

Aus dem Institut für Pathologie und Funktionsbereich Cytopathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. I. Esposito

**Prävalenz und Heterogenität von *KRAS*-, *BRAF*-
und *PIK3CA*-Mutationen in Magenkarzinomen
und ihren Metastasen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julianna Paulina Englisch

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stephan Ernst Baldus

Zweitgutachter: Univ.-Prof. med. Nikolas Hendrik Stöcklein

meiner Familie

Abkürzungen

ADCC	<i>antibody-dependant cytotoxicity</i>
Akt	Proteinkinase B; Serin-Threonin-Kinase
BEZ235	PI3K/mTOR-Inhibitor
BKM120	PI3K/mTOR-Inhibitor
BMFZ	Biomedizinisches Forschungszentrum
bp	Basenpaare
BRAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CA	Karzinom
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>complement-dependant cytotoxicity</i>
CDH1	E-Cadherin-Gen
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CpG	Cytosin-phosphat-Guanin
CR	<i>conserved region</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DOCETUX	Docetaxel+Cisplatin+Cetuximab
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
EGF	<i>epidermal-growth-factor</i>
EGFR	<i>epidermal-growth-factor-receptor</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ERB	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FAM	5-Fluorouracil+Doxorubicin+Mitomycin C
FAMTX	5-Fluorouracil+Doxorubicin+Methotrexat
FFPE	<i>formalin-fixed and paraffin-embedded</i>
FGFR	<i>fibroblastic growth factor receptor</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOLFIRI	Folinsäure+5-FU+Irinotecan
FOLFOX	Folinsäure+5-FU+Oxaliplatin
FUFOX	5-FU+Oxaliplatin
G	<i>grading</i>
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GNRP	<i>guanine nucleotide releasing protein</i>
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
H. pylori	Helicobacter pylori

H₀	Nullhypothese
H₁	Alternativhypothese
HDGC	Hereditäres diffuses Magenkarzinom
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
HNPCC	Hereditäres-nicht-polypöses Kolonkarzinom
Ig	Immunglobulin
ITR	<i>inter-target-relationship</i>
kb	Kilobase
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MEK	MAPK-Kinase
MET	<i>mesenchymal epithelial transition</i>
MLH1	<i>human mutL homolog 1</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mV	Millivolt
nm	Nanometer
N₂O₃	Dinitrogentrioxid
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	<i>non-small-cell-lung-cancer</i>
ORR	<i>overall response rate</i>
OS	<i>overall survival</i>
p	Signifikanzniveau
PAS	<i>periodic acid schiff</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK	<i>phosphoinositid -dependant kinase</i>
PFS	<i>progression-free-survival</i>
pH	potentia hydrogenii
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
R0	mikroskopisch tumorfrei
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	G-Protein
Rnase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RR	<i>response rate</i>
rT-PCR	<i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion
SH2	<i>Src-homology-2</i>
Shc	<i>Src-homology-2-domain-containing protein</i>
Ship	<i>Src-homology-2-domain-containing Inositol-5-Phosphatase</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>

SPSS	<i>Statistical package for social sciences</i>
Src	Tyrosin-spezifische Proteinkinase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Tm	Temperatur
TNM	<i>tumor, node, metastases</i>
TP53	Tumor protein 53
TTP	<i>time to progression</i>
UICC	<i>Union Internationale contre le cancer</i>
U/l	Units pro Liter
UV	Ultraviolett
VacA	<i>Helicobacter pylori vacuolating toxin</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
W	Watt
WHO	<i>World Health Organisation</i>
χ^2	Chi-Quadrat

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	- 1 -
1.1 Epidemiologie Magenkarzinom.....	- 1 -
1.2 Ätiologie.....	- 2 -
1.2.1 Helicobacter pylori.....	- 2 -
1.2.2 Genetik.....	- 3 -
1.2.3 Umweltfaktoren.....	- 4 -
1.2.4 Präkanzerosen.....	- 5 -
1.3 Histologie und Morphologie.....	- 6 -
1.4 Staging und Grading.....	- 7 -
1.5 Molekulare Karzinogenese.....	- 9 -
1.6 <i>KRAS</i>	- 12 -
1.7 <i>BRAF</i>	- 14 -
1.8 <i>PIK3CA</i>	- 15 -
1.9 Therapie des Magenkarzinoms.....	- 16 -
1.10 Fragestellung.....	- 20 -
2 Material und Methodik	- 21 -
2.1 Geräte.....	- 21 -
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	- 22 -
2.3 Chemikalien und Lösungen.....	- 22 -
2.4 Puffer und Lösungen.....	- 23 -
2.5 Kommerzielle Testsysteme (Kits).....	- 23 -
2.6 Patientenkollektiv.....	- 24 -
2.7 DNA-Extraktion aus Paraffingewebe.....	- 24 -
2.8 DNA-Konzentrationsmessung.....	- 25 -
2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	- 25 -
2.10 DNA-Agarosegelelektrophorese.....	- 28 -
2.11 Aufreinigung der DNA.....	- 29 -
2.12 DNA-Sequenzanalyse.....	- 30 -
2.13 Mutationsanalyse.....	- 30 -
2.14 Statistische Analyse.....	- 30 -
3 Ergebnisse	- 32 -
3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs.....	- 32 -
3.2 <i>KRAS</i>	- 34 -
3.2.1 Prävalenz der <i>KRAS</i> -Mutationen.....	- 35 -
3.2.2 Laurén - Klassifikation und <i>KRAS</i> -Mutationen.....	- 38 -
3.2.3 Tumordinfiltration des Primärtumors und <i>KRAS</i> -Mutationen.....	- 38 -
3.2.4 Lymphknotenbefall und <i>KRAS</i> -Mutationen.....	- 39 -
3.2.5 Grading und <i>KRAS</i> -Mutationen.....	- 39 -
3.2.6 Heterogenität von <i>KRAS</i> -Mutationen.....	- 40 -
3.3 <i>BRAF</i>	- 41 -
3.4 <i>PIK3CA</i>	- 42 -
3.4.1 Prävalenz der <i>PIK3CA</i> -Mutationen.....	- 42 -
3.4.2 Laurén-Klassifikation und <i>PIK3CA</i> -Mutationen.....	- 45 -
3.4.3 Tumordinfiltration des Primärtumors und <i>PIK3CA</i> -Mutationen.....	- 45 -
3.4.4 Lymphknotenbefall und <i>PIK3CA</i> -Mutationen.....	- 46 -
3.4.5 Grading und <i>PIK3CA</i> -Mutationen.....	- 46 -
3.4.6 Heterogenität von <i>PIK3CA</i> -Mutationen.....	- 47 -

3.5	Koexistenz von Mutationen.....	- 49 -
3.6	Zusammenfassung.....	- 49 -

4 Diskussion - 50 -

4.1	Prävalenz von Mutationen in der EGFR-Signalkaskade.....	- 50 -
4.1.1	<i>KRAS</i>	- 50 -
4.1.2	<i>BRAF</i>	- 53 -
4.1.3	<i>PIK3CA</i>	- 53 -
4.2	Heterogenität von Mutationen.....	- 55 -
4.3	Technische Artefakte.....	- 55 -
4.4	Antikörpertherapie.....	- 60 -
4.4.1	Anti-HER2-Antikörper.....	- 61 -
4.4.2	Anti-EGFR-Antikörper.....	- 63 -
4.4.3	Tyrosin-Kinase-Inhibitoren.....	- 65 -
4.4.4	PI3K-Inhibitoren.....	- 66 -
4.5	Prädiktive/prognostische Faktoren des Magenkarzinoms.....	- 66 -
4.5.1	TNM-Stadium.....	- 66 -
4.5.2	EGFR.....	- 67 -
4.5.3	PTEN.....	- 68 -
4.5.4	Mutationen in Protoonkogenen der EGFR-Signalkaskade.....	- 68 -
4.5.5	Fazit.....	- 69 -

5 Zusammenfassung..... - 71 -

6 Literaturverzeichnis..... - 73 -

Danksagung

Eidesstattliche Versicherung

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie Magenkarzinom

Aktuell ist das Magenkarzinom (nach Bronchial-, Mamma- und kolorektalem Karzinom) mit 900.000-950.000 neuen Fällen jährlich weltweit der vierthäufigste Tumor (Brenner et al., 2009), (Ferlay et al., 2010). Über 70% der Patienten mit Magenkarzinom leben in Entwicklungsländern. Die Hälfte aller dieser Tumore findet sich in Südasien, wobei sie in China mit Abstand am häufigsten auftreten. Männer sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Jedoch ist bei beiden Geschlechtern das Magenkarzinom die zweithäufigste Todesursache weltweit (9,7%). Die höchste Sterblichkeit wird in Südasien (28,1 pro 100.000 Männer; 13 pro 100.000 Frauen), v.a. in China und die geringste in Nordamerika gefunden (2,8 und 1,5 pro 100.000). Außerdem gibt es hohe Sterblichkeiten in Zentral- und Osteuropa sowie in Zentral- und Südamerika (Ferlay et al., 2010). Nichtsdestotrotz ist die Erkrankungs- und Sterberate in vielen Industrienationen, wie auch in Deutschland, innerhalb der letzten Jahre deutlich gesunken. Bezogen auf Deutschland erkranken Männer durchschnittlich mit 70 Jahren, Frauen erst mit 76 Jahren. Trotz der im Laufe der Jahre verbesserten Überlebenschancen ist die Diagnose Magenkarzinom, verglichen mit vielen anderen Tumorentitäten, mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 30% dennoch relativ ungünstig. Das liegt nicht zuletzt daran, dass die meisten Tumore erst im fortgeschrittenen Stadium (T2 und T3) diagnostiziert werden (Robert Koch Institut, 2012), (s. Kap. 1.4). Davon ausgenommen ist Japan, das trotz der hohen Erkrankungsinzidenz eine sinkende Mortalität vorweist. Möglich ist dies durch ein flächendeckendes *screening* seit den 60er Jahren, in den Anfängen noch mit Hilfe von Röntgendiagnostik. Heutzutage wird bevorzugt die Endoskopie eingesetzt (Tashiro et al, 2006; Hamashima et al, 2008). Zeitgleich mit der sinkenden Inzidenz des Magenkarzinoms hat sich die bevorzugte Tumorlokalisation im Magen geändert: während bislang gehäuft Karzinome in Magenkorpus und -antrum beobachtet wurden, sind sie derzeit vermehrt in Kardialia und Korpus anzutreffen sowie als Adenokarzinome am gastroösophagealen Übergang. Das betrifft vor allem die Industrienationen (Yao et al., 2002). In Europa (v.a. Dänemark, Italien, Großbritannien) stieg die Prävalenz von kardialen Adenokarzinomen in den Jahren 1984-1993 von 29,1% auf 52,2% an. Diese müssen von den Barrett-Karzinomen des unteren Ösophagus, die auf einer Barrett-Metaplasie basieren, abgegrenzt werden (Hohenberger & Gretschel, 2003).

1.2 Ätiologie

Die Ursachen für die Entstehung von Magenkarzinomen sind vielfältig, durch viele Faktoren beeinflusst und noch nicht im Einzelnen verstanden. Eine herausragende Rolle in der Entstehung scheint das Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) zu spielen. Dazu kommen individuelle Unterschiede in Lebensstil, Genetik und sozioökonomischen Faktoren (Nagini, 2012). Im Wesentlichen unterscheidet man bezüglich der Ätiologie zwei histologische Formen des Magenkarzinoms: den intestinalen und den diffusen Typ nach Laurén (s. Kap. 1.3).

1.2.1 *Helicobacter pylori*

Von allen Risikofaktoren nimmt *H. pylori* eine sehr bedeutende Rolle ein. Die Durchseuchung in der Bevölkerung ist sehr hoch. Es wird sogar vermutet, dass die Hälfte der Weltbevölkerung mit diesem Bakterium infiziert ist. Aber es erkrankt nicht jeder Infizierte im Laufe seines Lebens an einem Magenkarzinom, sondern nur etwa 1-3%. Je nach Virulenz des Bakteriums wird die Magenmukosa unterschiedlich stark angegriffen, wodurch eine chronisch-aktive Gastritis ausgelöst wird, die anscheinend die wichtigste Ursache einer Zellentartung darstellt (Zabala, 2012).

In vielen Fällen kommt es zu einem langjährigen Verlauf von Infektion, chronischer Gastritis, Schleimhautatrophie, Metaplasie und intraepithelialer Neoplasie. *H. pylori* selbst ist nicht karzinogen, triggert aber Immunprozesse, die zu Genomfehlern und abnormer Zelldifferenzierung führen können (Vauhkonen et al., 2006). Weiterhin ist es in der Lage, durch Beeinflussung der Magensäureproduktion das Magenmilieu zu ändern. Dadurch wird der pH-Wert angehoben und es können sich anaerobe Bakterien ansiedeln. Diese produzieren Reduktasen, welche Nitrat aus der Nahrung in Nitrit umwandeln. Zudem vermag *H. pylori* ein Zytotoxin namens VacA herzustellen, welches das Schleimhautepithel angreift und teilweise zerstört. Es gibt Hinweise darauf, dass dieses Zytotoxin mit der Tumorkarzinogenese in Verbindung steht. Die Zellproliferation der Magenschleimhaut ist bei Trägern von *H. pylori* stärker als in der Normalbevölkerung. Je größer die Proliferationsrate ist, desto wahrscheinlicher ist auch die Entwicklung von Karzinomen. Weiterhin ist belegt, dass durch das Auftreten von chronischen Gastritiden durch *H. pylori* ein erhöhter oxidativer Stress ausgelöst wird. Dadurch fallen Produkte wie Stickstoffmonoxid (NO), Dinitrogentrioxid (N₂O₃) und andere Oxidantien an, welche in größeren Konzentrationen Schäden an der Erbinformation verursachen können (Hamilton & Aaltonen, 2000).

1.2.2 Genetik

Die unterschiedlichen Inzidenzen des Magenkarzinoms je nach Geographie und ethnischer Zugehörigkeit lassen an eine genetische Ätiologie denken. Nach den vorliegenden Daten treten allerdings die meisten Magenkarzinome sporadisch auf und nur 8-10% weisen eine familiäre Komponente auf (Dicken et al., 2005).

Unter anderem ist nachgewiesen, dass es beim Magenkarzinom häufig zu epigenetischen Veränderungen, d.h. nachträglichen Modifikationen an der DNA kommt. Ein häufiges Beispiel sind Hypermethylierungen an Promoterregionen. Durch diese werden wichtige Zellfunktionen wie Zellreparatur, Apoptose und der Ablauf des Zellzyklus beeinträchtigt. Dabei sind Auswirkungen auf den Phänotyp der Tochterzelle möglich. In der Karzinogenese des Magenkarzinoms sind hypermethylierte CpG-Inseln relevant, die in der Lage sind, Tumorsuppressorgene zu unterdrücken. Infektionen mit *H. pylori* und EBV begünstigen zusätzlich die Methylierung der CpG-Inseln. Derzeit werden CpG-Inseln u.a. als Biomarker für maligne Zellen eingesetzt, aber auch als Prognoseprädiktor (Jang & Kim, 2011).

Eine besondere Rolle kommt dem Zelladhäsionsprotein E-Cadherin zu. Als Zelladhäsionsprotein befindet es sich in der Zonula adhaerens von Epithelien. Bei vielen Tumorentitäten ist die Expression von E-Cadherin herunterreguliert. Dadurch kam man zu dem Konzept, dass E-Cadherin wie ein Tumorsuppressor wirkt, der Invasion und Metastasierung unterdrückt.

In seltenen Fällen (ca. 1-3% der Magenkarzinome) tritt eine Keimbahnmutationen im CDH-1-Gen auf. Folge kann die Ausprägung eines diffusen Magenkarzinoms sein (Lebenszeitrisiko ca. 70%). Durch die Mutation in CDH-1 kann E-Cadherin weniger bis gar nicht mehr exprimiert werden. Das HDGC gehört zum Subtyp des diffusen Magenkarzinoms nach Laurén (s. Kap. 1.3), (Jang & Kim, 2011).

Außerdem kann selten bei Patienten mit Lynch-Syndrom (hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom, HNPCC) ein Magenkarzinom auftreten. Ursache eines HNPCC ist eine autosomal-dominant vererbte Keimbahnmutation in einem der *mismatchrepair*-Gene. Zu nennen sind beispielsweise MLH1, MSH2 und MSH6. Hauptaufgabe dieser Proteine ist die DNA-Reparatur. Ist dieser Schutz nicht gewährleistet, kommt es gehäuft, oft schon bei jüngeren Patienten, zu kolorektalen Karzinomen. Assoziiert sind weitere Neoplasien in Endometrium, Dünndarm, ableitenden Harnwegen oder Magen. Das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms beim Lynch-Syndrom liegt bei bis zu 30% (Moehler et al., 2011).

1.2.3 Umweltfaktoren

In größerem Maße als die Genetik scheinen Umweltfaktoren und Lebensweise zur Karzinogenese von Magenkarzinomen beizutragen.

Allein die Ernährung wirkt sich möglicherweise stark präventiv aus. Durch regelmäßigen Verzehr von frischem Obst und rohem Gemüse lässt sich das Magenkarzinomrisiko um ca. 30-50% senken. Darin enthalten sind Substanzen, die als Antioxidantien und Radikalfänger agieren wie Vitamin C, E und A sowie Polyphenole, z.B. Flavonoide (Terry et al., 2002).

Ein besonders wichtiger Radikalfänger ist Vitamin C. Ohne ihn begünstigen freie Radikale die Entstehung einer atrophischen Gastritis. Dabei gehen Parietalzellen der Magenmukosa zugrunde, der pH-Wert steigt an und anaeroben Bakterien wird das optimale Milieu geboten, um sich zu vermehren. In hohem Maße wandeln sie aus der Nahrung Nitrat zu Nitrit um, welches wiederum über verschiedene Mechanismen die Karzinogenese vorantreibt und zu Magenkarzinomen prädisponiert (Correa, 1992). Nitrat findet sich v.a. in gepökeltem Fleisch (Kelley & Duggan, 2003). Ebenso kann sich bei Patienten, die viele Kohlenhydrate und wenig Proteine zu sich nehmen, im Magen Nitrit anreichern (Nagini, 2012).

Eine größere Menge an protektiv wirkenden Polyphenolen ist in grünem Tee enthalten. Sie wirken nicht nur antikarzinogen, sondern können auch Mutationen verhindern. Speziell Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) kann der Tumorentstehung über den Epidermal-Growth-Faktor-Rezeptor (EGFR) vorbeugen (Terry et al., 2002).

Weiterhin ist ein gesteigerter Salzkonsum schädlich für die Magenschleimhaut (z.B. stark gesalzener Fisch, Sojasauce, eingelegte und gepökelte Nahrung). Bei kontinuierlicher Einwirkung auf die Magenschleimhaut kann es zu einer Inflammation kommen, damit zu einer Änderung des pH-Wertes, des Magenmilieus und in gravierenden Fällen zur Magenschleimhautatrophie, die letztendlich zur Entstehung eines Magenkarzinoms prädisponiert (Correa, 1992).

