



Fakultät für Medizin  
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie  
der Technischen Universität München

**Bedeutung des DNA-Polymorphismus rs11249433 für die Notch2 Expression und  
das Chemotherapieansprechen beim Magenkarzinom**

**Agnes Takács**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny  
Prüfende der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Gisela Keller  
2. Prof. Dr. Bernhard Holzmann

Die Dissertation wurde am 07.08.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 02.05.2018 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Magenkarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Klinik und Diagnostik .....	1
1.1.3 Makroskopischer Aspekt und Histopathologie .....	2
1.1.4 Tumorlokalisierung, Ausbreitung, Staging .....	3
1.1.5 Ätiologie und Risikofaktoren .....	4
1.1.6 Molekulargenetische Veränderungen im Magenkarzinom .....	6
1.1.7 Prognose und Prognosefaktoren .....	8
1.1.8 Therapie .....	9
1.2 Der Notch-Signalweg .....	11
1.2.1 Der Notch-Signalweg beim Magenkarzinom .....	13
1.3 Single nucleotide polymorphism .....	13
1.3.1 DNA-Polymorphismus im Notch2 Gen .....	14
<b>2. Fragestellung der Arbeit</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Materialien und Methoden</b> .....	<b>16</b>
3.1 Patientenkollektive .....	16
3.1.1 Patientenkollektiv allgemein: klinisch-pathologische Daten und Datenerhebung .....	16
3.2 Neoadjuvant behandelte Patienten .....	16
3.2.1 Patienten und Einschlusskriterien .....	16
3.2.2 Prätherapeutisches Staging .....	17
3.2.3 Neoadjuvante Chemotherapie .....	18
3.2.4 Beurteilung des Therapieansprechens .....	18
3.2.5 Operation .....	19
3.2.6 Tumornachsorge .....	20
3.3 Geräte .....	20
3.4 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien .....	21

---

3.5	Puffer und Lösungen .....	23
3.6	Primer .....	24
3.7	DNA-Isolierung.....	24
3.7.1	Isolierung aus Blutlymphozyten .....	24
3.7.2	Isolierung aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebe (FFPE).....	25
3.7.3	Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes.....	25
3.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
3.9	Gelelektrophorese .....	27
3.10	DNA-Sequenzierung .....	27
3.11	Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.....	28
3.12	Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse .....	30
3.13	Immunhistochemische Färbung .....	31
3.13.1	Durchführung der Färbung.....	32
3.13.2	Antikörper.....	33
3.13.3	Mikroskopische Auswertung der Färbung .....	33
3.14	Statistische Auswertung .....	34
3.14.1	Statistische Tests der univariaten Analyse .....	34
3.14.2	Kaplan-Meier-Überlebenskurve .....	35
3.14.3	Definition des Therapieansprechens und der Endpunkte der Studie .....	36
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
4.1	Klinische und histopathologische Patientencharakteristika .....	37
4.1.1	Therapieansprechen und Überleben.....	38
4.1.2	Klinisch-pathologische Daten und Therapieansprechen.....	40
4.1.3	Klinisch-pathologische Daten und Überleben .....	43
4.2	Genotypisierung des DNA-Polymorphismus im Notch2 Gen.....	46
4.2.1	Assoziation mit dem Therapieansprechen .....	47
4.2.2	Assoziation mit dem Überleben .....	48
4.2.3	Assoziation mit den klinisch-pathologischen Daten.....	50
4.3	Notch2 Expression (Immunhistochemische Färbung).....	52
4.3.1	Assoziation der Expression mit dem Überleben .....	57
4.3.2	Assoziation der Expression mit den klinisch-pathologischen Daten .....	62
4.4	Assoziationen des DNA-Polymorphismus mit der Expression von Notch2.....	66
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>70</b>

---

5.1	Assoziation der Notch2 Expression mit dem Überleben und mit den klinisch-pathologischen Daten .....	70
5.2	Klinische und histopathologische Response im chemotherapierten Patientenkollektiv .....	73
5.2.1	Therapieansprechen und Überleben.....	73
5.2.2	Klinisch-pathologische Daten, Therapieansprechen und Überleben .....	73
5.3	Polymorphismus rs11249433 .....	74
5.3.1	rs11249433, Therapieansprechen und Überleben.....	74
5.3.2	rs11249433 und klinisch-pathologische Daten .....	74
5.3.3	rs11249433 und Notch2 Expression.....	75
5.3.4	rs11249433 als Risikofaktor .....	75
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>77</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>90</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>95</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gesamt- und rezidivfreies Überleben und Therapieansprechen .....	39
Abbildung 2: Laurén-Klassifikation und histopathologisches Therapieansprechen .....	42
Abbildung 3: Grading und histopathologisches Therapieansprechen .....	42
Abbildung 4: Gesamt- und rezidivfreies Überleben und prä- und posttherapeutische klinisch- pathologische Daten .....	46
Abbildung 5: Genotypen des SNP rs112494433 und histopathologisches Therapieansprechen .....	48
Abbildung 6: Genotyp CT vs. CC+TT und Gesamt- bzw. rezidivfreies Überleben .....	50
Abbildung 7: Genotypen und Laurén-Klassifikation.....	52
Abbildung 8: Übersicht über die Notch2 Expression im Zytoplasma.....	55
Abbildung 9: Übersicht über die Notch2 Expression im Kern.....	56
Abbildung 10: Übersicht über die Notch2 Expression im Zytoplasma und im Kern .....	56
Abbildung 11: Expression von Notch2 in primär resezierten Magenkarzinomen .....	57
Abbildung 12: Gesamtüberleben und Notch 2 Proteinexpression in den intestinalen Karzinomen .....	59
Abbildung 13: Notch 2 Genexpression im Zytoplasma und Laurén-Klassifikation .....	64
Abbildung 14: Notch2 Genexpression im Zytoplasma und Assoziation mit der pT-Kategorie .....	65
Abbildung 15: Notch2 Genexpression im Kern und Assoziation mit der pT-Kategorie .....	65
Abbildung 16: Notch 2 Genexpression im Zytoplasma und Assoziation mit dem Lymphknotenstatus ..	66
Abbildung 17: Genotyp CT vs. TT+CC und Notch2-Expression im Zytoplasma .....	69

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: UICC-Stadieneinteilung des Magenkarzinoms nach der TNM-Klassifikation 7. Auflage (Wittekind und Meyer 2010) .....	4
Tabelle 2: Übersicht über die Chemotherapieschemata und die Anzahl der behandelten Patienten ....	18
Tabelle 3: Histopathologische Regressionsgrade .....	19
Tabelle 4: Verwendete Geräte .....	21
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien .....	22
Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen .....	23
Tabelle 7: Primersequenzen, Annealingtemperaturen und Produktlänge .....	24
Tabelle 8: Entparaffinierung in absteigender Alkoholreihe und Färbung mit Hämalaun .....	25
Tabelle 9: PCR-Ansatz mit verwendeten Puffern .....	26
Tabelle 10: PCR-Programm .....	27
Tabelle 11: Ansatz für die Cycle-PCR .....	28
Tabelle 12: Cycle-PCR-Ablauf .....	28
Tabelle 13: DHPLC-Methode .....	29
Tabelle 14: HRM-Analyse 20 µl Ansatz .....	30
Tabelle 15: HRM-Analyse Ablauf .....	31
Tabelle 16: absteigende Alkoholreihe .....	32
Tabelle 17: Beurteilung der Färbeintensität .....	33
Tabelle 18: Beschreibung der Zellfärbung .....	34
Tabelle 19: Immunreaktive Score .....	34
Tabelle 20: Endpunkte der Studie .....	36
Tabelle 21: Prä- und posttherapeutische klinisch-pathologische Daten .....	37
Tabelle 22: Absolute Häufigkeiten klinisches und histopathologisches Therapieansprechen .....	38
Tabelle 23: Klinische und histopathologische Parameter und Therapieansprechen .....	41
Tabelle 24: Prä- und posttherapeutische klinisch-pathologische Daten und Überleben .....	44
Tabelle 25: Allelverteilung Gesamtkollektiv / R0-resezierten Patienten .....	47
Tabelle 26: Genotypen des SNP rs112494433 und Therapieansprechen .....	47
Tabelle 27: Genotypen des SNP rs112494433 und Gesamtüberleben (Log-Rank-Test) .....	49
Tabelle 28: Genotypen des SNP rs112494433 und rezidivfreies Überleben (Log-Rank-Test) .....	49
Tabelle 29: Genotypen des SNP rs112494433 und klinisch-pathologische Daten .....	51
Tabelle 30: Patientencharakteristika .....	53
Tabelle 31: Notch2-Genexpression, Stärke der Zytoplasma- und Kernfärbung .....	54
Tabelle 32: Notch2-Genexpression (Färbescores) und Überleben im Gesamtkollektiv .....	58

---

Tabelle 33: Notch2-Genexpression (Färbescores) und Überleben in den intestinalen Karzinomen.....	59
Tabelle 34: Notch2-Genexpression und Überleben in den nicht intestinalen Karzinomen .....	60
Tabelle 35: Notch2-Genexpression und Überleben in den R0-resezierten Karzinomen .....	61
Tabelle 36: prätherapeutische klinisch-pathologische Patientencharakteristika und Färbescore.....	62
Tabelle 37: posttherapeutische klinisch-pathologische Patientencharakteristika und Färbescore .....	63
Tabelle 38: Genotypen des SNP rs112494433 und Genexpression .....	66
Tabelle 39: Genotypen des SNP rs112494433 und Genexpression in den neoadjuvant behandelten Fällen .....	67
Tabelle 40: Genotyp CC vs. TT+CT und Genexpression im Zytoplasma .....	68
Tabelle 41: Genotyp CT vs. TT+CC und Genexpression im Zytoplasma .....	69
Tabelle 42: Notch2-Genexpression (Anzahl der gefärbten Kerne und Zytoplasma, Farbeintensität) und Überleben im Gesamtkollektiv .....	90
Tabelle 43: Notch2-Genexpression (Anzahl der gefärbten Kerne und Zytoplasma) und Überleben in den intestinalen Karzinomen .....	91
Tabelle 44: Notch2-Genexpression (Anzahl der gefärbten Kerne und Zytoplasma) und Überleben in den R0 resezierten Karzinomen .....	92
Tabelle 45: Genotyp CC vs. TT+CT und Genexpression im Zytoplasma .....	93
Tabelle 46: Genotyp CT vs. CC+TT und Genexpression im Zytoplasma .....	94



## Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
A	Adenin
AEG	<i>Adenocarcinoma of the Esophagogastric junction</i>
AG	Adenin-Guanin
APC	adenomatosis polyposis coli
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARID1A	<i>AT Rich Interactive Domain 1A</i>
Bp.	Basenpaare
BRCA	<i>breast cancer</i>
C	Cytidin
Ca.	Karzinom
CA19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
CA72-4	Carbohydrate Antigen 72-4
CDH1	Cadherin 1 Gen, E-Cadherin
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CI	Konfidenzintervall
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CT	Computertomographie
CTx	Chemotherapie
D1/D2	limitierte bzw. ausgedehnte Lymphadenektomie
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DCC	<i>deleted in colorectal carcinoma</i>
ddNTP	Didesoxy-Nukleosidtriphosphat
DHPLC	denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EORTC	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
ER	Östrogen-Rezeptor
ERCC2	<i>excision repair cross-complementation group 2</i>

EvG-Färbung	Elastika-van-Gieson-Färbung
FFPE	formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe
FS	Färbescore
G	Guanosin
G1-G4	histologisches Grading
GDP	Guanosindiphosphat
GSI	gamma-Sekretase-Inhibitor
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Hydrogenchlorid
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER2	<i>human epidermal growth factor 2</i>
hMLH	humanes MutL Homolog (DNA Mismatch Reparaturgen)
hMSH	humanes MutS Homolog (DNA Mismatch Reparaturgen)
HNPCC	<i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i>
H.pylori	Helicobacter pylori
HRM	<i>High Resolution Melt</i> , hochauflösende Schmelzkurvenanalyse
IL1B	Interleukin-1β
i.v.	intravenös
JAG1	Jagged 1, Notch-Ligand
KCl	Kaliumchlorid
LK	Lymphknoten
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i>
M	Metastasen
Mb	Mega-Basenpaar, 1 Million Basenpaare
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mM	Millimol
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
n	<i>Number</i> , Stückzahl
N	Nodes, Lymphknoten
NICD	Notch intrazelluläre Domäne
n.r.	<i>not reached</i> , nicht erreicht
ÖGD	Ösophago-Gastro-Duodenoskopie

---

OLF	Oxaliplatin, Leucovorin, 5-Fluoruracil
OP	Operation
OR	<i>Odds Ratio</i>
p-	pathologisches Staging (TNM-Präfix)
p53	Tumorprotein p53
PAS	<i>Periodic acid-Schiff reaction</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate-3-Kinase
PLF	Cisplatin, Leucovorin und 5-Fluoruracil
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
R0-R2	Residualtumorstatus 0-2
Rdl	Klinikum rechts der Isar
RHOA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rs	Referenznummer in der National Center for Biotech. Information
siRNA	<i>small interfering</i> Ribonukleinsäure
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T	Thymin
TACE	Metalloproteinase Tumornekrose
T-ALL	akute lymphatische T-Zell Leukämie
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TEAA	Triethylammoniumacetat
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGF- $\alpha$	<i>transforming growth factor-<math>\alpha</math></i>
Tis	Tumor in situ
TNM	Tumorklassifizierung
TRG	Tumorregressionsgrad
Tris	Tris(hydroxymethyl)methylamin
UICC	Union internationale contre le cancer
UV	ultraviolett
VEGFA	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>

WHO	Weltgesundheitsorganisation
XPA	xeroderma pigmentosum, complementation group A
XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C
y-	Staging nach Therapie (TNM-Präfix)

# 1. Einleitung

## 1.1 Magenkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Im Jahre 2012 sind weltweit fast eine Million neue Magenkarzinomfälle aufgetreten. Somit gilt diese Tumorentität mit 6,8 % aller Krebserkrankungen als das fünfthäufigste Malignom nach dem Lungenkarzinom, Brustkrebs, Kolorektal-, und dem Prostatakarzinom. Länder mit der höchsten Inzidenz sind Japan, Korea und China. Eine mittlere Inzidenz findet man in Osteuropa und Südamerika. Regionen mit der niedrigsten Inzidenz sind Nordamerika, Afrika und Ozeanien. Es erkranken zweimal so viele Männer als Frauen. Das Magenkarzinom ist die dritthäufigste krebssbedingte Todesursache weltweit bei beiden Geschlechtern (Ferlay et al. 2013). In Deutschland ist das Magenkarzinom mit 3,6% die siebthäufigste Krebserkrankung bei Männern und mit 3,0 % die neunthäufigste Krebserkrankung bei Frauen. Bei den krebssbedingten Todesfällen steht das Magenkarzinom bei Männern an fünfter Stelle und bei Frauen an sechster Stelle (Robert Koch-Institut 2014a).

Seit etwa 30 Jahren nimmt die Inzidenz und die Sterberate ab, wobei dies vor allem auf die Abnahme der Nonkardiakarzinome zurückzuführen ist. Die Ursache liegt vermutlich in den veränderten Lebens- und Ernährungsgewohnheiten (Milne et al. 2009). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 30%. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei 71 Jahren, bei Frauen bei 75 Jahren.

### 1.1.2 Klinik und Diagnostik

Die Klinik ist zunächst unspezifisch. Die Patienten berichten über ein Druckgefühl im Oberbauch, über Brechreiz, Gewichtsabnahme, Abneigung gegenüber Fleisch, Leistungsknick und über subfebrile Temperaturen. Bei einem fortgeschrittenen Karzinom ist eventuell ein Oberbauchtumor tastbar, oder es kommt zu einer Magenblutung oder zu einer Magenausgangsstenose. Zeichen der Metastasierung sind Hepatomegalie, Aszites, und vergrößerte Virchow-Lymphknoten (Herold 2012). Alarmsymptome sind rezidivierendes Erbrechen, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, oder eine gastrointestinale Blutung. Beim Auftreten von einem oder mehreren Symptomen sollte eine frühzeitige Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) mit Entnahme von Biopsien erfolgen. Die Videoendoskopie ist wegen ihrer hohen Sensitivität und Spezifität das Standardverfahren zur Detektion von Tumoren.

Um eine Fernmetastasierung auszuschließen werden eine Sonographie und eine Computertomographie des Thorax und des Abdomens mit i.v. Kontrastmittel durchgeführt. Die Endosonographie dient

zur Beurteilung der lokoregionären Ausbreitung. Eine Knochenszintigraphie wird nur bei entsprechenden klinischen Symptomen eingesetzt. Ein PET-CT wird nicht routinemäßig verwendet (Möhler 2012).

### **1.1.3 Makroskopischer Aspekt und Histopathologie**

Als Magenkarzinom bezeichnet man Tumoren mit ihrem Zentrum im Magen, die mehr als 5 cm vom ösophago-gastralen Übergang entfernt liegen oder Tumoren deren Zentrum innerhalb eines Abstands von 5 cm liegen, aber nicht in den ösophago-gastralen Übergang hineinreichen. Die Klassifikation der Magenkarzinome erfolgt getrennt für die Frühkarzinome und für die fortgeschrittenen Tumoren.

Es wurde ein Zusammenhang zwischen der makroskopischen Wachstumsform und der Lokalisation, Geschlecht, Alter, histologischem Typ und dem Überleben beschrieben. Polypöse und scharf begrenzt ulzeröse Tumoren sind häufig vom intestinalen Typ, im Antrum lokalisiert und die Patienten sind meist ältere Männer. Im Gegensatz dazu sind die infiltrativen Tumoren vom diffusen Typ proximal lokalisiert, und bei Patientinnen im mittleren Alter aufgetreten (Grabsch und Tan 2013).

Patienten mit einem Magenkarzinom mit diffus infiltrierendem Wachstum haben das schlechteste Überleben (Li et al. 2009).

Bei 95% der Magenkarzinome handelt es sich um Adenokarzinome. Die histologische Einteilung erfolgt nach der WHO- oder nach der Lauren-Klassifikation. Es werden 5 Haupttypen des Adenokarzinoms anhand des Wachstumsmusters charakterisiert: tubuläres Adenokarzinom, papilläres Adenokarzinom, muzinöses Adenokarzinom, Siegelringzellkarzinom und gemischte Karzinome. Seltenerer Formen sind das Plattenepithelkarzinom, adenosquamöses Karzinom, kleinzelliges Karzinom und das undifferenzierte Karzinom. Die WHO-Klassifikation ist eine rein morphologische Einteilung, Histogenese und Differenzierung werden dabei nicht berücksichtigt (Bosman et al. 2010).

Die Lauren-Klassifikation unterscheidet zwischen diffus, intestinal und Mischtyp. Diffuse Magenkarzinome sind schlecht differenziert, durch Siegelringzellen charakterisiert, die einen an den Rand gedrängten Kern aufweisen. Die Krebszellen stehen einzeln oder bilden kleine Gruppen ohne Bildung von drüsigen Strukturen und wachsen infiltrativ. Der intestinale Typ ist meistens gut differenziert und enthält kohärente Zellstränge, die Drüsenstrukturen bilden. Der intestinale Typ ist das dominante Karzinom in Hochrisiko-Gebieten und entwickelt sich von einer intestinalen Metaplasie zum Adenom und dann zum Karzinom (Lauren 1965).

Man unterscheidet Magenfrühkarzinome von fortgeschrittenen Tumoren. Die Frühkarzinome sind auf die Mukosa und Submukosa beschränkt und haben eine bessere Prognose.

Unter Grading versteht man die Beurteilung des Differenzierungsgrades des Tumorgewebes. Die Ein-

teilung erfolgt nach der WHO-Klassifikation:

G1: hoch differenziert

G2: mäßig differenziert

G3: schlecht differenziert

#### **1.1.4 Tumorlokalisation, Ausbreitung, Staging**

Bei der Tumorlokalisation unterscheidet man Kardial- und Nonkardialkarzinome. 30% der Karzinome befindet sich im Antrum, 20% im Corpus, 40% im Fundus, 10% diffus im gesamten Magen. Kardialkarzinome zeigen eine steigende Inzidenz vor allem bei Kaukasier und sind mit gastroösophagealer Reflux und Adipositas, nicht aber mit *H. pylori*-Infektion assoziiert. Proximale Karzinome zeigen auch ein schlechteres Überleben unabhängig vom TNM-Stadium. Distale Tumoren findet man häufiger in der älteren, männlichen Population, sie sind mit einer *Helicobacter pylori*-Infektion assoziiert und sind meistens vom intestinalen Typ (Pacelli et al. 2001).

Die Stadieneinteilung erfolgt nach den Empfehlungen der Union Internationale Contré Cancer (UICC).

Die Tabelle 1 zeigt die Stadiengruppierung des Magenkarzinoms.

**Tabelle 1: UICC-Stadieneinteilung des Magenkarzinoms nach der TNM-Klassifikation 7. Auflage (Wittekind und Meyer 2010)**

Stadium	T-Kategorie	N-Kategorie	M-Kategorie
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Stadium IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
Stadium IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
Stadium IIIB	T4b	N0, N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Stadium IIIC	T4a	N3	M0
	T4b	N2, N3	M0

### 1.1.5 Ätiologie und Risikofaktoren

Man geht davon aus, dass die Entwicklung des Magenkarzinoms multifaktoriell bedingt ist. Bei der Genese spielen genetische Faktoren, exogene Faktoren wie etwa die Ernährung, das Rauchen (Shikata et al. 2008; Bosman et al. 2010) und Erkrankungen des Magens eine wichtige Rolle (Ferlay et al. 2013). Bei der Entstehung vom Magenkarzinom, vor allem vom intestinalen Typ, spielen Ernährungsfaktoren eine wichtige Rolle. Risikofaktoren sind Lebensmittel mit hohem Salzgehalt, geräucherte und gepökelte Nahrungsmittel und ein geringer Verzehr von frischem Obst und Gemüse. Der häufige Genuss von Fleisch ist mit einem erhöhten Risiko für Nonkardiakarzinome assoziiert. Ein protektiver Effekt durch die Zufuhr von Antioxidantien, Vitamin A, E, C und Selen konnte nicht eindeutig bewiesen werden (Bosman et al. 2010).

Eine chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* ist einer der stärksten Risikofaktoren für die Entstehung des Magenkarzinoms. Aber nur ein kleiner Teil der infizierten Menschen entwickelt tatsächlich ein Adenokarzinom. Eine chronische Infektion mit *H. pylori* verursacht eine Atrophie der Mukosa, eine



fokale intestinale Metaplasie und eine Dysplasie bevor es zur Entwicklung eines Magenkarzinoms vom intestinalen Typ kommt. Das Risiko ist auch von Interaktionen zwischen dem Bakterium und dem Wirt abhängig, welche durch stammspezifische bakterielle Faktoren (CagA+) beeinflusst werden. CagA ist ein Virulenzfaktor von *H. pylori* der in der Krebsentstehung eine wichtige Rolle zu spielen scheint und unter anderem eine chronische Entzündung durch Interleukin-8 Produktion verursacht. *H. pylori* Stämme können in CagA positive oder negative unterschieden werden. *H. pylori* Isolate in Osteuropa und Ostasien, also in den Hochrisiko-Gebieten sind CagA positiv (Hatakeyama und Higashi 2005) (Yamaoka 2010).

Der größte Teil der Magenkarzinome tritt sporadisch auf, etwa 1-3% sind durch eine genetische Prädisposition bedingt. Es wurden Keimbahnmutationen in dem Gen CDH1, das für das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin codiert, identifiziert. Diese Keimbahnmutationen sind für etwa 30% der hereditären, diffusen Magenkarzinome verantwortlich (Guilford et al. 1998; Fitzgerald et al. 2010). Dieses autosomal dominant vererbbares Tumorsyndrom ist durch das Auftreten von Magenkarzinome vom diffusen Typ und vom lobulären Mammakarzinom charakterisiert (Keller et al. 1999). Das Manifestationsalter ist viel niedriger als bei sporadischen Magenkarzinomen. Typisch ist auch ein multifokaler Befall.

Das geschätzte Lebenszeitrisko für das Magenkarzinom beträgt für Träger einer CDH1-Mutation 67% bei Männer und 83% bei Frauen. Bei Familien mit mindestens zwei Mitgliedern mit diffusem Magenkarzinom, von denen mindestens ein Karzinom unter 50 Jahre diagnostiziert wurde, ist eine Mutationsanalyse angezeigt. Bei Mutationsträgern soll eine prophylaktische Gastrektomie in Erwägung gezogen werden (Fitzgerald et al. 2010) (Brooks-Wilson et al. 2004).

Weiterhin wurden mehrere Vorerkrankungen beschrieben, die mit einem erhöhten Karzinomrisiko einhergehen wie z.B.: Typ A-Gastritis, Morbus Menetrier oder Gallereflux. Gallereflux steigert 5-10 Jahre nach einer Billroth II Operation das Risiko für die Entstehung eines Magenstumpf-Karzinoms (Bosman et al. 2010).

Das Magenkarzinom ist Teil von folgenden weiteren vererbaren Tumorsyndromen: HNPCC-Syndrom (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) ein autosomal-dominantes Tumor-Prädispositionssyndrom, das vor allem durch das Auftreten von kolorektalen Karzinomen charakterisiert ist. Häufiges Auftreten von Magen-, Ureter- und Endometriumkarzinomen wurde bei den betroffenen Familien beobachtet. Die Ursache liegt in Mutationen von DNA Mismatch Reparaturgenen. Die Tumoren zeigen eine hochgradige Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) und sind größtenteils vom intestinalen Typ. Das Li-Fraumeni Syndrom resultiert aus einer Keimbahnmutation des p53 Tumorsuppressorgens und führt zur Entwicklung von Mammakarzinomen, Osteosarkome und auch zur Kolon- und Magenkarzinomen. Die familiäre adenomatöse Polyposis, eine autosomal-dominante Erkrankung führt

zur Entstehung von Polypen im Dickdarm, im Duodenum und im Magen und geht mit einem hohen Entartungsrisiko einher. Das Peutz-Jeghers Syndrom führt zur Entstehung von hamartomatösen Polypen, die ebenfalls mit einem erhöhten Karzinomrisiko einhergehen (Keller et al. 2005).

Viele wissenschaftliche Artikel beschäftigen sich mit der Rolle von DNA-Polymorphismen als Risikofaktoren für die Entstehung des Magenkarzinoms. Es wurden mehrere DNA-Polymorphismen von verschiedenen Signalwegen entdeckt, die mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Magenkarzinomen assoziiert sind, wie ein Polymorphismus (C677T) im Methylentetrahydrofolat-Reduktase Gen (MTHFR), das im Folat-Metabolismus eine wichtige Rolle spielt, oder Polymorphismen in den DNA-Reparaturgenen XPA, XPC, ERCC2, die bei der Reparatur von DNA-Schaden, die im Rahmen von *H. pylori* induzierten Entzündungsprozessen entstehen können, mitwirken. Polymorphismen in dem IL1B-Gen, das ausschlaggebend für den Beginn und für die Steigerung der Immunantwort auf die *H. pylori* Infektion ist, sind ebenfalls von Bedeutung. Cyclin D1 ist ein Protein das eine wichtige Rolle in der Steuerung des Zellzyklus spielt. Ein SNP in diesem Gen zeigte eine Assoziation mit dem Therapieansprechen im Magenkarzinom (Stocker et al. 2009).

### 1.1.6 Molekulargenetische Veränderungen im Magenkarzinom

Die Entstehung eines Magenkarzinoms wird auf eine Akkumulation genetischer Veränderungen zurückgeführt. Diese genetischen Veränderungen kommen durch unterschiedliche Mechanismen zustande. Eine aktuelle Arbeit des *The Cancer Genome Atlas Research Network* teilt die Magenkarzinome nach den zugrunde liegenden molekulargenetischen Veränderungen in 4 Subtypen: in Epstein-Barr-Virus positiven Magenkarzinome (etwa 9%), die mit Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate-3-Kinase (PIK3CA)-Mutation und DNA-Hypermethylierung assoziiert sind, in Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI, etwa 20%), in genetisch stabile Tumoren (20%), die vor allem diffuse Karzinome sind und Mutationen des RhoA-Gens aufweisen und zuletzt in die chromosomal instabile Tumoren (ca. 50%) mit numerischen Veränderungen der Chromosomen, bzw. von Chromosomenbereichen und mit strukturellen Translokationen (The Cancer Genome Atlas Research Network 2014; Aguilera und Gómez-González 2008).

Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) wird in eine hohe MSI (MSI-H, mindestens 30% der Mikrosatellitenmarker sind mutiert) und in eine niedrige MSI (MSI-L, weniger als 30% der Marker sind verändert) eingeteilt. MSI-H geht mit einem Defekt des Mismatch Reparatursystems einher und kann in etwa 5-10% der diffusen Magenkarzinomen und in etwa 6-23,5 % der intestinalen Karzinomen nachgewiesen werden (Ushijima und Sasako 2004) (Ott et al. 2003) (Marrelli et al.2015). Die Ursache der MSI-H liegt

im Verlust des hMLH1 oder des hMSH2 Mismatch Reparatur Proteins. Die hMLH1 Promoter Methylierung spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Magenkarzinoms (Lee et al. 2004). Die MSI-L kann in 8-20% der Magenkarzinom-Fälle nachgewiesen werden (Keller et al. 2005). Die Mikrosatelliteninstabilität ist mit klinisch-pathologischen Merkmalen, wie intestinaler Typ, Lokalisation im Antrum, seltenere Lymphknotenmetastasen und ein verlängertes Überleben assoziiert (Beghelli et al. 2006). Epigenetische Veränderungen, wie die Promoter-Hypermethylierung spielen auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Magenkarzinoms. Es sind vor allem Tumorsuppressorgene betroffen, die durch die Hypermethylierung inaktiviert werden. Oft sind die Gene Cadherin-1 (CDH1), der Zellzyklus-Regulator p16 und das DNA-Reparaturgen MLH1 betroffen (Becker und Keller 2010). Eine Hypermethylierung in den CpG-Inseln wird in verschiedenen Tumoren, unter anderem auch im Magenkarzinom beschrieben (Napieralski et al. 2007). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass molekulargenetische Veränderungen in den Tumorsuppressorgenen und in den Onkogenen in die Entstehung der Magenkarzinome involviert sind. Eine Inaktivierung der Tumorsuppressorgene TP53 (*tumor protein p53*), APC (*adenomatosis polyposis coli*) oder des DCC-Gens (*deleted in colorectal carcinoma*) erfolgt durch Mutation oder durch Verlust der Heterozygotie (LOH). 30% der Magenkarzinome, größtenteils vom intestinalen Typ, weisen eine genetische Veränderung des p53 Locus auf. Etwa 60% der Tumoren vom intestinalen Typ zeigen eine Mutation oder LOH des APC-Gens. APC ist ein Mitglied des Wnt/wingless Signalweges, der z.B. in 90% der Kolonkarzinome verändert ist (Smith et al. 2006).

