auswertung konnten die Ergebnisse objektiviert werden. Dies gewährleistete eine zuverlässige Vergleichbarkeit untereinander als auch mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika. Zusammenfassend stellt die Immunhistochemie ein geeignetes Verfahren zur Beantwortung der Fragestellung dar.

9. Zusammenfassung

Das Magenkarzinom ist weltweit die viert-häufigste Krebstodesursache, wobei es deutliche Unterschiede der Inzidenz im Kontinentalvergleich gibt. Problematisch ist nach wie vor die späte Diagnosestellung, etwa 40% aller Magenkarzinome sind bei Erstdiagnose bereits metastasiert. Die Pathogenese des Magenkarzinoms ist vielfältig, neben familiären Risikofaktoren und syndromalen Tumorerkrankungen spielt die Ernährung, Umwelteinflüsse, Alkohol- und Nikotinkonsum, der soziale Status und insbesondere die Infektion mit *H. pylori* und assoziierte Gastritis eine entscheidende Rolle.

Meiner Forschungsarbeit vorausgegangen war eine multiregionale Genomsequenzierung von neun Magenkarzinomen, von denen an unterschiedlichen Lokalisationen 3-10 Proben entnommen und einer kompletten Exom-Sequenzierung zugeführt worden waren. Dabei wiesen 23 (47,9%) von 48 untersuchten Tumorproben eine Mutation in *PCLO* auf, was einer auffällig hohen Prävalenz entspricht. Auch bei der Literaturrecherche zeigte sich *PCLO* häufig mutiert im Magenkarzinom, wobei die genaue Funktion des Genprodukts größtenteils unklar ist. Auf der Grundlage dieser Daten sollte deshalb die Hypothese geprüft werden, dass *PCLO* im Magenkarzinom tumorbiologisch

relevant ist. Um meine Hypothese zu prüfen, wurden Ganzgewebsschnitte einer gut charakterisierten Kohorte von 466 Chemotherapie-naiven Magenkarzinomen immunhistochemisch mit einem gegen PCLO-gerichteten Antikörper mittels standardisiertem Färbeprotokoll gefärbt. Ein Auswertungsalgorithmus berücksichtigte eine vierstufige Färbeintensität an der anteiligen Fläche des Gesamttumors und wurde zur statistischen Auswertung in einen Histoscore überführt. Die Ergebnisse wurden mit vorhandenen Daten zu klinisch-pathologischen Patientencharakteristika korreliert und nach Überlebenszeit analysiert. Ebenfalls wurde die Anfärbbarkeit von Stroma und Gefäßen beurteilt.

175 Fälle wiesen eine erhaltene Expression von PCLO auf. In 291 (62,4%) Fällen gelang kein Nachweis von PCLO in Tumorzellen. Die Korrelation der PCLO-Expression (positiven/hoch und negativ/niedrig) mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika zeigte, dass PCLO häufiger bei intestinal differenzierten Adenokarzinomen, niedrigeren T-Stadien und H. pylori-positiven Magenkarzinomen nachweisbar war. Patienten mit einem PCLO-positiven Tumor lebten im Durchschnitt zwischen 2,0 und 2,9 Monaten länger. Nach Korrektur für multiples Testen zeigten die Ergebnisse keine Signifikanz, aber geben Hinweis auf die pathobiologische Funktion von PCLO.

Bereits bekannt war, dass Adenokarzinome des Magens eine starke intra- als auch intertumorale Heterogenität aufweisen. Meine Untersuchungen konnten nun zeigen, dass diese Heterogenität auf phänotypischer Ebene auch für PCLO gilt.

Indizien für die tumorbiologische Relevanz lieferten die Ergebnisse von Tumorgroße, Tumortyp und Differenzierungsgrad; beim systematischen Verlust von PCLO während der Tumorprogression liegt der Verdacht nahe, dass PCLO im Magenkarzinom die Rolle eines Tumorsuppressorgens übernimmt. Die leicht verlängerte Überlebenszeit bei PCLO-positiven Fällen unterstützt diesen Verdacht.

Komplex stellt sich der Sachverhalt bei H. pylori und PCLO dar. Hier scheint PCLO bei H. pylori-positiven Tumoren erst später bei der Tumorprogression wichtig zu sein, bei H. pylori negativen Tumoren möglicherweise bereits in der frühen Tumorentstehung. Weiterhin ist der Zusammenhang mit der Tumorentität von Bedeutung, wie der Vergleich mit der Arbeit von Zhang et. al am Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zeigt.