Rauchen und der Genuss von Alkohol sind weitere Variablen, die eine Karzinogenese begünstigen. Es wurde belegt, dass männliche Raucher ein 60% höheres Risiko haben, ein Magenkarzinom zu entwickeln als Nichtraucher. Dabei mache es keinen Unterschied, um welchen histologischen Typ es sich handelt (Terry et al., 2002).

Dicken et al. (2005) beschreiben ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko, vor allem für Tumore im proximalen Bereich des Magens bei Rauchern.

Diese Tatsache lässt sich z.T. damit erklären, dass Tabakrauch mit einem Abfall der Prostaglandinkonzentration im Magen selbst einhergeht, die wichtig ist, um das Magenmilieu aufrechtzuerhalten und die Mukosa zu schützen. Bei Patienten, die Tabak konsumieren, werden

gehäuft Vorläuferläsionen gefunden, wie Gastritis, Ulzerationen oder Entzündungsreaktionen (Nagini, 2012).

Bezüglich des Alkoholkonsums und der Assoziation zur Entstehung eines Magenkarzinoms existieren unterschiedliche Angaben in der Literatur. Während Terry et al. (2002) erwähnen, dass v.a. Kardial-Karzinome bereits durch geringe Mengen Alkohol pro Tag begünstigt werden und ebenso Nagini (2012) von einem starken Zusammenhang ausgeht, beschreiben Gajalakshmi & Shanta (1996) Alkohol jedoch nicht als Risikofaktor.

1.2.4 Präkanzerosen

Präkanzerosen sind sehr bedeutsam für die Entstehung von Magenkarzinomen, v.a. für die Entartung zum intestinalen Typ nach Laurén (s. Kap. 1.3). Der diffuse Typ tritt häufiger familiär und bei jüngeren Frauen auf und ist seltener mit Präkanzerosen assoziiert. Beim intestinalen Typ sind oft ältere Männer betroffen. Ein häufiger Weg der Karzinogenese verläuft über einen großen Zeitraum, lange unbemerkt von Symptomen über die intestinale Metaplasie und Atrophie bis hin zur Neoplasie (Siewert et al., 2006).

Als wichtige Präkanzerose ist die Gastritis zu nennen. Ätiopathogenetisch lässt sie sich in Typ A, B und C gliedern. Typ A beschreibt die autoimmune, Typ B die bakterielle (*H. pylori*) und Typ C die chemisch-reaktive Gastritis (z.B. durch Galle, Alkohol, Medikamente). Dessen endo- oder exogene Faktoren begünstigen eine Karzinogenese (Böcker et al., 2008).

Die häufige *H. pylori*-assoziierte Typ B-Gastritis ist in der Lage, eine Schleimhautatrophie zu verursachen. Wenn daraus Zelldysplasien entstehen, kann sich als Folge ein intestinales Magenkarzinom entwickeln. Die Typ B-Gastritis ist somit eine fakultative Präkanzerose (Vauhkonen et al., 2006). Neben *Helicobacter pylori*, dem mit Abstand häufigsten Risikofaktor, sind noch eine Reihe weiterer Risikofaktoren bekannt. Viele von ihnen können ebenso eine chronisch-atrophische Gastritis auslösen, beispielsweise Magen-Operationen, die einen Gallereflux verursachen, wie z.B. die Operation nach Billroth II (Dicken et al., 2005).

Das Risiko, infolge einer chronischen Gastritis ein Magenkarzinom zu entwickeln, liegt bei ca. 10% über 10 Jahre, ist jedoch abhängig von der Schwere der Gastritis (Siewert et al., 2006).

Neuere Studien geben Hinweise darauf, dass neben *H. pylori* noch weitere Infektionen mit Magenkarzinomen assoziiert sind, v.a. das Epstein-Barr-Virus (EBV). Ungefähr 10% der Adenokarzinome des Magens sind mit diesem Herpesvirus infiziert. Bei Magenstumpfkarzinomen sind es mit ca. 35% noch deutlich mehr. Der genaue Pathomechanismus ist derzeit Gegenstand der Forschung. Insbesondere ist die Einschleusung des Virus in die Epithelzelle

noch unklar, da die üblichen Rezeptoren (z.B. CD 21) nicht exprimiert werden. Zur Hausen et al. (2004) gehen davon aus, dass eine EBV-Infektion erst im späteren Verlauf der Karzinogenese auftritt, da EBV-RNA eher in neoplastischen Zellen und weniger in normaler Schleimhaut oder in Vorläuferläsionen gefunden wurde. Eine latente Infektion mit EBV aktiviert mitunter extrazellulär regulierte Kinasen wie ERK und MAPK1 und den Ras/PI3K/Akt-Signalweg (Jang & Kim, 2011). Schleimhautveränderungen, wie beispielsweise hyperplastische Polypen, entarten äußerst selten. Adenome des Magens, die seltener auftreten als Polypen, transformieren häufiger. Dieses Risiko ist bei den kleinen, flachen Adenomen höher (Siewert et al., 2006). Besteht ein Morbus Menetrier (Riesenfaltengastritis) ist das Risiko, daraus ein Magenkarzinom zu entwickeln, erhöht. In den ca. 200 beschriebenen Fällen entstand bei ca. 15% ein Magenkarzinom. Deshalb wird bei diesem Risikokollektiv eine jährliche Endoskopie zur Prävention empfohlen (Siewert et al., 2006).

1.3 Histologie und Morphologie

Für die histopathologische Einteilung von Magenkarzinomen stehen mehrere Klassifikationen zur Verfügung. Lange etabliert und häufig verwendet ist die Klassifikation nach Laurén. Die Einteilung der Subtypen erfolgt lichtmikroskopisch an routinegefärbten Schnittpräparaten (HE, PAS), (Correa, 1992). Laurén unterscheidet den intestinalen und den diffusen Typ. Im Laufe der Jahre wurde der Mischtyp zur besseren Differenzierung hinzugefügt. Der intestinale Typ ist eher in Magenkorpus und -antrum älterer Männer lokalisiert. Histologisch erkennt man drüsige, exophytisch wachsende Tumorzellformationen, die sich vielmehr expandierend als infiltrierend ausbreiten. Oft sind diese noch relativ gut differenziert.

Beim diffusen Typ ist keine bevorzugte Lokalisation auszumachen, nicht selten ist der ganze Magen betroffen. Das Wachstum geht nicht flächig voran, sondern ulkusähnlich, wächst schneller in die Tiefe und die Zellen sind undifferenzierter. Die häufigste Form des diffusen Magenkarzinoms ist das Siegelringzellkarzinom, das eine schlechte Prognose vorweist. Am diffusen Magenkarzinom leiden öfter Frauen und jüngere Menschen, was an eine genetische Entstehungskomponente denken lässt (s. Kap. 1.2.2). Der Mischtyp nach Laurén kombiniert Eigenschaften des intestinalen und diffusen Karzinomtyps (Vauhkonen et al., 2006; Dicken et al., 2005; Fox & Wang, 2007; Hartgrink et al., 2009).

Eine weitere histopathologische Klassifikation ist die der WHO (2010). Sie ermöglicht eine präzisere Einteilung in viele histologisch definierte Subtypen. Die am häufigsten vorkommen-

den Karzinome sind tubuläre Adenokarzinome und Siegelringzellkarzinome. Andere histologische Varianten sind seltener (Hu et al., 2012).

1.4 Staging und Grading

Als *staging* bezeichnet man die Bestimmung der Ausbreitung eines malignen Tumors. Wichtig sind Größe und Ausdehnung des Primärtumors sowie Ausbreitung im Sinne von Lymphknoten- oder Fernmetastasen. In der orientierenden klinischen Primärdiagnostik hat sich beim Magenkarzinom wegen der hohen Sensitivität und Spezifität die Endosonographie bewährt. Dabei können gleichzeitig Gewebeproben gewonnen werden. Klinisch wird das cTNM-Stadium bestimmt, wobei T die Ausdehnung des Primärtumors, N den Lymphknotenstatus und M die Fernmetastasierung beschreibt. Die Ergebnisse, die aus chirurgischen Eingriffen und histopathologischen Untersuchungen gewonnen werden, fließen in die pTNM-Klassifikation ein, die durch den Pathologen erfolgt (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: **Histologische Klassifikation der T-Stadien des Magenkarzinoms**, modifiziert nach (Washington, 2010)

Tx	Primärtumor unbeurteilbar
T0	kein Beweis eines Primärtumors
Tis	Carcinoma in situ, intraepithelialer Tumor ohne Durchdringen der Lamina propria
T1a	Infiltration Lamina propria oder Lamina muscularis mucosae
T1b	Infiltration Submukosa
T2	Infiltration Muscularis propria
T3	Infiltration subseröses Bindegewebe, ohne Peritoneum
T4a	Infiltration Serosa
T4b	Infiltration benachbarter Organe

Weiterhin wird zum *staging* eine Computertomographie von Thorax und Abdomen mit intravenösem und oralem Kontrastmittel empfohlen. Die klinische Evaluation des Lymphknotenstatus mit Hilfe der Computertomographie ist schwierig, da sie entzündliche von tumorös veränderten Lymphknoten nicht sicher zu unterscheiden vermag. Letztlich kann diese nur durch die histologische Begutachtung präzise erfolgen. Zum *staging* der Fernmetastasen (v.a.

Lebermetastasen) kann ein abdomineller Ultraschall erfolgen. Mehr Sicherheit bietet ein Computertomogramm. Im Zweifelsfall kann eine diagnostische Laparoskopie in Erwägung gezogen werden. Man sollte sich jedoch der Invasivität dieser Methode bewusst sein. Das chirurgische *staging* erfolgt primär makroskopisch, es sei denn, es werden intraoperative Schnellschnitte angefertigt. Die histologische Beurteilung mittels Aufbereitung der Operationspräparate ist von essenzieller Bedeutung (Moehler et al., 2011). Für die Therapieentscheidung ist es unerlässlich, das Stadium nach UICC zu bestimmen, um die Ausgangssituation des betreffenden Patienten genau festzusetzen (s. Tabelle 2) (Washington, 2010).

Tabelle 2: **UICC-Stadien des Magenkarzinoms**, modifiziert nach (Washington, 2010)

UICC-Stadium	T	N	M
0	Tis	0	0
Ia	1	0	0
Ib	2	1	0
	1	1	0
IIa	3	0	0
	2	1	0
	1	2	0
IIb	4a	0	0
	3	1	0
	2	2	0
	1	3	0
IIIa	4a	1	0
	3	2	0
	2	3	0
IIIb	4b	0/1	0
	4a	2	0
IIIc	3	3	0
	4b	2/3	0
	4a	3	0
IV	1-4b	0-3	1

Anmerkungen: Tis=Carcinoma in situ

Das histopathologische *grading* bezieht sich auf den Differenzierungsgrad der Tumorzellen.

Gx: Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden

G1: gut differenziert

G2: mäßig differenziert

G3: schlecht differenziert

G4: undifferenziert

Viele Autoren fassen G3 und G4 inhaltlich zusammen (Wittekind & Meyer, 2010).

1.5 Molekulare Karzinogenese

Die molekulare Karzinogenese des Magenkarzinoms ist sehr komplex und im Einzelnen noch nicht vollständig verstanden. Dabei bauen viele verschiedene Stufen aufeinander auf. Eine besondere Bedeutung kommt der Alteration unterschiedlicher Gene zu, sei es durch Punktmutation, Deletion, Rekombination oder Amplifikation. Dazu gehören auch epigenetische Modifikationen, wie z.B. Promoterhypermethylierungen, die Tumorsuppressorgene unterdrücken und somit die Karzinogenese begünstigen können (Jang & Kim, 2011). Es gibt einige Theorien, die Erklärungsansätze auf histopathologischer oder molekularbiologischer Ebene für die Entstehung von Magenkarzinomen bieten.

Eine davon ist der *Correa Pathway*. Er beschreibt die Theorie der Entstehung eines intestinalen Magenkarzinoms. Durch eine Infektion mit *H. pylori* kann gesunde Magenschleimhaut geschädigt werden und eine Gastritis entstehen. Bei langfristig bestehender Milieuänderung kann sich eine intestinale Metaplasie ausbilden, auf deren Boden dysplastische Läsionen entstehen können. Auf dieser Basis kann dann ein Magenkarzinom entstehen, i.d.R. vom intestinalen Typ (Vauhkonen et al., 2006) (s. Abb 1).

Correa Pathway

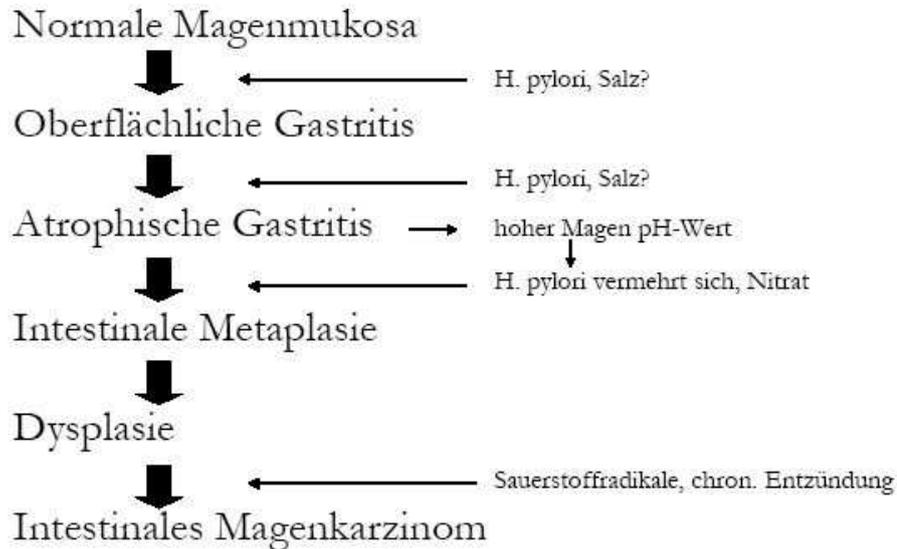


Abb 1: **Correa Pathway** modifiziert nach (Fox & Wang, 2007)

Der *Correa Pathway* ist ein mögliches Erklärungsmodell für die Karzinogenese von intestinalen Magenkarzinomen. Trotzdem können diese ebenso ohne die genaue Abfolge dieser Sequenz auftreten (Hohenberger & Gretschel, 2003). Das betrifft mindestens ca. 20-30% aller Magenkarzinome. Bei solchen Patienten sieht man in der Magenschleimhaut keine Gastritis, aber ggf. ein Magenkarzinom (Vauhkonen et al., 2006).

Der EGFR-Signalkaskade kommt eine besondere Rolle in der Entstehung vieler Tumore zu. Sie regt die Zellproliferation gesunder, aber ebenso transformierter Zellen an. Sobald es zu aktivierenden Mutationen von Komponenten dieser Signalwege kommt, können sich diese von der Kaskade entkoppeln. Damit wird die Selbstregulation gestört und natürliche Inhibitoren verlieren ihre Wirkung. Magenkarzinome mit Mutationen bestimmter Protoonkogene gehen mit einer schlechten Prognose einher (Steelman et al., 2011).

Von zentraler Bedeutung ist dabei der EGF-Rezeptor. Dieser ERBB-1 Rezeptor (EGFR, HER1) ist eines von vier Mitgliedern der ERBB-Familie (HER2, HER3, HER4), die sich in ihrer Struktur und Funktion ähneln. Der EGF-Rezeptor befindet sich am Rande der Zellmembran und besitzt eine cysteinreiche, extrazelluläre Rezeptordomäne und eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinasefunktion. Aktiviert wird der Rezeptor durch die Bindung eines

Liganden an die extrazelluläre Domäne (z.B. EGF, TGF). Dadurch dimerisiert der EGFR und wird u.a. durch Tyrosinkinaseaktivität autophosphoryliert (Citri & Yarden, 2006; Carpenter & Cohen, 1990). Die Aktivierung des EGFR ist ein Ausgangspunkt für den Ras/Raf/MEK/ERK- und den PI3K-Akt-Weg (s. Abb. 2).

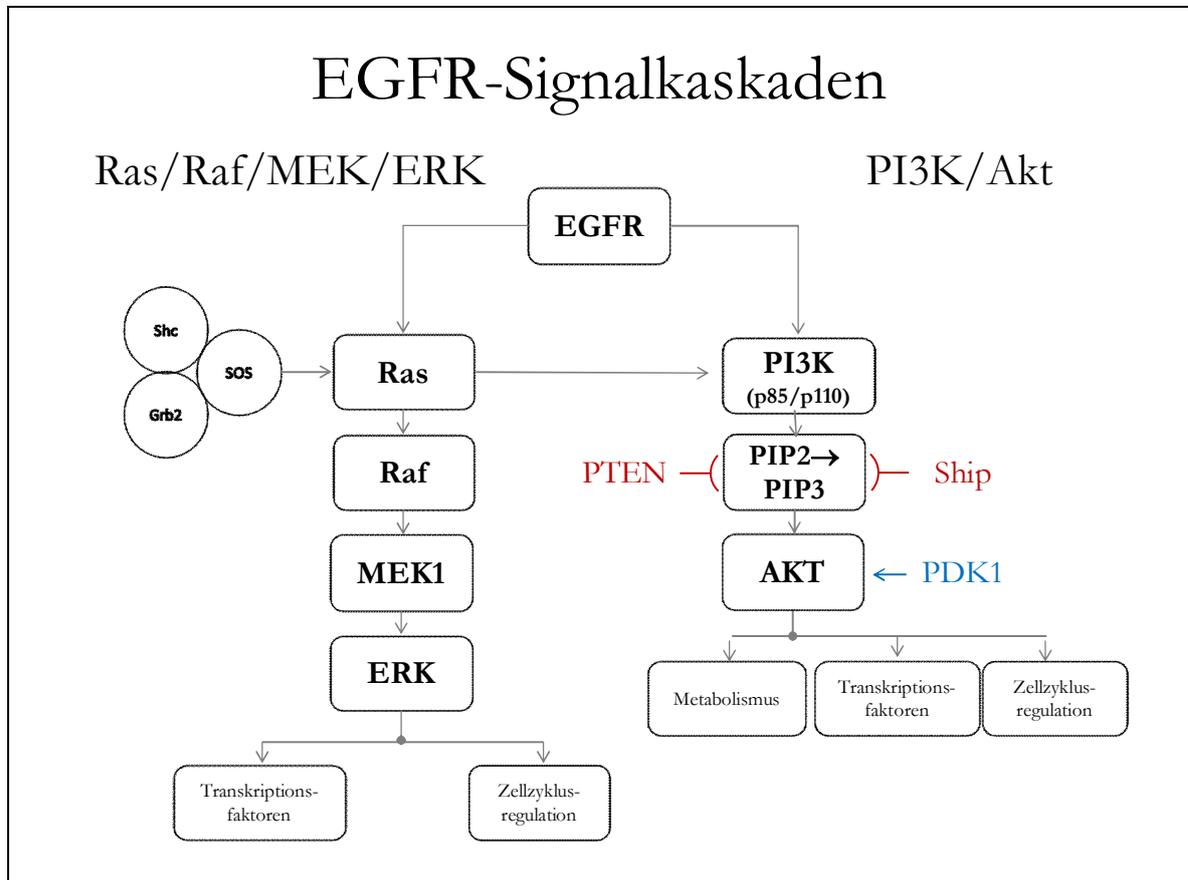


Abb 2: **EGFR-Signalkaskaden** modifiziert nach (McCubrey et al., 2007)

Durch die EGFR-Aktivierung kann dessen C-Terminus mit dem *Src-homology-2-domain-containing protein* (Shc) interagieren. Shc rekrutiert das Grb2-Protein und das *son of sevenless* (SOS)-Protein. Mit Hilfe dieses Komplexes ist es möglich, KRAS Energie in Form von GTP zuzuführen und damit zu aktivieren. KRAS selbst kann wiederum BRAF aktivieren. BRAF ist verantwortlich für die Phosphorylierung von Serin und Threonin der *mitogen activated protein kinase kinase-1* (MEK1). Dadurch ist MEK1 im Stande, ERK zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Das aktivierte ERK ist ein wichtiger Knotenpunkt und verbindet viele Signalkaskaden miteinander (Steelman et al., 2011).