Eine Überexpression des EGF (*epidermal growth factor*), TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor- $\alpha$* ) und K-sam wurde auch beschrieben (Smith et al. 2006). In 20% der intestinalen Magenkarzinome wurde die Amplifikation des Onkogen-Produktes ErbB2, HER2 beschrieben. HER2 ist ein *human epidermal growth factor* Rezeptor, eine Amplifikation oder Überexpression wurde in Mammakarzinomen, Kolorektal- und Ovarialkarzinomen nachgewiesen. (Keller et al. 2005) (Durães et al. 2014).

Gene, die die Apoptose und den Zellzyklus regulieren, haben auch große Bedeutung bei der Karzinogenese. So ist ein Verlust der Heterozygotie bei dem bcl-2 Locus (ein Apoptosehemmer) mit der Entwicklung von intestinalen Magenkarzinomen assoziiert. In Tumoren vom diffusen Typ wird das SC-1 Antigen, ein Apoptose Rezeptor exprimiert. Eine Amplifikation von Cyklin E, ein Regulator des Zellzyklus, wird in 15-20% der Magenkarzinome gefunden (Keller et al. 2005). Die Entwicklung von modernen Sequenzierungsmethoden (Next-Generation Sequencing) ermöglichte die Untersuchung des gesamten Genoms auf unterschiedlichen Ebenen und brachte dadurch weitere neue Erkenntnisse. Wang und Kollegen publizierten die ersten Ergebnisse der exome sequencing Studie im Jahre 2012. Sie identifizierten 20 verschiedene Gene, die bei der Entwicklung des Magenkarzinoms eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Unter den Genen waren die bereits bekannten TP53, PTEN (*Phosphatase and Tensin*

*homolog*) und  $\beta$ -Catenin. Eine neue Erkenntnis war die hohe Mutationsfrequenz von Genen (unter anderem von ARID1A), die in die Modifikation von Chromatin involviert sind. 59% der Magenkarzinome zeigten Mutationen in den Histon-Modifizierungsgenen (Wang et al. 2011). Zang et al. beschrieb im Rahmen seiner Exome-Sequenzierungsstudie somatische Mutationen in Zelladhäsions- und Chromatin-Remodeling-Genen. Er fand Mutationen in dem TP53-, dem PIK3CA- und dem ARID1A-Gen in Magenkarzinomen (Zang et al. 2012).

In 14-25% der diffusen Magenkarzinome wurden kürzlich Mutationen im RHOA-Gen, das für eine kleine GTPase kodiert, festgestellt. RhoA ist ein Vermittler zwischen Zelloberflächenrezeptoren und intrazellulären Signalproteinen. Das Protein wechselt zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen Form und einer aktiven GTP-gebundenen Form, die mit nachgeschalteten Effektoren interagiert, wodurch die Struktur des Aktin-Zytoskeletts, die Zellmigration und der Zellzyklus beeinflusst werden. Eine Überexpression wurde in verschiedenen Krebsarten beobachtet. Es wird vermutet, dass der Wildtyp RhoA tumorsuppressive Wirkung hat und eine Mutation in RHOA diese tumorsuppressive Funktion hemmt (Kakiuchi et al. 2014) (Zhou et al. 2014).

### 1.1.7 Prognose und Prognosefaktoren

Da das Magenkarzinom mit unspezifischen und spät auftretenden Symptomen einhergeht, wird es meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Oft liegt schon eine lymphogene oder hämatogene Metastasierung vor. Der Anteil der Tumoren im frühen Stadium beträgt nur 10-15%. All das erklärt, dass die 5-Jahres-Überlebensrate nur bei etwa 30% liegt. Eine bessere Prognose kann vor allem in Kliniken mit hoher Fallzahl, dank stadiengerechter, multimodaler Therapie erzielt werden (Hartgrink et al. 2009). Die Prognose hängt von tumor- und patientenassoziierten Faktoren ab. Lymphknotenratio (Ratio von befallenen Lymphknoten zu den entfernten Lymphknoten) und Lymphknotenstatus sind die wichtigsten unabhängigen Prognosefaktoren (Parameter, die die Prognose des Patienten unabhängig beeinflussen) in Patienten mit einem resezierten Magenkarzinom, gefolgt von der Residualtumor-Kategorie, pT-Kategorie und dem M-Status (Siewert et al. 1998). In 2004 wurde in einer Studie beschrieben, dass das Vorhandensein von Fernmetastasen (in der Leber oder im Peritoneum) und ein alkalische Phosphatase Wert >100 U/l als unabhängige prognostische Faktoren gelten (Chau et al. 2004). Dieses Ergebnis wurde im Jahr 2009 im Rahmen der REAL-2 Studie validiert (Chau et al. 2009).

Es wurde auch eine Vielzahl von molekularen Prognosefaktoren beschrieben. Etwa 40% der diffusen Magenkarzinome zeigten eine verstärkte Aktivierung des *met* Protoonkogens (*hepatocyte growth fac-*

*tor receptor*), die Amplifikation von *met* korreliert mit dem Stadium und mit der Prognose (Smith et al. 2006). 7-34% der Magenkarzinome zeigen eine Überexpression oder eine Amplifikation des Her2-Gens, das in dem Tumorzellproliferation, Migration, Adhäsion, Differenzierung und Apoptose involviert ist.

Die Assoziation der Her2 Expression mit der Prognose wird kontrovers diskutiert. Metaanalysen deuten jedoch darauf hin, dass eine vermehrte Her2 Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Durães et al. 2014; Gravalos und Jimeno 2008; Jácome et al. 2016). Mehrere Studien haben beschrieben, dass ein weiteres Mitglied der *epidermal growth factor* Rezeptor-Familie HER1 in etwa 5-27% der Magenkarzinome amplifiziert ist und die Überexpression als ein Marker für schlechte Prognose gilt (Deng et al. 2012; Kim et al. 2008; Kiyose et al. 2012). Die Angiogenese ist auch ein wichtiger Faktor bei der Krebsentstehung und wird durch den VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*) und durch seine Rezeptoren (VEGFRs) beeinflusst. In etwa 40% der Magenkarzinomfälle wird eine Expression von VEGFA und VEGFRs beschrieben, die mit einer schlechteren Prognose, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen assoziiert ist (Lietao et al. 2008; Yoshikawa et al. 2000). Eine Amplifikation des *fibroblast growth factor receptor* findet man in etwa 9% der Tumoren, häufiger bei Kaukasier als bei Asiaten und sie ist ebenfalls mit einem schlechteren Überleben assoziiert (Jung et al. 2012). Die Überexpression von MET geht auch mit einer schlechteren Prognose einher (Graziano et al. 2011; Lee et al. 2011).

Dem Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/mTOR Signalweg wird ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entstehung des Magenkarzinoms zugeschrieben (Samuels et al. 2004; Velho et al. 2005). Eine Aktivierung oder eine Deregulierung der Signalkaskade ist mit erhöhten Lymphknotenmetastasen und mit einem schlechteren Überleben assoziiert (Shi et al. 2012).

### 1.1.8 Therapie

Die chirurgische Resektion ist die Standardtherapie zur kurativen Behandlung des potentiell resektablen Magenkarzinoms. Ziel ist die Entfernung des gesamten Tumorgewebes mit den regionären Lymphknoten. Bei kurativer Intention werden die Lymphknoten von Kompartiment I und II (D2-Lymphadenektomie mit 25 LK-s) entfernt (Möhler 2012). Magenfrühkarzinome ohne LK-Befall (T1a N0 M0) können mit einer endoskopischen Resektion behandelt werden, falls folgende Bedingungen erfüllt werden:

- Läsionen von < 2 cm Größe in erhabenen Typen
- Läsionen von < 1 cm Größe in flachen Typen

- Histologischer Differenzierungsgrad: gut oder mäßig (G1/G2)
- Keine makroskopische Ulzeration
- Invasion begrenzt auf die Mukosa
- Keine restliche invasive Erkrankung nach der endoskopischen Resektion

Nach den Empfehlungen der S3-Leitlinie für Magenkarzinome (Möhler 2012) soll eine Kontroll-Endoskopie im ersten Jahr alle drei Monate, im zweiten Jahr alle sechs Monate und danach jährlich erfolgen. Bei Irresektabilität eines lokal begrenzten Karzinoms oder bei funktioneller Inoperabilität des Patienten kann eine Radiochemotherapie mit kurativem Ziel durchgeführt werden. Bei lokalisierten Adenokarzinomen des Magens oder des ösophagogastralen Übergangs mit Kategorie uT2 kann, mit Kategorie T3 und resektablen T4a soll eine präoperative Chemotherapie durchgeführt und postoperativ fortgesetzt werden. Das Ziel der neoadjuvanten Chemotherapie ist das sog. Downstaging des fortgeschrittenen Tumors und damit die Verbesserung der Resektabilität und des Überlebens. Studien beschreiben, dass eine neoadjuvante Chemotherapie mit darauf folgender Resektion mit einem besseren Überleben einhergeht, als die Operation alleine, trotz der Tatsache, dass mehr als 50% der Patienten Nonresponder sind.

Bei der MAGIC-Studie wurden 503 Patienten mit einem Magenkarzinom in zwei Gruppen geteilt, wobei bei 253 Patienten eine totale Gastrektomie durchgeführt wurde und 250 Patienten begleitend zur Magenresektion eine Chemotherapie erhielten. Die neoadjuvant behandelten Tumoren waren bei der Operation signifikant kleiner. Das 5-Jahres-Überleben war bei der chemotherapierten Gruppe signifikant höher als bei der nicht chemotherapierten Gruppe. Eine perioperative Chemotherapie führt also verglichen mit einer alleinigen Resektion zu einem signifikant erhöhten Überleben (Cunningham et al. 2006) (Ott et al. 2003). Eine totale oder subtotale Regression nach neoadjuvanter Chemotherapie wurde in 20% der Fälle beobachtet und korreliert mit den Merkmalen des downstaging's wie ypT-Kategorie, ypN-Kategorie und mit der Häufigkeit der R0-Resektion. Die Unterscheidung von Responder und Nonresponder liefert einen wichtigen, unabhängigen prognostischen Faktor für das Überleben. Es besteht eine signifikante Assoziation zwischen histomorphologischen Parametern und dem Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie. Tumoren des proximalen Drittels zeigten öfter ein Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie als Tumoren im distalen Drittel. Gut und mäßig differenzierte Karzinome, und Tumoren vom intestinalen Typ zeigten häufiger eine totale oder subtotale Regression (Becker et al. 2011).

Nach einer präoperativen Chemotherapie und anschließender Operation sollte die Chemotherapie postoperativ fortgesetzt werden. Nach primärer R0-Resektion (ohne präoperative Chemotherapie)

sollte keine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden.

Eine palliative medikamentöse Tumorthherapie sollte zum frühest möglichen Zeitpunkt nach Diagnosestellung der lokal fortgeschritten inoperablen oder metastasierten Erkrankung eingeleitet werden. Die systemische Chemotherapie erfolgt mit einer Kombination 5-FU, Platin und oralen Fluoropyrimidinen (Möhler 2012). Vor dem Einsatz einer palliativen medikamentösen Tumorthherapie sollte der HER2-Status bestimmt werden. Die ToGA-Studie, eine internationale, randomisierte, Phase 3 Studie zeigte eine Überlegenheit der Therapie mit Trastuzumab (einen monoklonalen Antikörper gegen HER2) in Kombination mit Chemotherapie gegenüber nur Chemotherapie in HER2-positiven, fortgeschrittenen Magenkarzinomen. Das mediane Gesamtüberleben war signifikant besser in der Trastuzumab-Gruppe als in der nur chemotherapierten Gruppe. Somit gilt die Behandlung mit Trastuzumab als eine neue Therapieoption bei den HER2-positiven, fortgeschrittenen Magenkarzinomen (Bang et al. 2010).

## 1.2 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist ein weit verbreiteter und evolutionär konservierter Signaltransduktionsweg. Er ist in den meisten mehrzelligen Organismen vorhanden, ist in die Kontrolle der Zellproliferation, des Überleben, der Apoptose, der Selbsterneuerung von Stammzellen und in die postnatale Gewebsdifferenzierung involviert und beeinflusst dadurch die Entwicklung und die Funktion von vielen Organen. Notch spielt eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese, bei der Entwicklung von Krebsstammzellen, bei der Angiogenese, außerdem bei der epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Entdeckt wurde der Notch-Rezeptor von Thomas Hunt Morgan im Jahre 1917, der eine Mutation bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* festgestellt hat, die zu Kerben (notches) auf den Flügeln führte (Espinoza und Miele 2013; Wang et al. 2010).

Bei Säugetieren und Menschen wurden 4 Notch Rezeptoren (Notch1-4) und 5 Liganden (JAG1, JAG2, Delta-like 1, Delta-like 3, Delta-like 4) identifiziert. Der Signalweg wird durch eine Rezeptor-Liganden-Interaktion benachbarter Zellen aktiviert. Nach der Bindung erfolgt eine proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors durch die Metalloproteinase Tumornekrose Faktor-alpha-converting Enzym (TACE). Es folgt eine weitere Spaltung durch den Presenilin-gamma-Sekretase Komplex wodurch die Notch intrazelluläre Domäne (NICD) abgespaltet wird und in den Nukleus gelangt. NICD aktiviert im Nukleus einen Transkriptionskomplex, der die Transkription von Zielgenen, wie z.B.: CyclinD, MYC, Hes und Hey reguliert (Ranganathan et al. 2011; Andersson et al. 2011).

Die Deregulierung des Notch Signalweges kann unter anderem für die Krebsentwicklung eine Rolle spielen. Interessanterweise kann Notch kontextabhängig sowohl onkogen als auch anti-proliferativ

wirken. Über die anti-proliferative Wirkung wurde in wenigen Tumorentitäten wie im Hautkrebs, im hepatozellulären Karzinom, im Zervixkarzinom und im kleinzelligen Lungenkarzinom berichtet. In hämatoonkologischen Erkrankungen wie in der T-Zell lymphoblastischen Leukämie wurden Mutationen des Notch 1 Gens beschrieben. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass eine Deregulierung auch für die Entwicklung von soliden Tumoren von Bedeutung ist, wie z.B.: für das Prostatakarzinom (Santagata et al. 2004), Mammakarzinom (Reedijk et al. 2005) oder für das Glioblastom (Brennan et al. 2009). Notch begünstigt die Tumorentstehung einerseits durch Regulierung des Zellzyklus (Induktion der Expression von CyclinD1 und MYC, ein Protoonkogen) und andererseits durch Hemmung der Apoptose durch Herunterregulierung von p53 (reviewed in Demarest et al. 2008). Zusammen mit dem WNT-Signalweg ist Notch für die Ausbildung von Tumorstammzellen von Bedeutung (Nakamura et al. 2007). Notch Rezeptoren und Liganden werden in großer Zahl in den Blutgefäßen exprimiert, Studien deuten auf eine Rolle bei der Tumorangiogenese hin (Benedito et al. 2009). Bei der Krebsentstehung spielt das Phänomen der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) eine wichtige Rolle. Dabei durchlaufen Epithelzellen morphologische Veränderungen bis sie einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Herabgesetzte Zelladhäsion, stärkere Produktion von extrazellulärer Matrix, Migration und verstärkte Resistenz gegen Apoptose sind für die so entstandenen Zellen charakteristisch. EMT soll außerdem durch eine Verstärkung der Resistenz gegenüber Apoptose zur Entstehung des Tumorstammzellphänotyps beitragen und ist dadurch mit einer Chemotherapie-Resistenz assoziiert. Studien schreiben dem Notch-Signalweg für die EMT eine Bedeutung zu, indem die Expression von zwei Zielgenen (SNAIL und SLUG) hochreguliert wird, die wiederum die Expression von CDH1 (das Gen das für E-Cadherin kodiert) herunterregulieren. So wird die Adhäsion zwischen den Zellen herabgesetzt, was als Voraussetzung für die Metastasierung gilt (Leong et al. 2007). So zeigen beispielsweise Gemcitabin-resistente Pankreaskarzinomzellen eine erhöhte Expression von Notch-2 und JAG1 und einen EMT-Phänotyp mit niedrigeren Expression von E-Cadherin und eine erhöhte Expression von mesenchymalen Markern. Eine Herunterregulierung vom Notch zeigte eine partielle Umwandlung vom mesenchymalen zum epithelialen Phänotyp (Wang et al. 2009). Der Notch-Signalweg ist auch in der Entwicklung der Cisplatin-Resistenz beteiligt. Bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich zeigte sich eine erhöhte Notch-1 Expression, die mit der Cisplatin-Sensitivität negativ korreliert. Nach der Hemmung des Notch Signalweges wurde eine verringerte Resistenzrate festgestellt (Zhang et al. 2009; Gu et al. 2010). Auch bei anderen Chemotherapie-Resistenzen (Taxane, Tamoxifen, Oxaliplatin, Trastuzumab und Doxorubicin) wurde die Rolle des Notch Signalweges bestätigt (Wang et al. 2010). Deshalb wurden neue Strategien für die Optimierung des Therapieansprechens entwickelt, die den Notch-Signalweg beeinflussen sollen. Erfolgversprechende Ziele der Krebstherapie sind die gamma-Sekretase-Inhibitoren (GSIs) die die



Aktivierung des Signalweges verhindern. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass GSIs in verschiedenen Krebsarten, wie im Mammakarzinom, im hepatozellulären Karzinom, im Prostatakarzinom das Zellwachstum hemmen, Apoptose induzieren und somit das Chemotherapie-Ansprechen erhöhen können (Wang et al. 2010). Die beiden Notch-Rezeptoren Notch1 und Notch2 zeigen interessanterweise teilweise gegenläufige Funktionen innerhalb eines Tumors (Mazur et al. 2010b; Mazur et al. 2010a).

### **1.2.1 Der Notch-Signalweg beim Magenkarzinom**

Der Notch-Signalweg spielt auch in der Magenmukosa, bei der Differenzierung von Magenepithel in foveolare Drüsen eine wichtige Rolle. Notch1, Notch3, JAG1, JAG2 und Hes1 wurden im Isthmus der normalen Mukosa gefunden, dort, wo die Magenstammzellen vermutet werden. Notch hat einen Einfluss nicht nur auf die Differenzierung der normalen Mukosa sondern auch auf die Magenkarzinomzellen. Eine Expression von Notch1, Notch2 und Notch3 wurde in Magenkarzinomzellen nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass der Notch-Signalweg im Magenkarzinom aktiviert ist und die Differenzierung hemmt (reviewed bei Katoh und Katoh 2007). Eine Aktivierung des Notch-Signalweges über Cyclooxygenase-2 ist mit einer Tumorprogression assoziiert (Yeh et al. 2009b; Tseng et al. 2012).

In Magenkarzinomen wurde eine unterschiedliche Expression von Notch1 und Notch2 beschrieben. Notch1 findet man in der intestinalen Metaplasie und in gut differenzierten Magenkarzinomen vom intestinalen Typ. Es wurde gezeigt, dass Notch1 an der metaplastischen Umwandlung der Gewebe beteiligt ist und die koloniebildende Fähigkeit der Zelllinien begünstigt (Sun et al. 2011). Die epigenetisch regulierte Notch1-Hemmung ist mit Magenkarzinomen vom diffusen Typ assoziiert (Piazzi et al. 2011). Die mit DAPT (gamma-Secretase-Inhibitor) behandelten Magenkarzinom-Zelllinien AGS und MKN45 zeigten eine herunterregulierte Expression von Notch1 und damit eine verminderte Fähigkeit zur Migration und zur Proliferation (Li et al. 2014). Die Expression von Notch2 in der gesunden oder leicht entzündlichen Mukosa ist sehr niedrig, in den Magenkarzinomzellen ist sie aber deutlich erhöht, was darauf schließen lässt, dass auch Notch2 in der Pathogenese des Magenkarzinoms beteiligt ist (Sun et al. 2011).

## **1.3 Single nucleotide polymorphism**

Unter einem single nucleotide polymorphism (SNP) versteht man eine Variation eines Basenpaares im Genom, die bei mindestens 1% der Bevölkerung auftritt. Es handelt sich um Punktmutationen die

während der Evolution entstanden sind. SNPs bilden 90% der humanen genetischen Variationen und kommen etwa alle 100-300 Basenpaaren im Genom vor. Bei etwa 60% der SNPs wird Cytosin durch Thymin ersetzt. Liegt der Austausch in einer kodierenden Region (Exon), gibt es zwei Möglichkeiten: das neu entstandene Triplet kodiert für dieselbe Aminosäure und hat somit keine Konsequenz für das Protein (silent SNP) oder es kodiert für eine andere Aminosäure wodurch es zu Veränderungen im Protein kommt. Mögliche Folgen sind: Prädisposition für Erkrankungen, Unterschiede im Ansprechen auf Medikamente und in der Immunantwort (Brookes 1999) (Karki et al. 2015).

### 1.3.1 DNA-Polymorphismus im Notch2 Gen

Der SNP rs11249433 befindet sich in der perizentromeren Region vom Chromosom 1p11.2. In dieser Region sind innerhalb von 1MB fünf Gene lokalisiert, darunter auch das Notch2 Gen. Es wurde eine Assoziation zwischen rs11249433 und einer erhöhten Expression von Notch2 in Östrogen-Rezeptor positiven Mammakarzinomen ohne TP53 Mutationen gefunden. Die Risikogenotypen AG und GG sind mit einer erhöhten Notch2 Expression assoziiert ( $p=0,054$ ) (Fu et al. 2010).

Wu und Kollegen führten eine Metaanalyse von 15 Studien durch, die die Assoziation zwischen dem SNP und dem Auftreten eines Mammakarzinoms untersuchten. Insgesamt wurden 90154 Patienten und 137238 Kontrollen mit verschiedenem ethnischen Hintergrund analysiert. Es wurde ein großer Unterschied in der Verteilung des G-Allels zwischen den unterschiedlichen ethnischen Gruppen gefunden. Bei Kaukasier beträgt die Häufigkeit des G-Allels 0,40, bei den Ost-Asiaten 0,03 und bei den Afrikaner 0,12. Die Odds-Ratio (OR) für den Polymorphismus rs11249433 und der Entwicklung eines Mammakarzinoms beträgt 1,09 bei Behandlung aller Ethnizitäten. Nach der Bildung von Subgruppen entsprechend der Ethnizität zeigte sich, dass nur Kaukasier mit dem G-Allel ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms besitzen, in den ost-asiatischen und afrikanischen Subgruppen wurde keine Assoziation zur Brustkrebs-Entwicklung entdeckt. Der SNP erhöht das Risiko für die Entwicklung von Östrogen-Rezeptor positiven (ER+) Tumoren (Wu et al. 2013). Eine weitere Arbeit beschrieb, dass der Genotyp G mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Mammakarzinomen mit einer niedrigen E-Cadherin Expression assoziiert ist. Die SNP-Träger entwickelten am häufigsten ER-positive, lobuläre Mammakarzinome (Horne et al. 2014).

## 2. Fragestellung der Arbeit

Eine neoadjuvante Chemotherapie führt verglichen mit alleiniger Gastrektomie zu einem signifikant erhöhten Überleben und ist inzwischen eine bewährte Behandlungsform für fortgeschrittene Magenkarzinome (Cunningham et al. 2006). Da jedoch eine hohe Anzahl der Magenkarzinom-Patienten nicht auf die Chemotherapie anspricht, besteht ein Bedarf an Marker und Faktoren die ein Therapieansprechen vorhersagen und so die Therapie optimieren und den Nonrespondern die Chemotherapie ersparen können. Der Notch-Signalweg ist durch verschiedene Mechanismen in der Karzinogenese und in der Entwicklung von Chemotherapie-Resistenzen beteiligt. In Magenkarzinomen wurde eine Chemotherapie-assoziierte signifikante Erhöhung der Notch2-Genexpression beschrieben (Bauer et al. 2012). In vorangegangenen Arbeiten wurde außerdem über eine Assoziation zwischen den SNP rs11249433 und der Notch-Genexpression berichtet (Fu et al. 2010).

In dieser Studie wurde die Rolle der Notch2-Genexpression und des mit dem Notch2-Gen assoziierten Polymorphismus rs11249433 untersucht.

Ziel dieser Studie war es, folgende Fragen zu beantworten:

1. Besteht eine Assoziation zwischen dem Polymorphismus rs11249433 und dem klinischen und histopathologischen Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie?
2. Besteht eine Assoziation zwischen den Genotypen des Polymorphismus und dem Überleben neoadjuvant behandelter Magenkarzinompatienten?
3. Besteht eine Assoziation zwischen der Notch2 Expression und den klinisch-pathologischen Charakteristika sowie dem Überleben der Patienten in primär resezierten Magenkarzinomen?
4. Besteht eine Assoziation zwischen dem Polymorphismus und der Notch2 Expression in den Tumoren?

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1 Patientenkollektive

##### 3.1.1 Patientenkollektiv allgemein: klinisch-pathologische Daten und Datenerhebung

Das Patientenkollektiv umfasst 179 an einem Magenkarzinom erkrankte Patienten, die neoadjuvant mit Chemotherapie behandelt wurden und 142 Patienten die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben. Die Patienten wurden im Zeitraum von 1992 bis 2010 behandelt.

Die klinisch-pathologischen Daten wurden aus dem klinikinternen pathologisch-klinischen Informationssystem gewonnen. Die Daten von 179 neoadjuvant chemotherapierten Patienten waren in der Doktorarbeit von Nils Henningsen bereits erhoben und mir zur Verfügung gestellt. (Henningsen 2009). Es wurden die Angaben zu Person, klinische Daten, pathologische Befunde, Daten zum Verlauf und Todesdaten ermittelt. Die Nachsorgedaten der 179 Patienten wurden von PD Dr. Novotny (Chirurgische Klinik der Klinikum rechts der Isar) zur Verfügung gestellt. Die Daten werden im Folgenden hier noch kurz dargestellt.

#### 3.2 Neoadjuvant behandelte Patienten

##### 3.2.1 Patienten und Einschlusskriterien

Einschlusskriterium für die Teilnahme an der Studie war bei den neoadjuvant chemotherapierten Patienten ein histologisch gesichertes Adenokarzinom des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs Typ 2 und 3 (AEG 2/3). Das Alter sollte bei Diagnosestellung zwischen 18 und 80 Jahre liegen. Die Patienten sollten ein *Eastern Cooperative Oncology Group-Status* von 0 oder 1 haben, außerdem ein klinisches T3/T4, cN0/+, cM0-Stadium besitzen und eine Peritonealkarzinose sollte mittels Laparoskopie ausgeschlossen werden. In einigen Fällen durften auch Patienten mit uT3/T4-, cN0/+-, cM1-Stadium an der Studie teilnehmen, wenn es anhand der Bildgebung möglich schien die Metastasen zu entfernen. Ein weiteres Kriterium war, dass die Patienten fit genug für eine neoadjuvante, platinbasierte Chemotherapie waren. Die Fitness wurde durch Risikoabschätzung anhand folgender Parameter festgestellt: die Leukozytenzahl sollte mehr als 4000/ $\mu$ l, Thrombozytenzahl mehr als 150.000/ $\mu$ l betragen, das Kreatininwert sollte unter 1,5 mg/dl liegen, Kreatininclearance mehr als 60 ml/min betragen und Bilirubin sollte unter 2mg/dl liegen. Die Patienten, die einen vorausgegangenen Zweittumor hatten, mit Ausnahme von semimalignen, behandelten Hauttumoren und in-situ-Karzinomen der Cervix uteri, wurden nicht in die Studie einbezogen. Zu den Ausschlusskriterien zählten außerdem Fernmeta-

stasen, Schwangerschaft, eine Lebenserwartung von weniger als 3 Monaten, eine histologisch gesicherte Peritonealkarzinose, vorausgegangene Chemo-, Strahlen-, und Lasertherapie, Stentanlagen, unkontrollierte Blutungen und eine Magenausgangsstenose, die eine parenterale Ernährung nötig machte.

### 3.2.2 Prätherapeutisches Staging

Im Rahmen des prätherapeutischen Staging wurde routinemäßig eine klinische Untersuchung, eine Blutabnahme mit Bestimmung des Differenzialblutbildes, der Tumormarker CEA, CA 19-9 und CA 72-4, der Gerinnungs-, und der Serumwerte durchgeführt. Es wurde auch eine Serumelektrophorese, eine Röntgenaufnahme des Thorax und eine Sonographie des Abdomens vorgenommen. Die Videoendoskopie und der endoluminale Ultraschall dienten der Feststellung der uT-Kategorie. Anhand der bei der Endoskopie gewonnenen Biopsien wurden die WHO-Klassifizierung, das Grading, und der Wachstumstyp nach Lauren von Pathologen des Klinikums rechts der Isar bestimmt. Um die Dicke der Magenwand beurteilen zu können, wurde bei den Patienten eine Computertomographie des Abdomens mit oralem oder intravenösem Kontrastmittel bei Vollfüllung des Magens durchgeführt. Bei Tumoren des proximalen Drittels des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs Typ 2 und 3 wurde außerdem ein CT des Thorax angeordnet. Eine Laparoskopie diente zum Ausschluss einer Peritonealkarzinose, dabei wurde die Bursa omentalis eröffnet und ein Leberultraschall durchgeführt. Zu Beginn und am Ende der Laparoskopie wurde eine abdominelle Lavage nach einem prospektiven Studienprotokoll vorgenommen. Weder konventionell zytologisch noch immunhistochemisch positive Tumorzellen führten zum Ausschluss aus der neoadjuvanten Therapie. Es erfolgte noch eine Echokardiographie, ein kardiologisches Konsil und eine Lungenfunktionsprüfung. Nach den Untersuchungen wurden die Patienten im Tumorboard vorgestellt, wo das interdisziplinäre Team die klinischen TNM-Stadien festlegte. Bei einem uT3/T4-, cN0/+-, cM0-Stadium oder bei einem cM+-Stadium (wenn die Fernmetastasen als potenziell resektabel erschienen), wurden die Patienten in das neoadjuvante Therapiekonzept und seit 1999 gegebenenfalls in die *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*-Studie - 40954 (EORTC) aufgenommen.

### 3.2.3 Neoadjuvante Chemotherapie

Bei einer neoadjuvanter Chemotherapie handelt es sich um eine Chemotherapie die vor der Operation durchgeführt wird. Die Chemotherapien bestanden aus 5-FU und aus einem Platinderivat. Der Großteil der Patienten erhielt eine Chemotherapie nach dem PLF (Cisplatin, Leucovorin und 5-FU) Schema, bei einigen Patienten wurde das PLF-Schema mit einem anderen Chemotherapeutikum (wie z.B.: Docetaxel, Paclitaxel oder Epirubicin) ergänzt. Ein kleiner Teil der Patienten erhielt statt Cisplatin Oxaliplatin.

In der Tabelle 2 sind die Anzahl der Patienten und jeweils ein Zyklus der einzelnen Therapieschemata aufgeführt. Die Dosisangaben beziehen sich auf die Körperoberfläche der Patienten.

