

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

Untersuchungen zur Expression von PD-L1 und PD-1 in einer
Kohorte neoadjuvant behandelter Magenkarzinome

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

vorgelegt von
Anna Bregenzer
aus Sigmaringen

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Becker, Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 12.10.2021

Gez.: Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

I.	Inhaltsverzeichnis	
I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	VI
III.	Abbildungsverzeichnis	VIII
IV.	Tabellenverzeichnis	IX
1	Einleitung	1
1.1	Das Magenkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie des Magenkarzinoms	1
1.1.2	Ätiologie des Magenkarzinoms	1
1.1.3	Klassifikation des Magenkarzinoms	2
1.1.3.1	Genomische Subtypen des Magenkarzinoms	4
1.1.4	Therapie des Magenkarzinoms	5
1.1.4.1	Regressionsgrading des Magenkarzinoms	6
1.2	PD-1, PD-L1 und ihre Interaktion	7
1.2.1	PD-1	7
1.2.2	PD-L1	7
1.2.3	Physiologische Wechselwirkung	7
1.2.4	Tumorwirkung	8
1.2.5	Therapieoptionen	8
1.3	Mikrosatelliteninstabile Magenkarzinome	9
1.4	Epstein-Barr Virus-assoziierte Magenkarzinome	10
1.5	Chromosomal instabile und genomisch stabile Magenkarzinome	10
1.6	Her2/neu im Magenkarzinom	11
1.7	MET im Magenkarzinom	12
2	Fragestellung der Arbeit und Hypothesen	13
3	Material	15
3.1	Patientenkollektiv	15
3.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
3.3	Chemikalien, Reagenzien und Kitsysteme	16
3.4	Antikörper	17
3.5	Software	17
4	Methoden	18
4.1	Herstellen der Blöcke und Tissue Microarrays (TMAs)	18
4.2	Herstellung der Schnitte	18

4.3	Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE)	19
4.4	PD-L1 und PD-1	19
4.4.1	Immunhistochemische Färbemethoden von Antikörper gegen PD-L1 und PD-1	19
4.4.2	Histologische Auswertung der PD-L1-Expression in Tumorzellen	19
4.4.3	Histologische Auswertung der PD-L1-Expression in Immunzellen	20
4.4.4	Histologische Auswertung der PD-1-Expression	21
4.5	Epstein-Barr-Virus	21
4.5.1	Nachweis des Epstein-Barr-Virus	21
4.5.2	Histologische Auswertung EBV	21
4.6	Mikrosatelliteninstabilität	21
4.6.1	Immunhistochemischer Nachweis der Expression der DNA-Reparaturproteine	21
4.6.2	Molekularpathologische Untersuchung des Mikrosatellitenstatus	22
4.7	HER2- und MET-Status	23
4.7.1	Immunhistochemischer Nachweis der Expression von Her2/neu und MET	23
4.7.2	Chromogene in situ-Hybridisierung zum Nachweis der <i>HER2</i> - und <i>MET</i> -Genamplifikation	23
4.7.3	Auswertung der Chromogenen in situ-Hybridisierung von <i>HER2</i> und <i>MET</i>	25
4.8	Statistische Auswertung	26
5	Ergebnisse	27
5.1	Klinisch-pathologische Charakteristika	27
5.2	PD-L1-Expression Bewertung der Rohwerte	30
5.2.1	PD-L1-Expression in Tumorzellen des Primärtumors	30
5.2.2	PD-L1-Expression in Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen	33
5.2.3	PD-L1-Expression in Immunzellen des Primärtumors	34
5.2.4	PD-L1-Expression in Tumor- und Immunzellen der Fernmetastasen	35
5.2.5	Verteilungsmuster der PD-L1-Expression	36
5.3	PD-1-Expression Bewertung der Rohwerte	38
5.3.1	PD-1-Expression in den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten	38
5.3.2	PD-1 in Lymphozytenaggregaten	38
5.3.3	PD-1-Expression in Immunzellen der korrespondierenden Fernmetastasen	39
5.4	Epstein-Barr-Virus-Bewertung der Rohwerte	39
5.5	Mikrosatellitenstatus Bewertung der Rohwerte	40
5.6	HER2 Bewertung der Rohwerte	41
5.7	MET Bewertung der Rohwerte	44
5.8	Korrelation mit den klinisch-pathologischen Patientencharakteristika	46

5.8.1	Korrelation der PD-L1-Expression mit den klinisch-pathologischen Patientencharakteristika	46
5.8.1.1	Korrelationen der PD-L1-Expression in Tumorzellen des Primärtumors mit den klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen	47
5.8.1.2	Korrelationen der PD-L1-Expression in Tumorzellen mit der Expression in den Lymphknotenmetastasen	48
5.8.1.3	Korrelationen der PD-L1-Expression in Immunzellen des Primärtumors mit den klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen	49
5.8.2	Korrelation der PD-1-Expression mit den klinisch-pathologischen Charakteristika	51
5.8.2.1	Korrelationen der PD-1-Expression in Immunzellen des Primärtumors mit den klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen	52
5.8.2.2	Korrelationen der PD-1-Expression in Lymphozytenaggregaten mit den klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen	52
5.8.3	Korrelationen der Expressionen von PD-L1 miteinander und mit der Expression von PD-1	52
5.8.3.1	Korrelation der PD-L1-Expression in Tumorzellen und Immunzellen	52
5.8.3.2	Korrelationen der Expression von PD-L1 mit der Expression von PD-1	53
5.8.4	Korrelation des Epstein-Barr-Virus mit den klinisch-pathologischen Charakteristika	54
5.8.5	Korrelation des Mikrosatellitenstatus mit den klinisch-pathologischen Charakteristika	55
5.8.6	Korrelation des HER2- und MET-Status mit den klinisch-pathologischen Charakteristika	58
5.8.6.1	Korrelation des HER2-Status mit den klinisch-pathologischen Charakteristika	60
5.8.6.2	Korrelation des MET-Status mit den klinisch-pathologischen Charakteristika	60
5.9	Korrelation mit dem Patientenüberleben	61
5.9.1	Korrelation der PD-L1-Expression mit dem Patientenüberleben	61
5.9.2	Korrelation der PD-1-Expression mit dem Patientenüberleben	63
5.9.3	Korrelation des Mikrosatellitenstatus mit dem Patientenüberleben	65
5.9.4	Korrelation des HER2-Status mit dem Patientenüberleben	66
5.9.5	Korrelation des MET-Status mit dem Patientenüberleben	67
5.10	Korrelation der Expression von PD-L1 und PD-1 der neoadjuvanten gegenüber der therapienaiven Kohorte von Magenkarzinompatienten	68
5.10.1	Korrelation der PD-L1-Expression der neoadjuvanten gegenüber der therapienaiven Kohorte	68
5.10.2	Korrelation der PD-L1-Expression mit den klinisch-pathologischen Charakteristika der neoadjuvanten gegenüber der therapienaiven Kohorte	70
5.10.3	Korrelation der PD-1-Expression in der neoadjuvanten gegenüber der therapienaiven Kohorte	71

5.10.4	Korrelation der PD-1-Expression mit den klinisch-pathologischen Charakteristika der neoadjuvanten gegenüber der therapienaiven Kohorte	72
6	Diskussion	73
6.1	Methodik	75
6.1.1	Das Patientenkollektiv	75
6.1.2	Die Schnitte	76
6.1.3	Die Färbemethoden	77
6.1.4	Die histologische Auswertung	77
6.1.5	Die statistische Auswertung	78
6.1.6	Der Vergleich mit der therapienaiven Kohorte	78
6.1.6.1	Unterschiedliche Cut-off-Werte	79
6.2	Inhaltliche Diskussion	81
6.2.1	PD-L1 und PD-1	81
6.2.1.1	Verminderte PD-L1-Expression	81
6.2.1.2	Die Korrelation der PD-L1 mit den klinisch-pathologischen Charakteristika weist Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede bei der neoadjuvanten gegenüber der therapienaiven Kohorte auf	82
6.2.1.3	Vermehrte PD-L1-Expression bei schlechtem Therapieansprechen	84
6.2.1.4	Vermehrte PD-1-Expression	85
6.2.1.5	Veränderte PD-1-Korrelationen mit den klinisch-pathologischen Charakteristika	86
6.2.2	Gegen PDL1/PD-1 gerichtete Immuncheckpointinhibitoren	87
6.2.3	PD-L1-Expression der Lymphknotenmetastasen und des Primärtumors waren konkordant	88
6.2.4	Veränderungen von PD-L1- und PD-1-Expression in den Fernmetastasen	90
6.2.5	Korrelation der Expression von PD-L1/PD-1 mit dem Überleben	91
6.2.5.1	Verlust des Überlebensvorteils PD-L1-positiver Tumoren	91
6.2.5.2	Korrelation der Expression von PD-1 mit dem Überleben	92
6.2.6	Epstein-Barr-Virus und Mikrosatelliteninstabilität	93
6.2.6.1	Die Eigenschaften MSI- und EBV-positiver Tumoren blieben nach neoadjuvanter Therapie erhalten	93
6.2.6.2	Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie	94
6.2.6.3	Erhöhte PD-L1- und PD-1-Expression in MSI- und EBV-positiven Tumoren	94
6.2.6.4	Korrelation des Mikrosatelliten- und Epstein-Barr-Virus-Status mit dem Überleben	95
6.2.7	HER2- und MET-Status	96
6.2.7.1	Die Eigenschaften <i>HER2</i> -amplifizierter Tumoren blieben erhalten	96
6.2.7.2	Die Eigenschaften der <i>MET</i> -amplifizierten Tumoren blieben erhalten	97

6.2.7.3	Koexpression HER2- und MET-positiver Tumoren mit PD-L1/PD-1	99
7	Zusammenfassung	100
8	Literaturverzeichnis	102
9	Anhang	108
9.1	Ethikvotum	108
9.2	Publikationen	109
9.3	Eidesstattliche Versicherung	111
9.4	Danksagung	112

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
ca.	Circa
CISH	Chromogene in situ- Hybridisierung
CTLA4	Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr Virus
et al.	<i>et aliae/et alii</i>
H. pylori	Helicobacter pylori
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin und Eosin
Her2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-2
HGF / SF	Ligand Hepatozyten-Wachstumsfaktor / Streufaktor
IFN-γ	Interferon-γ
IgG4	Immunglobulin G4
IRS	Immunreaktivitäts-Score
JAK2	Janus-Kinase-2
L	Lymphgefäßinvasion
M	Metastase
MET	Tyrosinkinase-Rezeptor-Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
MMR	Mismatch-Reparatur Proteine
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
n	Anzahl
N	Nodus lymphoideus, Lymphknoten
p	Pathologisches Stadium
PCR-Assay	Polymerase-Kettenreaktions-Assay
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>

Pn	Perineuralscheideninfiltration
PIK3CA	Phosphatidylinositol-3-Kinase-Untereinheit
R	Resttumor
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RHOA	<i>Ras homolog family member A</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
T	Tumor
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
u.a.	Unter anderem
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
V	Veneninvasion
vs.	Versus
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
y	Zustand nach Therapie
z.B.	Zum Beispiel

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung des Alters bei Diagnosestellung.	29
Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung vitaler Tumorresiduen.	29
Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung der Prozentwerte PD-L1-positiver Tumorzellen im Primärtumor.	30
Abbildung 4: Darstellung von Referenzschnitten der PD-L1-Immunfärbung in Tumorzellen.	31
Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung des Prozentwerte- und Intensitäts- Scores PD-L1-positiver Tumorzellen im Primärtumor.	31
Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung des Immunreaktivitätsscore innerhalb der PD-L1-Färbung bei positiven Tumorzellen im Primärtumor.	32
Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der Prozentwerte PD-L1-positiver Tumorzellen in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen.	33
Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung des Immunreaktivitätsscores innerhalb der PD-L1-Färbung bei positiven Tumorzellen in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen.	33
Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der Prozentwerte PD-L1-positiver Immunzellen im Primärtumor.	34
Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung des Prozentwerte Scores PD-L1-positiver Immunzellen im Primärtumor.	35
Abbildung 11: Exemplarische Darstellung Verteilungsmuster PD-L1-positiver Tumorzellen.	37
Abbildung 12: Exemplarische Darstellung Verteilungsmuster PD-1-positiver Immunzellen.	38
Abbildung 13: Darstellung von Referenzschnitten der EBER in situ-Hybridisierung in Tumorzellen.	39
Abbildung 14: Darstellung von Referenzschnitten der DNA-Reparaturproteine.	40
Abbildung 15: Darstellung von Referenzschnitten der Her2/neu-Immunfärbung in Tumorzellen.	41
Abbildung 16: Exemplarische Darstellung der chromogenen in situ-Hybridisierung für <i>HER2</i> .	42
Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der Heterogenität von <i>HER2</i> .	43
Abbildung 18: Darstellung von Referenzschnitten der MET-Immunfärbung in Tumorzellen.	44
Abbildung 19: Exemplarische Darstellung der chromogenen in situ-Hybridisierung für MET.	45
Abbildung 20: Grafische Darstellung des PD-L1-Verteilungsmusters in Abhängigkeit vom Becker-Regressionsgrad und dem Anteil an vitalen Tumorzellen.	47

Abbildung 21: Grafische Darstellung des PD-L1-Verteilungsmusters in Abhängigkeit vom Becker-Regressionsgrad und dem Anteil an vitalen Immunzellen.	49
Abbildung 22: Graphische Darstellung der PD-L1-Expression MSI- und MSS- Tumoren im Vergleich.	57
Abbildung 23: Überlebenskurven PD-L1-positiver und PD-L1-negativer, neoadjuvant behandelter Magenkarzinomen.	62
Abbildung 24: Überlebenskurven der neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen mit und ohne PD-1-positiven tumorinfiltrierenden Lymphozyten.	63
Abbildung 25: Überlebenskurven der neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen mit und ohne Lymphozytenaggregate bzw. mit und ohne PD-1-positiven Lymphozytenaggregaten.	64
Abbildung 26: Überlebenskurven der mikrosatellitenstabilen (MSS) und mikrosatelliteninstabilen (MSI), neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen.	65
Abbildung 27: Überlebenskurven HER2-positiven und HER2-negativer, neoadjuvant behandelter Magenkarzinomen.	66
Abbildung 28: Überlebenskurven MET-Status.	67
Abbildung 29: Vergleich des Verteilungsmusters PD-1-positiver TIL neoadjuvant vs. therapienaiv.	72

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms	3
Tabelle 2: Klassifikation der Tumorstadien	3
Tabelle 3: Klinisch-pathologische Merkmale der Patientenkohorte	27
Tabelle 4: Korrelation der PD-L1-Expression	46
Tabelle 5: Korrelation der PD-1-Expression	51
Tabelle 6: Korrelation der Expression von PD-L1 mit der Expression von PD-1	53
Tabelle 7: Korrelation des Mikrosatellitenstatus	55
Tabelle 8: Korrelation des HER2- und MET- Status	58
Tabelle 9: Vergleich der Cut-off Werte zwischen der therapienaiven und der neoadjuvanten Kohorte	69

1 Einleitung

1.1 Das Magenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie des Magenkarzinoms

Karzinome des Magens und des gastroösophagealen Überganges sind sehr häufig und stehen bei der Inzidenz an 5. bzw. 8. Stelle der weltweit auftretenden Krebsarten [1]. Obwohl die Inzidenz seit Jahren rückläufig ist, erkranken jedes Jahr ca. 16.000 Menschen in Deutschland neu an einem Magenkarzinom [2, 3]. Im Jahr 2014 waren 9340 davon Männer [3, 4]. Die Inzidenz des Magenkarzinoms nimmt kontinuierlich mit dem Alter zu [3]. Der Gipfel der Neuerkrankungsrate liegt zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr [5]. 2014 betrug das mittlere Erkrankungsalter bei Männern 72 und bei Frauen 75 Jahre [3, 4].

Trotz intensiver Forschung mit Weiterentwicklung von Diagnostik und Therapie ist die Prognose der Erkrankung weiterhin schlecht [3, 4, 6]. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit hat sich zwar in den letzten Jahren stetig verbessert, beträgt aber immer noch 45% beim Magenkarzinom und 68% beim Karzinom des gastroösophagealen Übergangs. Im fortgeschrittenen Stadium liegt sie nur bei 5% [3, 4, 6]. Ein Grund hierfür kann zum Beispiel ein langer asymptomatischer Krankheitsverlauf sein. Zwei Drittel der Patienten in der westlichen Welt werden mit einem bereits lokal fortgeschrittenen Tumor und im meist inoperablen Stadium diagnostiziert [3, 4, 7, 8].

Auch die Mortalitätsrate dieser Tumoren ist mit über 1,1 Millionen Todesfälle weltweit im Jahr 2012 sehr hoch und zählt somit zu den häufigsten tumorbedingten Todesursachen [1, 4, 6].

1.1.2 Ätiologie des Magenkarzinoms

Das Magenkarzinom ist eine multifaktorielle Erkrankung und kann sporadisch oder hereditär auftreten [9]. Das Correa Modell beschreibt eine chronische Gastritis, welche zu intestinalen Metaplasien und Epitheldysplasien führen kann, als eine Ursache und ein Risikofaktor für die Entstehung eines Magenkarzinoms [10]. Hauptauslöser ist nach heutigem Stand eine chronische *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)-assoziierte Gastritis und

nicht mehr nur salzhaltige Kost und Medikamente wie von Correa ursprünglich vermutet [4, 11]. Neben der chronischen H. pylori-Infektion zählen hohes Alter, niedriger sozioökonomischer Status, Tabakrauchen, Alkoholkonsum, familiäre Belastung, vorangegangene Magenoperationen, perniziöse Anämie, Leben in einer Hochrisikopopulation sowie Ernährungs- und Umweltfaktoren zu den weiteren Risikofaktoren [4, 9].

Zu den wichtigsten Risikofaktoren bei der Entstehung von Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs zählen Adipositas und Reflux. Die durch chronischen Reflux bedingte Reizung und Entzündung im Ösophagus stellt die Grundvoraussetzung für die Entstehung einer Barrett-Metaplasie dar, aus welcher sich die Neoplasie entwickeln kann [4, 9].

Aufgrund der regional verschiedenen Lebens- und Ernährungsbedingungen gibt es teils große geographische Unterschiede in der Inzidenz des Magenkarzinoms [5]. So erkranken in Asien deutlich mehr Menschen als in Europa [12].

1.1.3 Klassifikation des Magenkarzinoms

Adenokarzinome stellen mit 90-95% die Mehrheit der Magentumoren dar und werden gemäß einer der verbreitetsten histologischen Einteilung nach Lauren in den intestinalen, den diffusen, den Mischtyp und den nichtklassifizierbaren Typ eingeteilt [13]. Der intestinale Typ mit seinem tubulären, drüsenartigen Wachstum hat eine bessere Prognose als der diffuse Typ und kommt häufiger bei Männern und älteren Patienten vor [5, 13]. Der diffuse Typ fällt durch verstreutes, infiltratives Wachstum auf und tritt häufiger bei Frauen und jüngeren Patienten auf [5, 13].

Alternativ werden die Magenkarzinome auch, wie 2010 von der Weltgesundheitsorganisation vorgeschlagen, in papilläre, tubuläre, muzinöse, gering kohäsive und gemischte Adenokarzinome eingeteilt [14].

Die Stadieneinteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation gemäß der 8. Auflage der UICC-Richtlinien [15].

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms

7. und 8. Auflage [15][16]*	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1a	Tumor infiltriert Lamina propria
T1b	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Subserosa
T4a	Tumor perforiert Serosa
T4b	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	1-2 Lymphknoten
N2	3-6 Lymphknoten
N3a	7-15 Lymphknoten
N3b	≥ 16 Lymphknoten
M0	Keine Metastasen
M1	Fernmetastasen

*Die 7. und 8. Auflage sind identisch bei den Unterteilungen der TNM-Kategorien

Tabelle 2: Klassifikation der Tumorstadien

UICC-Stadium	TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms [15]
Stadium 0	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
Stadium IA	T1a N0 M0, T1b 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 N1 M0, T4a N0 M0, T4a N2 M0
Stadium IIIC	T4b N3 M0, T4b N2 M0, T4a N3 M0
Stadium IV	M1

Um eine spezifische Patientengruppe für die jeweils beste Therapieoption zu ermitteln und zu identifizieren, reichen diese Klassifikationen nicht aus. Grund hierfür ist die große intra- und intertumorale Heterogenität mit verschiedenen molekularen und histologischen Subtypen [17, 18].

1.1.3.1 Genomische Subtypen des Magenkarzinoms

Im Rahmen des „*The Cancer Genome Atlas Programs*“ (TCGA) wurde im Jahr 2014 eine neue, molekulare Einteilung vorgenommen [19]. Sie basierte auf der Untersuchung von 295 unbehandelten, primären Magenkarzinomen mittels Sequenzierung des gesamten Exoms, Analyse der somatischen Kopien, DNA-Methylierungsprofilierung, mRNA-Sequenzierung, microRNA-Sequenzierung und Reverse-Phase-Proteinarray. Anhand eines Entscheidungsbaumes wurden Magenkarzinome in vier Subtypen eingeteilt:

- Epstein-Barr Virus assoziierte Karzinome (9%)
- Mikrosatelliteninstabile Karzinome (22%)
- Genomisch stabile Karzinome (20%)
- Chromosomal instabile Karzinome (50%)

Diese molekulare Klassifizierung schlagen Bass et al. als Ergänzung zu etablierten histologischen Klassifizierungen vor [19]. Sie soll die Entwicklung klinischer Studien und die Erforschung von Therapien für bestimmte Patientengruppen erleichtern und dadurch das Überleben verbessern. In den einzelnen Subgruppen treten bestimmte Mutationen gehäuft auf. Die Signalwege der Mutationen können als Angriffspunkte für eine Antikörpertherapie mit Immuncheckpointinhibitoren genutzt werden. Die Hoffnung ist, dass in Zukunft Patienten aufgrund ihrer Subgruppe für die richtige Therapieoption ausgewählt werden können und neue prädiktive Marker entwickelt werden [19, 20].

1.1.4 Therapie des Magenkarzinoms

Die aktuellen Behandlungsstrategien in Deutschland sind stadienabhängig und können der gültigen S3 Leitlinie aus 2019 entnommen werden [9]. Die komplette chirurgische Tumorresektion stellt den einzig kurativen Ansatz dar [9]. Im fortgeschrittenen Tumorstadium beträgt die Chance einer vollständigen Resektion des Tumors allein durch chirurgische Maßnahmen weniger als 50% [7, 21]. Cunningham et al. konnten zeigen, dass eine perioperative Chemotherapie (neoadjuvant und adjuvant) zur Verkleinerung des Primärtumors führen kann und somit eine vollständige Resektion ermöglicht werden kann. Ein weiterer Vorteil der perioperativen Chemotherapie ist die Zerstörung okkulten Tumorzellen in Lymphknoten und/oder Organen, hierdurch kann die Rezidivwahrscheinlichkeit gesenkt werden [7, 22]. Es wurde ein klarer Überlebensvorteil für Patienten mit multimodaler Therapie gezeigt [22]. So bildet in Europa die perioperative (Radio-) Chemotherapie den Standard für die Behandlung von Magenkarzinomen im lokal fortgeschrittenen Stadium [23]. In der palliativen Erkrankungssituation kommen primär medikamentöse Behandlungen zum Einsatz, chirurgische Maßnahmen bleiben ausgewählten symptomatischen Tumormanifestationen vorbehalten [9].

Die Chemotherapie setzt sich aus einer Kombination aus Platinverbindungen (z.B. Cisplatin oder Oxaliplatin), Taxanen (Docetaxel) und Fluoropyridinen (z.B. 5-Fluoruracil oder Capecitabin) zusammen und bildet den Standard für die Erstlinientherapie [24–26]. Das Gesamtüberleben kann hierdurch um 9-11 Monate verbessert werden [24–26]. Die Meta-Analyse von Ronellenfitsch et al. zeigte eine Verbesserung des 5-Jahres-Gesamtüberlebens nach neoadjuvanter Chemotherapie von 19% relativ und 9% absolut [27].

Bei weiterhin schlechter Prognose der Erkrankung ist die Etablierung von neuen Therapieansätzen wichtig [20]. Mittlerweile kommen zielgerichtete Therapien in der Behandlung des Magenkarzinoms zum Einsatz [6]. Trastuzumab, ein gegen Her2/neu (ERBB2) gerichteter monoklonaler Antikörper, ist das erste zugelassene Medikament zur Behandlung des fortgeschrittenen Magenkarzinoms bei gesichertem Nachweis einer *HER2*-Überexpression [28]. Das Überleben von Patienten, die eine Kombinationstherapie aus Trastuzumab und Chemotherapie erhielten, konnte signifikant ($p=0,046$) von 11 auf 13,8 Monate verlängert werden [28].

Ramucirumab, ein weiteres Medikament aus der Klasse der zielgerichteten Therapien, ist ein VEGFR-Antikörper-Antagonist. Durch Einsatz von Ramucirumab lässt sich ein Überlebensvorteil im Vergleich zu Placebo erzielen [31, 32].

Auch für PD-L1/PD1 sind zielgerichtete Therapien im Einsatz. Pembrolizumab und Nivolumab sind IgG4 Antikörper die an PD-1 binden. Durch die Bindung an PD-1 wird die Wechselwirkung zwischen PD-1 und PD-L1 unterbrochen und die Hemmung des Immunsystems entfällt [6, 29, 30]. Seit 2017 gibt es eine US-amerikanische Zulassung für Pembrolizumab (Merck & Co., Kenilworth, New Jersey, US) als Drittlinienmedikament, zur Behandlung eines vorgeschrittenen, gastroösophagealen Tumors mit gleichzeitiger PD-L1-Überexpression. Des Weiteren hat Nivolumab in Asien aufgrund des Überlebensvorteils (Median 5,3 Monate vs. 4,1 Monate, $p < 0,001$) in der Phase 3 ATTRACTION-2 Studie eine Zulassung, unabhängig von der PD-L1-Expression [33]. Auch für PD-L1 befinden sich die Antikörper Atezolizumab (NCT01375842), Durvalumab (NCT02340975) und Avelumab (NCT01772004) in der klinischen Testung.

1.1.4.1 Regressionsgrading des Magenkarzinoms

Um ein Therapieansprechen der perioperativen Chemotherapie zu beurteilen, haben Becker et al. 2003 eine Klassifizierung vorgeschlagen, welche vier Tumorregressionsgrade unterscheidet: 1a vollständiges Ansprechen ohne Nachweis von vitalen Tumorresiduen, 1b Tumorresiduen $< 10\%$ des originalen Tumors, 2 Tumorresiduen $10\%-50\%$ und 3 Tumorresiduen $> 50\%$ [34]. Der zunächst klare prognostische Wert des Becker-Regressionsgrades konnte in einer anderen Studie nicht als unabhängiger Prognosefaktor für das Patientenüberleben bestätigt werden [35, 36].

1.2 PD-1, PD-L1 und ihre Interaktion

1.2.1 PD-1

PD1 (Programmed cell death protein) ist ein Rezeptor des programmierten Zelltods. Es ist ein Typ 1 Transmembranprotein. Exprimiert wird PD-1 durch aktivierte T-Zellen im Keimzentrum von Lymphfollikeln, tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL), B-Zellen, Monozyten, Natürlichen Killerzellen, myeloischen Zellen und anderen Immunzellen [6, 17, 20, 37]. PD-1 ist der wichtigste Hemmmechanismus für T-Zellen und regelt die Immunreaktion herab [6, 20]. In PD1-defizienten Mäusen konnte ein Verlust der peripheren Toleranz des Immunsystems und das Auftreten multipler autoimmuner Phänomene nachgewiesen werden [37]. PD-1 ist strukturell CTLA4 ähnlich, so wurde ein Ligand aus der B7 Familie vermutet und die zwei Hauptliganden PD-L1 und PD-L2 wurden entdeckt [37].

1.2.2 PD-L1

PD-L1 (Programmed cell death 1 ligant) oder B7-H1 ist ein Ligand des programmierten Zelltods. Kodiert wird PD-L1 durch das CD274-Gen, welches sich auf Chromosom 9 befindet. Zellen des Immunsystems wie Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, aber auch mesenchymale Stammzellen, nichtlymphoide, parenchymale Organe wie Herz, Plazenta, Lunge und Skelettmuskulatur sowie solide Tumoren exprimieren PD-L1 [6, 17, 20, 37].

Die PD-L1-Expression wird unter anderem durch Lipopolysaccharide, IFN- γ , T-Helfer-Zellen (Th1-Zellen), Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor und IL-4 an Makrophagen gesteuert [38, 39]. Die Signalgebung von PD-L1 hat eine inhibitorische Wirkung, es kommt zur Hemmung der T-Zell-Proliferation und zur reduzierten Expression von CD3/CD28 [37].

1.2.3 Physiologische Wechselwirkung

Die physiologische Wechselwirkung zwischen PD-L1 und PD1 soll die Aktivität von T-Zellen in der Peripherie auf Infektionen begrenzen, Autoimmunität vermeiden und Kollateralgewebeschädigung verhindern [17, 40].

Das Immunsystem besitzt im Allgemeinen die Fähigkeit, Tumorzellen zu identifizieren und zu vernichten [6, 20, 41, 42]. Dies gelingt unter anderem durch die Infiltration von zytotoxischen T-Zellen in den Tumor [20]. Im Verlauf der Tumorprogression muss ein Tumor Strategien der Immunevasion entwickeln, um der Immunantwort zu entgehen, in dem sie unterdrückt oder umgangen wird [20]. Entscheidend für die Regulation der Funktion der zytotoxischen T-Zellen ist die Tumorumgebung, welche sich aus Krebszellen, Entzündungszellen, Stromazellen und Zytokinen zusammensetzt [43]. So haben Magenkarzinome mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) eine bessere Prognose [44, 45].

1.2.4 Tumorwirkung

Die tumorspezifische Wechselwirkung zwischen PD-L1 und PD-1 ist eine solche Umgehungsstrategie der Antitumor-Immunreaktion. Das PD-L1 der Tumorzelle nutzt die physiologische Wechselwirkung und interagiert mit dem PD-1 der T-Zelle. So kommt es zur Herunterregulation der Immunantwort und die Krebszelle kann der Zerstörung durch Immunzellen entkommen [17, 46]. Die Immunüberwachung wird gestört und das Tumorwachstum gefördert [6, 40].

1.2.5 Therapieoptionen

Die moderne Medizin möchte diese tumorspezifische Wechselwirkung unterbrechen und so die krebszellgerichtete Immunantwort wiederherstellen. Dies gelingt durch Immuncheckpointinhibitoren [6, 17, 47].

Wie im Abschnitt Therapie des Magenkarzinoms beschrieben, sind mit Pembrolizumab und Nivolumab für PD-L1/PD1 zielgerichtete Therapien im Einsatz [29, 30, 33]. Durch die Bindung an PD-1 wird die Wechselwirkung zwischen PD-1 und PD-L1 unterbrochen und die Hemmung des Immunsystems entfällt [6, 29, 30]. Auch für PD-L1 befinden sich die Antikörper Atezolizumab (NCT01375842), Durvalumab (NCT02340975) und Avelumab (NCT01772004) in der klinischen Testung.

1.3 Mikrosatelliteninstabile Magenkarzinome

Mikrosatelliteninstabile (MSI) Tumoren sind durch Erhöhung oder Abnahme der Anzahl der Wiederholungen von Mikrosatelliten, kurzen nicht kodierenden DNA-Abschnitten, im gesamten Genom gekennzeichnet [48, 49]. Tandemwiederholungen, einfache Wiederholungsabschnitte von 1-6 Basen sind besonders anfällig für eine Mikrosatelliteninstabilität. MLH1, PMS2, MSH2 und MSH6 sind Mismatch-Reparaturproteine und korrigieren Fehlpaarungen durch Heterodimerbildung [48, 49]. Mängel oder Mutationen im DNA-Mismatch-Reparatursystem und die daraus resultierenden DNA-Replikationsfehler können zu MSI führen und so zur Entstehung von Krebs beitragen [48, 49].

Die Anzahl der MSI-Magenkarzinome variiert zwischen den einzelnen Studien. Die TCGA-Studie enthielt 22% MSI-Magenkarzinome [19]. Die Studie von Mathiak et al. fand nur 7,5% MSI-Fälle [50]. Mathiak et al. führen unterschiedliche Auswertungsmethoden und das Fehlen von Standards als Gründe hierfür an [50].

MSI-Tumoren sind in mehreren Studien mit einem längeren Überleben assoziiert [50–52]. Ein Grund hierfür könnte das reiche Infiltrat an Immunzellen sein, was typisch für MSI-Tumoren und die tumorsuppressive Immunreaktion von TIL ist [6, 50, 53]. Smyth et al. zeigten, dass dieser Überlebensvorteil von MSI-Tumoren durch perioperative Chemotherapie verloren ging. Patienten mit mikrosatellitenstabilen (MSS) Tumoren zeigten nach perioperativer Chemotherapie ein besseres Überleben. Sie stellten fest, dass Patienten mit MSI-Tumoren nicht von einer perioperativen Chemotherapie profitieren [54].

MSI-Tumoren sind häufig hypermutiert und haben eine höhere somatische Mutationslast [20]. Studien haben gezeigt, dass erhöhte somatische Mutationen mit einer erhöhten Immunsignatur einhergehen, was wiederum auf ein besseres Ansprechen von Immuncheckpointtherapien hindeutet [6, 55]. Weitere Gründe, die auf ein besonders gutes Ansprechen dieser Subgruppe auf Immuncheckpointinhibitoren deuten könnten, sind die erhöhte PD-L1-Expression von MSI-Tumoren und das, oben beschriebene, reiche Infiltrat an Immunzellen [6].

Keiner der von Mathiak et al. untersuchten MSI-Tumoren weist eine Epstein-Barr Virus (EBV) Positivität auf, dies deckt sich mit der Subgruppeneinteilung der TCGA-Studie [19, 50].

1.4 Epstein-Barr Virus-assoziierte Magenkarzinome

Ein kleiner Teil der Magenkarzinome weist eine Infektion mit dem EBV auf [56]. Durch die EBV-Infektion kann es zur Zerstörung verschiedener zellulärer Prozesse und Signalwege kommen. Dies kann zur Entstehung von Magenkarzinomen beitragen [57, 58].

Die Anzahl der EBV-positiven Magenkarzinome variiert je nach Studie und Herkunft der Patienten. In der TCGA-Studie lag der Anteil bei 9%, in einer Studie von Böger et al. mit kaukasischen Patienten betrug der Anteil 5% [59]. Dies ist deutlich geringer als bei asiatischen Patienten, dennoch weisen die Studien die gleichen klinisch-pathologischen Eigenschaften nach [56, 59]. EBV-positive Tumoren zeigen gehäuft eine DNA-Hypermethylierung, eine vermehrte Phosphatidylinositol-3-Kinase-Untereinheit (PIK3CA) Mutation und eine erhöhte Expression von Janus-Kinase-2- (JAK2), PD-L1 und PD-L2 [19, 59, 60]. Diese unterschiedlichen, bei EBV-positiven Magenkarzinomen gehäuft auftretenden Mutationen und die Tatsache, dass EBV-positive Tumoren ein reiches Infiltrat an Immunzellen aufweisen, ist ein Grund, warum vermutet wird, dass auch diese Subgruppe besonders gut auf Immuncheckpointinhibitoren anspricht [6].

Ob eine EBV-Infektion eine prognostische Bedeutung für das Magenkarzinom hat oder, wie in aktuellen Studien belegt, keine Auswirkungen auf das Überleben zeigt, ist nicht eindeutig geklärt [59, 61]. Die unterschiedlichen Ergebnisse werden auf unterschiedliche Entzündungsreaktionen der Patienten zurückgeführt [60]. Auch eine standardmäßige adjuvante Chemotherapie bringt keinen Zusammenhang zwischen EBV-Positivität und dem Überleben [60].

1.5 Chromosomal instabile und genomisch stabile Magenkarzinome

Chromosomal instabile Tumoren bilden mit 50% in der TCGA-Studie die größte Subgruppe der Magenkarzinome [19]. Ihre Prognose ist schlechter als bei EBV-positiven Tumoren, aber besser als die von genomisch stabilen Tumoren [62]. Eine *TP53* Mutation, Receptor Tyrosine Kinases (RTK) - Rat sarcoma (RAS) Aktivierung und der intestinale Typ nach Lauren treten bei dieser Subgruppe gehäuft auf [19]. Außerdem wurde herausgefunden, dass die Untergruppe der chromosomal instabilen

Tumoren am meisten von einer adjuvanten Chemotherapie profitiert [62]. Aufgrund der niedrigen Immunsignatur kommt es aber möglicherweise bei chromosomal instabilen Tumoren zu einem schlechten Ansprechen auf eine Immuncheckpointtherapie [6, 63].

Genomisch stabile Tumore bilden ca. 20% der Magenkarzinome. Sie weisen gehäuft eine *CDH1* und *RHOA* Mutation sowie eine *CLDN18-ARHGAP* Fusion auf. Der diffuse Typ überwiegt bei dieser Subgruppe [19]. Die genomisch stabile Subgruppe hat die schlechteste Prognose und den geringsten Nutzen von einer adjuvanten Chemotherapie [62].

1.6 Her2/neu im Magenkarzinom

Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (Her2/neu; *ERBB2*) ist an der Entwicklung mancher solider Tumoren beteiligt [64]. Besonders bei Brustkrebs ist eine Her2/neu-Überexpression bekannt, aber auch bei 7-43% der Magenkarzinome liegt eine Überexpression vor [64–67]. Wang et al. erkannten in ihrer Metaanalyse eine Assoziation der *HER2*-Amplifikation mit dem männlichen Geschlecht, dem intestinalen Phänotyp nach Lauren sowie einen Zusammenhang mit gut bis mäßig differenzierten Magentumoren. Sie empfehlen daher Magenkarzinompatienten zu identifizieren, die potenziell von einer Trastuzumab-Therapie, Her2/neu-Antikörper, profitieren könnten, um so eine maßgeschneiderte Behandlungsstrategie auszuwählen [64, 68]. Trastuzumab wird als erstes zugelassenes First-Line-Medikament bei Patienten mit fortgeschrittenen metastasierten Magenkarzinom und gleichzeitigem Vorliegen einer Her2/neu-Überexpression zeitgleich mit einer Chemotherapie verabreicht [28]. Ein weiterer Grund zur zeitnahen Untersuchung der Her2/neu-Überexpression ist der Einfluss auf die Wahl der Chemotherapie [65]. Ein Magenkarzinom gilt als HER2-positiv, sobald durch immunhistochemische Färbung die Intensität 3+ erreicht wird oder ein Fall mit der Intensität 2+ durch chromogene in situ-Hybridisierung die *HER2*-Amplifikation bestätigt werden kann [65, 66]. Es wird von einer Heterogenität der Her2/neu-Expression von 30% bzw. 25% berichtet [28, 66]. Um die falsch Negativrate möglichst klein zu halten, soll ein Fall als überexprimiert gelten sobald entweder der Primärtumor oder die Metastase überexprimiert ist. So kann möglichst vielen Patienten, die von einer Trastuzumab Therapie profitieren, diese auch zugänglich gemacht werden [65].