Der aktivierte EGF-Rezeptor hat aber ebenso die Möglichkeit, den PI3K/PTEN/Akt-Weg zu stimulieren. PI3K kann auf zwei Wegen aktiviert werden. Zum einen kann EGFR selbst an die p85-regulatorische Untereinheit von PI3K binden. Dadurch kann die katalytische Untereinheit

p110 mit diesem Komplex verschmelzen. Zum anderen kann das oben erwähnte aktivierte *KRAS* ebenso p110 aktivieren. Das aktivierte PI3K wandelt dann Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat (PIP2) in Phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat (PIP3) um. PIP3 aktiviert danach Akt, welches wieder einen wichtigen Knotenpunkt in der Verbindung vieler Signalkaskaden darstellt und zahlreiche Effektoren besitzt, die die Zellproliferation vorantreiben. Für die Eindämmung des Zellwachstums, insbesondere um unkontrollierte Proliferation zu vermeiden, existieren zusätzlich Inhibitoren der EGFR-Signalkaskade. Erwähnt seien beispielsweise PTEN und Shp. Aktivierend wirkt z.B. PDK1 (McCubrey et al., 2007). Durch Veränderungen in diesen komplexen Kaskaden, entweder durch Überaktivierung, Hemmung oder Entkoppelung einzelner Bestandteile, kann sich das System nicht mehr selbst kontrollieren und Zellen haben die Möglichkeit, unkontrolliert zu proliferieren. Genmutationen begünstigen diesen Zustand (Lee et al., 2003).

1.6 *KRAS*

RAS zählt zu den Protoonkogenen. Zur RAS-Familie gehören drei verschiedene Proteine: *HRAS*, *KRAS* und *NRAS*. Sie spielen eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion der MAPK-Kaskade. Ras-Proteine binden GDP und GTP mit hoher Affinität und können die Energie weiter zu Effektorproteinen übermitteln. Diese können folglich durch eine Konformationsänderung des Ras-Proteins aktiviert bzw. deaktiviert werden. Die GDP-gebundene Form ist inaktiv, während die GTP-gebundene Form aktiv ist (Lee et al., 2003). Die Regulation dieser Aktivierung erfolgt durch *guanin nucleotide releasing-Proteine* (GNRPs), welche Energie in Form von ATP speichern können. Die Wirkung ist abhängig von der Menge an GTP-gebundenem *KRAS* (Bollag & McCormick, 1991). Durch eine Komplexbildung aus dem *KRAS*-Protein, GRB2, GEF und SOS wird die Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade angeregt. Dadurch werden andere Effektorproteine phosphoryliert und somit verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert. Daraus resultiert Zellwachstum und Proliferation, eventuell auch Apoptose (McCubrey et al., 2007).

In einer Reihe von Karzinomen sind Veränderungen von *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) in der Karzinogenese anzutreffen. Ras-Proteine sind wichtig für das Zellwachstum, den Lipidmetabolismus und *second-messenger*-Systeme (z.B. Stimulation zur Bildung von cAMP und Proteinkinase C) (Bollag & McCormick, 1991).

Bei molekularen Veränderungen von *KRAS*, die eine Karzinogenese begünstigen, handelt es sich v.a. um Mutationen, die zur Aktivierung von *KRAS*-Proteinen führen. Dadurch ist der

normale Ablauf der EGFR-Signalkaskade gestört. Im ungünstigsten Fall proliferieren die Zellen ungehindert, da inhibitorische *feedback*-Mechanismen nicht mehr wirkungsvoll sind. Dadurch können Karzinome entstehen. Eine alleinige Ausprägung einer aktivierenden *KRAS*-Mutation genügt dabei. Es wurde nachgewiesen, dass die Elimination dieser Mutation aus bestehenden Tumorzellen zur Tumorregression führt (Grabrocka et al., 2014).

Zudem sind Tumore mit *KRAS*-Mutationen gegenüber einer Therapie mit Anti-EGFR-Inhibitoren resistent (s. Kap. 1.9) (Liu et al., 2009).

In allen malignen Tumoren des Körpers zusammen findet sich eine Häufigkeit von ca. 15% *KRAS*-Mutationen. Vermehrt treten diese bei malignen Karzinomen des Pankreas (69-90%), Kolons und Rektums (32-53%), der Lunge (15-50%) und der Gallenblase (10-38%) auf. Häufig sind Mutationen in Exon 2 anzutreffen, wobei die Hotspots nicht unbedingt in jeder Tumorentität dieselben sind. Als Hotspot-Mutationen im Allgemeinen gelten DNA-Sequenzen, welche für Mutationen anfälliger sind aufgrund von molekularer Instabilität, der chemischen Prädisposition zu Punktmutationen oder *crossing over* (Davies et al., 2002).

Die Literatur gibt für *KRAS*-Mutationen des Magens unterschiedliche Prävalenzen an, jedoch sind sie im Vergleich zu anderen Tumoren eine Rarität. Pinto et al. (2009) beschreiben eine Prävalenz der *KRAS*-Mutationen von 9,4% (in einem Kollektiv von 72 Patienten). In den früheren Arbeiten ist sogar die Rede von 0% *KRAS*-Mutationen (n=72), (Maesawa et al., 1995). Vauhkonen et al. (2006) gehen von 10-18% aus.

Die aktuell größte und multizentrische Studie (n= 712 Patienten) untersucht die Prävalenz von *KRAS*-Mutationen beim Magenkarzinom für Kohorten in Großbritannien (5,8%), Japan (4%) und Singapur (1,5%) (van Grieken et al., 2013).

Die Hotspot-Mutationen von *KRAS* befinden sich häufig in Exon 2 und 3, v.a. in Codon 12 und treten bevorzugt beim intestinalen Typ nach Laurén auf. Eine Mutation im diffusen Typ ist selten (Nagini, 2012; Liu et al., 2009). Kommt es zu *KRAS*-Mutationen, handelt es sich meist um G12D oder G12V. Bei der Mutation G12D erfolgt ein Basenaustausch von Glycin zu Asparaginsäure. Bei der *KRAS*-Mutation G12V wird Glycin durch Valin ersetzt (van Grieken et al., 2013). Die Mutation G12D scheint mit einem sehr aggressiven Phänotyp assoziiert zu sein, anders als G12V (Cervera & Fléjou, 2011).

1.7 BRAF

BRAF ist eines der drei Mitglieder der Raf-Familie (ARAF, BRAF, CRAF), die jeweils für eine Serin/Threonin-Kinase kodieren und durch die Bindung von KRAS reguliert werden (Lee et al., 2003) (McCubrey et al., 2007). Die Aktivität von Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma) wird durch seine *conserved region* (CR) 2 regulatorische Domäne gedrosselt. Dies ist beispielsweise durch den Einfluss von Proteinkinase A (PKA) und Akt möglich. BRAF ist im Vergleich zu ARAF und CRAF viel kompetenter, den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg zu aktivieren.

BRAF-Mutationen treten in ungefähr 7% aller menschlichen Tumore auf. Bis vor einigen Jahren kam den *KRAS*-Mutationen eine viel größere Bedeutung zu, bis sich herausstellte, dass die *BRAF*-Mutationen zwar insgesamt selten, in einigen Tumorentitäten jedoch gehäuft auftreten: maligne Melanome (27-70%), papilläre Schilddrüsenkarzinome (36-53%), kolorektale Karzinome (5-22%), Ovarialkarzinome (30%). Man geht davon aus, dass die *BRAF*-Mutationen häufiger als *ARAF*- oder *CRAF*-Mutationen sind, weil eine einzelne genetische Mutation ausreicht, um eine Aktivierung herbeizuführen, während bei *ARAF* und *CRAF* zwei genetische Veränderungen nötig sind (Lee et al., 2003).

Die bei weitem häufigste *BRAF*-Mutation ist V600E in Exon 15 (ehemals V599E). Dabei wird Valin durch Glutaminsäure ausgetauscht. Diese Mutation befindet sich in der Kinasedomäne von *BRAF*. Sie ist eine aktivierende Mutation, erhöht die Kinaseaktivität mehr als 500-fach und regt somit eine Überstimulation der Zellproliferation an (Lee et al., 2003; Giannini et al., 2007). Im Falle dieser *BRAF*-Mutation bildet das BRAF-Protein neue molekulare Interaktionen aus und behält seine katalytisch aktivierte Konformation dauerhaft bei. Dadurch wird kann MEK kontinuierlich phosphoryliert und somit aktiviert werden (s. Kap. 1.5), (Ciampi & Nikiforov, 2007).

Neben Exon 15 ist auch Exon 11 ein Hotspot für *BRAF*-Mutationen. Beide Exone kodieren die Kinasedomäne in der *G-loop* Region und im aktivierenden Segment von *BRAF* (Lee et al., 2003).

Besonders häufig (>40%) findet man *BRAF*-Mutationen in papillären Schilddrüsenkarzinomen. In >90% der Fälle handelt es sich um die Mutation V600E (Giannini et al., 2007). Tiermodelle haben bestätigt, dass genetisch veränderte Mäuse mit der Expression von V600E mit hoher Penetranz papilläre Schilddrüsenkarzinome mit aggressivem Wachstumsverhalten (schlecht differenziert, multifokale Progression) ausprägen (Ciampi & Nikiforov, 2007).

Bei multifokalen papillären Schilddrüsenkarzinomen ist die inter- und intratumorale Heterogenität mit ca. 40% besonders hoch. Bei diesen Karzinomen können anscheinend molekular-

biologisch unterschiedliche Läsionen unabhängig voneinander wachsen (Giannini et al., 2007). Die Mutationsheterogenität könnte eine Ursache für die Therapieresistenz gegenüber monoklonalen Antikörpern sein (Ciampi & Nikiforov, 2007).

BRAF-Mutationen sind in Magenkarzinomen im Vergleich zu anderen Tumoren sehr selten. Lee et al. (2003) entdeckten in ihrem Kollektiv von 319 Magenkarzinomen sieben *BRAF*-Mutationen (2,2%). Wenn Mutationen auftreten, dann handelt es sich meist um die Mutation V600E (Lee et al., 2003). Viele Autoren beschreiben keine *BRAF*-Mutationen im Magenkarzinom (Pinto et al., 2009). Velho et al. (2005) zeigten das an einer Population von 47 Patienten mit Magenkarzinom. Die aktuellste Multizenterstudie, bei der eine große Kohorte von 712 Patienten eingeschlossen wurden, bestätigt die Seltenheit von *BRAF*-Mutationen im Magenkarzinom (Großbritannien 0%, Japan 0,4%, Singapur 0%) (van Grieken et al., 2013).

In sehr seltenen Fällen können *KRAS* und *BRAF* im selben Magenkarzinom gleichzeitig mutiert sein (Lee et al., 2003). Andere Autoren fanden keinen Beweis dafür, dass beide Mutationen in Zusammenhang stehen, wie z.B. Kim et al. (2003).

1.8 *PIK3CA*

Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3Ks) gehören zur Familie der Lipidkinasen. Man kann sie in drei Klassen einteilen (I-III).

Ia PI3Ks sind heterodimere Proteine, welche aus einer p110 katalytischen und p85 regulatorischen Untereinheit bestehen. Sie werden über Rezeptortyrosinkinasen oder das Binden von aktiviertem Ras-Protein gesteuert. Als Komplex können sie andere Proteine aktivieren, indem sie den Inositolring von PIP2 phosphorylieren. Dadurch entsteht PIP3, welches als *second-messenger* fungiert. Es hat verschiedene *Targetproteine*, u.a. AKT.

PIK3CA gehört zur Klasse I der PI3Ks. Das *PIK3CA*-Gen kodiert für die katalytische Untereinheit p110 α , die einen Komplex mit p110 β und δ bildet und danach der PI3K/AKT-Signalkaskade folgt (s. Kap. 1.5). Man geht von einer sehr großen Bedeutung dieses Gens für die Tumorkarzinogenese vieler maligner Tumore aus. Zu nennen sind u.a. kolorektale Karzinome, Magenkarzinome, Glioblastome, Mamma- und Bronchialkarzinome (Velho et al., 2005).

Es existieren zwei wesentliche Hotspots, in denen gehäuft Mutationen auftreten: die helikale (Exon 9) und die katalytische Proteindomäne (Exon 20) (Velho et al., 2005).

Die Angaben in der Literatur zur Prävalenz von Mutationen von *PIK3CA* im Adenokarzinom des Magens reichen von 5,1% (Lee et al., 2012) über 7,1% (Shi et al., 2012) bis hin zu 16,5% (Barbi et al., 2010).

Eine häufige Mutation in *PIK3CA* ist H1047R, bei der Histidin durch Arginin ersetzt wird. Es scheint so, als ob beim Auftreten dieser Mutation die Lipidkinaseaktivität erhöht wäre (Samuels et al., 2004). Während diese Mutation in der Kinasedomäne von *PIK3CA* zu finden ist, sind die Hotspot-Mutationen E542K und E545K in der Helikasedomäne lokalisiert. Sie sind in der Lage, die Interaktion zwischen der N-terminalen SH2-Domäne von p85 und der Helikasedomäne von p110 zu stören.

Insgesamt stellen diese drei Mutationen 80% aller *PIK3CA*-Mutationen dar. Sie haben die Fähigkeit, unabhängiges Tumorzellwachstum zu triggern, z.B. durch über die Aktivierung von Proteinkinase B und Akt. Als aktivierende Mutationen weisen sie onkogenetisches Potential vor (Zhao & Vogt, 2008). Sobald *PIK3CA*-Mutationen in Karzinomen vorkommen, geht dies mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einher. Gezeigt wurde das u.a. an Mamma- und metastasierten kolorektalen Karzinomen (Mao et al., 2012). Die Heterogenität dieser Mutationen wurde bislang nur selten untersucht. Im Mammakarzinom, bei dem die Prävalenz von *PIK3CA*-Mutationen sehr hoch ist, scheint die Tumorheterogenität bezüglich Primärtumor und Metastasen eine Rarität zu sein (Kalinsky et al., 2011).

1.9 Therapie des Magenkarzinoms

Der wichtigste Therapieansatz des Magenkarzinoms war und ist die chirurgische Resektion. Bis in die späten 1990er Jahre war die Operation sogar die einzige Therapieoption. Chemotherapie und Radiatio wurden nur palliativ eingesetzt. Dieses Vorgehen hat sich in den letzten Jahren weitgehend geändert (Wöll et al., 2008). Für eine kurative Therapie sollte das Magenkarzinom chirurgisch komplett entfernt werden. Dazu ist in den meisten Fällen eine totale Gastrektomie mit Lymphadenektomie nötig, da die Diagnose aufgrund der Symptomarmut oft spät gestellt wird. Ausnahmen sind Mukosakarzinome des Magens, bei denen eine endoskopisch lokale Resektion möglich ist und weit distal gelegene Karzinome, die eventuell durch eine subtotale Gastrektomie therapiert werden können (Vallböhmer & Knoefel, 2014). Ein weiterer potenziell kurativer Therapieansatz ist die neoadjuvante Therapie. Dabei erfolgt bereits präoperativ eine Chemo- und/oder Radiotherapie, um das Magenkarzinom zu verkleinern und die Chance der vollständigen chirurgischen Resektion zu erhöhen. Diese Strategie wird bei fortgeschrittenen Magenkarzinomen präferiert.

Eine adjuvante Therapie (Chemotherapie/Radiatio nach chirurgischer Therapie) ist möglich, sollte aber nicht Mittel der Wahl sein, da die neoadjuvante Therapie bessere Erfolgschancen bringt und verträglicher ist. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass der Gesundheitszustand des Patienten postoperativ diese Behandlung nicht erlaubt (Moehler et al., 2011). Kommt es zu einer palliativen Situation, wird einem Patienten in gutem Allgemeinzustand eine systemische Chemotherapie angeboten. Nicht selten entstehen im Verlauf Komplikationen, wie z.B. eine Magenausgangsstenose. In solchen Fällen können verschiedene endoskopische oder sogar chirurgische Verfahren zur Anwendung kommen (Moehler et al., 2011). Die Prognose für Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom und Fernmetastasen, bei denen man eine systemische Chemotherapie anwendet, ist derzeit sehr schlecht (5-Jahres-Überlebensrate <5%, *overall survival* <12 Monate) (Ohtsu et al., 2013). Bezüglich der Chemotherapie verwendet man derzeit vor allem Kombinationen, da sie einen Überlebensvorteil gegenüber der Monotherapie bieten. Als Beispiele sind FAM (5-Fluorouracil+Doxorubicin+Mitomycin C) und FAMTX (5-Fluorouracil+Doxorubicin+Methotrexat) zu erwähnen (Wöll et al., 2008). Studien, die in westlichen Ländern durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass meist zum Diagnosezeitpunkt die Submukosa der Magenschleimhaut schon infiltriert ist. Dadurch sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate von ursprünglich 70-95% auf 20-30%. Aus diesem Grund haben Cunningham et al. (2006) untersucht, ob sich durch die perioperative Anwendung von Chemotherapie (im Speziellen das ECF-Schema: Epirubicin, Cisplatin, Fluorouracil) bei potenziell kurativen Patienten das *outcome* verbessern lässt. Tatsächlich verringern sich Tumorgröße und -stadium. Zusätzlich zeigen sich signifikante Verbesserungen des *progression free survival* (PFS) und *overall survival* (OS) (MAGIC-trial). Die perioperative Chemotherapie erhöht die Wahrscheinlichkeit, die rasche lymphatische Metastasierung einzudämmen (Cunningham et al., 2006). Eine relativ neue und zielgerichtetere Behandlungsmethode ist die *targeted therapy*. Mittels Verwendung monoklonaler Antikörper als Therapeutika ist es möglich, Tumorzellen selektiv zu bekämpfen (Adams & Weiner, 2005). Besonders vielversprechend sind diejenigen, deren Zielstruktur der EGF-Rezeptor darstellt: die monoklonalen Anti-EGFR-Antikörper (z.B. Cetuximab, Panitumumab). Sie binden kompetitiv an die extrazelluläre Domäne von EGFR und blockieren somit die EGFR-Signalkaskade, wodurch Apoptose eingeleitet wird und die Tumorzellen zugrunde gehen. Nach 20 Jahren Forschung sind Anti-EGFR-Antikörper für nur vier Tumorentitäten zugelassen: nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, squamöse Kopf- und Halskarzinome, kolorektale und Pankreaskarzinome (Ciardiello & Tortora, 2008).