Zur Korrelation von Genotyp und Phänotyp wurden neun Fälle, die zuvor einer multiregionalen Sequenzierung unterzogen worden waren (n= 48 Tumorproben), untereinander korreliert. Hier konnte kein direkter Zusammenhang zwischen Phänotyp und Mutationsstatus gezeigt werden.

Zusammenfassend zeigt meine Studie, dass Piccolo heterogen im Magenkarzinom exprimiert wird und eine potenzielle tumorbiologische Bedeutung hat. Es scheint vor allem eine tumorsuppressive Wirkung zu besitzen, indem es während der Tumorprogression einen zunehmenden Verlust der Expression aufweist. Weiterführende Studien sind wünschenswert.

Literaturverzeichnis

- 1 Malvezzi M, Bonifazi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Decarli A, Negri E. An age-period-cohort analysis of gastric cancer mortality from 1950 to 2007 in Europe. *Annals of epidemiology* 2010; 20: 898–905.
- 2 7-Stomach-fact-sheet.
- 3 Sasako M, Inoue M, Lin J-T, Khor C, Yang H-K, Ohtsu A. Gastric Cancer Working Group report. *Japanese journal of clinical oncology* 2010; 40 Suppl 1: i28-37.
- 4 Shin A, Kim J, Park S. Gastric cancer epidemiology in Korea. *Journal of gastric cancer* 2011; 11: 135–140.
- 5 Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Datenbankabfrage mit Schätzung der Inzidenz, Prävalenz und des Überlebens von Krebs in Deutschland auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten. Abfrage am 29.08.2022. DOI: 10.18444/5.03.01.0005.0014.0001.
- 6 Nagini S. Carcinoma of the stomach. A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World journal of gastrointestinal oncology* 2012; 4: 156–169.
- 7 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018. *GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: a cancer journal for clinicians 2018; 68: 394–424.
- 8 Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. State of the art. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1996 Jun; 5: 477–481.
- 9 Krejs GJ. Gastric cancer. Epidemiology and risk factors. *Digestive Diseases* 2010; 28: 600–603.
- 10 Correa P, Piazuelo MB, Camargo MC. Etiopathogenesis of gastric cancer. *Scandinavian Journal of Surgery: SJS* 2006; 95: 218–224.
- 11 Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, Washington KM, Carneiro F, Cree IA. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology* 2020; 76: 182–188.
- 12 Kellner U, Frahm SO, Mawrin C, Krams M, Schüller S. *Kurzlehrbuch Pathologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2019.
- 13 Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer. A paradigm for hit-and-run carcinogenesis. *Cell host & microbe* 2014; 15: 306–316.
- 14 Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2008; 134: 306–323.
- 15 Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, Capelinha AF, Quint W, Caldas C, van Doorn L-J, Carneiro F, Sobrinho-Simões M. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping. An opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 2002; 94: 1680–1687.
- 16 Buti L, Spooner E, van der Veen AG, Rappuoli R, Covacci A, Ploegh HL. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108: 9238–9243.
- 17 Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105: 1003–1008.
- 18 Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature reviews. Microbiology* 2005; 3: 320–332.
- 19 Willhite DC, Cover TL, Blanke SR. Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome c release are independent outcomes of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278: 48204–48209.
- 20 Amieva M, Peek RM, JR. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. *Gastroenterology* 2016; 150: 64–78.
- 21 Oh JD, Kling-Bäckhed H, Giannakis M, Engstrand LG, Gordon JI. Interactions between gastric epithelial stem cells and *Helicobacter pylori* in the setting of chronic atrophic gastritis. *Current opinion in microbiology* 2006; 9: 21–27.
- 22 Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S, Korving J, Abo A, Peters PJ, Wright N, Poulsom R, Clevers H. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell stem cell* 2010; 6: 25–36.
- 23 Sigal M, Rothenberg ME, Logan CY, Lee JY, Honaker RW, Cooper RL, Passarelli B, Camorlinga M, Bouley DM, Alvarez G, Nusse R, Torres J, Amieva MR. *Helicobacter pylori* Activates and Expands Lgr5(+) Stem Cells Through Direct Colonization of the Gastric Glands. *Gastroenterology* 2015; 148: 1392-404.e21.
- 24 Yamanouchi J, Azuma T, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M. Dramatic and prompt efficacy of *Helicobacter pylori* eradication in the treatment of severe refractory iron deficiency anemia in adults. *Annals of hematology* 2014; 93: 1779–1780.
- 25 Noto JM, Gaddy JA, Lee JY, Piazuelo MB, Friedman DB, Colvin DC, Romero-Gallo J, Suarez G, Loh J, Slaughter JC, Tan S, Morgan DR, Wilson KT, Bravo LE, Correa P, Cover TL, Amieva MR, Peek RM. Iron deficiency accelerates *Helicobacter pylori*-induced carcinogenesis in rodents and humans. *The Journal of clinical investigation* 2013; 123: 479–492.
- 26 Noto JM, Lee JY, Gaddy JA, Cover TL, Amieva MR, Peek RM. Regulation of *Helicobacter pylori* Virulence Within the Context of Iron Deficiency. *The Journal of infectious diseases* 2015; 211: 1790–1794.
- 27 Lee S-A, Kang D, Shim KN, Choe JW, Hong WS, Choi H. Effect of diet and *Helicobacter pylori* infection to the risk of early gastric cancer. *Journal of epidemiology* 2003; 13: 162–168.
- 28 Tsugane S. Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer. Epidemiologic evidence. *Cancer science* 2005; 96: 1–6.
- 29 Gaddy JA, Radin JN, Loh JT, Zhang F, Washington MK, Peek RM, Algood HMS, Cover TL. High dietary salt intake exacerbates *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis. *Infection and immunity* 2013; 81: 2258–2267.
- 30 Parkin DM. 11. Cancers attributable to infection in the UK in 2010. *British journal of cancer* 2011; 105 Suppl 2: S49-56.