**Tabelle 2: Übersicht über die Chemotherapieschemata und die Anzahl der behandelten Patienten**

	Chemotherapie				
	PLF-Schema	PLF + Docetaxel	PLF + Paclitaxel	PLF + Epirubicin	OLF-Schema
Anzahl der Patienten n (%)	131 (73)	17 (9)	14 (8)	9 (5)	8 (4)
Chemotherapeutika	Cisplatin 50 mg/m <sup>2</sup>	Cisplatin 50mg/m <sup>2</sup>	Cisplatin 50mg/m <sup>2</sup>	Cisplatin 50mg/m <sup>2</sup>	Oxaliplatin 85mg/m <sup>2</sup>
	Leucovorin 500mg/m <sup>2</sup>	Leucovorin 500mg/m <sup>2</sup>	Leucovorin 500mg/m <sup>2</sup>	Leucovorin 500mg/m <sup>2</sup>	Leucovorin 500mg/m <sup>2</sup>
	5-FU 2000mg/m <sup>2</sup>	5-FU 2000mg/m <sup>2</sup>	5-FU 2000mg/m <sup>2</sup>	5-FU 2000mg/m <sup>2</sup>	5-FU 2000mg/m <sup>2</sup>
		Docetaxel 40-50mg/m <sup>2</sup>	Paclitaxel 85mg/m <sup>2</sup>	Epirubicin 30mg/m <sup>2</sup>	

### 3.2.4 Beurteilung des Therapieansprechens

Das Therapieansprechen nach der neoadjuvanter Chemotherapie wurde anhand von zwei Kriterien beurteilt: a, der klinischen und b, der histopathologischen *Response*. Das klinische Therapieansprechen wurde durch das *Restaging* der Patienten nach dem ersten abgeschlossenen Chemotherapiezyklus erhoben. Außer der Laparoskopie wurden alle Staging-Untersuchungsschritte wiederholt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die klinische Responseevaluation erfolgte durch das interdisziplinäre Tumorboard am Klinikum rechts der Isar. Die entscheidenden Kriterien waren dabei die Abnahme der

Wanddicke und der kraniokaudalen Tumorausdehnung im CT um mindestens 50% sowie nur minimale Residuen oder komplette Rückbildung des Tumors in der Endoskopie. Wenn die Kriterien erfüllt wurden handelt es sich bei dem Patienten um einen klinischen Responder, wenn nicht dann um einen klinischen Nonresponder.

Das histopathologische Therapieansprechen wurde anhand der Kriterien von Becker (Becker et al. 2011) wie folgt ermittelt. Die resezierten Tumoren und Lymphknoten wurden nach einem festgelegten Protokoll aufgearbeitet. Die Größe der Magenkarzinome wurde makroskopisch erfasst. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Abstand von 0,5 cm von oral nach aboral in Paraffin eingebettet. Die von den Proben gewonnene Schnitte wurden routinemäßig HE, EvG und PAS gefärbt und anschließend mit dem Mikroskop befundet. Der histologische Typ, das Grading und der Wachstumstyp nach Laurén wurden entsprechend der Richtlinien der WHO bestimmt. Der ypTNM-Klassifikation und der Resektionsstatus wurden entsprechend den Vorgaben der UICC (Sobin et al. 2002) gestellt. Das Kriterium für die histopathologische Response besteht wenn die Anzahl der vitalen, residualen Tumorzellen im Verhältnis zum ursprünglichen Tumorgewebe kleiner als 10 % beträgt. Das bezeichnet man als Regressionsgrad 1a und 1b. Insgesamt werden drei Regressionsgrade unterschieden.

**Tabelle 3: Histopathologische Regressionsgrade**

Tumorregressionsgrad	Residualtumor	Histopathologisches Therapieansprechen*	n (%) = 172 (100%)
1a	0%	Responder	13 (8)
1b	<10%	Responder	36 (21)
1 (a oder b)		Responder	2 (1)
2	10-50%	Nonresponder	58 (34)
3	>50%	Nonresponder	63 (36)

\* die histopathologische Response wurde nur bei den operierten Patienten (n=172) bestimmt

### 3.2.5 Operation

Zwei bis drei Wochen nach Abschluss der neoadjuvanten Chemotherapie erfolgte die Operation. Bei Tumoren des mittleren und distalen Drittels wurde eine totale Gastrektomie mit D2-Lymphadenektomie durchgeführt. Der Resektionsrand lag oral im Bereich der anatomischen Kardia. Bei weit distal gelegenen Tumoren wurden auch die Lymphknotenstationen am Ligamentum hepatoduodenale, an der Aorta und am hinteren Pankreaskopf entfernt. Als Rekonstruktion wurde eine einfache Ösophagojejunostomie oder eine Ösophagojejunoplicatio nach Y-Roux durchgeführt.

Bei Tumoren des proximalen Drittels wurde eine transhiatal erweiterte Gastrektomie vorgenommen, wobei nach Eröffnung des Hiatus der distale Anteil des Ösophagus mitreseziert wurde. Der Resektionsrand lag auf Höhe der unteren Lungenvene, oder in Einzelfällen auf Höhe der Vena azygos. Standardmäßig wurde auch hier eine D2-Lymphadenektomie durchgeführt, die zusätzlich die Lymphknotenstationen am Milzhilus, der Arteria lienalis und paraaortal umfasste. Die Rekonstruktion erfolgte durch eine Ösophagojejunostomie nach Y-Roux.

Bei Adenokarzinomen des gastroösophagealen Übergangs Typ 2 wurde in Einzelfällen nach individueller Indikationsstellung eine transmediastinale Ösophagektomie vorgenommen, da die Tumoren bis weit in den Ösophagus hinein reichten. Die Rekonstruktion erfolgte durch einen Magenhochzug nach Schlauchmagenbildung im hinteren Mediastinum. In seltenen Fällen, bei weit nach proximal reichenden großen Tumoren erfolgte die Rekonstruktion durch ein Koloninterponat.

### **3.2.6 Tumornachsorge**

Die Tumornachsorge der Patienten erfolgte ambulant über das Tumortherezentrum des Klinikum rechts der Isar. Im ersten Jahr wurden die Nachsorgeuntersuchungen vierteljährlich, im zweiten und dritten Jahr halbjährlich und im vierten und fünften jährlich durchgeführt. Bei Rezidivfreiheit endete die Tumornachsorge nach 60 Monaten.

Die Tumornachsorge umfasste jeweils eine Anamnese, eine klinische Untersuchung, ein Röntgen Thorax, eine Sonographie des Abdomens, eine Ösophagogastroduodenoskopie, ein CT des Abdomens und Beckens und eine Blutabnahme mit Tumormarkerbestimmung (CEA, CA 19-9, CA 72-4). Bei Verdacht auf ein Rezidiv bei der Bildgebung wurde eine Biopsie zur histologischen Sicherung angestrebt. Die Nachsorgedaten lagen bei 179 CTX Patienten vor.

### **3.3 Geräte**

In Tabelle 4 sind die verwendeten Geräte, die Hersteller und die Methode, bei der das Gerät benutzt wurde, aufgeführt.



**Tabelle 4: Verwendete Geräte**

Bezeichnung, Name	Firma/ Firmensitz	Methode
Wärmeblock: Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf®/ Hamburg	DNA-Isolierung
Wärmeblock: Schuttron Thermoshaker TS-K	Wolf Laboratories Limited®/ York, UK	DNA-Isolierung
UV-Spektralphotometer: Nanodrop 2000C	Peqlab/ Erlangen	Bestimmung des DNA-Gehalts
PCR-Prozessor: GeneAmp®PCR System 9700	Applied Biosystems®, Weiter- stadt	PCR
PCR-Prozessor: Mastercycler gradient®	Eppendorf®/ Hamburg	PCR
Zentrifuge: Centrifuge 5415 D	Eppendorf®/ Hamburg	PCR
Elektrophoresekammer: Wide Mini Sub™ Cell	BIO-RAD® Laboratories/ Her- cules, CA, USA	Gelelektrophorese
Spannungsgerät: Power Pac 300®	BIO-RAD® Laboratories/ Her- cules, CA, USA	Gelelektrophorese
Digitale Bilddokumentation: Eagle Eye™	Stratagene®/ La Jolla, CA, USA	Gelelektrophorese
Zentrifuge: Centrifuge 5417 R	Eppendorf®/ Hamburg	DNA-Aufreinigung
Sequenziergerät: 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems®/ Darm- stadt	DNA-Sequenzierung
Real Time PCR Gerät: Light Cycler®480.2	Roche/ Basel, Schweiz	HRM-Analyse
DHPLC: WAVE® DNA Fragment Analy- sis System	Transgenomic/ Crewe, UK	DHPLC

### 3.4 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 5 sind die verwendeten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien, die herstellende Firma und die Methode, bei der die Substanz verwendet wurde, aufgeführt.

**Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung, Name	Firma/ Firmensitz	Methode
Proteinase K	Roche®/ Basel, Schweiz	DNA-Isolierung
Isopropanol 100%	Technische Befüllanlage Pa- thologie/ München	DNA-Isolierung
Ethanol 96, 70, 50%	Technische Befüllanlage Pa- thologie/ München	DNA-Isolierung
PCR-Reaktionsgefäße: PCR tubes 0,5 ml	Biozym®/ Oldendorf	PCR
DNA-Polymerase: Ampli Taq Gold®	Applied Biosystems®/ Weiter- stadt	PCR
Nukleotide: dNTPs 200µM	Applied Biosystems®/ Weiter- stadt	PCR
Agarose	Biozym®/ Oldendorf	Gelelektrophorese
Ethidiumbromid	Amresco/ Ohio, USA	Gelelektrophorese
Molekulargewichtsmarker: Φ174X =Hae 3	Fermentas®/ Burlington, Can- ada	Gelelektrophorese
PCR-Reinigungskit: QIAquick® PCR Purification Kit	Quiagen®/ Hilden	DNA-Sequenzierung
PCR-Reinigungskit: QIAGEN® Dye Ex 2.0 Kit Spin	Quiagen®/ Hilden	DNA-Sequenzierung
Big Dye Terminator Cycle Se- quencing Kit Version 1.1	Applied Biosystems®/ Weiter- stadt	DNA-Sequenzierung
Reaktionsgefäße: Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf®/ Hamburg	DNA-Isolierung
Light Cycler® 480 High resolu- tion Melting Master	Roche/ Basel, Schweiz	HRM-Analyse
96-er Well-Platte		HRM-Analyse
Wasserfiltrationsanlage für HPLC	Millipore/ Eschborn	DHPLC
Acetonitril	Sigma/ Deisenhofen	DHPLC

### 3.5 Puffer und Lösungen

In Tabelle 6 sind die verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet.

**Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen**

<u>Proteinase K-Puffer</u>	<u>Herstellung des Proteinase K-Puffers</u>
50mM Tris/HCl (pH 8,5)	Ansatz für 1 l: 50 ml 1M TRIS-HCl (pH 8,3)0,05
1mM EDTA (pH 8,0)	2ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
0,5% Tween 20 (pH 8,0)	Pro 50 ml 250µl TWEEN 20
	Der Puffer wird steril filtriert
<hr/>	<hr/>
<u>PCR-Puffer</u>	<u>Herstellung des PCR-Puffers (10fach)</u>
10mM Tris-HCl (pH 8,3)	20 ml Tris-HCl, 1M (pH 8,3)
50mM KCl	100 ml KCl, 1M
0,01% Gelatine	200mg Gelatine
1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	80 ml H <sub>2</sub> O (Millipore)
	Ad 48 ml:
	Für 10 mM-Puffer: 480 µl MgCl <sub>2</sub> , 1M
	Für 15 mM-Puffer: 720 µl MgCl <sub>2</sub> , 1M
	Für 20 mM-Puffer: 960 µl MgCl <sub>2</sub> , 1M
<hr/>	<hr/>
<u>TE-Puffer</u>	<u>TBE-Puffer (10-fach)</u>
10 mM Tris (pH 8,0)	1,0 M Tris
1mM EDTA (pH 8,0)	0,9 M Borsäure (pH 8,0)
	0,01 M EDTA
<hr/>	<hr/>
<u>DHPLC-Puffer</u>	
<u>Puffer A</u>	<u>Puffer B</u>
50 ml TEAA (2M)	50 ml TEAA (2M)
250 µl Acetonitril	250 ml Acetonitril
Ad 1000 ml HPLC-Wasser	Ad 1000 ml HPLC-Wasser
<u>Puffer C</u>	<u>Puffer D</u>
750 ml Acetonitril	80 ml Acetonitril
250 ml HPLC-Wasser	Ad 1000 ml HPLC-Wasser

### 3.6 Primer

Für die Genotypisierung wurden zwei verschiedene Primer benutzt, die von der Firma Sigma® hergestellt wurden. Die Tabelle 7 gibt die Primersequenzen, die Annealingtemperaturen, und die Produktlänge wieder.

#### **Tabelle 7: Primersequenzen, Annealingtemperaturen und Produktlänge**

Primer 1. für PCR : Notch 2 SNP rs 11249433

Primer 1. vorwärts: 5'-TTGTTCTAAAACAGATTAATGAC-3'

Primer 1. rückwärts: 5'-TTGGAAAACCTTTAGCCAGAG-3'

Produktlänge: 203 bp

Primer 1. wurde bei der DNA-Sequenzierung verwendet.

Die Annealing-Temperatur betrug bei der PCR 55°C und bei der Cycle PCR 57°C.

Primer 2. für DHPLC und HRM-Analyse: Notch 2 SNP rs 11249433

Primer 2.vorwärts: 5'-AGAAAGCAGGGCTGGGTTTA-3'

Primer 2. rückwärts: 5'-TTCCTGCTGGTACATCCATTACA-3'

Produktlänge: 161 bp

Primer 2.wurde zur DHPLC und zur HRM-Analyse benutzt.

### 3.7 DNA-Isolierung

Für die Genotypisierung wurde die DNA aus Lymphozyten von EDTA -Blut (n=145) und aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebe (n=106) isoliert. Insgesamt war die DNA von 145 Patienten bereits vorhanden und wurde mir zur Verfügung gestellt. Von 59 Patienten wurde die DNA im Rahmen dieser Arbeit von mir extrahiert.

#### **3.7.1 Isolierung aus Blutlymphozyten**

Die DNA aus Lymphozyten von EDTA-Blut war mit Hilfe des FlexiGene DNA Kit von Qiagen® nach den Angaben des Herstellers isoliert.

### 3.7.2 Isolierung aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebe (FFPE)

Zuerst wurden aus den FFPE-Gewebestücken 8 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Entparaffinierung erfolgte durch Xylol und durch die absteigende Alkoholreihe, anschließend wurden die Proben mit Hämalaun gefärbt. Die Schritte sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8: Entparaffinierung in absteigender Alkoholreihe und Färbung mit Hämalaun**

Xylol	10 min
Isopropanol 100%	5 min
Ethanol 96%	5 min
Ethanol 70%	5 min
Ethanol 50%	5 min
Aqua dest.	5 min
Hämalaun	20-30 sec
Fließendes Leitungswasser	10 min
Aqua dest.	abspülen
TE-Puffer	abspülen
Trocknen lassen	

Das nicht-tumoröse Gewebe wurde von einem Pathologen markiert und mit einem Skalpell abgetragen. Das Material wurde dann in 200 µl Proteinase K- Puffer überführt. Proteinase K wurde bis zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugegeben und über Nacht im Schnippschüttler bei 55 °C inkubiert. Wenn am nächsten Tag nicht alles verdaut war, wurde nochmals Proteinase K zugegeben. Zur Inaktivierung von Proteinase K wurde die Lösung 10 Minuten lang gekocht. Die Stocklösungen wurden bei -20°C gelagert.

### 3.7.3 Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes

Nach der DNA-Isolierung erfolgte standardmäßig die Verdünnung der Stocklösungen in Gebrauchslösungen. Dazu wurde der DNA-Gehalt mit dem UV-Spektralphotometer bestimmt. Das Gerät misst die UV-Absorption bei 260 nm, da hier die Absorption der DNA am höchsten ist. Die Verdünnung erfolgte mit TE-Puffer. Für die PCR wurde eine Gebrauchslösung mit 20 ng/µl DNA-Konzentration, für die HRM-Analyse mit 4 ng/µl hergestellt.

### 3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Der PCR-Prozess besteht aus drei Schritten, die in den automatisierten Thermocyclern durchgeführt und in der Regel 35-45-mal wiederholt werden.

Der erste Schritt ist die Denaturierung (Melting, Schmelzen). Die doppelsträngige DNA wird auf eine Temperatur von 94-96°C erhitzt, dabei lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden Stränge miteinander verbinden.

Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung der Primer (Annealing). Ein sehr wichtiger Faktor ist die Annealing-Temperatur, bei der die Bedingungen zur Anlagerung am besten sind. Die optimale Temperatur wird durch die Länge und die Sequenz der Primer bestimmt (ein höherer GC-Gehalt bedeutet mehr Wasserstoffbrückenbindungen und braucht somit eine höhere Annealing-Temperatur). Mit einem PCR-Gradientencycler könnten verschiedene Annealing-Temperaturen gleichzeitig getestet werden und so die optimale Annealing-Temperatur bestimmt werden.

Im dritten Schritt, der Elongation, füllt die thermostabile DNA-Polymerase beginnend von den gebundenen Primer in der 5'-3'-Richtung die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auf. Die optimale Temperatur hängt vom Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase ab, sie liegt zwischen 68-72°C. Ein neues Erhitzen stoppt die Synthese, es kommt wieder zur Denaturierung und ein neuer Zyklus beginnt, wobei die DNA-Sequenz wieder verdoppelt wird. Bei 35-45 Wiederholungen vervielfältigt sich der DNA-Abschnitt um den Faktor  $10^6$ - $10^7$ . Am Ende des Programms werden die PCR-Produkte auf 4 °C abgekühlt, somit wird die Amplifikation gestoppt. Den PCR-Ansatz zeigt Tabelle 9.

**Tabelle 9: PCR-Ansatz mit verwendeten Puffern**

H <sub>2</sub> O	15,25 µl
PCR-Puffer	2,5 µl (20 mM MgCl <sub>2</sub> )
dNTPs	4,0 µl (200 µM)
Primer 1 vorwärts	0,5 µl (20 pmol/µl)
Primer 2 rückwärts	0,5 µl (20 pmol/µl)
Ampli Taq Gold Polymerase	0,25 µl (5U/µl)
DNA-Template	2,0 µl (20ng/µl)

Um eine eventuelle Verunreinigung der Proben erkennen zu können, wurde immer eine Negativkontrolle ohne DNA mitgeführt. Außerdem wurden bei jedem Lauf Positivkontrollen, deren Basenabfolge und Länge schon durch Sequenzierung festgestellt wurde, verwendet. Die Schritte des PCR-Programms sind in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10: PCR-Programm**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	94°C	30 s	35
Annealing	55°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s	
Extension	72°C	7 min	1
Aufbewahrung	4°C	∞	

### 3.9 Gelelektrophorese

Der Nachweis der DNA erfolgt durch die Gelelektrophorese. Durch diese Methode werden die PCR-Produkte nach ihrer Ladung und Größe getrennt. Das Prinzip beruht darauf, dass die DNA aufgrund der Phosphatreste negativ geladen ist und unter Gleichspannung zur Anode wandert. Durch die Gelmatrix, die Agarose enthält, werden die Moleküle der Größe nach aufgetrennt. Das 2% Agarosegel enthält 2 mg Agar, 100 ml TBE-Puffer und einen Tropfen Ethidiumbromid. Das Ethidiumbromid interkaliert in die Basen der DNA und fluoresziert unter UV-Licht. Die Elektrophorese wird für 35-40 Minuten bei 120 Volt durchgeführt. Mit dem Bildanalyse-System wurde unter UV-Licht die DNA aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht. Die Länge der DNA-Fragmente wird mit einem standardisierten Molekulargewichtsmarker kontrolliert.

### 3.10 DNA-Sequenzierung

Bei der DNA-Sequenzierung wird die Didesoxymethode nach Sanger verwendet. Diese enzymatische Methode wird auch Kettenabbruch-Synthese genannt. Der DNA-Abschnitt wird entweder mit dem Vorwärts- oder Rückwärtsprimer vervielfältigt. Die DNA-Doppelhelix wird durch Hitze denaturiert, es entstehen Einzelstränge. Danach werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide dazugegeben. Bei einem Teil der Nukleotide handelt es sich um Didesoxynukleotide, das bedeutet dass sie keine 3'-Hydroxygruppe besitzen. Werden die ddNTPs eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch, da die Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids nicht anknüpfen kann. So entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Die Enden sind mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, die den jeweiligen Basen, A, T, G, C entsprechen, markiert. Die Amplifikate werden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, dann mit einem Laser detektiert und durch die entsprechende Software in die DNA-Sequenz überführt. Zur DNA-Sequenzierung haben wir den Big-Dye® Terminator-Kit-Version-1.1 verwendet. Nach der PCR wurden die Amplifikate mit dem QIAquick® PCR Purification Kit nach dem Protokoll des Herstellers Qi-

agen®aufgereinigt. Dabei wurden die Primer des PCR-Ansatzes entfernt. Die Ausbeute wird mittels Gelelektrophorese überprüft. Bei der nachfolgenden Cycle-PCR wurden die fluoreszenzmarkierten ddNTPs hinzugefügt. Die Annealing-Temperatur wurde aufgrund des unterschiedlichen G-C, A-T Gehaltes der Primer folgendermaßen festgelegt: für die DNA-Basen Adenin und Thymin gibt man jeweils 2°C und für Cytosin und Guanin jeweils 4°C. Von der Summe zieht man 5°C ab, die Temperatur beträgt höchstens 60°C. Den Ansatz und den Ablauf der Cycle-PCR zeigen die Tabellen 11 und 12.

**Tabelle 11: Ansatz für die Cycle-PCR**

DNA	8-9 µl bei DNA aus Blut, 12-14 µ bei DNA aus Gewebe ( je nachdem wie stark die Bande in der Gelelektrophorese war)
Primer	1 µl (1:4 verdünnt) (10 pmol/ µl)
Premix	3 µl
Big Dye Sequencing Buffer (10fach)	2 µl
H <sub>2</sub> O	Ad 20 µl

**Tabelle 12: Cycle-PCR-Ablauf**

Initiale Denaturierung	96°C	1 min
25 Zyklen	96°C	10 s
	Annealing-Temperatur: 57°C	5 s
	60°C	4 min
Endtemperatur	4 °C	

Die durch den Kettenabbruch unterschiedlich langen Fragmente wurden mit dem 3130-Genetic-Analyzer®-Sequenzier aufgetrennt und die Basenabfolge lasergestützt festgestellt.

### 3.11 Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Die denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (DHPLC) ist eine schnelle Detektionsmethode für Mutationen, auch wenn man deren Art und Stelle nicht kennt. Das darunterliegende Prinzip ist folgendes: Personen, die eine heterozygote Mutation aufweisen, besitzen Wildtyp und mutierte DNA im 1:1 Verhältnis. Während der PCR werden die Proben auf 94°C erhitzt und danach langsam abgekühlt. Bei 94°C denaturieren die DNA-Stränge und beim Abkühlen lagern sie sich wieder zu Doppelsträngen zusammen, somit erfolgt eine Hybridisierung. Nach dem Abkühlprogramm wird die Probe Heteroduplizates und Homoduplizates enthalten. Bei Homoduplizates handelt es sich um komplementäre



Einzelstränge, die Heteroduplexe erhalten aber Fehlpaarungen, wie z.B.: A-C oder G-T. Die DNA wird an eine Chromatographiesäule gebunden. Da die DNA negativ und hydrophil ist braucht sie das amphiphile TEAA (Triethylammoniumacetat) als Brückenmolekül. TEAA bindet mit einem positiven Ammoniumion an die negativ geladene Phosphation der DNA und damit bindet der ganze Komplex mit dem hydrophoben Teil des TEAA an die Säule. Durch eine kontinuierliche Erhöhung der Acetonitrilkonzentration werden die DNA-Fragmente von der Säule verdrängt, da die Bindung zwischen Säule und TEAA gelöst wird. Bei einer optimalen Temperatur lösen sich die Heteroduplexe früher von der Säule als die Homoduplexe, da ihre Doppelstränge wegen der Fehlpaarung nicht so stabil sind als die komplementären Stränge der Homoduplexe. Ein eingebauter UV-Detektor misst die abgelösten DNA-Fragmente bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Daten werden von dem Computer als Absorption-Zeit Chromatogramm dargestellt.

Bei den Heteroduplexen sollten idealerweise im Diagramm vier Peaks erscheinen, zwei Homoduplex-, und zwei Heteroduplex-Peaks. Die Unterschiede sind aber meistens so gering, dass die beiden Homoduplex-Peaks und die beiden Heteroduplex-Peaks jeweils zu einem Intensitätsmaximum verschmelzen. So sieht man bei den heterozygoten Mutationsträgern zwei Peaks, die frühere durch die Heteroduplexe, die spätere durch die Homoduplexe und bei den Homozygoten nur einen. Bei einem Peak im Chromatogramm kann es sich um den Wildtyp aber auch um einen homozygoten Mutationsträger handeln. In diesem Fall mischt man Wildtyp-DNA zu der Probe und lässt die Analyse noch einmal ablaufen. Wenn jetzt nur ein Peak zu sehen ist, handelt es sich um den Wildtyp, wenn aber zwei Peaks auftauchen handelt es sich um die homozygote Mutation.

Die Analyse wurde mit dem WAVE® DNA Fragment Analysis System durchgeführt. Anhand der zu analysierenden DNA-Sequenz berechnet die Software WAVEMAKER die Laufzeit, die Schmelztemperatur, die Pufferkonzentrationen und die Puffergradienten.

**Tabelle 13: DHPLC-Methode**

Zeit	Puffer A	Puffer B	Puffer C
0,0 min	59 %	41 %	0 %
0,1 min	54 %	46 %	0 %
9,1 min	36 %	64 %	0 %
9,2 min	0 %	0 %	100 %
9,7 min	0 %	0 %	100 %
9,8 min	59 %	41 %	0 %
11,8 min	59 %	41 %	0 %

### 3.12 Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse

Bei den größten Teil unseren DNA-Proben wurde die Genotypisierung mittels hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (High Resolution Melt, HRM) durchgeführt. Diese Methode eignet sich besonders gut zur Detektion von Mutationen und Polymorphismen in der doppelsträngigen DNA, da sie sehr schnell und sensitiv ist. Als erster Schritt erfolgt eine Polymerase-Kettenreaktion wo der DNA-Abschnitt amplifiziert wird. Nach der PCR beginnt die HRM-Analyse. Dabei wird das PCR-Produkt von etwa 50°C auf etwa 95°C erhitzt. Bei einer bestimmten Temperatur denaturiert der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge. Diese Schmelztemperatur ist von der Basenabfolge, von der Länge und vom GC-Gehalt abhängig. Bei einer Mutation oder einem Polymorphismus unterscheiden sich die beiden DNA-Stränge voneinander, es kommt zur Ausbildung von Heteroduplexen und zu einer früheren Trennung der Stränge. Der heterozygote Typ, die sogenannte Heteroduplex, schmilzt somit zuerst und dann die beiden Homoduplexe. Dieser Prozess wird in „real-time“ gemessen. Dazu benutzt man einen interkalierenden fluoreszierenden Farbstoff, und zwar SYBR Green 1, das sich spezifisch an doppelsträngige DNA bindet und erst dann fluoresziert. Wenn sich die beiden DNA-Stränge voneinander gelöst haben sinkt die Fluoreszenz-Emission. Am Anfang der Analyse ist die Fluoreszenzintensität hoch und sinkt bei Erhöhung der Temperatur ab. Das Real Time PCR Gerät besitzt eine Kamera und misst die Emission. Die Methode hat eine sehr hohe Auflösung und Fluoreszenzunterschiede können auch bei sehr kleinen Temperaturunterschieden gemessen werden. Die Daten werden in einer Graphik als Schmelzkurve sichtbar gemacht. Die Tabellen 14 und 15 zeigen den Ansatz und den Ablauf der HRM-Analyse.

**Tabelle 14: HRM-Analyse 20 µl Ansatz**

Mix	10 µl
Primer 1 vorwärts (10 pmol/µl)	0,4 µl
Primer 2 rückwärts (10 pmol/ µl)	0,4 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,4 µl
H <sub>2</sub> O	1,8 µl
DNA (4 ng/µl)	5 µl (20 ng)

**Tabelle 15: HRM-Analyse Ablauf**

	Temperatur	Zeit
Aktivierung	95°C	15 min
Amplifikation 45 Zyklen	95°C	15 s
	62°C	12 s
	72°C	20 s
HRM	96°C	60 s
	36°C	30 s
	65°C	2 s
	95°C	continuous
Cool	40°C	10 s

### 3.13 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung ist eine Methode, mit der Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Damit kann bestimmt werden ob ein Protein in einem Gewebe vorhanden ist, und wenn ja, in welchem Teil der Zelle es lokalisiert ist. Diese Methode dient auch der Identifikation und Klassifizierung von Tumorzellen, die bestimmte Antigene exprimieren. Der Nachweis von Proteinen erfolgt durch die spezifische Bindung von Antikörpern zum Antigen, als Antigen-Antikörper-Reaktion. Antikörper sind Serumproteine die nach Antigenkontakt von den Plasmazellen gebildet und spezifisch gegen das Antigen gerichtet sind, in unserem Fall gegen das Protein Notch2. Diese Art von spezifischen Antikörpern bezeichnet man als Primär-Antikörper. Sie sollen sich durch hohe Spezifität und Affinität auszeichnen. Der Primär-Antikörper ist mit einem Nachweissystem gekoppelt, somit wird er im Präparat sichtbar gemacht. Dazu verwendet man markierte Sekundär-Antikörper, die gegen eine bestimmte Tierart gerichtet sind. Wenn die gesuchten Antigene mit einem primären Antikörper aus der Maus inkubiert wurden, kann man sie mit einem markierten Anti-Maus-Sekundär-Antikörper nachweisen. Mehrere Methoden stehen zur Verfügung um die Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen. Die von uns benutzte Streptavidin-Biotin-Methode nutzt die starke Affinität von Streptavidin (ein aus vier identischen Untereinheiten aufgebautes Protein aus Streptomyzeten) für Biotin zur Kopplung des enzymmarkierten (Peroxidase-markierten) Streptavidins an biotinylierten Sekundär-Antikörper. Bei der Reaktion bindet das enzymgekoppeltes Streptavidin kovalent an den Sekundär-Antikörper. Als Enzym wird Meerrettichperoxidase verwendet. In Gegenwart von Meerrettichperoxidase kommt es mit Hilfe von einem Farbstoff (Chromogen) zu einer Färbereaktion.

### 3.13.1 Durchführung der Färbung

Als erster Schritt wurden aus dem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe 2 µm dicke Schnitte angefertigt und über Nacht im Brutschrank bei 60°C getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Schnitte durch die Alkohol-Reihe entparaffiniert.

**Tabelle 16: absteigende Alkoholreihe**

2 x 10 min	Xylol
2 x 5 min	Isopropanol
2 x 5 min	Ethanol 96 %
2 x 5 min	Ethanol 70%
2 x 5 min	Ethanol 50%
2 x	In aqua dest. spülen
2 x	In TRIS-Puffer (pH=7,6) spülen

Auf die Entparaffinierung folgte die Vorbehandlung zur Antigendemaskierung um das Antigen für den Antikörper zugänglich zu machen und eine Immunreaktivität mit dem Antikörper zu gewährleisten. Als Vorbehandlung zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in Citratpuffer (pH 6.0) 7 Minuten lang im Dampfkochtopf gekocht. Bei dieser Hitzevorbehandlung (*Retrieval*) im 91-95°C heißen Puffer werden die Fixierungen wieder gelöst, die Antigene werden freigelegt und können von den spezifischen Antikörpern erkannt werden.