Ein wichtiger Vertreter ist Cetuximab. Dieser stellt einen rekombinanten monoklonalen Antikörper vom Typ IgG1 dar. Er ist chimär, das bedeutet, sein konstanter Anteil ist humaner,

sein variabler Anteil muriner Herkunft. Cetuximab bindet spezifisch an die extrazelluläre Domäne des EGFR in normalen und karzinomatös transformierten Zellen und hemmt dadurch kompetitiv die Bindung von EGF und anderen Liganden. Damit wird die EGFR-Signalkaskade unterbunden und die Tumorzellproliferation gehemmt. Bisherige klinische Zulassung besteht u.a. für das fortgeschrittene kolorektale Karzinom. In Kombinationstherapie mit Standard-Chemotherapeutika zeigten sich laut FUFOX/FOLFOX- und FOLIFIRI-Studie deutliche Überlebensvorteile. Das Nebenwirkungsprofil von Cetuximab und anderen monoklonalen Antikörpern ist deutlich geringer im Vergleich zur Chemotherapie. Es handelt sich bei den Nebenwirkungen um Infusionsreaktionen, Hauttoxizität, Diarrhoen und Flushsymptomatik (Arkenau, 2009).

In der DOCETUX-Studie wurde untersucht, ob es möglich ist, diese Therapieerfolge vom Kolon- auf das Magenkarzinom zu übertragen. Dabei wurde Cetuximab in Kombination mit Cisplatin und Docetaxel an Patienten mit fortgeschrittenem, bis dahin unbehandeltem Magenkarzinom verabreicht. Es konnte eine verbesserte ORR (*overall response rate*) nachgewiesen werden, ohne die Rate an Nebenwirkungen zu steigern. Jedoch blieben TTP (*time to progression*) und OS (*overall survival*) unverändert (Pinto et al., 2009).

Panitumumab ist ein weiterer Anti-EGFR-Antikörper, der sich noch in der klinischen Erprobung befindet. Man erhofft sich eine noch potentere Wirkung als durch Cetuximab, größere Affinität zum EGF-Rezeptor und weniger Nebenwirkungen. Vorteilhaft ist, dass Panitumumab nicht chimär, sondern komplett humanisiert ist und somit keine Fremdproteinanteile enthält, die vom Immunsystem als Fremdeiweiß erkannt werden könnten (Adams & Weiner, 2005).

Analog zum Mammakarzinom ist bei Magenkarzinomen eine häufige Amplifikation von *HER2* (*human epidermal growth receptor 2*, ERBB-2) vorzufinden (s. Kap. 1.5). Diese betrifft eher den intestinalen Typ nach Laurén und tritt in den meisten Fällen homogen zwischen Primärtumor und Metastasen auf (Hu et al., 2012). Ebenso sind Mutationen von *HER2* in dessen Kinasedomäne beschrieben. (Stephens et al., 2004), der sich in seiner Arbeit eher auf das Bronchialkarzinom fokussiert, beschreibt zusätzlich 5% *HER2*-Mutationen im Magenkarzinom.

Vom humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab wird der *HER2*-Rezeptor kompetitiv gebunden, die Wachstumssignalkaskade inhibiert und die Tumorzellen gehen zugrunde. Im ToGA-Trial wurde der Nutzen bezüglich der Therapie des Magenkarzinoms untersucht. Trastuzumab wurde in Kombination mit Capecitabine oder Fluorouracil und Cisplatin verabreicht. Es zeigte sich ein Ansprechen auf diese Therapie, sofern der Rezeptorstatus

HER2 positiv war. Dies äußerte sich in verbessertem *overall survival* (OS), *progression free survival* (PFS) und der *response rate* (Hu et al., 2012).

Ein weiteres vielversprechendes Forschungsgebiet, die Inhibition des EGFR betreffend, sind sogenannte *small molecules*, Inhibitoren von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Diese konkurrieren mit ATP kompetitiv um die intrazelluläre katalytische Domäne der EGFR-Tyrosinkinase und hemmen somit die Autophosphorylierung des EGFRs und ebenso die EGFR-Signalkaskaden (z.B. Erlotinib, Gefitinib), (Ciardiello & Tortora, 2001). Bislang scheint es, als würde Gefitinib wirksam die Aktivierung des EGFR beim Magenkarzinom inhibieren. Trotzdem spiegelt diese Tatsache sich bislang nicht im klinischen Erfolg wider (Rojo et al., 2006).

Ebenso aktueller Gegenstand der Forschung im Sinne von klinischen Studien sind selektive PI3K-Inhibitoren, wie z.B. BKM120 und BEZ235. Die Tatsache, dass Magen- und kolorektale Karzinome in 10-20% mit Mutationen von PI3K einhergehen, könnte mit der Therapieresistenz monoklonaler Antikörper zusammen hängen. PI3K-Inhibitoren zielen darauf ab, direkt die katalytische Untereinheit von p110 α von PI3K kompetitiv an der ATP-Bindungsstelle zu blockieren (Mueller et al., 2012). In Zelllinien konnte man zeigen, dass PI3K-Inhibitoren Caspasen und Apoptose induzieren und damit Magenkarzinomzellen zugrunde gehen, unabhängig davon, ob *KRAS*- oder *PIK3CA*-Mutationen bestehen (Lee & Ou, 2013). Derzeit finden klinische Studien zu diesem Thema statt (Mueller et al., 2012).

Weiterhin haben mTOR-Inhibitoren *in vitro* bereits gute Erfolge erzielt. Als eine Schlüsselproteinkinase, die Zellwachstum, -proliferation und Angiogenese reguliert, wird mTOR über den PI3K/Akt-Weg reguliert. Everolimus beispielsweise inhibiert mTOR medikamentös und wird in Studien derzeit bezüglich des Magenkarzinoms untersucht. Unter Anwendung von Everolimus bei chemotherapierefraktären Magenkarzinomen sprechen ca. 4% auf das Medikament an (Lee & Ou, 2013). In der GRANITE-Studie wurden 656 Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom nach Chemotherapie auf das Ansprechen von Everolimus untersucht. Es ließ sich jedoch keine signifikante Verbesserung im *overall survival* (OS) feststellen (Ohtsu et al., 2013). Es existiert derzeit jedoch keine Studie, die die Wirksamkeit von mTOR-Inhibitoren auf das Magenkarzinom untersucht und dabei die Existenz von *PIK3CA*-Mutationen berücksichtigt (Lee & Ou, 2013).

1.10 Fragestellung

Die EGFR-Signalkaskade stellt einen wichtigen Angriffspunkt zur Inhibierung der Karzinogenese verschiedener Tumoren u.a. des Magenkarzinoms dar. Anti-EGFR-Antikörper, wie z.B. Cetuximab und Panitumumab werden bereits zur Behandlung des Kolonkarzinoms eingesetzt. Nach EGFR-Rezeptoraktivierung laufen verschiedene *downstream*-Kaskaden ab, die am Ende die Tumorzelle zum weiteren Wachstum anregen (Ciardiello & Tortora, 2008). In der EGFR-Kaskade kommt den Effektoren KRAS, BRAF und PIK3CA eine wichtige Rolle zu. Man konnte nachweisen, dass die Anti-EGFR-Antikörper unwirksam sind, sobald eine Mutation in bestimmten Protoonkogenen (z.B. KRAS) vorherrscht, da sie dann, losgelöst von der Kaskade, daueraktiv sind. Beim Wildtyp ist dies nicht der Fall. Trotz dieser Tatsache ist die *response rate* aber immer noch nicht zufriedenstellend, was mitunter daran liegen könnte, dass Mutationen innerhalb eines Patienten in verschiedenen Lokalisationen zum Teil heterogen sind (Raponi et al., 2008). Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Ergebnisse des Kolon- auf das Magenkarzinom übertragbar sind, wurden in der vorliegenden Arbeit Prävalenz und Heterogenität von Hotspot-Mutationen bezüglich Primärtumor (Tumorzentrum und Invasionsfront), Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen von KRAS, BRAF, PIK3CA untersucht. Durch *screening* könnte der Nachweis bzw. das Fehlen von Mutationen somit als prädiktiver Biomarker für die Erfolgsrate einer Antikörpertherapie verwendet werden. Konkret sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Wie hoch ist die Prävalenz von Hotspot-Mutationen von KRAS (Exon 2), BRAF (Exon 15) und PIK3CA (Exon 9 und 20) im Magenkarzinom in Primärtumor (Tumorzentrum und Invasionsfront), korrespondierenden Lymphknoten- und Fernmetastasen?
- Besteht Heterogenität zwischen den einzelnen Mutationen des Magenkarzinoms in Primärtumor (Tumorzentrum und Invasionsfront), korrespondierenden Lymphknoten- und Fernmetastasen?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen klinisch-/histopathologischen Parametern (z.B. Klassifikation, Grading) und dem Auftreten dieser Mutationen?

2 Material und Methodik

2.1 Geräte

Tabelle 3: **Verwendete Geräte und deren Firmen**

Digital Graphic Printer UP-D890	Biometra GmbH (Göttingen)
Elektrophorese-Kammer	Biometra GmbH (Göttingen)
Elektrophoresesystem Biometra Gel	Biometra GmbH (Göttingen)
Feinwaage Kern 440-33	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Feinwaage Mettler PM 3000	Mettler-Toledo GmbH (Gießen)
Geldokumentationssystem	Biometra; BioDocAnalyse(Göttingen) Video Copy Processor Mitsubishi (Ratingen)
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Hamburg)
Kamerasystem, RT COLOR	Diagnostic Instruments Inc. (USA)
Kühlschränke	Liebherr AG (Bulle, Schweiz)
IKA MS 2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Maxtract-Gel	Qiagen (Hilden)
Mikrowelle Micromat	AEG (Nürnberg)
PCR-Gerät Mastercycler Gradient	Eppendorf AG (Hamburg)
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf AG (Hamburg)
Photometer BioPhotometer	Eppendorf AG (Hamburg)
Tiefkühltruhe (-80°C)	Hettich (Tuttlingen)
Transilluminator 312 nm BioDoc Analyze	Biometra GmbH (Göttingen)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia N.Y., USA)
Zentrifuge Minispin	Eppendorf AG (Hamburg)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: **Verwendetes Verbrauchsmaterial und deren Firmen**

Deckgläschen	Starfrost Engelbrecht GmbH (Edermünde)
Kühlbox Quick Chill	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Kryotubes	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Objektträger (ca. 76x26 mm/3x1 inch) 50x	Starfrost Engelbrecht GmbH (Edermünde)
PCR-Platten 96 well (0,2 mL) 25 Stk.	BioRad (München)
PCR-Sealers Microseal "B" Fil 100 Stk.	BioRad (München)
Pipettenspitzen (10,20,100,200,1000,5000 µL)	StarLab GmbH (Hamburg)
Plastikküvetten	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Plastikpipetten	Corning (New York, USA)
Reaktionsgefäße (0,5-2 mL)	Eppendorf AG (Hamburg)
Reaktionsgefäße (0,5-2 mL)	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf)

2.3 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 5: **Verwendete Chemikalien und Lösungen und deren Firmen**

Agarose, Peq Gold universal	peqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Borsäure	Merck KGaA (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck KGaA (Darmstadt)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-aldrich GmbH (Deisenhofen)
DNA-Leiter 50 bp	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Ethidiumbromidlösung (1%) 10 mg/mL	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Ethanol absolute pro analysi 100%	Merck KGaA (Darmstadt)
Positivkontrolle Genomic DNA	Promega (Madison, USA)
G2-Buffer	Qiagen (Hilden)
6 x Loading Dye	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Proteinase K	Merck KGaA (Darmstadt)
Xylol absolute pro analysi	Merck KGaA (Darmstadt)

2.4 Puffer und Lösungen

DEPC-Wasser

200 µL DEPC

ad 1000 mL dest. H₂O

TBE-Puffer (10 X)

108 g Tris-base (890 mM)

55 g Borsäure

40 mL EDTA 0,5 M pH 8.0

TE-Puffer

12 mg Tris-Hcl (10 mM, pH 8.0)

200 µL EDTA 0,5 M pH 8.0 (1 mM)

ad 100 mL aqua bidest.

2.5 Kommerzielle Testsysteme (Kits)

Tabelle 6 : **Verwendete Kits und deren Firmen**

EZ1 DNA Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
2X PCR Mastermix	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)

2.6 Patientenkollektiv

Mit Hilfe einer Stichprobe wurde repräsentativ ein Patientenkollektiv aus 72 Patienten ermittelt, welches im Universitätsklinikum Düsseldorf, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. T. Knoefel) operativ versorgt worden war. Die chirurgische Exzision erfolgte in den Jahren 1995-2011. Anschließend wurden die Resektate in Formalin fixiert und an das Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. E. Gabbert) eingesandt. Dort wurden sie zugeschnitten, in Paraffin eingebettet, klassifiziert und histologisch begutachtet. Es wurden unterschiedliche Proben des einzelnen Patienten untersucht. In den Tumorblöcken wurde jeweils sowohl Gewebe aus dem Tumorzentrum als auch aus der Invasionsfront erfasst. Falls vorhanden, wurden von demselben Patienten die dazugehörigen Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen vergleichend untersucht. Weiterführende Angaben finden sich in Kap. 3.1.

Diese Arbeit entstand in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf und wurde daher nach den Vorgehensweisen durchgeführt, wie sie im Studienprotokoll der Studie „Molekulare Analysen zur malignen Progression von Tumoren an anonymisierten, Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebeproben aus Altbeständen der Diagnostik (Pathologie), welche nicht mehr für die Diagnostik benötigt werden“ (Studienprotokoll 3821), beschrieben wurden. Die Patientendaten wurden dabei pseudonymisiert.

2.7 DNA-Extraktion aus Paraffingeweben

Gewebeanteile, die bereits makroskopisch als Tumoranteile identifiziert werden konnten, wurden von einem Pathologen selektiert und anschließend als Blockmaterial in Paraffin konserviert. Die so gelagerten Proben konnten nun retrospektiv untersucht werden.

Von den FFPE (*formalin fixed and paraffin embedded*) Gewebeproben wurden fünf Leerschnitte angefertigt, indem sie 3-5 µm dünn mit einem Mikrotom zugeschnitten und auf einen Objektträger aufgetragen wurden. HE-Färbungen von den einzelnen Präparaten wurden vom Pathologen unter dem Lichtmikroskop begutachtet und die jeweilige Tumormasse zur manuellen Dissektion eingekreist.

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte zuerst zweimal 10 Minuten in Xylol getaucht. Anschließend wurden sie zweimal fünf Minuten in 100%-igem Ethanol gewaschen. Danach wurden die Präparate für zwei Minuten luftgetrocknet. Die markierten Areale konnten somit vom Paraffinschnitt mit Hilfe einer 100 µl-Pipettenspitze unter Verwendung von G2-Puffer gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Hinzugefügt wurden 10µl Proteinase K zum Verdau der Proteine. Über Nacht wurde die Lösung bei 56°C und 400 rpm inkubiert und danach im Minishaker noch einmal durchmischt.

Abschließend wurde die DNA mit Hilfe des Bioroboters EZ1 und des „EZ1 DNA Tissue Kit“ nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.8 DNA-Konzentrationsmessung

Die DNA-Konzentration wurde mittels UV-Absorption gemessen. 2 µl der jeweilig isolierten DNA wurden in 98 µl TE-Puffer, in einem Verhältnis von 1:50, in einer Küvette verdünnt. Die Absorption wurde bei Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Die DNA-Konzentration ließ sich wie folgt berechnen:

$$c(\mu\text{g}/\text{mL}) = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 \mu\text{g}/\text{mL}$$

Aus dem errechneten Quotienten A_{260}/A_{280} ergab sich ein Hinweis auf eine optimale Auftrennung der DNA und Proteine. Der optimale errechnete Wert sollte zwischen 1,5-2,0 liegen.

2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, mit deren Hilfe es möglich ist, definierte Mengen an DNA zu vervielfältigen.

Im vorliegenden Versuchsaufbau wurden folgende Primer verwendet (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: **Primer für *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA***

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Tm in °C/ Zyklusanzahl	Größe in bp
<i>KRAS</i> (Ex2) Sense	AGGCCTGCTGAAAATGACTGAA	55/35 X	381
<i>KRAS</i> (Ex2) Antisense	AAAGAAATGGTCCTGCACCAG		
<i>BRAF</i> (Ex15) Sense	TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG	55/35 X	191
<i>BRAF</i> (Ex15) Antisense	AGCCTCAATTCTTACCATCCA		
<i>PIK3CA</i> (Ex9) Sense	GACAAAGAACAGCTCAAAGCA	55/35 X	166
<i>PIK3CA</i> (Ex9) Antisense	ACATGCTGAGATCAGCCAAA		
<i>PIK3CA</i> (Ex20) Sense	ATGATGCTTGGCTCTGGAAT	55/35 X	188
<i>PIK3CA</i> (Ex20) Antisense	GCATGCTGTTTAATTGTGTGG		

Mastermix (25 µL Reaktionsvolumen):

2 x PCR Mastermix	12,5 µL
Primer Sense	1 µL
Primer Antisense	1 µL
H ₂ O (RNase frei)	8,5 µL

Anschließend wurden jeder Probe 2 µL DNA (*template*) hinzugefügt.

Die Polymerase-Kettenreaktion besteht aus einem repetitiven Zyklus von drei Schritten:

1. DNA-Denaturierung

Das Gemisch aus zu vervielfältigenden DNA-Molekülen, Polymerasen und Primern wurde auf 95°C erhitzt. Das führte dazu, dass sich die beiden komplementären DNA-Stränge in zwei Einzelstränge auftrennten.

2. Annealing

Hierbei wurde die Temperatur auf 50-55°C herab gesetzt. Das führte zum komplementären Hybridisieren der Primer an die DNA. Sie dienen als Startpunkte für die DNA-Synthesierung. Polymerasen begannen bereits in dieser Phase, erste Nukleotide neu anzulagern, was zu einer Verstärkung der Verbindung der DNA und der Primer führte.

3. Polymerisierung

Die Temperatur wurde auf 72°C erhöht, damit die Polymerasen ihre optimale Arbeitstemperatur erreichten, um weitere Nukleotide an die vorhandenen DNA-Stränge zu synthetisieren. Gleichzeitig wurden insuffiziente Verbindungen wieder aufgebrochen und erneuert. Mit einem Richtwert von 0,5-1 min/kb wurde die Elongationszeit unter der Berücksichtigung der Größe des zu erwartenden PCR-Produktes ausgewählt. In diesem Fall wurde entsprechend für KRAS, BRAF, PIK3CA eine Elongation von einer Minute ausgewählt. Die Beendigung der PCR wurde mit einem Elongationsschritt von zehn Minuten festgelegt, um die Vollständigkeit der PCR-Produkte zu gewährleisten.

Die Menge der PCR-Produkte verdoppelte sich ungefähr bei jedem Durchlauf dieser drei Schritte.