1.7 MET im Magenkarzinom

Neben Her2/neu sind der Tyrosinkinase-Rezeptor-Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (MET) und sein Ligand Hepatozyten-Wachstumsfaktor / Streufaktor (HGF / SF) eine weitere Angriffsstruktur in der Magenkarzinombehandlung und Gegenstand aktueller Forschung [69, 70]. Studien zu gegen MET gerichteten monoklonalen Antikörpern wie Rilotumumab (AMG102; Amgen) und Onartuzumab (MetMAb; Genentech) befinden sich in Phase-III ([NCT01697072](#), [NCT01662869](#)) [70]. Krebszellen nutzen die aktivierenden Eigenschaften wie Proliferation, Angiogenese, Motilität, Zellstreuung und Überleben für Tumordinvasion und Metastasierung [69–72]. So sind Magentumoren mit einer MET-Überexpression eine kleine Untergruppe genetisch instabiler Magenkarzinome mit einem aggressiven Phänotyp und einer sehr schlechten Prognose [69–72]. Zur Identifizierung MET-positiver Tumoren eignet sich, wie bei Her2/neu die Immunfärbung und die anschließende in situ-Hybridisierung. Auch hier wird die Identifikation MET-positiver Tumoren durch die intratumorale Heterogenität erschwert [69].

2 Fragestellung der Arbeit und Hypothesen

Tumoren des Magens und gastroösophagealen Übergangs werden oft erst im fortgeschrittenen Stadium und dadurch mit einer schlechten Prognose diagnostiziert [3, 8]. Bei diesen fortgeschrittenen Tumoren sind die rein chirurgischen Therapieverfahren entweder nicht mehr kurativ möglich oder werden in multimodale Therapiekonzepte eingebettet, zu denen die neoadjuvante Chemotherapie zählt [9]. Bei den nicht mehr kurativ behandelbaren Tumoren bleibt oft nur noch die palliative, lebensverlängernde onkologische Behandlung [9]. Der Erfolg der palliativen Therapie kann durch den Einsatz zielgerichteter Medikamente nachhaltig gesteigert werden. Aus diesem Grund hat die Entwicklung robuster molekularer Klassifizierungen, genauerer Einteilungen und Identifikation von Magenkarzinom-Subtypen und die Identifikation fehlregulierter Stoffwechselwege große Priorität erlangt [19]. Die Signalwege der Mutationen können als Angriffspunkte für eine Antikörpertherapie mit Immuncheckpointinhibitoren genutzt werden. Die Hoffnung ist, dass in Zukunft Patienten aufgrund ihrer Subgruppe für die richtige Therapieoption ausgewählt werden können und sich neue prädiktive Marker entwickeln [19, 20]. Ein anderer Ansatz richtet sich gegen die Immunevasionsstrategien maligner Tumoren, die über diesen Mechanismus der eigenen Körperabwehr entgehen. Die Entwicklung und der Einsatz von Immuncheckpointinhibitoren hat die Behandlung von soliden Tumoren in den letzten Jahren nachhaltig verbessert [6]. Aber auch hier profitiert nicht jeder Patient von der Behandlung. Der zielgerichtete Einsatz und die Suche nach geeigneten prädiktiven Biomarkern ist ein brennendes aktuelles Thema in der palliativen Behandlung der Tumoren des Magens und gastroösophagealen Übergangs. Aufgrund der großen Heterogenität innerhalb der einzelnen Tumoren gestaltet sich die Selektion von Patienten an denen z.B. eine zielgerichtete Therapie, wie gegen PD-L1/PD-1, wirkt als schwierig [18].

In dieser Arbeit soll die Expression von PD-L1 und PD1 nach neoadjuvanter Chemotherapie im Magenkarzinom untersucht werden. Bis jetzt haben sich die meisten Studien mit der PD-L1- und PD1-Expression in einer Kohorte unbehandelter Magenkarzinome beschäftigt [17, 73]. Eine neoadjuvante Chemotherapie greift in das Tumorgeschehen ein und verändert z.B. durch Selektionsdruck die subklonale Zusammensetzung eines Tumors und die Genexpression. Sie hat unter Umständen eine immunsuppressive Wirkung auf den Patienten, führt zu Tumorregression und

damit zu einer Reduktion der Antigenlast und verändert insgesamt das Tissue-Microenvironment. Aus diesem Grund ist es das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss einer neoadjuvanten Chemotherapie auf die PD-L1- und PD-1-Expression näher zu untersuchen und Unterschiede zu einer therapienaiven Kohorte zu evaluieren, um Anhaltspunkte für die Therapie mit gegen PD-1/PD-L1 gerichteten Immuncheckpointinhibitoren nach neoadjuvanter Chemotherapie zu liefern.

Es sollen folgende Hypothesen geprüft werden:

- Eine neoadjuvante Therapie verändert die Expression von PD-L1 und PD-1 in Karzinomen des Magens und gastroösophagealen Übergangs.
- EBV-positive und MSI-Tumoren weisen auch nach neoadjuvanter Chemotherapie eine höhere PD-L1-Expression auf.
- Tumoren mit *HER2*- und *MET*-Amplifikation zeigen nach neoadjuvanter Chemotherapie nur eine geringe Koexpression mit PD-L1.

3 Material

3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv besteht aus 140 kaukasischen Patienten mit einem neoadjuvant/perioperativ, auf platinbasierter Chemotherapie, behandeltem Magenkarzinom. Die Patienten wurden zwischen 1998 und 2017 entweder total oder partiell am Adenokarzinom des Magens oder gastroösophagealen Überganges operiert. Ebenfalls standen 81 korrespondierende Lymphknotenmetastasen und 11 korrespondierende Fernmetastasen von 7 dieser Fälle zur Verfügung. Die Proben stammen aus dem Archiv des Instituts für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) Kiel.

Es wurden folgende Patientenmerkmale erhoben: Geschlecht, Alter bei Diagnosestellung, Tumorlokalisation, Tumortyp, Lauren Phänotyp [13], T-, N-, M-, L-, V-, Pn-Kategorie, R-Status, UICC-Stadium, Anteil vitale Tumorresiduen, Regressionsgrad nach Becker [35], Art der Operation, Tumorgröße, Anzahl der resezierten Lymphknoten, Anzahl der Lymphknoten mit Metastasen und das Überleben.

Die Sterbedaten der Patienten stammten aus dem Epidemiologischen Krebsregister des Landes Schleswig-Holstein, Deutschland. Alle weiteren Follow-up-Daten der Patienten wurden aus den Krankenakten und von Hausärzten abgerufen.

Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, wenn ein Adenokarzinom des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs histologisch gesichert war und die Patienten zusätzlich neoadjuvant/perioperativ behandelt worden waren. Ausschlusskriterien waren das Vorliegen eines anderen Tumortyps als ein Adenokarzinom, keine neoadjuvante/perioperative Chemo- oder Strahlentherapie oder die Unvollständigkeit der histologischen Daten.

Die Studie war von der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät genehmigt worden (D 525/15).

Alle Patientendaten wurden nach der Aufnahme in die Studie pseudonymisiert.

3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden verwendet: ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), Bond™ Max automatisiertes Objektträgerfärbesystem (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), Brutschrank (Modell B322, Bender & Hobein, München), Glas und Plastik, Deckgläser (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland), Färbetröge, Färbekammer, Hybridisierungsschlitten (ThermoBrite StatSpin, Abbott Molecular), Inkubator classic (Fa. BINDER GmbH, Modell B28, Tuttlingen, Deutschland), Kühlschrank 6°C (Siemens AG, München, Deutschland), Laborglasflaschen (250ml, 500ml), Messzylinder (25ml, 100ml, 500ml), Objektträger (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland), Objektträgerfärbesystem (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), Pipettenspitzen (DNA-frei, mit Aerosolfilter) entsprechender Größen (Sarstedt, Kat.-Nr.: 70.1116.210, 70.760.212, 70.760.211, 70.1186.210), Reagiergefäße, mit Sicherheitsverschluss (1,5 ml) (Sarstedt, Kat.-Nr.:72.706.400), Polypropylen (nach Coplin), Reagiergefäßständer, Rotationsmikrotom RM2245 (Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland), Slidescanner SCN400 (Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland), Systemmikroskop DM1000 (Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland), Tischzentrifuge (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland Mini-Zentrifuge mit Rotor für 1,5-Reagenzgefäße), Tissue Cool Plate COP 30 (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland), TMA Stanz-Gerät (Beecher Instruments, Silver Spring, MD), Untersuchungshandschuhe, pudernfrei, unsteril (Ansell, Micro Touch Nitra Tex), Vortexer (Vortex Genie, Scientific Industries), Wasserbad (Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland), Wasserbad (WNB7, Memmert), Wippschüttler See-Saw Rocker SSL4 (Stuart Benchtop Science Equipment, Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, USA),

3.3 Chemikalien, Reagenzien und Kitsysteme

Es wurden folgende Chemikalien, Reagenzien und Kitsysteme verwendet: Bond™ Polymer Refine Detection Kit (DS 9800; braune Markierung; Novocastra; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), Bond Polymer Refine Detection Kits (Menarini Diagnostics, Berlin, Deutschland), Deionisiertes Wasser (Carl Roth GmbH +

Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), EBER-Sonde (Novocastra, Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland), 99% Ethanol (Sorte 642; BÜFA, Kat.-Nr.: 30000153010), Fixogum-Klebstoff (Marabu, Tamm, Deutschland), HER2-Sonde (ZytoDot 2C SPEC ERBB2 / CEN17 Sonde), Hämatoxylin und Eosin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), MET-Sonde (ZytoDot 2C SPEC MET / CEN7 Sonde), Mounting Solution (Zytomed Systems, Kat-Nr.: MT-0004-4, Berlin, Deutschland), Natriumhyochlorit-Lösung, 12% Cl (Roth, Kat.-Nr.:9062,3; Gebrauchslösung: 1:10 mit Wasser, Karlsruhe, Deutschland), Polymerase-Kettenreaktions-Assay (PCR-Assay), QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), 30% Wasserstoffperoxid (Roth, Kat.-Nr.:8070.2), Xylol (BÜFA, Kat.-Nr.: 30000173010), ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland).

3.4 Antikörper

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit den folgenden Antikörpern durchgeführt: Her2/neu (Klon 4B5), MET (Klon SP44; Verdünnung 1:50; Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA), MLH1 (Klon G168-15, Verdünnung 1:50; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), MSH2 (Klon FE11, 1:30, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland); MSH6 (Klon 44, 1:30; BD Biosciences), PD-1 (Klon MRQ-22; 1:100, Cell Marque, Rocklin, Vereinigte Staaten von Amerika), PD-L1 (Klon E1L3N; Verdünnung 1:100, E1L3N, CellSignaling, Danvers, Vereinigte Staaten von Amerika), PMS2(Klon MRQ-28, 1:20; Cell Marque Corporation, Rocklin).

3.5 Software

Folgende Softwareprodukte wurden verwendet: Citavi 5.7 für Windows (Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH), Gimp2.10.10 (GNU Image Manipulation Programm), Microsoft Office 365 ProPlus, SPSS SmartReader 24.0 (IBM; Armonk, NY, USA), SPSS Version 20.0 (IBM; Armonk, NY, USA), Software für Leica SCN400 Slide Scanner (Leica Microsystems; Wetzlar).

4 Methoden

4.1 Herstellen der Blöcke und Tissue Microarrays (TMAs)

Das Tumorgewebe wurde nach der Operation im Institut für Pathologie mit Formalin (10% neutralisiertes Formalin) fixiert und in Paraffin (FFPE) eingebettet.

Die Tissue Microarray (TMA) Technik ermöglichte eine Beurteilung des Patientenkollektivs mit geringem Materialaufwand. Dazu wurden die Paraffinblöcke in einem zur Herstellung von TMA geeignetem Gerät (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) eingespannt. Am korrespondierenden HE-Schnitt wurde die Tumorregion identifiziert und fünf repräsentative 1,5 mm durchmessende Stanzen aus der Tumorregionen entnommen. Die Stanzzyylinder wurden mit dem gleichen Instrument in ein zuvor angefertigtes passgenaues Loch des Empfänger-Paraffinblocks (TMA-Block) übertragen. Nach dieser Methode wurden von allen Patientenfällen mit ausreichend Tumorgewebe schließlich fünf TMA- Paraffinblöcke hergestellt. In 11 Fällen wurden Stanzen von den Lymphknotenmetastasen und in einem Fall von einer Fernmetastase gewonnen. Die Primärtumoren waren in diesen Fällen auf Grund zu geringer Resttumormenge nicht geeignet. In 25 Fällen wurden wegen der verstreut liegenden einzelnen Tumorzellen (z.B. Becker 1b) die Großflächenschnitte und nicht die TMA-Stanzen zur weiteren Auswertung verwendet. In 15 Fällen gab es keine vitalen Tumorzellen mehr oder der Block konnte nicht für weitere Schnitte verwendet werden. Die fertigen TMA-Blöcke wurden zwei Mal für fünf Minuten im Brutschrank bei 54°C erwärmt, damit sich die Gewebestanzungen mit dem Paraffin des Empfängerblocks verbinden konnten.

4.2 Herstellung der Schnitte

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Paraffinblöcke auf einer -15°C kalten Platte (Tissue Cool Plate COP 30) gekühlt und anschließend mit einem Rotationsmikrotom 2 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Mit Hilfe eines Wasserbads wurden die Schnitte auf die Objektträger (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und im Brutschrank (Bender & Hobein, München) über Nacht bei 54° C getrocknet.

Die Großflächenschnitte und TMA-Schnitte wurden für die unten beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen genutzt. Für die chromogene in situ-Hybridisierung (CISH) wurden 3-5µm dickere Schnitte hergestellt.

4.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE)

Die mit Xylol entparaffinierten, in absteigender Alkoholreihe rehydrierten und mit destilliertem Wasser gespülten Gewebsschnitte wurden mit HE gefärbt. An HE-Schnitten eines Tumors wurden jeweils die Einschlusskriterien, der prozentuale Anteil vitaler Tumorzellen und der Tumortyp nach Laurén [13] für das Kollektiv überprüft.

Der Anteil an vitalen Tumorzellen wurde in Prozent von 0% keine vitalen Tumorzellen vorhanden, Narbenareal und Tumornekrose bis 100% vitale Tumorzellen in Bezug auf den kompletten Tumor an repräsentativen Schnitten abgeschätzt.

4.4 PD-L1 und PD-1

4.4.1 Immunhistochemische Färbemethoden von Antikörper gegen PD-L1 und PD-1

Die Immunfärbung erfolgte für den Primärtumor, die Lymphknotenmetastasen und die Fernmetastasen jeweils an Großflächenschnitten. Der Nachweis von PD-L1 und PD-1 erfolgte immunhistochemisch mit dem Bond™ Max automatisierten Objektträgerfärbesystem. Die Immunreaktion wurde mit dem Bond™ Polymer Refine Detection Kit sichtbar gemacht. Keimzentren von Lymphfollikeln dienten als interne positive Kontrolle für PD-L1 und PD-1.

4.4.2 Histologische Auswertung der PD-L1-Expression in Tumorzellen

Die PD-L1-Expression in Tumorzellen wurden im Primärtumor, den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen sowie den korrespondierenden Fernmetastasen ausgewertet. Als positiv wurde nur eine membranständige PD-L1-Expression gewertet. Tumornekrosen, Narbengewebe und die gesunde Magenschleimhaut wurden nicht ausgewertet oder als nicht auswertbar klassifiziert.

Auch konnten Primärtumorschnitte mit dem Tumorstadium komplette Regression (Becker 1a) nicht ausgewertet werden, da hier keine vitalen Tumorzellen mehr vorhanden waren.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Immunreaktivitäts-Scores (IRS). Kategorie A bewertete den Prozentsatz PD-L1-positiver Tumorzellen: 0 (0% negativ), 1 ($\leq 1\%$ positiv), 2 (2-10% positiv), 3 (11-50%) oder 4 ($> 50\%$). Kategorie B bewertete die Intensität der Immunreaktion: 0 (keine Immunfärbung), 1+ (schwache Immunfärbung), 2+ (mäßige Immunfärbung), 3+ (starke Immunfärbung). Die Addition von Kategorie A und B führte zu einem IRS von 0 bis 7. Aufgrund der insgesamt niedrigeren Expression von PD-L1 in neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen wurde jede Membranfärbung ($IRS > 0$) von Tumorzellen als PD-L1 positiv klassifiziert.

4.4.3 Histologische Auswertung der PD-L1-Expression in Immunzellen

Die PD-L1 gefärbten Immunzellen, Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen konnten in allen Primärtumorschnitten ausgewertet werden, auch in denen mit dem Tumorstadium komplette Regression (Becker 1a), da bei dieser Auswertung sowohl PD-L1-positive Immunzellen im Tumor- als auch im Regressionsgebiet, der Narbe, gewertet wurden. Dies gilt sowohl für den Primärtumor als auch die Fernmetastasen, nicht aber für die korrespondierenden Lymphknotenmetastasen. Für die Auswertung wurde nur der Prozentsatz an PD-L1-positiven Immunzellen berücksichtigt und dem Score 0 bis 3: 0 (0%), 1 ($\leq 1\%$), 2 (2-10%), 3 ($\geq 10\%$) zugeordnet. Zur statistischen Auswertung wurden die Werte am Median dichotomiert. Ein Tumor wurde als PD-L1-positiv in Immunzellen betrachtet, wenn $> 1\%$ der Immunzellen eine Immunreaktion zeigten.

Der inzwischen in der mittelbaren Krankenversorgung etablierte *Tumorproportion score* und der *Compound positivity score* wurden in dieser Dissertation nicht verwendet, da sonst keine Vergleichbarkeit mit den an der therapienaiven Kohorte erhobenen Studiendaten möglich gewesen wäre [17].

4.4.4 Histologische Auswertung der PD-1-Expression

Die Auswertung der PD-1-positiven Zellen wurde nur für Immunzellen vorgenommen. Es wurde im Primärtumor und den korrespondierenden Fernmetastasen jeweils separat tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) und Lymphozytenaggregate/ intratumorale Lymphfollikel betrachtet. Die Bewertung erfolgte in den Kategorien angefärbt, positiv und nicht angefärbt, negativ. Zusätzlich wurde die Anwesenheit oder das Fehlen von Lymphozytenaggregaten/intratumoralen Lymphfollikeln unabhängig von ihrer PD-1-Färbung gewertet.

4.5 Epstein-Barr-Virus

4.5.1 Nachweis des Epstein-Barr-Virus

Der EBV-Status wurde mit Hilfe der EBER-Sonde und dem Bond TM Max automatisierten Objektträgerfärbesystem gemäß den Herstellerangaben ermittelt. So konnte EBV-kodierende RNA nachgewiesen und auf den Schnitten sichtbar gemacht werden.

4.5.2 Histologische Auswertung EBV

Die TMA Schnitte und die Großflächenschnitte wurden nach den Kriterien EBV-Nachweis positiv und EBV-Nachweis negativ ausgewertet.

4.6 Mikrosatelliteninstabilität

4.6.1 Immunhistochemischer Nachweis der Expression der DNA-Reparaturproteine

Für die Bestimmung des MSI-Status in der Studienkohorte wurde ein Zwei-Schritt-Verfahren eingesetzt. Zunächst wurde mit Hilfe der Immunhistologie die Expression der DNA-Reparaturproteine MLH1, PMS2, MSH2 und MSH6 überprüft. Die Immunfärbung erfolgte mit dem Bond TM Max automatisierten Objektträgerfärbesystem unter Verwendung des Bond Polymer Refine Detection Kits gemäß den Anweisungen

des Herstellers. Ein nukleärer Nachweis aller vier DNA-Reparaturproteine galt als *MMR-proficient* und wurde als Hinweis auf das Vorliegen eines mikrosatellitenstabilen Karzinoms gewertet. Der Nachweis einer verminderten oder fehlenden Expression eines oder zweier DNA-Reparaturproteine wurde als potentieller Verlust der Expression (*MMR-deficient*) gewertet und der Fall wurde anschließend einer molekularpathologischen Untersuchung zugeführt.

4.6.2 Molekularpathologische Untersuchung des Mikrosatellitenstatus

Für die molekularpathologische Untersuchung des Mikrosatellitenstatus wurde DNA aus mikrodissezierten Arealen des Tumors und Nichttumors (z.B. korrespondierende gesunde Magenwand) extrahiert. Dazu wurden jeweils Paraffinserienschnitte verwendet, von denen einer mit HE gefärbt worden war.

Die DNA-Isolierung erfolgte gemäß der Herstelleranweisungen. Aus dem in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe wurde genomische DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit extrahiert. Durch Zuhilfenahme eines qualitativen Polymerase-Kettenreaktions-Assay (PCR-Assay) wurde die Integrität und Amplifizierbarkeit der isolierten DNA überprüft [74]. Anschließend wurde ein Vergleich der Allelprofile von 5 Mononukleotid-Wiederholungsmarkern im Tumor und dem korrespondierenden Normalgewebe durchgeführt. Als Marker wurde BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 und NR-27 verwendet [75]. In einer Pentaplex-PCR wurden alle Marker gemeinsam zur Amplifikation von Mikrosatelliten-Loci mit dem Qiagen Multiplex PCR Master Mix gemäß Herstellerangaben untersucht. Die amplifizierten Loci wurden anschließend auf einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer analysiert. Als Karzinom wurde als MSI gewertet, wenn mindestens 2 von 5 Markern instabil waren.

4.7 HER2- und MET-Status

4.7.1 Immunhistochemischer Nachweis der Expression von Her2/neu und MET

Die Bestimmung des HER2- und MET-Status erfolgte wie bei Warneke et al. [66] und Metzger et al. [69] beschrieben. Zunächst wurde bei allen Fällen der Studienkohorte ein immunhistologischer Nachweis der Expression von Her2/neu und MET durchgeführt und die membranäre Expression als 0 (keine Immunfärbung), 1+ (schwache Immunfärbung), 2+ (mäßige Immunfärbung) und 3+ (starke Immunfärbung) kategorisiert. Alle Fälle mit der Färbeintensität 0 und 1+ wurden als HER2- bzw. MET-negativ klassifiziert. Alle Fälle mit einer Intensität 2+ und 3+ wurden einer chromogenen in situ-Hybridisierung (CISH) zugeführt.

4.7.2 Chromogene in situ-Hybridisierung zum Nachweis der *HER2*- und *MET*-Genamplifikation

Zunächst wurden 3-5 µm dicke Paraffinschnitte für 2 x 15 min in Xylol (BÜFA, Kat.-Nr.:30000173010) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (2 x 5 min 99 % Ethanol, 1 x 5 min 96% Ethanol und 1 x 5 min 70% Ethanol). Um endogene Peroxidasen abzupuffern, wurden die Gewebeschnitte 5 min in 3 % H₂O₂ auf dem Wippschüttler (70rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 2 x 1min in deionisiertem Wasser wieder auf dem Wippschüttler gewaschen, um sie danach durch eine Hitzebehandlung, 15 min im Heat Pretreatment Solution EDTA Wasserbad bei 95°C, für die Sonde zugänglich zu machen. Nach erneutem Waschen, 2 x 2 min in deionisiertem Wasser, wurde Pepsinsolution gewebedeckend aufgeträufelt und für 5 min bei 37 °C im Hybridisierungsschlitten inkubiert. Die Denaturierung diente der Trennung beider Doppelhelixstränge, damit die Sonden an die komplementären DNA-Abschnitte binden konnten. Danach wurden die Schnitte wieder für 1 min in deionisiertem Wasser gewaschen, anschließend jeweils für 1 min in 70% Ethanol, 96% Ethanol und dann 99% Ethanol dehydriert und für 5 min luftgetrocknet. Als nächstes wurde die Sonde (MET: ZytoDot 2C SPEC MET / CEN7 Sonde; Her2: ZytoDot 2C SPEC ERBB2 / CEN17 Sonde, DIG und DNP-markiert) zugefügt und der Schnitt mit Hilfe eines Deckgläschens und Fixogum-Klebstoff (Marabu) abgedichtet. Nach einer Lufttrocknungszeit von 15 min wurden die Schnitte über Nacht im Programm "HER2" (75°C für 5 min, 37°C, unendlich) im Hybridisierungsschlitten inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Fixogum entfernt und der Gewebeschnitt 5 min in Wash Buffer SSC (Zytomed Systems, Kat-Nr.: WB-0001-500) bei Raumtemperatur inkubiert, um das Deckglas vom Objektträger zu lösen. Als nächstes sollten nicht und zu locker gebundene Sonden entfernt werden. Dazu wurden die Gewebeschnitte bei 75-80°C in Wash Buffer SSC gewaschen. Die Temperatur durfte nicht überschritten werden, da sonst auch richtig gebundene Sonden entfernt worden wären. Anschließend erfolgte 2 x 1 min waschen in deionisiertem Wasser und 1 min in Wash Buffer TBS (Zytomed Systems, Kat-Nr.: WB-0005-50). Als nächstes wurden die Sonden über eine chromogene Farbreaktion sichtbar gemacht. Dazu wurde zuerst ein Anti-DIG/DNP-Mix (Zytomed Systems, Kat-Nr.: AB-0014-4) gewebedeckend aufgeträufelt und für 15 min im Hybridisierungsschlitten bei 37°C inkubiert. Nach 3 x 1 min waschen in Wash Buffer TBS wurde als nächstes ein HRP/AP-Polymer-Mix (Zytomed Systems, Kat-Nr.: AB-0013-4) gewebedeckend aufgeträufelt und ebenfalls für 15 min im Hybridisierungsschlitten bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen der Gewebeschnitte für 3 x 1 min in Wasch Buffer TBS wurde nun AP-Red-Solution (Zytomed Systems, Kat-Nr.: SB-0006a-0.4; Kat-Nr.: SB-0006b-15) gewebedeckend aufgeträufelt und lichtgeschützt für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die alkalische Phosphatase der Red-Solution machte den Polymermix, welcher an das Zentromer des Chromosoms 17 gebunden hatte als, im Normalfall, zwei rote Punkte sichtbar. Nach erneutem Waschen, dieses Mal in deionisiertem Wasser für 2 min wurde die HRP-Green-Solution (Zytomed Systems, Kat-Nr.: SB-0007a-0.8; Kat-Nr.: SB-0007b-15) aufgeträufelt und bei Raumtemperatur wieder lichtgeschützt für 10 min inkubiert. Diese Peroxidase machte den Polymermix der *HER2*- oder *MET*-Region im Normalfall als zwei grüne Punkte sichtbar. Bevor der letzte Färbeschritt durchgeführt werden konnte, mussten die Schnitte wieder für 2 min in deionisiertem Wasser gewaschen werden. Um die Kerne leicht anzufärben, wurde nun Nuclear Blue Solution (Zytomed Systems, Kat-Nr.: CS-0002-20) aufgeträufelt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2 min Waschen unter fließendem Wasser wurden die Schnitte dehydriert, 3 x 30sec in 99% Ethanol und 2 x 30 sec in Xylol, um anschließend mit Hilfe von Mounting Solution (Zytomed Systems, Kat-Nr.: MT-0004-4) eingedeckelt zu werden. Nach einer 30-minütigen Trocknungszeit an der Luft konnten die Schnitte ausgewertet werden.

4.7.3 Auswertung der Chromogenen in situ-Hybridisierung von *HER2* und *MET*

Für die Auswertung der CISH wurde zuerst der gesamte Großflächenschnitt begutachtet, um ein homogenes oder heterogenes Amplifizierungsmuster zu erkennen. Anschließend wurden die Hybridisierungssignale in mindestens 20 repräsentativen, zufällig im Tumorareal verteilten Krebszellen ausgezählt und das Verhältnis von *HER2*-Signalen bzw. *MET*-Signalen zu Centromer 17 und Centromer 7-Signalen durch Division von *HER2*- bzw. *MET*-Gensignale durch die Anzahl der Krebszellkerne berechnet. Ein Quotient ≥ 2 wurde als amplifiziert gewertet. In Fällen mit einem *HER2* oder *MET* und Centromer 17 bzw. 7 Verhältnis zwischen 1,8 und 2,2 wurden weitere 20 zufällige Krebszellen ausgezählt und der Mittelwert beider Zählungen verwendet. Zusätzlich oder als Ersatz bei zu dichten Clustern wurde auf das Vorhandensein von *HER2*- bzw. *MET*-Clustern geachtet.

Abschließend galt ein Fall als *HER2*-positiv bzw. *MET*-positiv, wenn er in der Immunhistologie eine Intensität 2+ oder 3+ zeigte und zusätzlich in der CISH ein Quotient ≥ 2 aufwies.

4.8 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung von SPSS 20.0 (IBM Corporation, New York, USA) durchgeführt. Sowohl der PD-L1- und PD-1-Status innerhalb der verschiedenen Tumorkomponenten (Tumorzellen, Immunzellen) als auch der HER2- und MET- sowie der MSI- und EBV-Status wurden zunächst als Rohwerte untersucht. Anschließend erfolgte die Dichotomisierung am Median, um die Ergebnisse mit den klinisch-pathologischen Patientencharakteristika zu korrelieren. Dies wurde mit Kreuztabellen und unter Verwendung des Fishers Exakt Test oder mit dem Tau-Test nach Kendall, für Parameter der Ordinalskala (z.B. T-Kategorie, N-Kategorie), durchgeführt. Wenn für einen Fall ein Charakteristikum nicht vorlag oder nicht ausgewertet werden konnte, wurde der entsprechende Fall nicht in der Statistik berücksichtigt. Das mediane Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben wurden mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Der Log-Rank-Test wurde verwendet, um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Überlebenskurven zu bestimmen. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $p < 0,05$ festgelegt. Die Deckungsrate der Korrelationen zwischen klinischen Variablen und Biomarkern wurde durch Anwendung des explorativen Simes-Verfahrens (Benjamini-Hochberg) kontrolliert [76]. Alle p-Werte wurden nicht angepasst, aber diejenigen, die im explorativen Simes-Korrekturverfahren an Bedeutung verloren, wurden entsprechend markiert.

5 Ergebnisse

5.1 Klinisch-pathologische Charakteristika

Die klinisch-pathologischen Merkmale der Patientenkohorte sind in Tabelle 3 zusammengefasst. 140 Fälle mit 93 korrespondierenden Lymphknotenmetastasen und 15 Fernmetastasen erfüllten alle Studienkriterien. Eine vollständige Tumorregression zeigten 16 der Primärtumorfälle. Überlebensdaten standen in 135 (96,4%) von 140 Fällen zur Verfügung.

Tabelle 3: Klinisch-pathologische Merkmale der Patientenkohorte

Patienten Charakteristika		Valide	n (%)
Geschlecht	weiblich	140	28 (20,0)
	männlich		112 (80,0)
Alter	< 64 Jahre	140	70 (50,0)
	≥ 64 Jahre		70 (50,0)
Lokalisation	proximal	140	90 (64,3)
	distal		50 (53,7)
Laurén Phänotyp	intestinal	140	62 (44,3)
	diffus		26 (18,6)
	gemischt		26 (18,6)
	unklassifiziert		14 (10,0)
	komplete Regression		12 (8,6)
yT-Kategorie	ypT0	140	16 (11,4)
	ypT1(a/b)		20 (14,3)
	ypT2		20 (14,3)
	ypT3		74 (52,9)
	ypT4(a/b)		10 (7,1)
yN-Kategorie	ypN0	140	51 (36,4)
	ypN1		33 (23,6)
	ypN2		32 (22,9)
	ypN3(a/b)		24 (17,1)
yM-Kategorie	ypM0	140	119 (85,0)
	ypM1		21 (15,0)
UICC-Stadium	0/N+	138	15 (10,9)
	I(A/B)		21 (15,2)
	II(A/B)		24 (17,4)
	III(A/B/C)		57 (41,3)
	IV		21 (15,2)
yL-Kategorie	ypL0	140	98 (70,0)
	ypL1		42 (30,0)
yV-Kategorie	ypV0	140	130 (92,9)
	ypV1		10 (7,1)

Patienten Charakteristika		Valide	n (%)
yPn-Kategorie	ypPn0	140	110 (78,6)
	ypPn1		30 (21,4)
yR-Status	R0	140	125 (89,3)
	R1		13 (9,3)
	RX		2 (1,4)
Mikrosatellitenstatus	MSS	121	113 (93,4)
	MSI		8 (6,6)
Epstein-Barr-Virus	negativ	122	119 (97,5)
	positiv		3 (2,5)
MET-Status	negativ	124	118 (84,3)
	positiv		6 (4,8)
HER2-Status	negativ	122	114 (93,4)
	positiv		8 (6,6)
vitale Tumorresiduen (dichotomisiert am Median)	<55%	139	70 (50,4)
	≥55%		69 (49,6)
vitale Tumorresiduen (Quartile)	Q1 (<6%)	139	39 (28,1)
	Q2 (6-55%)		31 (22,3)
	Q3 (56-85%)		31 (22,3)
	Q4 (>85%)		38 (27,3)
Tumorregressionsgrad (Becker)	1a	140	16 (11,4)
	1b		29 (20,7)
	2		22 (15,7)
	3		73 (52,1)
PD-L1 in Tumorzellen (Primärtumor)	negativ	119	92 (77,3)
	positiv		27 (22,7)
PD-L1 in Immunzellen (Primärtumor)	negativ	138	87 (63,0)
	positiv		51 (37,0)
PD-L1 in Tumorzellen (Lymphknotenmetastasen)	negativ	73	54 (74,0)
	positiv		19 (26,0)
PD-1 in tumorinfiltrierenden Lymphozythen	negativ	138	12 (8,7)
	positiv		126 (91,3)
Lymphozytenaggregate vorhanden	negativ	138	14 (10,1)
	positiv		124 (89,9)
PD-1 in Lymphozytenaggregaten	negativ	138	15 (10,9)
	positiv		123 (89,1)

Das Kollektiv umfasste 112 (80%) Männer und 28 (20%) Frauen. Das mediane Alter der Patientenkohorte bei Diagnosestellung betrug 63,8 Jahre (Umfang 20,8 – 81,7 Jahre). Die Altersverteilung ist in Abbildung 1 zu sehen.

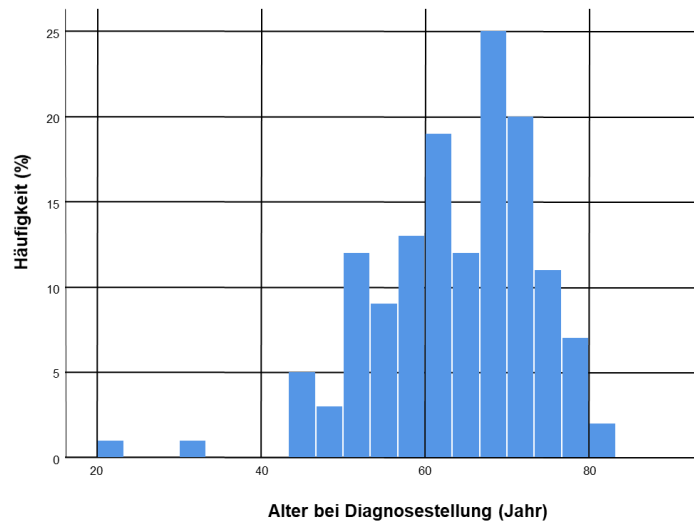


Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung des Alters bei Diagnosestellung.
n=140 (n = Anzahl der Patienten).

Bei der Lokalisation überwiegte mit 64,3% die proximal gelegenen Tumoren. Der intestinale Typ der Lauren Klassifikation stellte mit 44,3% den größten Anteil gefolgt vom diffusen und gemischten Typ mit jeweils 18,6%. Bei der ypT-Kategorie zeigte über die Hälfte der Patienten (52,9%) Kategorie ypT3. Der Anteil an vitalen Tumorzellen schwankte zwischen 0 und 100% mit einem Median von 49,5% (Abbildung 2).

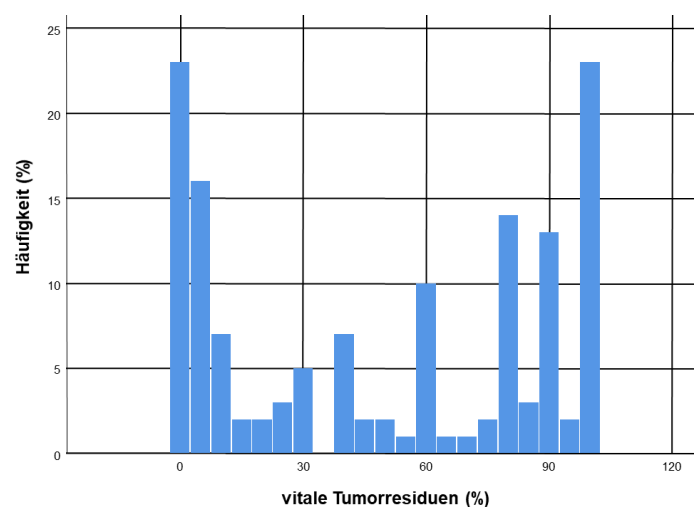


Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung vitaler Tumorresiduen.
n=139 (n = Anzahl der Patienten).

5.2 PD-L1-Expression Bewertung der Rohwerte

Die Expression von PD-L1 wurde in Tumor- und Immunzellen bewertet. Tumornekrosen oder nichtneoplastisches Gewebe wurden nicht gewertet. PD-L1-positive Immunzellen dienten als interne Positivkontrolle und konnten in jedem Fall nachgewiesen werden.