Endogene Enzyme müssen inaktiviert werden, um eine falschpositive Färbereaktion zu verhindern. Die endogene Peroxidase wurde durch 10 min langen Inkubation in 50 ml TRIS-Puffer + 5 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockiert. Nachher wurde der Schnitt dreimal mit TRIS-Puffer abgespült, dadurch wurden die nicht gebundene Antikörper entfernt und somit ein störender Hintergrund reduziert. Nach der Spülung erfolgte die Blockierung von unspezifischen Bindungen mit 5% Ziegen Serum in einer speziellen Antikörperverdünnungslösung (*Antibody Diluent*) 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.

Der Primär-Antikörper Notch 2 wurde mit *Antibody Diluent* von DAKO 1:20 verdünnt und auf den Objektträger gegeben (ca. 100-250 µl pro Objektträger) und anschließend eine Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut dreimal mit TRIS-Puffer abgespült. Die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:100 für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Als nächster Schritt erfolgte wieder die dreimalige Spülung mit TRIS-Puffer.

Nach dem Auftropfen des Streptavidin-Peroxidase Komplexes wurde der Schnitt erneut 30 Minuten

lang in der feuchten Kammer inkubiert. Bevor das Chromogen DAB dazugegeben wurde, wurde der Schnitt wieder dreimal mit TRIS-Puffer gespült. 100-250 µl DAB Chromogen wurden pro Schnitt dazugegeben, anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In Gegenwart des Enzyms Peroxidase und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bildet DAB ein braunes Endprodukt.

Die Farbreaktion wurde mit aqua dest. gestoppt. Die Kerne wurden 30 sec lang mit Hämalan gegengefärbt und dann 1-2 Minuten lang im lauwarmen Leitungswasser gebläut.

Die Schnitte wurden von 70% Ethanol zu Xylol durch die Alkoholreihe gezogen, dabei entwässert und anschließend eingedeckt. Bei der Färbung wurde auch eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der keine Behandlung mit dem Primärantikörper erfolgte.

### 3.13.2 Antikörper

Bei dem Primär-Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper aus der Ratte (C651.6DbHN), den wir von der Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB, The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, USA) erhielten. Bei dem Sekundär-Antikörper handelt es sich um biotinylierter alpha-rat DAKO.

### 3.13.3 Mikroskopische Auswertung der Färbung

Die Beurteilung der Färbung erfolgte anhand eines modifizierten Remmele und Stegner Bewertungssystems (Remmele 1987). Dabei wurde die Färbeintensität und der Prozentsatz immunreaktiver Zellen untersucht und bewertet. Die zwei Komponenten wurden semiquantitativ ausgewertet und getrennt für die Zellkerne und für das Zytoplasma bestimmt.

**Tabelle 17: Beurteilung der Färbeintensität**

Färbeintensität	Punktzahl
Keine Färbung	0
schwache	1
mäßige	2
starke	3

**Tabelle 18: Beschreibung der Zellfärbung**

Anzahl gefärbten Zellen in %	Punktzahl
0	0
<10%	1
10-50%	2
51-80%	3
>80%	4

Die immunreaktive Score wurde aus dem Produkt von der Punktzahl von Färbeintensität und Prozentsatz errechnet. Folgende Immunreaktive Scores konnten vergeben werden: 0,1,2,3,4,6,8,9,12.

**Tabelle 19: Immunreaktive Score**

Immunreaktive Score	Expression
0	negativ
1-2	schwach
3-6	mäßig stark
8-12	stark

Zuerst wurden die Negativkontrollen untersucht. Wenn sie ungefärbt waren, gingen wir davon aus dass der Färbeprozess richtig war, dann konnte die Auswertung der Schnitte erfolgen. Die Auswertung und die Punktevergabe wurden bei jedem Schnitt von einem erfahrenen Pathologen überprüft.

### 3.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von zweiseitigen Tests mit dem Programm SPSS Version 19 und 20. Zuerst wurden die klinisch-pathologischen Daten und der Polymorphismus mit dem klinischen und histopathologischen Therapieansprechen und mit den Studienendpunkten univariat auf Assoziationen untersucht. Bei einem p-Wert kleiner als 0,05 besteht Signifikanz, bei einem p-Wert kleiner als 0,1 und größer als 0,05 kann ein Trend beobachtet werden.

#### 3.14.1 Statistische Tests der univariaten Analyse

Um die Abhängigkeit zweier Alternativmerkmale zu prüfen wurde der zweiseitige  $\chi^2$ Test (Chi-Quadrat-Test) nach Pearson verwendet. Dieser Test kam bei dem Vergleich des klinischen und histopa-

thologischen Therapieansprechens mit den klinisch-pathologischen Daten und mit dem Polymorphismus zur Anwendung.

### **3.14.2 Kaplan-Meier-Überlebenskurve**

Kaplan-Meier-Überlebenskurven ermöglichen den Vergleich der Überlebensgruppen verschiedener Patientengruppen (z.B.: Responder und Non-Responder). Mit den Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurden das Gesamt- und rezidivfreie Überleben mit den klinisch-pathologischen Daten, mit dem klinischen und histopathologischen Ansprechen und mit dem Polymorphismus verglichen. Mit dem Logrank Test wurden die Unterschiede der einzelnen Gruppen in den Überlebenskurven auf Signifikanz getestet.

### 3.14.3 Definition des Therapieansprechens und der Endpunkte der Studie

Die Definitionen des Therapieansprechens und der Studienendpunkte sind in Tabelle 20 erläutert.

**Tabelle 20: Endpunkte der Studie**

Endpunkte	Definition
Gesamtüberleben	Überlebenszeitraum, ab dem 1. Tag der Chemotherapie oder ab dem Tag der Operation (bei nicht chemotherapierten Patienten) bis zum Todesdatum oder dem letzten Nachsorgetermin berechnet
rezidivfreies Überleben	Zeitraum berechnet ab dem OP-Tag bis zum Auftreten eines Rezidivs bei R0 resezierten Patienten
klinisches Therapieansprechen nach neoadjuvanter CTx	<p><b>Klinisches Ansprechen:</b> Abnahme der Wanddicke und der kraniokaudalen Ausdehnung des Magenkarzinoms im CT um mindestens 50 % und komplette Rückbildung oder nur Residuen in der Endoskopie</p> <p><b>Klinisches Nichtansprechen:</b> weniger als 50% Größenabnahme oder klinischer Progress</p>
histopathologisches Therapieansprechen nach neoadjuvanter CTx	<p><b>Histopathologisches Ansprechen:</b> Weniger als 10% vitale residuale Tumorzellen im OP-Resektat</p> <p><b>Histopathologisches Nichtansprechen:</b> Mehr als 10% vitale residuale Tumorzellen im OP-Resektat oder klinischer Progress</p>



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Klinische und histopathologische Patientencharakteristika

Die klinischen und histopathologischen Patientencharakteristika der 179 neoadjuvant chemotherapier-ten Patienten wurden im Wesentlichen bereits beschrieben, sind jedoch aufgrund der Vollständigkeit in Tabelle 21 erneut dargestellt (Stocker et al. 2009).

**Tabelle 21: Prä- und posttherapeutische klinisch-pathologische Daten**

klinisch-pathologische Daten	Gesamt-kollektiv n(%)	R0-resezierte n(%)	Posttherapeutische klinisch-pathologische Daten	Operierte Patienten n (%)	R0-resezierte n (%)
Zahl der Patienten	179 (100)	140 (100)	Zahl der Patienten	172 (100)	140 (100)
Tumorlokalisation			Resektionsstatus		
proximales Drittel	119 (66)	94 (67)	R0	140 (81)	-
mittleres Drittel	34 (19)	29 (21)	R1/2	32 (19)	-
distales Drittel	14 (8)	12(8,5)			
Linitis	12 (7)	5 (3,5)	ypT-Kategorie		
			ypT0	13 (8)	13 (9)
Laurén-Klassifikation			ypT1	12 (7)	12 (9)
intestinaler Typ	76 (42)	65 (46)	ypT2	104 (60)	86 (62)
diffuser Typ	68 (38)	47 (34)	ypT3	37 (22)	27 (19)
Mischtyp	35 (20)	28 (20)	ypT4	6 (3)	1 (1)
Grading			ypN-Kategorie		
G1&G2	29 (16)	19 (14)	ypN0	71 (41)	65 (46,5)
G3&G4	150 (84)	121 (86)	ypN1	57 (33)	48 (34,5)
			ypN2	31 (18)	23 (16)
Chemotherapie			ypN3	13 (8)	4 (3)
PLF	131 (73)	100 (71)			
Paclitaxel-PLF	14 (8)	13 (9)	ypM-Kategorie		
Epirubicin-PLF	9 (5)	8 (6)	ypM0	137 (80)	126 (90)
OLF	8 (4)	5 (4)	ypM1	35 (20)	14 (10)
Docetaxel-PLF	17 (9)	14 (10)			
			Klinische Response	53 (31)	51 (30)
			Histopathologische Resp.	51 (30)	50 (29)
			TRG1	51 (30)	
			TRG2	58 (34)	
			TRG3	63 (36)	

Proximales Drittel = AEG II, AEG III oder Fundus; mittleres Drittel = Korpus; distales Drittel = Antrum; PLF = Cisplatin, Leucovorin und 5FU; OLF = Oxaliplatin, Leucovorin und 5FU; y = nach neoadjuvanter Chemotherapie; p = postoperativ/ pathologisch; LK = Lymphknoten, ypN1 = bis 6 LK-, ypN2 = bis 15 LK-, ypN3 > 15 LK befallen, TRG= Tumorregressionsgrad

Das Gesamtkollektiv umfasst 179 Patienten, 131 Männer und 48 Frauen. Das mittlere Patientenalter beträgt 56,2 Jahre, das mediane 56,6 (Range 23,1-77,2). 172 Patienten wurden nach neoadjuvanter Chemotherapie operiert, sieben Patienten erlitten unter der Chemotherapie einen Progress und wurden nicht operiert. Bei den 172 Patienten erfolgten eine Gastrektomie und eine Lymphadenektomie. Bei 140 Patienten wurde der Tumor im histologisch gesicherten gesunden Gewebe reseziert, bei 14 R0-Patienten lag präoperativ ein ypM1 Status vor, das gesamte makroskopische Tumormaterial wurde aber entfernt, somit gelang auch hier ein R0-Resektion. Auffallend im untersuchten Patientenkollektiv ist ein hoher Anteil an proximal lokalisierten Magenkarzinomen. Am Klinikum rechts der Isar wurden vermehrt Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs reseziert, dadurch erklärt sich der hohe Anteil der proximal liegenden Magenkarzinome.

#### 4.1.1 Therapieansprechen und Überleben

Klinisches und histopathologisches Therapieansprechen korrelieren hochsignifikant miteinander ( $p < 0,001$ ). Bei 38 Patienten stimmt das klinische und das histopathologische Ansprechen nicht überein. Das klinische Therapieansprechen wurde bei allen 179 Patienten ermittelt, das histopathologische Therapieansprechen konnte für die 172 operierten Patienten bestimmt werden. Die sieben Patienten, die unter der Chemotherapie ein Progress erlitten, wurden als histopathologische Nonresponder klassifiziert.

**Tabelle 22: Absolute Häufigkeiten klinisches und histopathologisches Therapieansprechen**

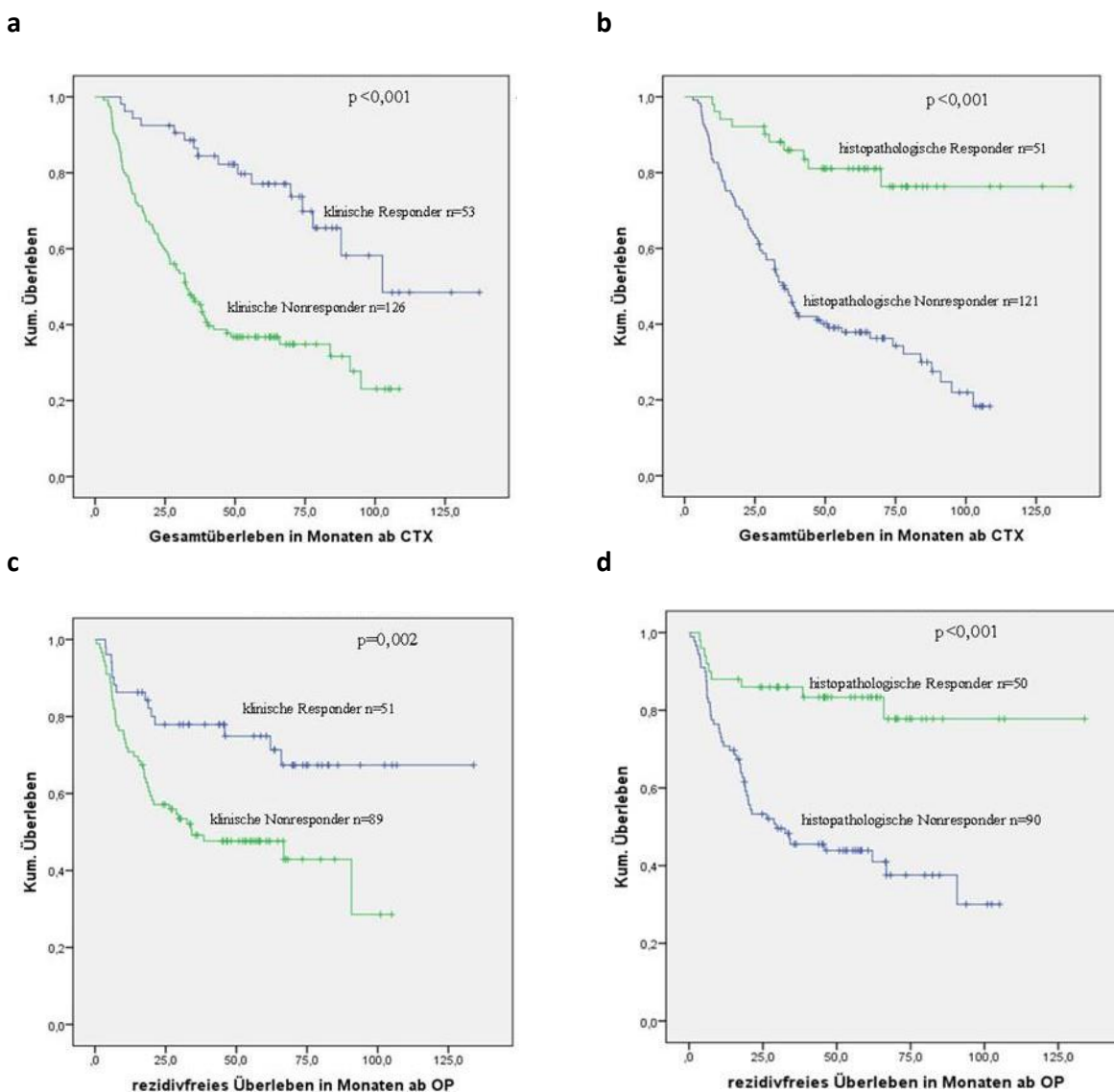
	histopathologische Responder	histopathologische Nonresponder	n (%)
klinische Responder	33	20	53 (30)
klinische Nonresponder	18	108	126 (70)
n (%)	51 (28)	128 (72)	179 (100)

Der Median der Tumornachsorgezeit (*Follow up*) betrug bei den lebenden Patienten 68,1 Monate. In diesem Beobachtungszeitraum verstarben 98 der 179 Patienten.

Das mediane Gesamtüberleben aller 179 Patienten betrug 37,7 Monate. Die klinischen und histopathologischen *Responder* hatten eine signifikant bessere Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens als die jeweiligen *Nonresponder* (Abb.1).

Das mediane Gesamtüberleben betrug für die klinischen *Responder* 62,0 Monate, für die *Nonresponder* 35,2 Monate, für die histopathologischen *Responder* 59,9 Monate und für die *Nonresponder* 33,4 Monate.

Das mediane rezidivfreie Überleben der 140 R0-resezierten Patienten beträgt 33,4 Monate. Bei 69 Patienten kam es zu einem Rezidiv. Das mediane rezidivfreie Überleben betrug für die klinischen *Responder* 45,9, für die *Nonresponder* 28,8 Monate, für die histopathologischen *Responder* 47,6, für die *Nonresponder* 23 Monate.



**Abbildung 1: Gesamt- und rezidivfreies Überleben und Therapieansprechen**

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der a), c) klinischen Responder und Nonresponder und der b), d) histopathologischen Responder und Nonresponder; der p-Wert wurde mit dem Logrank-Test berechnet; CTX = Chemotherapie

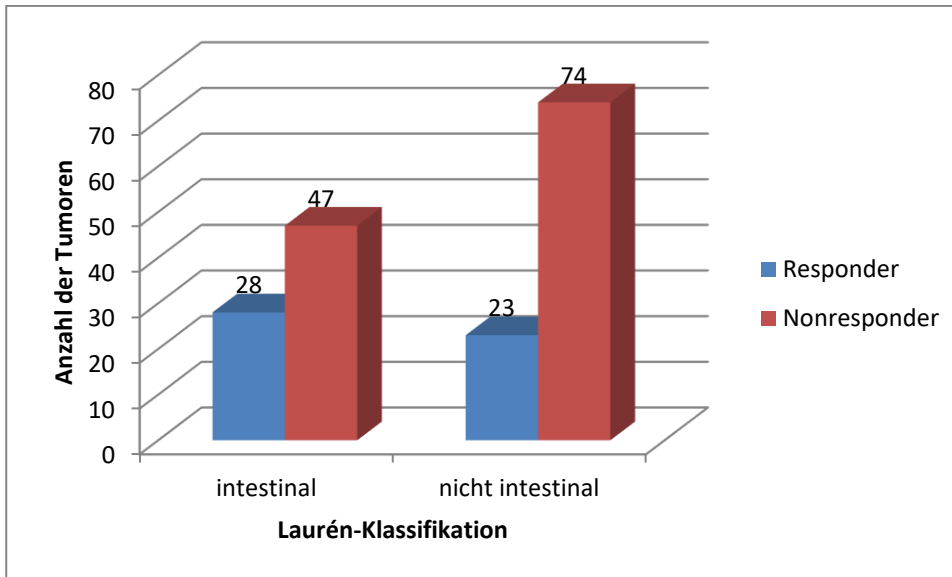
#### **4.1.2 Klinisch-pathologische Daten und Therapieansprechen**

Die klinischen und histopathologischen Parameter wurden auf Assoziationen mit dem klinischen und histopathologischen Therapieansprechen untersucht. Das Alter und das Geschlecht zeigten keine Korrelation mit dem Therapieansprechen. Die anderen klinisch-pathologischen Daten zeigt die Tabelle 23. Die prätherapeutischen klinisch-pathologischen Parameter (Tumorlokalisierung, Laurén-Klassifikation, Grading) wurden bei allen 179 Patienten bestimmt, den posttherapeutischen Parametern (Resektionsstatus, ypT-, ypN-, ypM-Kategorie) liegen nur die Daten der operierten Patienten (n=172) zu Grunde.

**Tabelle 23: Klinische und histopathologische Parameter und Therapieansprechen**

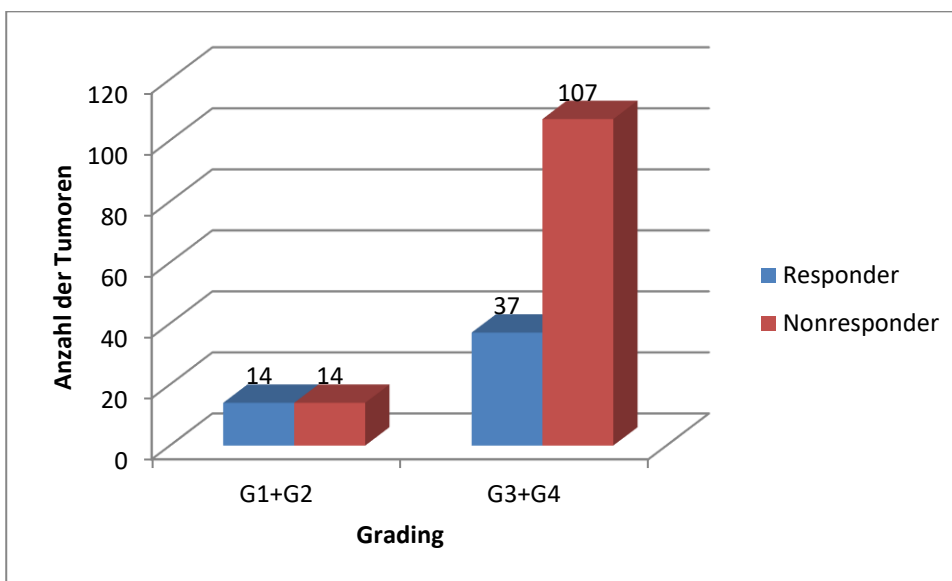
klinisch- pathologische Daten	klinische Responder	klinische Nonresponder	p-Wert	histopath. Responder	histopath. Nonresponder	p- Wert
<b>Tumorlokalisation</b>						
proxim.Drittel	44	74		41	74	
mittler. Drittel	8	26	<b>0,006</b>	7	27	
distales Drittel	0	14		2	11	<i>0,092*</i>
Linitis	1	11		1	9	
<b>Laurén- Klassifikation</b>						
intestinal						
nicht intestinal	30	45	<b>0,013</b>	28	47	<i>0,064*</i>
	23	80		23	74	
<b>Grading</b>						
G1-G2	14	15	<b>0,017</b>	14	14	<b>0,013*</b>
G3-G4	39	110		37	107	
<b>Resektionsstatus</b>						
R0	51	89	<b>0,001</b>	50	90	<b>&lt;0,001</b>
R1-2	2	30		1	31	
<b>ypT-Kategorie</b>						
ypT0	8	5		13	0	
ypT1	9	3	<b>&lt;0,001</b>	10	2	<b>&lt;0,001</b>
ypT2	28	75		25	79	
ypT3	8	29		3	34	
ypT4	0	6		0	6	
<b>ypN-Kategorie</b>						
ypN0	32	39	<b>0,001</b>	37	34	<b>&lt;0,001</b>
ypN1,2,3	21	79		34	87	
<b>ypM-Kategorie</b>						
ypM0	49	87	<b>0,005</b>	47	90	<b>0,008</b>
ypM1	4	31		4	31	

Proximales Drittel = AEG II, AEG III oder Fundus; mittleres Drittel = Korpus; distales Drittel = Antrum; PLF = Cisplatin, Leucovorin und 5FU; OLF = Oxaliplatin, Leucovorin und 5FU; y = nach neoadjuvanter Chemotherapie; p = postoperativ/ pathologisch; LK = Lymphknoten, ypN1 = bis 6 LK-, ypN2 = bis 15 LK-, ypN3 > 15 LK befallen, die p-Werte wurden mit dem Logrank-Test berechnet



**Abbildung 2: Laurén-Klassifikation und histopathologisches Therapieansprechen**

$p=0,064$ , der  $p$ -Wert wurde mit  $\chi^2$ -Test oder mit dem Fischer's exact test berechnet; Laurén-Klassifikation: intestinaler Typ, nicht intestinaler Typ (diffuser- oder Mischtyp)



**Abbildung 3: Grading und histopathologisches Therapieansprechen**

$p=0,013$ , der  $p$ -Wert wurde mit  $\chi^2$ -Test oder mit dem Fischer's exact Test berechnet; Grading: G1+G2, G3+G4

Proximal lokalisierte Tumoren zeigten ein besseres klinisches ( $p=0,006$ ) und histopathologisches ( $p=0,092$ ) Therapieansprechen als solche anderer Lokalisation. Tumoren von intestinalem Typ nach Laurén sprachen auch besser auf die Chemotherapie an, als die von diffusen und Mischtyp (klinisches

Therapieansprechen  $p=0,013$ , histopathologisches Therapieansprechen  $p=0,064$ , Abb.2). Gut differenzierte Tumoren (G1-G2) zeigten auch eine bessere *Response* (histopathologisch  $p=0,013$ , Abb.3) klinisch  $p=0,017$ ). Patienten, die ein besseres Ansprechen auf die Chemotherapie zeigten, konnten öfter R0-reseziert werden, die Tumorgröße war kleiner und sie hatten weniger Lymphknotenbefall und Metastasen. Diesen Prozess bezeichnet man als *Downstaging* der Tumoren.

#### **4.1.3 Klinisch-pathologische Daten und Überleben**

Die klinisch-pathologischen Daten wurden auf Assoziation mit dem Gesamt- und rezidivfreien Überleben untersucht. Die Ergebnisse zeigen Tabelle 24 und Abbildung 4.

**Tabelle 24: Prä- und posttherapeutische klinisch-pathologische Daten und Überleben**

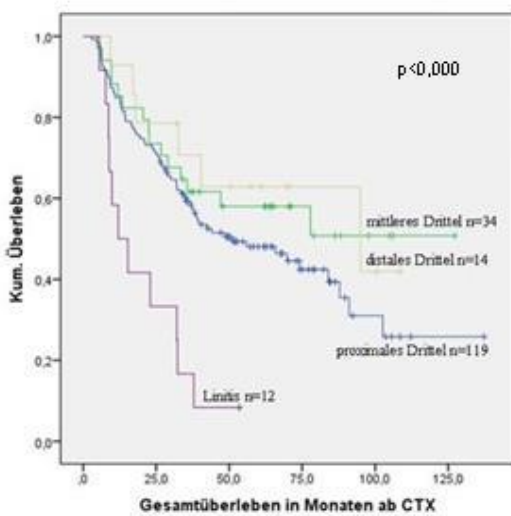
prä- und post- therapeutische klinisch-path. Da- ten	Gesamt- überleben			rezidivfreies Überleben		
	medianes Überleben (Monate)	95% CI*	p-Wert	medianes Überleben (Monate)	95% CI*	p-Wert
<b>Laurén- Klassifikation</b>						
intestinal	74,1	40,5-107	0,126	n.e.	n.e.-n.e.	0,575
nicht intestinal	37,9	23-52		90,8	8-173	
<b>Tumorlokalisation</b>						
proximales Drittel	50,9	24,3-74,5	<b>&lt;0,001</b>	66,8	n.e.-n.e.	0,073
mittleres Drittel	n.e.	n.e.-n.e.		n.e.	n.e.-n.e.	
distales Drittel	94,9	0-193		90,8	10-172	
Linitis	12	2,7-21,3		15,3	12-18,5	
<b>Grading</b>						
G1-G2	91	n.e.-n.e.	<b>0,010</b>	n.e.	n.e.-n.e.	0,059
G3-G4	39,1	28-50,7		66,8	27-106,7	
<b>Resektionsstatus</b>						
R0	83,9	60,7-107	<b>&lt;0,001</b>	-	-	-
R1-2	14,3	6-22,7				
<b>ypT-Kategorie</b>						
ypT0-1	n.e.	n.e.-n.e.	<b>&lt;0,001</b>	n.e.	n.e.-n.e.	<b>0,004</b>
ypT2	77	34,2-121		90,8	47-135	
ypT3-4	26	20,4-33		19,6	0-40	
<b>ypN-Kategorie</b>						
ypN0	94,9	74,8-115	<b>&lt;0,001</b>	n.e.	n.e.-n.e.	<b>&lt;0,001</b>
ypN1,2,3	32,1	23,4-40,7		21,2	6,9-35	
<b>ypM-Kategorie</b>						
ypM0	91	70,4-111,7	<b>&lt;0,001</b>	90,8	n.e.-n.e.	<b>&lt;0,001</b>
ypM1	12,6	8,9-16,3		7,2	4,9-9,4	

\*= Konfidenzintervall, n.e.= nicht erreicht

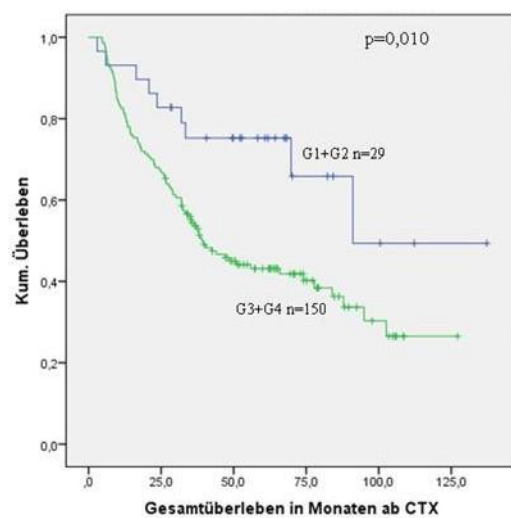


Die Tabelle veranschaulicht, dass distal lokalisierte und besser differenzierte Karzinome (Grading WHO Grad 1-2) mit einem längeren Gesamt-, und rezidivfreies Überleben assoziiert sind. Patienten, die einen Tumor mit kleineren Ausdehnung hatten (ypT 1-2), die R0 reseziert wurden, keine Lymphknoten-, und Fernmetastasen hatten, zeigten auch erwartungsgemäß eine bessere Prognose. Ein längeres rezidivfreies Überleben hatten Patienten mit kleineren Tumoren, ohne Metastasen und ohne Lymphknotenbefall.