Tabelle 8: PCR-Bedingungen für KRAS, BRAF, PIK3CA

Gen	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Finale Elongation	Stop	Zyklen
<i>KRAS</i>	95°C/2 min.	95°C/30 s	55°C/30 s	72°C/1min	72°C/10 min	4°C/∞	35
<i>BRAF</i>	95°C/2 min.	95°C/30 s	55°C/30 s	72°C/1min	72°C/10 min	4°C/∞	35
<i>PIK3CA</i>	95°C/2 min.	95°C/30 s	55°C/30 s	72°C/1min	72°C/10 min	4°C/∞	35

Jeder Ansatz beinhaltet jeweils eine Negativ- (Wasserkontrolle ohne DNA) und eine Positivkontrolle. Die Positivkontrolle enthielt 2 µl verdünnter RNA aus verschiedenen Zellkulturen.

2.10 DNA-Agarosegelelektrophorese

Um die entstandenen DNA-Fragmente anhand ihrer Größe zu identifizieren, wurden die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei gleichzeitig ein Längenstandard (50bp-DNA-Ladder) als Referenz mit auf das Gel aufgetragen wurde. Eine Gelkammer wurde mit TBE-Puffer gefüllt. Darin liegend befand sich ein ebenso 2%-iges TBE-Agarosegel gefüllt mit den PCR-Produkten. Die Herstellung des 2%-igen Agarosegels benötigte 1,6 g Agarosepulver und 80 ml TBE-Puffer, die vermischt und für drei Minuten bei 800 W in der Mikrowelle aufgekocht wurden. Anschließend wurden 4 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Flüssigkeit konnte in einer dafür vorgesehenen Form, die durch einen entfernbaren Kamm Geltaschen bildete, erkalten. Die eingefüllten PCR-Produkte enthielten je 5 µl DNA-Fragmente und 1,5 µl 6%-igem Loading Dye. Der blau gefärbte Loading Dye diente dem Beschweren der Probe auf dem Grund der Geltasche und dem visuellen Verfolgen der PCR-Produkte. Der Bandenlängenstandard wurde aus 20 µl 50bp-DNA-Ladder, 20 µl Loading Dye und 80 µl H₂O aufbereitet. Der 50bp-Marker diente zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße. Nach der Fertigstellung wurde eine Stromspannung von 90 mV an die Gelkammer angeschlossen. Da die Zucker-Phosphat-Reste von Nukleinsäuren negativ geladen waren, wanderten sie im elektrischen Feld je nach Größe und Konfiguration unterschiedlich schnell zur Anode. Kleinere DNA-Fragmente wanderten dabei schneller als größere.

Nach einer Laufzeit von 45 Minuten wurde die Spannung entfernt, das Gel herausgenommen und in den Transilluminator gelegt. Ethidiumbromid interkalierte in die DNA. Durch Bestrah-

lung mit UV-Licht wurde es zur Fluoreszenz angeregt und die DNA damit sichtbar. Die DNA konnte mit dem Programm BioDocAnalyse optisch optimiert und fotografiert werden.

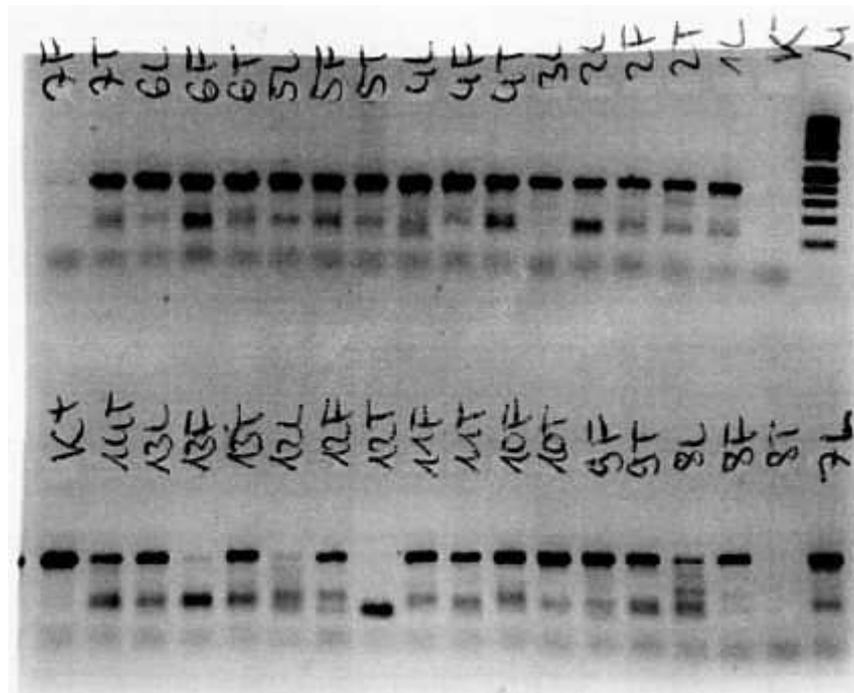


Abb. 3: **Beispiel Gelelektrophorese von PIK3CA, Exon 20**

Anmerkungen: Fotografie einer Gelelektrophorese von Proben 1L bis 14T. M dient als Referenzwert. Zur Qualitätskontrolle wurden Proben von K- und K+ hinzugefügt.

M: 50bp-Marker, K-: Negativkontrolle, K+: Positivkontrolle, T: Tumorzentrum, F: Invasionsfront, L: Lymphknotenmetastase, Zahlen entsprechen den Patienten

2.11 Aufreinigung der DNA

Bevor die entstandenen DNA-Fragmente für die Sequenzanalyse am Biomedizinischen Forschungszentrum (Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Reifenberger) bereitgestellt werden konnten, mussten die Proben von eventuellen Nebenprodukten und Verunreinigungen befreit werden. Dazu wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zunächst wurden 20 µl der bearbeiteten DNA-Fragmente mit 100 µl des im Kit enthaltenen *binding*-Puffer gemischt in ein Tube gefüllt und zentrifugiert. Danach wurden 750 µl *wash*-Puffer aus dem Kit hinzugefügt, noch einmal 1 Minute zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Probe wurde getrocknet und zentrifugiert. Um die aufgereinigte DNA wieder zu eluieren, wurden 30 µl H₂O zur DNA gegeben und das Gemisch eine Minute zentrifugiert.

2.12 DNA-Sequenzanalyse

Die fertigen Proben wurden zum Biomedizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gesandt. Dort wurden die Proben mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert.

2.13 Mutationsanalyse

Mit Hilfe der Software Chromas lite wurde die DNA jeder Probe optisch farblich sowie quantitativ dargestellt (s. Abb. 7 und 8). Die Abfolge der Basen wurde analysiert. Mit dem optischen Vergleich der Proben ohne Mutationen konnten Änderungen der Basenabfolge identifiziert werden.

2.14 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS, Version 13 für Windows, verwendet. Damit wurden Häufigkeiten und histopathologische Parameter unter Verwendung des χ^2 -Test errechnet und mit der Inzidenz der verschiedenen Mutationen korreliert. Der Signifikanzlevel wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

$$\chi^2 = \sum [(f_0 - f_e)^2 / f_e]$$

Formel zur Berechnung des χ^2 -Test:

f_0 = beobachtete Häufigkeit; f_e = erwartete Häufigkeit.

Der Berechnung lag die Grundannahme einer Nullhypothese (H_0) und einer Alternativhypothese (H_1) zugrunde, die sich inhaltlich nicht überschneiden durften. Ein Signifikanztest wurde so angelegt, indem man die Ablehnung der Nullhypothese erwartete. In diesem Fall wurde dafür der χ^2 -Test verwendet. Sobald ein signifikanter Unterschied beider Hypothesen entdeckt wurde, konnte die Nullhypothese widerlegt werden. Testentscheidungen beruhten somit

nicht auf dem Beweis einer Hypothese, sondern vielmehr auf seiner Widerlegung, wenn die Stichprobe deutlich abweichende Ergebnisse zeigte (Zwerenz, 2011). Unter Verwendung dieser Formel war zu beachten, dass Abweichungen der Häufigkeit eine Mindestwahrscheinlichkeit von 5% haben mussten, um nicht signifikant zu sein. Lag die Wahrscheinlichkeit bei einem Test unter 5%, dann galten die Ergebnisse als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Die Gewebeproben von 72 Patienten mit Magenkarzinom wurden dem Archiv des Instituts für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. E. Gabbert) entnommen. Es handelt sich um eine retrospektive Untersuchung. Unter 72 Patienten befanden sich 52 Männer (72,2%) und 20 Frauen (27,8%). Zum Operationszeitpunkt lag das Durchschnittsalter bei 67,8 Jahren. Der jüngste Patient war 42 Jahre, der älteste 90 Jahre alt. Gemeinsam war allen Patienten das Vorhandensein eines Adenokarzinoms des Magens, klassifiziert nach den Vorgaben der UICC 2010, sowie eine potentiell kurative Resektion in den Jahren 1995-2011. Das Kollektiv beinhaltete einen Tumor im Stadium pT1, 14 Tumore im Stadium pT2, 39 Tumore im Stadium pT3 und 18 Tumore im Stadium pT4. Gemäß der Klassifikation nach Laurén handelte es sich um 26 intestinale (36,2%), 23 diffuse (31,9%) und 23 Mischtypen (31,9%). Lokalisiert waren sie in allen Bereichen des Magens, vorzugsweise aber in Korpus (51%), Kardia (18%) und Antrum (18%). Es gab im vorliegenden Kollektiv 72 Proben für den Primarius (jeweils Tumorzentrum und -invasionsfront), 50 regionäre Lymphknotenmetastasen und drei Fernmetastasen (Leber).

In den folgenden Tabellen wurden die Häufigkeiten von klinischen und histopathologischen Parametern aufgeführt (s. Tabelle 9-13).

Tabelle 9: **Häufigkeitsverteilung nach Geschlecht**

Geschlecht	Häufigkeit	Prozent (%)
männlich	52	72,2
weiblich	20	27,8

Tabelle 10: **Häufigkeitsverteilung nach Laurén-Klassifikation**

Laurén-Klassifikation	Häufigkeit	Prozent (%)
intestinaler Typ	26	36,2
diffuser Typ	23	31,9
Mischtyp	23	31,9

Tabelle 11: **Häufigkeitsverteilung nach T-Stadium**

T-Stadium	Häufigkeit	Prozent (%)
1-2	15	20,8
3-4	57	79,2

Tabelle 12: **Häufigkeitsverteilung nach N-Stadium**

N-Stadium	Häufigkeit	Prozent (%)
0	22	30
1-3	50	70

Tabelle 13: **Häufigkeitsverteilung nach M-Stadium**

M-Stadium	Häufigkeit	Prozent (%)
0	69	96
1	3	4

Bei 26% der Patienten lag ein lokalisierter Tumorbefall vor. Die Mehrheit (70%) wies zusätzlich regional befallene Lymphknotenmetastasen auf. Weiterhin gab es 4% der Patienten, die sowohl Primärtumor, regionale Lymphknotenmetastase als auch Fernmetastase aufwiesen (s. Abb. 5).

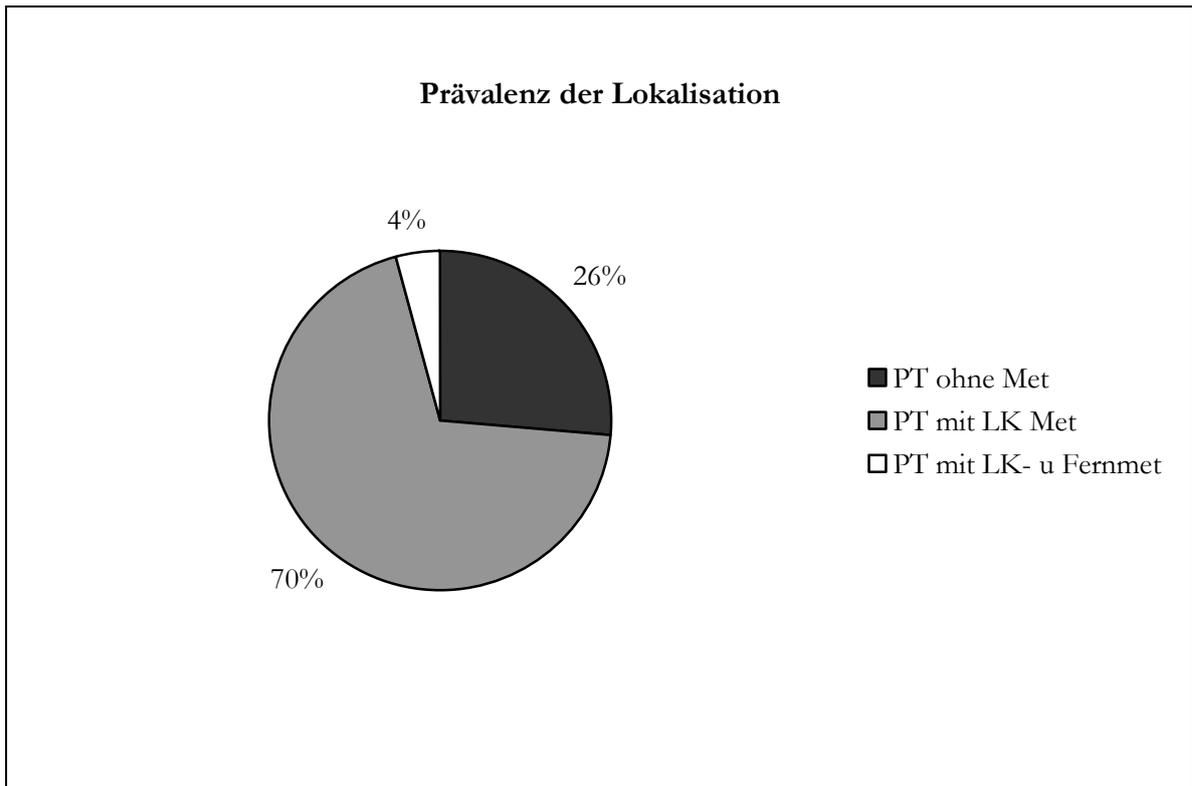


Abb. 5: **Häufigkeiten des Tumorbefalls nach Lokalisation**

Anmerkungen: dunkelgrau: Primärtumor ohne Metastase, hellgrau: Primärtumor mit Lymphknotenmetastase, weiß: Primärtumor mit Lymphknoten- und Fernmetastase

Die Patienten ließen sich folgendermaßen den UICC-Stadien zuweisen (s. Tabelle 14).

Tabelle 14: **Häufigkeitsverteilung nach UICC-Stadien**

UICC-Stadium	Häufigkeiten	Prozent (%)
I	8	11,1
II	23	31,9
III	38	52,8
IV	3	4,2

3.2 *KRAS*

In der folgenden Tabelle wurden alle Patienten, bei denen *KRAS*-Mutationen vorkamen, mit ihren klinischen und histopathologischen Merkmalen in Übersicht aufgelistet. Es fanden sich zwei unterschiedliche Mutationen, einerseits in G12D, zum anderen in G12V (s. Tabelle 15).

Tabelle 15: **KRAS**-Mutationen und deren histopathologische Parameter

Patient	Geschlecht	Histologie	Laurén	T	N	M	G	R	Z	F	LK	M	Heterogenität
13	m	Adeno-CA	intestinal	2	0	x	2	0	G12D	G12D			
38	m	Adeno-CA	Mischtyp	3	2	1	3	0	G12D	G12D	G12D	WT	x
64	w	Adeno-CA	intestinal	3	0	x	2	0	G12D	G12D			
17	w	Adeno-CA	intestinal	4a	3b	x	3	1	G12V	G12V	WT		x

Anmerkungen: Histopathologische Merkmale der vier Patienten mit *KRAS*-Mutation. Zwei *KRAS*-Mutationen vorhanden (G12D,G12V). CA=Karzinom, T=Tumorzentrum, N=Lymphknotenmetastasierung, M=Fernmetastasierung, G=Grading, R=Residualtumorstatus, Z=Tumorzentrum, F=Invasionsfront, LK=Lymphknoten, M=Fernmetastase, m=männlich, w=weiblich, WT=Wildtyp

3.2.1 Prävalenz der *KRAS*-Mutationen

In dem Kollektiv von 72 Magenkarzinompatienten wiesen vier eine Mutation von *KRAS* im Hotspot von Exon 2 auf (Codon 12). Dies entsprach einer Prävalenz von 5,6%, während 94,4% (68 Patienten) *KRAS*-Wildtyp aufwiesen. Dabei handelte es sich um zwei unterschiedliche Mutationen, die beide Exon 2 betrafen: G12D (Gly12Asp) und G12V (Gly12Val) (s. Abb. 6).

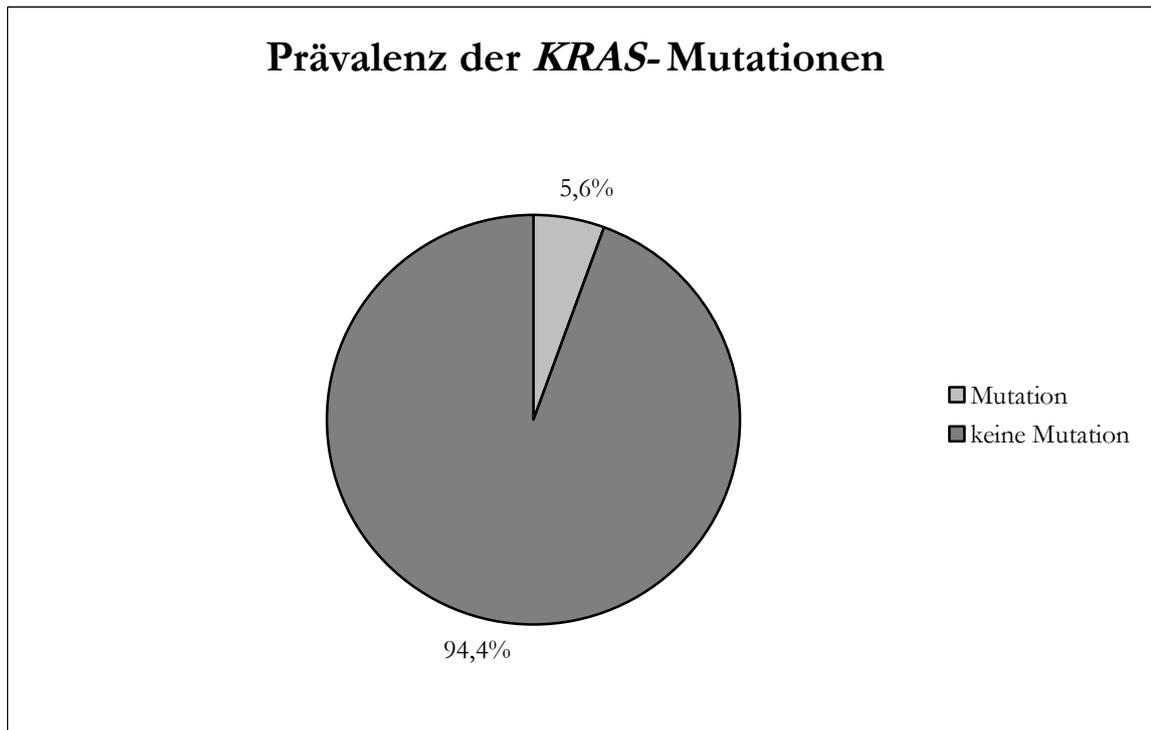


Abb. 6: **Prävalenz der *KRAS*-Mutationen** in Prozent (%)

Anmerkungen: hellgrau=*KRAS*-Mutation vorhanden, dunkelgrau=keine *KRAS*-Mutation vorhanden

Jede dieser vier *KRAS*-Mutationen ließ sich einem unterschiedlichen UICC-Stadium zuweisen (s. Tabelle 16).