- 31 Fang X, Wei J, He X, An P, Wang H, Jiang L, Shao D, Liang H, Li Y, Wang F, Min J. Landscape of dietary factors associated with risk of gastric cancer. A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2015; 51: 2820–2832.
- 32 Carl-McGrath, S., Ebert, M., Röcken, C. Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis. *Cancer ther.* 2007; 5: 1-17.
- 33 Gao Y, Zhang K, Xi H, Cai A, Wu X, Cui J, Li J, Qiao Z, Wei B, Chen L. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor DNA in gastric cancer. A meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8: 6330–6340.
- 34 Denova-Gutiérrez E, Hernández-Ramírez RU, López-Carrillo L. Dietary patterns and gastric cancer risk in Mexico. *Nutrition and cancer* 2014; 66: 369–376.
- 35 Bartsch H, Nair J. Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions. Potential lead markers for chemoprevention of inflammation-driven malignancies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2005; 591: 34–44.
- 36 Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. *Journal of digestive diseases* 2012; 13: 2–9.
- 37 Sa G, Das T. Anti cancer effects of curcumin. *Cycle of life and death. Cell division* 2008; 3: 14.
- 38 Sintara K, Thong-Ngam D, Patumraj S, Klaikeaw N. Curcumin attenuates gastric cancer induced by N-methyl-N-nitrosourea and saturated sodium chloride in rats. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012; 2012: 915380.
- 39 Wolf E-M, Geigl JB, Svrcek M, Vieth M, Langner C. Hereditäres Magenkarzinom. *Der Pathologe* 2010; 31: 423–429.
- 40 Peleteiro B, Lunet N, Carrilho C, Durães C, Machado JC, La Vecchia C, Barros H. Association between cytokine gene polymorphisms and gastric precancerous lesions. Systematic review and meta-analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2010; 19: 762–776.
- 41 Yang P, Zhou Y, Chen B, Wan H-W, Jia G-Q, Bai H-L, Wu X-T. Overweight, obesity and gastric cancer risk. Results from a meta-analysis of cohort studies. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2009; 45: 2867–2873.
- 42 Safaee A, Moghimi-Dehkordi B, Fatemi SR, Maserat E, Zali MR. Association of stomach cancer risk in individuals with family history of cancer. *Koomesh* 2012; 13.
- 43 Sadjadi A, Derakhshan MH, Yazdanbod A, Boreiri M, Parsaeian M, Babaei M, Alimohammadian M, Samadi F, Etemadi A, Pourfarzi F, Ahmadi E, Delavari A, Islami F, Farzadfar F, Sotoudeh M, Nikmanesh A, Alizadeh BZ, Bock GH de, Malekzadeh R. Neglected role of hookah and opium in gastric carcinogenesis. A cohort study on risk factors and attributable fractions. *International journal of cancer* 2014; 134: 181–188.
- 44 Dong LM, Potter JD, White E, Ulrich CM, Cardon LR, Peters U. Genetic susceptibility to cancer. The role of polymorphisms in candidate genes. *JAMA* 2008; 299: 2423–2436.
- 45 Welling R, Beaumont JJ, Petersen SJ, Alexeeff GV, Steinmaus C. Chromium VI and stomach cancer. A meta-analysis of the current epidemiological evidence. *Occupational and environmental medicine* 2015; 72: 151–159.
- 46 Chen Y, Hu N, Liao L, Yu K, Shu X-O, Zheng W, Yuan J-M, Koh W-P, Qiao Y-L, Fan J-H, Dawsey SM, Freedman ND, Taylor PR, Goldstein AM, Abnet CC. ABO genotypes and the risk of esophageal and gastric cancers. *BMC cancer* 2021; 21: 589.
- 47 LAUREN P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA. DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 1965; 64: 31–49.
- 48 Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C (Hrsg. 2017). *TNM classification of malignant tumours. Eighth edition* John Wiley & Sons Inc, Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ, 2017.
- 49 Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours.* John Wiley & Sons 2011.
- 50 Shin CM, Kim N, Yang HJ, Cho S-I, Lee HS, Kim JS, Jung HC, Song IS. Stomach cancer risk in gastric cancer relatives. Interaction between *Helicobacter pylori* infection and family history of gastric cancer for the risk of stomach cancer. *Journal of clinical gastroenterology* 2010; 44: e34-9.
- 51 Tada M, Tanaka Y, Matsuo N, Shimamura T, Yamaguchi K. Mucosectomy for gastric cancer. Current status in Japan. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2000; 15 Suppl: D98-102.
- 52 Bang Y, Chung H, Xu J, Lordick F, Sawaki A, Al-Sakaff N, Lipatov O, See C, Rueschoff J, van Cutsem E. Pathological features of advanced gastric cancer (GC). Relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial. *Journal of Clinical oncology* 2009; 27: 4556.
- 53 S3-Leitlinie Magenkarzinom (Hrsg.). Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF):S3-Leitlinie Magenkarzinom, Langversion 2.0, 2019 (abgerufen am: 11.01.2021). AWMF Registernummer: 032/009OL. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/magenkarzinom/>.
- 54 Hallissey MT, Dunn JA, Ward LC, Allum WH. The second British Stomach Cancer Group trial of adjuvant radiotherapy or chemotherapy in resectable gastric cancer. Five-year follow-up. *Lancet (London, England)* 1994; 343: 1309–1312.
- 55 Jain VK, Cunningham D, Rao S. Chemotherapy for operable gastric cancer. Current perspectives. *Indian journal of surgical oncology* 2011; 2: 334–342.
- 56 Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, Hinoue T, Laird PW, Curtis C, Shen H, Weisenberger DJ, Schultz N, Shen R, Weinhold N, Kelsen DP, Bowlby R, Chu A, Kasaian K, Mungall AJ, Robertson AG, Sipahimalani P, Cherniack A, Getz G, Liu Y, Noble MS, Pedamallu C, Sougnez C, Taylor-Weiner A, Akbani R, Lee J-S, Liu W, Mills GB, Yang D, Zhang W, Pantazi A, Parfenov M, Gulley M, Piazuelo MB, Schneider BG, Kim J, Boussioutas A, Sheth M, Demchok JA, Rabkin CS, Willis JE, Ng S, Garman K, Beer DG, Pennathur A, Raphael BJ, Wu H-T, Odze R, Kim HK, Bowen J, Leraas KM, Lichtenberg TM, Weaver S, McLellan M, Wizniewicz M, Sakai R, Lawrence MS, Cibulskis K, Lichtenstein L, Fisher S, Gabriel SB, Lander ES, Ding L, Niu B,