5.2.1 PD-L1-Expression in Tumorzellen des Primärtumors

Zuerst wurden die Rohwerte untersucht. Eine membranständige PD-L1-Expression in Tumorzellen zeigten 27 (22,7%) von 119 auswertbaren Fällen. 16 (11,4%) Fälle konnten auf Grund von Becker-Regressionsgrad 1a und somit fehlender Tumorzellen nicht ausgewertet werden. Vier (2,8%) weitere Fälle mit dem Becker-Regressionsgrad 1b zeigten ebenfalls keine Tumorzellen im gefärbten Schnitt und wurden ebenfalls als nicht auswertbar klassifiziert. Bei einem Fall fehlte der Primärtumorschnitt und wurde somit als nicht auswertbar klassifiziert. Der Prozentsatz an gefärbten Tumorzellen lag im Bereich von 0 bis 90% (Median 0%), wobei der Gesamtprozentsatz von PD-L1-positiven Tumorzellen niedrig war (in 95,8% der Fälle <10% immunpositive Tumorzellen). Die Färbeintensität wies ebenfalls einen Median von 0 auf bei einer Intensität von 0 bis 3+.

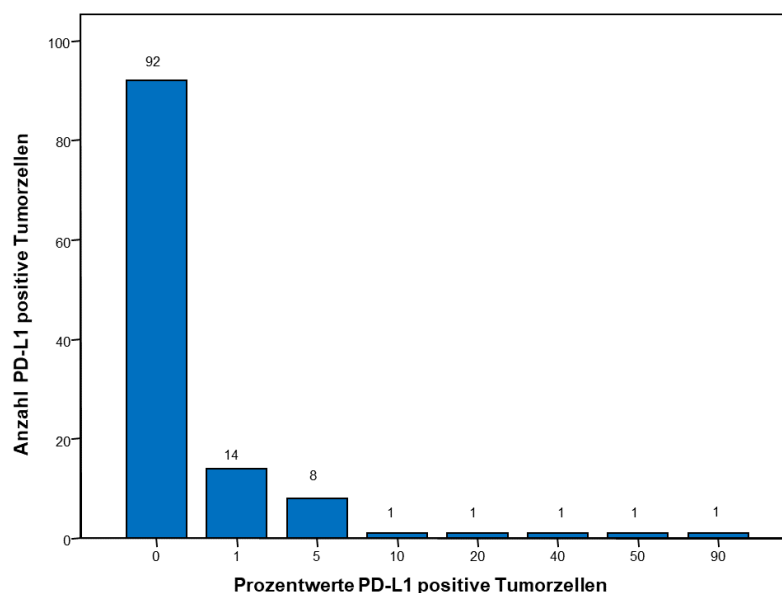


Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung der Prozentwerte PD-L1-positiver Tumorzellen im Primärtumor.

Durch Addition der Kategorie Intensität und Kategorie Prozentsatz PD-L1-positiver Tumorzellen errechnet sich der für die Auswertung verwendeten IRS von 0 bis 7 (Median 0). Die Intensität der Immunfärbung reichte von 0 (keine Immunfärbung), 1+ (schwache Immunfärbung), 2+ (mäßige Immunfärbung) bis 3+ (starke Immunfärbung) (Median 0). Die logische Aufteilung der Prozentwerte anhand der Rohwerte ergab, wie oben beschrieben: 0 (0% negativ), 1 ($\leq 1\%$ positiv), 2 (2-10% positiv), 3 (11-50%) und 4 ($>50\%$).

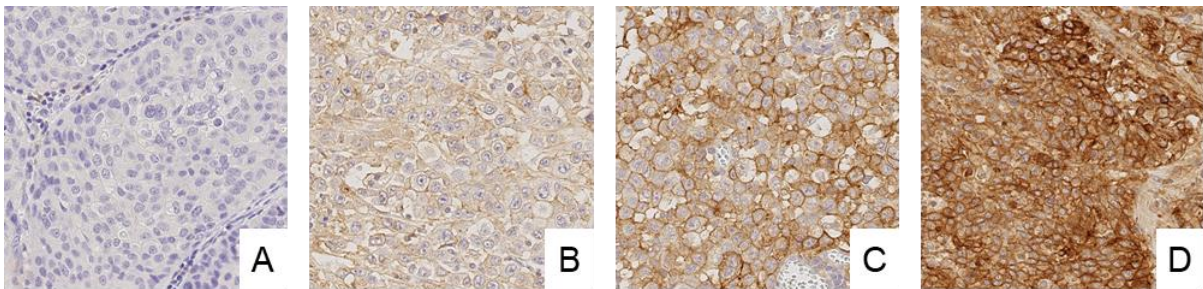


Abbildung 4: Darstellung von Referenzschnitten der PD-L1-Immunfärbung in Tumorzellen.

A: Intensität 0 (keine Immunfärbung), B: Intensität 1+ (schwache Immunfärbung), C: Intensität 2+ (mäßige Immunfärbung) D: Intensität 3+ (starke Immunfärbung). Membranständige Färbung. Anti-PD-L1-Antikörper; Hämalaun-Kernfärbung; 400-fache Originalvergrößerung.

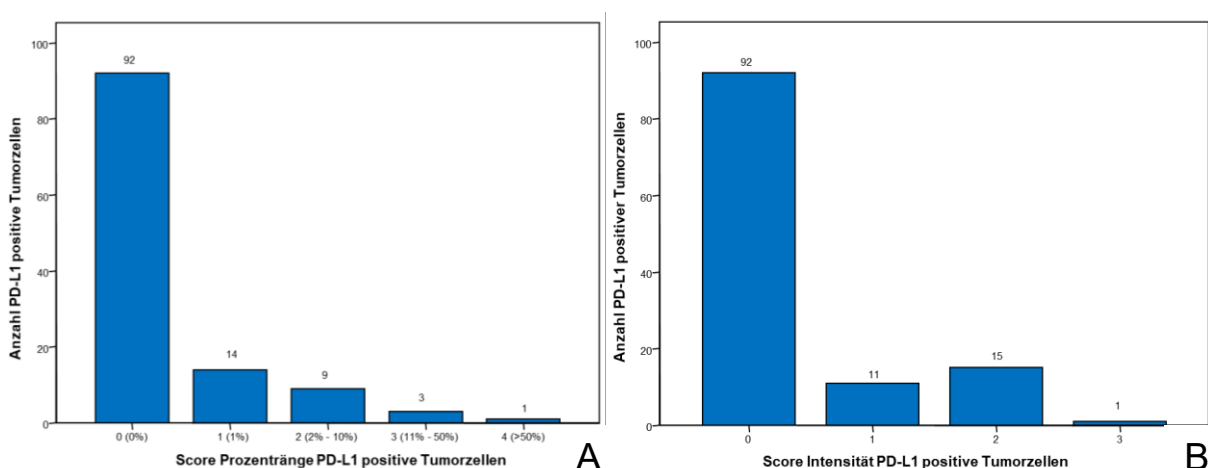


Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung des Prozentwerte- und Intensitäts- Scores PD-L1-positiver Tumorzellen im Primärtumor.

A: Prozentwertescore, B: Intensitätsscore.

Keiner der Fälle wies das gleichzeitige Vorliegen einer Intensität von 3+ und einen Prozentsatz an gefärbten Zellen > 50 % auf. Der Summenscore IRS = 7 wurde somit in keinem Fall der Kohorte erreicht. Auch ein IRS = 1 ist nicht in der Grafik zu sehen, da dieser rein rechnerisch nicht erreicht werden kann. Eine Intensität bedingt automatisch, dass ein gewisser Prozentsatz an Tumorzellen gefärbt ist und der Schnitt somit mit IRS 2 bewertet wird.

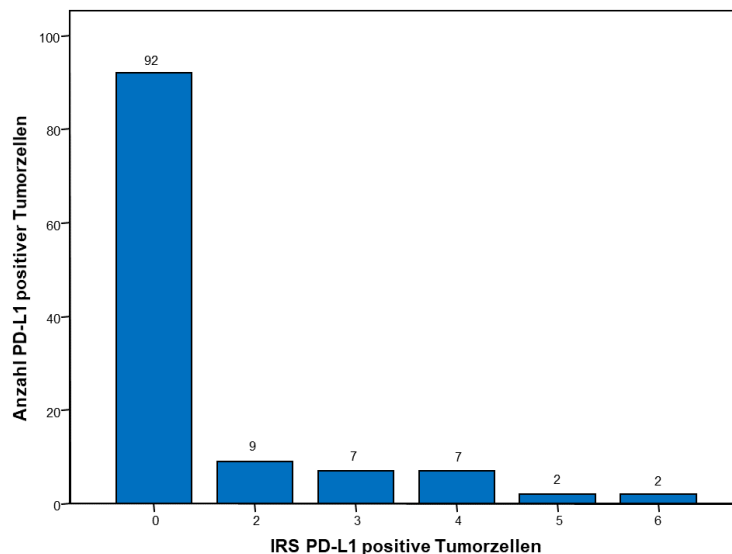


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung des Immunreaktivitätsscore innerhalb der PD-L1-Färbung bei positiven Tumorzellen im Primärtumor.

Im nächsten Schritt wurden die Werte am Median in positiv und negativ dichotomiert. Ein Tumor galt als PD-L1-positiv, sobald 1% der Tumorzellen eine schwache Expression (1+) aufwiesen (IRS \geq 2). Somit wurden 27 (22.7%) der 119 untersuchten Magenkarzinome als PD-L1-positiv gewertet.

5.2.2 PD-L1-Expression in Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen

Eine membranständige PD-L1-Expression in Tumorzellen zeigten 19 (26,0%) von 73 untersuchten Lymphknotenmetastasen. Der Prozentsatz an gefärbten Tumorzellen lag im Bereich von 0 bis 50% (Median 0%) und die Intensität schwankte von 0 bis 3+ (Median 0).

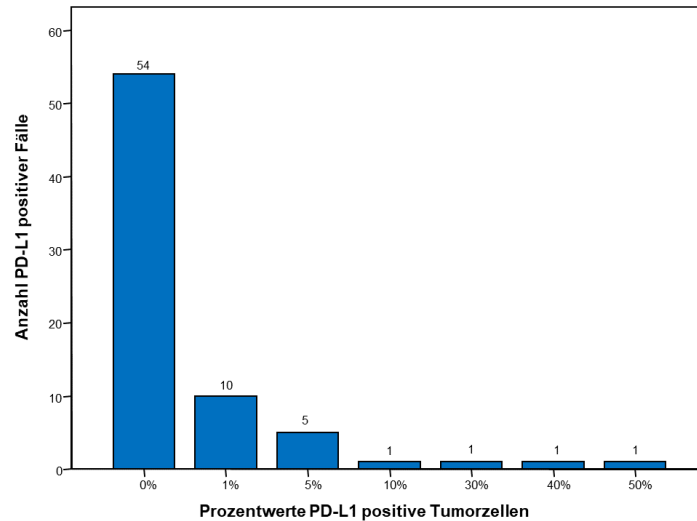


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der Prozentwerte PD-L1-positiver Tumorzellen in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen.

In den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen wurde, um die erhobenen Ergebnisse vergleichen zu können, wie im Primärtumor mit demselben IRS (0-7) gearbeitet. Hier zeigte der IRS eine Verteilung von 0 und 2-5 (Median 0).

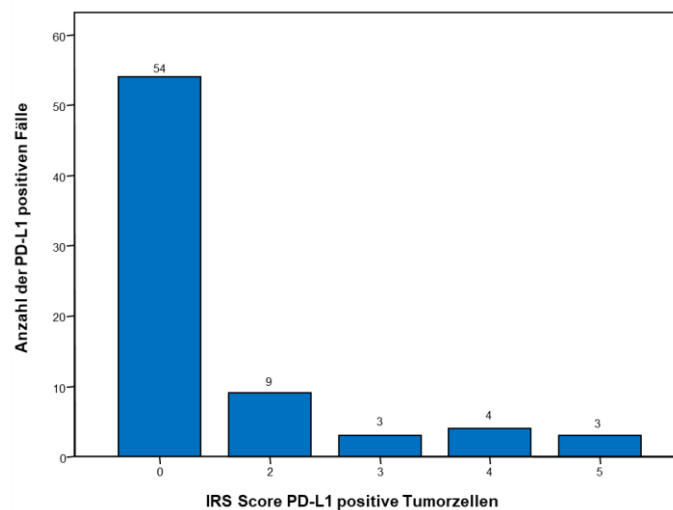


Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung des Immunreaktivitätsscores innerhalb der PD-L1-Färbung bei positiven Tumorzellen in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen.

Auch in den Lymphknotenmetastasen bedingte eine starke Färbeintensität nicht automatisch einen großen Prozentsatz an gefärbten Zellen.

Die Dichotomisierung wurde am Median durchgeführt. Eine Lymphknotenmetastase galt auch hier als PD-L1-positiv, sobald $\geq 1\%$ der Tumorzellen eine schwache Expression aufwiesen (1+; IRS ≥ 2 , IRS >0). Eine membranständige PD-L1-Expression in Tumorzellen zeigten 19 (35,1%) von 73 Lymphknotenmetastasen.

5.2.3 PD-L1-Expression in Immunzellen des Primärtumors

134 (96,4%) von 139 Fälle enthielten PD-L1-positive Immunzellen im Primärtumor. Der Prozentsatz an gefärbten Immunzellen reichte von 0 bis 70% (Median 1%).

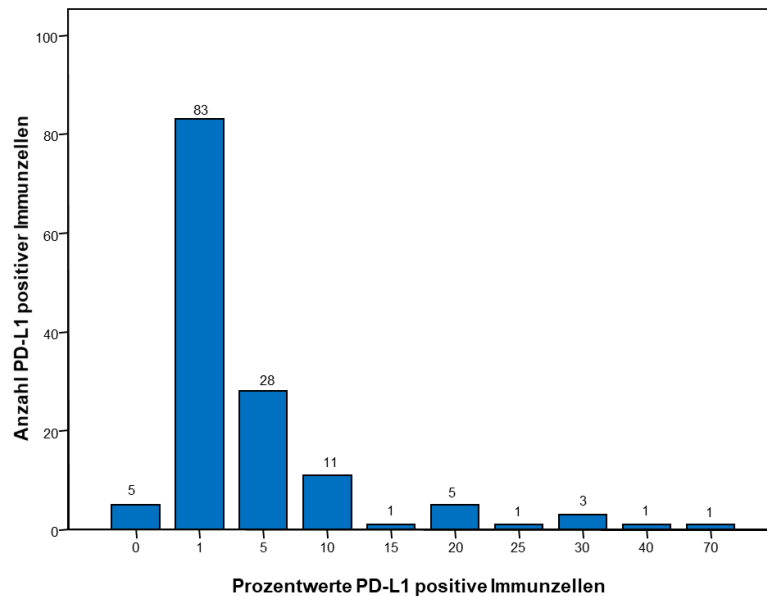


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der Prozentwerte PD-L1-positiver Immunzellen im Primärtumor.

Wie oben beschrieben wurde bei der Bewertung von Immunzellen nur der Prozentsatz an PD-L1-positiven Zellen berücksichtigt, im Score 0 bis 3: 0 (0%), 1 (1%), 2 (5%), 3 ($\geq 10\%$).

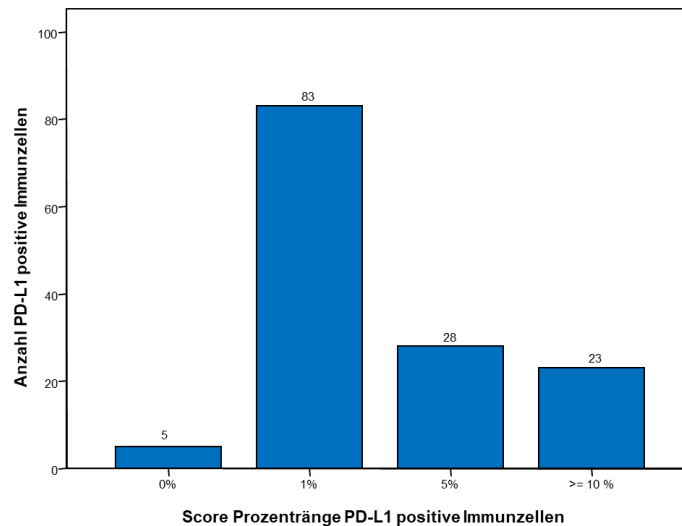


Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung des Prozentwerte Scores PD-L1-positiver Immunzellen im Primärtumor.

Score 0 bis 3: 0 (0%), 1 (1%), 2 (5%), 3 ($\geq 10\%$).

Für die statistische Untersuchung wurden die Werte in positiv/viel und negativ/wenig PD-L1-positive Immunzellen am Median dichotomiert. Als positiv wurde ein Fall gewertet, wenn mehr $>1\%$ der Immunzellen eine Immunreaktion zeigten. Somit gelten 51 (36,6%) der 139 untersuchten Magenkarzinome als positiv.

5.2.4 PD-L1-Expression in Tumor- und Immunzellen der Fernmetastasen

Bei 17 Fällen der 140 Magenkarzinomfälle lagen Fernmetastasen vor (ypM1). In 15 der 17 Fälle war die Lokalisation bekannt. Acht Mal trat eine Peritonealmetastase auf, zweimal Lebermetastasen, eine Weichgewebismetastase, eine Lungenmetastase und eine Knochenmetastase. Zwei Patienten hatten multiple Metastasen in Kolon, Peritoneum und Pleura bzw. Lunge und Leber. Die Fernmetastasen wurden zum einen klinisch, zum anderen histologisch gesichert. Für diese Studie standen 11 Fernmetastasen von 7 Fällen zur Verfügung. Ein Patient hatte vier Lebermetastasen, ein anderer Patient zwei Peritonealmetastasen. In einem Fall stand eine Weichgewebismetastase zur Verfügung und die restlichen 4 Fälle zeigten jeweils eine Peritonealmetastase.

Zwei der 11 untersuchten Metastasen zeigten eine PD-L1-Expression in Tumorzellen. Beide wiesen 1% gefärbte Zellen mit der Intensität von 2+ auf. Beide positiven

Metastasen sind Teil des Falls mit vier Lebermetastasen. Somit konnte nur in einem von 7 Fällen eine PD-L1-Positivität in Fernmetastasen beobachtet werden. Auch ist bei diesem Fall auffällig, dass sowohl Metastasen mit PD-L1 positiven und negativen Tumorzellen vorhanden waren, obwohl der Primärtumor keine PD-L1-Expression in Tumorzellen zeigte.

Der Prozentsatz an PD-L1-positiven Immunzellen in den Fernmetastasen bewegte sich zwischen 0 und 5% (Median 1%). Aber auch hier gab es innerhalb eines Falles Unterschiede bei den verschiedenen Metastasen. Diese schwankten zwischen 0 und 1% bzw. 1% und 5%, und stimmten ebenfalls nicht immer mit den Auswertungen im Primärtumor überein. Zehn der 11 Fernmetastasen zeigten eine PD-L1-Expression in Immunzellen. Auf Grund der geringen Fallzahl wurde auf eine Korrelation mit den klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen verzichtet.

5.2.5 Verteilungsmuster der PD-L1-Expression

Das Verteilungsmuster innerhalb eines Schnittes war nicht durchgehend homogen. Es gab Fälle, bei denen nur ein Teil des Tumors PD-L1 positiv war (Abbildung 11A), als auch Fälle, die nur in spezifischen Bereichen, z.B. Randbereich, eine PD-L1-Expression in Tumorzellen zeigten (Abbildung 11B). Auch bedingt eine starke Färbeintensität nicht automatisch einen großen Prozentsatz an gefärbten Zellen.

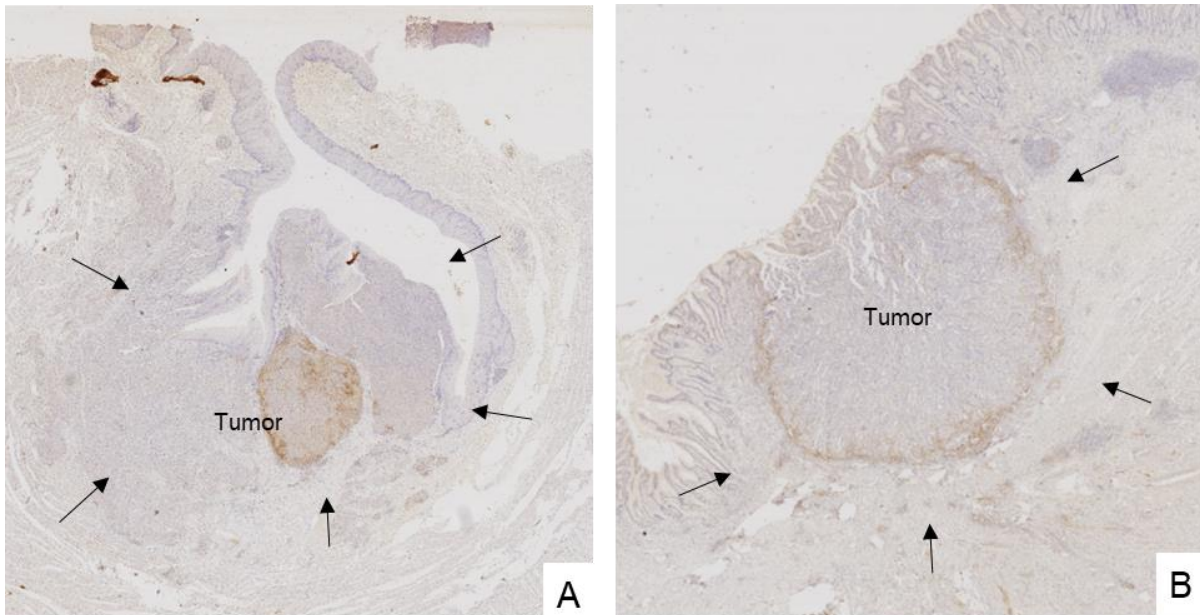


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung Verteilungsmuster PD-L1-positiver Tumorzellen.

A: Nur ein Teil des Tumors zeigte eine PD-L1-Expression. B: Der Randbereich des Tumors zeigte eine PD-L1-Expression. Anti-PD-L1-Antikörper; Hämalaun-Kernfärbung.

Des Weiteren gab es unterschiedliche PD-L1-Expressionen im Primärtumor und den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen. Es gab sowohl PD-L1-positive und -negative Primärtumoren mit PD-L1-Expression in den Lymphknotenmetastasen als auch PD-L1-positive und -negative Primärtumoren ohne eine PD-L1-Expression in den Lymphknotenmetastasen. Vier der untersuchten Fälle zeigten eine komplette Regression im Primärtumor, aber vitale Tumorzellen in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen. Einer dieser vier Fälle exprimierte PD-L1 in den vorhandenen Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen.

5.3 PD-1-Expression Bewertung der Rohwerte

Eine Expression von PD-1 wurde nur in Immunzellen nachgewiesen. Weder Tumor- noch Stromazellen zeigten eine Immunreaktion. Wie oben beschrieben wurden Lymphozytenaggregate und tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) unterschieden.

5.3.1 PD-1-Expression in den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten

Diffus im Tumor verteilte TIL waren in 126 (91,3%) von 138 Fällen PD-1-positiv (Abbildung 12A). Da meist nur einzelne Zellen der TIL angefärbt waren, wurde auf eine genauere Auswertung verzichtet. Die Auswertung erfolgte als PD-1-vorhanden oder nicht vorhanden.

5.3.2 PD-1 in Lymphozytenaggregaten

Lymphozytenaggregate/ intratumorale Lymphfollikel waren in 124 (89,9%) von 138 Fällen vorhanden. In 123 (99,2%) von 124 Fällen waren die intratumoralen Lymphfollikel PD-1-positiv (Abbildung 12B). Nur ein einziger Fall mit Lymphozytenaggregaten wies keine PD-1-Expression auf.

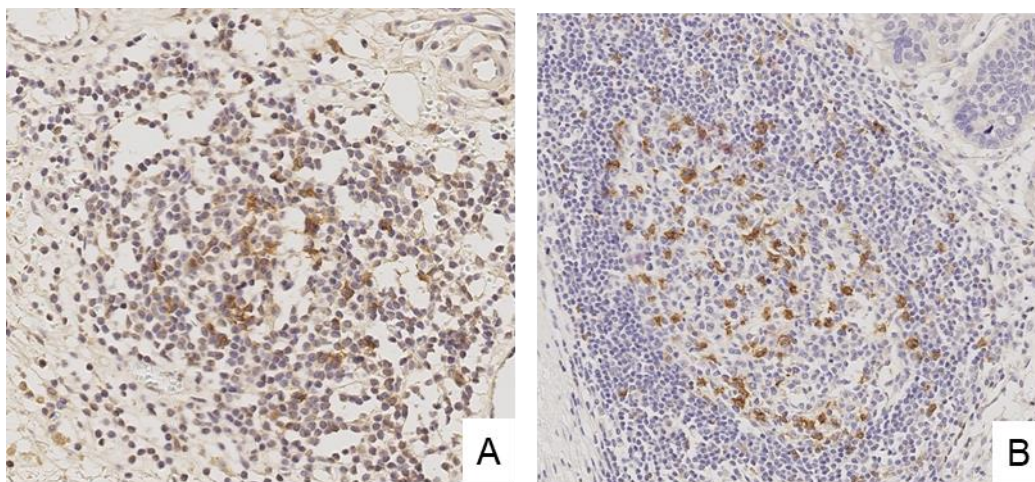


Abbildung 12: Exemplarische Darstellung Verteilungsmuster PD-1-positiver Immunzellen.

A: PD-1-positive Tumor-infiltrierende Lymphozyten. B: PD-1-positiver Lymphfollikel. Anti-PD-1-Antikörper, Hämalaun-Kernfärbung; 400-fache Vergrößerung.

5.3.3 PD-1-Expression in Immunzellen der korrespondierenden Fernmetastasen

Intratumorale Lymphfollikel waren in 7 (89,9%) von 11 Fernmetastasen der 7 Fälle vorhanden, jeweils mit PD-1-positive Zellen. Wie schon bei der Expression PD-L1-positiver Zellen zeigte sich auch hier ein heterogenes Verteilungsmuster PD-1-positiver Zellen. Bei einem Fall gab es sowohl Metastasen mit intratumoralen Lymphfollikeln als auch ohne.

PD-1-positive TIL waren in 10 von 11 Fernmetastasen der 7 Fälle nachweisbar. Die eine PD-1-negative Metastase ist Teil des Falls mit vier Metastasen.

5.4 Epstein-Barr-Virus-Bewertung der Rohwerte

Eine EBER-positive in situ-Hybridisierung zeigten 3 (2,5%) von 122 Fällen in TMA und Großflächenschnitten. Waren Tumorzellen angefärbt, galt dies als Nachweis für das EBV.

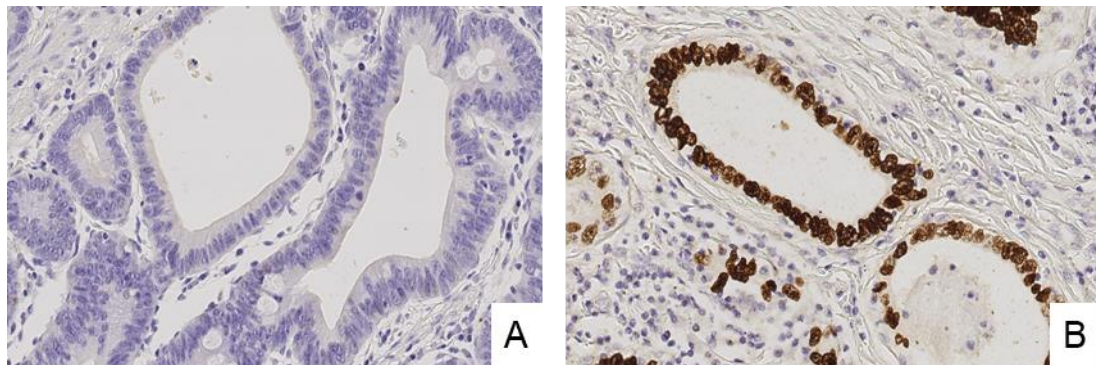


Abbildung 13: Darstellung von Referenzschnitten der EBER in situ-Hybridisierung in Tumorzellen.

A: negativ = kein Nachweis des EBV, B: positiv = EBV vorhanden. 400-fache Originalvergrößerung.

5.5 Mikrosatellitenstatus Bewertung der Rohwerte

Zur Ermittlung des MSI-Status wurden zunächst die Mismatch-Reparaturproteine (MMR) immunhistologisch untersucht. Im Kern angefärbte Krebszellen zeigten keinen Verlust von MMR und wurden als *MMR-proficient* eingestuft. Keine Kernfärbung und somit einen Verlust der Expression von MMR zeigten 9 (7,5%) von 120 bei PMS2, 10 (8,34 %) von 120 bei MLH1, 6 (5,00%) von 120 bei MSH2 und 6 (5,00%) von 120 bei MSH6.

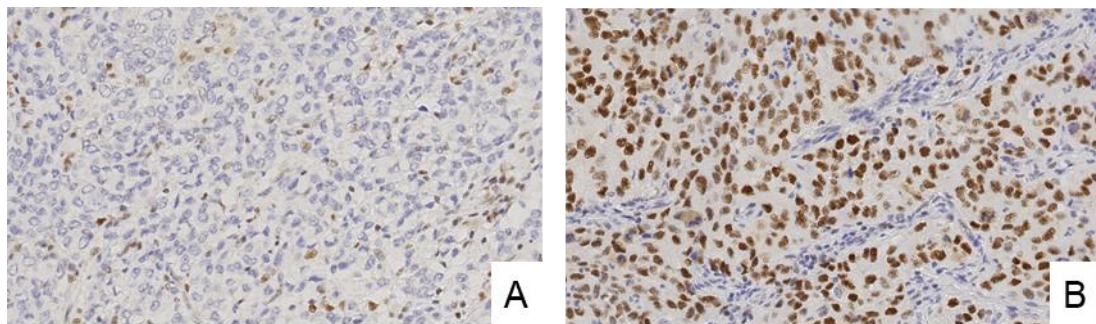


Abbildung 14: Darstellung von Referenzschnitten der DNA-Reparaturproteine.

(PMS2, MLH1, MSH2, MSH6) Immunfärbung in Tumorzellen A: negativ = Verlust von DNA-Reparaturproteinen, B: positiv = MMR-proficient, kein Verlust von DNA-Reparaturproteinen.

MLH1 und PMS2 bzw. MSH2 und MLH6 fallen i.d.R. gemeinsam aus. Ein Fall dieser Kohorte zeigte eine Besonderheit und keine Expression von MLH1, MSH2 und MSH6 aber eine positive PMS2 Färbung. Der Fall wurde molekularpathologisch untersucht. Bei zwei Fällen fanden sich jeweils nur noch bei zwei der vier untersuchten Färbungen Tumorzellen auf den Schnitten. Beide Fälle wurden nach der Färbung der vorhandenen Tumorzellen, als MMR-proficient, gewertet.

Insgesamt zeigten nach der histologischen Auswertung 15 (12,40%) von 121 Fällen einen Verlust von MMR.

Durch die DNA-Extraktion konnten 8 (53,3%) der 15 Fälle als MSI bestätigt werden. In der Kohorte wurden abschließend 8 (6,6%) von 121 Fällen als MSI bewertet.

5.6 HER2 Bewertung der Rohwerte

Bei 123 Fällen konnte der HER2-Status ermittelt werden. Die Färbeintensität reichte beim immunhistologischen Nachweis von Her2/neu von 0 bis 3+ (Median 0). In 31 (25,3%) Fällen erfolgte der Nachweis einer Her2/neu-Expression. Während der Auswertung konnte ein heterogenes Auftreten beobachtet werden, es gab Fälle mit vielen und wenigen angefärbten Tumorzellen. Als positiv wurden Fälle gewertet, die fünf oder mehr zusammenhängende membranständig gefärbte Tumorzellen zeigten.

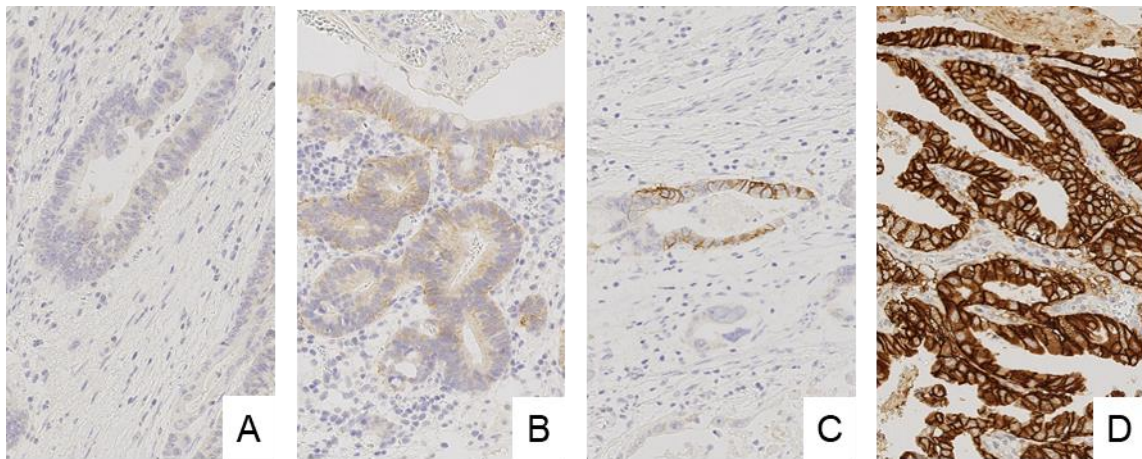


Abbildung 15: Darstellung von Referenzschnitten der Her2/neu-Immunfärbung in Tumorzellen.

A: Intensität 0 (keine Immunfärbung), B: Intensität 1+ (schwache Immunfärbung), C: Intensität 2+ (mäßige Immunfärbung), D: Intensität 3+ (starke Immunfärbung). Membranständige Färbung. Anti-HER2-Antikörper; Hämalaun-Kernfärbung, Originalvergrößerung 400x.

Für eine Bestätigung des HER2-Status wurden 14 (11,4%) mit einer Intensität 2+ und 3+ als Her2/neu auffällig zusammengefasst und einer CISH zugeführt. Ein Her2/neu auffälliger Fall aus dem Jahr 1998 konnte aus technischen Gründen nicht mit der CISH ausgewertet werden.

Mit Hilfe der CISH konnten 8 (61,5%) der 13 Fälle als *HER2*-amplifiziert identifiziert werden. Das Genverhältnis von *HER2* und Centromer 17 schwankte zwischen 1,3 und 4,1 (Median 2,5). In 4 Fällen war eine sehr starke Amplifikation mit Clusterbildung zu sehen, deshalb wurde auf eine Auszählung verzichtet. Alle 5 Fälle mit der histologischen Auswertung Intensität 3+ zeigten auch in der CISH eine *HER2*-Amplifikation. Vier Fälle imponierten durch eine heterogene Amplifikation von *HER2* in der CISH. Es waren insgesamt 6,6% (8 von 122 Fälle) *HER2*-amplifiziert.

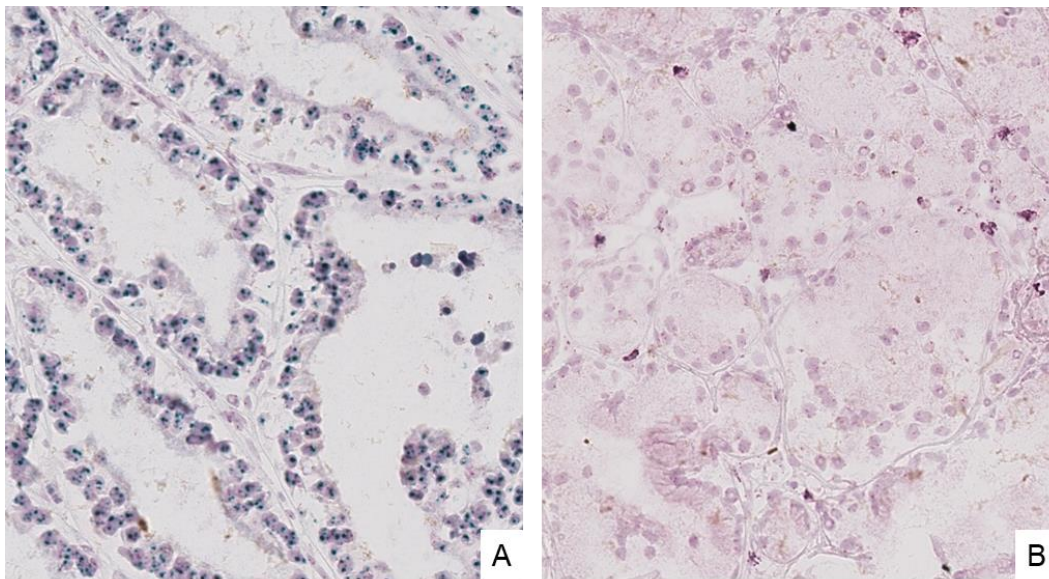


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung der chromogenen in situ-Hybridisierung für *HER2*.

A: Amplifizierte Tumorzellen mit Clusterbildung, B: Tumorzellen mit zwei roten Punkten für den Zentromer 17 Genabschnitt und zwei grünen Punkten für den *HER2*-Genabschnitt.