Tabelle 16: Häufigkeiten *KRAS*-Mutation nach UICC-Stadien

Patient	UICC-Stadium	Häufigkeit/Prozent (%)
13	I	1/1,4
17	III	1/1,4
38	IV	1/1,4
64	II	1/1,4

Im Folgenden werden die zwei in diesem Kollektiv vorkommenden Mutationen genauer erläutert.

Die am häufigsten (dreimal) vorkommende *KRAS*-Mutation war G12D. Dabei fand sich eine Punktmutation der Sequenz GGT an Codon 12 von Exon 2, daraus ergab sich GAT und somit wurde die Aminosäure Glycin durch Asparaginsäure ersetzt. Diese Mutation trat bei den Patienten 13, 38 und 64 auf (s. Abb. 7).

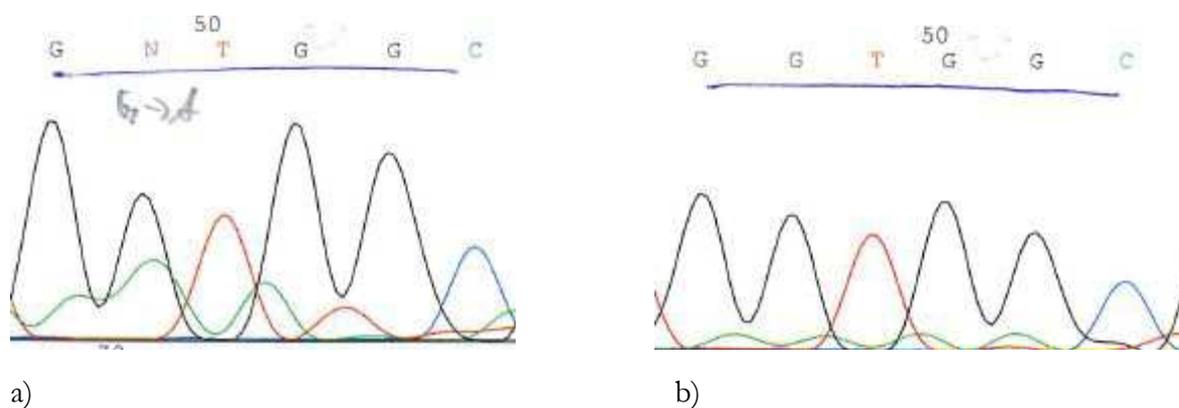


Abb. 7: Basenabfolge *KRAS* Exon 2, Codon 12 und 13

Anmerkungen: Sequenzanalyse, dargestellt mit der Software Chromas lite a) Mutation G12D am Beispiel Patient 13, Basenabfolge GATGGC b) Wildtyp am Beispiel Patient 1, Basenabfolge GGTGGC

Patient 13 war männlich und von einem Adenokarzinom der Kardia bzw. des gastroösophagealen Übergangs betroffen. Nach der Klassifikation nach Laurén handelte es sich um einen intestinalen Typ mit folgendem TNM-Stadium: pT2N0MxG2R0. Folglich lag hier ein lokaler Tumorbefall vor, der den Magen nicht überschritten hat. Daher existierten nur Proben des Tumorzentrums und der Invasionsfront. Die Sequenzierung von *KRAS* zeigte eine G12D-Mutation in Exon 2, die homogen in Tumorzentrum und Invasionsfront war.

Patient 38 war ebenso männlich und wies ein Adenokarzinom vom Mischtyp nach Laurén in der Kardia des Magens auf. Klassifiziert war dieser Tumor als pT3N2M1G3R0 gemäß TNM-Klassifikation. Hier war der Tumor in einem fortgeschrittenerem Stadium, wuchs infiltrativer und disseminierter, befiel Lymphknoten und bildete eine Fernmetastase aus (Leber). Die G12D-Mutation in Exon 2 lag homogen in Tumorzentrum, -invasionsfront und befallenen Lymphknoten vor. In der Fernmetastase befand sich keine *KRAS*-Mutation. Ihr *KRAS*-Mutationsstatus war damit heterogen zum Primarius.

Bei **Patientin 64** wurde bereits eine Whipple-Operation bei Verdacht auf Pankreaskarzinom durchgeführt. Reseziert wurden also das rechte Pankreas, das gesamte Duodenum, Gallenblase und ein Teil des Magens. Anschließend wurde das restliche Pankreas mit dem Jejunum als Billroth II oder Roux-Y mit dem Restmagen anastomosiert (Siewert et al., 2006). Bei dieser Patientin trat im Restmagen ein Jahr später ein Adenokarzinom vom intestinalen Typ nach Laurén auf. Nach dem TNM-Stadium war ihr Tumor als pT3N0MxG2R0 klassifiziert worden. Der Primärtumor wies eine homogene G12D-Mutation von *KRAS* in Exon 2 auf.

Eine Ausnahme zu den Vorherigen stellte **Patientin 17** dar. Sie litt an einem Adenokarzinom der Kardia vom intestinalen Typ nach Laurén. TNM-Stadium: pT4aN3bMxG3R1. Dieser weit fortgeschrittene Tumor weist eine G12V - Mutation von *KRAS* im Exon 2 auf. In diesem Fall liegt eine Punktmutation in Codon 12 vor, die die Sequenz GGT zu GTT verändert. Somit entsteht an der Position 12 anstatt Glycin Valin. Diese Mutation befindet sich im Tumorzentrum und der -invasionfront, aber nicht im befallenen Lymphknoten. Primärtumor und korrespondierender Lymphknoten sind bezüglich ihres *KRAS*-Status heterogen (s. Abb. 8).

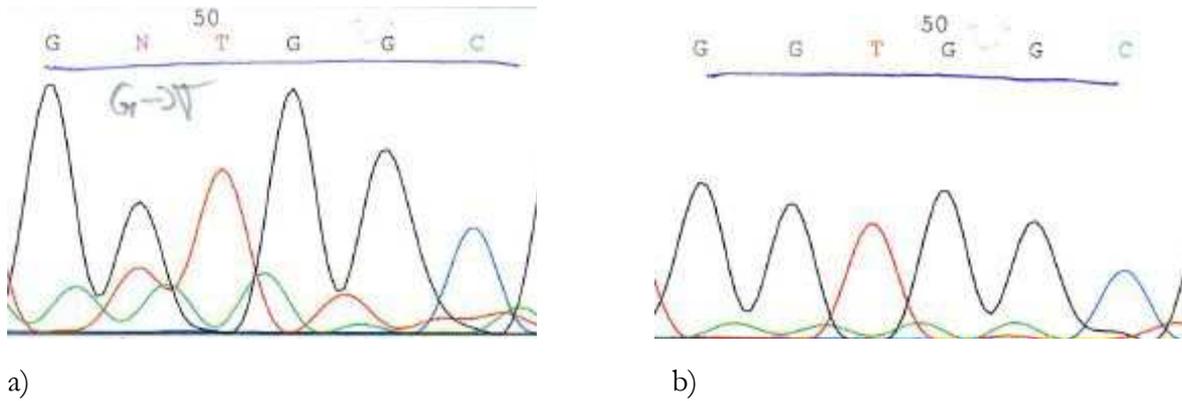


Abb. 8: Basenabfolge **KRAS** Exon 2, Codon 12 und 13

Anmerkungen: Sequenzanalyse, dargestellt mit der Software Chromas lite a) Mutation G12V am Beispiel Patient 17, Basenabfolge GTTGGC b) Wildtyp am Beispiel Patient 1, Basenabfolge GGTGGC

3.2.2 Laurén-Klassifikation und **KRAS**-Mutationen

Von den vier **KRAS**-Mutationen ließen sich histopathologisch drei Tumore dem intestinalen Typ, eine dem Mischtyp und keine dem diffusen Typ nach Laurén zuordnen (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Kreuztabelle: **KRAS**-Mutation und Laurén-Klassifikation

	Laurén			Gesamt
	intestinaler Typ	diffuser Typ	Mischtyp	
Wildtyp	23	23	22	68
Mutation	3	0	1	4
Gesamt	26	23	23	72

Ein χ^2 -Test zeigte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Laurén-Typ (intestinal vs. diffus vs. Mischtyp) und Mutationsstatus (Mutation vs. Wildtyp), $\chi^2(2) = 3,19$, $p = 0,203$.

3.2.3 Tumorinfiltration des Primärtumors und **KRAS**-Mutationen

Von allen Patienten, die untersucht wurden, befand sich die Mehrzahl im fortgeschrittenen lokalen Tumorausbreitungsstadium, entsprechend pT3 oder pT4.

Von den vier Patienten mit **KRAS**-Mutation fanden sich drei im Stadium 3-4 (Patient 17, 38 und 64) und eine im Stadium 2 (Patient 13) (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: **Kreuztabelle: *KRAS*-Mutation und pT-Stadium**

	T		Gesamt
	1-2	3-4	
Mutation	1	3	4
WT	14	54	68
Gesamt	15	57	72

Es ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen T-Stadium (1-2 vs. 3-4) und Mutationsstatus (Mutation vs. Wildtyp) herstellen, $\chi^2 (1) = 0,045$, $p = 0,833$.

3.2.4 Lymphknotenbefall und *KRAS*-Mutationen

Bei vier *KRAS*-Mutationen wies die eine Hälfte der Tumore einen regionalen Lymphknotenbefall vor (Patient 17, 38) und die andere nicht (Patient 13, 64) (s. Tabelle 19).

Tabelle 19: **Kreuztabelle: *KRAS*-Mutation und pN-Stadium**

	N		Gesamt
	0	1-3	
Mutation <i>KRAS</i>	2	2	4
WT	20	48	68
Gesamt	22	50	72

Nach Berechnung des χ^2 -Tests ließ sich bezüglich der *KRAS*-Mutation und des N-Stadiums kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem N-Stadium (0 vs. 1-3) und dem Mutationsstatus (*KRAS*-Mutation vs. Wildtyp) feststellen, $\chi^2 (1) = 0,755$, $p = 0,385$.

3.2.5 Grading und *KRAS*-Mutationen

Von vier Patienten mit *KRAS*-Mutation waren zwei gut bis mäßig differenziert (G 1-2) (Patient 13, 64) und zwei gering differenziert (G 3) (Patient 17, 38) (s. Tabelle 20).

Tabelle 20: **Kreuztabelle: KRAS- Mutation und G-Stadium**

	G		Gesamt
	1-2	3	
Mutation <i>KRAS</i>	2	2	4
WT	10	58	68
Gesamt	12	60	72

Ein χ^2 -Test zeigte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Grading (1-2 vs. 3) und Mutationsstatus (*KRAS*-Mutation vs. Wildtyp), $\chi^2(1) = 3,388$, $p = 0,066$.

3.2.6 Heterogenität von *KRAS*-Mutationen

Heterogenität war bei zwei von vier *KRAS*-Mutationen vorhanden (s. Tabelle 21).

Tabelle 21: **Heterogenität der KRAS-Mutation in Abhängigkeit von der Lokalisation**

Patient	Z	F	LK	M	Heterogenität
13	G12D	G12D			
38	G12D	G12D	G12D	WT	x
64	G12D	G12D			
17	G12V	G12V	WT		x

Anmerkungen: Lokalisation der *KRAS*-Mutation bei den betroffenen vier Patienten. Heterogenität liegt vor, sobald sich das Vorhandensein oder die Art der Mutation in verschiedenen Gebieten unterscheidet. Z=Tumorzentrum, F=Invasionsfront, LK=Lymphknoten, M=Fernmetastase, WT=Wildtyp

Alle vier gefundenen Mutationen betrafen den Primärtumor sowohl in Tumorzentrum als auch an der Invasionsfront.

Dies bedeutet, dass innerhalb des Primarius (n=72) alle Mutationen (G12D, als auch G12V) homogen waren. Man spricht hier von einer intratumoralen Homogenität. Prozentual entspricht dies 100% der Mutationen und 5,6% des Gesamtkollektivs.

Bei 50 Patienten unseres Kollektivs waren Lymphknotenmetastasen vorhanden. Von diesen war bei zwei Patienten eine *KRAS*-Mutation vorhanden (4%). Es fand sich jedoch nur in einer Lymphknotenmetastase selbst eine *KRAS*-Mutation (Patient 38, G12D). Diese war homogen

zum Primärtumor (2%, entsprechend 50% der Patienten mit *KRAS*-Mutation und Lymphknotenmetastasen).

Bei Patient 17 lag zwar ein Befall der Lymphknoten vor, aber keine Mutation des *KRAS*-Gens. Deshalb bestand bei diesem Patienten eine intertumorale Heterogenität (2%).

Von den vier Patienten wies einer eine Fernmetastase auf. In dieser ließ sich keine *KRAS*-Mutation finden. Damit war sie intertumoral heterogen zum Primarius (33,3% aller Patienten mit Fernmetastasen) (s. Tabelle 21 und Abb. 9).

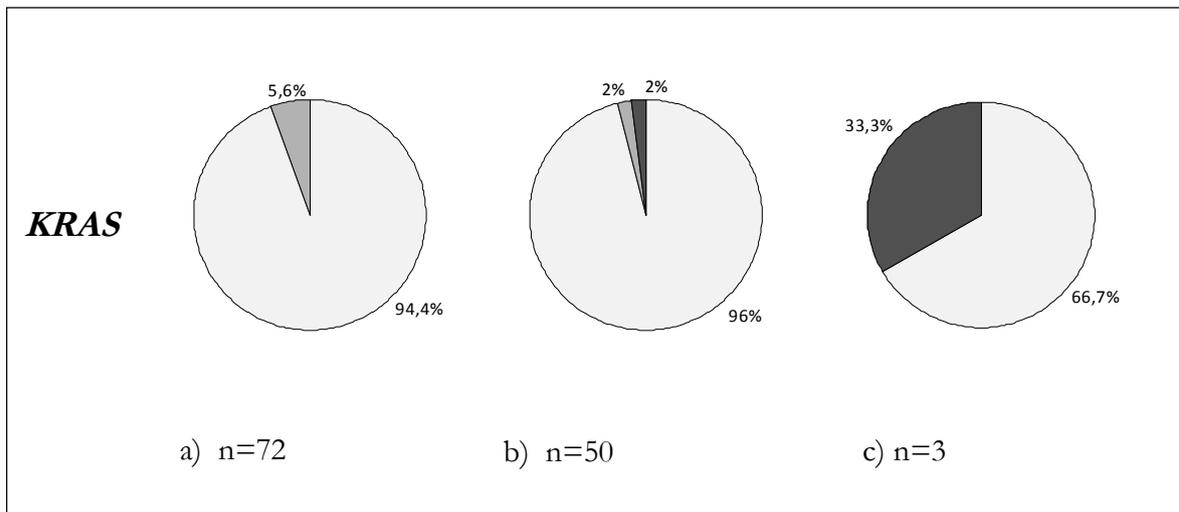


Abb. 9: Tumorheterogenität von *KRAS* in Prozent (%)

Anmerkungen:

- a) weiß: Wildtyp Tumorzentrum+Invasionsfront
hellgrau: Homogene Mutation Tumorzentrum+Invasionsfront
- b) weiß: Wildtyp Primarius+Lymphknotenmetastase
hellgrau: Homogene Mutation Primarius+Lymphknotenmetastase
schwarz: Heterogene Mutation; Mutation Primarius+Wildtyp Lymphknotenmetastase
- c) weiß: Wildtyp Primarius+Fernmetastase
schwarz: Heterogene Mutation; Mutation Primarius+Wildtyp Fernmetastase

Bezüglich aller *KRAS*-Mutationen bestand zu 100% intratumorale Homogenität im Primarius, 50% intertumorale Heterogenität zwischen Primarius und Lymphknotenmetastase und 100% intertumorale Heterogenität zwischen Primarius und Fernmetastase.

3.3 BRAF

Es wurden keine *BRAF*-Mutationen in den untersuchten Adenokarzinomen des Magens gefunden.

3.4 *PIK3CA*

3.4.1 Prävalenz der *PIK3CA*-Mutationen

Es wurden keine Mutationen in *PIK3CA*, Exon 9 gefunden. Im Folgenden wird auf Mutationen in Exon 20 eingegangen.

Bei vier von 72 Patienten konnte eine Mutation in *PIK3CA*, Exon 20 entdeckt werden (5,6%). 94,4% (68 Patienten) hatten *PIK3CA*-Wildtyp (s. Abb. 10).

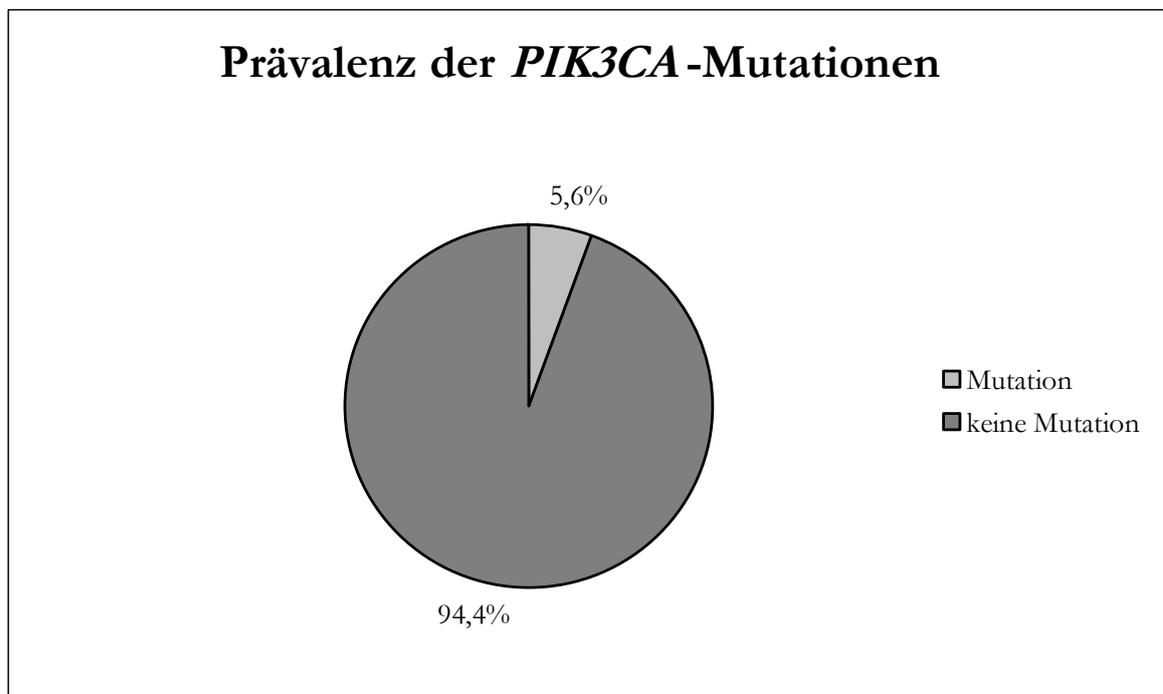


Abb. 10: **Prävalenz der *PIK3CA*-Mutationen** in Prozent (%)

In diesen vier Fällen handelt es sich um die Mutation H1047R (His1047Arg) im Hotspot von Codon 1047 des Exons 20 (Patient 12, 26, 66 und 72).