- Ally A, Balasundaram M, Birol I, Brooks D, Butterfield YSN, Carlsen R, Chu J, Chuah E, Chun H-JE, Clarke A, Dhalla N, Guin R, Holt RA, Jones SJM, Lee D, Li HA, Lim E, Ma Y, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall KL, Nip KM, Schein JE, Tam A, Thiessen N, Beroukhi R, Carter SL, Cherniack AD, Cho J, DiCara D, Frazer S, Gehlenborg N, Heiman DI, Jung J, Kim J, Lin P, Meyerson M, Ojesina AI, Pedamallu CS, Saksena G, Schumacher SE, Stojanov P, Tabak B, Voet D, Rosenberg M, Zack TI, Zhang H, Zou L, Protopopov A, Santoso N, Lee S, Zhang J, Mahadeshwar HS, Tang J, Ren X, Seth S, Yang L, Xu AW, Song X, Xi R, Bristow CA, Hadjipanayis A, Seidman J, Chin L, Park PJ, Kucherlapati R, Ling S, Rao A, Weinstein JN, Kim S-B, Lu Y, Mills G, Bootwalla MS, Lai PH, Triche T, van den Berg DJ, Baylin SB, Herman JG, Murray BA, Askoy BA, Ciriello G, Dresdner G, Gao J, Gross B, Jacobsen A, Lee W, Ramirez R, Sander C, Senbabaoglu Y, Sinha R, Sumer SO, Sun Y, Thorsson V, Iype L, Kramer RW, Kreisberg R, Rovira H, Tasman N, Ng SCS, Haussler D, Stuart JM, Verhaak RGW, Leiserson MDM, Taylor BS, Black AD, Carney JA, Gastier-Foster JM, Helsel C, McAllister C, Ramirez NC, Tabler TR, Wise L, Zmuda E, Penny R, Crain D, Gardner J, Lau K, Curely E, Mallery D, Morris S, Paulauskis J, Shelton T, Sherman M, Benz C, Lee J-H, Fedosenko K, Manikhas G, Potapova O, Voronina O, Belyaev S, Dolzhansky O, Rathmell WK, Brzezinski J, Ibbs M, Korski K, Kycier W, ŁaŹniak R, Leporowska E, Mackiewicz A, Murawa D, Murawa P, Spychała A, Suchorska WM, Tatka H, Teresiak M, Abdel-Misih R, Bennett J, Brown J, Iacocca M, Rabeno B, Kwon S-Y, Kemkes A, Curley E, Alexopoulou I, Engel J, Bartlett J, Albert M, Park D-Y, Dhir R, Luketich J, Landreneau R, Janjigian YY, Cho E, Ladanyi M, Tang L, McCall SJ, Park YS, Cheong J-H, Ajani J, Camargo MC, Alonso S, Ayala B, Jensen MA, Pihl T, Raman R, Walton J, Wan Y, Eley G, Mills Shaw KR, Tarnuzzer R, Wang Z, Yang L, Zenklusen JC, Davidsen T, Hutter CM, Sofia HJ, Burton R, Chudamani S, Liu J. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014; 513: 202–209.
- 57 Kim S-E, Shim K-N, Jung S-A, Yoo K, Lee JH. The clinicopathological significance of tissue levels of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in gastric cancer. *Gut and liver* 2009; 3: 88–94.
- 58 Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, Castellano P, La Mura A, Pinto M, Zamboli A, Vita F de, Galizia G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients. *Annals of surgical oncology* 2008; 15: 69–79.
- 59 Kang Y, Ohtsu A, van Cutsem E, Rha SY, Sawaki A, Park S, Lim H, Wu J, Langer B, Shah MA. AVAGAST. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study of first-line capecitabine and cisplatin plus bevacizumab or placebo in patients with advanced gastric cancer (AGC). *Journal of Clinical oncology* 2010; 28: LBA4007-LBA4007.
- 60 Bang Y-J, van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang Y-K. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA). A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 2010; 376: 687–697.