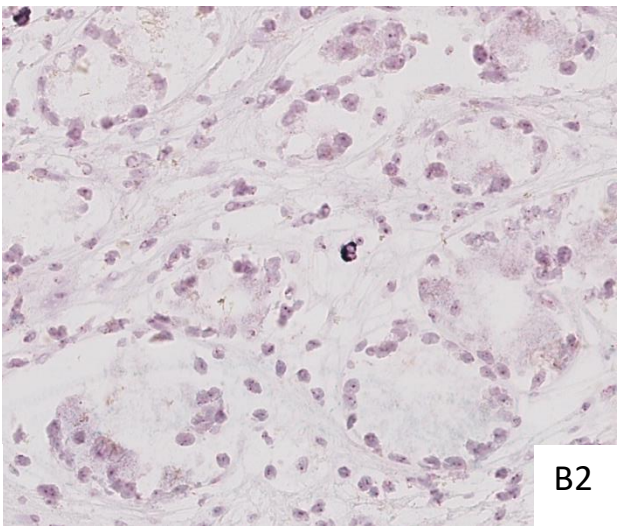
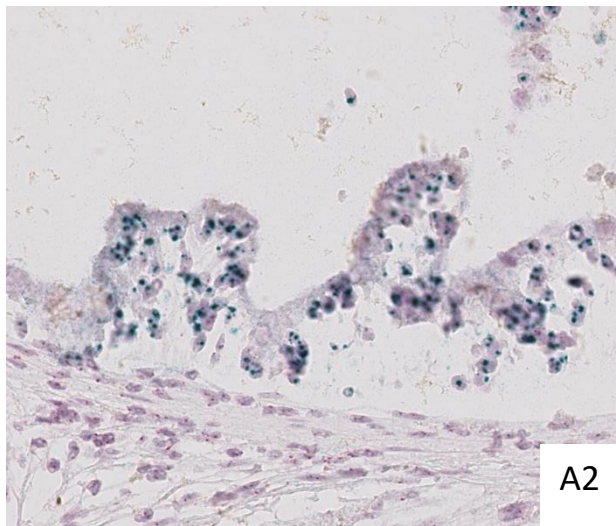
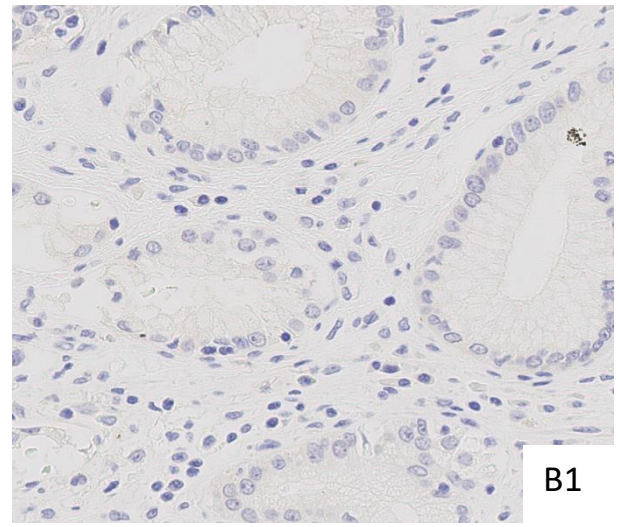
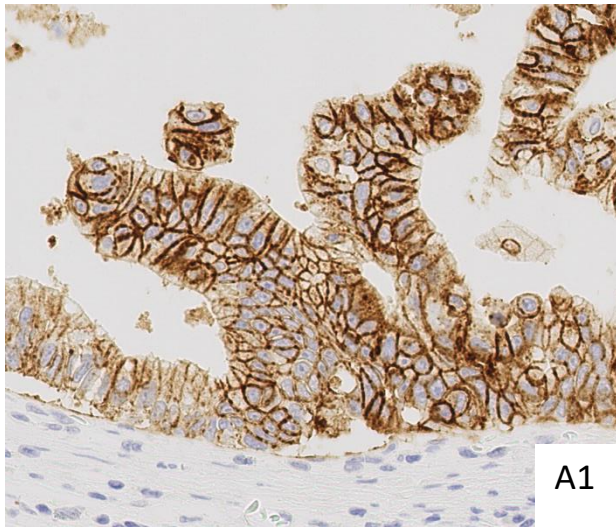
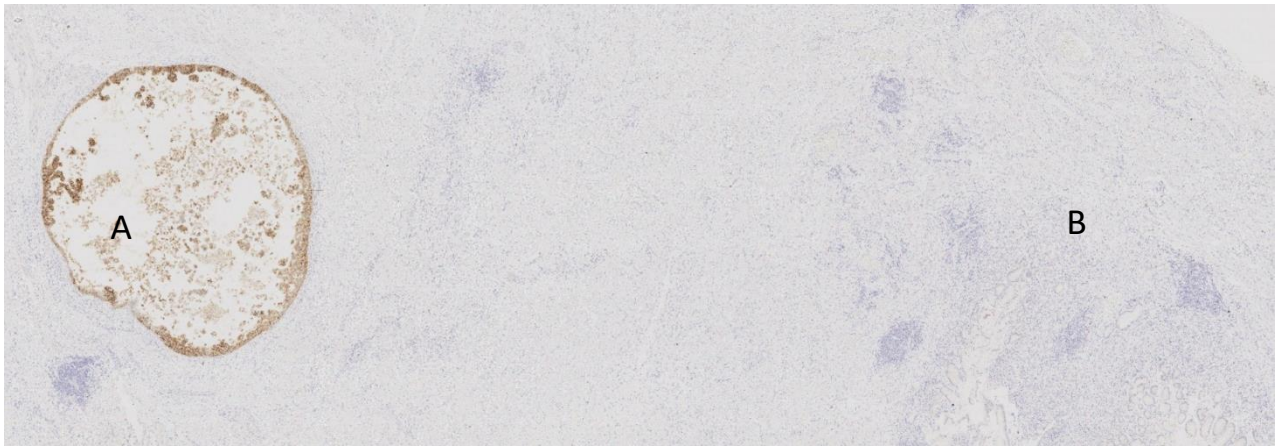


Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der Heterogenität von HER2.

Immunhistologisches Übersichtsbild A: positive Her2/neu-Areale, B: negative Her2/neu-Areale. A1: Immunhistologischer Ausschnitt A mit Intensität 3+. A2: CISH Tumorgebiet A. B1: Immunhistologischer Ausschnitt B mit Intensität 0. B2: CISH Darstellung aus Tumorgebiet B.

5.7 MET Bewertung der Rohwerte

Immunhistologisch erfolgte in 26 (21,0%) von 124 Fällen der Nachweis einer MET-Expression. Die Färbeintensität reichte von 0 bis 3+ (Median 0). Auch hier konnte während der Auswertung beobachtet werden, dass es Fälle mit wenigen und vielen angefärbten Tumorzellen gab.

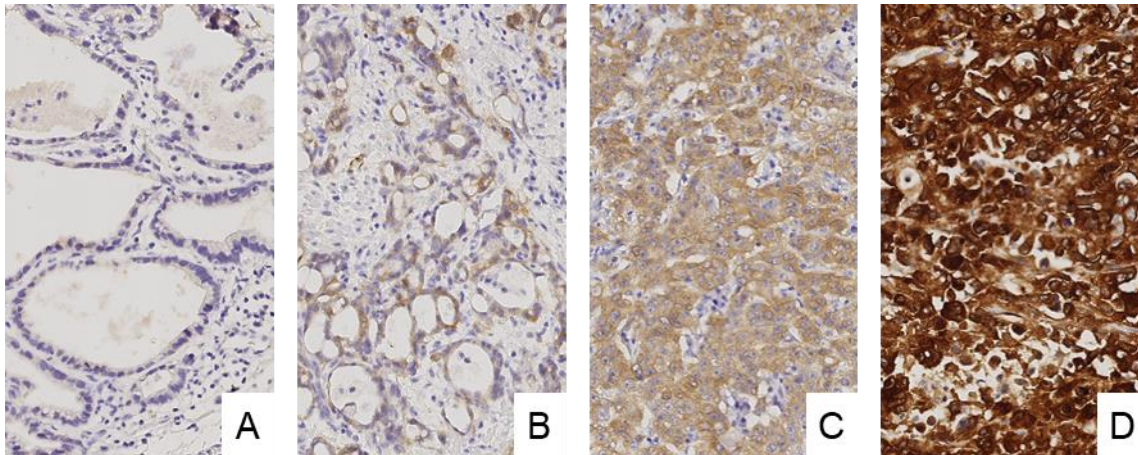


Abbildung 18: Darstellung von Referenzschnitten der MET-Immunfärbung in Tumorzellen.

A: Intensität 0 (keine Immunfärbung), B: Intensität 1+ (schwache Immunfärbung), C: Intensität 2+ (mäßige Immunfärbung), D: Intensität 3+ (starke Immunfärbung). Membranständige Färbung. Anti-MET-Antikörper; Hämalaun-Kernfärbung, Originalvergrößerung 400x.

Wie beim HER2-Status wurden auch bei der Beurteilung des MET-Status alle Fälle mit der Intensität 2+ und 3+ zusammengefasst und einer CISH zugeführt. Diese fiel in 9 (7,3 %) von 124 Fällen positiv aus.

Es konnte bei 6 (66,7%) der 9 Fälle eine *MET*-Amplifikation nachgewiesen werden. Das Genverhältnis von *MET* zu Centromer 7 bewegte sich zwischen 1,4 und 3,4 (Median 2,3). Drei Fälle zeigten eine so starke Amplifikation mit Clusterbildung, dass auf eine Auszählung verzichtet wurde. Alle 3 Fälle mit der histologischen Auswertung Intensität 3+ zeigten in der CISH eine Amplifikation mit Clusterbildung. Im Gegensatz zum HER2-Status konnte bei der Auswertung der CISH keine heterogene *MET*-Amplifikation nachweisen werden. Für die weitere Statistik wurden 6 (4,8%) von 124 Fälle als *MET*-amplifiziert gewertet.

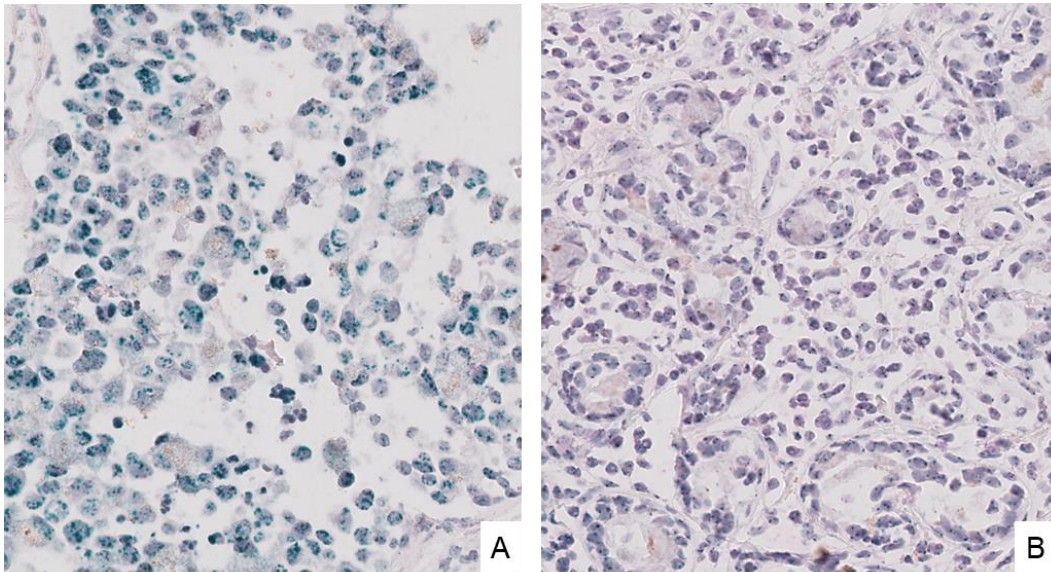


Abbildung 19: Exemplarische Darstellung der chromogenen in situ-Hybridisierung für MET.

A: Amplifizierte Tumorzellen mit und ohne Clusterbildung, B: Tumorzellen mit einem Genverhältnis von Zentromer 7 und MET <2 (1,4).

5.8 Korrelation mit den klinisch-pathologischen Patientencharakteristika

5.8.1 Korrelation der PD-L1-Expression mit den klinisch-pathologischen Patientencharakteristika

Tabelle 4: Korrelation der PD-L1-Expression

	valide		PD-L1 in Tumorzellen (Primärtumor)		PD-L1 in Immunzellen (Primärtumor)		PD-L1 in Tumorzellen (Lymphknotenmetastase)	
	n (%)	n (%)	valide	p-Wert	valide	p-Wert	valide	p-Wert
			negativ	positiv	negativ/wenig	positiv/viele	negativ	positiv
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Geschlecht	140	119		0,099*	139	0,512*	73	0,046*
weiblich	28 (20,0)	14 (63,6)	8 (36,4)		16 (57,1)	39 (42,9)	4 (44,4)	5 (55,6)
männlich	112 (80,0)	78 (80,4)	19 (19,6)		72 (64,9)	12 (35,1)	50 (78,1)	14 (29,9)
Alter	140	115		0,660*	133	0,479*	70	0,596*
< 64 Jahre	70 (50,0)	42 (79,2)	11 (20,8)		42 (65,6)	22 (34,4)	25 (69,4)	11 (30,6)
≥ 64 Jahre	70 (50,0)	46 (74,2)	16 (25,8)		41 (59,4)	28 (40,6)	26 (76,5)	8 (23,5)
Lokalisation	140	119		0,258*	139	0,143*	73	0,999*
proximal	90 (64,3)	56 (73,7)	20 (26,3)		52 (58,4)	37 (42,6)	38 (74,5)	13 (25,5)
distal	50 (53,7)	36 (83,7)	7 (16,3)		36 (72,0)	14 (28,0)	18 (72,7)	6 (27,3)
Lauren Phänotyp	140	119		0,175*	139	0,076*	73	0,416*
intestinal	62 (44,3)	48 (82,8)	10 (17,2)		37 (59,7)	25 (40,3)	26 (81,3)	6 (18,8)
diffus	26 (18,6)	21 (80,8)	5 (19,2)		21 (80,8)	5 (19,2)	7 (63,6)	4 (36,4)
gemischt	26 (18,6)	16 (72,7)	6 (27,3)		13 (50,0)	13 (50,0)	15 (75,0)	5 (25,0)
unklassifiziert	14 (10,0)	6 (54,5)	5 (45,5)		7 (53,8)	6 (46,2)	6 (60,0)	4 (40,0)
komplette Regression	12 (8,6)	N.A.	N.A.		10 (83,3)	2 (16,7)	N.A.	N.A.
yT-Kategorie	140	119		0,980*	139	0,108*	73	0,869*
ypT0	16 (11,4)	N.A.	N.A.		14 (87,5)	2 (12,5)	3 (75,0)	1 (25,0)
ypT1(a/b)	20 (14,3)	13 (76,5)	4 (23,5)		11 (55,0)	9 (45,0)	1 (50,0)	1 (50,0)
ypT2	20 (14,3)	15 (78,9)	4 (21,1)		15 (75,0)	5 (25,0)	8 (72,7)	3 (27,3)
ypT3	74 (52,9)	56 (76,7)	17 (23,3)		42 (57,5)	31 (42,5)	38 (77,6)	11 (22,4)
ypT4(a/b)	10 (7,1)	8 (80,0)	2 (20,0)		6 (60,0)	4 (40,0)	4 (57,1)	3 (42,9)
yN-Kategorie	140	119		0,340*	139	0,726*	73	0,275*
ypN0	51 (36,4)	27 (73,0)	10 (27,0)		35 (68,6)	16 (31,4)	N.A.	N.A.
ypN1	33 (23,6)	21 (70,0)	9 (30,0)		16 (48,5)	17 (51,5)	16 (64,0)	9 (36,0)
ypN2	32 (22,9)	27 (93,1)	2 (6,9)		23 (74,2)	8 (25,8)	21 (80,8)	5 (19,2)
ypN3(a/b)	24 (17,1)	17 (73,9)	6 (26,1)		14 (58,3)	10 (41,7)	17 (77,3)	5 (22,7)
yM-Kategorie	140	119		0,236*	139	0,469*	73	0,056*
ypM0	119 (85,0)	75 (75,0)	25 (25,0)		73 (61,9)	45 (38,1)	43 (69,4)	19 (30,6)
ypM1	21 (15,0)	17 (89,5)	2 (10,5)		15 (71,4)	6 (28,6)	11 (100)	0 (0,0)
UICC-Stadium	138	117		0,175*	137	0,497*	73	0,046*
0/N+	15 (10,9)	N.A.	N.A.		13 (86,7)	2 (13,3)	2 (66,7)	1 (33,3)
I(A/B)	21 (15,2)	14 (70,0)	6 (30,0)		13 (61,9)	8 (38,1)	N.A.	N.A.
II(A/B)	24 (17,4)	17 (73,9)	6 (23,6)		14 (58,3)	10 (41,7)	6 (60,0)	4 (40,0)
III(A/B/C)	57 (41,3)	42 (76,4)	13 (23,6)		32 (57,1)	24 (42,9)	35 (71,4)	14 (28,6)
IV	21 (15,2)	17 (89,5)	2 (10,5)		15 (71,4)	6 (28,6)	11 (100)	0 (0,0)
yL-Kategorie	140	119		0,165*	139	0,033*	73	0,999*
ypL0	98 (70,0)	65 (81,3)	15 (18,8)		68 (69,4)	30 (30,6)	30 (75,0)	10 (25,0)
ypL1	42 (30,0)	27 (69,2)	12 (30,8)		20 (48,8)	21 (51,2)	24 (72,7)	9 (27,3)
yV-Kategorie	140	119		0,999*	139	0,498*	73	0,999*
ypV0	130 (92,9)	84 (77,1)	25 (22,9)		83 (64,3)	46 (35,7)	48 (73,8)	17 (26,2)
ypV1	10 (7,1)	8 (80,0)	2 (20,0)		5 (50,0)	5 (50,0)	6 (75,0)	2 (25,0)
yPn-Kategorie	140	119		0,611*	139	0,523*	73	0,575*
ypPn0	110 (78,6)	68 (75,6)	22 (24,4)		68 (61,8)	42 (38,2)	34 (70,8)	14 (20,2)
ypPn1	30 (21,4)	24 (82,8)	5 (17,2)		20 (69,0)	9 (31,0)	20 (80,0)	5 (20,0)
yR-Status	140	119		0,395*	139	0,609*	73	0,315*
R0	125 (89,3)	78 (75,0)	26 (25,0)		80 (64,5)	44 (35,5)	42 (70,0)	18 (30,0)
R1	13 (9,3)	12 (92,3)	1 (7,7)		7 (53,8)	6 (46,2)	11 (90,9)	1 (9,1)
RX	2 (1,4)	2 (100)	0 (0,0)		1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100)	0 (0,0)
Mikrosatellitenstatus	121	115		0,389*	120	0,058*	71	0,173*
Mikrosatelliten stabil	113 (93,4)	83 (77,6)	24 (22,4)		70 (62,5)	42 (37,5)	51 (75,0)	17 (25,0)
Mikrosatelliten instabil	8 (6,6)	5 (62,5)	3 (37,5)		2 (25,0)	6 (75,0)	1 (33,3)	2 (66,7)
Epstein-Barr-Virus	122	114		0,139*	121	0,595*	72	0,264*
negativ	119 (97,5)	86 (77,5)	25 (22,5)		72 (60,2)	47 (39,8)	53 (74,6)	18 (25,4)
positiv	3 (2,5)	1 (33,3)	2 (66,7)		1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)	1 (100)
MET-Status	124	116		0,138*	123	0,999*	72	0,602*
negativ	118 (84,3)	86 (78,2)	24 (21,8)		70 (59,8)	47 (40,2)	67 (74,6)	17 (25,4)
positiv	6 (4,8)	1 (50,0)	3 (50,0)		4 (66,7)	2 (33,3)	5 (60,0)	2 (40,0)
HER2-Status	122	116		0,679*	121	0,999*	71	0,999*
negativ	114 (93,4)	82 (75,9)	26 (24,1)		67 (59,3)	46 (40,7)	51 (73,9)	18 (26,1)
positiv	8 (6,6)	7 (87,5)	1 (12,5)		5 (62,5)	3 (37,5)	2 (100)	0 (0,0)
vitale Tumorresiduen (dichotomisiert am Median)	139	118		0,078*	138	0,001*	73	0,167*
<55%	70 (50,4)	43 (86,0)	7 (14,0)		54 (77,1)	16 (22,9)	22 (84,6)	4 (15,9)
≥55%	69 (49,6)	49 (72,1)	19 (27,9)		33 (48,5)	35 (51,5)	32 (88,1)	15 (31,3)
vitale Tumorresiduen (Quartiles)	140	118		0,003*	138	<0,001*	73	0,014*
Q1 (<6%)	39 (28,1)	18 (94,7)	1 (5,3)		30 (76,9)	9 (23,1)	11 (84,6)	2 (15,4)
Q2 (6-55%)	31 (22,3)	25 (80,6)	6 (19,4)		24 (77,4)	7 (22,6)	11 (84,6)	2 (15,4)
Q3 (56-85%)	31 (22,3)	27 (87,1)	4 (12,9)		19 (61,3)	12 (38,7)	18 (85,7)	3 (14,3)
Q4 (>85%)	38 (27,3)	22 (59,5)	15 (40,5)		14 (37,8)	23 (62,2)	14 (53,8)	12 (46,2)
Tumorregressionsgrad (Becker)	140	119		0,032*	139	0,001*	73	0,028*
1a	16 (11,4)	N.A.	N.A.		14 (87,5)	2 (12,5)	3 (75,0)	1 (25,0)
1b	29 (20,7)	23 (92,0)	2 (8,0)		21 (72,4)	8 (27,6)	9 (90,0)	1 (10,0)
2	22 (15,7)	18 (81,1)	4 (18,2)		17 (77,3)	5 (22,7)	8 (80,0)	2 (20,0)
3	73 (52,1)	51 (70,8)	21 (29,2)		36 (50,0)	36 (50,0)	34 (69,4)	15 (30,6)

* = Fisher's Exact ° = Kendall's tau statistisch Signifikant nach multiplem Testverfahren nicht statistisch Signifikant nach multiplem Testverfahren

5.8.1.1 Korrelationen der PD-L1-Expression in Tumorzellen des Primärtumors mit den klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen

Die Expression von PD-L1 in Tumorzellen des Primärtumors korrelierte signifikant mit dem Regressionsgrad nach Becker ($p=0,032$) sowie dem prozentualen Anteil an vitalen Tumorresiduen in Quartile unterteilt ($p=0,003$). Diese Ergebnisse verloren jedoch in der multivariaten Analyse (nach Simes-Korrektur für multiple Testverfahren) an Signifikanz. Dennoch wiesen Tumoren mit einem schlechten Therapieansprechen (Regressionsgrad 3 nach Becker) sowie Tumoren mit einem hohen prozentualen Anteil an vitalen Tumorresiduen eine signifikant höhere Expression von PD-L1 in Tumorzellen auf. Auffällig ist, dass die PD-L1-Expression nicht linear mit der Anzahl an vitalen Tumorzellen zunahm, sondern besonders bei viel Resttumorgewebe nach einer neoadjuvanten Therapie vorhanden war (Abbildung 20).

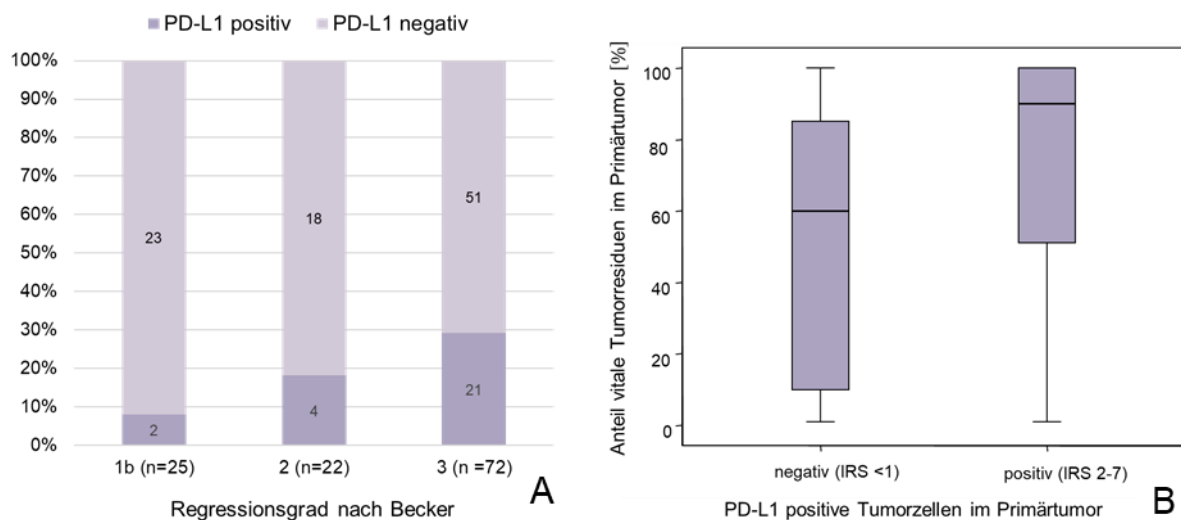


Abbildung 20: Grafische Darstellung des PD-L1-Verteilungsmusters in Abhängigkeit vom Becker-Regressionsgrad und dem Anteil an vitalen Tumorzellen.

Korrelation PD-L1-positiver Tumorzellen im Primärtumor mit A: dem Becker-Regressionsgrad $p=0,032$, B: Boxplot: Korrelation PD-L1-positiver Tumorzellen im Primärtumor mit dem Anteil vitaler Tumorzellen $p=0,001$. Die Ober- und Untergrenze der Box-Plots repräsentieren die 25. und 75. Perzentile. Die Linie in der Mitte markiert den Median.

Eine signifikante Korrelation von PDL1-Expression der Tumorzellen und den klinisch-pathologischen Charakteristika Alter, Geschlecht, Lokalisation, Lauren Phänotyp, TNM-Klassifikation und UICC-Stadium bestand nicht. Dennoch fand sich bei an Magenkarzinom erkrankten Frauen die Tendenz mit einer höheren Wahrscheinlichkeit PD-L1 in den Tumorzellen zu exprimieren (19,6% Männer vs. 36,4% Frauen). Eine weitere nicht signifikante Auffälligkeit fand sich bei der Tumorlokalisation. Proximale Tumoren zeigten häufiger als distale Tumoren (26,3% vs. 16,3%) eine PD-L1-Expression. Bei Tumoren vom unklassifizierten Typ nach Lauren wurde eine verstärkte PD-L1-Expression nachgewiesen.

5.8.1.2 Korrelationen der PD-L1-Expression in Tumorzellen mit der Expression in den Lymphknotenmetastasen

Eine Korrelation der PD-L1-positiven Tumorzellen in den Lymphknotenmetastasen mit dem Anteil an vitalen Tumorresiduen im Primärtumor zeigte wie oben beschrieben im Primärtumor einen signifikanten Zusammenhang (Boxplot $p=0,005$; Quartile $p=0,014$). Es ist zu beachten, dass der prozentuale Anteil an vitalen Tumorzellen in den Lymphknotenmetastasen nicht erhoben wurde.

Eine weitere Korrelation der PD-L1-Expression ergab sich mit dem UICC-Stadium (Tabelle 4). Wie bei den Tumorzellen im Primärtumor zeigten weiterhin auch in den Lymphknotenmetastasen mehr Frauen eine PD-L1-Expression (55,6%) als Männer (29,9%; $p=0,046$). Die altersabhängige PD-L1-Expression der Tumorzellen im Primarius und in den Lymphknotenmetastasen war unterschiedlich, erreichte jedoch keine Signifikanz (Primärtumor: < 64 Jahre 20,8% vs. ≥ 64 Jahre 25,8%; Lymphknotenmetastasen: < 64 Jahre 30,6% vs. ≥ 64 Jahre 23,5%). Aber auch hier verlieren die Ergebnisse nach dem Simes-Korrektur für multiple Testverfahren die Signifikanz.

5.8.1.3 Korrelationen der PD-L1-Expression in Immunzellen des Primärtumors mit den klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen

Der Nachweis von PD-L1 in tumorinfiltrierenden Entzündungszellen korrelierte mit dem Regressionsgrad nach Becker ($p=0,001$) sowie dem prozentualen Anteil an vitalen Tumorresiduen in Quartile ($p < 0,001$). Wie bei den Tumorzellen zeigte sich auch hier, dass Tumoren mit einem schlechten Therapieansprechen (Regressionsgrad 3 nach Becker) sowie Tumoren mit einem hohen prozentualen Anteil an vitalen Tumorresiduen eine signifikant höhere Expression von PD-L1 in Immunzellen aufwiesen. Wie schon bei den Tumorzellen zeigten auch die Immunzellen keinen linearen Anstieg der Wahrscheinlichkeit einer PD-L1-Expression, sondern Tumoren mit 90-100% vitaler Tumorresiduen zeigten besonders häufig (62,2%) eine PD-L1-Expression in Entzündungszellen.

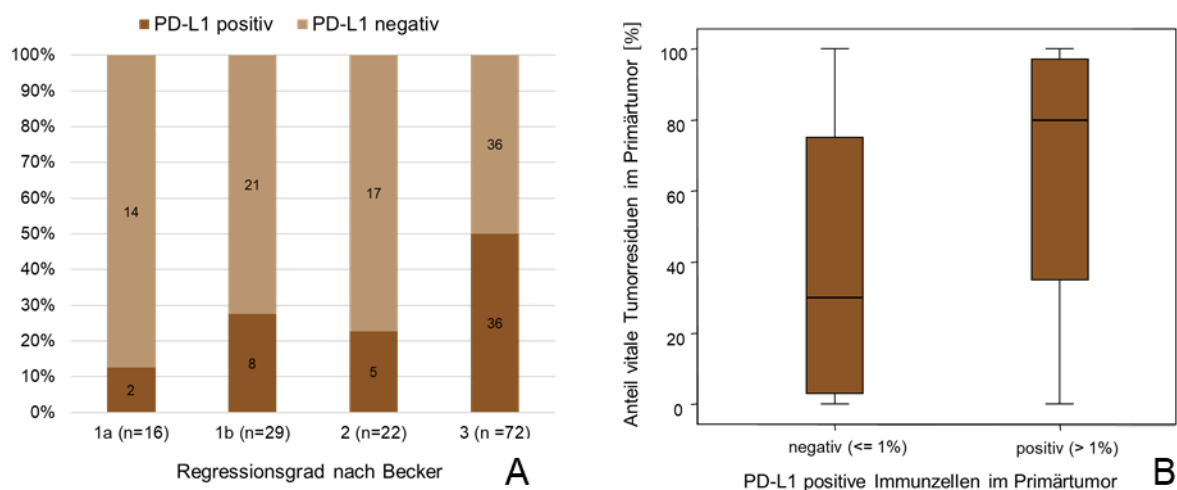


Abbildung 21: Grafische Darstellung des PD-L1-Verteilungsmusters in Abhängigkeit vom Becker-Regressionsgrad und dem Anteil an vitalen Immunzellen.

Korrelation PD-L1-positiver Immunzellen im Primärtumor mit A: dem Becker-Regressionsgrad ($p=0,001$), B: Boxplot: Korrelation PD-L1 positiver Immunzellen im Primärtumor mit dem Anteil an vitalen Tumorresiduen ($p < 0,001$). Die Ober- und Untergrenze der Box-Plots repräsentieren die 25. und 75. Perzentile. Die Linie in der Mitte markiert den Median.

Tumoren mit gesicherter Lymphgefäßinvasion zeigten häufiger eine PD-L1-Expression in Immunzellen ($p=0,033$). Der diffuse Phänotyp zeigte mit einer PD-L1-Expression von 19,2% den geringsten Wert. MSI-Tumoren zeigten häufig eine PD-L1-Expression (75%), wohingegen MSS-Tumoren nur zu 37,5% eine PD-L1-Expression aufwiesen. Kein anderes klinisch-pathologisches Patientenmerkmal korrelierte mit der Expression von PD-L1 in TIL.

5.8.2 Korrelation der PD-1-Expression mit den klinisch-pathologischen Charakteristika

Tabelle 5: Korrelation der PD-1-Expression

	valide		PD-1 in tumorinfiltrierenden Lymphozythen		Lymphozytenaggregate vorhanden		PD-1 in Lymphozytenaggregaten			
	n (%)	n (%)	p-Wert		p-Wert		p-Wert			
			negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv		
Geschlecht	140	138		0,999*	138		0,303*	138		0,302*
weiblich	28 (20,0)	2 (7,4)	25 (92,6)		1 (3,7)	26 (96,3)		1 (3,7)	26 (96,3)	
männlich	112 (80,0)	10 (9,0)	101 (91,0)		13 (11,7)	98 (88,3)		14 (12,6)	97 (87,4)	
Alter	140	132		0,071*	132		0,780*	132		0,999*
< 64 Jahre	70 (50,0)	9 (14,1)	55 (85,9)		6 (9,4)	58 (90,6)		7 (10,9)	57 (89,1)	
≥ 64 Jahre	70 (50,0)	3 (4,4)	65 (95,6)		8 (11,8)	60 (88,2)		8 (11,8)	60 (88,2)	
Lokalisation	140	138		0,999*	138		0,138*	138		0,085*
proximal	90 (64,3)	8 (9,0)	81 (91,0)		12 (13,5)	77 (86,5)		13 (14,6)	76 (85,4)	
distal	50 (53,7)	4 (8,2)	45 (91,8)		2 (4,1)	47 (95,9)		2 (4,1)	47 (95,9)	
Lauren Phänotyp	140	138		0,251*	138		0,828*	138		0,731*
intestinal	62 (44,3)	6 (9,7)	56 (90,3)		8 (12,9)	54 (87,1)		8 (12,9)	54 (87,1)	
diffus	26 (18,6)	0 (0,0)	25 (100)		3 (12,0)	22 (88,0)		3 (12,0)	22 (88,0)	
gemischt	26 (18,6)	2 (7,7)	24 (92,3)		1 (3,8)	25 (96,2)		1 (3,8)	25 (96,2)	
unklassifiziert	14 (10,0)	2 (15,4)	11 (84,6)		1 (7,7)	12 (92,3)		2 (15,4)	11 (84,6)	
komplette Regression	12 (8,6)	2 (16,7)	10 (83,3)		1 (8,3)	11 (91,7)		1 (8,3)	11 (91,7)	
yT-Kategorie	140	138		0,024*	138		0,837*	138		0,712*
ypT0	16 (11,4)	3 (18,8)	13 (81,3)		1 (6,3)	15 (93,8)		1 (6,3)	15 (93,8)	
ypT1(a/b)	20 (14,3)	3 (15,8)	16 (84,2)		3 (15,8)	16 (84,2)		3 (15,8)	16 (84,2)	
ypT2	20 (14,3)	2 (10,0)	18 (90,0)		1 (5,0)	19 (95,0)		1 (5,0)	19 (95,0)	
ypT3	74 (52,9)	4 (5,5)	69 (94,5)		8 (11,0)	65 (89,0)		9 (12,3)	64 (87,7)	
ypT4(a/b)	10 (7,1)	0 (0,0)	10 (100)		1 (10,0)	9 (90,0)		1 (10,0)	9 (90,0)	
yN-Kategorie	140	138		0,430*	138		0,046*	138		0,054*
ypN0	51 (36,4)	5 (9,8)	46 (90,2)		3 (5,9)	48 (94,1)		3 (5,9)	48 (94,1)	
ypN1	33 (23,6)	3 (9,1)	30 (90,9)		2 (6,1)	31 (93,9)		3 (9,1)	30 (90,9)	
ypN2	32 (22,9)	4 (13,3)	26 (86,7)		4 (13,3)	26 (86,7)		4 (13,3)	26 (86,7)	
ypN3(a/b)	24 (17,1)	0 (0,0)	24 (100)		5 (20,8)	19 (79,2)		5 (20,8)	19 (79,2)	
yM-Kategorie	140	138		0,213*	138		0,040*	138		0,054*
ypM0	119 (85,0)	12 (10,3)	105 (89,7)		9 (7,7)	108 (92,3)		10 (8,5)	107 (91,5)	
ypM1	21 (15,0)	0 (0,0)	21 (100)		5 (23,8)	16 (76,2)		5 (23,8)	16 (76,2)	
UICC-Stadium	138	136		0,028*	136		0,059*	136		0,049*
0/N+	15 (10,9)	3 (20,0)	12 (80,0)		1 (6,7)	14 (93,3)		1 (6,7)	14 (93,3)	
I(A/B)	21 (15,2)	3 (14,3)	18 (85,7)		2 (9,5)	19 (90,5)		2 (9,5)	19 (90,5)	
II(A/B)	24 (17,4)	2 (8,7)	21 (91,3)		0 (0,0)	23 (100)		0 (0,0)	23 (100)	
III(A/B/C)	57 (41,3)	4 (7,1)	52 (92,9)		6 (10,7)	50 (89,3)		7 (12,5)	49 (87,5)	
IV	21 (15,2)	0 (0,0)	21 (100)		5 (23,8)	16 (76,2)		5 (23,8)	16 (76,2)	
yL-Kategorie	140	138		0,509*	138		0,999*	138		0,999*
ypL0	98 (70,0)	10 (10,3)	87 (89,7)		10 (10,3)	87 (89,7)		11 (11,3)	86 (88,7)	
ypL1	42 (30,0)	2 (4,9)	39 (95,1)		4 (9,8)	37 (90,2)		4 (9,8)	37 (90,2)	
yV-Kategorie	140	138		0,600*	138		0,065*	138		0,079*
ypV0	130 (92,9)	12 (9,4)	116 (90,6)		11 (8,6)	117 (91,4)		12 (9,4)	116 (90,6)	
ypV1	10 (7,1)	0 (0,0)	10 (100)		3 (30,0)	7 (70,0)		3 (30,0)	7 (70,0)	
yPn-Kategorie	140	138		0,716*	138		0,075*	138		0,017*
ypPn0	110 (78,6)	9 (8,3)	100 (91,7)		8 (7,3)	101 (92,7)		8 (7,3)	101 (92,7)	
ypPn1	30 (21,4)	3 (10,3)	26 (89,7)		6 (20,7)	23 (79,3)		7 (14,1)	22 (75,9)	
yR-Status	140	138		0,435*	138		0,301*	138		0,331*
R0	125 (89,3)	10 (8,1)	113 (91,9)		11 (8,9)	112 (91,1)		12 (9,8)	111 (90,2)	
R1	13 (9,3)	2 (15,4)	11 (84,6)		3 (23,1)	10 (76,9)		3 (23,1)	10 (76,9)	
RX	2 (1,4)	0 (0,0)	2 (100)		0 (0,0)	2 (100)		0 (0,0)	2 (100)	
Mikrosatellitenstatus	121	119		0,999*	119		0,185*	119		0,211*
Mikrosatelliten stabil	113 (93,4)	10 (9,0)	101 (91,0)		10 (9,0)	101 (91,0)		11 (9,9)	100 (90,1)	
Mikrosatelliten instabil	8 (6,6)	2 (25,0)	6 (75,0)		2 (25,0)	6 (75,0)		2 (25,0)	6 (75,0)	
Epstein-Barr-Virus	122	120		0,999*	120		0,273*	120		0,293*
negativ	119 (97,5)	9 (7,7)	108 (92,3)		11 (9,4)	106 (90,6)		12 (10,3)	105 (89,7)	
positiv	3 (2,5)	0 (0,0)	3 (100)		1 (33,3)	2 (66,7)		1 (33,3)	2 (66,7)	
MET-Status	124	122		0,999*	122		0,123*	122		0,141*
negativ	118 (84,3)	10 (8,6)	106 (91,4)		11 (9,4)	105 (90,5)		12 (10,3)	104 (89,7)	
positiv	6 (4,8)	0 (0,0)	6 (100)		2 (33,3)	4 (66,7)		2 (33,3)	4 (66,7)	
HER2-Status	122	120		0,475*	120		0,999*	120		0,597*
negativ	114 (93,4)	8 (7,1)	104 (92,9)		12 (10,7)	100 (89,3)		13 (11,6)	99 (88,4)	
positiv	8 (6,6)	1 (12,5)	7 (87,5)		0 (0,0)	8 (100)		0 (0,0)	8 (100)	
vitale Tumorresiduen (dichotomisiert am Median)	139	137		0,765*	137		0,267*	137		0,177*
<55%	70 (50,4)	7 (10,0)	63 (90,0)		5 (7,1)	65 (92,9)		5 (7,1)	65 (92,9)	
≥55%	69 (49,6)	5 (7,5)	62 (92,5)		9 (13,4)	58 (86,6)		10 (14,9)	57 (85,1)	
vitale Tumorresiduen (Quartiles)	140	137		0,326*	137		0,810*	137		0,726*
Q1 (<6%)	39 (28,1)	5 (12,8)	34 (87,2)		5 (12,8)	34 (87,2)		5 (12,8)	34 (87,2)	
Q2 (6-55%)	31 (22,3)	2 (6,5)	29 (93,5)		0 (0,0)	31 (100)		0 (0,0)	31 (100)	
Q3 (56-85%)	31 (22,3)	3 (9,7)	28 (90,3)		5 (16,1)	26 (83,9)		6 (19,4)	25 (80,6)	
Q4 (>85%)	38 (27,3)	2 (5,6)	34 (94,4)		4 (11,1)	32 (88,9)		4 (11,1)	32 (88,9)	
Tumorregressionsgrad (Becker)	140	138		0,234*	138		0,529*	138		0,910*
1a	16 (11,4)	3 (18,8)	13 (81,2)		1 (6,2)	15 (93,8)		1 (6,3)	15 (93,8)	
1b	29 (20,7)	3 (10,3)	26 (89,7)		4 (13,8)	25 (86,2)		4 (13,8)	25 (86,2)	
2	22 (15,7)	1 (4,5)	21 (95,5)		0 (0,0)	22 (100)		0 (0,0)	22 (100)	
3	73 (52,1)	5 (7,0)	66 (93,0)		9 (12,7)	62 (87,3)		10 (14,1)	61 (85,9)	

* = Fisher's Exact ° = Kendall's tau statistisch Signifikant nach multiplem Testverfahren nicht statistisch Signifikant nach multiplem Testverfahren

5.8.2.1 Korrelationen der PD-1-Expression in Immunzellen des Primärtumors mit den klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen

Die Wahrscheinlichkeit PD-1-positiver TIL erhöhte sich mit der T-Kategorie ($p=0,024$) und dem UICC-Stadium ($p=0,028$). Je höher die T-Kategorie bzw. das UICC-Stadium war, je fortgeschrittener der Tumor war, desto häufiger fanden sich PD-1-positive TIL im Tumor und Narbengewebe. Hier sollte die geringe Anzahl PD-1-negativer TIL berücksichtigt werden, außerdem verloren diese Korrelationen nach Simes-Korrektur für multiple Testverfahren die Signifikanz. Auch mit den anderen klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen und dem Überleben ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge.