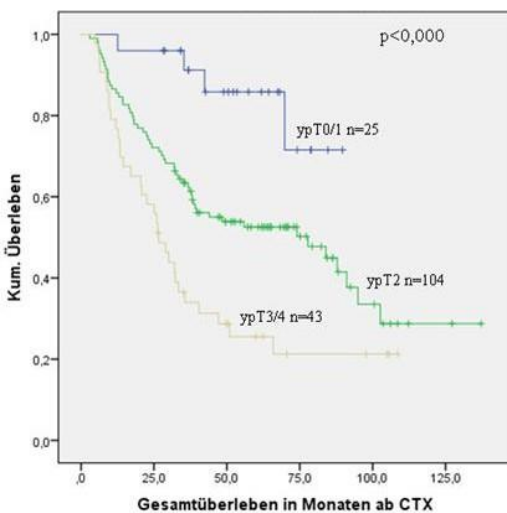
a



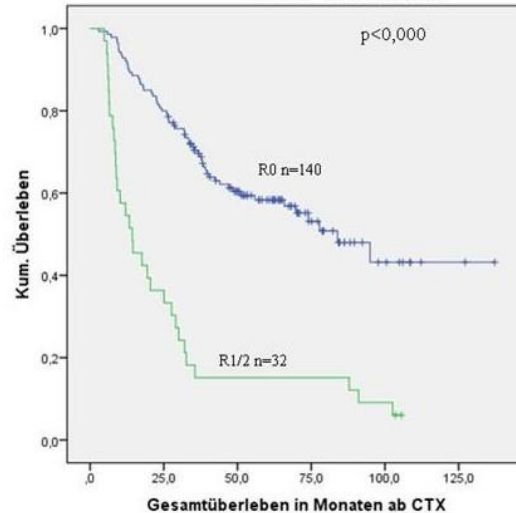
b

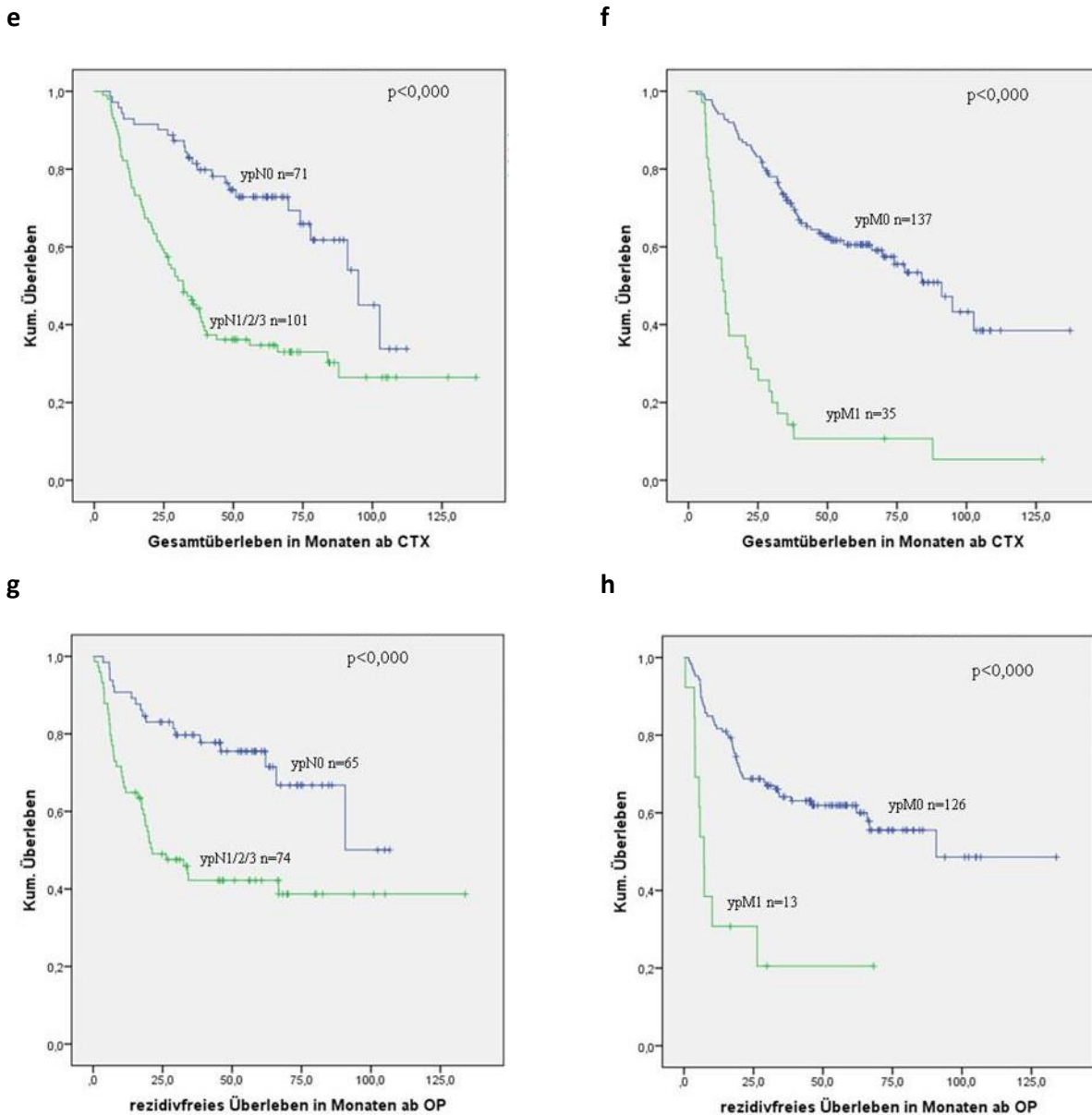


c



d





**Abbildung 4: Gesamt- und rezidivfreies Überleben und prä- und posttherapeutische klinisch-pathologische Daten**

Gesamt-, a) b) c) d) e) f) und rezidivfreies Überleben g) h). Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit von a) der Tumorlokalisation, b) Grading, c) der ypT-Kategorie, d) dem Resektionsstatus, e) g) des Lymphknotenstatus, f) h) des Fernmetastasenstatus; CTX = Chemotherapie; nicht-adjustierte p-Werte wurden mit dem Logrank-Test berechnet.

#### 4.2 Genotypisierung des DNA-Polymorphismus im Notch2 Gen

Aus der DNA der 179 neoadjuvant chemotherapierten Patienten erfolgte die Genotypisierung des Polymorphismus rs 11249433. Zuerst verwendeten wir DHPLC, mit dieser Methode wurden keine eindeutigen Ergebnisse erzielt, so wurden die Proben mittels hochauflösender Schmelzkurvenanalyse untersucht. Etwa 20% der Resultate wurden durch direkte Sequenzierung überprüft. Die Häufigkeiten der

Genotypen waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und waren vergleichbar mit der bisher publizierten Verteilung (SNP-Datenbank des ncbi). Die Allelverteilung bei allen Patienten und bei den R0-resezierten Patienten zeigt Tabelle 25.

**Tabelle 25: Allelverteilung Gesamtkollektiv / R0-resezierten Patienten**

Genotypen des SNP rs112494433	Gesamt n=179 (%)	R0-resezierte Patienten n=140 (%)
CC	27 (15)	22 (16)
CT	88 (49)	71 (51)
TT	64 (36)	47 (33)
CC+CT	115 (64)	93 (66)
TT+CC	91 (51)	69 (49)
CT+TT	152 (85)	118 (84)

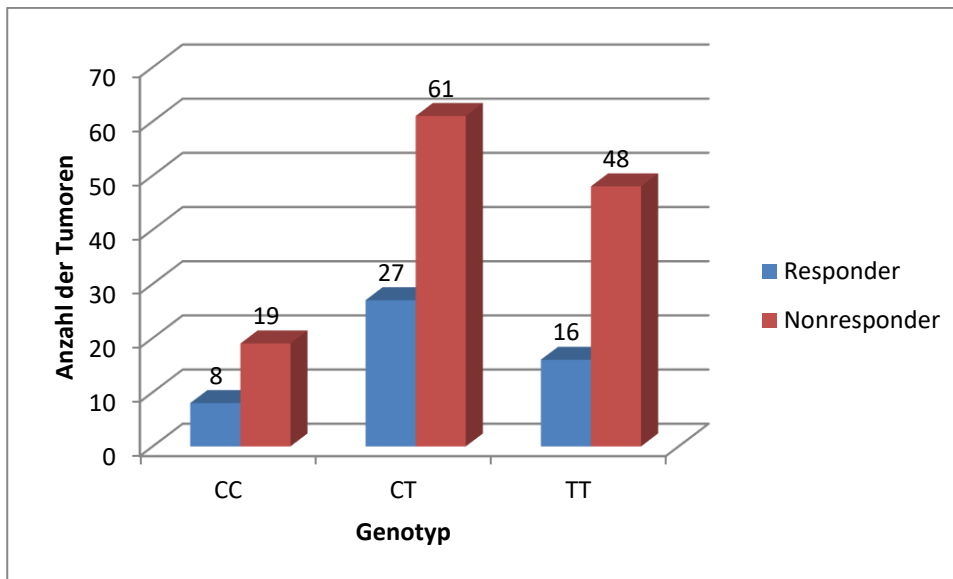
Gesamtkollektiv n=179, R0-resezierte Patienten n=140

#### 4.2.1 Assoziation mit dem Therapieansprechen

Der rs11249433 Polymorphismus zeigte keine signifikante Korrelation mit dem klinischen oder histopathologischen Ansprechen. Die Ergebnisse werden in Tabelle 26 und in Abbildung 5 dargestellt.

**Tabelle 26: Genotypen des SNP rs112494433 und Therapieansprechen**

Genotypen	klinische Responder n (%)	klinische Nonresponder n (%)	p-Wert	histopath. Responder n (%)	histopath. Nonresponder n (%)	p-Wert
	53 (30)	126 (70)		51 (29)	128 (71)	
CC	6 (11)	21 (17)		8 (16)	19 (15)	
CT	29 (55)	59 (47)	0,555	27 (53)	61 (48)	0,738
TT	18 (34)	46 (36)		16 (31)	48 (37)	
TT versus CC+CT	18 (34)	47 (37)	0,391	16 (31)	49 (38)	0,419
	35 (66)	79 (63)		35 (69)	79 (62)	
CT versus CC+TT	29 (55)	59 (47)	0,419	27 (53)	61 (48)	0,554
	24 (45)	67 (53)		24 (47)	67 (52)	
CC versus CT+TT	6 (11)	21 (17)	0,58	8 (16)	19 (15)	0,903
	47 (89)	105 (83)		43 (84)	109 (85)	



**Abbildung 5: Genotypen des SNP rs112494433 und histopathologisches Therapieansprechen**

p-Wert 0,738, der p-Wert wurde mit  $\chi^2$ -Test oder mit dem Fischer's exact Test berechnet; Genotypen CC, CT und TT

#### 4.2.2 Assoziation mit dem Überleben

Der Polymorphismus wurde auf Assoziationen mit dem rezidivfreien- und Gesamtüberleben untersucht. Das Gesamtkollektiv und die drei Untergruppen des Regressionsgrades wurden getrennt untersucht. Es wurde keine signifikante Korrelation festgestellt, es wurde lediglich ein Trend beobachtet. Patienten mit dem heterozygoten Genotyp CT zeigten im Regressionsgrad 2 ein schlechteres Gesamtüberleben als die Genotypen CC+TT (48 vs. 77 Monate,  $p=0,088$ ). Die Ergebnisse zeigen die Tabellen 27, 28 und Abbildung 6.

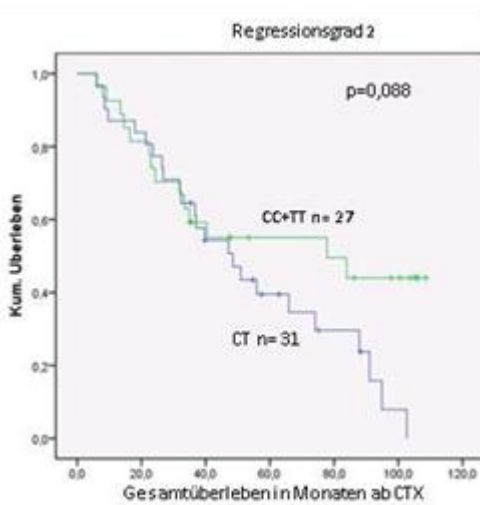
**Tabelle 27: Genotypen des SNP rs112494433 und Gesamtüberleben (Log-Rank-Test)**

Genotypen	Gesamtüberleben p-Werte			
	gesamt n=179	TRG1 n=51	TRG2 n=58	TRG3 n=63
CC				
CT	0,668	0,555	0,224	0,789
TT				
TT versus CC+CT	0,595	0,401	0,135	0,66
CT versus CC+TT	0,33	0,279	0,088	0,954
CC versus CT+TT	0,664	0,678	0,715	0,525

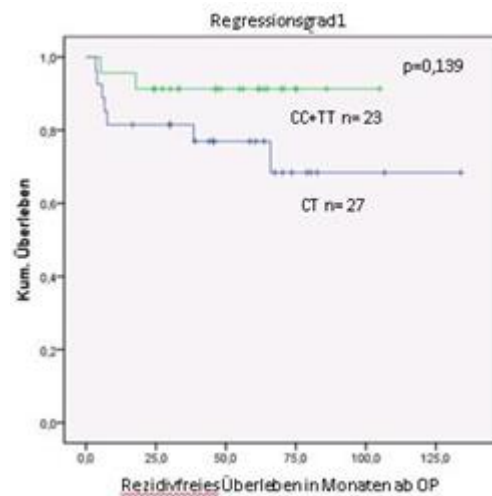
**Tabelle 28: Genotypen des SNP rs112494433 und rezidivfreies Überleben (Log-Rank-Test)**

Genotypen	rezidivfreies Überleben p-Werte			
	gesamt n=140	TRG1 n=50	TRG2 n=49	TRG3 n=40
CC				
CT	0,404	0,311	0,446	0,983
TT				
TT versus CC+CT	0,348	0,178	0,621	0,86
CT versus CC+TT	0,179	0,139	0,246	0,94
CC versus CT+TT	0,542	0,757	0,349	0,903

a



b



**Abbildung 6: Genotyp CT vs. CC+TT und Gesamt- bzw. rezidivfreies Überleben**

a) Gesamt-, b) rezidivfreies Überleben; Kaplan-Meier-Überlebenskurven; Vergleich des CT-Genotyps versus CC und TT; Regr. = Regressionsgrad; ab CTX = ab Beginn der Chemotherapie; nicht-adjustierte p-Werte wurden mit dem Logrank-Test berechnet.

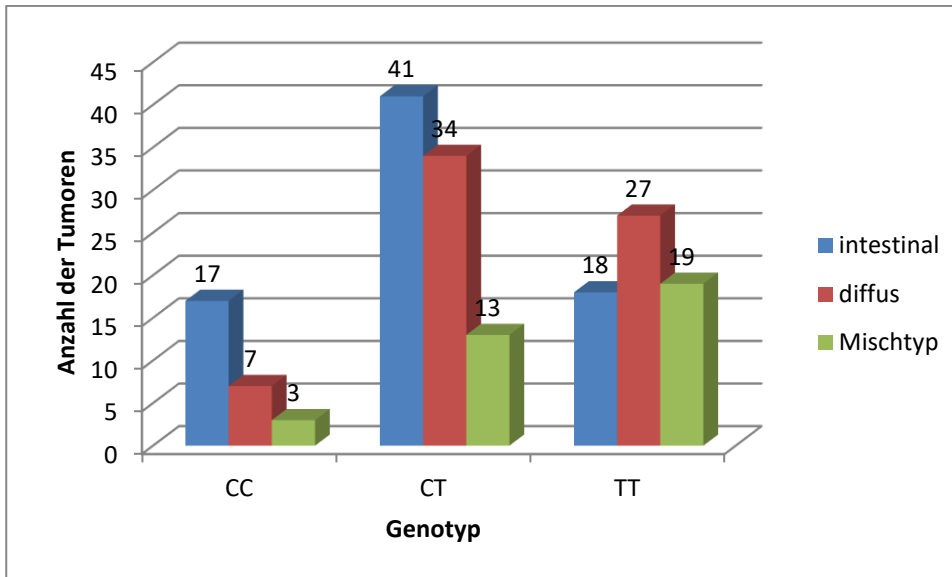
#### 4.2.3 Assoziation mit den klinisch-pathologischen Daten

Die Genotypen wurden auch auf Assoziationen mit den klinisch-pathologischen Daten untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 29 zusammengefasst. Es besteht keine Assoziation zwischen den Genotypen und dem Alter oder dem Geschlecht. Es wurde eine signifikante Korrelation mit der Laurén-Klassifikation gefunden ( $p=0,018$ , Abbildung 7). Bei Patienten mit dem CC-Genotyp wurden verhältnismäßig mehr Karzinomen vom intestinalen Typ beobachtet, bei Patienten mit TT-Genotyp verhältnismäßig mehr nicht intestinale Tumoren.

**Tabelle 29: Genotypen des SNP rs112494433 und klinisch-pathologische Daten**

Prätherapeutische klinisch-path. Daten Zahl der Patienten	Gesamtkollektiv	Genotyp CC	Genotyp CT	Genotyp TT	p-Wert
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	
	179 (100)	27(100)	88(100)	64(100)	
<b>Tumorlokalisation</b>					
proximales Drittel	119 (66)	18(67)	65(74)	36(56)	0,196
mittleres Drittel	34 (19)	7(26)	11(12)	16(25)	
distales Drittel	14 (8)	1(3,5)	6(7)	7(11)	
Linitis	12 (7)	1(3,5)	6(7)	5(8)	
<b>Laurén-Klassifikation</b>					
intestinaler Typ	76 (42)	17(63)	41(47)	18(28)	<b>0,018</b>
diffuser Typ	68 (38)	7(26)	34(38)	27(42)	
Mischtyp	35 (20)	3(11)	13(15)	19(30)	
<b>Grading</b>					
G1&G2	29 (16)	12(44)	31(35)	6(9)	0,641
G3&G4	150 (84)	15(56)	57(65)	58(91)	
Posttherapeutische klinisch-pathologische Daten Zahl der Patienten	Operierte Patienten n (%)	Genotyp CC n(%)	Genotyp CT n(%)	Genotyp TT n(%)	
	172 (100%)	25(15)	85(49)	62(36)	
<b>Resektionsstatus</b>					
R0	140 (81)	22(88)	71(84)	47(76)	0,366
R1/2	32 (19)	3(12)	14(16)	15(24)	
<b>ypT-Kategorie</b>					
ypT0	13 (8)	3(12)	6(7)	4(7)	0,99
ypT1	12 (7)	1(4)	6(7)	5(8)	
ypT2	104 (60)	15(60)	53(62)	36(58)	
ypT3	37 (22)	5(20)	17(20)	15(24)	
ypT4	6 (3)	1(4)	3(4)	2(3)	
<b>ypN0-Kategorie</b>					
ypN1	71 (41)	7(28)	38(45)	26(42)	0,313
ypN2	57 (33)	11(44)	29(34)	17(27)	
ypN3	31 (18)	5(20)	12(14)	14(23)	
ypN3	13 (8)	2(8)	6(7)	5(8)	
<b>ypM-Kategorie</b>					
ypM0	137 (80)	22(88)	68(80)	47(76)	0,439
ypM1	35 (20)	3(12)	17(20)	15(24)	

Proximales Drittel = AEG II, AEG III oder Fundus; mittleres Drittel = Korpus; distales Drittel = Antrum; y = nach neoadjuvanter Chemotherapie; p = postoperativ/ pathologisch; LK = Lymphknoten, ypN1 = bis 6 LK-, ypN2 = bis 15 LK-, ypN3 > 15 LK befallen, die p-Werte wurden mit dem  $\chi^2$ -Test berechnet



**Abbildung 7: Genotypen und Laurén-Klassifikation**

p-Wert 0,018, der p-Wert wurde mit  $\chi^2$ -Test oder mit dem Fischer's exact Test berechnet

### 4.3 Notch2 Expression (Immunhistochemische Färbung)

Das Patientenkollektiv umfasste 142 Magenkarzinompatienten, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben. Der median follow up betrug 42 Monaten (range: 0-116 Monaten). Das Gesamtüberleben wurde als der Zeitraum zwischen der Operation und dem Tod des Patienten definiert. Das Median betrug 15 Monaten (95% CI 8,4-21,6 Monaten). Die klinisch-pathologischen Daten werden in der Tabelle 30 dargestellt.



**Tabelle 30: Patientencharakteristika**

<b>Zahl der Patienten:</b>	n (%)
	142 (100)
<b>Geschlecht:</b>	
männlich	87 (61)
weiblich	55 (39)
<b>Alter (in Jahren)</b>	
Median	70,9
Range	39,5-99,9
<b>Lauren-Klassifikation</b>	
intestinaler Typ	76 (53)
nicht intestinal	66 (47)
<b>Tumorlokalisation</b>	
proximales Drittel	33 (23)
mittleres Drittel	39 (28)
distales Drittel	54 (38)
Linitis	12 (8)
keine Angabe	4 (3)
<b>Grading</b>	
G1+G2	26 (18)
G3+G4	116 (82)
<b>Resektionsstatus</b>	
R0	82 (58)
R1/2	54 (38)
Rx	6 (4)
<b>pT-Kategorie</b>	
pT1-pT2	64 (45)
pT3-pT4	78 (55)
<b>pN-Kategorie</b>	
pN0	36 (25)
pN1,2,3	106 (75)

Die Notch2 Expression wurde mittels immunhistochemischer Färbung bestimmt. Die Kernfärbung und die Zytoplasma-Färbung wurden getrennt beurteilt. Einerseits wurden die Tumorzellen mit gefärbten Zytoplasma/ Kern in Prozent angegeben, andererseits wurde die Färbeintensität ermittelt. Das Produkt der beiden ergab den Färbescore (0-12). Ein Färbescore von 0 wurde als negativ, 1-2 als schwache, 3-6 als mäßige und 8-12 als starke Expression definiert. Die Notch2 Expression war in allen 142 primär rezezierten Magenkarzinomen auswertbar.

Neun Tumoren (6%) zeigten eine starke Expression im Zytoplasma, 61 (43%) zeigten eine mäßige und 53 (37%) eine schwache zytoplasmatische Expression. 19 (13%) der Tumoren zeigten keine Notch2 Expression. In 45 % (64) der Magenkarzinome konnte keine nukleäre Notch2 Expression nachgewiesen

werden, 63 Tumoren (44%) zeigten eine schwache-, 15 Tumoren (10%) zeigten eine mäßige Expression im Kern. In keinem Magenkarzinom konnte eine starke nukleäre Notch2 Expression nachgewiesen werden. Die Tabelle 31 und die Abbildungen 8, 9 und 10 stellen einen Teil der Ergebnisse dar, die übrigen Ergebnisse (Anzahl positiver Zellen und Färbeintensität) sind nicht dargestellt. Beispiele für die immunhistochemische Färbung zeigt die Abbildung 11.

**Tabelle 31: Notch2-Genexpression, Stärke der Zytoplasma- und Kernfärbung**

**Färbung des Zytoplasmas**

<b>Anzahl positiver Zellen</b>	n (%)
Keine	19 (13)
<10%	23 (16)
10-50%	48 (34)
50-80%	38 (27)
>80%	14 (10)

**Intensität**

Keine	19 (13)
Schwach	79 (56)
Mäßig	37 (26)
Stark	7 (5)

**Färbescore**

0	19 (13)
1	19 (13)
2	34 (24)
3	20 (14)
4	27 (19)
6	14 (10)
8	3 (2)
9	5 (4)
12	1 (1)

**Kernfärbung**

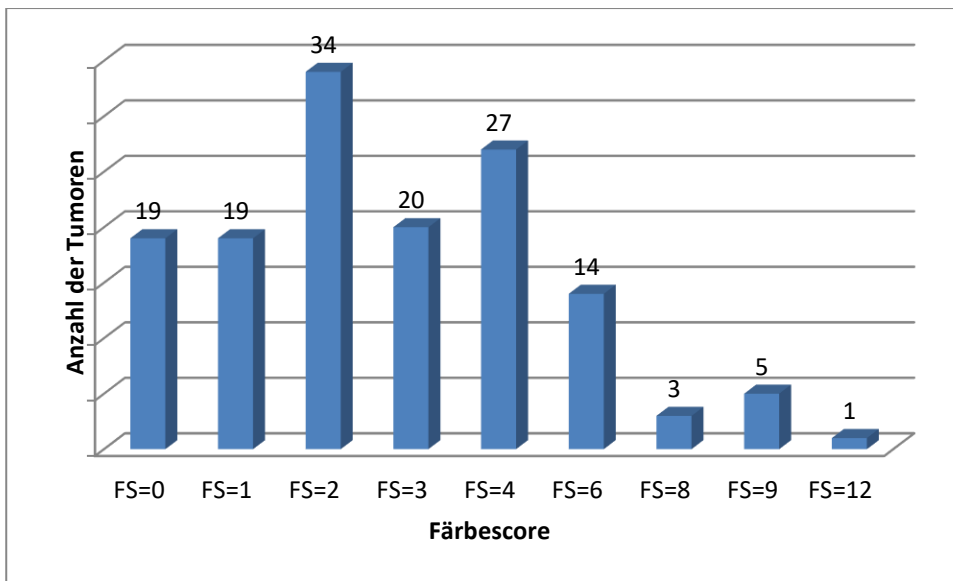
<b>Anzahl positiver Zellen</b>	n (%)
Keine	64 (45)
<10%	45 (32)
10-50%	29 (20)
50-80%	4 (3)
>80%	0 (0)

**Intensität**

Keine	64 (45)
Schwach	60 (42)
Mäßig	18 (13)
Stark	0 (0)

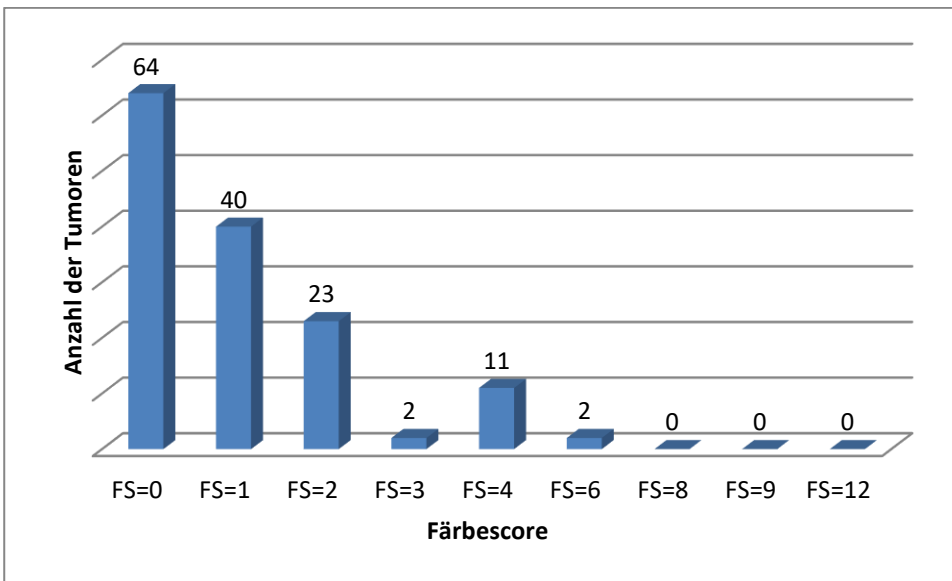
**Färbescore**

0	64 (45)
1	40 (28)
2	23 (16)
3	2 (1)
4	11 (8)
6	2 (1)
8	0 (0)
9	0 (0)
12	0(0)



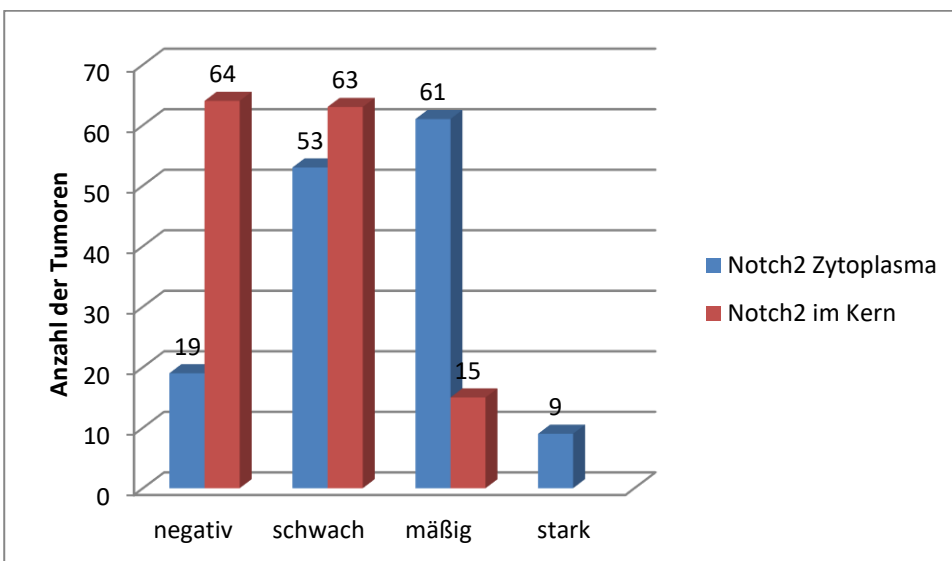
**Abbildung 8: Übersicht über die Notch2 Expression im Zytoplasma**

FS= Färbescore



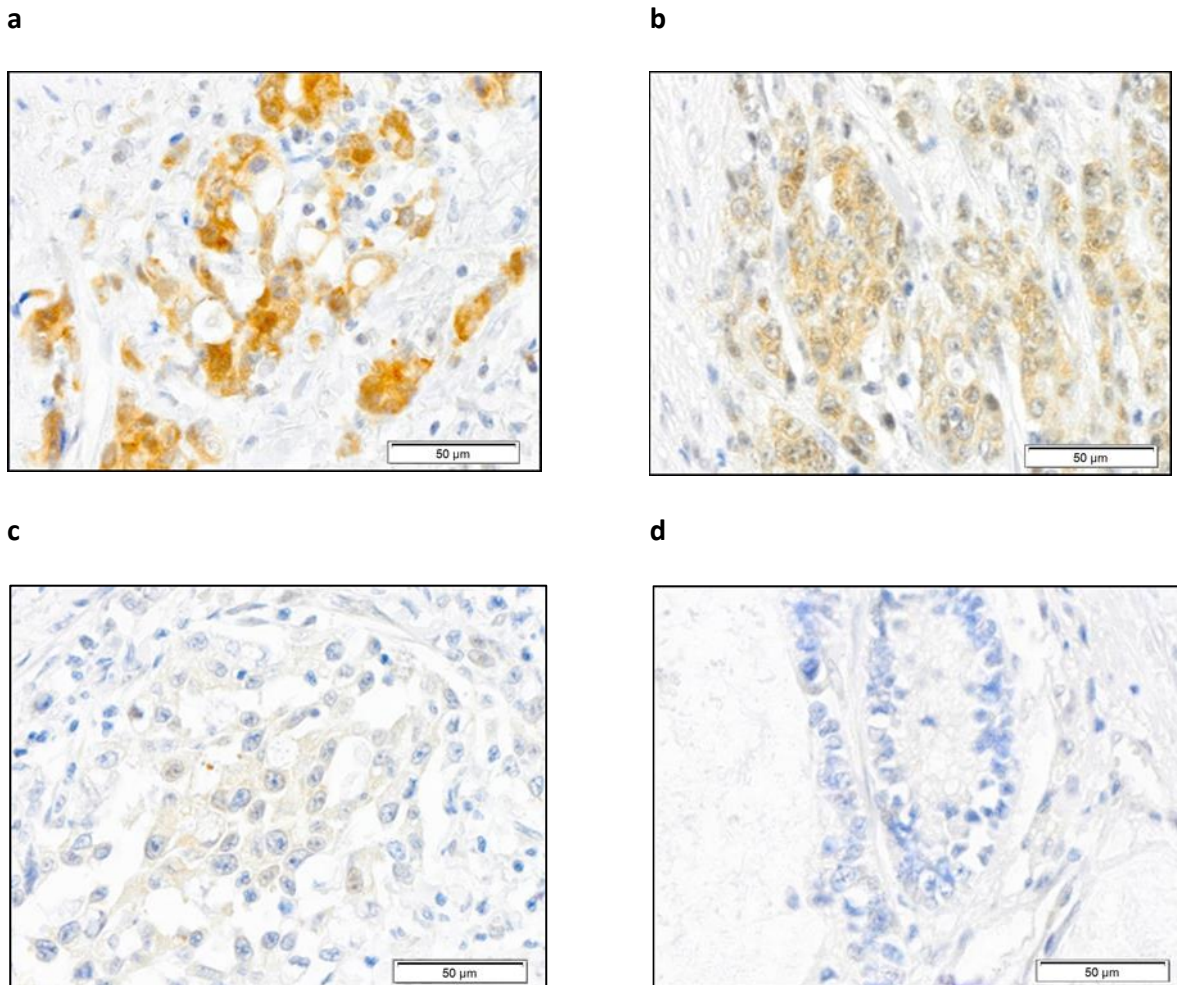
**Abbildung 9: Übersicht über die Notch2 Expression im Kern**

FS= Färbescore



**Abbildung 10: Übersicht über die Notch2 Expression im Zytoplasma und im Kern**

Die Stärke der Genexpression wurde anhand der Färbescores bestimmt. Negativ=Färbescore von 0, schwach=Färbescore von 1-2, mäßig=Färbescore von 3-6 und stark=Färbescore von 8-12.