- 61 Chen K, Yang D, Li X, Sun B, Song F, Cao W, Brat DJ, Gao Z, Li H, Liang H, Zhao Y, Zheng H, Li M, Buckner J, Patterson SD, Ye X, Reinhard C, Bhathena A, Joshi D, Mischel PS, Croce CM, Wang YM, Raghavakaimal S, Li H, Lu X, Pan Y, Chang H, Ba S, Luo L, Cavenee WK, Zhang W, Hao X. Mutational landscape of gastric adenocarcinoma in Chinese. Implications for prognosis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; 112: 1107.
- 62 Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014; 513: 202–209.
- 63 Wang H, Shen L, Li Y, Lv J. Integrated characterisation of cancer genes identifies key molecular biomarkers in stomach adenocarcinoma. *Journal of clinical pathology* 2020: jclinpath-2019-206400.
- 64 Fenster SD, Kessels MM, Qualmann B, Chung WJ, Nash J, Gundelfinger ED, Garner CC. Interactions between Piccolo and the actin/dynamin-binding protein Abp1 link vesicle endocytosis to presynaptic active zones. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278: 20268–20277.
- 65 Limbach C, Laue MM, Wang X, Hu B, Thiede N, Hultqvist G, Kilimann MW. Molecular in situ topology of Aczonin/Piccolo and associated proteins at the mammalian neurotransmitter release site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108: E392.
- 66 Fenster SD, Chung WJ, Zhai R, Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Kaempf U, Kindler S, Gundelfinger ED, Garner CC. Piccolo, a Presynaptic Zinc Finger Protein Structurally Related to Bassoon. *Neuron* 2000; 25: 203–214.
- 67 Garner CC, Nash J, Huganir RL. PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends in Cell Biology* 2000; 10: 274–280.
- 68 Garcia J, Gerber SH, Sugita S, Südhof TC, Rizo J. A conformational switch in the Piccolo C2A domain regulated by alternative splicing. *Nature Structural & Molecular Biology* 2004; 11: 45–53.
- 69 Gerber SH, Garcia J, Rizo J, Südhof TC. An unusual C2-domain in the active-zone protein piccolo. Implications for Ca²⁺ regulation of neurotransmitter release. *The EMBO Journal* 2001; 20: 1605–1619.
- 70 Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Appeltauer U, Takei K, Kindler S, Veh RW, Camilli P de, Gundelfinger ED, Garner CC. Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *European journal of cell biology* 1996; 69: 214–223.
- 71 Ahmed MY, Chioza BA, Rajab A, Schmitz-Abe K, Al-Khayat A, Al-Turki S, Baple EL, Patton MA, Al-Memar AY, Hurles ME, Partlow JN, Hill RS, Evrony GD, Servattalab S, Markianos K, Walsh CA, Crosby AH, Mochida GH. Loss of PCLO function underlies pontocerebellar hypoplasia type III. *Neurology* 2015; 84: 1745–1750.
- 72 Uno K, Nishizawa D, Seo S, Takayama K, Matsumura S, Sakai N, Ohi K, Nabeshima T, Hashimoto R, Ozaki N, Hasegawa J, Sato N, Tanioka F, Sugimura H, Fukuda K-I, Higuchi S, Ujike H, Inada T, Iwata N, Sora I, Iyo M, Kondo N, Won M-J, Naruse N, Uehara-Aoyama K, Itokawa M, Yamada M, Ikeda K, Miyamoto Y, Nitta A. The Piccolo Intronic Single Nucleotide Polymorphism rs13438494 Regulates Dopamine and Serotonin Uptake and Shows Associations with Dependence-Like Behavior in Genomic Association Study. *Current molecular medicine* 2015; 15: 265–274.