5.8.2.2 Korrelationen der PD-1-Expression in Lymphozytenaggregaten mit den klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen

Die Korrelation der Expression von PD-1 in Lymphozytenaggregaten mit den klinisch-pathologischen Patientenmerkmalen ergab nach Simes-Korrektur für multiple Testverfahren keine signifikanten Zusammenhänge.

5.8.3 Korrelationen der Expressionen von PD-L1 miteinander und mit der Expression von PD-1

5.8.3.1 Korrelation der PD-L1-Expression in Tumorzellen und Immunzellen

Die Expression von PD-L1 in Tumorzellen des Primärtumors korrelierte signifikant mit der Expression in Immunzellen des Primärtumors ($p < 0.001$). In 72,3% der Fälle zeigten Tumor- und Immunzellen das gleiche Expressionsmuster (positiv oder negativ). In 17,6% der Fälle lag eine positive PD-L1-Expression in den Tumorzellen und in den Immunzellen vor.

Auch die Expression von PD-L1 in Tumorzellen des Primärtumors korrelierte signifikant mit der Expression in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen ($p < 0.001$). Je häufiger Tumorzellen im Primärtumor PD-L1 positiv waren, desto häufiger waren auch Tumorzellen in den Lymphknotenmetastasen positiv. Die PD-L1-

Expression in Tumorzellen stimmte in 84,9% der Fälle überein (68,2% negativ und 16,7% positiv).

Das Vorhandensein PD-L1-positiver Tumorzellen in den Lymphknotenmetastasen korrelierte nicht mit dem Vorhandensein PD-L1-positiver Immunzellen im Primärtumor ($p=0,101$).

5.8.3.2 Korrelationen der Expression von PD-L1 mit der Expression von PD-1

Der Nachweis von PD-L1 korrelierte nicht mit dem Nachweis von PD-1 in der neoadjuvant behandelten Kohorte (Tabelle 6).

Tabelle 6: Korrelation der Expression von PD-L1 mit der Expression von PD-1

		PD-1		
		Lymphozyten Aggregate vorhanden	Lymphozyten Aggregate	TIL
PD- L1	Tumorzellen Primärtumor	$p=0,304$	$p=0,292$	$p=0,464$
	Immunzellen Primärtumor	$p>0,999$	$p=0,788$	$p=0,210$
	Tumorzellen Lymphknotenmetastasen	$p>0,999$	$p=0,719$	$p=0,356$

5.8.4 Korrelation des Epstein-Barr-Virus mit den klinisch-pathologischen Charakteristika

Auf Grund der geringen Anzahl EBV-positiver Tumoren, 3 (2,5%) von 122 Fällen, wurde auf eine Korrelation mit den klinisch-pathologischen Charakteristika verzichtet. Der Anteil an vitalen Tumorzellen zeigte 5%, 30% und 100% bei EBV-positiven Tumoren. Keiner der drei Fälle zeigte Lymphknoten- oder Fernmetastasen, alle EBV-positiven Fälle waren Männer. Eine PD-L1-Expression war in allen EBV-positiven Fällen, entweder in Tumorzellen (zwei Fälle) und/oder in Immunzellen (zwei Fälle) vorhanden. PD-1-positive TIL zeigten alle drei Fälle, wohingegen Lymphozytenaggregate nur in zwei vorhanden und PD-1-positiv waren. Keiner der drei Fälle war MSI noch *MET*- oder *HER2*-amplifiziert.

5.8.5 Korrelation des Mikrosatellitenstatus mit den klinisch-pathologischen Charakteristika

Tabelle 7: Korrelation des Mikrosatellitenstatus

	valide		Mikrosatellitenstatus		p-Wert
	n (%)		valide		
			Mikrosatelliten stabil n (%)	Mikrosatelliten instabil n (%)	
Geschlecht	140		121		0,005*
weiblich	28 (20,0)		17 (77,3)		3 (22,7)
männlich	112 (80,0)		96 (97,0)		5 (3,0)
Alter	140		116		0,069*
< 64 Jahre	70 (50,0)		52 (98,1)		1 (1,9)
≥ 64 Jahre	70 (50,0)		56 (88,9)		7 (11,1)
Lokalisation	140		121		0,124*
proximal	90 (64,3)		76 (96,2)		3 (3,8)
distal	50 (53,7)		37 (88,1)		5 (11,9)
Laurén Phänotyp	140		121		0,521*
intestinal	62 (44,3)		56 (94,9)		3 (5,1)
diffus	26 (18,6)		22 (91,7)		2 (8,3)
gemischt	26 (18,6)		22 (88,0)		3 (12,0)
unklassifiziert	14 (10,0)		13 (100)		0 (0,0)
komplette Regression	12 (8,6)		N.A.		N.A.
yT-Kategorie	140		121		0,624°
ypT0	16 (11,4)		2 (100)		0 (0,0)
ypT1(a/b)	20 (14,3)		15 (93,8)		1 (6,3)
ypT2	20 (14,3)		18 (90,0)		2 (10,0)
ypT3	74 (52,9)		68 (93,2)		5 (6,8)
ypT4(a/b)	10 (7,1)		10 (100)		0 (0,0)
yN-Kategorie	140		121		0,353°
ypN0	51 (36,4)		31 (88,6)		4 (11,4)
ypN1	33 (23,6)		30 (96,8)		1 (3,2)
ypN2	32 (22,9)		29 (93,5)		2 (6,5)
ypN3(a/b)	24 (17,1)		23 (95,8)		1 (4,2)
yM-Kategorie	140		121		0,999*
ypM0	119 (85,0)		95 (93,1)		7 (6,9)
ypM1	21 (15,0)		18 (94,7)		1 (5,3)
UICC-Stadium	138		119		0,335°
0/N+	15 (10,9)		2 (100)		0 (0,0)
I(A/B)	21 (15,2)		16 (94,1)		1 (5,9)
II(A/B)	24 (17,4)		20 (83,3)		4 (16,7)
III(A/B/C)	57 (41,3)		55 (96,5)		2 (3,5)
IV	21 (15,2)		18 (94,7)		1 (5,3)
yL-Kategorie	140		121		0,575*
ypL0	98 (70,0)		76 (95,0)		4 (5,0)
ypL1	42 (30,0)		37 (90,2)		4 (9,8)
yV-Kategorie	140		121		0,623°
ypV0	130 (92,9)		103 (92,8)		8 (7,2)
ypV1	10 (7,1)		10 (100)		0 (0,0)
yPn-Kategorie	140		121		0,999*
ypPn0	110 (78,6)		85 (93,4)		6 (6,6)
ypPn1	30 (21,4)		28 (93,3)		2 (6,7)
yR-Status	140		121		0,648*
R0	125 (89,3)		98 (92,5)		8 (7,5)
R1	13 (9,3)		13 (100)		0 (0,0)
RX	2 (1,4)		2 (100)		0 (0,0)
Epstein-Barr-Virus	122		119		0,999*
negativ	119 (97,5)		102 (93,1)		8 (6,9)
positiv	3 (2,5)		3 (100)		0 (0,0)

	valide		Mikrosatellitenstatus		p-Wert
	n (%)		valide		
			Mikrosatelliten stabil	Mikrosatelliten instabil	
	n (%)	n (%)	n (%)		
MET-Status	124		121		0,999*
negativ	118 (84,3)		107 (93,0)		8 (7,0)
positiv	6 (4,8)		6 (100)		0 (0,0)
HER2-Status	122		120		0,999*
negativ	114 (93,4)		104 (93,1)		8 (6,9)
positiv	8 (6,6)		8 (100)		0 (0,0)
vitale Tumorresiduen (dichotomisiert am Median)	139		115		0,076*
<55%	70 (50,4)		46 (97,9)		1 (2,1)
≥55%	69 (49,6)		61 (89,7)		7 (10,3)
vitale Tumorresiduen (Quartiles)	139		115		0,072°
Q1 (<6%)	39 (28,1)		11 (100)		0 (0,0)
Q2 (6-55%)	31 (22,3)		35 (97,2)		1 (2,8)
Q3 (56-85%)	31 (22,3)		28 (90,3)		3 (9,7)
Q4 (>85%)	38 (27,3)		33 (89,2)		4 (10,8)
Tumorregressionsgrad (Becker)	140		121		0,147°
1a	16 (11,4)		2 (100)		0 (0,0)
1b	29 (20,7)		27 (96,4)		1 (3,6)
2	22 (15,7)		20 (100)		0 (0,0)
3	73 (52,1)		64 (90,1)		7 (9,9)
PD-L1 in Tumorzellen (Primärtumor)	119		115		0,389*
negativ	92 (77,3)		83 (94,3)		5 (5,7)
positiv	27 (22,7)		24 (88,9)		3 (11,1)
PD-L1 in Immunzellen (Primärtumor)	138		120		0,058*
negativ	87 (63,0)		70 (97,2)		2 (2,8)
positiv	51 (37,0)		42 (87,5)		6 (12,5)
PD-L1 in Tumorzellen (Lymphknotenmetastasen)	73		71		0,173*
negativ	54 (74,0)		51 (98,1)		1 (1,9)
positiv	19 (26,0)		17 (89,5)		2 (10,5)
PD-1 in tumorinfiltrierenden Lymphozythen	138		119		0,999*
negativ	12 (8,7)		10 (100)		0 (0,0)
positiv	126 (91,3)		101 (92,7)		8 (7,3)
Lymphozytenaggregate vorhanden	138		119		0,185*
negativ	14 (10,1)		10 (83,3)		2 (16,7)
positiv	124 (89,9)		101 (94,4)		6 (5,6)
PD-1 in Lymphozytenaggregaten	138		119		0,211*
negativ	15 (10,9)		11 (84,6)		2 (15,4)
positiv	123 (89,1)		100 (94,3)		6 (5,7)

statistisch Signifikant nach multiplem Testverfahren

nicht statistisch Signifikant nach multiplem Testverfahren

* = Fisher's Exact

° = Kendall's tau

Bei der Korrelation des MSI-Status mit den klinisch-pathologischen Charakteristika fiel eine Korrelation mit dem Patientengeschlecht auf: Tumoren von Frauen waren häufiger MSI ($p=0,005$). Aufgrund der kleinen Fallzahl verlor diese Korrelation nach der Simes-Korrektur für multiple Testverfahren die Signifikanz.

Sieben der 8 MSI-Fälle waren älter als der Altersmedian (≥ 64 Jahre). Die MSI-Tumoren zeigten in 7 von 8 Fällen einen Becker-Regressionsgrad 3. Dennoch konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie nachgewiesen werden (Anteil an vitalen Tumorzellen Quartile $p=0,072$; Becker-Regressionsgrad $p=0,147$). Keiner der MSI-Fälle war EBV-positiv, HER2- oder MET-positiv (s.u.).

Mit der PD-L1-Expression bestand keine signifikante Korrelation. Dennoch zeigten MSI-Tumoren häufiger eine PD-L1-Expression als MSS Tumoren (Abbildung 22). Auch die PD-1-Expression war häufiger in MSI-Tumoren als in MSS zu finden, ebenfalls nicht signifikant.

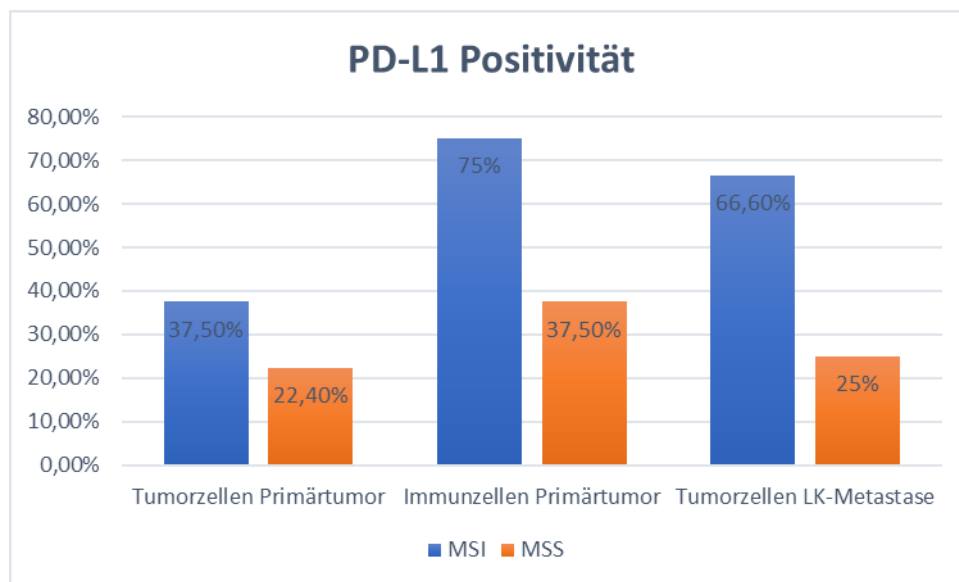


Abbildung 22: Graphische Darstellung der PD-L1-Expression MSI- und MSS-Tumoren im Vergleich.

Sowohl bei Tumor- als auch bei Immunzellen zeigten MSI-Tumoren eine höhere Wahrscheinlichkeit einer PD-L1-Expression.

5.8.6 Korrelation des HER2- und MET-Status mit den klinisch-pathologischen Charakteristika

Tabelle 8: Korrelation des HER2- und MET- Status

	valide		HER2-Status			MET-Status		
	n (%)	n (%)	valide		p-Wert	valide		p-Wert
			negativ	positiv		negativ	positiv	
Geschlecht	140	122			0,348*	124		0,999*
weiblich	28 (20,0)	21 (100)		0 (0,9)		21 (95,5)		1 (4,5)
männlich	112 (80,0)	93 (92,1)		8 (7,9)		97 (95,1)		5 (4,9)
Alter	140	116			0,466*	118		0,999*
< 64 Jahre	70 (50,0)	48 (90,6)		5 (9,4)		52 (94,5)		3 (5,5)
≥ 64 Jahre	70 (50,0)	60 (95,2)		3 (4,8)		60 (95,2)		3 (4,8)
Lokalisation	140	122			0,256*	124		0,999*
proximal	90 (64,3)	74 (91,4)		7 (8,6)		78 (95,1)		4 (4,9)
distal	50 (53,7)	40 (97,6)		1 (2,4)		40 (95,2)		2 (4,8)
Laurén Phänotyp	140	122			0,043*	124		0,018*
intestinal	62 (44,3)	51 (86,4)		8 (13,6)		60 (98,4)		1 (1,6)
diffus	26 (18,6)	24 (100)		0 (0,0)		20 (83,3)		4 (16,7)
gemischt	26 (18,6)	26 (100)		0 (0,0)		26 (100)		0 (0,0)
unklassifiziert	14 (10,0)	13 (100)		0 (0,0)		12 (93,3)		1 (7,7)
komplette Regression	12 (8,6)	N.A.		N.A.		N.A.		N.A.
yT-Kategorie	140	122			0,045°	124		0,616°
ypT0	16 (11,4)	2 (100)		0 (0,0)		3 (100)		0 (0,0)
ypT1(a/b)	20 (14,3)	14 (82,4)		3 (17,6)		18 (100)		0 (0,0)
ypT2	20 (14,3)	18 (90,0)		2 (10,0)		18 (90,0)		2 (10,0)
ypT3	74 (52,9)	70 (95,9)		3 (4,1)		70 (95,9)		3 (4,1)
ypT4(a/b)	10 (7,1)	10 (100)		0 (0,0)		9 (90,0)		1 (10,0)
yN-Kategorie	140	122			0,039°	124		0,087°
ypN0	51 (36,4)	31 (83,3)		6 (16,7)		36 (97,3)		1 (2,7)
ypN1	33 (23,6)	30 (100)		0 (0,0)		30 (96,8)		1 (3,2)
ypN2	32 (22,9)	31 (96,9)		1 (3,1)		32 (100)		0 (0,0)
ypN3(a/b)	24 (17,1)	23 (95,9)		1 (4,2)		20 (83,3)		4 (16,7)
yM-Kategorie	140	122			0,355*	124		0,229*
ypM0	119 (85,0)	95 (92,2)		8 (7,8)		101 (96,2)		4 (3,8)
ypM1	21 (15,0)	19 (100)		0 (0,0)		17 (89,5)		2 (10,5)
UICC-Stadium	138	120			0,005°	122		0,240°
0/N+	15 (10,9)	2 (100)		0 (0,0)		3 (100)		0 (0,0)
I(A/B)	21 (15,2)	13 (72,2)		5 (27,8)		18 (94,7)		1 (5,3)
II(A/B)	24 (17,4)	23 (95,8)		1 (4,2)		24 (100)		0 (0,0)
III(A/B/C)	57 (41,3)	55 (96,5)		2 (3,5)		54 (94,7)		3 (5,3)
IV	21 (15,2)	19 (100)		0 (0,0)		17 (89,5)		2 (10,5)
yL-Kategorie	140	122			0,999*	124		0,017*
ypL0	98 (70,0)	75 (93,8)		5 (6,3)		81 (98,8)		1 (1,2)
ypL1	42 (30,0)	39 (92,9)		3 (7,1)		37 (88,1)		5 (11,9)
yV-Kategorie	140	122			0,624*	124		0,074°
ypV0	130 (92,9)	104 (92,9)		8 (7,1)		110 (96,5)		4 (3,5)
ypV1	10 (7,1)	10 (100)		0 (0,0)		8 (80,0)		2 (20,0)
yPn-Kategorie	140	122			0,198*	124		0,152*
ypPn0	110 (78,6)	84 (91,3)		8 (8,7)		91 (96,8)		3 (3,2)
ypPn1	30 (21,4)	30 (100)		0 (0,0)		27 (90,0)		3 (10,0)
yR-Status	140	122			0,648*	124		0,025*
R0	125 (89,3)	99 (92,5)		8 (7,5)		106 (97,2)		3 (2,8)
R1	13 (9,3)	13 (100)		0 (0,0)		10 (76,9)		3 (23,1)
RX	2 (1,4)	2 (100)		0 (0,0)		2 (100)		0 (0,0)
Mikrosatellitenstatus	121	120			0,999*	121		0,999*
Mikrosatelliten stabil	113 (93,4)	104 (93,1)		8 (6,9)		107 (94,7)		6 (5,3)
Mikrosatelliten instabil	8 (6,6)	8 (100)		0 (0,0)		8 (100)		0 (0,0)
Epstein-Barr-Virus	122	120			0,999*	122		0,999*
negativ	119 (97,5)	109 (93,2)		8 (6,8)		113 (95,0)		6 (5,0)
positiv	3 (2,5)	3 (100)		0 (0,0)		3 (100)		0 (0,0)

	valide		HER2-Status		MET-Status	
	n (%)		p-Wert		n (%)	p-Wert
			negativ	positiv		
			negativ	positiv		
		valide		valide		
MET-Status	124		122		0,999*	
negativ	118 (84,3)		108 (93,1)		8 (6,9)	
positiv	6 (4,8)		6 (100)		0 (0,0)	
HER2-Status	122					0,999*
negativ	114 (93,4)				108 (94,7)	6 (5,3)
positiv	8 (6,6)				8 (100)	0 (0,0)
vitale Tumorresiduen (dichotomisiert am Median)	139		115		0,729*	0,379*
<55%	70 (50,4)		42 (91,3)		4 (8,7)	1 (2,1)
≥55%	69 (49,6)		65 (94,2)		4 (5,8)	4 (5,8)
vitale Tumorresiduen (Quartile)	139		115		0,282°	0,320°
Q1 (<6%)	39 (28,1)		9 (90,0)		1 (10,0)	0 (0,0)
Q2 (6-55%)	31 (22,3)		33 (91,7)		3 (8,3)	1 (2,8)
Q3 (56-85%)	31 (22,3)		28 (90,3)		3 (9,7)	2 (6,5)
Q4 (>85%)	38 (27,3)		37 (97,4)		1 (2,6)	2 (5,3)
Tumorregressionsgrad (Becker)	140		122		0,583°	0,177°
1a	16 (11,4)		2 (100)		0 (0,0)	3 (100)
1b	29 (20,7)		25 (89,3)		3 (10,7)	29 (100)
2	22 (15,7)		19 (95,0)		1 (5,0)	19 (95,0)
3	73 (52,1)		68 (94,4)		4 (5,6)	67 (94,7)
PD-L1 in Tumorzellen (Primärtumor)	119		116		0,999*	0,138*
negativ	92 (77,3)		82 (92,1)		7 (7,9)	86 (96,6)
positiv	27 (22,7)		26 (96,3)		1 (3,7)	24 (88,9)
PD-L1 in Immunzellen (Primärtumor)	138		121		0,999*	0,999*
negativ	87 (63,0)		67 (93,1)		5 (6,9)	70 (94,6)
positiv	51 (37,0)		46 (93,9)		3 (6,1)	47 (95,9)
PD-L1 in Tumorzellen (Lymphknotenmetastasen)	73		71		0,999*	0,602*
negativ	54 (74,0)		51 (96,2)		2 (3,8)	50 (94,3)
positiv	19 (26,0)		18 (100)		0 (0,0)	17 (89,5)
PD-1 in tumorinfiltrierenden Lymphozythen	138		120		0,475*	0,999*
negativ	12 (8,7)		8 (100)		0 (0,0)	10 (100)
positiv	126 (91,3)		104 (92,9)		8 (7,1)	106 (94,6)
Lymphozytenaggregate vorhanden	138		120		0,999*	0,123*
negativ	14 (10,1)		12 (100)		0 (0,0)	11 (84,6)
positiv	124 (89,9)		100 (92,6)		8 (7,4)	105 (95,4)
PD-1 in Lymphozytenaggregaten	138		120		0,597*	0,141*
negativ	15 (10,9)		13 (92,9)		1 (7,1)	12 (85,7)
positiv	123 (89,1)		99 (93,4)		7 (6,6)	104 (96,3)

statistisch Signifikant nach multiplem Testverfahren

nicht statistisch Signifikant nach multiplem Testverfahren

* = Fisher's Exact

° = Kendall's tau

5.8.6.1 Korelation des HER2-Status mit den klinisch-pathologischen Charakteristika

Die Korrelation mit den klinisch-pathologischen Parametern ergab für den HER2-Status eine signifikante Korrelation mit dem Lauren Phänotyp ($p=0,043$), der T- und N-Kategorie (T-Kategorie $p=0,045$; N-Kategorie $p=0,039$) und dem UICC-Stadium ($p=0,005$). Alle 8 HER2-positiven Magenkarzinome waren vom intestinalen Phänotyp (13,6% *HER2*-amplifiziert beim intestinalen Typ). Sowohl bei den TNM-Kategorien als auch beim UICC-Stadium wurde erkennbar, dass HER2 eher mit einem lokal nicht weit fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert war. Bei der T-Kategorie fiel auf, dass T1 (17,6%) bzw. T2 (10%) häufiger eine *HER2*-Amplifikation zeigten, wohingegen Tumoren in der Kategorie T3 (4,1%) und T4 (0%) seltener eine HER2-Positivität zeigten. Bei der N-Kategorie fielen 6 von 8 und bei der M-Kategorie 8 von 8 HER2-positive Fälle auf. Im UICC-Stadium I waren sogar 27,8% *HER2*-amplifiziert. Auch zeigte keiner der HER2-positiven Fälle eine Pn- oder V-Infiltration. Diese Korrelationen verloren jedoch nach Simes-Korrektur für multiple Testverfahren die Signifikanz. Weiter auffällig, aber nicht signifikant, war, dass 7 der 8 HER2-positiven Magenkarzinome proximal gelegen waren (HER2 proximal 8,6%, distal 2,4%).

Mit dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie zeigte der HER2-Status keinen signifikanten Zusammenhang (Anteil an vitalen Tumorzellen Quartile $p=0,282$; Becker-Regressionsgrad $p=0,583$).

Auch zeigte meine Studie keinen Zusammenhang zwischen PD-L1/PD-1 und dem HER2-Status. Keiner der HER2-positiven Fälle war MSI, EBV-positiv oder MET-positiv.

5.8.6.2 Korelation des MET-Status mit den klinisch-pathologischen Charakteristika

Der Vergleich des MET-Status mit den klinisch-pathologischen Parametern ergab signifikante Korrelationen mit dem Lauren Phänotyp ($p=0,018$), der L-Kategorie ($p=0,017$) und dem R-Status ($p=0,025$). Der diffuse Phänotyp trug mit 16,7% die höchste Wahrscheinlichkeit in der Lauren Klassifikation eine *MET*-Amplifikation zu zeigen. Fünf der sechs MET-positiven Tumoren zeigten einen L1 Status (11,9%). Beim R-Status waren Magenkarzinome im R1-Status zu 23,1% MET-positiv, im R0-

Status hingegen zeigten nur 2,8% einen positiven MET-Status. Auch weitere nicht signifikante Auffälligkeiten wie eine höhere Anzahl an Lymphknotenmetastasen wiesen auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium MET-positiver Magenkarzinome hin. Auch hier verloren die Korrelationen ihre Signifikanz nach Simes-Korrektur für multiples Testverfahren.

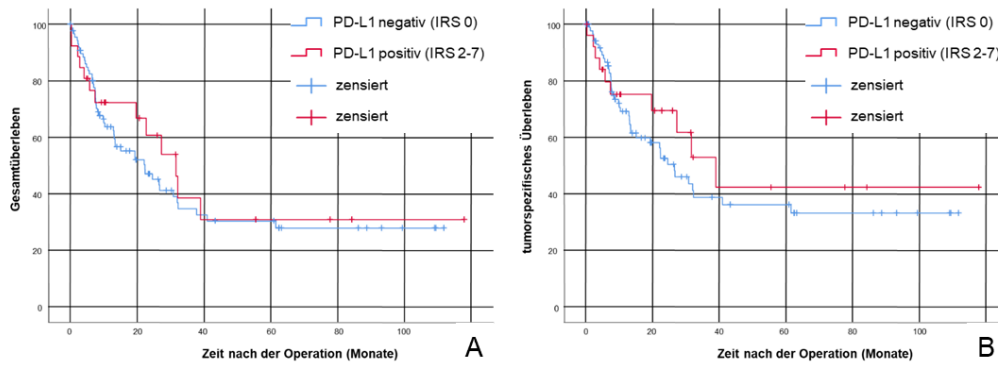
Der MET-Status korrelierte nicht mit dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie (Anteil an vitalen Tumorzellen Quartile $p=0,320$; Becker-Regressionsgrad $p=0,177$).

Auch zeigte in meiner Studie der MET-Status keinen Zusammenhang mit PD-L1/PD-1. Wie schon bei HER2, war auch keiner der *MET*-amplifizierten Tumoren, MSI, EBV-positiv, noch *HER2*-amplifiziert.

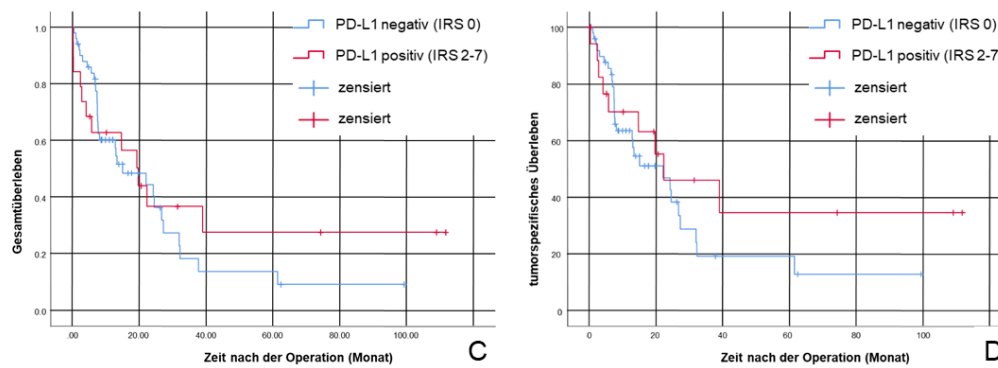
5.9 Korrelation mit dem Patientenüberleben

5.9.1 Korrelation der PD-L1-Expression mit dem Patientenüberleben

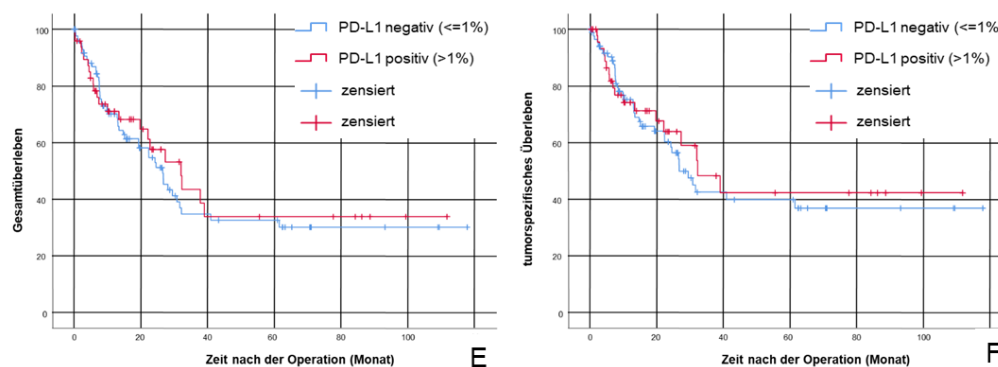
Der Nachweis von PD-L1 in den Tumor- oder Immunzellen des Primärtumors bzw. in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen korrelierte nicht mit dem Patientenüberleben (Abbildung 23).



PD-L1-Expression in Tumorzellen des Primärtumors



PD-L1-Expression in Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen



PD-L1-Expression in Immunzellen des Primärtumors

Abbildung 23: Überlebenskurven PD-L1-positiver und PD-L1-negativer, neoadjuvant behandelter Magenkarzinomen.

A, B: Tumorzellen im Primärtumor (A: Gesamtüberleben $p=0,558$, $n=114$; B: tumorspezifisches Überleben $p=0,441$, $n=114$), C, D: Tumorzellen in der Lymphknotenmetastasen (C: Gesamtüberleben $p=0,610$, $n=69$; D: tumorspezifisches Überleben $p=0,356$, $n=69$), E, F: Immunzellen im Primärtumor (E: Gesamtüberleben $p=0,686$, $n=134$; F: tumorspezifisches Überleben $p=0,699$, $n=134$). Die Kaplan-Meier Kurve stellt das Überleben vom Patienten mit und ohne PD-L1-positiven Tumor- oder Immunzellen im Magenkarzinom dar. Der p-Wert wurde mit dem Log-Rang-Test berechnet. n = Anzahl der Patienten.

5.9.2 Korrelation der PD-1-Expression mit dem Patientenüberleben

Der Nachweis von PD-1 in den TIL des Primärtumors korrelierte nicht mit dem Patientenüberleben (Abbildung 24). Die Korrelation des Nachweises von PD-1 in Lymphozytenaggregaten und das Vorhandensein von Lymphozytenaggregaten im Primärtumor korrelierte trotz niedriger Fallzahl signifikant mit einem besseren Überleben (Abbildung 25).

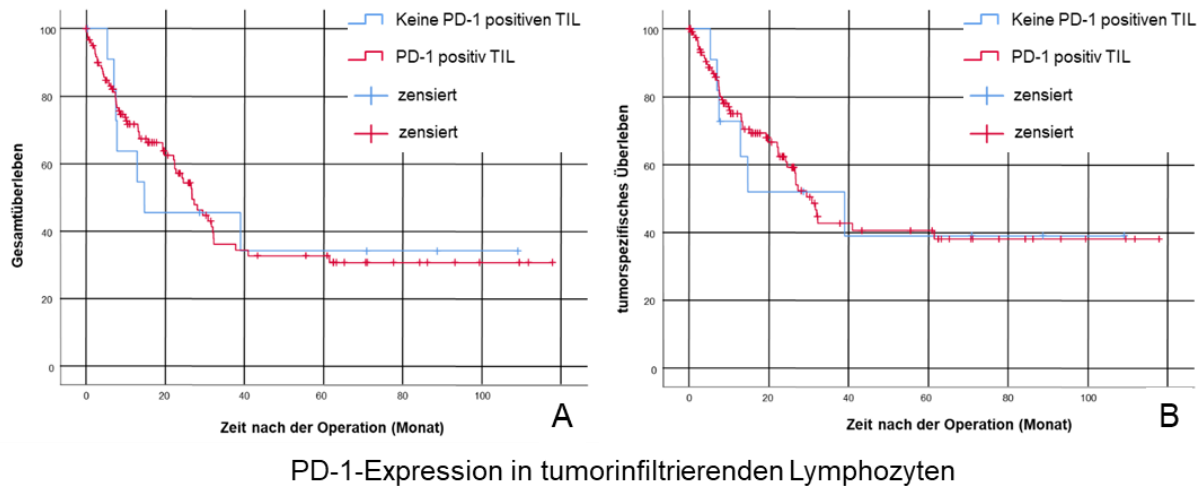
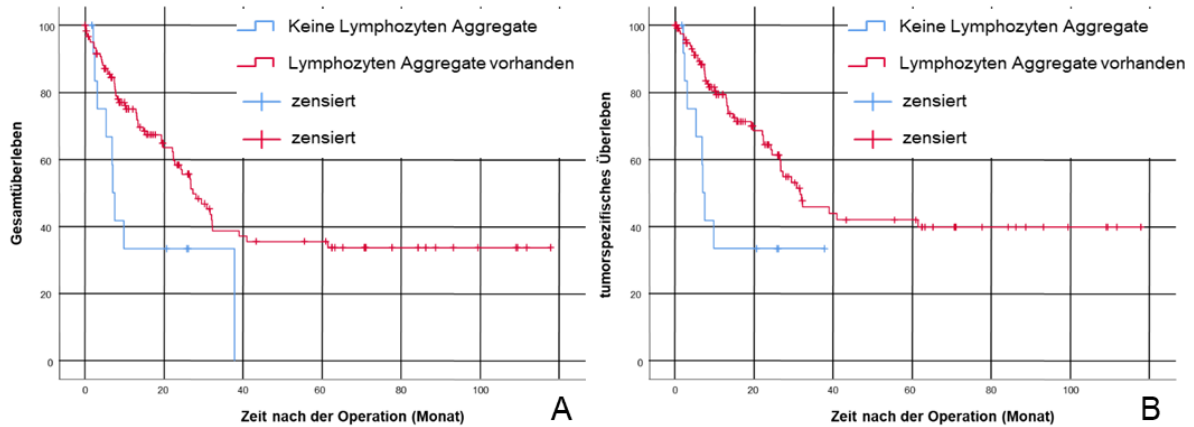
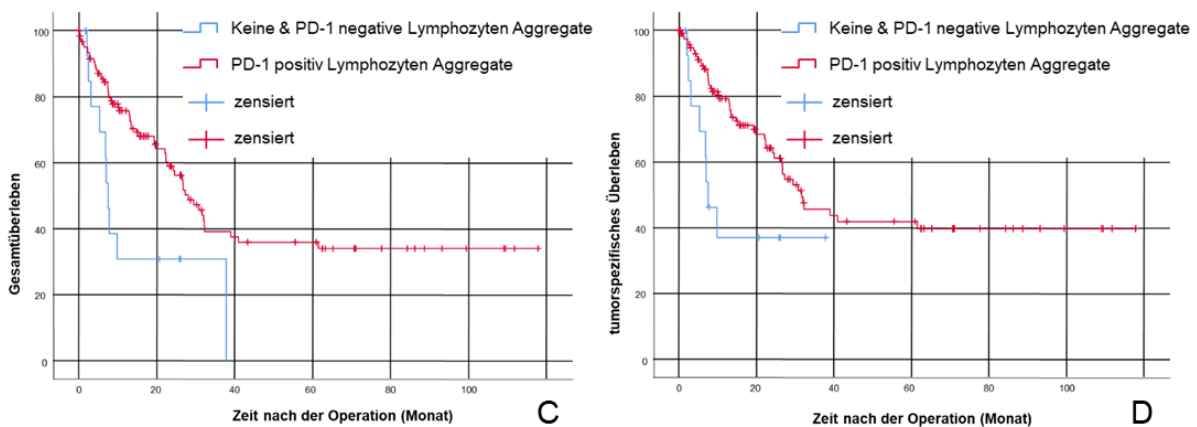


Abbildung 24: Überlebenskurven der neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen mit und ohne PD-1-positiven tumorinfiltrierenden Lymphozyten.