H1047R war eine Punktmutation, bei der CAT durch CGT im Codon 1047 ausgetauscht wurde. Dadurch entstand an dieser Stelle Arginin anstatt Histidin (s. Tabelle 22).

Tabelle 22: **PIK3CA**-Mutationen und deren histopathologische Parameter

Patient	Geschlecht	Histologie	Laurén	T	N	M	G	R	Z	F	LK	M	Heterogenität
12	w	Adeno-CA	intestinal	3	3a	x	3	0	WT	H1047R	WT		x
26	m	Adeno-CA	intestinal	2	1	x	3	0	H1047R	H1047R	WT		x
66	m	Adeno-CA	intestinal	3	1	x	3	0	WT	H1047R	WT		x
72	m	Siegelringzell-CA	diffus	4a	3b	1	3	0	H1047R	WT	WT	WT	x

Anmerkungen: CA=Karzinom, T=Tumorzentrum, N=Lymphknotenmetastasierung, M=Fernmetastasierung, G=Grading, R=Residualtumorstatus, Z=Tumorzentrum, F=Invasionsfront, LK=Lymphknoten, M=Fernmetastase, m=männlich, w=weiblich, WT=Wildtyp

Bei drei von vier Tumoren waren die Mutationen dem UICC-Stadium II zuzuordnen und einer dem Stadium IV (s. Tabelle 23).

Tabelle 23: Häufigkeiten der **PIK3CA**-Mutation nach UICC-Stadien

Patient	UICC-Stadium	Häufigkeit/Prozent (%)
12, 26, 66	II	3/4,2
72	IV	1/1,4

Patient 12 war weiblich, zum Operationszeitpunkt 73 Jahre alt und hatte ein Adenokarzinom vom intestinalen Typ nach Laurén im Magenkorpus (pT3pN3aMxG3R0) mit einer H1047R-Mutation in der Lymphknotenmetastase (s. Abb. 11).

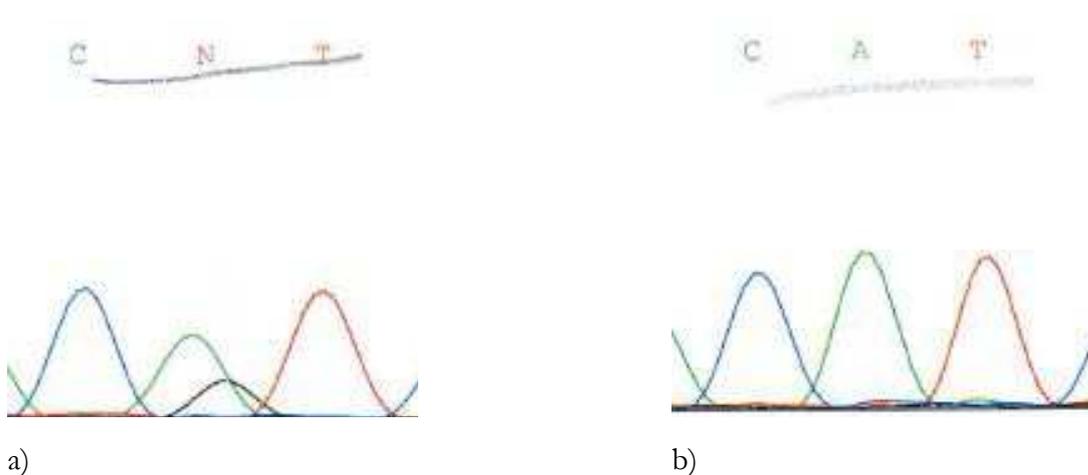


Abb. 11: **Basenabfolge PIK3CA Exon 20 Codon 1047**

Anmerkungen: Sequenzanalyse, dargestellt mit der Software Chromas lite a) Mutation H1047R am Beispiel Patient 12, Basenabfolge CGT b) Wildtyp am Beispiel Patient 1, Basenabfolge CAT

Der 73-jährige **Patient 26** war männlich und litt ebenso an einem intestinalen Adenokarzinom im Magenkörper (pT2N1MxG3R0). Der Primärtumor (Tumorzentrum und -invasionsfront) wies die Mutation H1047R auf.

Patient 66 war männlich (77 Jahre) und besaß auch ein Adenokarzinom vom intestinalen Typ nach Laurén im Magenkörper (pT3N1MxG3R0). Eine H1047R-Mutation befand sich ausschließlich an der Tumordinvasionsfront.

Zum Operationszeitpunkt war **Patient 72** 45 Jahre alt. Er hatte aber im Gegensatz zu den drei anderen Patienten ein Siegelringzellkarzinom vom diffusen Typ nach Laurén (pT4aN3bM1G3R0). Es ließ sich eine H1047R-Mutation im Tumorzentrum feststellen.

Außerdem trat in einem Fall ein DNA-Polymorphismus auf. Bei **Patient 10** handelte es sich um H1047H (His1047His). Er war männlich und zum Operationszeitpunkt 88 Jahre alt. Das Adenokarzinom vom intestinalen Typ nach Laurén befand sich im Magenkörper (pT3N3MxG3R0). Bei dieser stummen Mutation wurde durch eine Punktmutation CAT in CAC umgewandelt. Trotz einer Veränderung in Codon 1047 entstand also keine andere Aminosäure. Die Funktion des Gens war damit unverändert. Aus diesem Grund gelten Polymorphismen nicht als Mutationen. Die Prävalenz dieses Polymorphismus lag bei 1,4% (s. Abb. 12).

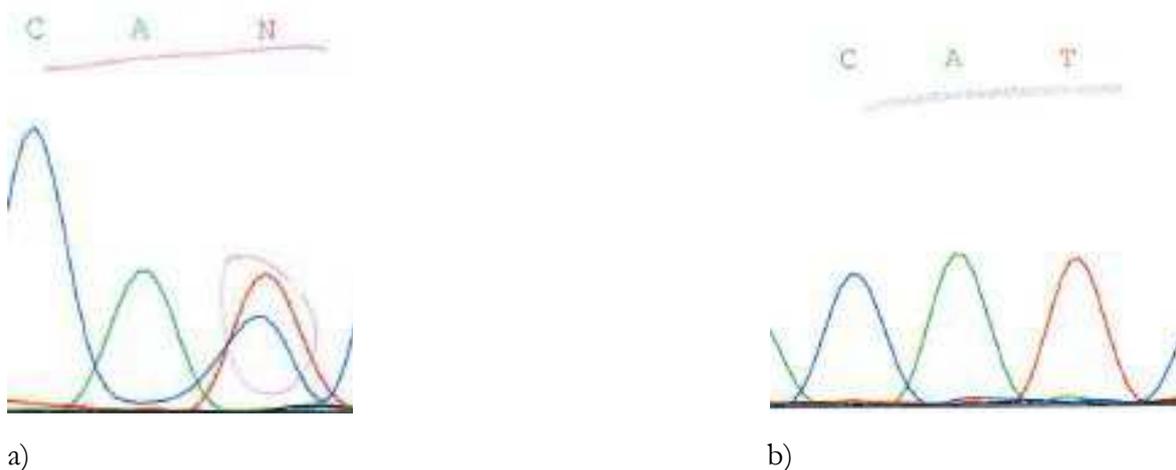


Abb. 12: **Basenabfolge PIK3CA Exon 20 Codon 1047**

Anmerkungen: Sequenzanalyse, dargestellt mit der Software Chromas lite a) Polymorphismus H1047H am Beispiel Patient 10, Basenabfolge CAC b) Wildtyp am Beispiel Patient 1, Basenabfolge CAT

3.4.2 Laurén-Klassifikation und *PIK3CA*-Mutationen

Von den vier *PIK3CA* Exon 20-Mutationen verteilen sich drei (Patient 12, 26 und 66) auf den intestinalen Typ und eine auf den diffusen Typ nach Laurén (Patient 72) (s. Tabelle 24).

Tabelle 24: Kreuztabelle: *PIK3CA*, Exon 20-Mutation und Laurén-Klassifikation

	Laurén			Gesamt
	intestinaler Typ	diffuser Typ	Mischtyp	
Wildtyp	23	22	23	68
Mutation	3	1	0	4
Gesamt	26	23	23	72

Nach Berechnung des χ^2 -Tests ließ sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Mutationsstatus (mutiertes *PIK3CA* vs. *PIK3CA*-Wildtyp) und Laurén-Klassifikation (intestinaler vs. diffuser Typ) feststellen, $\chi^2 (2) = 3,191$, $p = 0,203$.

3.4.3 Tumorinfiltration des Primärtumors und *PIK3CA*-Mutationen

Ein Patient mit *PIK3CA*-Mutation wies eher ein niedriges pT-Stadium auf (Patient 26), während die drei anderen ein hohes pT-Stadium aufwiesen (Patient 12, 66 und 72) (s. Tabelle 25).

Tabelle 25: Kreuztabelle: *PIK3CA*, Exon 20-Mutation und pT-Stadium

	T		Gesamt
	1-2	3-4	
Wildtyp	14	54	68
Mutation <i>PIK3CA</i>	1	3	4
Gesamt	15	57	72

Die Berechnung des χ^2 -Tests zeigt keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Mutationsstatus (*PIK3CA*-Mutation vs. Wildtyp) und T-Stadium (1-2 vs. 3-4), $\chi^2 (1) = 0,045$, $p = 0,833$.

3.4.4 Lymphknotenbefall und *PIK3CA*-Mutationen

Bei allen vier Patienten mit Mutationen in *PIK3CA*, Exon 20 lag zusätzlich eine regionale Lymphknotenmetastasierung vor (s. Tabelle 26).

Tabelle 26: Kreuztabelle: *PIK3CA*, Exon 20-Mutation und pN-Stadium

	N		Gesamt
	0	1-3	
Wildtyp	22	46	68
Mutation <i>PIK3CA</i>	0	4	4
Gesamt	22	50	72

Nach Berechnung des χ^2 -Tests ließ sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Mutationsstatus (Mutation von *PIK3CA* vs. *PIK3CA*-Wildtyp) und N-Stadium (0 vs. 1-3) herstellen, $\chi^2(1) = 1,864$, $p = 0,172$.

3.4.5 Grading und *PIK3CA*-Mutationen

Alle vier *PIK3CA* Exon 20-Mutationen kamen bei schlecht differenzierten Magenkarzinomen vor (s. Tabelle 27).

Tabelle 27: Kreuztabelle: *PIK3CA* Exon 20-Mutation und G-Stadium

	G		Gesamt
	1-2	3	
Wildtyp	12	56	68
Mutation <i>PIK3CA</i>	0	4	4
Gesamt	12	60	72

Die Berechnung des χ^2 -Tests ergab keine statistische Signifikanz bezüglich des Mutationsstatus (Mutation von *PIK3CA* vs. *PIK3CA*-Wildtyp) und des G-Stadiums (1-2 vs. 3), $\chi^2(1) = 0,847$, $p = 0,357$.

3.4.6 Heterogenität von *PIK3CA*-Mutationen

Im Primärtumor gab es insgesamt vier Mutationen (5,6%). Das Tumorzentrum wies in zwei Fällen eine Mutation in *PIK3CA* auf (Patient 26 und 72). Es handelte sich in beiden Fällen um die H1047R-Mutation im Exon 20. Das entsprach 2,8% aller 72 Patienten. Die Tumordinvasionsfront des Primärtumors enthielt bei drei Patienten eine Mutation (4,2%).

In 1,4% waren Tumorzentrum und Invasionsfront homogen mutiert (Patient 26). Heterogene Mutationen, bei denen die Invasionsfront mutiert war, das Tumorzentrum jedoch nicht, fanden sich in 2,8% (Patienten 12 und 66). Bei einem Patienten (Patient 72) befand sich eine *PIK3CA*-Mutation im Tumorzentrum, aber nicht an der Invasionsfront (1,4%).

In regionalen Lymphknoten und auch Fernmetastasen gab es keine *PIK3CA*-Mutationen.

Betrachtet man die 50 Patienten, die mindestens einen tumorbefallenen Lymphknoten vorwiesen, lag Wildtypstatus für *PIK3CA* in 92% (46 Patienten) für Primarius und Lymphknotenmetastase vor. In 8% (vier Patienten) lag eine heterogene Mutation vor, die sich im Primarius manifestierte, in der Lymphknotenmetastase jedoch nicht.

Vergleicht man den *PIK3CA*-Mutationsstatus von Primärtumor und Lebermetastasen, erkennt man Heterogenität in 33,3%. Das bedeutet, bei einem von drei Patienten mit Lebermetastasen trat eine *PIK3CA*-Mutation im Primärtumor auf, in der Fernmetastase aber nicht.

In drei Fällen war der Primärtumor heterogen mutiert (Patient 12, 66 und 72). Die Mutation H1047R fand sich im Tumorzentrum alleinig in Patient 26 und 72, während sie nur an der Invasionsfront bei Patient 12 bestand. Es lag somit eine intratumorale Heterogenität innerhalb von 4,2% vor. In den Primärtumoren zeigte sich in allen Fällen ein heterogener Mutationsstatus zu den jeweiligen Lymphknoten. Bei allen vier vorliegenden H1047R-Mutationen bestand im regionalen Lymphknoten ein *PIK3CA* Exon 20-Wildtyp.

Es gab nur eine Fernmetastase (Patient 72) In dieser existierte aber keine *PIK3CA*, Exon 20-Mutation. Demnach war sie heterogen zum Primarius.

Zusammenfassend lag bei allen dieser vier Patienten in mindestens einer Assoziation Heterogenität vor (5,6%) (s. Tabelle 28, Abb. 13).

Tabelle 28: Heterogenität von *PIK3CA*-Mutationen in Abhängigkeit von der Lokalisation

Patient	Z	F	LK	M	Heterogenität
12	WT	H1047R	WT		x
26	H1047R	H1047R	WT		x
66	WT	H1047R	WT		x
72	H1047R	WT	WT	WT	x

Anmerkungen: Vergleich der *PIK3CA*-Mutationen nach Lokalisation. Unterschiede werden als Heterogenität festgestellt. Z=Tumorzentrum, F=Invasionsfront, LK=Lymphknoten, M=Fernmetastase, WT=Wildtyp

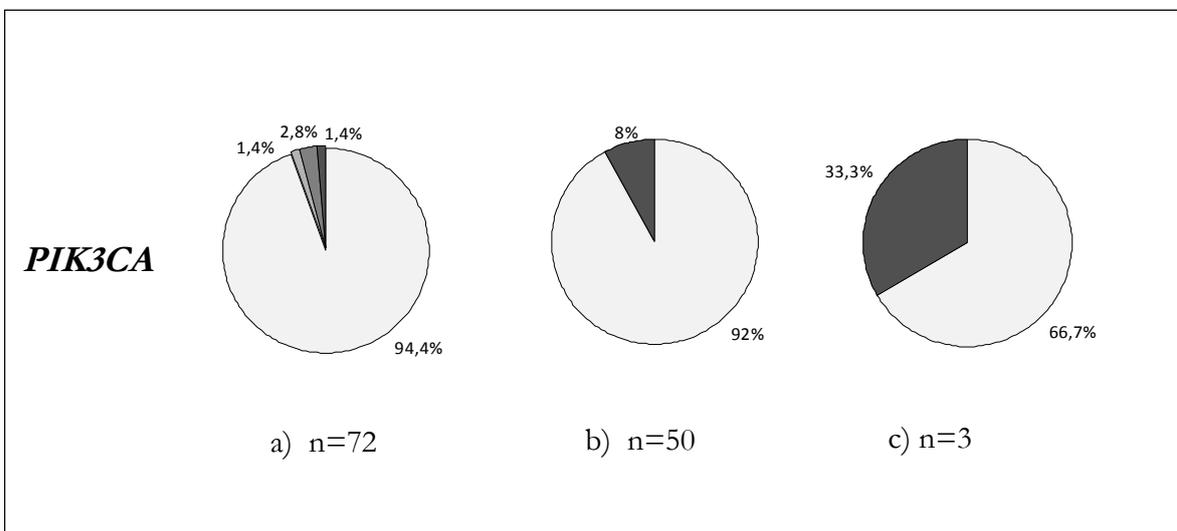


Abb. 13: Tumorheterogenität von *PIK3CA* in Prozent (%)

Anmerkungen:

- a) weiß: Wildtyp Tumorzentrum+Invasionsfront
hellgrau: Homogene Mutation Tumorzentrum+Invasionsfront
dunkelgrau: Heterogene Mutation; Wildtyp Tumorzentrum+Mutation Invasionsfront
schwarz: Heterogene Mutation; Mutation Tumorzentrum+Wildtyp Invasionsfront
- b) weiß: Wildtyp Primarius+Lymphknotenmetastase
schwarz: Heterogene Mutation; Mutation Primarius+Wildtyp Lymphknotenmetastase
- c) weiß: Wildtyp Primarius+Fernmetastase
schwarz: Heterogene Mutation; Mutation Primarius+Wildtyp Fernmetastase

Von allen *PIK3CA*-Mutationen existierte in 75% der Fälle eine intratumorale Heterogenität im Primärtumor (Tumorzentrum, -invasionsfront). Intertumorale Heterogenität zwischen Primarius und Lymphknotenmetastase bestand bei 100% der Patienten und ebenso bei 100% war der Primarius heterogen zur Fernmetastase.

3.5. Koexistenz von Mutationen

In keinem Fall existierten *KRAS* -, *BRAF* - oder *PIK3CA*-Mutationen beim selben Patienten.

3.6 Zusammenfassung

Tabelle 29: Prävalenz und Heterogenität von *KRAS*-, *BRAF*- und *PIK3CA*-Mutationen bezogen auf das Gesamtkollektiv

UICC	n	<i>KRAS</i>	<i>BRAF</i>	<i>PIK3CA</i>
		Prävalenz/Heterogenität (%)	Prävalenz/Heterogenität (%)	Prävalenz/Heterogenität (%)
gesamt	72	5,6/2,8	0/0	5,6/5,6
St. 1-2	16	1,4/0	0/0	4,2/4,2
St. 3-4	56	4,2/2,8	0/0	1,4/1,4

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Mutationen von *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* in den untersuchten Hotspot-Regionen von Magenkarzinomen selten waren. Es fanden sich vier *KRAS*-Mutationen, von denen zwei homogen und zwei heterogen waren. Es existierte keine intratumorale Heterogenität. Bei zwei Patienten lag intertumorale Heterogenität vor (2,8% des Gesamtkollektivs): in einem Fall zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase, im anderen gab es dieselbe Mutation in Primärtumor und Lymphknotenmetastase, aber nicht in der Fernmetastase. Mutationen in *BRAF* oder *PIK3CA*, Exon 9 fanden sich nicht. Die aufgeführten Mutationen von *PIK3CA* befanden sich ausschließlich in Exon 20. Vier Patienten waren davon betroffen. Intratumorale Heterogenität lag zu 4,2% des Gesamtkollektivs vor (drei Patienten). Intertumorale Heterogenität konnte in jedem Fall nachgewiesen werden. Bei allen vier Patienten bestand intertumorale Heterogenität zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase (5,6% des Gesamtkollektivs). Ein Patient zeigte zusätzlich intertumorale Heterogenität zwischen Primärtumor/Lymphknotenmetastase und Fernmetastase (1,4% des Gesamtkollektivs). Weiterhin ließ sich keine Korrelation zwischen dem Auftreten von *KRAS*-/*PIK3CA* Exon 20-Mutationen und histopathologischen Parametern (histologische Klassifikation, T-Stadium, Lymphknotenbefall, *grading*) feststellen.