- 73 Mateos-Hernández L, Villar M, Doncel-Pérez E, Trevisan-Herraz M, García-Forcada Á, Ganuza FR, Vázquez J, La Fuente J de. Quantitative proteomics reveals Piccolo as a candidate serological correlate of recovery from Guillain-Barré syndrome. *Oncotarget* 2016; 7: 74582–74591.
- 74 Mbarek H, Milaneschi Y, Hottenga J-J, Ligthart L, Geus EJC de, Ehli EA, Willemsen G, Davies GE, Smit JH, Boomsma DI, Penninx BWJH. Genome-Wide Significance for PCLO as a Gene for Major Depressive Disorder. *Twin research and human genetics : the official journal of the International Society for Twin Studies* 2017; 20: 267–270.
- 75 Zhang W, Hong R, Xue L, Ou Y, Liu X, Zhao Z, Xiao W, Dong D, Dong L, Fu M, Ma L, Lu N, Chen H, Song Y, Zhan Q. Piccolo mediates EGFR signaling and acts as a prognostic biomarker in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2017; 36: 3890–3902.
- 76 Park AK, Kim P, Ballester LY, Esquenazi Y, Zhao Z. Subtype-specific signaling pathways and genomic aberrations associated with prognosis of glioblastoma. *Neuro-oncology* 2019; 21: 59–70.
- 77 Zhang Y, Qiu Z, Wei L, Tang R, Lian B, Zhao Y, He X, Xie L. Integrated analysis of mutation data from various sources identifies key genes and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *PloS one* 2014; 9: e100854.
- 78 Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, Cruz-Gordillo P, Knoechel B, Asmann YW, Slager SL, Novak AJ, Dogan A, Ansell SM, Link BK, Zou L, Gould J, Saksena G, Stransky N, Rangel-Escareño C, Fernandez-Lopez JC, Hidalgo-Miranda A, Melendez-Zajgla J, Hernández-Lemus E, Schwarz-Cruz y Celis A, Imaz-Rosshandler I, Ojesina AI, Jung J, Pedamallu CS, Lander ES, Habermann TM, Cerhan JR, Shipp MA, Getz G, Golub TR. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109: 3879–3884.
- 79 Röcken C, Amallraja A, Halske C, Opasic L, Traulsen A, Behrens H-M, Krüger S, Liu A, Haag J, Egberts J-H, Rosenstiel P, Meißner T. Multiscale heterogeneity in gastric adenocarcinoma evolution is an obstacle to precision medicine. *Genome medicine* 2021; 13: 177.
- 80 Cai H, Jing C, Chang X, Ding D, Han T, Yang J, Lu Z, Hu X, Liu Z, Wang J, Shang L, Wu S, Meng P, Lin L, Zhao J, Nie M, Yin K. Mutational landscape of gastric cancer and clinical application of genomic profiling based on target next-generation sequencing. *Journal of translational medicine* 2019; 17: 189.
- 81 Warneke VS, Behrens H-M, Haag J, Balschun K, Böger C, Becker T, Ebert MPA, Lordick F, Röcken C. Prognostic and putative predictive biomarkers of gastric cancer for personalized medicine. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B* 2013; 22: 127–137.
- 82 Böger C, Krüger S, Behrens HM, Bock S, Haag J, Kalthoff H, Röcken C. Epstein-Barr virus-associated gastric cancer reveals intratumoral heterogeneity of PIK3CA mutations. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2017; 28: 1005–1014.
- 83 Mathiak M, Warneke VS, Behrens H-M, Haag J, Böger C, Krüger S, Röcken C. Clinicopathologic Characteristics of Microsatellite Instable Gastric Carcinomas Revisited. Urgent Need for Standardization. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 2017; 25: 12–24.
- 84 Warneke VS, Behrens H-M, Böger C, Becker T, Lordick F, Ebert MPA, Röcken C. Her2/neu testing in gastric cancer. Evaluating the risk of sampling errors. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2013; 24: 725–733.
- 85 Metzger M-L, Behrens H-M, Böger C, Haag J, Krüger S, Röcken C. MET in gastric cancer--discarding a 10% cutoff rule. *Histopathology* 2016; 68: 241–253.
- 86 Namikawa T, Hanazaki K. Mucin phenotype of gastric cancer and clinicopathology of gastric-type differentiated adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 2010; 16: 4634–4639.
- 87 Wittekind C. TNM. Klassifikation maligner Tumoren. John Wiley & Sons 2016.
- 88 Simes RJ. An improved Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* 1986; 73: 751–754.
- 89 Kuboki Y, Yamashita S, Niwa T, Ushijima T, Nagatsuma A, Kuwata T, Yoshino T, Doi T, Ochiai A, Ohtsu A. Comprehensive analyses using next-generation sequencing and immunohistochemistry enable precise treatment in advanced gastric cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2016; 27: 127–133.
- 90 Frattini M, Molinari F, Epistolio S. The role of Piccolo in cancer treatment. Relationship with EGFR and related therapies, and a marker for new targeted therapies. *Journal of thoracic disease* 2017; 9: 4240–4243.
- 91 Höcker M, Rosenberg I, Xavier R, Henihan RJ, Wiedenmann B, Rosewicz S, Podolsky DK, Wang TC. Oxidative stress activates the human histidine decarboxylase promoter in AGS gastric cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 1998; 273: 23046–23054.
- 92 Wang TC, Goldenring JR, Dangler C, Ito S, Mueller A, Jeon WK, Koh TJ, Fox JG. Mice lacking secretory phospholipase A2 show altered apoptosis and differentiation with *Helicobacter felis* infection. *Gastroenterology* 1998; 114: 675–689.
- 93 Brenes F, Ruiz B, Correa P, Hunter F, Rhamakrishnan T, Fontham E, Shi TY. *Helicobacter pylori* causes hyperproliferation of the gastric epithelium. Pre- and post-eradication indices of proliferating cell nuclear antigen. *The American journal of gastroenterology* 1993; 88: 1870–1875.
- 94 Warneke VS, Behrens H-M, Haag J, Balschun K, Böger C, Becker T, Ebert MPA, Lordick F, Röcken C. Prognostic and Putative Predictive Biomarkers of Gastric Cancer for Personalized Medicine. *Diagnostic Molecular Pathology* 2013; 22.
- 95 Higuchi K, Koizumi W, Tanabe S, Sasaki T, Katada C, Azuma M, Nakatani K, Ishido K, Naruke A, Ryu T. Current management of esophageal squamous-cell carcinoma in Japan and other countries. *Gastrointestinal cancer research : GCR* 2009; 3: 153–161.
- 96 Herrera V, Parsonnet J. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2009; 15: 971–976.