Patienten mit und ohne PD-1-positiven Immunzellen (A: Gesamtüberleben $p=0,957$, $n=133$; B: tumorspezifisches Überleben $p=0,908$, $n=133$). Die Kaplan-Meier Kurve stellt das Überleben von Patienten mit und ohne PD-1-positiven Immunzellen im Magenkarzinom dar. Der p-Wert wurde mit dem Log-Rang-Test berechnet. n = Anzahl der Patienten.



Korrelation der Lymphozytenaggregate mit dem Patientenüberleben



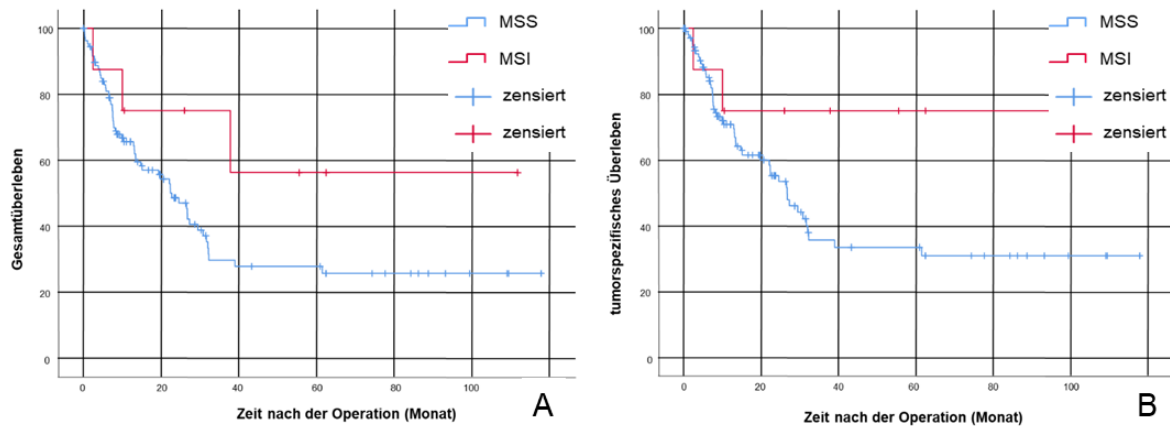
PD-1-Expression in Lymphozytenaggregaten

Abbildung 25: Überlebenskurven der neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen mit und ohne Lymphozytenaggregate bzw. mit und ohne PD-1-positiven Lymphozytenaggregaten.

A, B: Patienten mit und ohne Lymphozytenaggregaten (A: Gesamtüberleben $p=0,014$, $n=133$; B: tumorspezifisches Überleben $p=0,010$, $n=133$), C, D: Patienten mit und ohne PD-1-positiven Lymphozytenaggregaten (C: Gesamtüberleben $p=0,006$, $n=133$; D: tumorspezifisches Überleben $p=0,017$, $n=133$). Die Kaplan-Meier Kurve stellt das Gesamtüberleben und tumorspezifische Überleben dar. Der p-Wert wurde mit dem Log-Rang-Test berechnet. n = Anzahl der Patienten.

5.9.3 Korrelation des Mikrosatellitenstatus mit dem Patientenüberleben

Auf Grund der geringen Fallzahl korrelierte der MSI-Status nicht signifikant mit dem Überleben. Allerdings zeigen die Überlebenskurve einen deutlichen Trend hin zu einem besseren Überleben der MSI-Tumoren (Abbildung 26).



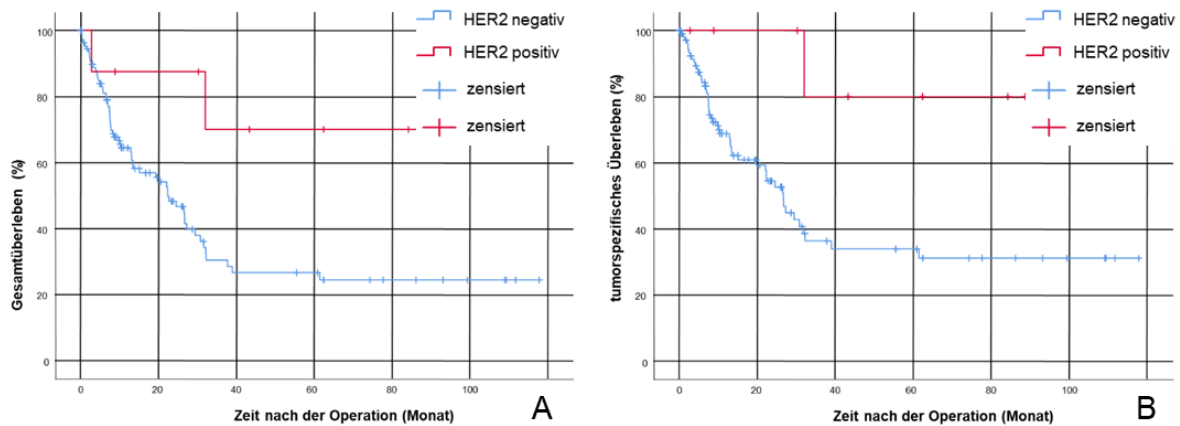
Korrelation des Mikrosatellitenstatus mit dem Patientenüberleben

Abbildung 26: Überlebenskurven der mikrosatellitenstabilen (MSS) und mikrosatelliteninstabilen (MSI), neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen.

Patienten mit MSS und MSI Tumoren (A: Gesamtüberleben $p=0,152$, $n=116$; B: tumorspezifisches Überleben $p=0,130$, $n=116$). Die Kaplan-Meier Kurve stellt das Überleben vom Patienten mit MSS und MSI Magenkarzinom dar. Der p-Wert wurde mit dem Log-Rang-Test berechnet. n = Anzahl der Patienten

5.9.4 Korrelation des HER2-Status mit dem Patientenüberleben

HER2-positive Magenkarzinome zeigten einen geringen Überlebensvorteil gegenüber HER2-negativen Karzinomen. Aufgrund der kleinen Kohortengröße ist die Aussagekraft eingeschränkt. Nach der Simes-Korrektur für multiples Testen lag kein signifikanter Unterschied mehr vor (Abbildung 27).



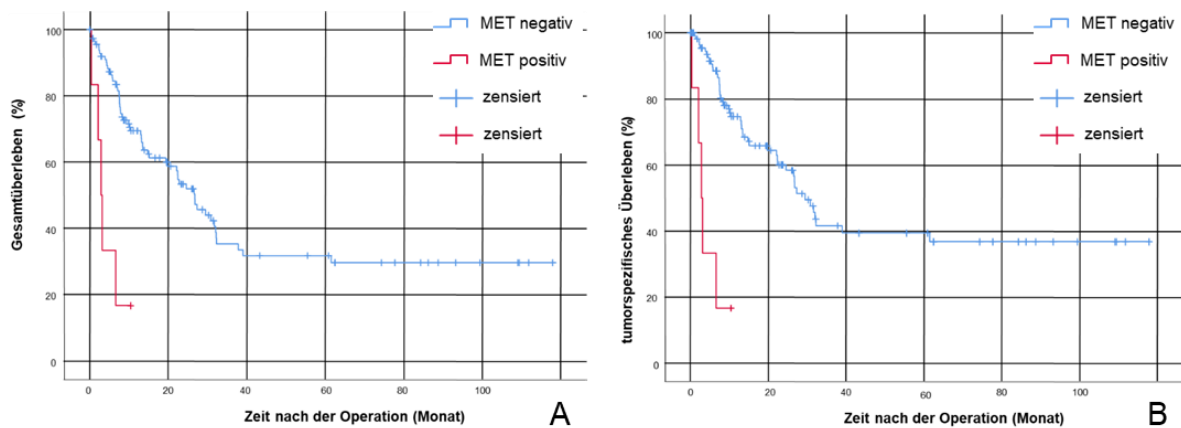
Korrelation des HER2-Status mit dem Patientenüberleben

Abbildung 27: Überlebenskurven HER2-positiven und HER2-negativer, neoadjuvant behandelter Magenkarzinomen.

Patienten mit und ohne HER2-positiven Tumoren (A: Gesamtüberleben $p=0,038$, $n=117$; B: tumorspezifisches Überleben $p=0,028$, $n=117$). Die Kaplan-Meier Kurve stellt das Gesamtüberleben und tumorspezifische Überleben dar. Der p-Wert wurde mit dem Log-Rang-Test berechnet. n = Anzahl der Patienten.

5.9.5 Korrelation des MET-Status mit dem Patientenüberleben

MET-positive Magenkarzinome zeigten trotz der kleinen Kohorte ein signifikant schlechteres Überleben gegenüber MET-negativen Magenkarzinomen (Abbildung 28).



Korrelation des MET-Status mit dem Patientenüberleben

Abbildung 28: Überlebenskurven MET-Status.

Patienten mit und ohne MET-positiven Tumoren (A: Gesamtüberleben $p < 0,001$, $n = 119$; B: tumorspezifisches Überleben $p < 0,001$, $n = 119$). Die Kaplan-Meier Kurve stellt das Gesamtüberleben und tumorspezifische Überleben dar. Der p-Wert wurde mit dem Log-Rang-Test berechnet. n = Anzahl der Patienten.

5.10 Korrelation der Expression von PD-L1 und PD-1 der neoadjuvanten gegenüber der therapienaiven Kohorte von Magenkarzinompatienten

Um Hinweise auf den Einfluss einer neoadjuvanten Chemotherapie auf die PD-L1- und PD-1-Expression zu erhalten, verglich ich meine Ergebnisse mit den zuvor veröffentlichten Daten der Kohorte therapienaiver Magenkarzinomen von Böger et al. [17].

5.10.1 Korrelation der PD-L1-Expression der neoadjuvanten gegenüber der therapienaiven Kohorte

Zur Auswertung der PD-L1-positiven Tumorzellen wurde derselbe IRS wie bei Böger et al. in der therapienaiven Kohorte genutzt [17]. Die therapienaive Kohorte zeigte mit 30,1% häufiger eine PD-L1-Expression als die neoadjuvante Kohorte mit 22,7%. Die PD-L1-Expression war in Ausmaß und Intensität stärker ausgeprägt. So erfolgte die Dichotomisierung der Ergebnisse in den beiden Kohorten an unterschiedlichen Rängen. Ich klassifizierte nicht wie Böger et al. die Tumorzellen am $IRS \leq 2$ vs. > 2 , in positiv und negativ, sondern wie oben beschrieben am $IRS 0$ vs. ≥ 2 . Der Unterschied der beiden Kohorten wird noch deutlicher, wenn man in beiden Kohorten die IRS Teilung ≤ 2 vs. > 2 anwendet. In der therapienaiven Kohorte tragen noch 23,9% der Magenkarzinome den Status PD-L1-positiv, wohingegen in der neoadjuvanten Kohorte nur noch 15,1% der Karzinome als PD-L1-positiv in Tumorzellen klassifiziert wurden.

Bei der Betrachtung der Immunzellen fielen ähnliche Unterschiede zwischen der neoadjuvanten und therapienaiven Kohorte auf. Die Summe der Fälle, die eine PD-L1-Expression in Immunzellen zeigte, war in der neoadjuvanten Kohorte mit 96,4% zwar höher als in der therapienaiven Kohorte mit 88,4%, der Median an gefärbten Zellen in der therapienaiven Kohorte lag mit 5% aber über dem der neoadjuvanten mit 1%. In der therapienaiven Kohorte wurde ab 10% ($\geq 10\%$) PD-L1-positiver Immunzellen ein Fall als PD-L1 positiv klassifiziert. In der neoadjuvanten Kohorte hingegen wurde einen Fall schon als PD-L1 positiv in Immunzellen gewertet, sobald mehr als $> 1\%$ der Immunzellen eine PD-L1-Expression zeigten. Bei Verwendung des Cut-off Wertes der therapienaiven Fälle für beide Kohorten zeigte sich, dass sich die Zahl PD-L1-positiver Fälle in Immunzellen in der neoadjuvanten Kohorte durch die neoadjuvante

Chemotherapie mehr als halbierte ($\geq 10\%$ PD-L1-positive Immunzellen therapienaiv 35,5%; neoadjuvant 16,5%) (Tabelle 9).

Tabelle 9: Vergleich der Cut-off Werte zwischen der therapienaiven und der neoadjuvanten Kohorte

	PD-L1 in Tumorzellen im Primärtumor				PD-L1 in Immunzellen im Primärtumor				PD-1 in tumorinfiltrierenden Lymphozythen			
	<i>Cut-off</i>				<i>Cut-off</i>				<i>Cut-off</i>			
	negativ		positiv		negativ		positiv		Negativ		positiv	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
therapienaive Kohorte	IRS ≤ 2 vs. > 2				$< 10\%$ vs. $\geq 10\%$				vs. vorhanden			
[Böger et al.]	354	76.1	111	23.9	300	64.5	165	35.5	215	46.3	250	53.8
neoadjuvante Kohorte	IRS 0 vs. ≥ 2				$\leq 1\%$ vs. $> 1\%$				vs. vorhanden			
	92	77.3	27	22.7	88	63.3	51	36.7	12	9.5	126	91.1
	IRS ≤ 2 vs. $> 2^*$				$< 10\%$ vs. $\geq 10\%^*$							
	101	84,9	18	15.1	116	83.5	23	16.5				

* Cut-off Werte von Böger et al.

5.10.2 Korrelation der PD-L1-Expression mit den klinisch-pathologischen Charakteristika der neoadjuvanten gegenüber der therapienaiven Kohorte

Die signifikanten Korrelationen der therapienaiven Kohorte konnten weder bei den Tumorzellen (signifikante Korrelation mit dem Geschlecht, der Tumorlokalisierung, dem Laurén-Phänotyp, dem UICC-Stadium) noch bei Immunzellen (signifikante Korrelationen mit der T-, M- und L-Kategorie sowie dem UICC-Stadium) bestätigt werden. Durch die neoadjuvante Chemotherapie kam es zu einer Verschiebung hin zu mehr Frauen, welche eine PD-L1-Expression zeigten. In der therapienaiven Kohorte überwog noch der Männeranteil der PD-L1-positiven Tumorzellen mit 27,6% zu 17,7% PD-L1-positiver Frauen. In der neoadjuvanten Kohorte zeigten hingegen 36,4% der Frauen eine PD-L1-Expression und nur 19,6% der Männer. Dasselbe war in der neoadjuvanten Kohorte auch bei PD-L1-positiven Immunzellen (PD-L1-Expression neoadjuvant 42,9% Frauen vs. 35,1% Männer; therapienaiv 32,6% Frauen vs. 37,2% Männer) festzustellen.

Bei Analyse der PD-L1-Expression in Abhängigkeit der TNM-Kategorie zeigten sich in der therapienaiven Kohorte in der Kategorie pT2 mit 48,1% die meisten positiven Fälle. Nach neoadjuvanter Chemotherapie konnte in der Kategorie ypT2 eine PDL1-Expression in 21,1% der Fälle nachgewiesen werden. In der neoadjuvanten Kohorte kam es zu einer gleichmäßigen Verteilung der PD-L1-Expression über alle Kategorien. Das gleiche Phänomen konnte auch bei Immunzellen beobachtet werden (PD-L1-Expression in der T2-Kategorie therapienaiv 57,4% vs. neoadjuvant 25%). Des Weiteren zeigte die neoadjuvante Kohorte 12,5% PD-L1-Expression in der Kategorie ypT0, bei Tumorfällen mit vollständiger Regression.

Ist die Tumorlokalisation bei therapienaiven Patienten signifikant mit unterschiedlichen PD-L1-Expressionen in den Tumorzellen verbunden, lässt sich dies in der neoadjuvanten Kohorte nicht nachweisen (therapienaiv $p < 0,001$ vs. neoadjuvant $p = 0,258$), zeigte aber wie in der therapienaiven Kohorte im Trend ein vermehrtes Auftreten bei proximaler Lokalisation.

Weitere Unterschiede waren in Abhängigkeit des Lauren Phänotyps zu erkennen. Trotz der Häufigkeitsverschiebung der PD-L1-Expression in den einzelnen Subtypen, z.B. Zunahme der PD-L1-Expression beim gemischten Typ (Tumorzellen 12,9% therapienaiv zu 27,3% neoadjuvant; Immunzellen 25,8% therapienaiv zu 50,0%

neoadjuvant), zeigten auch nach neoadjuvanter Chemotherapie PD-L1-positive Tumorzellen die größte Wahrscheinlichkeit beim unklassifizierten Typ aufzutreten (45,3% neoadjuvant; 58,3% therapienaiv). Beim diffusen Typ nach Lauren war zu beobachten, dass es einen Zuwachs an PD-L1-positiver Tumorzellen (6,2% therapienaiv zu 19,2% neoadjuvant) und eine Abnahme bei Immunzellen von (30,3% therapienaiv zu 19,2% neoadjuvant) gab. Dennoch zeigten beide Kohorten eine ähnliche Tendenz mit wenigen PD-L1-positiven Tumoren beim diffusen Typ.

Bei der L- und V-Kategorie kam es zu einer Umkehr der PD-L1-Expression in Immunzellen. Zeigten in der therapienaiven Kohorte noch 42,1% L0 und 29,1% L1 - Stadien ($p=0,005$) eine PD-L1-Expression, waren in der neoadjuvanten Kohorte 30,6% L0 und 51,2% L1 - Stadien ($p=0,033$) PD-L1 positiv.

Diese neoadjuvante Kohorte zeigte im Gegensatz zur therapienaiven Kohorte keinen Überlebensvorteil von Patienten mit einer PD-L1-Expression (Tumorzellen: Gesamtüberleben $p=0,028$ therapienaiv vs. $p=0,558$ neoadjuvant; tumorspezifisches Überleben $p=0,018$ therapienaiv vs. $p=0,441$ neoadjuvant; Immunzellen: Gesamtüberleben $p<0,001$ therapienaiv vs. $p=0,686$ neoadjuvant; tumorspezifisches Überleben $p<0,001$ therapienaiv vs. $p=0,699$ neoadjuvant).

5.10.3 Korrelation der PD-1-Expression in der neoadjuvanten gegenüber der therapienaiven Kohorte

Die Anzahl der PD-1-positiven Lymphozytenaggregate unterschied sich in beiden Kohorten kaum (88,8% und 89,1%). Mit 91,3% PD-1-positiven TIL zeigte die neoadjuvante Kohorte aber eine deutliche Erhöhung der Expression im Vergleich zur therapienaiven Kohorte mit 53,8% (Tabelle 9). Die therapienaive Kohorte zeigte einen Anstieg der Häufigkeit von PD-1-positiven TIL in Abhängigkeit der PD-L1-positiven Tumorzellen im Primärtumor. Wie in Abbildung 29 zu sehen, waren PD-1-positive TIL häufiger bei einer hohen PD-L1-Expression zu finden. Die neoadjuvante Kohorte hingegen hat eine höhere Grundwahrscheinlichkeit PD-1 in TIL zu exprimieren. Auch Fälle mit PD-L1-negativen Tumorzellen zeigten zu 91,2% eine PD-1-Expression. Beim Vergleich der PD-1- mit der PD-L1-Expression in Immunzellen war sowohl in der therapienaiven als auch in der neoadjuvanten Kohorte ein Anstieg der PD-1-Expression zu sehen. Je mehr Immunzellen eine PD-L1-Expression zeigten, desto

häufiger besteht auch eine PD-1-Expression in TIL. Bei der neoadjuvanten Kohorte verlief dieser Anstieg aber schneller als bei der therapienaiven. Tumoren mit 1-5% PD-L1-positive Immunzellen zeigten schon zu 91,9% eine PD-1-Expression in der neoadjuvanten Kohorte, in der therapienaiven nur zu 47,6%.

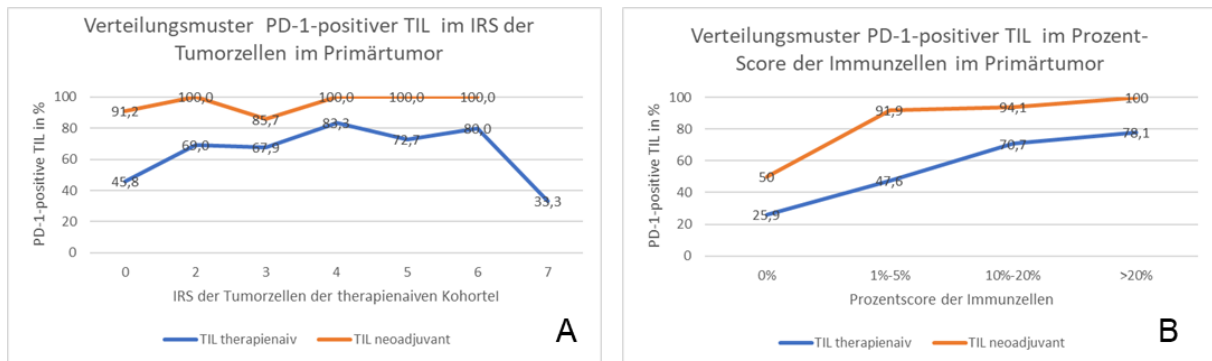


Abbildung 29: Vergleich des Verteilungsmusters PD-1-positiver TIL neoadjuvant vs. therapienaiv.

A: PD-1-positive TIL im IRS der Tumorzellen der therapienaiven Kohorte. B: PD-1-positive TIL im Prozentscore der Immunzellen.

5.10.4 Korrelation der PD-1-Expression mit den klinisch-pathologischen Charakteristika der neoadjuvanten gegenüber der therapienaiven Kohorte

Auch beim Vergleich der klinisch-pathologischen Charakteristika waren Unterschiede der PD-1-Expression zu erkennen. Im Vergleich zur therapienaiven Gruppe zeigte die neoadjuvante Kohorte eine Korrelation mit der T-Kategorie ($p=0,024$) und dem UICC-Stadium ($p=0,028$).

In den anderen klinisch-pathologischen Charakteristika zeigte weder die therapienaive noch die neoadjuvante Kohorte eine signifikante Korrelation.

Patienten in der therapienaiven Kohorte zeigten mit PD-1-positiven TIL ein besseres, aber nicht signifikantes, tumorspezifisches Überleben ($p=0,050$). Diese Beobachtung konnte in der Gruppe der neoadjuvant behandelten Patienten nicht bestätigen ($p=0,908$) werden. Das in der neoadjuvanten Kohorte beobachtete bessere Überleben von Patienten mit Lymphozytenaggregaten konnte hingegen die therapienaive Kohorte nicht bestätigen.

6 Diskussion

Tumoren des Magens und des gastroösophagealen Übergangs werden oft erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, was ein wesentlicher Grund für die schlechte Prognose dieser Tumoren ist [3, 8]. Bei diesen fortgeschrittenen Tumoren sind die rein chirurgischen Therapieverfahren entweder nicht mehr kurativ möglich oder werden in multimodale Therapiekonzepte eingebettet, zu denen die neoadjuvante Chemotherapie zählt. Bei den nicht mehr kurativ behandelbaren Tumoren bleibt oft nur noch die palliative, lebensverlängernde onkologische Behandlung [9]. Der Erfolg der palliativen Therapie kann durch den Einsatz zielgerichteter Medikamente nachhaltig gesteigert werden. Aus diesem Grund hat die Entwicklung robuster molekularer Klassifizierungen, genauerer Einteilungen und die Identifikation von Magenkarzinom-Subtypen und fehlregulierter Stoffwechselwege große Priorität erlangt [19]. Ein Beispiel dafür ist der Einsatz von Trastuzumab bei HER2-positiven Magenkarzinomen. Die Hoffnung ist, dass in Zukunft Patienten aufgrund ihrer Subgruppe für die richtige Therapieoption ausgewählt werden können und sich neue prädiktive Marker entwickeln [19, 20]. Ein anderer Ansatz richtet sich gegen die Immunevasionsstrategien maligner Tumoren, die über diesen Mechanismus der eigenen Körperabwehr entgehen. Die Entwicklung und der Einsatz von Immuncheckpointinhibitoren hat die Behandlung von soliden Tumoren in den letzten Jahren nachhaltig verbessert [6]. Aber auch hier profitiert nicht jeder Patient von der Behandlung und der zielgerichtete Einsatz und die Suche nach geeigneten prädiktiven Biomarkern ist ein brennendes aktuelles Thema in der palliativen Behandlung der Tumoren des Magens und gastroösophagealen Übergangs. Aufgrund der großen Heterogenität innerhalb der einzelnen Tumoren gestaltet sich die Selektion von Patienten, an denen z.B. eine zielgerichtete Therapie (z.B. gegen PD-L1/PD-1) wirkt, als schwierig [18].

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer neoadjuvanten Chemotherapie auf die PD-L1- und PD-1-Expression näher zu untersuchen, Unterschiede zur therapienaiven Kohorte zu evaluieren und Anhaltspunkte für die Therapie mit gegen PD-1/PD-L1 gerichteten Immuncheckpointinhibitoren zu liefern. Um die Auswirkungen der Chemotherapie in Abhängigkeit des Manifestationsort zu unterscheiden, wurden neben dem Primärtumor auch korrespondierende Lymphknoten- und Fernmetastasen analysiert.

Im ersten Teil der Diskussion werden die durchgeführten Methoden, das Patientenkollektiv und die Vergleichskohorte kritisch bewertet. Im Anschluss folgt die inhaltliche Diskussion. Ich vergleiche die neoadjuvante Kohorte mit einer früher publizierten therapienaiven Kohorte von Böger et al. aus derselben Forschungsgruppe und überprüfte meine Hypothesen:

- Eine neoadjuvante Therapie verändert die Expression von PD-L1 und PD-1 in Karzinomen des Magens und gastroösophagealen Übergangs.
- EBV-positive und MSI-Tumoren weisen auch nach neoadjuvanter Chemotherapie eine höhere PD-L1-Expression auf.
- Tumoren mit *HER2*- und *MET*-Amplifikation zeigen nach neoadjuvanter Chemotherapie nur eine geringe Koexpression mit PD-L1.

6.1 Methodik

6.1.1 Das Patientenkollektiv

Vergleiche ich meine neoadjuvante Kohorte mit den in der Literatur zu findenden Daten sehen wir eine große Übereinstimmung. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei Frauen im 72. Lebensjahr und bei Männern im 75. Lebensjahr. Der Gipfel der Neuerkrankungsrate lag zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr [5]. Diese neoadjuvante Kohorte zeigte ein mittleres Alter bei Diagnosestellung von 63,8 Jahren und spiegelte so das ältere Erkrankungsalter wider. Laut Robert Koch-Institut werden 2/3 der Magenkarzinome erst im fortgeschrittenen Tumorstadium (T3, T4) diagnostiziert [4]. Auch in meiner neoadjuvanten Kohorte wurden 60,0% der Patienten in der Kategorie T3 und T4 diagnostiziert, die geschlechtsspezifische Verteilung mit 80% männlichen zu 20% weiblichen Patienten entsprach jedoch nicht den statistischen Werten aus Deutschland. Gemäß der Daten des Robert Koch-Instituts erkrankten 9.340 Männer und 6.090 Frauen im Jahr 2014 [4]. Trotz Teildiskrepanz der Daten sollten diese geschilderten Ergebnisse nicht auf eine regionale Besonderheit zurückgeführt werden, sondern können auf andere kaukasische Kohorten übertragen werden.

Bei dieser Studie handelte es sich um eine kaukasische Patientengruppe und nicht um eine Mischung von kaukasischen und asiatischen Patienten. Dies schließt aus, dass die Ergebnisse aufgrund von unterschiedlichen immunologischen Profilen der ethnischen Gruppen verzerrt wurden [17, 77].

Die in dieser Studie untersuchten Magenkarzinompräparate stammen aus den Jahren 1998 bis 2017. Dies ist eine große Zeitspanne mit Veränderungen in den Therapieoptionen und -entscheidungen. Zwar wurden bei allen Karzinomen nachträglich die TNM-Kategorie, gemäß der 7. Auflage [16] der UICC-Richtlinien bestimmt, dennoch gab es Unterschiede in den Behandlungsstrategien, z.B. wurde mit verschiedenen Chemotherapeutika und unterschiedlicher Zyklenzahl gearbeitet. Auch wurden in manchen Fällen Fernmetastasen operiert, wohingegen in anderen Fällen die Fernmetastasen nur klinisch gesichert wurden.

Um den Einfluss einer neoadjuvanten Therapie unabhängig bewerten zu können, wurde eine getrennte Betrachtung von neoadjuvanten und therapienaiven Magenkarzinomen vorgenommen. Ausschlusskriterien waren deshalb das Vorliegen

eines anderen Primärtumortyps als das Adenokarzinom und keine perioperative, neoadjuvante Chemo- oder Strahlentherapie. Dieses neoadjuvante Patientenkollektiv ist repräsentativ und geeignet zur Beantwortung meiner Fragestellungen.

6.1.2 Die Schnitte

Die große Heterogenität innerhalb der einzelnen Tumoren und die damit verbundenen Probleme der Klassifikation und Patientenidentifikation sind bekannt [78]. Die Studie von Böger et al. zeigte, dass diese intratumorale Heterogenität auch für die PD-L1-Expression in Magenkarzinomen gilt [17]. Die PD-L1-Expression konnte bei Böger et al. in einem Drittel der Magenkarzinome nicht durch eine oberflächliche Biopsie erkannt werden und hätte zu falsch negativ Befunden geführt [17]. Aus diesem Grund habe ich für die Bewertung der PD-L1- und PD-1-Expression Großflächenschnitte verwendet, um eine falsch Negativrate möglichst klein zu halten. Nichtsdestotrotz wird auch bei den Auswertungen mittels Großflächenschnitt nur ein kleiner räumlicher Teil des Gesamttumors stellvertretend untersucht. Da ein möglichst repräsentativer Tumorschnitt ausgewählt wurde, konnten in meinen Augen repräsentative Ergebnisse erzielt werden.

Das gleiche Problem von falsch negativen Befunden besteht auch bei der Begutachtung von TMAs. Warneke et al. berichteten über eine falsch Negativrate von 25% bei der HER2-Untersuchung und gaben einen kleinen Teil an falsch positiven Fällen an [66]. Auch in dieser Studie wurde mit TMAs für die Auswertung des HER2-, MET-, EBV- und MSI-Status gearbeitet. Bei der Beurteilung der Ergebnisse sollte die Möglichkeit falsch negativer Befunde nicht außer Acht gelassen werden.

Auch ist kritisch zu bewerten, dass ich in 12 Fällen bei der TMA Herstellung von der Verwendung des Primärtumors abweichen musste und Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen verwendet habe. Für HER2 ist eine Diskordanz-Rate zwischen Primärtumor und Fernmetastasen bekannt [79]. Wie hoch die Diskordanz-Rate zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen für die einzelnen Färbungen sind, ist nicht bekannt.

Trotz der hier aufgeführten Bedenken halten ich die ausgewählten Schnitte als repräsentativ für das Gesamttumorgeschehen.

6.1.3 Die Färbemethoden

Die immunhistochemische Färbung erfolgte in allen Fällen vollautomatisch nach den Angaben des Herstellers. Die einzelnen Marker wurden an der therapienaiven Kohorte getestet und in vorherigen Studien validiert [17, 50, 59, 66, 69].

6.1.4 Die histologische Auswertung

Die histologische Auswertung mit Hilfe eines Mikroskops ist subjektiv und hängt von der Erfahrung des Untersuchers ab. Um alle Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurde zum einen immer das gleiche Mikroskop verwendet und zum anderen wurden die Präparate anhand von Referenzschnitten kategorisiert. Kritische Fälle wurden ein weiteres Mal ausgewertet (z.B. Auszählung von 40 Zellen bei der CISH). Die Ergebnisse wurden mit einem Facharzt für Pathologie abgestimmt.

Jeder Schnitt wurde mit der genauesten durchführbaren Methode für sein Kriterium begutachtet: Für PD-L1-positive Tumorzellen wurde wie bei der Auswertung von Böger et al. in der therapienaiven Kohorte mit einem IRS von 0 bis 7 gearbeitet [17]. Die stärkste Intensität wurde ausgewählt und mit dem Score an Prozentzahlen addiert. Ein Vorteil des IRS ist, dass die oft sehr inhomogene Expression der Rezeptoren vergleichbar wird. Ob eine schwache Intensität und viele positive Zellen und eine hohe Intensität mit wenig positiven Zellen die gleichen Prozesse im Tumor bedingen, ist nicht geklärt. Dennoch wurden sie in meine Auswertung als gleichwertig gewertet. Bei PD-L1-positiven Immunzellen wurde, auf Grund der durchweg niedrigen Intensität, nur der Prozentsatz an gefärbten Zellen im angepassten Score gewertet. Bei PD-1-, EBV- und den MSI-Färbungen wurde nur in den Kriterien angefärbt/nicht angefärbt bzw. vorhanden/nicht vorhanden ausgewertet. Da bei den Markern auf das Expressionsmuster angepasste und aus der therapienaiven Kohorte bereits etablierte und bewährte Beurteilungskriterien verwendet wurden, halte ich die Auswertungsmethoden für geeignet [17, 50, 59, 66, 69].

6.1.5 Die statistische Auswertung

In der Auswertung wurden alle Werte am Median dichotomiert, um sie mit den klinisch-pathologischen Charakteristika vergleichen zu können. Der Median als Teilungspunkt wurde gewählt, um ähnlich große Gruppen mit gleichem Gewicht zu bekommen.

Ein Punkt, der kritisch betrachtet werden sollte, ist die mit 140 Fällen vergleichsweise kleine Kohortengröße und die daraus resultierende eingeschränkte Aussagekraft mancher Ergebnisse: Aufgrund der geringen Fallzahl, 11 Fernmetastasen aus 7 Fällen, sind die Ergebnisse möglicherweise nicht repräsentativ.

6.1.6 Der Vergleich mit der therapienaiven Kohorte

Um den Einfluss der neoadjuvanten Therapie unabhängig bewerten zu können, wurde eine getrennte Betrachtung von neoadjuvanten und therapienaiven Magenkarzinomen vorgenommen. Die Ergebnisse dieser rein neoadjuvanten Kohorte wurden mit den Ergebnissen der therapienaiven Kohorte von Böger et al. verglichen [17]. Beide Kohorten wurden im selben Institut untersucht. Es wurde angestrebt, identische Marker, Färbemethoden und Bewertungssysteme zu verwenden. Aufgrund der geringen PD-L1-Expression mussten aber Cut-off Werte angepasst und die Score Prozentränge der PD-L1-positiven Immunzellen verringert werden. Dennoch zeigten beide Kohorten viele Gemeinsamkeiten, was mir ermöglichte, den Einfluss einer neoadjuvanten Therapie möglichst ohne Störgrößen zu untersuchen.

Beide Studien arbeiteten mit kaukasischen Patienten aus dem gleichen mitteleuropäischen Einzugsgebiet. Ein weiterer Vorteil des Vergleichs mit dieser therapienaiven Kohorte ist die ähnliche Gesamtzusammensetzung der beiden Kohorten. Die Verteilung auf die klinisch-pathologischen Merkmale war größtenteils ähnlich (mittleres Patientenalter: therapienaiv 68 Jahre, neoadjuvant 63,8 Jahre; intestinaler Phänotyp: therapienaiv 51,7%, neoadjuvant 44,3%). Obwohl sich der Anteil an Frauen von 37,6% auf 20% in der neoadjuvanten Kohorte verringert hatte, zeigten beide Kohorten ein männliches Übergewicht (therapienaiv 62%; neoadjuvant 80%). Bei der Lokalisation waren Unterschiede in den beiden Kohorten zu erkennen. Der Anteil von Patienten mit Tumoren des proximalen Magens betrug in der neoadjuvanten

Kohorte 64,3% und war somit doppelt so hoch wie in der therapienaiven Gruppe mit 31,6%.

Weitere Unterschiede waren erwartungsgemäß bei der TNM-Kategorie zu erkennen. Der Vergleich der TNM-Kategorie der neoadjuvant behandelten und der therapienaiven Patienten ist aufgrund der behandlungsbedingten Tumorregression nicht statthaft. Dies wird durch die unterschiedliche Verteilung der Erkrankungsstadien eindrucksvoll untermauert (ypT3 neoadjuvante Kohorte 52,9% vs. pT3 therapienaive Kohorte 40,2%, ypT4 neoadjuvante Kohorte 7,1% vs. pT4 therapienaive Kohorte 36,3% und ypT0 neoadjuvante Kohorte 11,4% vs. pT0 therapienaive Kohorte 0,0%).

Auch bei der N- und L-Kategorie waren in der neoadjuvanten Kohorte jeweils mehr Fälle mit N0/L0 - Status nachweisbar (ypN0 neoadjuvante Kohorte 36,4% vs. pN0 therapienaive Kohorte 28,6%, ypL0 neoadjuvante Kohorte 70,0% vs. pL0 therapienaive Kohorte 48,8%).

6.1.6.1 Unterschiedliche Cut-off-Werte

Die beiden Studien arbeiteten zwar mit demselben IRS und ähnlichen Bewertungssystemen, dennoch wurde an unterschiedlichen Rängen dichotomiert. In der neoadjuvanten Kohorte erfolgte die Teilung von Tumorzellen in positiv und negativ beim IRS 0 vs. ≥ 2 , die therapienaive Kohorte hingegen wählte einen IRS ≤ 2 vs. > 2 zur Dichotomisierung. Daraus ergab sich, dass die Korrelationen der beiden Kohorten mit den klinisch-pathologischen Charakteristika nicht gleich bewertete Magenkarzinome widerspiegeln. Hätte ich für die neoadjuvante Kohorte ebenfalls den IRS ≤ 2 vs. > 2 zur Dichotomisierung verwendet, wären nur 18 (15,1%) PD-L1-positive Magenkarzinome als positiv klassifiziert worden.