**Abbildung 11: Expression von Notch2 in primär resezierten Magenkarzinomen**

(a) starke Zytoplasmafärbung (Färbescore 9) und schwache Kernfärbung (Färbescore 1), (b) mäßige Zytoplasmafärbung (Färbescore 6) und schwache Kernfärbung (Färbescore 1), (c) schwache Zytoplasmafärbung (Färbescore 3) und negative Kernfärbung (Färbescore 0), (d) negative Zytoplasma- und Kernfärbung für Notch2. Maßstab: 50 µm

#### 4.3.1 Assoziation der Expression mit dem Überleben

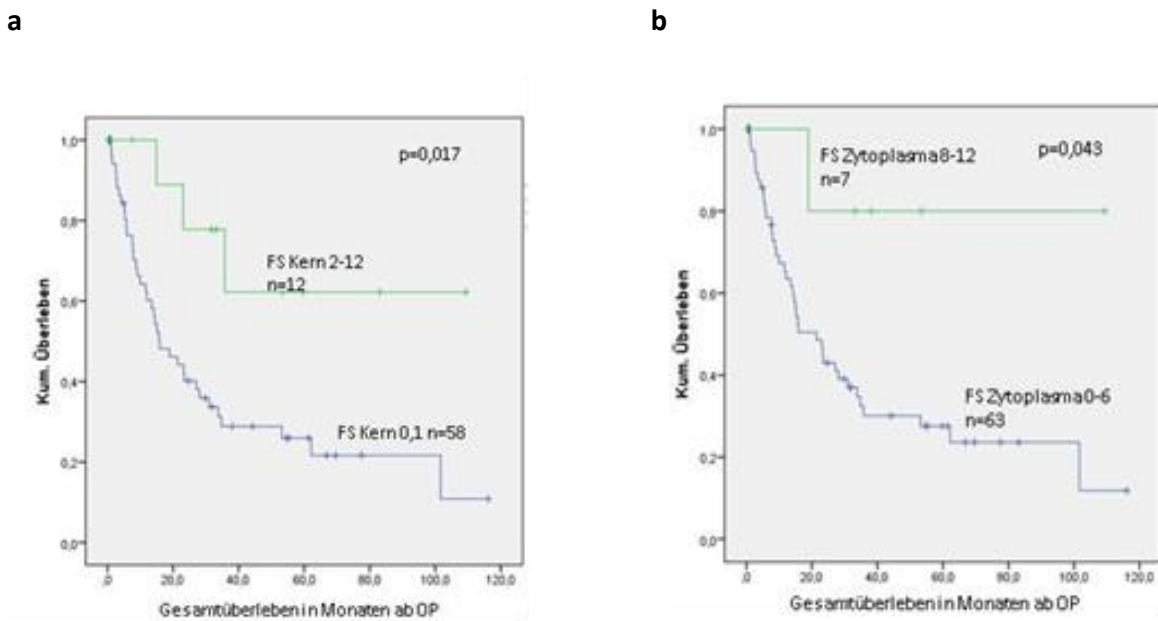
Die Expression wurde auf Assoziationen mit dem Überleben untersucht. Uns lagen die Überlebensdaten von 126 der 142 Patienten vor. Dabei wurde keine signifikante Korrelation gefunden, es lässt sich lediglich ein Trend beobachten: Patienten mit mehr als 50% gefärbten Zytoplasma überlebten am längsten mit 33 Monaten, Patienten mit weniger als 50% gefärbten Zytoplasma überlebten nur 15 Monate (siehe Tabelle 42 im Anhang; log-rank Test  $p=0,088$ ). Tabelle 32 gibt die Notch2-Genexpression und das Gesamtüberleben am Beispiel der Färbescores wieder.

**Tabelle 32: Notch2-Genexpression (Färbescores) und Überleben im Gesamtkollektiv**

	n	medianes Überleben in Monaten	p-Wert
<b>Färbescore Kern</b>			
negativ vs. schwach, mäßig	56 70	15 20	0,851
schwach vs. negativ, mäßig	55 71	20 15	0,754
mäßig vs. negativ, schwach	15 111	33 16	0,467
<b>Färbescore Zytoplasma</b>			
negativ vs. schwach, mäßig, stark	14 112	14 20	0,715
schwach vs. negativ, mäßig, stark	48 78	15 21	0,285
mäßig vs. negativ, schwach, stark	55 71	23 16	0,718
stark vs. negativ, schwach, mäßig	9 117	NR 15	0,123

Die intestinalen und die nicht intestinalen Fälle wurden auch getrennt untersucht. Bei den intestinalen Fällen ist die Menge der gefärbten Kerne mit dem medianen Überleben assoziiert: Patienten mit weniger als 10% Kernfärbung und mit keiner oder schwacher Färbeintensität überlebten signifikant kür-

zer, als Patienten mit mehr als 10% Kernfärbung ( $p=0,014$ ) und mit mäßiger Färbeintensität ( $p=0,052$ , Tabelle 43 im Anhang). Eine niedrige Kernfärbung mit Färbescore 0,1 ist mit einem schlechteren Überleben (16 Monate) assoziiert, als eine höhere Kernfärbung mit Färbescore 2-12 (NR,  $p=0,017$ , Abb. 12.a). Dasselbe Ergebnis kann man bei der Expression in der Zytoplasma beobachten: eine stärkere Zytoplasmafärbung ist mit einer besseren Prognose assoziiert: FS 0-6: 21 Monate vs. FS 8-12: NR ( $p=0,043$ , Abb. 13.b). Die Ergebnisse zeigt Tabelle 33.



**Abbildung 12: Gesamtüberleben und Notch 2 Proteinexpression in den intestinalen Karzinomen**

a) Gesamtüberleben; Kaplan-Meier-Überlebenskurven; nicht-adjustierte p-Werte wurden mit dem Logrank-Test berechnet.

**Tabelle 33: Notch2-Genexpression (Färbescores) und Überleben in den intestinalen Karzinomen**

nur intestinale Fälle	n	medianes Überleben in Monaten	p-Wert
<b>Färbescore Kern</b>			
FS=0	33	23	0,609
FS>0	37	23	
FS=0,1	58	16	<b>0,017*</b>
FS=>1	12	NR	
FS=0-2	64	21	<b>0,039</b>
FS>2	6	NR	

**Färbescore Zytoplasma**

FS=0	15	28	0,452
FS>0	55	23	
FS=0,1	15	28	0,452
FS=2-12	55	23	
FS=0-2	28	16	0,398
FS=3-12	42	23	
FS=0-3	37	16	0,623
FS=4-12	33	34	
FS=0-4	55	21	0,207
FS=6-12	15	34	
FS=0-6	63	21	<b>0,043*</b>
FS=8-12	7	NR	

Die nicht intestinalen Karzinome zeigten keine Assoziation zwischen der Genexpression und dem Überleben (Tabelle 34). Die pT1-2 und die pT3-4 Fälle wurden auch getrennt untersucht. Es wurden keine Assoziationen mit dem Überleben gefunden (die Tabelle ist nicht dargestellt).

**Tabelle 34: Notch2-Genexpression und Überleben in den nicht intestinalen Karzinomen**

nicht intestinale Fälle	medianes Überleben		p-Wert
	n	in Monaten	
<b>Färbescore Kern</b>			
FS=0	23	12	0,974
FS>0	33	15	
FS=0,1	32	14	0,413
FS=2-12	24	10	
<b>Färbescore Zytoplasma</b>			
FS=0	7	12	0,623
FS>0	49	15	
FS=0,1	17	12	0,581
FS=2-12	39	20	



FS=0-2	34	14	0,617
FS=3-12	22	28	
FS=0-3	43	14	0,476
FS=4-12	13	10	
FS=0-4	49	14	0,888
FS=6-12	7	28	
FS=0-6	54	14	0,562
FS=8-12	2	4	

Die R0-Fälle wurden auch getrennt untersucht (s. Tab. 35). Bei Analyse der Färbescore zeigte sich keine Assoziation. Bei getrennter Betrachtung von Färbeintensität und Anzahl gefärbten Zellen ergaben sich folgende Assoziationen: eine höhere Expression vom Notch 2 im Zytoplasma und im Kern ist mit einer besseren Prognose assoziiert. Mehr als 10% Kernfärbung ist mit einem besseren Überleben assoziiert (35 Monate vs. nicht erreicht,  $p=0,046$ , Tabelle 43 im Anhang). Mehr als 50% Zytoplasmafärbung ist mit einem längeren Überleben assoziiert (101 vs. 31 Monate,  $p=0,061$ , Tabelle 44 im Anhang).

**Tabelle 35: Notch2-Genexpression und Überleben in den R0-resezierten Karzinomen**

<b>R0-Fälle</b>	n	medianes Überleben in Mona- ten	p-Wert
<b>Färbescore Kern</b>			
FS=0	30	34	0,778
FS>0	43	52	
FS=0,1	53	34	0,104
FS=2-12	20	NR	
<b>Färbescore Zytoplasma</b>			
FS=0	8	28	0,781
FS>0	65	53	
FS=0,1	16	NR	0,549
FS=2-12	57	52	

FS=0-2	31	62	0,833
FS=3-12	42	52	
FS=0-3	41	NR	0,187
FS=4-12	32	35	
FS=0-4	59	52	0,393
FS=6-12	14	NR	
FS=0-6	66	72	0,177
FS=8-12	7	123	

#### 4.3.2 Assoziation der Expression mit den klinisch-pathologischen Daten

Die Notch2 Genexpression wurde auf Assoziationen mit den klinisch-pathologischen Daten untersucht. Die Assoziation zwischen den prä- und posttherapeutischen klinisch-pathologischen Merkmalen und dem Färbescore zeigen die Tabellen 36 und 37.

**Tabelle 36: prätherapeutische klinisch-pathologische Patientencharakteristika und Färbescore**

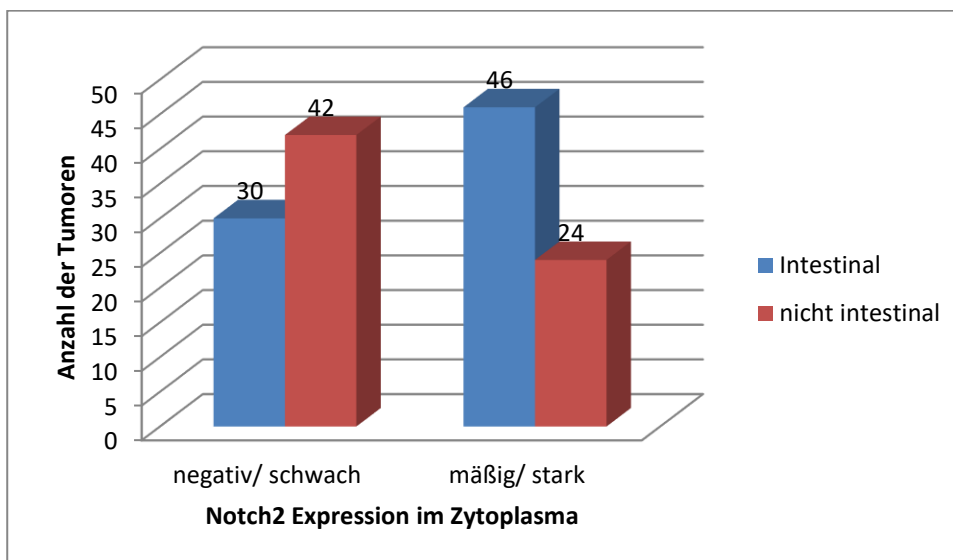
	Lauren Klassifikation		Tumorlokalisation				Grading	
	intestinal	nicht intestinal	proximal	mittel	distal	Linitis	G1-2	G3-4
<b>Färbescore Zytoplasma</b>								
FS=0	7	12	6	4	8	1	3	16
FS>0	69	54	27	35	46	11	23	100
p-Wert	0,142		0,730				1,0	
FS=0,1	16	22	8	11	16	2	7	31
FS>1	60	44	25	28	38	10	19	85
p-Wert	0,129		0,802				1,0	
FS=0-2	30	42	14	20	28	7	13	59
FS=3-12	46	24	19	19	26	5	13	57
p-Wert	<b>0,004*</b>		0,755				0,937	
FS=0-3	40	52	19	24	37	9	17	75
FS=4-12	36	14	14	15	17	3	9	41
p-Wert	<b>0,001*</b>		0,615				0,944	

<b>Färbescore Kern</b>								
FS=0	34	30	15	16	25	5	10	54
FS>0	42	36	18	23	29	7	16	62
p-Wert	1,00		0,959				0,517	
FS=0,1	64	40	24	26	43	7	21	83
FS=2-12	12	26	9	13	11	5	5	33
p-Wert	<b>0,002</b>		0,355				0,464	

Tabelle 37: posttherapeutische klinisch-pathologische Patientencharakteristika und Färbescore

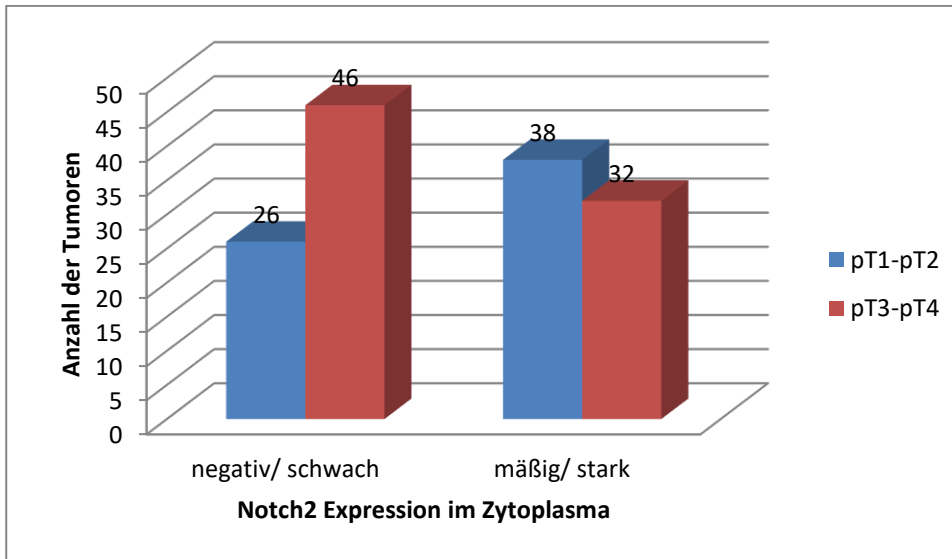
	pT-Kategorie		pN-Kategorie		Resektionsstatus	
	pT1-2	pT3-4	pN0	pN1/2/3	R0	R1/2
<b>Färbescore Zytoplasma</b>						
FS=0	6	13	1	18	12	5
FS=1-12	58	65	35	88	70	49
p-Wert	0,226		<b>0,044*</b>		0,433	
FS=0,1	13	25	6	32	20	16
FS=2-12	51	53	30	74	62	38
p-Wert	0,131		0,131		0,554	
FS=0-2	26	46	17	55	36	33
FS=3-12	38	32	19	51	46	21
p-Wert	<b>0,03*</b>		0,629		0,05	
FS=0-3	35	57	23	69	47	41
FS=4-12	29	21	13	37	35	13
p-Wert	<b>0,022*</b>		0,896		<b>0,026*</b>	
<b>Färbescore Kern</b>						
FS=0	22	42	12	52	34	26
FS=1-12	42	36	24	54	48	28
p-Wert	<b>0,027*</b>		0,122		0,483	
FS=0,1	45	59	24	80	55	43
FS=2-12	19	19	12	26	27	11
p-Wert	0,568		0,383		0,843	

Den Tabellen ist zu entnehmen, dass eine höhere Expression im Zytoplasma mit Tumoren vom intestinalen Typ ( $p=0,001$  bzw.  $p=0,004$  Abb. 13) assoziiert ist. Eine niedrigere Färbescore ist sowohl im Zytoplasma als auch im Kern mit späteren Tumorstadien ( $p=0,03$ , Abb. 14, bzw.  $p=0,022$  und  $p=0,027$ , Abb. 15) assoziiert. Zwischen der Tumorlokalisation und der Expression besteht keine signifikante Korrelation. Zwischen Grading und Expression besteht auch keine Korrelation. Eine höhere Notch2 Expression im Zytoplasma ist häufiger in Patienten mit negativem Lymphknotenstatus zu finden ( $p=0,044$ , Abb. 16). Die R0-Resektion ist mit einer relativ höheren Zytoplasma-Expression ( $p=0,026$ ) assoziiert. Zusammenfassend zeigt sich, dass eine relativ höhere Expression im Zytoplasma mit dem intestinalen Typ, mit einer R0-Resektion und einer niedrigeren Tumorausdehnung assoziiert ist.



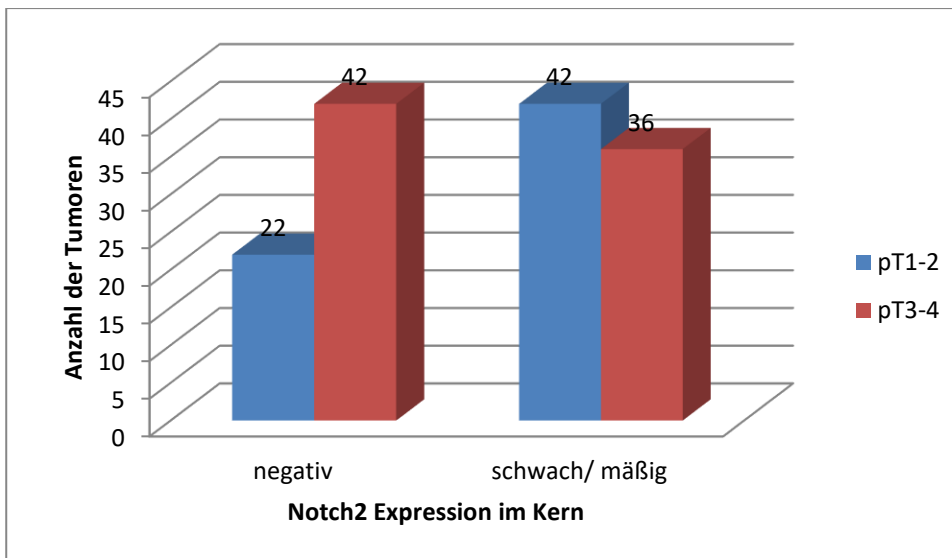
**Abbildung 13: Notch 2 Genexpression im Zytoplasma und Laurén-Klassifikation**

p-Wert 0,004, der p-Wert wurde mit  $\chi^2$ -Test oder mit dem Fischer's exact Test berechnet; Laurén-Klassifikation: intestinaler Typ, nicht intestinaler Typ (diffuser- oder Mischtyp), FS= Färbescore



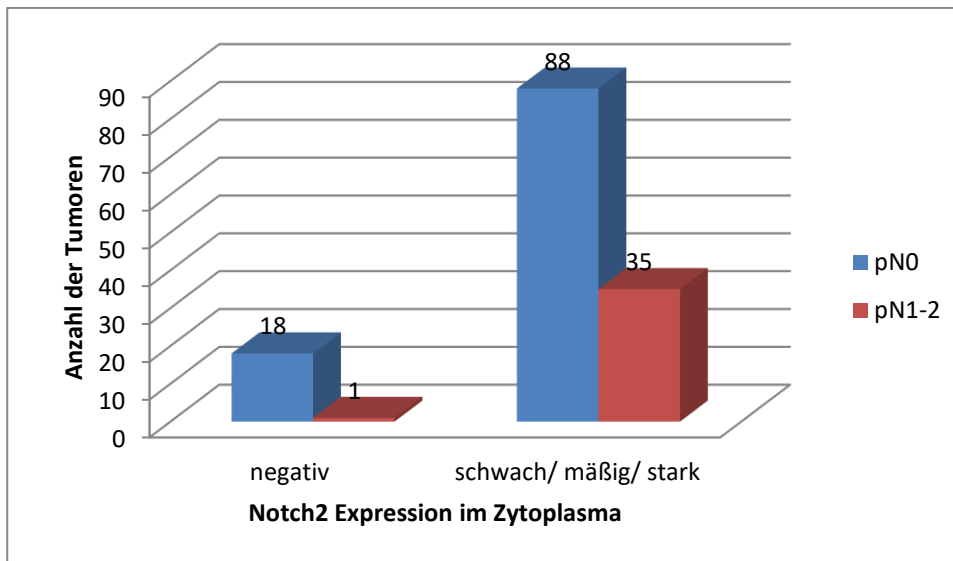
**Abbildung 14: Notch2 Genexpression im Zytoplasma und Assoziation mit der pT-Kategorie**

p-Wert 0,03, der p-Wert wurde mit  $\chi^2$ -Test berechnet; pT =postoperative/ pathologische Tumorausdehnung



**Abbildung 15: Notch2 Genexpression im Kern und Assoziation mit der pT-Kategorie**

p-Wert 0,027, der p-Wert wurde mit  $\chi^2$ -Test berechnet, pT =postoperative/ pathologische Tumorausdehnung



**Abbildung 16: Notch 2 Genexpression im Zytoplasma und Assoziation mit dem Lymphknotenstatus**

p-Wert 0,044, der p-Wert wurde mit  $\chi^2$ -Test berechnet, pN=Lymphknotenmetastasen

#### 4.4 Assoziationen des DNA-Polymorphismus mit der Expression von Notch2

Es wurden insgesamt 85 Magenkarzinomfälle auf Assoziationen zwischen dem Polymorphismus und der Notch2 Expression untersucht. Die 45 nativen und die 40 neoadjuvant behandelte Karzinome wurden auch getrennt untersucht. Die Tabelle 38 zeigt die Allelverteilung und die Stärke der Notch2 Genexpression.

**Tabelle 38: Genotypen des SNP rs112494433 und Genexpression**

	Gesamt n(%)	nativ n(%)	CTX n(%)
Polymorphismus	85(100)	45(100)	40(100)
CC	8(9,5)	4(9)	4(10)
CT	58(68)	30(67)	28(70)
TT	19(22,5)	11(24)	8(20)
CC+CT	66(78)	34	32
TT+CC	27(32)	15	12
CT+TT	77(91)	41	36
<b>Plasmafärbung%</b>			
keine	10(12)	5(11)	5(12,5)
<10%	13(15)	11(24,5)	2(5)
10-50%	23(27)	9(20)	14(35)
50-80%	26(31)	14(31)	12(30)
>80%	13(15)	6(13,5)	7(17,5)

**Plasma Färbeintensität**

keine	10(12)	5(11)	5(12,5)
schwach	43(51)	26(58)	17(42,5)
mittel	28(33)	12(27)	16(40)
stark	4(4)	2(4)	2(5)

**Kernfärbung%**

keine	31(36,5)	17(38)	14(35)
<10%	26(31)	12(27)	14(35)
10-50%	25(29)	14(31)	11(28)
50-80%	2(2,5)	28(4)	0
>80%	1(1)	0(0)	1(2)

**Kern Färbeintensität**

keine	31(36)	17(38)	14(35)
schwach	27(32)	19(42)	8(20)
mittel	23(27)	9(20)	14(35)
stark	4(5)	0(0)	4(10)

In den 45 nativen Magenkarzinomen wurde keine Assoziation zwischen den Genotypen und der Genexpression (weder im Zytoplasma, noch im Kern) gefunden. Die 40 neoadjuvant behandelten Fälle zeigten signifikante Korrelationen zwischen den Genotypen und der Notch2 Expression im Zytoplasma, die Ergebnisse werden hier dargestellt. Zwischen dem Polymorphismus und der Genexpression im Kern wurde keine Assoziation gefunden. Die signifikanten Assoziationen und die Trends sind in der Tabelle 39 dargestellt.

**Tabelle 39: Genotypen des SNP rs112494433 und Genexpression in den neoadjuvant behandelten Fällen**

	Genotypen			gesamt n(%)	p-Wert
	CC n(%) n=4	CT n(%) n=28	TT n(%) n=8		
Färbescore Zytoplasma					
0	2	1	2	5	<b>p=0,016*</b>
1-12	2	27	6	35	
Färbescore Zytoplasma					
0-1	2	2	3	7	<b>p=0,027</b>
2-12	2	26	5	33	

Färbescore Zytoplasma					
0-2	3(75)	5(18)	4(50)	12(30)	<b>p=0,025*</b>
3-12	1(25)	23(82)	4(50)	28(70)	

Färbescore Zytoplasma					
0-3	3(75)	8(29)	5(62,5)	16(40)	<i>p=0,072</i>
4-12	1(25)	20(71)	3(37,5)	24(60)	

Die Tabelle veranschaulicht, dass der CT-Genotyp mit einer stärkeren Notch2-Expression assoziiert ist als die CC und TT Genotypen. Eine Genexpression im Zytoplasma zeigten 96% der Tumoren mit CT-Genotyp, aber nur zwei von vier (50%) mit CC und 75% mit TT-Genotyp ( $p=0,016$ ). 53% des heterozygoten CT-Genotyps wiesen eine mäßige Färbeintensität auf, die Mehrheit der Genotypen CC und TT zeigte aber keine oder nur eine schwache Färbeintensität ( $p=0,011$ ). Eine signifikante Korrelation besteht auch in der Verteilung der Färbescores. 82% des CT-Genotyps erhielt ein Färbescore zwischen 3-12, aber nur eins von vier (25%) des CC-Genotyp und 50% des TT-Genotyps ( $p=0,025$ ).

**Tabelle 40: Genotyp CC vs. TT+CT und Genexpression im Zytoplasma**

Genexpression	Genotypen			p-Wert
	CC n(%) n=4	TT+CT n(%) n=36	gesamt n(%) n=40	
Färbescore Zytoplasma				
0-2	3(75)	9(25)	12(30)	<i>p=0,073*</i>
03-12	1(25)	27(75)	28(70)	

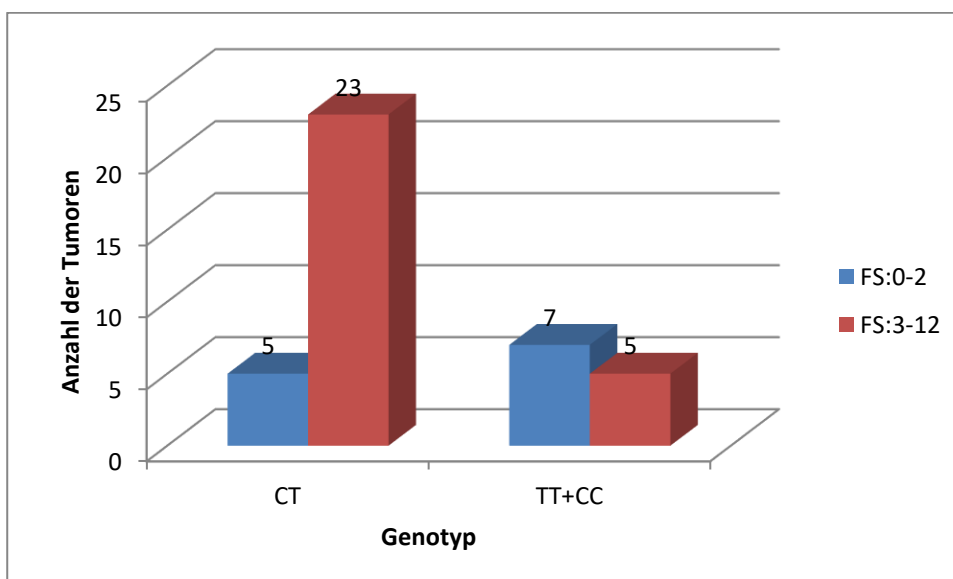
Beim Vergleich der homozygoten Patienten mit dem Genotyp CC mit Patienten mit mindestens einem T-Allel (TT oder CT) zeigten sich zwei Trends und eine signifikante Korrelation. Das T-Allel ist mit einem höheren Prozentsatz Plasmafärbung ( $p=0,069$ ), einem höheren Färbescore ( $p=0,073$ , Abb. 22) und mit einer schwachen oder mäßigen Färbeintensität assoziiert ( $p=0,014$ , s. Tabelle 45 im Anhang).



**Tabelle 41: Genotyp CT vs. TT+CC und Genexpression im Zytoplasma**

Genexpression	Genotypen			p-Wert
	CT	TT+CC	gesamt	
	n(%)	n(%)	n(%)	
	n=28	n=12	n=40	
<b>Färbescore Zytoplasma</b>				
0-2	5(18)	7(58)	12(30)	<b>p=0,021*</b>
3-12	23(82)	5(42)	28(70)	
<b>Färbescore Zytoplasma</b>				
0-3	8(29)	8(67)	16(40)	<b>p=0,037</b>
3-12	20(71)	4(33)	24(60)	

Beim Vergleich des heterozygoten Genotypen CT mit den homozygoten Genotypen TT und CC ergaben sich signifikante Assoziationen. 96% des CT-Genotyps weisen eine Genexpression im Zytoplasma auf, aber nur 67% der homozygoten Genotypen (CC und TT). Der CT-Genotyp zeigt insgesamt eine stärkere Notch 2 Expression (s. Tabelle 46 im Anhang). Der CT-Genotyp ist auch mit einem höheren Färbescore assoziiert als die Genotypen CC und TT, 82% erhielten ein Färbescore zwischen 3-12 (nur 42% der Genotypen CC+TT,  $p=0,021$ , Abb. 17), 71% erhielten ein Score zwischen 4-12 (nur 33% der homozygoten Genotypen,  $p=0,037$ ).

**Abbildung 17: Genotyp CT vs. TT+CC und Notch2-Expression im Zytoplasma**

p-Wert 0,021, der p-Wert wurde mit  $\chi^2$ -Test berechnet, FS=Färbescore

## 5. Diskussion

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass der Notch-Signalweg einen Einfluss auf die Entwicklung des Magenkarzinoms, auf das Ansprechen auf eine 5FU- und platinbasierte Chemotherapie und auf das Überleben der Patienten hat. Es sollte somit untersucht werden, ob eine Assoziation der Notch2 Expression mit dem Überleben und mit den klinisch-pathologischen Daten beobachtet werden kann. Außerdem wurde der mit dem Notch2 Gen assoziierte DNA-Polymorphismus rs11249433 auf Assoziationen mit dem Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie, mit dem Überleben und mit der Notch2 Expression untersucht.

Bei der Studie muss man folgende Limitierungen berücksichtigen. Es ist eine Assoziationsstudie, eine Kausalität kann nicht bewiesen werden. Es handelt sich um eine retrospektive, explorative Studie, die einem prospektiven Ansatz unterlegen ist, da eine mögliche Selektionsbias nicht ausgeschlossen werden kann.