- 97 Witherell HL, Hiatt RA, Replogle M, Parsonnet J. Helicobacter pylori infection and urinary excretion of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, an oxidative DNA adduct. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1998; 7: 91–96.
- 98 Tan P, Yeoh K-G. Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2015; 149: 1153-1162.e3.
- 99 Li W-Q, Hu N, Wang Z, Yu K, Su H, Wang L, Wang C, Chanock SJ, Burdett L, Ding T, Qiao Y-L, Fan J-H, Wang Y, Xu Y, Giffen C, Xiong X, Murphy G, Tucker MA, Dawsey SM, Freedman ND, Abnet CC, Goldstein AM, Taylor PR. Genetic variants in epidermal growth factor receptor pathway genes and risk of esophageal squamous cell carcinoma and gastric cancer in a Chinese population. *PloS one* 2013; 8: e68999.
- 100 Cook MS, Blelloch R. Small RNAs in germline development. *Current topics in developmental biology* 2013; 102: 159–205.
- 101 Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 2008; 14: 1–6.
- 102 Ma Y-Y, Tao H-Q. Microribonucleic acids and gastric cancer. *Cancer science* 2012; 103: 620–625.
- 103 Okines AFC, Ashley SE, Cunningham D, Oates J, Turner A, Webb J, Saffery C, Chua YJ, Chau I. Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine with or without panitumumab for advanced esophagogastric cancer. Dose-finding study for the prospective multicenter, randomized, phase II/III REAL-3 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010; 28: 3945–3950.
- 104 Lordick F, Kang Y-K, Chung H-C, Salman P, Oh SC, Bodoky G, Kurteva G, Volovat C, Moiseyenko VM, Gorbunova V, Park JO, Sawaki A, Celik I, Götte H, Melezínková H, Moehler M. Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND). A randomised, open-label phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2013; 14: 490–499.
- 105 Dutton SJ, Ferry DR, Blazeby JM, Abbas H, Dahle-Smith A, Mansoor W, Thompson J, Harrison M, Chatterjee A, Falk S, Garcia-Alonso A, Fyfe DW, Hubner RA, Gamble T, Peachey L, Davoudianfar M, Pearson SR, Julier P, Jankowski J, Kerr R, Petty RD. Gefitinib for oesophageal cancer progressing after chemotherapy (COG). A phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled randomised trial. *The Lancet Oncology* 2014; 15: 894–904.
- 106 Schrupf T, Behrens HM, Haag J, Krüger S, Röcken C. FGFR2 overexpression and compromised survival in diffuse-type gastric cancer in a large central European cohort. *PLoS One*. 2022 Feb 15;17(2):e0264011. doi: 10.1371/journal.pone.0264011. PMID: 35167603; PMCID: PMC8846517.
- 107 Behrens, HM.; Warneke, VS.; Böger, C.; Garbrecht, N.; Jüttner, E.; Klapper, W.; Mathiak, M.; Oschlies, Ilske; Rudolph, Ursula; Stuhlmann-Laeisz, Christiane; Trick, David; Röcken, Christoph; Hufnagl, Peter: Reproducibility of Her2/neu scoring in gastric cancer and assessment of the 10% cut-off rule.. In: *Cancer Medecine* 4. (2014), S. 1-10.
- 108 Metzger ML, Behrens HM, Böger C, Haag J, Krüger S, Röcken C. MET in gastric cancer--discarding a 10% cutoff rule. *Histopathology*. 2016 Jan;68(2):241-53. doi: 10.1111/his.12745. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26033401; PMCID: PMC4744765.
- 109 Böger C, Behrens HM, Mathiak M, Krüger S, Kalthoff H, Röcken C. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget*. 2016 Apr 26;7(17):24269-83. doi: 10.18632/oncotarget.8169. PMID: 27009855; PMCID: PMC5029700.