Die gleiche Problematik galt auch für PD-L1-positive Immunzellen. Hier wurde in der neoadjuvanten Kohorte am Median $\leq 1\%$ vs. $> 1\%$ geteilt. Die therapienaive Kohorte teilte ebenfalls am Median aber bei $< 10\%$ vs. $\geq 10\%$. Auch hier würde sich der Prozentsatz PD-L1 positiv klassifizierter Fälle drastisch senken, hätte ich mit dem gleichen Cut-off Wert wie die therapienaive Kohorte gearbeitet (Tabelle 9).

Trotz der Unterschiede in den beiden Kohorten kann der Vergleich dieser neoadjuvanten Kohorte und der therapienaiven Kohorte wertvolle Hinweise auf die

Veränderung der Immuncheckpointproteine PD-L1 und PD-1 und anderer Eigenschaften wie dem MSI-, EBV-, HER2- und MET-Status durch neoadjuvante Therapie liefern.

Die unterschiedlichen Cut-off-Werte geben den ersten Hinweis auf den Einfluss der neoadjuvanten Therapie auf die Expression von PD-L1 und PD-1.

6.2 Inhaltliche Diskussion

6.2.1 PD-L1 und PD-1

6.2.1.1 Verminderte PD-L1-Expression

Bei dem immunhistologisch geführten Nachweis von PD-L1 in Tumorzellen und Immunzellen gelang mir generell der Nachweis einer verminderten Expression. Bei Tumorzellen verringerte sich die Anzahl PD-L1-positiver Magenkarzinome von 30,1% in der therapienaiven Kohorte auf 22,7% in der neoadjuvanten Kohorte. Auch die Expressionsstärke wurde schwächer. Beim Vergleich des Cut-off Wertes $IRS \leq 2$ vs. >2 , wie er von der therapienaiven Kohorte verwendet wurde, zeigte die therapienaive Kohorte in 23,9% und die neoadjuvante Kohorte nur zu 15,1% eine PD-L1-Expression. In Immunzellen sah ich zwar in der neoadjuvanten Kohorte häufiger eine PD-L1-Expression (neoadjuvant 96,4%; therapienaiv 88,4%) durch die Betrachtung der unterschiedlichen Mediane (neoadjuvant 1%; therapienaiv 5%) wurde aber auch hier deutlich, dass die PD-L1-Expression abnahm.

Aufgrund der ähnlichen Methoden und oben genannten Gemeinsamkeiten der beiden Kohorten führe ich diese Unterschiede auf den Einfluss der neoadjuvanten Therapie zurück. Schon frühere Studien haben berichtet, dass eine Bestrahlung und/oder Chemotherapie die Tumormikroumgebung verändert [20, 80–82]. Durch die chemotherapiebedingte Zerstörung der Tumorzelle könnte es zum Wegfall des Antigens und zur Verringerung der Antigenlast kommen. Dies könnte eine Veränderung der PD-L1-Expression bedingen und eine Erklärung für eine geringere PD-L1-Expression sein.

Die asiatische Studie von Xing et al. identifizierte mit 37,8% einen höheren Prozentsatz an positiven PD-L1-Fällen in Tumorzellen als die beiden kaukasischen Kohorten [73]. Dies könnte auf die ethnischen Unterschiede der Kohorten und die damit verbundenen unterschiedlichen Tumormikroumgebungen zurückzuführen sein [77].

Die Hypothese „Die PD-L1-Expression wird durch neoadjuvante Chemotherapie verändert“ kann in Bezug auf die Auftretenswahrscheinlichkeit angenommen werden.

6.2.1.2 Die Korrelation der PD-L1 mit den klinisch-pathologischen Charakteristika weist Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede bei der neoadjuvanten gegenüber der therapienaiven Kohorte auf

Trotz der verminderten PD-L1-Expression fanden sich Gemeinsamkeiten mit der therapienaiven Kohorte. Einige Zusammenhänge blieben auch nach neoadjuvanter Therapie erhalten. Es gab eine signifikante Übereinstimmung des PD-L1-Status zwischen den Tumor- und Immunzellen (therapienaive $p < 0,001$; neoadjuvante $p < 0,001$). Tumoren mit PD-L1 exprimierenden Tumorzellen zeigten in beiden Kohorten häufig auch Immunzellen mit einer PD-L1-Expression im Primärtumor. Dies weist auf einen eher „allgemeinen“, nicht zellspezifischen Effekt hin und spricht für eine simultane Stimulation von PD-L1 auf Tumor- und Immunzellen.

In der therapienaiven Kohorte fand sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) der PD-L1-Expression in Tumorzellen in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation (distal vs. proximal). Dieser war in der neoadjuvanten Kohorte, vermutlich durch die kleinere Kohortengröße bedingt, nicht nachweisbar ($p = 0,258$). Dennoch zeigten beide Kohorten ein vermehrtes Auftreten von PD-L1 in Tumorzellen proximal gelegener Tumoren (neoadjuvant 26,3% proximal vs. 16,3% distal, therapienaiv 34,5% proximal vs. 18,7% distal).

Beim Phänotyp nach Lauren kam es zu Verschiebungen in den einzelnen Gruppen, dennoch lagen in beiden Kohorten gemeinsame Tendenzen vor. In beiden Kohorten war die Wahrscheinlichkeit, beim unklassifizierten Typ eine PD-L1-Expression zu zeigen, hoch (PD-L1 in Tumorzellen neoadjuvant 45,5%, therapienaiv 58,3%; PD-L1 in Immunzellen neoadjuvant 46,2%, therapienaiv 47,9%). Der unklassifizierte Phänotyp ist laut Pereira et al. mit einem an Immunzellen reichen Entzündungsinfiltrat assoziiert [83]. Der diffuse Phänotyp nach Lauren ist mit wenigen Immunzellen in der Tumorumgebung assoziiert [6, 63]. Sowohl die neoadjuvante als auch die therapienaive Kohorte zeigten bei diesem Phänotyp eine geringere Wahrscheinlichkeit der PD-L1-Expression (PD-L1 in Tumorzellen neoadjuvant 19,2%, therapienaiv 6,2%). Der vermehrte Nachweis PD-L1-positiver Tumorzellen bei Tumoren, deren Tumorumgebung reich an Immunzellen ist, erfolgte auch nach neoadjuvanter Chemotherapie [6, 63].

Der häufigere Nachweis PD-L1-positiver Tumorzellen bei MSI- und EBV-positiven Magenkarzinomen blieb nach der neoadjuvanten Chemotherapie erhalten (Abbildung 22), verlor aber im Vergleich zur therapienaiven Kohorte auf Grund geringer Fallzahl an Signifikanz (neoadjuvant: Immunzellen $p=0,058$ Tumorzellen $p=0,389$; therapienaiv: Immunzellen $p=0,282$ Tumorzellen $p=0,001$) [19, 59, 60]. Pereira et al. beschrieben ebenfalls eine große Übereinstimmung PD-L1- und EBV-positiver Tumoren und erkannte ein an Immunzellen reiches Entzündungsinfiltrat bei diesen Tumoren [83].

Andere klinisch-pathologischen Eigenschaften zeigten in der neoadjuvanten Kohorte hingegen Veränderungen und bilden so ein weiteres Argument für die Hypothese der veränderten Expression von PD-L1 nach neoadjuvanter Chemotherapie. Meine neoadjuvante Kohorte konnte die signifikanten Korrelationen der therapienaiven Kohorte weder bei den Tumorzellen (therapienaiv signifikante Korrelationen mit dem Geschlecht, der Tumorlokalisierung, dem Laurén Phänotyp, dem UICC-Stadium) noch bei Immunzellen (therapienaiv signifikante Korrelationen mit den Kategorien T-, M- und L-Kategorie, UICC-Stadium) bestätigen.

Ich sah eine Verschiebung hin zu mehr Frauen mit PD-L1-positiven Tumoren (PD-L1 in Tumorzellen: neoadjuvant 36,4% Frauen vs. 16,6% Männer, therapienaiv 17,7% Frauen vs. 27,7% Männer). Dieses Phänomen könnte auf das unterschiedliche Immunenvironment von Frauen und Männern zurückzuführen sein.

Bei der TNM-Kategorie kam es ebenfalls zu leichten Verschiebungen. Die größte Wahrscheinlichkeit der PD-L1-Expression in der Kategorie T2, wie sie in der therapienaiven Kohorte zu finden war (Tumorzellen pT2 48,1%; Immunzellen pT2 57,4%), konnte ich nach neoadjuvanter Chemotherapie (Tumorzellen ypT2 21,1%; Immunzellen ypT2 25,0%) nicht nachweisen. In der neoadjuvanten Kohorte kam es zu einer gleichmäßigen Verteilung der PD-L1-Expression über alle Stadien (PD-L1 in Tumorzellen ypT1 23,5%, ypT2 21,1%, ypT3 23,3%, ypT4 20,0%).

Bei der L-Kategorie kam es zu einer Umkehr der PD-L1-Expression in Immunzellen (PD-L1 in Immunzellen: neoadjuvant 30,6% ypL0, 51,2% ypL1; therapienaiv 42,1% pL0, 29,1% pL1), ebenso bei der V-Kategorie (PD-L1 in Immunzellen: neoadjuvant 35,7% ypV0, 50,0% ypV1; therapienaiv 36,6% pV0, 24,5% pV1).

Einige Korrelationen der klinisch-pathologischen Eigenschaften mit der PD-L1-Expression scheinen nach neoadjuvanter Chemotherapie erhalten zu bleiben. Andere Eigenschaften zeigten, wie in meiner Hypothese vermutet, Veränderungen. Diese Veränderungen und der Mangel an Korrelationen kann zum Teil mit der Stichprobengröße zusammenhängen. Es könnte jedoch auch angenommen werden, dass die neoadjuvante Therapie die Zusammenhänge der klinisch-pathologischen Eigenschaften unbehandelter Magenkarzinome mit der PD-L1-Expression in einem gewissen Grad beeinflussen kann.

6.2.1.3 Vermehrte PD-L1-Expression bei schlechtem Therapieansprechen

Betrachtete man genauer, welche Tumoren PD-L1 exprimieren, fiel ein Zusammenhang mit dem Therapieansprechen auf. Der Nachweis von PD-L1 in Tumor- und Immunzellen korrelierte signifikant mit dem Regressionsgrad nach Becker (Tumorzellen $p=0,032$, Immunzellen $p=0,001$) sowie dem prozentualen Anteil an vitalen Tumorresiduen (Tumorzellen $p=0,002$, Immunzellen $p< 0,001$). Die PD-L1-Expression steigerte sich nicht linear zum Anteil der vitalen Tumorzellen. Hauptsächlich Tumoren mit einem Becker-Regressionsgrad 3 bzw. einem hohen Prozentsatz vitaler Tumorzellresiduen (Q4 >85% vitale Tumorzellen) zeigten eine erhöhte PD-L1-Expression (Abbildung 20 & 21).

Es wird vermutet, dass es durch die Strahlen- oder Chemotherapie-induzierte lokale Entzündungsreaktion zur Infiltration tumorspezifischer T-Zellen kommt. Gleichzeitig wird die PD-L1-Expression in der Tumormikroumgebung induziert. Dies führt zur Abschwächung der Antitumorimmunität [20, 82]. Diese Vermutung deckt sich mit meinen Ergebnissen. Je geringer der Effekt der neoadjuvanten Therapie war, desto mehr PD-L1 und desto mehr vitale Tumorzellen waren vorhanden. Eine Chemotherapie könnte einen Selektionsdruck auslösen. Bestimmte Magenkarzinome könnten mit einer vermehrten Expression von PD-L1 reagieren, um so einer Zerstörung des Immunsystems zu entgehen. Sie zeigten somit ein schlechteres therapeutisches Ansprechen.

Auch die Ergebnisse von Sohn et al. decken sich mit meinen Beobachtungen [62]. Die Subgruppe der chromosomal instabilen Tumoren, welche eine niedrige Immunsignatur aufweist und nicht gehäuft mit PD-L1 assoziiert ist, profitiert am meisten von einer

adjuvanten Chemotherapie [62]. Auch in meiner Studie zeigten Tumoren, die durch ein geringes Entzündungsinfiltrat gekennzeichnet waren, wie der diffuse Phänotyp nach Lauren, seltener eine PD-L1-Expression in Tumorzellen. Des Weiteren haben auch in meiner Studie Tumoren mit einem guten Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie und somit einem niedrigen Becker-Regressionsgrad häufiger keine PD-L1-Expression in Tumor- und Immunzellen. Aber auch andere Mechanismen müssen bei der Wirkung von Strahlen- oder Chemotherapien eine Rolle spielen, denn die Subgruppe der genomisch stabilen Magenkarzinome weist ebenfalls keine erhöhte PD-L1-Expression auf, bezieht aber laut Sohn et al. den geringsten Nutzen aus einer adjuvanten Chemotherapie [62].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Ansprechrate auf eine neoadjuvanten Chemotherapie mit der Expression von PD-L1 korreliert. Um die Frage zu klären, ob eine hohe PD-L1-Expression ein schlechtes Therapieansprechen bedingt oder ob es durch ein schlechtes Therapieansprechen zu einer erhöhten PD-L1-Expression kommt, sind prospektive Studien oder eine Prä- und Post-Chemotherapie Untersuchung der PD-L1-Expression erforderlich.

6.2.1.4 Vermehrte PD-1-Expression

Mit 91,3% PD-1-positiver TIL zeigte die neoadjuvante Kohorte eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zu den beiden therapienaiven Studienkohorten mit 31,7% (Xing et al.) und 53,8% (Böger et al.) [17, 73]. Diese Erhöhung könnte durch die von der neoadjuvanten Therapie induzierte Tumormikrobiomveränderung bedingt sein [20, 80–82]. Des Weiteren beobachtete ich in der neoadjuvanten Kohorte nicht wie die therapienaive Kohorte einen Anstieg der Häufigkeit von PD-1-positiven TIL in Abhängigkeit der PD-L1-positiven Tumorzellen im Primärtumor, sondern generell eine gesteigerte Expression (Abbildung 29). Dies zeigt, dass die Expression von PD-1 und PD-L1 nicht miteinander verknüpft sind. Die PD-1-Expression stellt keinen Indikator für den Behandlungseffekt dar. In dieser durchweg vermehrten Expression sehe ich ein Argument für meine Hypothese „neoadjuvante Chemotherapie verändert die PD-1-Expression“.

Bei der Anzahl der PD-1-positiven Lymphozytenaggregate unterschieden sich die beiden Kohorten hingegen kaum (88,8% und 89,1%).

Die Expressionsveränderung von PD-1 durch die neoadjuvante Chemotherapie scheint nicht alle Immunzellen gleichermaßen zu betreffen.

6.2.1.5 Veränderte PD-1-Korrelationen mit den klinisch-pathologischen Charakteristika

In der neoadjuvanten Kohorte fand sich, im Gegensatz zur therapienaiven Kohorte, kein signifikanter Zusammenhang zwischen der PD-1-Expression in TIL und den PD-L1-positiven Tumor- und Immunzellen (neoadjuvante Kohorte: Tumorzellen $p=0,464$ Immunzellen $p=0,210$; therapienaive Kohorte: Tumorzellen $p<0,001$ Immunzellen $p<0,001$). Es zeigte sich, wie oben beschrieben, eine viel höhere Grundwahrscheinlichkeit einer PD-1-Expression unabhängig von der Stärke der PD-L1-Expression.

Auch bei den signifikanten Korrelationen war eine Veränderung der PD-1-Expression zu erkennen. Im Vergleich zur therapienaiven zeigte die neoadjuvante Kohorte eine signifikante Korrelation mit der T-Kategorie ($p=0,024$) und dem UICC-Stadium ($p=0,028$). Je höher die T-Kategorie und das UICC-Stadium waren, je fortgeschrittener der Tumor war, desto mehr PD-1-positive TIL fanden sich im Tumor und Narbengewebe. Ob die neoadjuvante Chemotherapie bei TIL zusätzlich zur vermehrten Expression eine Verschiebung der Expression zeigt, ist auf Grund der geringen Fallzahl aber fraglich. Die Korrelationen verloren nach der Simes-Korrektur für multiple Testverfahren ihre Signifikanz.

Auffällig war weiter, dass die Veränderung nicht wie bei der PD-L1-Expression mit dem Ansprechen der neoadjuvanten Chemotherapie zusammenhing (Becker-Regressionsgrad $p=0,234$; Anteil an vitalen Tumorresiduen $p=0,262$). Ich wies eine generell gesteigerte Expression nach. Daher kann die erhöhte Expression von PD-1 als eine allgemeine Reaktion auf eine Chemotherapie interpretiert werden und nicht als Indikator für das Therapieansprechen.

6.2.2 Gegen PDL1/PD-1 gerichtete Immuncheckpointinhibitoren

In den vorangegangenen Abschnitten habe ich Argumente zum Beweis meiner Hypothese der veränderten PD-L1- und PD-1-Expression angebracht. Es wurde deutlich, dass es zu einer vermehrten Expression von PD-1 in TIL kam und die PD-L1-Expression gehäuft bei Tumoren mit einem schlechten Therapieansprechen auftrat. Im Weiteren will ich Überlegungen anbringen, wie die neu gewonnenen Erkenntnisse klinisch genutzt werden könnten.

Es gab schon früher Überlegungen, dass chemoimmuntherapeutische Regime eine Möglichkeit darstellen, die Tumormikroumgebung zu verändern und die Wirksamkeit zielgerichteter Therapeutika zu fördern [20, 80]. Da ein schlechtes Therapieansprechen mit einer hohen PD-L1-Expression im Tumor und Immunzellen einhergeht, scheinen Magenkarzinome mit einem schlechten Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie somit besonders gut geeignet für eine adjuvante Zweitlinientherapie mit gegen PD-L1/PD-1 gerichteten Immuncheckpointinhibitoren.

Eine andere Möglichkeit, die Ergebnisse dieser Studie zu nutzen, wäre die Kombination und gleichzeitige Gabe von gegen PD-L1/PD-1 gerichteten Immuncheckpointinhibitoren und neoadjuvanter Chemotherapie oder Bestrahlung. Dies hat im Tiermodell schon vielversprechende Ergebnisse gezeigt [82]. Studien, die diese Ergebnisse auf menschliche Krebserkrankungen übertragen, laufen derzeit oder sollen in Kürze starten (NCT02268825, NCT02642809 NCT02730546). Eine Studie beschäftigt sich mit der multimodalen neoadjuvanten Therapie lokal fortgeschrittener Malignome des gastroösophagealen Übergangs. Geprüft wird der neoadjuvante Einsatz des Checkpointinhibitors Pembrolizumab in Kombination mit einer Carboplatin und Paclitaxel-basierten Radio-/Chemotherapie, gefolgt von einer Tumorresektion und einer adjuvanten Behandlung mit Pembrolizumab [20].

Der Vorteil der gleichzeitigen Anwendung wäre die verbesserte Wirkung der Chemotherapie und die Vermeidung von Resistenzen [20, 82]. Die Frage, welche Tumoren verstärkt PD-L1 exprimieren und somit von der gleichzeitigen Gabe profitieren würden, ist nicht geklärt. In meiner Studie zeigte ein Teil der Tumoren ein gutes Ansprechen auf die herkömmliche neoadjuvante Therapie. Vermehrt zeigten nur Tumoren mit besonders schlechtem Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie eine erhöhte PD-L1-Expression. Ob dennoch alle Patienten eine mit Nebenwirkungen

verbundene Immuncheckpointtherapie bekommen sollten oder wie die richtigen Patienten ausgewählt werden können, müssen zukünftige Studien klären.

Der Vorteil einer postoperativen (adjuvanten) Therapie, mit gegen PD-L1/PD-1 gerichteten Immuncheckpointinhibitoren, wäre die gezielte Anwendung bei Tumoren mit hoher PD-L1-Expression. In dieser neoadjuvanten Studie waren es Magenkarzinome mit einem schlechten Therapieansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie, welche eine höhere Wahrscheinlichkeit einer PD-L1-Expression zeigten. Die Patientenselektion kann mittels Untersuchung des PD-L1-Status am resezierten Magentumor erfolgen. Aber auch hier müssen Studien erst den Vorteil einer adjuvanten oder neoadjuvanten Therapie mit Immuncheckpointinhibitoren gegenüber dem aktuellen Therapiestandard belegen.

6.2.3 PD-L1-Expression der Lymphknotenmetastasen und des Primärtumors waren konkordant

In den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen zeigten 26,0% (19 von 73) der untersuchten Magenkarzinome eine membranständige PD-L1-Expression in Tumorzellen. Dies ist im Vergleich zu der PD-L1-Expression der Tumorzellen im Primärtumor (=22,7%) leicht erhöht.

Es gab sowohl PD-L1-positive und -negative Primärkarzinome mit PD-L1-positiven Lymphknotenmetastasen als auch PD-L1-positive und -negative Primärkarzinome mit PD-L1-negativen Lymphknotenmetastasen. Vier der untersuchten Fälle zeigten sogar eine komplette Regression des Primärtumors, aber vitale Tumorzellen in den Lymphknotenmetastasen. Einer dieser vier Fälle exprimierte PD-L1 in den Lymphknotenmetastasen. Dies verdeutlicht, dass auch die Wirkung einer Chemotherapie heterogen ist. Zum einen können nur Teilbereiche eines Tumors mit Regression auf die Chemotherapie antworten, zum anderen kann die Chemotherapie im Primärtumor anders als in den Lymphknotenmetastasen ansprechen. Trotz der Heterogenität bestand ein signifikanter Zusammenhang der PD-L1-Expression zwischen den Tumorzellen im Primärtumor und den Tumorzellen in den Lymphknotenmetastasen ($p < 0,001$). Je mehr und je stärker Tumorzellen im Primärtumor eine PD-L1-Expression zeigten, desto mehr Tumorzellen zeigten diese auch in den Lymphknotenmetastasen. Trotz der unterschiedlichen

Immunumgebungen von Primärtumor und Lymphknotenmetastasen scheint die PD-L1-Expression konkordant zu sein.

Bei der Betrachtung der klinisch-pathologischen Charakteristika fallen teilweise Verschiebungen der Korrelation in den Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Primarius auf. Distale Tumoren zeigten häufiger in den Lymphknotenmetastasen eine PD-L1-Expression als im Primärtumor (distaler Typ: Primärtumor 16,3%; Lymphknotenmetastasen 27,3%). Dies könnte, wie auch die unterschiedliche Verteilung im UICC-Stadium, mit der spezialisierten Teilkohorte der Magenkarzinome mit Lymphknotenmetastasen zusammenhängen.

Dennoch sehe ich Belege für das gleichsinnige Verhalten der Lymphknotenmetastasen und ihrer Primärtumoren. Die Lymphknotenmetastasen zeigten, wie die Tumorzellen im Primarius, häufiger eine PD-L1-Expression bei Frauen (PD-L1-positive Tumorzellen 55,6% Frauen vs. 29,9% Männer; $p=0,046$). Ebenso sah ich beim unklassifizierten Phänotyp nach Lauren die höchste Wahrscheinlichkeit einer PD-L1-Expression (unklassifiziert 40,0%, intestinal 18,8%, diffus 36,4% gemischt 25,0%). Es ist bekannt, dass sich die Tumorumgebung in den Lymphknotenmetastasen unterscheidet und eine unterschiedliche Immunumgebung vorliegen kann. Trotz dieser unterschiedlichen Immunumgebung sah ich meistens eine konkordante PD-L1-Expression in den Lymphknotenmetastasen und den Primärtumoren.

Die Korrelation der PD-L1-positiven Tumorzellen in den Lymphknotenmetastasen mit dem Anteil an vitalen Tumorresiduen in den Primärtumoren zeigte ebenfalls, wie in den Primärtumoren, einen signifikanten Zusammenhang ($p=0,005$). Da der prozentuale Anteil an vitalen Tumorzellen in den Lymphknotenmetastasen nicht erhoben wurde, ist es unmöglich, Aussagen über den Zusammenhang der PD-L1-Expression mit dem Regressionsgrad zu machen. Der Zusammenhang lässt sich aber durch die signifikante Korrelation der PD-L1-Expression von Tumorzellen in den Primärtumoren und den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen nachvollziehen ($p<0,001$). Je mehr Tumorzellen im Primärtumor PD-L1 positiv waren, desto mehr Tumorzellen waren auch in den Lymphknotenmetastasen positiv. Da die PD-L1-positiven Tumorzellen in den Primärtumoren signifikant mit dem Ansprechen auf eine Chemotherapie korrelierten (vitale Tumorresiduen $p=0,001$, Becker-Regressionsgrad

p=0,032), korrelierte indirekt auch die PD-L1-Expression in den Lymphknotenmetastasen mit dem Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie (vitale Tumorresiduen p=0,005, Becker-Regressionsgrad p=0,218). Ob die Korrelation mit dem echten Anteil an vitalen Tumorzellen in den Lymphknotenmetastasen genauer übereinstimmt, kann auf Grund der fehlenden Daten nicht bestätigt werden.

Es bleibt festzuhalten, dass trotz der großen Variabilität der PD-L1-Expression und dem Ansprechen der neoadjuvanten Chemotherapie die Wahrscheinlichkeit signifikant erhöht ist, bei einer PD-L1-Expression in Tumorzellen im Primärtumor auch eine PD-L1-Expression in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen zu finden. Ob Patienten mit PD-L1-negativen Primärtumoren und PD-L1-positiven Lymphknotenmetastasen von einer Immuncheckpointtherapie profitieren, müssen zukünftige Studien prüfen [65].

6.2.4 Veränderungen von PD-L1- und PD-1-Expression in den Fernmetastasen

Die therapienaive Kohorte zeigte in 33,3% der Fernmetastasen eine PD-L1-Expression. Mit einer PD-L1-Expression in nur 2 der 11 Metastasen, 1 von 7 Fällen, zeigte die neoadjuvante Kohorte, redundant zu den Primärtumoren, deutlich seltener eine PD-L1-Expression in Tumorzellen. Obwohl das PD-L1-Expressionsverhalten in beiden Kohorten ähnlich war (neoadjuvante Kohorte: 1%, 2+; therapienaive Kohorte: 0,1 bis 3% von 1+ bis 2+), konnte ich die Übereinstimmung von 80% PD-L1-Expression der Tumorzellen in den Primärtumoren und den korrespondierenden Fernmetastasen nicht bestätigen. Der PD-L1-positive Fall zeigte im Primärtumor keine PD-L1-Expression in Tumorzellen. Für diesen Fall gab es Metastasen mit positiver PD-L1-Expression in Tumorzellen als auch Metastasen ohne PD-L1. In meiner Studie konnte ich aber eine hohe Übereinstimmung der PD-L1-negativen Fälle in den Primärtumoren und den Fernmetastasen beobachten. Alle Primärtumorfälle mit Fernmetastasen zeigten keine PD-L1-Expression im Primärtumor.

PD-L1-positive Immunzellen wurden häufiger als in der therapienaiven Kohorte in 10 (90,9%) von 11 Fernmetastasen gefunden (therapienaiv: 73,3% PD-L1-positive Immunzellen). Der Prozentsatz an PD-L1-positiven Immunzellen war jedoch, wie schon beim Primärtumor, in der neoadjuvanten Kohorte geringer als in der therapienaiven (neoadjuvant 0-5%, therapienaiv 0-10%). Alle Primärtumoren mit

Fernmetastasen zeigten 1% PD-L1-positive Immunzellen. So sehe ich eine große Übereinstimmung mit den Fernmetastasen. Jedoch gab es auch hier innerhalb eines Falles Unterschiede bei den verschiedenen Metastasen. Diese schwanken zwischen 0% und 1% bzw. 1% und 5% und stimmen ebenfalls nicht in allen Fällen mit den Auswertungen im Primärtumor überein. Die therapienaive Kohorte zeigte auch hier eine Konkordanz von 80%.

TIL waren in 10 von 11 Fernmetastasen PD-1 positiv. Wie schon im Primärtumor sah ich auch hier bei den TIL eine häufigere Expression im Vergleich zur therapienaiven Kohorte mit 73,3%. Zusätzlich fand ich, ähnlich häufig wie beim Primärtumor, 89,9% PD-1-positive intratumorale Lymphfollikel. Wie schon bei der PD-L1-Auswertung gab es auch hier Unterschiede sowohl innerhalb eines Falls als auch zum Primärtumor.

Zu beachten ist, dass in der therapienaiven Kohorte nur Lebermetastasen untersucht worden waren. In meiner Studie zeigte die einzige Lebermetastase ebenfalls eine PD-L1-Expression. Die anderen von mir untersuchten Fernmetastasen (z.B. Peritonealmetastasen) exprimierten kein PD-L1 in Tumorzellen. Ob dies ein Zufall ist oder das Gewebe der Fernmetastase einen signifikanten Einfluss auf die PD-L1-Expression hat, kann auf Grund der geringen Fallzahl nicht abschließend geklärt werden.

6.2.5 Korrelation der Expression von PD-L1/PD-1 mit dem Überleben

6.2.5.1 Verlust des Überlebensvorteils PD-L1-positiver Tumoren

Diese Studie an neoadjuvant behandelten Tumoren zeigte im Gegensatz zu den beiden therapienaiven Kohorten von Xing et al. und Böger et al. keinen Überlebensvorteil von Patienten mit einer PD-L1-Expression [17, 73]. Es gab weder für PD-L1-positive Tumorzellen noch Immunzellen im Primärtumor und den Lymphknotenmetastasen einen Überlebensvorteil. Dies könnte zum einen auf das schlechtere Ansprechen PD-L1-positiver Tumoren auf die neoadjuvante Therapie zurückzuführen sein. Der Überlebensvorteil der therapienaiven Kohorte könnte dadurch ausgeglichen werden und verloren gehen. Zum anderen könnte die unterschiedliche Staffelung der einzelnen Subgruppen in Bezug auf Prognose und Therapieansprechen eine Rolle spielen. Das beste Überleben zeigten Patienten mit

MSI-Tumoren gefolgt von EBV-positiven und chromosomal instabilen Magenkarzinomen. Das schlechteste Überleben zeigten Patienten mit genomisch stabilen Magenkarzinomen [19, 62]. Von einer adjuvanten Chemotherapie profitierten hingegen Patienten mit chromosomal instabilen Tumoren am meisten, gefolgt von MSI-Tumoren. Wohingegen EBV-positive Karzinome keinen Zusammenhang zeigten und genomisch stabile Magentumoren den geringsten Nutzen aus der Chemotherapie zogen [19,62]. Durch die neoadjuvante Therapie kam es zum Verlust des Überlebensvorteils PD-L1-positiver Tumoren. Die Auswirkungen auf unbehandelte Magenkarzinome wurden vermutlich durch die perioperative Behandlung unterdrückt und moduliert. Es könnte angenommen werden, dass die PD-L1-Expression in einer größeren Patientenkohorte von neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen, aufgrund der erhöhten Expression bei Patienten mit schlechtem Ansprechen auf die Therapie, sogar als negativer Prognostiker ausfallen könnte.

6.2.5.2 Korrelation der Expression von PD-1 mit dem Überleben

Patienten in der therapienaiven Kohorte zeigten mit PD-1-positiven TIL ein besseres, aber nicht signifikantes, tumorspezifisches Überleben. Aus vermutlich den gleichen Gründen wie bei PD-L1 konnte ich keinen Zusammenhang zwischen PD-1 und dem Überleben aufzeigen.

Die Aussagekraft des schlechteren Überlebens von Patienten ohne Lymphozytenaggregate/ intratumorale Lymphfollikel bzw. Lymphozytenaggregate ohne PD-1-Expression halte ich aufgrund der kleinen Kohorte für gering.

6.2.6 Epstein-Barr-Virus und Mikrosatelliteninstabilität

6.2.6.1 Die Eigenschaften MSI- und EBV-positiver Tumoren blieben nach neoadjuvanter Therapie erhalten

Sowohl beim MSI-Status als auch beim EBV lag die Prävalenz in dieser Studie niedriger als bei TCGA [19]. Unterschiedliche Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Auswertungsmethoden konnte auch ich bestätigen [50]. Nach der histologischen Auswertung zeigten 15 (12,40%) von 121 Magenkarzinomen eine MSI. Durch die DNA-Extraktion konnten nur 8 (6,61%) der 121 MSI-Fälle bestätigt werden. Mit 6,6% MSI-Fällen lag die neoadjuvante Kohorte nahe an der therapienaiven Kohorte, welche 7,5% MSI-Fälle beschrieb. Auch meine 2,5% EBV-Fälle lagen näher an der therapienaiven Kohorte von Böger et al., welche 5% EBV-positive Fälle zeigt, als an der von TCGA mit 9% [19, 59]. Die neoadjuvante Kohorte zeigte eine ähnliche Prävalenz bei MSI und dem EBV wie die therapienaive Kohorte.

Wie bei Mathiak et al. zeigte auch in der neoadjuvanten Kohorte keiner der MSI-Fälle eine EBV-Positivität, was die Einteilung in vier Subgruppen von TCGA bestätigt [19, 50].

Die neoadjuvante Kohorte konnte im Gegensatz zur therapienaiven Kohorte keine signifikante Korrelation des Mikrosatellitenstatus mit dem Lauren Phänotyp (neoadjuvant $p=0,521$; therapienaiv $p=0,001$) zeigen [50, 84, 85]. Die neoadjuvante Kohorte konnte nicht bestätigen, dass MSI-Tumoren nicht beim diffusen Typen auftreten, sondern zeigte eine gleichmäßige Verteilung der einzelnen Typen und trat in dieser Kohorte nicht beim unklassifizierten Typ auf (MSI: intestinal 5,1%, diffus 8,3%, gemischt 12,0%, umklassifiziert 0,0%). Dieses Phänomen könnte auf die kleine Kohorte zurückzuführen sein.

Das signifikant vermehrte Auftreten bei älteren Patienten konnte ich auf Grund der kleinen Stichprobe nicht bestätigen, allerdings waren 7 der 8 MSI Patienten älter als der Altersmedian von 64 Jahren (neoadjuvant $p=0,069$; therapienaiv $p=0,042$). Meine signifikante Korrelation mit dem Geschlecht ($p=0,005$), Frauen zeigten vermehrt eine MSI, deckt sich mit den Ergebnissen aus früheren Studien [84, 85]. Zu beachten ist die kleine Kohortengröße der MSI-Fälle, bestehend aus 5 Frauen und 3 Männern. Nach Simes-Korrektur für multiple Testverfahren verlor die Korrelation an Signifikanz.

Der EBV-Status zeigt trotz meiner kleinen Kohorte Gemeinsamkeiten mit der therapienaiven Kohorte. Alle drei EBV-positiven Fälle der neoadjuvanten Kohorte waren Männer und spiegelten so das signifikante Ergebnis der therapienaiven Kohorte mit dem Geschlecht ($p=0,003$) wider. Zu der signifikanten Korrelation der therapienaiven Kohorte mit dem Phänotyp nach Lauren ($p=0,005$) konnte ich aufgrund der kleinen neoadjuvanten Kohorte keine Aussagen treffen.

Die neoadjuvante Chemotherapie hatte, wie schon bei der Prävalenz festgestellt, keine großen Auswirkungen auf die klinisch-pathologischen Eigenschaften EBV-positiver und MSI-Tumoren.

6.2.6.2 Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie

Die drei EBV-positiven Tumoren zeigten einen Anteil an vitalen Tumorzellen von 5%, 30% und 100%. Auswirkungen des EBV-Status auf das Ansprechen der neoadjuvanten Chemotherapie können auf Grund der geringen Fallzahl nicht erkannt werden.

Die MSI-Tumoren zeigten in 7 von 8 Fällen einen Becker-Regressionsgrad 3. Trotz des fehlenden signifikanten Zusammenhangs (Becker-Regressionsgrad $p=0,147$; Anteil an vitalen Tumorresiduen in Quantilen $p=0,072$) sah ich bei MSI-Tumoren häufig ein schlechteres Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie. Auch Smyth et al. zeigten, dass Patienten mit MSI-Tumoren nicht von einer perioperativen Chemotherapie profitieren. Der Überlebensvorteil von MSI-Tumoren ging durch perioperative Chemotherapie verloren, Patienten mit MSS-Tumoren zeigten ein überlegenes Überleben [54].

6.2.6.3 Erhöhte PD-L1- und PD-1-Expression in MSI- und EBV-positiven Tumoren

Die TCGA zeigte eine erhöhte PD-L1-Expression in MSI- und EBV-positiven Tumoren [19]. Dies konnte die therapienaive Kohorte von Mathiak et al. für die PD-L1-Expression in Tumorzellen für EBV ($p<0,001$) und MSI ($p=0,001$) und in Immunzellen für EBV ($p=0,003$) bestätigen [17, 50]. Meine neoadjuvante Kohorte zeigte im Vergleich zur therapienaiven Kohorte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen MSI- oder EBV-positiven Tumoren und PD-L1. Dies könnte auf die kleinere Kohorte

zurückzuführen sein, denn eine nicht signifikante Erhöhung in den beiden Subgruppen war auch in dieser neoadjuvanten Kohorte zu erkennen. Alle EBV-positiven Fälle zeigten entweder in Tumorzellen (zwei Fälle) und/oder in Immunzellen (zwei Fälle) eine PD-L1-Positivität. Auch MSI-Tumoren in der neoadjuvanten Kohorte zeigten, wie in Abbildung 22 zu sehen, häufiger als MSS-Tumoren eine PD-L1-Expression. Eine erhöhte PD-L1-Expression in der Gruppe der MSI- und EBV-positiven Tumoren bleibt auch nach der neoadjuvanten Therapie bestehen, wenn auch nicht signifikant.

Eine PD-1-Expression in TIL zeigten sogar alle 3 EBV-positiven und alle 8 MSI-Fälle. In der therapienaiven Kohorte konnte nach Simes-Korrektur kein signifikanter Zusammenhang zwischen der PD-1-Expression in Immunzellen und dem EBV- ($p=0,021$) oder MSI-Status ($p=0,606$) gefunden werden. Sowohl ein EBV-positiver als auch ein MSI-Tumor hat eine hohe Wahrscheinlichkeit eine PD-1-Expression in TIL zu zeigen.

Meine Hypothese, EBV-positive und MSI-Tumoren weisen auch nach neoadjuvanter Chemotherapie eine höhere PD-L1-Expression auf, konnte ich auf Grund der kleinen Kohorte statistisch nicht belegen. Die Ergebnisse legen dies aber nahe.