### 5.1 Assoziation der Notch2 Expression mit dem Überleben und mit den klinisch-pathologischen Daten

In dieser Studie wurde die Rolle der Notch2 Expression in primär resezierten Magenkarzinomen untersucht. Die Notch2 Expression wurde immunhistochemisch nachgewiesen. Es wurde keine Assoziation im Gesamtkollektiv zwischen der Notch2 Expression und dem Überleben gefunden. In der Subgruppe der intestinalen Karzinomen ist die Expression im Kern und im Zytoplasma mit dem medianen Überleben assoziiert: Patienten mit einer stärkeren Notch2 Expression überlebten signifikant länger als Patienten mit niedrigeren Expression. Eine niedrige Expression im Kern (Färbescore 0,1) ist mit einem schlechteren Überleben (15 Monate) assoziiert, als eine höhere Expression (Färbescore 2-12, NR,  $p=0,015$ ). Dasselbe Ergebnis kann man bei der Expression im Zytoplasma beobachten: eine stärkere Zytoplasmafärbung ist mit einer besseren Prognose assoziiert (FS 0-6: 21 Monate vs. FS 8-12: NR).

Diese Ergebnisse deuten auf eine tumorsuppressive Funktion von Notch2 im Magenkarzinom hin.

Es wurden bereits mehrere Studien veröffentlicht, die die Assoziation zwischen der Notch Expression und der Prognose untersucht haben. Zhang beschrieb, dass eine hohe Notch1 Expression im Magenkarzinom mit der Tiefe der Tumorinvasion, mit der Zahl der Lymphknotenmetastasen, mit einem fortgeschrittenen TNM-Stadium und mit einer schlechteren Prognose korreliert. Die multivariate Cox Regression Analyse bestätigte, dass Notch1 ein unabhängiger prognostischer Faktor ist (Zhang et al. 2014).

Reedijk publizierte, dass eine erhöhte Expression von Notch1 und seinem Ligand Jag1 im Mammakarzinom nachgewiesen werden kann und mit einem schlechteren Überleben assoziiert ist (Reedijk et al. 2005). Yeh kam zu einem ähnlichen Ergebnis im Jahr 2009. Er untersuchte die Notch1 Expression im Magenkarzinom und fand, dass die Expression des Notch1 Ligands Jagged1 mit der Aggressivität des Magenkarzinoms korreliert. Patienten mit erhöhter Jagged1-Expression hatten eine schlechtere Prognose als Patienten ohne Expression (Yeh et al. 2009a). Bauer beschrieb eine starke Assoziation zwischen einer niedrigen Notch2 Genexpression und einem besseren Überleben ( $p < 0,001$ ) in einer Subgruppe (Tumorregressionsgrad 2) von chemotherapierten Magenkarzinomen. Außerdem wurde ein signifikanter Anstieg von Notch2 nach der Behandlung mit Chemotherapie gefunden. Immunhistochemisch wurde eine Chemotherapie assoziierte Anstieg der Intensität der Notch2 Färbung (nicht aber der prozentualen Anteil) beschrieben. In dieser Studie erfolgte die Analyse jedoch auf mRNA-Ebene (Bauer et al. 2012).

Eine höhere Notch2 Expression (sowohl im Kern als auch im Zytoplasma) konnte in dieser Arbeit in den intestinalen Karzinomen nachgewiesen werden, und war in dieser Subgruppe mit einem besseren Überleben assoziiert. Dieses Ergebnis stimmt nicht mit dem von Sun (Sun et al. 2011) überein, der in seiner Studie keine Assoziation zwischen der Notch Expression und dem histopathologischen Typ gefunden hat.

Es wurde keine Assoziation der Notch2 Expression mit der Tumorlokalisation und dem Grading gefunden. Eine signifikant höhere Notch2 Expression im Kern und im Zytoplasma wurde in den frühen Tumorstadien (T1+T2  $p=0,02$ ;  $p=0,03$ ) im Vergleich zu den fortgeschrittenen Tumorstadien (T3+T4) nachgewiesen. Eine höhere Notch2 Expression im Zytoplasma war mit einem R0 Resektionsstatus ( $p=0,026$ ) und mit einem negativen Lymphknotenstatus ( $p=0,044$ ) assoziiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass während der Tumorprogression in den Magenkarzinomen eine Abnahme der Notch2 Genexpression erfolgt und deutet somit auf eine tumorsuppressive Funktion des Notch Signalweges in der Entwicklung des Magenkarzinoms hin. Es ist beschrieben, dass der Notch-Signalweg kontextabhängig sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Funktionen ausüben kann (South et al. 2012; Lobry et al. 2011). In mehreren Studien wurde die Rolle von Notch als Onkogen beschrieben, wie z.B. in der T-ALL (Weng et al. 2004), im Mammakarzinom (Fu et al. 2010), in der CLL, im Prostatakarzinom (Santagata et al. 2004) oder im Pankreaskarzinom (Mazur et al. 2010a). Über die anti-proliferative Wirkung wurde in wenigen Tumorentitäten wie im Hautkrebs (Proweller et al. 2006; Nicolas et al. 2003), im hepatozellulären Karzinom, im Zervixkarzinom und im kleinzelligen Lungenkarzinom berichtet (Ranganathan et al. 2011). Eine tumorsuppressive Funktion wurde z.B. für Notch1 auch in den Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus beschrieben (Agrawal et al. 2012). Die individuelle Notch-Rezeptoren können im selben

Tumortyp zeit- und kontextabhängig unterschiedliche Funktionen ausüben (Ranganathan et al. 2011; South et al. 2012). Eine duale Rolle wurde in Pankreaskarzinomen und in kolorektalen Karzinomen beschrieben (Mazur et al. 2010a). In der Studie von Chu wurde eine verminderte Notch2 Expression in kolorektalen Karzinomen gefunden im Vergleich zum Normalgewebe. Besser differenzierte Karzinome zeigten eine höhere Notch2 Expression als schlechter differenzierte Tumoren. Je fortgeschrittener das Tumorstadium war, desto weniger Notch2 Expression konnte nachgewiesen werden. Anhand dieser Studie spielt Notch2 eine antionkogene Funktion im kolorektalen Karzinom (Chu et al. 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind im Einklang mit den Ergebnissen der funktionalen Analyse vom Notch2 in einer Magenkarzinomzelllinie, die gezeigt hat dass die Herunterregulierung von Notch2 über siRNA die Tumorzellinvasion verstärkt (Guo et al. 2012). Allerdings beschreiben einige, vor allem in asiatischen Ländern durchgeführten Studien eine onkogene Funktion des Notch2 Gens. Eine höhere Notch2 Expression ist laut diesen Studien mit einer Tumorprogression assoziiert (Yeh et al. 2009a) (Zhang et al. 2014) (Luo et al. 2014; Li et al. 2007). Tseng beschreibt in seiner Studie, dass die Expression der Notch2 Intrazellulärdomäne N2IC (die aktivierte Form des Notch2 Rezeptors) die Zellproliferation und das Tumorwachstum der SC-M1 Magenkarzinomzellen fördert. Die Kolonieformation, die Migration und die Invasion wurden verstärkt. Diese Fähigkeiten wurden bei der Herunterregulation der Notch2-Expression unterdrückt (Tseng et al. 2012). Es wurde eine niedrige Expression im Normalgewebe und eine höhere Expression im Tumorgewebe gefunden (Sun et al. 2011). In den Magenkarzinom-Zelllinien konnte eine höhere Notch1 Expression nachgewiesen werden, als in der normalen Magenmukosa. Nach Hemmung des Notch1 Signalweges mittels DAPT wurde das Wachstum, die Invasion, die Metastasierung und die EMT ebenfalls gehemmt (Li et al. 2014). Eine andere Studie kam zum Ergebnis, dass die Notch1 Expression in Magenkarzinomzellen signifikant erhöht ist in und mit der Tumorgröße, dem Differenzierungsgrad und der Invasionstiefe korreliert. Notch1 ist laut dieser Studie ein unabhängiger Prognosefaktor für das Magenkarzinom, eine höhere Expression geht mit einer schlechteren Prognose einher (Li et al. 2007). Die Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse sind unklar, möglicherweise sind sie aber durch die verschiedenen Studienpopulationen, durch die Technologie der Analysen oder durch die Bewertungsmethoden bedingt. Eine weitere mögliche Ursache für die Diskrepanz kann in der unterschiedlichen Spezifität der verwendeten Antikörper liegen.

Die Arbeit weist einige Limitationen auf, die auf die geringen Fallzahlen und auf die retrospektive Natur der Studie beruhen. Weitere Studien mit der Untersuchung von höheren Fallzahlen wären notwendig, um die Rolle des Notch2 Signalweges in der Entwicklung des Magenkarzinoms weiter zu charakterisieren.

## 5.2 Klinische und histopathologische Response im chemotherapierten Patientenkollektiv

### 5.2.1 Therapieansprechen und Überleben

Die klinischen und histopathologischen Responder zeigten in der Studie ein signifikant längeres rezidivfreies, eventfreies und Gesamtüberleben als die Nonresponder. Etwa 30% (28,0%-30,0%) der Patienten zeigten ein Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit bereits veröffentlichten Ergebnissen (Becker et al. 2011) (Fink et al. 1995) (Ott et al. 2003). 38 Patienten (21%) zeigten entweder nur klinisches oder nur histopathologisches, evaluiertes Therapieansprechen, die klinische und histopathologische Response stimmte also in 79% überein. Die Beurteilung des klinischen Ansprechens erfolgt durch Gastroskopie und durch Endosonographie wobei beide Untersuchungstechniken vom Untersucher und von dem Füllungszustand des Magens abhängig sind. Dabei scheint das histopathologische, evaluierte Therapieansprechen der klinischen Response überlegen und gilt neben dem ypN-Status als unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben (Becker et al. 2011).

### 5.2.2 Klinisch-pathologische Daten, Therapieansprechen und Überleben

Die Ergebnisse zu den klinisch-pathologischen Daten (Tumorlokalisierung, Laurén-Klassifikation, Grading, Resektionsstatus und yTNM-Kategorie) und dem Therapieansprechen entsprechen bereits publizierten Studienergebnissen (Fink et al. 1995, Ott et al. 2003, Becker et al. 2011). Tumoren, die klinisch oder histopathologisch auf die Chemotherapie angesprochen haben, waren weniger fortgeschritten und konnten öfter R0-reseziert werden. Klinisches und histopathologisches Therapieansprechen findet man öfters in proximal lokalisierten Tumoren ( $p$  jeweils=0,006), im intestinalen Typ ( $p=0,013$ , 0,064) und in besser differenzierten Tumoren (beide  $p$ -Werte:  $p=0,017$ ). Das Therapieansprechen war außerdem mit dem Fehlen von Lymphknoten- und Fernmetastasen assoziiert. Erwartungsgemäß zeigten weniger fortgeschrittene, besser differenzierte und R0-resezierte Tumoren eine bessere Prognose. Ebenfalls eine gute Prognose hatten Patienten mit Karzinomen ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen. Das schlechteste Überleben zeigten Patienten bei einer Linitis plastica. Proximal lokalisierte Tumoren zeigten trotz eines besseren Therapieansprechens eine schlechtere Prognose als Tumoren mit einer Lokalisation im distalen oder im mittleren Drittel. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit bereits veröffentlichten Studien (Roder et al. 1993). Eine mögliche Ursache ist der aggressivere Wachstumstyp der proximalen Tumoren oder eine komplizierte OP-Technik, weswegen eine R0-Resektion schwieriger

zu erreichen ist als bei anders lokalisierten Karzinomen. Wegen des fehlenden Serosaüberzugs des proximalen Magens kann es früher zu einer Metastasierung kommen.

### 5.3 Polymorphismus rs11249433

Die Allelverteilung in dieser Studie sah folgendermaßen aus: CC 15%, CT 49%, TT 36%. Im Patientenkollektiv wurde eine Frequenz des CC Allels von ca. 15% beobachtet, was ungefähr den Angaben in der Literatur entspricht. Laut der SNP Datenbank der ncbi hat etwa 16,8 % der kaukasischen Bevölkerung den Genotyp CC, 51,3% den Genotyp CT und 31,9% den Genotyp TT (SNP Datenbank der ncbi). Die Häufigkeiten der Genotypen waren im Hardy-Weinberg Gleichgewicht. Der SNP rs11249433 befindet sich in der perizentromeren Region vom Chromosom 1p11.2. In dieser Region sind innerhalb von 1MB fünf Gene lokalisiert, darunter auch das Notch2 Gen.

#### 5.3.1 rs11249433, Therapieansprechen und Überleben

Der rs11249433 Polymorphismus zeigte keine signifikante Korrelation mit dem klinischen oder histopathologischen Ansprechen. Es ist denkbar, dass die Expression des Notch2 Gens im Tumorgewebe entscheidender ist als der Polymorphismus. Es wurde keine Assoziation zwischen dem Polymorphismus und dem Überleben gefunden, es konnte lediglich ein Trend beobachtet werden, Patienten mit dem heterozygoten Genotyp CT zeigten im Regressionsgrad 2 ein schlechteres Gesamtüberleben als die Genotypen CC+TT (48 vs. 77 Monate,  $p=0,088$ ). Wegen der kleinen Fallzahlen ist der Unterschied jedoch nicht signifikant. Eine höhere Fallzahl wäre notwendig um zu untersuchen ob es sich um einen signifikanten Unterschied handelt.

#### 5.3.2 rs11249433 und klinisch-pathologische Daten

Der Polymorphismus wurde auch auf Assoziation mit den klinisch-pathologischen Daten untersucht. Es besteht keine Assoziation zwischen den Genotypen und dem Alter oder dem Geschlecht. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Polymorphismus und der Laurén-Klassifikation gefunden ( $p=0,018$ ). Bei Patienten mit dem CC-Genotyp wurden verhältnismäßig mehr Karzinomen vom intestinalen Typ beobachtet, bei Patienten mit TT-Genotyp verhältnismäßig mehr nicht intestinale Tumoren.

### 5.3.3 rs11249433 und Notch2 Expression

Es konnte keine Assoziation zwischen dem Genotyp und der Notch2 Genexpression in den primär resezierten Magenkarzinomen nachgewiesen werden. In der Subgruppe der neoadjuvant behandelten Magenkarzinome zeigte die Genexpression im Zytoplasma eine Assoziation mit dem Polymorphismus. Der heterozygote Genotyp CT ist mit einer stärkeren Notch2 Expression im Zytoplasma assoziiert als die homozygoten Genotypen CC und TT. Sowohl eine höhere Prozentzahl als auch eine stärkere Färbintensität konnten für den CT Genotyp nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass das T-Allel mit einem höheren Prozentsatz Plasmafärbung ( $p=0,069$ ), und einer höheren Färbescore ( $p=0,073$ ) assoziiert ist. Die Ergebnisse sind nicht im Einklang mit den Ergebnisse von Fu (Fu et al. 2010), der beschrieb dass die Genotypen GG und AG mit einer höheren Notch2 Expression assoziiert sind. Die Ursache für die unterschiedliche Ergebnisse kann in der sehr niedrigen Fallzahl ( $n=45$ , Genotyp CC  $n=4$ ) liegen.

### 5.3.4 rs11249433 als Risikofaktor

In der Literatur wird die Bedeutung des SNP-s vor allem als Risikofaktor bei der Ausbildung von Mammakarzinomen beschrieben. Es wurde eine Assoziation zwischen rs11249433 und einer erhöhten Expression von Notch2 in Östrogen-Rezeptor positiven Mammakarzinomen ohne TP53 Mutationen gefunden (Thomas et al. 2009). Die Risikogenotypen AG und GG sind mit einer erhöhten Notch2 Expression assoziiert ( $p=0,054$ ) (Fu et al. 2010). Wu und Kollegen führten eine Metaanalyse von 15 Studien durch, die die Assoziation zwischen dem SNP und das Auftreten eines Mammakarzinoms untersuchten. Bei Kaukasier betrug die Häufigkeit des G-Allels 40%, bei den Ost-Asiaten 3% und bei den Afrikaner 12%. Die Odds-Ratio (OR) für den Polymorphismus rs11249433 und der Entwicklung eines Mammakarzinoms beträgt 1,09 (Wu et al. 2013). Es zeigte sich, dass nur Kaukasier mit dem G-Allel ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms besitzen, in den ost-asiatischen und afrikanischen Subgruppen wurde keine Assoziation zur Brustkrebs-Entwicklung entdeckt. Der SNP erhöht das Risiko für die Entwicklung von Östrogen-Rezeptor positiven (ER+) Tumoren (Wu et al. 2013). Eine weitere Arbeit beschrieb, dass der SNP mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Mammakarzinomen mit einer niedrigen E-Cadherin Expression assoziiert ist. Die SNP-Träger entwickelten am häufigsten ER-positive, lobuläre Mammakarzinome (Horne et al. 2014). Eine andere Studie konnte keine Assoziation zwischen dem Polymorphismus und dem Brustkrebsrisiko in chinesischen Frauen feststellen (Jiang et al. 2011). Figueroa überprüfte 2011 die Ergebnisse von 39 Studien mit insgesamt 46.000 Mammakarzinomfällen und konnte die Ergebnisse von Thomas und Fu bestätigen. Der SNP rs11249433

zeigte eine stärkere Assoziation mit ER-positiven Mammakarzinomen (OR für ER+ Tumoren 1,13, für ER- Tumoren 1,03). Die Assoziation mit den ER+ Tumoren war stärker nachweisbar in den lobulären und in den besser differenzierten Karzinomen. Es wurde keine Assoziation des SNP-s mit der Ausdehnung des Tumors oder mit dem LK-Status gefunden (Figuroa et al. 2011). Das Risiko-Allel ist für BRCA2 Mutationsträgerinnen mit der Entwicklung von Mammakarzinomen assoziiert (HR = 1.09, 95% CI: 1.02–1.17, *P*-trend = 0.015), nicht aber für die BRCA1 Mutationsträgerinnen (HR = 0.97, 95% CI: 0.92–1.02, *P*-trend = 0.20) (Antoniou et al. 2011). Der SNP rs11249433 spielt wahrscheinlich auch in anderen Tumorentitäten eine wichtige Rolle. Er ist signifikant mit der Entstehung von multiplem Primärkrebs (multiple primary cancer, MPC; OR, 1.16; 95% CI, 1.04-1.28; *P* = 0.005) assoziiert. Die Assoziation blieb sogar nach Ausschluss der Brustkrebspatienten aus dem Kollektiv erhalten (Park et al. 2014). Chen und seine Kollegen führten eine Meta-Analyse über alle Studien durch, die den Zusammenhang des SNP-s rs11249433 mit dem Mammakarzinom untersuchten. Die Träger des Risikoallels G haben ein OR von 1,09 (95% CI: 1.06–1.12;  $P < 10^{-5}$ ) für die Entwicklung eines Mammakarzinoms. Ein erhöhtes Risiko wurde nur für Kaukasier beschrieben, für Asiaten und Afrikaner bestand keine signifikante Assoziation mit der Entwicklung eines Mammakarzinoms. Rs11249433 ist in der Entstehung von Östrogen- und Progesteronrezeptor positiven Tumoren involviert (Chen et al. 2013).

In dieser Studie war eine Aussage über eine Assoziation des SNPs als Risikofaktor nicht möglich. Ein direkter Vergleich mit einem Kontrollkollektiv war nicht möglich, da nur Tumorpatienten analysiert wurden.



## 6. Zusammenfassung

In dieser Studie wurde untersucht, ob die Expression des Notch2 Gens mit den klinisch-pathologischen Charakteristika sowie mit der Prognose von 142 Patienten in primär resezierten Magenkarzinomen korreliert. In mehreren Studien wurde berichtet, dass der Notch-Signalweg kontextabhängig sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Funktionen ausüben kann. Die Genexpression wurde durch immunhistochemische Färbung und durch anschließende mikroskopische Beurteilung nachgewiesen. In dem Patientenkollektiv dieser Studie wurde keine Assoziation im Gesamtkollektiv zwischen der Notch2 Expression und dem Überleben gefunden. In der Subgruppe der intestinalen Karzinomen zeigte sich die Expression im Kern und im Zytoplasma mit dem medianen Überleben assoziiert: Patienten mit einer stärkeren Notch2 Expression überlebten signifikant länger als Patienten mit niedrigeren Expression. Es konnten signifikante Korrelationen zwischen der Genexpression und den klinisch-pathologischen Daten nachgewiesen werden. Eine signifikant höhere Notch2 Expression (sowohl im Kern, als auch im Zytoplasma) wurde in den intestinalen Karzinomen und in den frühen Tumorstadien nachgewiesen. Eine höhere Notch2 Expression im Zytoplasma war mit einem R0 Resektionsstatus und mit einem negativen Lymphknotenstatus assoziiert. Zusammenfassend weisen diese Daten auf eine tumorsuppressive Eigenschaft von Notch2 hin.

Außerdem wurde der mit Notch2 assoziierte genetische Polymorphismus rs11249433 auf Assoziationen mit dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie von 179 Magenkarzinompatienten, mit dem Überleben und mit der Notch2 Expression untersucht. Studien beschreiben, dass dieser Polymorphismus in der Entwicklung des Mammakarzinoms und wahrscheinlich auch in anderen Tumorentitäten eine wichtige Rolle spielt und mit einer Notch2 Expression assoziiert ist. Für die Lösung der Frage wurde DNA aus Lymphozyten und aus gesundem Gewebe gewonnen. Anschließend erfolgte eine Genotypisierung durch Polymerase-Kettenreaktion, DNA-Sequenzierung und durch denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie. In dem Patientenkollektiv dieser Studie zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Polymorphismus und dem Ansprechen auf die 5-FU und platinbasierten Chemotherapie. Zwischen der Prognose und dem Polymorphismus konnten keine Assoziationen nachgewiesen werden.

Anschließend wurde untersucht, ob zwischen dem Polymorphismus und der Notch2 Expression eine Assoziation besteht. In der Subgruppe der neoadjuvant behandelten Patienten konnte eine Korrelation des heterozygoten CT Genotyps mit einer höheren Notch2 Expression im Zytoplasma nachgewiesen werden. Insgesamt scheint somit der SNP rs11249433 für das Magenkarzinom keine große Rolle zu spielen.

## Literaturverzeichnis

- Agrawal, N., Jiao, Y., Bettegowda, Ch., Hutfless, S. M., Wang, Y., David, S., Cheng, Y., Twaddell, W. S., Latt, N. L., Shin, E. J., Wang, L.-D., Wang, L., Yang, W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W. and Meltzer, St. J. (2012): Comparative genomic analysis of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. In: *Cancer discovery* 2 (10), S. 899–905. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0189.
- Aguilera, A., Gómez-González, B. (2008): Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. In: *Nat. Rev. Genet.* 9 (3), S. 204–217. DOI: 10.1038/nrg2268.
- Andersson, E. R., Sandberg, R., Lendahl, U. (2011): Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. In: *Development* 138 (17), S. 3593–3612. DOI: 10.1242/dev.063610.
- Antoniou, A. C., Kartsonaki, C., Sinilnikova O. (2011): Common alleles at 6q25.1 and 1p11.2 are associated with breast cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Oxford University Press.
- Bang, Y. J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H. C., 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., ToGA Trial Investigators (2010): 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. In: *Lancet* 376 (9742), S. 687–697. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X.
- Bauer, L., Langer, R., Becker, K., Hapfelmeier, A., Ott, K., Novotny, A., Höfler, H., Keller, G. (2012): Expression profiling of stem cell-related genes in neoadjuvant-treated gastric cancer: a NOTCH2, GSK3B and  $\beta$ -catenin gene signature predicts survival. In: *PLoS ONE* 7 (9), S. e44566. DOI: 10.1371/journal.pone.0044566.
- Becker, K., Langer, R., Reim, D., Novotny, A., Meyer zum Buschenfelde, C., Engel, J., Friess, H., Hofler, H. (2011): Significance of histopathological tumor regression after neoadjuvant chemotherapy in gastric adenocarcinomas: a summary of 480 cases. In: *Ann. Surg.* 253 (5), S. 934–939. DOI: 10.1097/SLA.0b013e318216f449.
- Becker, K.-F., Keller, G. (Hg.) (2010): Gastric Cancer. Online verfügbar unter <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0006056.html>, zuletzt geprüft am 31.07.2014.
- Beghelli, S., de Manzoni, G., Barbi, S., Tomezzoli, A., Roviello, F., Di Gregorio, C., Vindigni, C., Bortesi, L., Parisi, A., Saragoni, L., Scarpa, A., Moore, P. S. (2006): Microsatellite instability in gastric cancer is asso-

- ciated with better prognosis in only stage II cancers. In: *Surgery* 139 (3), S. 347–356. DOI: 10.1016/j.surg.2005.08.021.
- Benedito, R., Roca, C., Sørensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., Adams, R. H. (2009): The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. In: *Cell* 137 (6), S. 1124–1135. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.025.
- Bosman, F. T., Carneiro, F., Hruban, R. H. (Hg.) (2010): WHO Classification of Tumours of the Digestive System. World Health Organisation. 4. Aufl.: World Health Organisation.
- Brennan, C., Momota, H., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Tandon, A., Pedraza, A., Holland, E. (2009): Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. In: *PLoS ONE* 4 (11), S. e7752. DOI: 10.1371/journal.pone.0007752.
- Brookes, A. J. (1999): The essence of SNPs. In *Gene* 234 (2), pp. 177–186.
- Brooks-Wilson, A. R., Kaurah, P., Suriano, G., Leach, S., Senz, J., Grehan, N., Butterfield, Y. S., Jeyes, J., Schinas, J., Bacani, J., Kelsey, M., Ferreira, P., MacGillivray, B., MacLeod, P., Micek, M., Ford, J., Foulkes, W., Australie, K., Greenberg, C., LaPointe, M., Gilpin, C., Nikkel, S., Gilchrist, D., Hughes, R., Jackson, C. E., Monaghan, K. G., Oliveira, M. J., Seruca, R., Gallinger, S., Caldas, C., Huntsman, D. (2004): Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. In: *J. Med. Genet.* 41 (7), S. 508–517.
- Chau, I., Ashley, S., Cunningham, D. (2009): Validation of the Royal Marsden hospital prognostic index in advanced esophagogastric cancer using individual patient data from the REAL 2 study. In: *J. Clin. Oncol.* 27 (19), S. e3-4. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.0863.
- Chau, I., Norman, A. R., Cunningham, D., Waters, J. S., Oates, J., Ross, P. J. (2004): Multivariate prognostic factor analysis in locally advanced and metastatic esophago-gastric cancer--pooled analysis from three multicenter, randomized, controlled trials using individual patient data. In: *J. Clin. Oncol.* 22 (12), S. 2395–2403. DOI: 10.1200/JCO.2004.08.154.
- Chen, Q., Shi, R., Liu, W., Jiang, D. (2013): Assessing interactions between the association of common genetic variant at 1p11 (rs11249433) and hormone receptor status with breast cancer risk. In: *PLoS one* 8 (8), S. e72487. DOI: 10.1371/journal.pone.0072487.
- Chu, D., Zheng, J., Wang, W., Zhao, Q., Li, Y., Li, J., Xie, H., Zhang, H., Dong, G., Xu, C., Li, M., Chen, D., Ji, G. (2009): Notch2 expression is decreased in colorectal cancer and related to tumor differentiation status. In: *Annals of surgical oncology* 16 (12), S. 3259–3266. DOI: 10.1245/s10434-009-0655-6.

- Cunningham, D., Allum, W. H., Stenning, S. P., Thompson, J. N., Van de Velde, C. J., Nicolson, M., Scarffe, J. H., Lofts, F. J., Falk, S. J., Iveson, T. J., Smith, D. B., Langley, R. E., Verma, M., Weeden, S., Chua, Y. J., MAGIC Trial Participants (2006): Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. In: *N. Engl. J. Med.* 355 (1), S. 11–20. DOI: 10.1056/NEJMoa055531.
- Demarest, R. M., Ratti, F., Capobianco, A. J. (2008): It's T-ALL about Notch. In: *Oncogene* 27 (38), S. 5082–5091. DOI: 10.1038/onc.2008.222.
- Deng, N., Goh, L. K., Wang, H., Das, K., Tao, J., Tan, I. B., Zhang, S., Lee, M., Wu, J., Lim, K. H., Lei, Z., Goh, G., Lim, Q. Y., Tan, A. L., Sin Poh, D. Y., Riahi, S., Bell, S., Shi, M. M., Linnartz, R., Zhu, F., Yeoh, K. G., Toh, H. C., Yong, W. P., Cheong, H. C., Rha, S. Y., Boussioutas, A., Grabsch, H., Rozen, S., Tan, P. (2012): A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. In: *Gut* 61 (5), S. 673–684. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301839.
- Durães, C., Almeida, G. M., Seruca, R., Oliveira, C., Carneiro, F. (2014): Biomarkers for gastric cancer: prognostic, predictive or targets of therapy? In: *Virchows Arch.* 464 (3), S. 367–378. DOI: 10.1007/s00428-013-1533-y.
- Espinoza, I., Miele, L. (2013): Deadly crosstalk: Notch signaling at the intersection of EMT and cancer stem cells. In: *Cancer Lett.* 341 (1), S. 41–45. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.08.027.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., Bray, F. (2013): GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. International Agency for Research on Cancer. Online verfügbar unter <http://globocan.iarc.fr>, zuletzt geprüft am 31.07.2014.
- Figuroa, J. D., Garcia-Closas, M., Humphreys, M., Platte, R., Hopper, John L., Southey, M. C. (2011): Associations of common variants at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1) with breast cancer risk and heterogeneity by tumor subtype: findings from the Breast Cancer Association Consortium. In: *Human molecular genetics* 20 (23), S. 4693–4706. DOI: 10.1093/hmg/ddr368.
- Fink, U., Schuhmacher, C., Stein, H. J., Busch, R., Feussner, H., Dittler, H. J., Helmberger, A., Böttcher, K., Siewert, J. R. (1995): Preoperative chemotherapy for stage III-IV gastric carcinoma: feasibility, response and outcome after complete resection. In: *The British journal of surgery* 82 (9), S. 1248–1252.
- Fitzgerald, R. C., Hardwick, R., Huntsman, D., Carneiro, F., Guilford, P., Blair, V., Chung, D. C., Norton, J., Ragnath, K., Van Krieken, J. H., Dwerryhouse, S., Caldas, C., International Gastric Cancer Linkage Consortium (2010): Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical manage-

ment and directions for future research. In: *J. Med. Genet.* 47 (7), S. 436–444. DOI: 10.1136/jmg.2009.074237.

Fu, Y. P., Edvardsen, H., Kaushiva, A., Arhancet, J. P., Howe, T. M., Kohaar, I., Porter-Gill, P., Shah, A., Landmark-Høyvik, H., Fosså, S. D., Ambs, S., Naume, B., Børresen-Dale, A. L., Kristensen, V. N., Prokuni-na-Olsson, L. (2010): NOTCH2 in breast cancer: association of SNP rs11249433 with gene expression in ER-positive breast tumors without TP53 mutations. In: *Mol. Cancer* 9, S. 113. DOI: 10.1186/1476-4598-9-113.

Grabsch, H. I., Tan, P. (2013): Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms. In: *Dig Surg* 30 (2), S. 150–158. DOI: 10.1159/000350876.