Publikationen

- 10.06.2022 Posterbeitrag
zur 105. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V. in
Münster mit dem Titel: „*Mutation of PCLO has a modulating effect in genesis of
gastric carcinoma*“
- Abstract
*Validation of the tumorbiologic relevance of PCLO mutations in gastric cancer –
Results from a large Central European cohort*
Bernhardt M, Behrens HM, Krüger S, Röcken C
- 16.10.2023 Research article
*Exploration of the tumorbiologic relevance of PCLO mutations in gastric cancer –
Results from a large Central European cohort*
Bernhardt M, Behrens HM, Krüger S, Röcken C
Pathobiology, ISSN: 1015-2008 (Print); e-ISSN: 1423-0291 (Online)
- DOI: 10.1159/issn.1015-2008
© 2022 S. Karger AG, Basel

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht. Ich versichere, dass ich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mich in einem entsprechenden Verfahren befinde. Ich versichere, dass ich die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. Ich bin damit einverstanden, dass meine Promotionsarbeit in der Bibliothek der Christian-Albrechts-Universität ausgestellt wird.

Datum, Ort

Unterschrift

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Röcken möchte ich danken, mich stets geduldig, wertschätzend und motivierend bei diesem Projekt begleitet zu haben. Die mühevollen Korrekturen und Erläuterungen waren stets lehrreich und die neuen Denkanstöße in allen Belangen sehr erhellend.

Frau Sandra Krüger möchte ich danken, mich vor allem zu Beginn der Arbeit mit Rat und Tat in der praktischen Forschung unterstützt zu haben. Ohne sie wäre der Start nicht so reibungslos gewesen.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Behrens, dessen Hilfe bei der Auswertung der Daten und ihrer Analyse unbezahlbar war. Seine Tipps und Tricks in der Informatik haben mich immer wieder weitergebracht.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau Vanessa, die mich mit einer unglaublichen Geduld und viel Verständnis während dieser Zeit begleitet hat.