Die MSI- bzw. EBV-positiven Magenkarzinome scheinen auf Grund ähnlicher klinisch-pathologischer Eigenschaften zur therapienaiven Kohorte besonders gut geeignet zu sein für eine Immuncheckpointinhibitortherapie [6, 55]. Da in meiner neoadjuvanten Kohorte die PD-L1-Expression sowohl bei EBV-positiven als auch bei MSI-Tumoren erhöht war, könnte der EBV- bzw. MSI-Nachweis für eine Immuncheckpointinhibitortherapie qualifizieren.

6.2.6.4 Korrelation des Mikrosatelliten- und Epstein-Barr-Virus-Status mit dem Überleben

In dieser neoadjuvanten Kohorte gab es, obwohl die Überlebenskurven (Abbildung 26) dies suggerierten, keine signifikante Korrelation von MSI mit dem Überleben. Die therapienaiven Kohorten zeigen einen Überlebensvorteil von MSI-Tumoren [50–52]. Trotz der kleinen Kohorte vermute ich, dass die Auswirkungen der neoadjuvanten Therapie zum Verlust dieses Überlebensvorteils beigetragen haben könnte. Auch Smyth et al. zeigten, dass der Überlebensvorteil von MSI-Tumoren durch perioperative

Chemotherapie verloren gehen kann. Patienten mit MSS Tumoren zeigten nach perioperativer Chemotherapie ein besseres Überleben [54]. Aber auch das vermehrte Auftreten PD-L1-positiver Tumoren in der Subgruppe der MSI-Tumoren könnte ein weiterer Grund für den Verlust des Überlebensvorteils sein.

Aufgrund der geringen Fallzahl können keine Aussagen zum EBV-Status und dem Zusammenhang mit dem Überleben getätigt werden.

6.2.7 HER2- und MET-Status

6.2.7.1 Die Eigenschaften *HER2*-amplifizierter Tumoren blieben erhalten

Mit 6,6% *HER2*-positiver Fällen lag die neoadjuvante Kohorte nahe an der in der Literatur angegebenen Prävalenz von 7-43% und sehr nahe an der therapienaiven Kohorte welche in TMAs 6,3% *HER2*-positive Fälle identifizierte [64–67]. Durch die Evaluation des *HER2*-Status an Großflächenschnitten klassifizierte die therapienaive Kohorte für die weitere Statistik 8,1% *HER2*-positive Fälle [66].

Auch der Vergleich der klinisch-pathologischen Korrelationen zeigte mir die Ähnlichkeit beider Kohorten, trotz unterschiedlicher Therapien. Beide Kohorten zeigten eine Korrelation mit dem Tumortyp (neoadjuvant $p=0,043$; therapienaiv= $0,002$) und dem Tumorstadium (neoadjuvant T-Kategorie $p=0,045$; N-Kategorie $p=0,039$; UICC-Stadium $p=0,005$; therapienaiv Tumorgrad $p=0,003$). Die Korrelationen der neoadjuvanten Kohorte verloren jedoch nach Simes-Korrektur für multiple Testverfahren ihre Signifikanz. Beide Kohorten zeigten eine *HER2*-Amplifikation eher bei weniger fortgeschrittenen Tumoren. Alle 8 neoadjuvanten *HER2*-positiven Magenkarzinome waren vom intestinalen Phänotyp (13,6% *HER2*-amplifiziert beim intestinalen Typ; $p=0,043$). Die therapienaive Kohorte zeigte eine ähnliche Verteilung mit 12,9% *HER2*-positiver Tumoren vom intestinalen Typ (therapienaiv: intestinal 12,9%, diffus 3,6%, gemischt 3,4%, umklassifiziert 1,9%; $p=0,002$). Eine weitere nicht signifikante Gemeinsamkeit zeigten die beiden Kohorten bei der Lokalisation. Sieben der 8 *HER2*-positiven Magenkarzinome lagen in der neoadjuvanten Kohorte proximal (proximal 8,6%, distal 2,4%). Die therapienaive Kohorte zeigte mit 11,8% proximal und 6,5% distal gelegener Tumoren mit positiven *HER2*-Status eine ähnliche Verteilung.

Auffällig, aber nicht signifikant, war, dass in der neoadjuvanten Kohorte keiner der HER2-positiven Fälle MSI, EBV-positiv oder *MET*-amplifiziert war. Die aus früheren Studien gemeinsame Amplifikation von *HER2* und *MET* konnte ich, vermutlich aufgrund der kleineren Kohorte, nicht nachweisen [66, 69].

Der HER2-Status zeigte mit dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie keinen signifikanten Zusammenhang (Anteil an vitalen Tumorzellen Quartile $p=0,282$; Becker-Regressionsgrad $p=0,645$).

In der therapienaiven Kohorte brachte der HER2-Status weder einen Überlebensvorteil noch -nachteil ($p=0,452$). Andere Studien hingegen zeigten eine schlechtere Prognose und ein kürzeres Leben [64]. In dieser neoadjuvanten Kohorte hingegen zeigten HER2-positive Magenkarzinome ein signifikant besseres Überleben (neoadjuvant Gesamtüberleben $p=0,038$; das Gesamtüberleben verlor nach Simes-Korrektur die Signifikanz; tumorspezifisches Überleben $p=0,028$). Dass diese Ergebnisse der 8 HER2-positiven Magenkarzinome zufällig bedingt sind und nicht Auswirkungen der neoadjuvanten Chemotherapie waren, lässt sich nicht ausschließen und wird auf Grund der kleinen Kohorte für wahrscheinlich erachtet.

Diese neoadjuvante Kohorte zeigte keine signifikanten Unterschiede zur therapienaiven Kohorte und die klinisch-pathologischen Eigenschaften HER2-positiver Tumoren blieben nach neoadjuvanter Therapie erhalten. So scheint es keine Anhaltspunkte zu geben, die Therapie HER2-positiver Magenkarzinome in neoadjuvanter Regime zu ändern. Auf Grund der geringen Fallzahl bleiben die Ergebnisse überwiegend deskriptiv und sollten in größeren Fallserien noch einmal unabhängig überprüft werden.

6.2.7.2 Die Eigenschaften der *MET*-amplifizierten Tumoren blieben erhalten

Wie beim HER2-Status sah ich auch bei *MET*-positiven Magenkarzinomen nach neoadjuvanter Therapie eine ähnliche Prävalenz wie bei der therapienaiven Kohorte (neoadjuvant 4,8%; therapienaiv 5,3%) [69].

Auch für den *MET*-Status ergaben sich dieselben Korrelationen in beiden Kohorten mit den klinisch-pathologischen Parametern. Es bestanden Korrelationen mit der N-Kategorie (neoadjuvant $p=0,029$; therapienaiv $p=0,004$), der L-Kategorie (neoadjuvant

p=0,017; therapienaiv p=0,003) und dem R-Status (neoadjuvant p=0,025; therapienaiv p=0,005). Diese verloren jedoch in der neoadjuvanten Kohorte, auf Grund der geringen Fallzahl, nach Simes-Korrektur die Signifikanz. MET-Tumoren traten in beiden Kohorten bei invasiveren und weiter fortgeschrittenen Tumoren häufiger auf. Zwar konnte in der neoadjuvanten Kohorte nicht dieselbe signifikante Korrelation mit dem UICC-Stadium gezeigt werden (neoadjuvant p=0,240; therapienaiv p<0,001). Dennoch zeigten beide Kohorten auch hier ein fortgeschrittenes Tumorleiden und die größte Wahrscheinlichkeit einer MET-Amplifikation in Stadium IV (neoadjuvant 10,5%; therapienaiv 12,5%).

Die therapienaive Kohorte zeigte zusätzlich ein nicht signifikantes vermehrtes Auftreten bei Männern und der proximalen Lokalisation (Geschlecht p=0,041; Lokalisation p=0,075). Analog wiesen 5 von 6 MET-positiven Karzinomen der neoadjuvanten Kohorte ein männliches Geschlecht und 4 von 6 eine proximale Lokalisation auf.

Ich sah im Gegensatz zur therapienaiven Kohorte eine, wenngleich nach Simes-Korrektur nicht-signifikante, Korrelation mit dem Lauren Phänotyp (p=0,018). Der diffuse Phänotyp trug mit 16,7% die höchste Wahrscheinlichkeit einer MET-Amplifikation (neoadjuvant: intestinal 1,6%, diffus 16,7%, gemischt 0,0%, umklassifiziert 7,7%). In der therapienaiven Kohorte wiesen hingegen die meisten MET-positiven Fälle einen Mischtyp auf (therapienaiv: intestinal 5,4%, diffus 6,8%, gemischt 19,4%, umklassifiziert 7,8%). Die Gründe für diese Beobachtung sind unklar und sollten an größeren Fallserien untersucht werden.

Das Therapieansprechen korrelierte nicht mit dem MET-Status (Anteil an vitalen Tumorzellen Quartile p=0,320; Becker-Regressionsgrad p=0,177). Auffällig aber ebenfalls nicht signifikant war, dass in beiden Kohorten keiner der MET-positiven Fälle mikrosatelliteninstabil oder EBV-positiv war. Wie schon in der therapienaiven Kohorte, zeigten auch in meiner Kohorte MET-positive Magenkarzinome ein signifikant schlechteres Überleben (neoadjuvant Gesamtüberleben p <0,001, tumorspezifisches Überleben p<0,001), auch nach der Simes-Korrektur [69].

Auch beim MET-Status zeigte meine neoadjuvante Kohorte keine signifikanten Unterschiede zur therapienaiven Kohorte. Die klinisch-pathologischen Eigenschaften MET-positiver Tumoren blieben nach neoadjuvanter Therapie erhalten. So gab es

auch hier keine Anhaltspunkte, die Therapie MET-positiver Magenkarzinome im neoadjuvanten Regime zu ändern. MET-positive Magenkarzinome scheinen auch nach neoadjuvanter Therapie noch eine kleine Subgruppe von Magenkarzinomen mit sehr schlechter Prognose zu sein. Aufgrund der geringen Fallzahl haben diese Ergebnisse einen überwiegend deskriptiven Charakter, liefern aber weitere wichtige Belege für die besondere Tumorbilogie der MET-positiven Magenkarzinome.

6.2.7.3 Koexpression HER2- und MET-positiver Tumoren mit PD-L1/PD-1

In meiner neoadjuvanten Studie zeigten weder HER2- noch MET-positive Tumoren einen signifikanten Zusammenhang mit der PD-L1- oder PD-1-Expression. Eine geringe Anzahl Tumoren (HER2: Tumorzellen 1 von 8, Immunzellen 3 von 8; MET: Tumorzellen 3 von 6, Immunzellen 2 von 6) zeigten zwar das gleichzeitige Vorliegen einer PD-L1-Expression und einer *HER2*- oder *MET*-Amplifikation. Diese Koexpression ist aber geringer ausgeprägt als in der therapienaiven Kohorte. Dort zeigten noch fast 50% der PD-L1-positiven Tumoren eine HER2-Überexpression [17]. Es gibt Überlegungen zu Kombinationstherapien verschiedener Immuncheckpointinhibitoren, um die Resistenzbildungen zu vermeiden und ein besseres Ansprechen zu erreichen [17, 86]. Eine gemeinsame Gabe von gegen Her2/neu bzw. MET und PD-L1/PD1 gerichteten Immuncheckpointinhibitoren scheint nach meinen Ergebnissen nur an einer sehr kleinen Patientengruppe wirkungsvoll. Aber auch hier sollte die geringe Fallzahl bedacht werden. Meine Hypothese, dass Tumoren mit *HER2*- und *MET*-Amplifikation nur eine geringe Koexpression mit PD-L1 zeigen, konnte ich annehmen.

7 Zusammenfassung

Die Entwicklung und der Einsatz von Immuncheckpointinhibitoren hat die Behandlung von soliden Tumoren in den letzten Jahren nachhaltig verbessert [6]. Tumoren des Magens und gastroösophagealen Übergangs sind häufig und werden oft im fortgeschrittenen Stadium mit einer schlechten Prognose diagnostiziert [3, 8]. Dies führt häufig dazu, dass eine alleinige kurative chirurgische Therapie nicht mehr möglich ist und multimodale sowie zielgerichtete Therapien zum Einsatz kommen. Deren Erfolg hängt u.a. von der Selektion der Patienten ab, im Sinne einer prädiktiven, gewebebasierten Diagnostik. Aus diesem Grund hat die Entwicklung robuster molekularer Klassifizierungen, genauere Einteilung und Identifikation von Magenkarzinomsubtypen und die Identifikation fehlregulierter Stoffwechselwege große Priorität [19]. Die verschiedenen zellulären Signalwege und deren krebsassoziierten genetischen Alterationen können als Angriffspunkte für eine Antikörpertherapie mit Immuncheckpointinhibitoren genutzt werden. Die Hoffnung ist, dass in Zukunft Patienten aufgrund ihrer Subgruppe für die richtige Therapieoption ausgewählt werden können und sich neue prädiktive Marker entwickeln [19, 20].

Um den Einfluss einer neoadjuvanten Chemotherapie auf die PD-L1- und PD-1-Expression näher zu untersuchen, wurde eine Kohorte von 140 Patienten mit einem neoadjuvant behandelten Magenkarzinom, sowie derer 81 korrespondierenden Lymphknotenmetastasen und 11 Fernmetastasen untersucht. Das in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Material wurde immunhistochemisch mit gegen PD-L1 (Klon E1L3N) und PD-1 (Klon MRQ-22) gerichteten Antikörpern gefärbt, um die PD-L1- und PD1-Expression zu untersuchen. Des Weiteren wurden Tissue Microarrays (TMA) hergestellt, um das Vorhandensein einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI), den HER2-, MET- und Epstein-Barr-Virus-Status zu überprüfen. Die TMA-Schnitte wurden zuerst immunhistologisch ausgewertet. Bei entsprechenden Hinweisen wurden molekularpathologische Untersuchungen ergänzt für MSI (5 Mononucleotidmarker), HER2 und MET (jeweils chromogene in situ-Hybridisierung). Die Ergebnisse wurden mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert und anschließend mit einer therapienaiven Kohorte verglichen, die von derselben Arbeitsgruppe zuvor untersucht worden war.

Meine Hypothese, dass die PD-L1-Expression durch eine neoadjuvante Chemotherapie verändert wird, konnte angenommen werden. Insgesamt war eine geringere Expression von PD-L1 zu beobachten. Bei Patienten mit schlechtem Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie zeigte sich aber eine vermehrte Expression von PD-L1. Es könnte angenommen werden, dass PD-L1 in einer größeren Patientenkohorte von neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen, aufgrund dieser gesteigerten PD-L1-Expression, als negativer Vorhersagewert genutzt werden kann. Die PD-1-Expression hingegen zeigte ein allgemein häufigeres und vermehrtes Auftreten. So scheinen Magenkarzinome mit einem schlechten Therapieansprechen besonders gut geeignet für eine palliative Therapie mit gegen PDL1/PD-1 gerichteten Immuncheckpointinhibitoren. Die Expression von PD-L1 im Primärtumor und den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen war konkordant.

Die zweite Hypothese, EBV-positive und MSI-Tumoren weisen auch nach neoadjuvanter Chemotherapie eine vermehrte PD-L1-Expression auf, konnte auf Grund der geringen Fallzahl statistisch nicht belegt werden. Dennoch könnte die vermehrte Koexpression mit PD-L1, sowie die ähnlichen klinisch-pathologischen Eigenschaften zur therapienaiven Kohorte, beim Vorliegen einer dieser beiden Subgruppen dennoch für den Einsatz einer gegen PDL1/PD-1 gerichteten Immuncheckpointtherapie sprechen.

HER2- und *MET*-amplifizierte Tumoren zeigten nach neoadjuvanter Chemotherapie, wie in der Hypothese vermutet, nur eine geringe Koexpression mit PD-L1. So scheint von einer gleichzeitigen Gabe von gegen Her2/neu bzw. MET und PD-L1/PD-1 gerichteten Immuncheckpointinhibitoren nur eine sehr geringe Patientengruppe zu profitieren.

8 Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136: E359-86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
2. Malvezzi M, Bonifazi M, Bertuccio P et al. (2010) An age-period-cohort analysis of gastric cancer mortality from 1950 to 2007 in Europe. *Ann Epidemiol* 20: 898–905. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2010.08.013>
3. Koch-Institut R Krebs in Deutschland | 2013/2014
4. Koch-Institut R Krebs in Deutschland | 2013/2014 | Magen C16
5. Nagini S (2012) Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol* 4: 156–169. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v4.i7.156>
6. Mehta R, Shah A, Almhanna K (2018) Pembrolizumab for the treatment of patients with recurrent locally advanced or metastatic gastric or gastroesophageal junction cancer: an evidence-based review of place in therapy. *Onco Targets Ther* 11: 6525–6537. <https://doi.org/10.2147/OTT.S152513>
7. Becker K, Mueller JD, Schulmacher C et al. (2003) Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 98: 1521–1530. <https://doi.org/10.1002/cncr.11660>
8. Wagner AD, Unverzagt S, Grothe W et al. (2010 Mar 17) Chemotherapy for advanced gastric cancer, vol 3, England
9. Onkologie L S3 Leitlinie Magenkarzinom
10. Correa P (1988) A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 48: 3554–3560
11. Correa P (1992) Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-- First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 52: 6735–6740
12. Crew KD, Neugut AI (2006) Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12: 354–362. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i3.354>
13. 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. *Acta Pathol Microbiol Scand* 64: 31–49
14. Bosman FT (ed) (2010) WHO classification of tumours of the digestive system: Reflects the views of a working group that convened for an editorial and consensus conference at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, December 10 - 12, 2009 ; third volume of the 4th edition of the WHO series on histological and genetic typing of human tumours, 4. ed., 1. print run. World Health Organization classification of tumours, 3 (der 4. ed.). IARC, Lyon
15. Wittekind C (ed) (2017) TNM - Klassifikation maligner Tumoren, Achte Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
16. Wittekind C, Meyer H-J (2013) TNM, 1. Aufl. Wiley-VCH, s.l.
17. Böger C, Behrens H-M, Mathiak M et al. (2016) PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget* 7: 24269–24283. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8169>
18. Röcken C (2017) Tumoren und Tumorstufen des Magens (Gastric tumors and tumor precursors). *Pathologe* 38: 75–86. <https://doi.org/10.1007/s00292-016-0259-4>

19. The Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 513: 202–209. <https://doi.org/10.1038/nature13480>
20. Jin Z, Yoon HH (2016) The promise of PD-1 inhibitors in gastro-esophageal cancers: microsatellite instability vs. PD-L1. *J Gastrointest Oncol* 7: 771–788. <https://doi.org/10.21037/jgo.2016.08.06>
21. Roder JD, Böttcher K, Siewert JR et al. (1993) Prognostic factors in gastric carcinoma. Results of the German Gastric Carcinoma Study 1992. *Cancer* 72: 2089–2097
22. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP et al. (2006) Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 355: 11–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa055531>
23. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP et al. (2006) Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 355: 11–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa055531>
24. Al-Batran S-E, Hartmann JT, Probst S et al. (2008) Phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil, leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. *J Clin Oncol* 26: 1435–1442. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.9378>
25. Cunningham D, Starling N, Rao S et al. (2008) Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med* 358: 36–46. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa073149>
26. van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S et al. (2006) Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol* 24: 4991–4997. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.8429>
27. Ronellenfitsch U, Schwarzbach M, Hofheinz R et al. (2013 Oct) Preoperative chemo(radio)therapy versus primary surgery for gastroesophageal adenocarcinoma: systematic review with meta-analysis combining individual patient and aggregate data, vol 15, England
28. Bang Y-J, van Cutsem E, Feyereislova A et al. (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. *Lancet* 376: 687–697. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61121-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61121-X)
29. Wang C, Thudium KB, Han M et al. (2014) In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Immunol Res* 2: 846–856. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0040>
30. Garon EB, Rizvi NA, Hui R et al. (2015) Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 372: 2018–2028. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501824>
31. Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ et al. (2014) Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 383: 31–39. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61719-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61719-5)
32. Wilke H, Muro K, van Cutsem E et al. (2014) Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 15: 1224–1235. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70420-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70420-6)
33. Kang Y-K, Boku N, Satoh T et al. (2017) Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind,

- placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 390: 2461–2471.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31827-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31827-5)
34. Becker K, Mueller JD, Schulmacher C et al. (2003) Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 98: 1521–1530. <https://doi.org/10.1002/cncr.11660>
 35. Becker K, Langer R, Reim D et al. (2011) Significance of histopathological tumor regression after neoadjuvant chemotherapy in gastric adenocarcinomas: a summary of 480 cases. *Ann Surg* 253: 934–939. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318216f449>
 36. Schmidt T, Sivic L, Blank S et al. (2014) Prognostic value of histopathological regression in 850 neoadjuvantly treated oesophagogastric adenocarcinomas. *Br J Cancer* 110: 1712–1720. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.94>
 37. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y et al. (2000) Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* 192: 1027–1034
 38. Loke P'n, Allison JP (2003) PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5336–5341.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0931259100>
 39. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H et al. (2002) Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169: 5538–5545
 40. Toor SM, Syed Khaja AS, Alkurd I et al. (2017) In-vitro effect of pembrolizumab on different T regulatory cell subsets. *Clin Exp Immunol* 191: 189–197.
<https://doi.org/10.1111/cei.13060>
 41. Thuss-Patience PC, Shah MA, Ohtsu A et al. (2017) Trastuzumab emtansine versus taxane use for previously treated HER2-positive locally advanced or metastatic gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (GATSBY): an international randomised, open-label, adaptive, phase 2/3 study. *Lancet Oncol* 18: 640–653.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30111-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30111-0)
 42. Swann JB, Smyth MJ (2007) Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 117: 1137–1146. <https://doi.org/10.1172/JCI31405>
 43. Osińska I, Domagała-Kulawik J (2013) Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe w raku płuca--znaczenie w diagnostyce i ocenie odpowiedzi układu odpornościowego (Bronchoalveolar lavage in lung cancer--diagnostic value and assessment of the anti-cancer immune response). *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 67: 1119–1127
 44. Fridman W-H, Dieu-Nosjean M-C, Pagès F et al. (2012) The Immune Microenvironment of Human Tumors: General Significance and Clinical Impact. *Cancer Microenviron* 6: 117–122. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0124-9>
 45. Fridman WH (2012) The immune microenvironment as a guide for cancer therapies. *Oncoimmunology* 1: 261–262. <https://doi.org/10.4161/onci.19651>
 46. Zou W, Chen L (2008) Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 8: 467–477. <https://doi.org/10.1038/nri2326>
 47. Poole RM (2014) Pembrolizumab: first global approval. *Drugs* 74: 1973–1981.
<https://doi.org/10.1007/s40265-014-0314-5>
 48. Geiersbach KB, Samowitz WS (2011) Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 135: 1269–1277. <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0035-RA>
 49. Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Chan TL et al. (2009) Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 41: 112–117. <https://doi.org/10.1038/ng.283>
 50. Mathiak M, Warneke VS, Behrens H-M et al. (2016) Clinicopathologic Characteristics of Microsatellite Instable Gastric Carcinomas Revisited: Urgent Need for Standardization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 25: 12–24.
<https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000264>

51. An C, Choi I-S, Yao JC et al. (2005) Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 656–663
52. Beghelli S, Manzoni G de, Barbi S et al. (2006) Microsatellite instability in gastric cancer is associated with better prognosis in only stage II cancers. *Surgery* 139: 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2005.08.021>
53. Beghelli S, Manzoni G de, Barbi S et al. (2006) Microsatellite instability in gastric cancer is associated with better prognosis in only stage II cancers. *Surgery* 139: 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2005.08.021>
54. Smyth EC, Wotherspoon A, Peckitt C et al. (2017) Mismatch Repair Deficiency, Microsatellite Instability, and Survival: An Exploratory Analysis of the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy (MAGIC) Trial. *JAMA Oncol* 3. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.6762>
55. Ock C-Y, Hwang J-E, Keam B et al. (2017) Genomic landscape associated with potential response to anti-CTLA-4 treatment in cancers. *Nat Commun* 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01018-0>
56. Fukayama M, Ushiku T (2011) Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Pathol Res Pract* 207: 529–537. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2011.07.004>
57. Zur Hausen A, van Grieken NC, Meijer GA et al. (2001) Distinct chromosomal aberrations in Epstein-Barr virus-carrying gastric carcinomas tested by comparative genomic hybridization. *Gastroenterology* 121: 612–618
58. Wu MS, Shun CT, Wu CC et al. (2000) Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas: relation to *H. pylori* infection and genetic alterations. *Gastroenterology* 118: 1031–1038
59. Böger C, Krüger S, Behrens HM et al. (2017) Epstein–Barr virus-associated gastric cancer reveals intratumoral heterogeneity of PIK3CA mutations. *Ann Oncol* 28: 1005–1014. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx047>
60. Baek DW, Kang BW, Kim JG (2018) The Predictive Value of Epstein-Barr Virus-Positivity in Patients Undergoing Gastrectomy Followed by Adjuvant Chemotherapy. *Chonnam Med J* 54: 173–177. <https://doi.org/10.4068/cmj.2018.54.3.173>
61. Huang S-C, Ng K-F, Chen K-H et al. (2014) Prognostic factors in Epstein-Barr virus-associated stage I-III gastric carcinoma: implications for a unique type of carcinogenesis. *Oncol Rep* 32: 530–538. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3234>
62. Sohn BH, Hwang J-E, Jang H-J et al. (2017) Clinical Significance of Four Molecular Subtypes of Gastric Cancer Identified by The Cancer Genome Atlas Project. *Clin Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2211>
63. Ock C-Y, Hwang J-E, Keam B et al. (2017) Genomic landscape associated with potential response to anti-CTLA-4 treatment in cancers. *Nat Commun* 8: 1050. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01018-0>
64. Rüschoff J, Dietel M, Baretton G et al. (2010) HER2 diagnostics in gastric cancer—guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 457: 299–307. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-0952-2>
65. Lordick F, Al-Batran S-E, Dietel M et al. (2017) HER2 testing in gastric cancer: results of a German expert meeting. *J Cancer Res Clin Oncol* 143: 835–841. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2374-x>
66. Warneke VS, Behrens H-M, Böger C et al. (2012) Her2/neu testing in gastric cancer: evaluating the risk of sampling errors. *Ann Oncol* 24: 725–733. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds528>
67. Hofmann M, Stoss O, Shi D et al. (2008) Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 52: 797–805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.03028.x>

68. Wang H-B, Liao X-F, Zhang J (2017) Clinicopathological factors associated with HER2-positive gastric cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 96. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008437>
69. Metzger M-L, Behrens H-M, Böger C et al. (2015) MET in gastric cancer – discarding a 10% cutoff rule. *Histopathology* 68: 241–253. <https://doi.org/10.1111/his.12745>
70. Hack SP, Bruy J-M, Koeppen H (2014) HGF/MET-directed therapeutics in gastroesophageal cancer: a review of clinical and biomarker development. *Oncotarget* 5: 2866–2880
71. Graveel CR, Tolbert D, Vande Woude GF (2013) MET: A Critical Player in Tumorigenesis and Therapeutic Target. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009209>
72. Yu S, Yu Y, Zhao N et al. (2013) c-Met as a Prognostic Marker in Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079137>
73. Xing X, Guo J, Wen X et al. (2018) Analysis of PD1, PDL1, PDL2 expression and T cells infiltration in 1014 gastric cancer patients. *Oncoimmunology* 7: e1356144. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1356144>
74. van Dongen, J J M, Langerak AW, Bruggemann M et al. (2003) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17: 2257–2317. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403202>
75. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF et al. (2006) Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* 24: 241–251. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.7227>
76. Benjamini Y (2010) Discovering the false discovery rate. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* 72: 405–416. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2010.00746.x>
77. Lin SJ, Gagnon-Bartsch JA, Tan IB et al. (2014) Signatures of tumour immunity distinguish Asian and non-Asian gastric adenocarcinomas. *Gut* 64: 1721–1731. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308252>
78. Wang K, Yuen ST, Xu J et al. (2014) Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet* 46: 573–582. <https://doi.org/10.1038/ng.2983>
79. Gumusay O, Benekli M, Ekinci O et al. (2015) Discordances in HER2 status between primary gastric cancer and corresponding metastatic sites. *Jpn J Clin Oncol* 45: 416–421. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyv020>
80. Pallasch CP, Leskov I, Braun CJ et al. (2014) Sensitizing Protective Tumor Microenvironments to Antibody-Mediated Therapy. *Cell* 156: 590–602. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.041>
81. Zhang B, Bowerman NA, Salama JK et al. (2007) Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells. *J Exp Med* 204: 49–55. <https://doi.org/10.1084/jem.20062056>
82. Deng L, Liang H, Burnette B et al. (2014) Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *J Clin Invest* 124: 687–695. <https://doi.org/10.1172/JCI67313>
83. Pereira MA, Ramos, Marcus F K P, Faraj SF et al. (2018) Clinicopathological and prognostic features of Epstein-Barr virus infection, microsatellite instability, and PD-L1 expression in gastric cancer. *J Surg Oncol* 117: 829–839. <https://doi.org/10.1002/jso.25022>

84. Arai T, Sakurai U, Sawabe M et al. (2013) Frequent microsatellite instability in papillary and solid-type, poorly differentiated adenocarcinomas of the stomach. *Gastric Cancer* 16: 505–512. <https://doi.org/10.1007/s10120-012-0226-6>
85. Corso G, Velho S, Paredes J et al. (2011) Oncogenic mutations in gastric cancer with microsatellite instability. *Eur J Cancer* 47: 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.09.008>
86. Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW (2011) Next-Generation Sequencing for Cancer Diagnostics: a Practical Perspective. *Clin Biochem Rev* 32: 177–195

9 Anhang

9.1 Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION

EINGEGANGEN
28. AUG. 2015



Universitäts-Kinderklinik · Schwänenweg 20 · 24105 Kiel

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

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-1809
Telefax 04 31 / 597-5333
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 20. August 2015

AZ.: D 525/15 (bitte stets angeben)
Studienplan: Prognostische und prädiktive Biomarker des perioperativ behandelten Magenkarzinoms
Anschreiben mit Projektbeschreibung vom 10. August 2015; Basisformular für einen Ethik-Antrag vom 10. August 2015; Checkliste zur Antragstellung Registerstudien; Datenträger
Studienleiter und Antragsteller: Prof. Dr. Christoph Röcken, UKSH Campus Kiel
Antrag vom: 10. August 2015 (Eingang: 12. August 2015)

Sehr geehrter Herr Kollege Röcken,

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

Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Studienleiter.
3. Gemäß Deklaration von Helsinki **muss** der Ethik-Kommission nach Studienende ein Abschlussbericht vorgelegt werden, der eine Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Studie enthält.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

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

Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

9.2 Publikationen

15.05.2018 Abstract: Pathologie 2018 · 39 (Suppl 1): AG01.P1.22

Die Expression von PD-L1 korreliert im neoadjuvant behandelten Magenkarzinom mit dem Therapieansprechen

A. Bregenzer*1, C. Böger1, H.-M. Behrens1, C. Hauser2, J.-H. Egberts2, C. Röcken1

1Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel, Deutschland

2Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel, Deutschland

13.02.2020 Artikel: Transl Oncol. 2020 Feb; 13(2): 165–176.

Therapy resistance in neoadjuvantly treated gastric cancer and cancer of the gastroesophageal junction is associated with an increased expression of immune checkpoint inhibitors - comparison against a therapy naïve cohort.

Hauke Schoop,* Anna Bregenzer,* Christine Halske,* Hans-Michael Behrens,* Sandra Krüger,* Jan-Hendrik Egberts,† and Christoph Röcken**

*Department of Pathology, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany

†Department of General Surgery, Visceral, Thoracic, Transplantation and Pediatric Surgery, University Hospital Schleswig-Holstein (UKSH), Kiel, Germany

Die Expression von PD-L1 korreliert im neoadjuvant behandelten Magenkarzinom mit dem Therapieansprechen

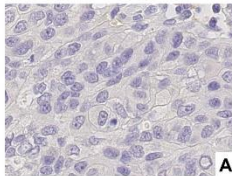
A. Bregenzner¹, C. Böger¹, H.-M. Behrens¹, C. Hauser², J.-H. Egberts², C. Röcken¹
¹Institut für Pathologie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel; ²Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

Ziel

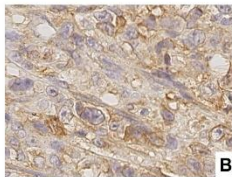
Nach den vielversprechenden klinischen Studien zu Therapien mit Immuncheckpoint-Inhibitoren im Magenkarzinom, wurde nun die Expression von PD-L1 (programmed death ligant 1) und PD-1 nach neoadjuvanter Chemotherapie im Magenkarzinom untersucht.

Methoden

Es wurden Gewebeproben von 141 Patienten mit einem neoadjuvant behandelten Magenkarzinom sowie 81 korrespondierende Lymphknotenmetastasen und 11 korrespondierende Fernmetastasen untersucht.

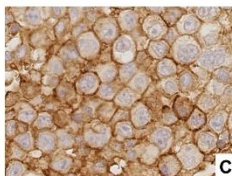


Das in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Material wurde immunhistochemisch mit anti-PD-L1- (Klon E1L3N) und anti-PD-1- (Klon MRQ-22) Antikörpern untersucht.

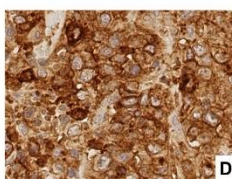


Die PD-L1 gefärbten Tumorzellen wurden mit Hilfe eines Immunreaktivitäts Bewertungssystems (IRS) von 0 bis 7 ausgewertet.

Intensität: A=0, B=1+, C=2+, D=3+.
 Prozentzahl gefärbter Zellen: 0 (0%), 1 (1%), 2 (2%-10%), 3 (11%-50%), 4 (>50%).



Die Auswertung der PD-L1-Immunreaktion bei Immunzellen erfolgte mit einem Score von 0 bis 3
 0 (0%), 1 (1%), 2 (5%), 3 (>10%).



Die so ausgewerteten Schnitte wurden mit klinisch-pathologischen Charakteristika (Alter, Geschlecht, Lokalisation Lauren Phänotyp, T-, N-, M-, L-, V-, Pn-Kategorie, UICC-Stadium, vitale Tumorresiduen Beckerregressionsgrad) und dem Überleben korreliert.

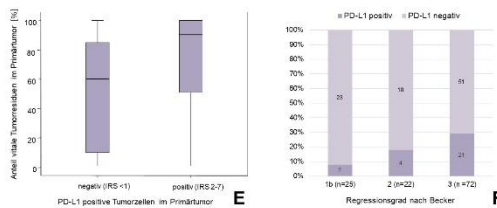
Fazit

Ein schlechtes Therapieansprechen geht mit einer hohen PD-L1-Expression im Tumor einher. Magenkarzinome mit einem schlechten Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie scheinen somit besonders gut geeignet für eine adjuvante Zweitlinientherapie mit gegen PDL1/PD-1 gerichteten Immuncheckpoint-Inhibitoren.

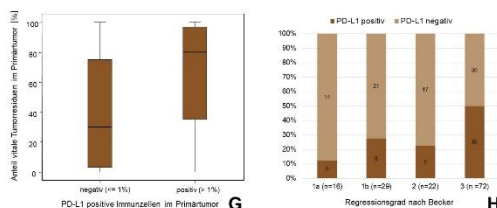
Ergebnisse

Eine membranständige PD-L1 Expression in Tumorzellen zeigten 27 (22.7%) von 119 untersuchten Magenkarzinome, 19 (26%) von 67 Lymphknotenmetastasen und 1 (14,3%) von 7 Fernmetastasen. Ein Tumor galt als PD-L1 positiv, wenn 1% der Tumorzellen eine schwache Expression aufwiesen (1+; IRS>2). Immunzellen im Magenkarzinom zeigten in 134 Fällen (96,4%) eine PD-L1-Expression. Als positiv wurde gewertet, wenn mehr >1% der Immunzellen eine Immunreaktion zeigten. PD-1 positive Immunzellen fanden sich in 126 von 138 Fällen (91,3%) in Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) und in 123 (89,1%) von 138 Fällen in Lymphozytenaggregaten.

Die PD-L1 Expression in Tumorzellen und Immunzellen sowohl des Primärtumors als auch der korrespondierenden Lymphknotenmetastasen korrelieren signifikant mit dem Regressionsgrad nach Becker sowie dem prozentualen Anteil an vitalen Tumorresiduen: Tumoren mit einem schlechten Therapieansprechen (Regressionsgrades 2/3 nach Becker) sowie Tumoren mit einem hohen prozentualen Anteil an vitalen Tumorresiduen wiesen eine signifikant höhere Expression von PD-L1 in Tumorzellen und Immunzellen auf (jeweils p<0,05). Es besteht keine signifikante Korrelation von PD-1 Expression mit anderen klinisch-pathologischen Parametern.



Korrelation PD-L1 positiver Tumorzellen im Primärtumor mit
E Anteil vitaler Tumorzellen % p=0,001
F Becker-Regressionsgrad p=0,032



Korrelation PD-L1 positive Immunzellen im Primärtumor mit
G Anteil vitaler Tumorzellen % p<0,001
H Becker-Regressionsgrad p=0,001



9.3 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, Anna Bregenzer, geboren am 17.11.1992 in Sigmaringen, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Ort, Datum

Anna Bregenzer

9.4 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. C. Röcken, Leiter des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel der mir die Möglichkeit gab, an dieser spannenden Dissertation zu arbeiten und mir das Thema meiner Arbeit zur Verfügung stellte. Er stand mir allzeit persönlich mit seinem professionellen Rat und seiner engagierten Betreuung zur Seite.

Ebenso danke ich Frau PD Dr. Christine Halske für ihre professionelle Unterstützung bei der Auswertung der Schnitte und Betreuung meiner Dissertation.

Weiter möchte ich Frau Sandra Krüger und Herrn Dr. rer. nat. Jochen Haag sowie den medizinisch-technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für die Hilfe bei der chromogenen in situ-Hybridisierung, die Zusammenstellung des Patientenkollektivs und die Durchführung der immunpathologischen Färbungen danken.

Herrn Dr. rer. medic. H. M. Behrens möchte ich für seine geduldige und professionelle Hilfe bei der Durchführung der statistischen Analyse und den Anregungen für die Erstellung meines Posters danken.

Ein weiterer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mich nicht nur bei meiner gesamten Ausbildung, sondern weit darüber hinaus immer liebevoll unterstützen. Besonders meiner Mutter für die geduldige Hilfe bei der Durchsicht meiner Dissertation und die moralische Unterstützung.