Gravalos, C., Jimeno, A. (2008): HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. In: *Ann. Oncol.* 19 (9), S. 1523–1529. DOI: 10.1093/annonc/mdn169.

Graziano, F., Galluccio, N., Lorenzini, P., Ruzzo, A., Canestrari, E., D'Emidio, S., Catalano, V., Sisti, V., Ligorio, C., Andreoni, F., Rulli, E., Di Oto, E., Fiorentini, G., Zingaretti, C., De Nictolis, M., Cappuzzo, F., Magnani, M. (2011): Genetic activation of the MET pathway and prognosis of patients with high-risk, radically resected gastric cancer. In: *J. Clin. Oncol.* 29 (36), S. 4789–4795. DOI: 10.1200/JCO.2011.36.7706.

Gu, Feng; Ma, Yongjie; Zhang, Zuping; Zhao, Jinghui; Kobayashi, Hisayuki; Zhang, Lun; Fu, Li (2010): Expression of Stat3 and Notch1 is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Oncol. Rep.* 23 (3), S. 671–676.

Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., McLeod, M., McLeod, N., Harawira, P., Taite, H., Scoular, R., Miller, A., Reeve, A. E. (1998): E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. In: *Nature* 392 (6674), S. 402–405. DOI: 10.1038/32918.

Guo, L. Y., Li, Y. M., Qiao, L., Liu, T., Du, Y. Y., Zhang, J. Q., He, W. T., Zhao, Y. X., He, D. Q. (2012): Notch2 regulates matrix metalloproteinase 9 via PI3K/AKT signaling in human gastric carcinoma cell MKN-45. In: *World journal of gastroenterology : WJG* 18 (48), S. 7262–7270. DOI: 10.3748/wjg.v18.i48.7262.

Hartgrink, H. H., Jansen, E. P. M., van Grieken, N. C. T., Van de Velde, C. J. H. (2009): Gastric cancer. In: *Lancet* 374 (9688), S. 477–490. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60617-6.

Hatakeyama, M., Higashi, H. (2005): Helicobacter pylori CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. In: *Cancer Sci.* 96 (12), S. 835–843. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2005.00130.x.

Herold, G. (Hg.) (2012): Innere Medizin.

Horne, H. N., Sherman, M. E., Garcia-Closas, M., Pharoah, P. D., Blows, F. M., Yang, X. R., Hewitt, S. M., Conway, C. M., Lissowska, J., Brinton, L. A., Prokunina-Olsson, L., Dawson, S. J., Caldas, C., Easton, D. F., Chanock, S. J., Figueroa, J. D. (2014): Breast cancer susceptibility risk associations and heterogeneity by E-cadherin tumor tissue expression. In: *Breast Cancer Res. Treat.* 143 (1), S. 181–187. DOI: 10.1007/s10549-013-2771-z.

Jácome, A. A., Coutinho, A. K., Lima, E. M., Andrade, A. C., Dos Santos, J. S. (2016): Personalized medicine in gastric cancer: Where are we and where are we going? In: *World Journal of Gastroenterology.* 22(3), S. 1160-1171. DOI: 10.3748/wjg.v22.i3.1160

Jiang, Y., Shen, H., Liu, X., Dai, J., Jin, G., Qin, Z., Chen, J., Wang, S., Wang, X., Hu, Z., Shen, H. (2011): Genetic variants at 1p11.2 and breast cancer risk: a two-stage study in Chinese women. In: *PLoS one* 6 (6), S. e21563. DOI: 10.1371/journal.pone.0021563.

Jung, E. J., Jung, E. J., Min, S. Y., Kim, M. A., Kim, W. H. (2012): Fibroblast growth factor receptor 2 gene amplification status and its clinicopathologic significance in gastric carcinoma. In: *Hum. Pathol.* 43 (10), S. 1559–1566. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.12.002.

Kakiuchi, M., Nishizawa, T., Ueda, H., Gotoh, K., Tanaka, A., Hayashi, A., Yamamoto, S., Tatsuno, K., Katoh, H., Watanabe, Y., Ichimura, T., Ushiku, T., Funahashi, S., Tateishi, K., Wada, I., Shimizu, N., Nomura, S., Koike, K., Seto, Y., Fukayama, M., Aburatani, H., Ishikawa, S. (2014): Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. In: *Nat. Genet.* 46 (6), S. 583–587. DOI: 10.1038/ng.2984.

Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C., Ferlini, C. (2015): Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. In *BMC medical genomics* 8, p. 37. DOI: 10.1186/s12920-015-0115-z.

Keller, G., Vogelsang, H., Becker, I., Hutter, J., Ott, K., Candidus, S., Grundei, T., Becker, K. F., Mueller, J., Siewert, J. R., Höfler, H. (1999): Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. In: *Am. J. Pathol.* 155 (2), S. 337–342. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65129-2.

Keller, G., Höfler, H., Becker, K. F. (2005): Molecular medicine of gastric adenocarcinomas. In: *Expert Rev Mol Med* 7 (17), S. 1–13. DOI: 10.1017/S1462399405009592.

- Kim, M. A., Lee, H. S., Lee, H. E., Jeon, Y. K., Yang, H. K., Kim, W. H. (2008): EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. In: *Histopathology* 52 (6), S. 738–746. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2008.03021.x.
- Kiyose, S., Nagura, K., Tao, H., Igarashi, H., Yamada, H., Goto, M., Maeda, M., Kurabe, N., Suzuki, M., Tsuboi, M., Kahyo, T., Shinmura, K., Hattori, N., Sugimura, H. (2012): Detection of kinase amplifications in gastric cancer archives using fluorescence in situ hybridization. In: *Pathol. Int.* 62 (7), S. 477–484. DOI: 10.1111/j.1440-1827.2012.02832.x.
- Lauren, P. (1965): The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. In: *Acta Pathol Microbiol Scand* 64, S. 31–49.
- Lee, J. H., Park, S. J., Abraham, S. C., Seo, J. S., Nam, J. H., Choi, C., Juhng, S. W., Rashid, A., Hamilton, S. R., Wu, T. T. (2004): Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas. In: *Oncogene* 23 (26), S. 4646–4654. DOI: 10.1038/sj.onc.1207588.
- Lee, J., Seo, J. W., Jun, H. J., Ki, C. S., Park, S. H., Park, Y. S., Lim, H. Y., Choi, M. G., Bae, J. M., Sohn, T. S., Noh, J. H., Kim, S., Jang, H. L., Kim, J. Y., Kim, K. M., Kang, W. K., Park, J. O. (2011): Impact of MET amplification on gastric cancer: possible roles as a novel prognostic marker and a potential therapeutic target. In: *Oncol. Rep.* 25 (6), S. 1517–1524. DOI: 10.3892/or.2011.1219.
- Leong, K. G., Niessen, K., Kulic, I., Raouf, A., Eaves, C., Pollet, I., Karsan, A. (2007): Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. In: *J. Exp. Med.* 204 (12), S. 2935–2948. DOI: 10.1084/jem.20071082.
- Li, C., Oh, S. J., Kim, S., Hyung, W. J., Yan, M., Zhu, Z. G., Noh, S. H. (2009): Macroscopic Borrmann type as a simple prognostic indicator in patients with advanced gastric cancer. In: *Oncology* 77 (3-4), S. 197–204. DOI: 10.1159/000236018.
- Li, D. W., Wu, Q., Peng, Z. H., Yang, Z. R., Wang, Y. (2007): [Expression and significance of Notch1 and PTEN in gastric cancer]. In: *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer* 26 (11), S. 1183–1187.
- Li, L. C., Peng, Y., Liu, Y. M., Wang, L. L., Wu, X. L. (2014): Gastric cancer cell growth and epithelial-mesenchymal transition are inhibited by  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT. In: *Oncol Lett* 7 (6), S. 2160–2164. DOI: 10.3892/ol.2014.1980.
- Lieto, E., Ferraraccio, F., Orditura, M., Castellano, P., Mura, A. L., Pinto, M., Zamboli, A., De Vita, F., Galizia, G. (2008): 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. In: *Ann. Surg. Oncol.* 15 (1), S. 69–79. DOI: 10.1245/s10434-007-9596-0.

Lobry, C., Oh, P., Aifantis, I. (2011): Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. In: *The Journal of experimental medicine* 208 (10), S. 1931–1935. DOI: 10.1084/jem.20111855.

Luo, D. H., Zhou, Q., Hu, S. K., Xia, Y. Q., Xu, C. C., Lin, T. S., Pan, Y. T., Wu, J. S., Jin, R. (2014): Differential expression of Notch1 intracellular domain and p21 proteins, and their clinical significance in gastric cancer. In: *Oncology letters* 7 (2), S. 471–478. DOI: 10.3892/ol.2013.1751.

Marrelli, D., Polom, K., Pascale, V., Vindigni, C., Piagnerelli, R., De Franco, L., Ferrara, F., Roviello, G., Garosi, L., Petrioli, R., Roviello, F. (2015): Strong Prognostic Value of Microsatellite Instability in Intestinal Type Non-cardia Gastric Cancer. In *Annals of surgical oncology*. DOI: 10.1245/s10434-015-4931-3.

Mazur, P. K., Einwächter, H., Lee, M., Sipos, B., Nakhai, H., Rad, R., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L. J., Radtke, F., Klöppel, G., Schmid, R. M., Siveke, J. T. (2010a): Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (30), S. 13438–13443. DOI: 10.1073/pnas.1002423107.

Mazur, P. K., Grüner, B. M., Nakhai, H., Sipos, B., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L. J., Radtke, F., Schmid, R. M., Siveke, J. T. (2010b): Identification of epidermal Pdx1 expression discloses different roles of Notch1 and Notch2 in murine Kras(G12D)-induced skin carcinogenesis in vivo. In: *PLoS ONE* 5 (10), S. e13578. DOI: 10.1371/journal.pone.0013578.

Milne, A. N., Carneiro, F., O'Morain, C., Offerhaus, G. J. A. (2009): Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. In: *Hum. Genet.* 126 (5), S. 615–628. DOI: 10.1007/s00439-009-0722-x.

Möhler, M. (2012): Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs. Online verfügbar unter [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-009k\\_S3\\_Magenkarzinon\\_Diagnostik\\_Therapie\\_Adenokarzinome\\_Magen\\_%C3%B6sophagogastralen\\_%C3%9Cbergang\\_2012-02.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-009k_S3_Magenkarzinon_Diagnostik_Therapie_Adenokarzinome_Magen_%C3%B6sophagogastralen_%C3%9Cbergang_2012-02.pdf).

Nakamura, T., Tsuchiya, K., Watanabe, M. (2007): Crosstalk between Wnt and Notch signaling in intestinal epithelial cell fate decision. In: *J. Gastroenterol.* 42 (9), S. 705–710. DOI: 10.1007/s00535-007-2087-z.

Napieralski, R., Ott, K., Kremer, M., Becker, K., Boulesteix, A. L., Lordick, F., Siewert, J. R., Höfler, H., Keller, G. (2007): Methylation of tumor-related genes in neoadjuvant-treated gastric cancer: relation to



therapy response and clinicopathologic and molecular features. In: *Clin. Cancer Res.* 13 (17), S. 5095–5102. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0241.

Ncbi SNP Datenbank der ncbi: retrieved from

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11249433](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=11249433)

Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J. A., Mill, P., van Noort, M., Hui, C. C., Clevers, H., Dotto, G. P., Radtke, F. (2003): Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. In: *Nature genetics* 33 (3), S. 416–421. DOI: 10.1038/ng1099.

Ott, K., Sendler, A., Becker, K., Dittler, H. J., Helmberger, H., Busch, R., Kollmannsberger, C., Siewert, J. R., Fink, U. (2003): Neoadjuvant chemotherapy with cisplatin, 5-FU, and leucovorin (PLF) in locally advanced gastric cancer: a prospective phase II study. In: *Gastric Cancer* 6 (3), S. 159–167. DOI: 10.1007/s10120-003-0245-4.

Ott, K., Vogelsang, H., Mueller, J., Becker, K., Müller, M., Fink, U., Siewert, J. R., Höfler, H., Keller, G. (2003): Chromosomal instability rather than p53 mutation is associated with response to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in gastric carcinoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9 (6), S. 2307–2315.

Pacelli, F., Papa, V., Caprino, P., Sgadari, A., Bossola, M., Doglietto, G. B. (2001): Proximal compared with distal gastric cancer: multivariate analysis of prognostic factors. In: *Am Surg* 67 (7), S. 697–703.

Park, S. L., Caberto, C. P., Lin, Y., Goodloe, R. J., Dumitrescu, L., Love, S. A., Matisse, T. C., Hindorff, L. A., Fowke, J. H., Schumacher, F. R., Beebe-Dimmer J., Chen, C., Hou, L., Thomas, F., Deelman, E., Han, Y., Peters, U., North, K. E., Heiss, G., Crawford, D. C., Haiman, C. A., Wilkens, L. R., Bush, W. S., Kooperberg, C., Cheng, I., Le Marchand, L. (2014): Association of Cancer Susceptibility Variants with Risk of Multiple Primary Cancers: The Population Architecture using Genomics and Epidemiology Study. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 23 (11), S. 2568–2578. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0129.

Piazzini, G., Fini, L., Selgrad, M., Garcia, M., Daoud, Y., Wex, T., Malfertheiner, P., Gasbarrini, A., Romano, M., Meyer, R. L., Genta, R. M., Fox, J. G., Boland, C. R., Bazzoli, F., Ricciardiello, L. (2011): Epigenetic regulation of Delta-Like1 controls Notch1 activation in gastric cancer. In: *Oncotarget* 2 (12), S. 1291–1301.

- Proweller, A., Tu, L., Lepore, J. J., Cheng, L., Lu, M. M., Seykora, J., Millar, S. E., Pear, W. S., Parmacek, M. S. (2006): Impaired notch signaling promotes de novo squamous cell carcinoma formation. In: *Cancer research* 66 (15), S. 7438–7444. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0793.
- Ranganathan, P., Weaver, K. L., Capobianco, A. J. (2011): Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. In: *Nat. Rev. Cancer* 11 (5), S. 338–351. DOI: 10.1038/nrc3035.
- Reedijk, M., Odorcic, S., Chang, L., Zhang, H., Miller, N., McCready, D. R., Lockwood, G., Egan, S. E. (2005): High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. In: *Cancer Res.* 65 (18), S. 8530–8537. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1069.
- Remmele, W., Stegner, H. E. (1987): Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. In *Der Pathologe* 8 (3), pp. 138–140.
- Robert Koch-Institut (Hg.) (2014a). Robert Koch-Institut. Retrieved from [http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2013/kid\\_2013\\_c0097\\_krebs\\_gesamt.pdf;jsessionid=F50B0DE8B01F3BC9435A2C84D845D52B.2\\_cid390?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/kid_2013_c0097_krebs_gesamt.pdf;jsessionid=F50B0DE8B01F3BC9435A2C84D845D52B.2_cid390?__blob=publicationFile), zuletzt geprüft am 07.08.2014.
- Robert Koch-Institut (Hg.) (2014b). Zentrum für Krebsregisterdaten. Online verfügbar unter [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Magenkrebs/magenkrebs\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Magenkrebs/magenkrebs_node.html), zuletzt geprüft am 07.08.2014.
- Roder, J. D., Böttcher, K., Siewert, J. R., Busch, R., Hermanek, P., Meyer, H. J. (1993): Prognostic factors in gastric carcinoma. Results of the German Gastric Carcinoma Study 1992. In: *Cancer* 72 (7), S. 2089–2097.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggs, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Velculescu, V. E. (2004): High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. In: *Science* 304 (5670), S. 554. DOI: 10.1126/science.1096502.
- Santagata, S., Demichelis, F., Riva, A., Varambally, S., Hofer, M. D., Kutok, J. L., Kim, R., Tang, J., Montie, J. E., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A., Aster, J. C. (2004): JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence. In: *Cancer Res.* 64 (19), S. 6854–6857. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2500.

- Shi, J., Yao, D., Liu, W., Wang, N., Lv, H., Zhang, G., Ji, M., Xu, L., He, N., Shi, B., Hou, P. (2012): Highly frequent PIK3CA amplification is associated with poor prognosis in gastric cancer. In: *BMC Cancer* 12, S. 50. DOI: 10.1186/1471-2407-12-50.
- Shikata, K., Doi, Y., Yonemoto, K., Arima, H., Ninomiya, T., Kubo, M., Tanizaki, Y., Matsumoto, T., Iida, M., Kiyohara, Y. (2008): Population-based prospective study of the combined influence of cigarette smoking and Helicobacter pylori infection on gastric cancer incidence: the Hisayama Study. In: *Am. J. Epidemiol.* 168 (12), S. 1409–1415. DOI: 10.1093/aje/kwn276.
- Siewert, J. R., Böttcher, K., Stein, H. J., Roder, J. D. (1998): Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. In: *Ann. Surg.* 228 (4), S. 449–461.
- Smith, M.-G., Hold, G.-L., Tahara, E., El-Omar, E.-M. (2006): Cellular and molecular aspects of gastric cancer. In: *World J. Gastroenterol.* 12 (19), S. 2979–2990.
- Sobin, L. H., Wittekind, C. (Eds.) (2002): TNM classification of malignant tumours. International Union against Cancer. 6. ed. New York: Wiley-Liss. Available online at <http://www.loc.gov/catdir/description/wiley036/2002000627.html>.
- South, A. P., Cho, R. J., Aster, J. C. (2012): The double-edged sword of Notch signaling in cancer. In: *Seminars in cell & developmental biology* 23 (4), S. 458–464. DOI: 10.1016/j.semcd.2012.01.017.
- Stocker, G., Ott, K., Henningsen, N., Becker, K., Hapfelmeier, A., Lordick, F., Hois, S., Plaschke, S., Höfler, H., Keller, G. (2009): CyclinD1 and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms are associated with prognosis in neoadjuvant-treated gastric carcinoma. In: *Eur. J. Cancer* 45 (18), S. 3326–3335. DOI: 10.1016/j.ejca.2009.09.021.
- Sun, Y., Gao, X., Liu, J., Kong, Q. Y., Wang, X. W., Chen, X. Y., Wang, Q., Cheng, Y. F., Qu, X. X., Li, H. (2011): Differential Notch1 and Notch2 expression and frequent activation of Notch signaling in gastric cancers. In: *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135 (4), S. 451–458. DOI: 10.1043/2009-0665-OA.1.
- The Cancer Genome Atlas Research Network (2014): Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. In: *Nature*. DOI: 10.1038/nature13480.
- Thomas, G., Jacobs, K. B., Kraft, P., Yeager, M., Wacholder, S., Cox, D. G., Hankinson, S. E., Hutchinson, A., Wang, Z., Yu, K., Chatterjee, N., Garcia-Closas, M., Gonzalez-Bosquet, J., Prokunina-Olsson, L., Orr, N., Willett, W. C., Colditz, G. A., Ziegler, R. G., Berg, C. D., Buys, S. S., McCarty, C. A., Feigelson, H. S., Calle, E. E., Thun, M. J., Diver, R., Prentice, R., Jackson, R., Kooperberg, C., Chlebowski, R., Lissowska, J., Peplonska, B., Brinton, L. A., Sigurdson, A., Doody, M., Bhatti, P., Alexander, B. H., Buring, J., Lee, I. M.,

- Vatten, L. J., Hveem, K., Kumle, M., Hayes, R. B., Tucker, M., Gerhard, D. S., Fraumeni, J. F. Jr., Hoover, R. N., Chanock, S. J., Hunter, D. J. (2009): A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1). In: *Nature genetics* 41 (5), S. 579–584. DOI: 10.1038/ng.353.
- Tseng, Y. C., Tsai, Y. H., Tseng, M. J., Hsu, K. W., Yang, M. C., Huang, K. H., Li, A. F., Chi, C. W., Hsieh, R. H., Ku, H. H., Yeh, T. S. (2012): Notch2-induced COX-2 expression enhancing gastric cancer progression. In: *Mol. Carcinog.* 51 (12), S. 939–951. DOI: 10.1002/mc.20865.
- Ushijima, T., Sasako, M. (2004): Focus on gastric cancer. In: *Cancer Cell* 5 (2), S. 121–125.
- Velho, S., Oliveira, C., Ferreira, A., Ferreira, A. C., Suriano, G., Schwartz, S. Jr., Duval, A., Carneiro, F., Machado, J. C., Hamelin, R., Seruca, R. (2005): The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. In: *Eur. J. Cancer* 41 (11), S. 1649–1654. DOI: 10.1016/j.ejca.2005.04.022.
- Wang, K., Kan, J., Yuen, S. T., Shi, S.T., Chu, K. M., Law, S., Chan, T. L., Kan, Z., Chan, A. S., Tsui, W. Y., Lee, S. P., Ho, S. L., Chan, A. K., Cheng, G. H., Roberts, P. C., Rejto, P. A., Gibson, N. W., Pocalyko, D. J., Mao, M., Xu, J., Leung, S. Y. (2011): Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. In: *Nat. Genet.* 43 (12), S. 1219–1223. DOI: 10.1038/ng.982.
- Wang, Z., Li, Y., Ahmad, A., Azmi, A. S., Banerjee, S., Kong, D., Sarkar, F. H. (2010): Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1806 (2), S. 258–267. DOI: 10.1016/j.bbcan.2010.06.001.
- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Azmi, A. S., Ali, S., Abbruzzese, J. L., Gallick, G. E., Sarkar, F. H. (2009): Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. In: *Cancer Res.* 69 (6), S. 2400–2407. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4312.
- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. 4<sup>th</sup>, Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T., Aster, J. C., (2004): Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. In: *Science (New York, N.Y.)* 306 (5694), S. 269–271. DOI: 10.1126/science.1102160.
- Wittekind, C., Meyer, H.-J. (Hg.) (2010): TNM: Klassifikation maligner Tumoren. Union Internationale Contré Cancer (UICC). 7. Aufl.: Wiley-VCH Verlag.
- Wu, S., Cai, J., Wang, H., Zhang, H., Yang, W. (2013): Association between 1p11-rs11249433 Polymorphism and Breast Cancer Susceptibility: evidence from 15 Case-Control Studies. In: *PLoS ONE* 8 (8), S. e72526. DOI: 10.1371/journal.pone.0072526.

- Yamaoka, Y. (2010): Mechanisms of disease: Helicobacter pylori virulence factors. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7 (11), S. 629–641. DOI: 10.1038/nrgastro.2010.154.
- Yeh, T. S., Wu, C. W., Hsu, K. W., Liao, W. J., Yang, M. C., Li, A. F., Wang, A. M., Kuo, M. L., Chi, C. W. (2009b): The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2. In: *Cancer Res.* 69 (12), S. 5039–5048. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4021.
- Yoshikawa, T., Tsuburaya, A., Kobayashi, O., Sairenji, M., Motohashi, H., Yanoma, S., Noguchi, Y. (2000): Plasma concentrations of VEGF and bFGF in patients with gastric carcinoma. In: *Cancer Lett.* 153 (1-2), S. 7–12.
- Zang, Z. J., Cutcutache, I., Poon, S. L., Zhang, S. L., McPherson, J. R., Tao, J., Rajasegaran, V., Heng, H. L., Deng N., Gan, A., Lim, K. H., Ong, C. K., Huang, D., Chin, S. Y., Tan, I. B., Ng, C. C., Yu, W., Wu, Y., Lee, M., Wu, J., Poh, D., Wan, W. K., Rha, S. Y., So, J., Salto-Tellez, M., Yeoh, K. G., Wong, W. K., Zhu, Y. J., Futreal, P. A., Pang, B., Ruan, Y., Hillmer, A. M., Bertrand, D., Nagarajan, N., Rozen, S., The, B. T., Tan, P. (2012): Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes. In: *Nat. Genet.* 44 (5), S. 570–574. DOI: 10.1038/ng.2246.
- Zhang, H., Wang, X., Xu, J., Sun, Y. (2014): Notch1 activation is a poor prognostic factor in patients with gastric cancer. In: *British journal of cancer* 110 (9), S. 2283–2290. DOI: 10.1038/bjc.2014.135.
- Zhang, Z.-P., Sun, Y.-L., Fu, L., Gu, F., Zhang, L., Hao, X.-S. (2009): Correlation of Notch1 expression and activation to cisplatin-sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma. In: *Ai Zheng* 28 (2), S. 100–103.
- Zhou, J., Hayakawa, Y., Wang, T. C., Bass, A. J. (2014): RhoA Mutations Identified in Diffuse Gastric Cancer. In: *Cancer Cell* 26 (1), S. 9–11. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.06.022.

## Anhang

**Tabelle 42: Notch2-Genexpression (Anzahl der gefärbten Kerne und Zytoplasma, Färbeintensität) und Überleben im Gesamtkollektiv**

	n	medianes Überleben in Monaten	p-Wert
<b>Anzahl gefärbten Kerne in %</b>			
keine Färbung	56	15	0,851
Färbung	70	20	
<10%	94	16	0,537
>10%	32	20	
<b>Färbeintensität Kern</b>			
keine	56	15	0,590
schwache	52	19	
mäßige	18	33	
<b>Anzahl gefärbten Zytoplasma in %</b>			
keine Färbung	14	14	0,715
Färbung	112	20	
<10%	35	15	0,944
>10%	91	21	
<50%	78	15	0,088
>50%	48	33	
<80%	113	16	0,543
>80%	13	23	
<b>Färbeintensität Zytoplasma</b>			
keine	14	14	0,659
schwache	72	16	
mäßige	33	19	
starke	7	33	
keine-schwache	32	15	0,963
mäßige-starke	94	22	

**Tabelle 43: Notch2-Genexpression (Anzahl der gefärbten Kerne und Zytoplasma) und Überleben in den intestinalen Karzinomen**

<b>nur intestinale Fälle</b>		medianes Überleben	
<b>Anzahl gefärbten Kerne in %</b>	n	in Monaten	p-Wert
keine Färbung	33	23	0,609
Färbung	37	23	
<10%	59	16	<b>0,014</b>
>10%	11	NR	
<b>Färbeintensität Kern</b>			
keine	33	23	0,142
schwache	30	16	
mäßige	7	NR	
keine bis schwache	63	19	0,052
mäßige	7	NR	
<b>Anzahl gefärbten Zytoplasma in %</b>			
keine Färbung	7	14	0,787
Färbung	63	23	
<10%	17	28	0,638
>10%	53	23	
<50%	39	16	0,118
>50%	31	34	
<80%	59	16	0,248
>80%	11	35	
<b>Färbeintensität Zytoplasma</b>			
keine	7	zensiert	0,167
schwache	35		
mäßige	24		
starke	4		
keine-schwache	42	23	0,977
mäßig-starke	28	23	

**Tabelle 44: Notch2-Genexpression (Anzahl der gefärbten Kerne und Zytoplasma) und Überleben in den R0 resezierten Karzinomen**

<b>R0-Fälle</b>		medianes Überleben		
<b>Anzahl gefärbten Kerne in %</b>	n	in Monaten		p-Wert
keine Färbung	30	34		0,778
Färbung	43	52		
<10%	55	35		<b>0,046</b>
>10%	18	NR		
<b>Färbeintensität Kern</b>				
keine	30	34		0,475
schwache	33	62		
mäßige	10	NR		
keine-schwache	63	35		0,231
mäßige	10	NR		
<b>Färbescore Kern</b>				
FS=0	30	34		0,778
FS>0	43	52		
FS=0,1	53	34		0,104
FS=2-12	20	NR		
<b>Anzahl gefärbten Zytoplasma in %</b>				
keine Färbung	8	28		0,781
Färbung	65	53		
<10%	19	NR		0,628
>10%	54	52		
<50%	43	31		0,061
>50%	30	101		
<80%	62	53		0,852
>80%	11	34		
<b>Färbeintensität Zytoplasma</b>				
keine	8	28		0,272
schwache	37	101		
mäßige	23	34		
starke	5	NR		



keine-schwache	45	101	0,365
mäßig-starke	28	35	
<b>Färbescore Zytoplasma</b>			
FS=0	8	28	0,781
FS>0	65	53	
FS=0,1	16	NR	0,549
FS>1	57	52	
FS=0-2	31	62	0,833
FS>2	42	52	
FS=0-3	41	NR	0,187
FS>3	32	35	
FS=0-4	59	52	0,393
FS=6-12	14	NR	
FS=0-6	66	52	0,177
FS=8-12	7	NR	

Tabelle 45: Genotyp CC vs. TT+CT und Genexpression im Zytoplasma

Genexpression	Genotypen			p-Wert
	CC n(%) n=4	TT+CT n(%) n=36	gesamt n(%) n=40	
<b>Plasmafärbung in %</b>				
keine Färbung	2(50)	3(8)	5(12,5)	$p=0,069$
Färbung	2(50)	33(92)	35(87,5)	
<b>Färbeintensität</b>				
keine	2(50)	3(9)	5(12,5)	$p=0,014$
schwache	1(25)	16(44)	17(42,5)	
mäßige	0(0)	16(44)	16(40)	
starke Färbung	1(25)	1(3)	2(5)	
<b>Färbescore</b>				
0-2	3(75)	9(25)	12(30)	$p=0,073$
3-12	1(25)	27(75)	28(70)	

Tabelle 46: Genotyp CT vs. CC+TT und Genexpression im Zytoplasma

Genexpression	Genotypen		gesamt n(%)	p-Wert
	CT n(%) n=28	TT+CC n(%) n=12		
<b>Plasmafärbung in %</b>				
keine	1(4)	4(33)	5(12,5)	<i>p=0,087</i>
<10%	1(4)	1(8)	2(5)	
10-50%	12(42)	2(17)	14(35)	
50-80%	9(32)	3(25)	12(30)	
>80%	5(18)	2(17)	7(17,5)	
<b>Plasmafärbung in %</b>				
keine Färbung	1(4)	4(33)	5(12,5)	<b>p=0,022</b>
Färbung	27(96)	8(67)	35(87,5)	
<b>Plasmafärbung in %</b>				
0-10%	2(7)	5(42)	7(17,5)	<b>p=0,017</b>
>10%	26(93)	7(58)	33(82,5)	
<b>Färbeintensität</b>				
keine	1(4)	4(33)	5(12,5)	<b>p=0,013</b>
schwache	11(39)	6(50)	17(42,5)	
mäßige	15(53)	1(8)	16(40)	
starke Färbung	1(4)	1(8)	2(5)	
<b>Färbeintensität</b>				
keine bis schwache	12(42)	10(83)	22(55)	<b>p=0,035</b>
mäßige bis starke Färbung	16(58)	2(17)	18(45)	
<b>Färbescore</b>				
0-2	5(18)	7(58)	12(30)	<b>p=0,021</b>
3-12	23(82)	5(42)	28(70)	
<b>Färbescore</b>				
0-3	8(29)	8(67)	16(40)	<b>p=0,037</b>
4-12	20(71)	4(33)	24(60)	

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Gisela Keller für die freundliche Überlassung des Themas, für die kontinuierliche und hervorragende Betreuung, ihr wertvolles und kritisches Feedback und für ihre Geduld.

Ich bedanke mich herzlich bei Dr. rer. nat. Lukas Bauer für seine Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Susanne Plaschke für die Unterstützung bei der praktischen Arbeit im Labor bedanken.

Dank gilt auch meinem Ehemann, Zsolt Pap, der mich in allen Situationen unterstützte und mich stets zu motivieren vermochte.