4 Diskussion

Um einschätzen zu können, warum die *targeted therapy* trotz aller Bemühungen und zielgerichteter Tumorangriffspunkte immer noch keine bahnbrechenden Erfolge in der Therapie des Magenkarzinoms erzielt hat, wurden in der vorliegenden Arbeit Prävalenz und Heterogenität von Protoonkogenen der EGFR-Signalkaskade untersucht. Es stellt sich die Frage, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Mutationen von *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* und der Wirksamkeit der Therapie mit EGFR-spezifischen monoklonalen Antikörpern existiert. Bei vielen Karzinomen ist eine enge Assoziation zur Überaktivierung der EGFR-Signalkaskade bekannt (s. Kap. 1.5) (Salomon et al., 1995; Citri & Yarden, 2006). Zu nennen sind beispielsweise kolorektale Karzinome (Corso et al., 2011; Baldus et al., 2010) und Mammakarzinome (Kalinsky et al., 2011). Ebenso scheint die EGFR-Signalkaskade eine Bedeutung für die Karzinogenese des Magens zu besitzen (Vauhkonen et al., 2006).

4.1 Prävalenz von Mutationen in der EGFR-Signalkaskade

4.1.1 *KRAS*

KRAS kommt eine Schlüsselrolle in der EGFR-Signalkaskade zu. Im derzeit gültigen Erklärungsmodell für die Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms geht man davon aus, dass Mutationen im *KRAS*-Gen die Signalkaskade überaktivieren können. Ist dies der Fall, bleibt sie möglichen regulierenden Inhibitoren gegenüber resistent und Tumorzellen können sich ungehindert vermehren. Schlussfolgernd hätten Patienten mit aktivierender *KRAS*-Mutation eine schlechtere Prognose als diejenigen mit *KRAS*-Wildtyp (de Roock et al., 2007), (s. Kap. 4.4.8). Im Vergleich zu anderen Tumoren (Pankreaskarzinom (69-90%), kolorektales Karzinom (32-53%), Bronchialkarzinom (15-50%)) waren *KRAS*-Mutationen im Magenkarzinom eher selten (Davies et al., 2002). In der Literatur waren - je nach Studie - ganz unterschiedliche Prävalenzen zu finden. Sie reichten von 0-18% (s. Kap. 1.6) (Pinto et al., 2009; Maesawa et al., 1995; Vauhkonen et al., 2006). In einer der frühen Arbeiten (1995), bei der genetische Alterationen in Magenadenomen und -karzinomen untersucht wurden, wurde weder in den 30 Adenomen, noch in den 72 Karzinomen eine *KRAS*-Mutation angetroffen. Die Studie wurde vor dem Hintergrund der Hypothese durchgeführt, die Karzinogenese des Magens wäre der des

Kolons ähnlich. Folglich kämen *KRAS*-Mutationen eine Schlüsselrolle zu (Maesawa et al., 1995). In einem größeren Kollektiv (140 Patienten) untersuchten Lee et al. (1995) Codon 12 von *KRAS*. 11 von diesen 140 Patienten zeigten eine aktivierende *KRAS*-Mutation (7,9%). Codon 13 wurde in dieser Studie vernachlässigt. Pinto et al. (2009) untersuchten im Rahmen der DOCETUX-Studie die Wirksamkeit von Cetuximab in Kombination mit den Chemotherapeutika Cisplatin und Docetaxel beim Magenkarzinom. Hierbei wurden ebenso 72 Patienten mit einem Adenokarzinom des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs untersucht. Bei 32 von diesen wurde zusätzlich der *KRAS*-Mutationsstatus bestimmt. In drei Karzinomen (9,4%) fand sich eine *KRAS*-Mutation. Man sollte jedoch berücksichtigen, dass die Fallzahl sehr gering war (Pinto et al., 2009). Yashiro et al. (2005) haben 108 Magenkarzinome untersucht und dabei eine vergleichsweise hohe Prävalenz von 18% *KRAS*-Mutationen aufgedeckt. Die bislang größte und aktuellste Studie diesbezüglich wurde von van Grieken et al. im Jahre 2013 durchgeführt. In Zentren von Großbritannien, Japan und Singapur wurden insgesamt 712 Magenkarzinome genauer untersucht. Dies ist die erste Studie, die auch regionale Unterschiede miteinbezieht. Insgesamt gab es 4,2% *KRAS*-Mutationen (5,8% in Großbritannien, 4% in Japan, 1,5% in Singapur). Besitzen Magenkarzinome eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI), das heißt Längenveränderungen durch Mutationen in bestimmten repetitiven DNA-Sequenzen, haben diese oft eine höhere Rate an Hotspot-Mutationen. MSI trat in ca. 15-20% aller Magenkarzinome auf (Nagini, 2012; Corso et al., 2011). Am häufigsten fand sich MSI dort aufgrund einer Hypermethylierung des Promotors MLH-1. Magenkarzinome mit einer MSI traten oft in höherem Alter auf und hatten eine günstigere Prognose (Duraes et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit konnten vier *KRAS*-Mutationen (5,6%) in Exon 2 aufgedeckt werden. In drei Fällen handelt es sich um die Mutation G12D, einmal um G12V. Die Prävalenz von *KRAS*-Mutationen lässt sich gut mit der vorhandenen Literatur vereinbaren.

Weiterhin schien Codon 12 im Magenkarzinom etwas häufiger Mutationen aufzuweisen als Codon 13. Corso et al. (2011) berichteten von einer Verteilung von 63,6% (Codon 12) und 36,4% (Codon 13). Van Grieken et al. (2013) fanden 75% (Codon 12) und 13% (Codon 13) *KRAS*-Mutationen. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Veränderungen von Codon 12 angetroffen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Mutationen in Codon 12 die größere Bedeutung zukommt. Die häufigste Mutation in Codon 12 von Exon 2 wurde in der Literatur G12D zugeschrieben (van Grieken et al., 2013; Corso et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit war diese mit drei Fällen ebenso die häufigste Mutation (75% aller Mutationen).

Obwohl sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen klinischen und histopathologischen Parametern und dem Auftreten von *KRAS*-Mutationen feststellen ließ, fiel auf, dass die Mutationen meist beim intestinalen Typ nach Laurén vorkamen (drei Patienten). In einem Fall han-

delte es sich um einen Mischtyp. Diese Tatsache stimmt mit dem derzeit gängigen Erklärungsmodell der Karzinogenese des intestinalen Magenkarzinoms überein (s. Kap. 1.5). Das intestinale Magenkarzinom scheint eine enge Assoziation zur Überaktivierung der EGFR-Signalkaskade zu besitzen (Vauhkonen et al., 2006). Im diffusen Magenkarzinom befanden sich daher nur wenige oder keine *KRAS*-Mutationen (Nagini, 2012).

In keinem Fall traten in der vorliegenden Untersuchung *KRAS*-Mutationen mit *BRAF*- oder *PIK3CA*-Mutationen simultan auf (s. Kap. 3.5). Derartige Koexistenzen wurden bislang nur selten untersucht (Velho et al., 2005). Kim et al. (2003) berichteten davon, dass *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen nicht im selben Magenkarzinom vorkommen. Lee et al. (2003) haben 319 Magenkarzinome auf *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen untersucht und dabei ein einziges Karzinom entdeckt, welches beide Mutationen enthielt. In einer weiteren Studie von Li & Wong (2005) fand sich bei einer niedrigen Prävalenz von 4,3% *PIK3CA*-Mutationen (4 von 94 Patienten) bei zwei Mutationen eine koexistente *KRAS*-Mutation. Dabei handelte es sich um eine H1047R-Mutation in *PIK3CA* Exon 20 und eine G13D-Mutation in *KRAS*, Exon 2, im anderen Fall um eine E542K-Mutation in *PIK3CA*, Exon 9 und eine G13D-Mutation in *KRAS*, Exon 2. Eine Prävalenz von 5,6% *KRAS*-Mutationen allein kann nicht die schlechte Ansprechrate der Anti-EGFR-Antikörpertherapie für das Magenkarzinom erklären (s. Kap. 1.9). Eine weitere mögliche Ursache könnten Amplifikationen von Protoonkogenen sein. Bislang wurden Amplifikationen von *KRAS* möglicherweise in ihrer klinischen Relevanz unterschätzt. Deng et al. (2012) haben eine Prävalenz von 8,8% *KRAS*-Amplifikationen herausgearbeitet. Damit waren Amplifikationen häufiger als *KRAS*-Mutationen. Ähnlicher Ansicht waren auch Mita et al. (2009). Diese Arbeitsgruppe hat 86 Primärtumore und 20 Zelllinien von Magenkarzinomen genauer untersucht. In 15% fand sich eine *KRAS*-Genamplifikation in Zelllinien und in 4,7% im Primärtumor. Bei den veränderten Formen wurde nachgewiesen, dass es sich um überaktive Formen handelt, da vermehrt GTP-*KRAS* exprimiert wurde. Demnach könnten *KRAS*-Genamplifikationen im Magenkarzinom mitunter zu einer Resistenz gegenüber der *targeted therapy* führen.

4.1.2 *BRAF*

In der vorliegenden Studie fanden sich in 72 Patienten keine mit *BRAF* Hotspot-Mutation. Diese Seltenheit im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten wurde von anderen Autoren bestätigt. Als eine der ersten Arbeitsgruppen, die die Prävalenz von *BRAF*-Mutationen im Magenkarzinom untersuchten, fanden Lee et al. (2003) in 319 Adenokarzinomen sieben *BRAF*-Mutationen (2,2%). Velho et al. (2005) untersuchten 47 Magenkarzinome. Von diesen trat nur bei einem eine *BRAF*-Mutation auf. Pinto et al. (2009) haben bei 72 Patienten keine *BRAF*-Mutationen aufgedeckt. In der aktuellsten und größten multizentrischen Studie (Großbritannien, Japan, Singapur) bezüglich der Mutation von Protoonkogenen des Magenkarzinoms mit 712 Patienten wurden ebenso keine *BRAF*-Mutationen im Magenkarzinom gefunden. Aufgrund der großen Fallzahl scheinen die Daten dieser Studie sehr zuverlässig zu sein (van Grieken et al., 2013). Kam es doch zum Auftreten von *BRAF*-Mutationen, handelte es sich meist um die Mutation V600E (Kim et al., 2003). Diese Mutation dient bei anderen Karzinomen bereits erfolgreich als medikamentöser Angriffspunkt. Durch die Applikation von *BRAF*-Inhibitoren wie Vemurafenib und Dabrafenib konnte das Überleben bei fortgeschrittenem malignem Melanom signifikant verbessert werden. Derzeit wird versucht, die therapeutische Anwendung in Bezug auf das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom auszuweiten. Die präklinischen Ergebnisse sind vielversprechend (Lee & Ou, 2013). Diese Therapiemöglichkeit schien nicht passend für das Magenkarzinom zu sein, da kaum *BRAF*-Mutationen vorlagen (Lee et al., 2003). Aus diesem Grund schlugen Corso et al. (2011) vor, den *BRAF*-Mutationsstatus nicht als prädiktiven Marker für das Ansprechen einer Anti-EGFR-Antikörpertherapie zu verwenden (s. Kap. 4.4.8).

4.1.3 *PIK3CA*

Es existieren zwei wesentliche Hotspot-Regionen für *PIK3CA*-Mutationen (s. Kap. 1.8): Exon 9 und 20. Das *PIK3CA*-Gen kodiert für die katalytische Untereinheit von p110 α , welche einen Komplex mit p85 bildet und dadurch als möglicher Ausgangspunkt für den PI3K/Akt-Signalweg dient (s. Kap. 1.5, Abb. 2). Das p110 α wiederum besteht aus einer Helikase- und einer Kinasedomäne. Die Hotspot-Mutationen von Exon 9 befinden sich in der Helikasedomäne und die von Exon 20 in der Kinasedomäne. Im Ruhezustand stabilisiert p85 p110 α , dadurch bleibt PI3K inaktiv und es findet kein Zellwachstum statt. Bei beiden oben genannten Hotspot-Mutationen kam es zu einem *gain-of-function* und die Zellen proliferierten unge-

hemmt. Entstanden Mutationen in der Helikasedomäne (z.B. *PIK3CA* Exon 9), wurde für die Aktivierung der Kaskade eine Interaktion von p110 α mit Ras-GTP nötig, unabhängig von der Bindung von p85. Bei Mutationen der Kinasedomäne (z.B. *PIK3CA* Exon 20) war die Bindung von p85 unbedingt notwendig, Ras-GTP jedoch nicht. Welche Auswirkung diese unterschiedlichen Aktivierungswege im Einzelnen auf die Karzinogenese des Magens haben, ist derzeit noch unklar (Zhao & Vogt, 2008). Bezüglich des Magenkarzinoms reichten die Prävalenzen für *PIK3CA*-Mutationen von 4,3-16%, je nach Autoren: Li & Wong (2005) untersuchten 94 Patienten auf Hotspot-Mutationen in Exon 9 und 20. In 4,3% (vier Patienten) traten Mutationen in *PIK3CA* auf. Die vier Mutationen waren zur Hälfte auf Exon 9 (E542K, E545K) und Exon 20 (H1047R) verteilt. In der Untersuchung von Velho et al. (2005) fanden sich fünf *PIK3CA*-Mutationen in 47 Adenokarzinomen des Magens (10,6%). All diese Mutationen fanden sich in MSI-Karzinomen. Dieser Unterschied war signifikant. Es handelte sich bei Velho et al. (2005) um dieselben Hotspot-Mutationen wie bei Li & Wong (2005) (drei Patienten E542K, zwei Patienten H1047R). Barbi et al. (2010) analysierten eine große Zahl an Magenkarzinomen (264 Patienten) bezüglich Hotspot-Mutationen in *PIK3CA* und fanden eine Prävalenz von 16%. Dabei handelte es sich meist um eine H1047R-Mutation in Exon 20 (62%). Es konnte kein Zusammenhang zu klinisch/histopathologischen Parametern erkannt werden. Barbi et al. erklärten diese Tatsache dadurch, dass Veränderungen in *PIK3CA* wahrscheinlich zu einem frühen Zeitpunkt der Karzinogenese entstehen. Im Jahr 2012 zeigte eine Studie von Shi et al. erstmals Prävalenzen von *PIK3CA*-Mutationen in Assoziation zum klinischen *outcome*. Es fanden sich acht Mutationen bei 113 Patienten (7,1%). Drei Mutationen betrafen Exon 9 und fünf Exon 20. Es konnte kein Zusammenhang zwischen klinisch/histopathologischen Parametern oder klinischem *outcome* und diesen Mutationen festgestellt werden (Shi et al., 2012). Das Patientenkollektiv der vorliegenden Studie mit 72 Patienten enthielt 5,6% *PIK3CA*-Mutationen (vier Patienten), allesamt in Exon 20 lokalisiert. Vergleichend mit den Studien von Li & Wong (2005), Velho et al. (2005), Barbi et al. (2010) und Shi et al. (2012) lag die Prävalenz im unteren Normbereich. Bis auf die Studie von Barbi et al. (2010) war die Fallzahl annähernd ähnlich und somit gut vergleichbar. Analog zu Barbi et al. (2010) und Shi et al. (2012) betraf die häufigste *PIK3CA*-Mutation Exon 20 (H1047R). In unserem Fall war es sogar die einzige. Velho et al. (2005) und Li und Wong (2005) beschrieben eine ausgewogene Verteilung von Mutationen für Exon 9 und 20. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Anzahl der Mutationen insgesamt sehr gering war. Desweiteren gab es in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen dem Auftreten einer *PIK3CA*-Mutation und klinisch/histopathologischen Parametern, ebenso wenig bei Barbi et al. (2010) und Shi et al. (2012). Trotzdem fiel auf, dass drei Mutationen im intestinalen Typ nach Laurén zu finden

waren. Dies lässt wiederum eine enge Assoziation zur Karzinogenese und EGFR-Signalkaskade vermuten (s. Kap. 1.5). Eine Mutation betraf ein Siegelringzellkarzinom, entsprechend dem diffusen Typ nach Laurén. Das war eher ungewöhnlich, da die Karzinogenese des diffusen Typs anders verläuft als des intestinalen Typs, der eng mit der EGFR-Signalkaskade verknüpft ist (Vauhkonen et al., 2006). Viel häufiger als Mutationen wurden bei Shi et al. (2012) jedoch Genamplifikationen von *PIK3CA* festgestellt (67%). Traten sie auf, war häufig Akt durch Phosphorylierung überaktiviert. Patienten mit *PIK3CA*-Amplifikationen wiesen eine signifikant schlechtere Überlebenszeit auf. Byun et al. (2003) wiesen ebenfalls darauf hin, dass Amplifikationen von *PIK3CA* im Magenkarzinom häufig vorkamen. Bei der Untersuchung von 126 Magenkarzinomen gab es in 36,4% (22 von 55) *PIK3CA*-Amplifikationen, bei der Untersuchung von 15 Zelllinien in 60% (9 von 15). Durch die Genamplifikation wurde *PIK3CA* überexprimiert. Daraufhin fand man häufig eine große Menge an phosphoryliertem Akt. Resultierend war der PI3K/Akt-Signalweg überaktiv und die Karzinogenese begünstigt.

4.2 Heterogenität von Mutationen

Neben dem Auftreten von Mutationen von Protoonkogenen innerhalb der EGFR-Signalkaskade kann auch die Heterogenität selbiger ein ausschlaggebender Faktor für den bisherigen Therapiemisserfolg durch monoklonale Antikörper darstellen. Man geht davon aus, dass generell in soliden Karzinomen durchschnittlich ca. 33-66% somatische Mutationen vorkommen, wodurch am Ende ein neues Protein entsteht. Weiterhin existieren Mutationen, die eine klonale Expansion auslösen können, wie sie beispielsweise bei *KRAS* oder *PIK3CA* vorkommen (Vogelstein et al., 2013). Da Karzinome, vor allem im fortgeschrittenen Stadium eine systemische Erkrankung darstellen ist es notwendig Mutationen an verschiedenen Loci zu betrachten. Aus diesem Grund unterscheidet man die intra- und intertumorale Heterogenität. In der vorliegenden Arbeit wurde der Begriff intratumorale Heterogenität für Mutationen an einem Ort (entweder Primarius, Lymphknoten- oder Fernmetastase) eines Patienten verwendet. Weiterhin oblag der Begriff intertumorale Heterogenität Mutationen zwischen diesen Orten eines einzelnen Patienten. Vogelstein et al. (2013) unterteilten zusätzlich noch intermetastatisch (zwischen Metastasen eines Patienten), intrametastatisch (innerhalb einer Metastase) und zwischen Patienten um Mutationen noch genauer differenzieren zu können.

Mutationen sowie Heterogenitäten können sich dynamisch im Laufe einer Krankheit verändern. Daher ist zu diskutieren, ob eine Momentaufnahme eines aktuellen Mutationsstatus ausreichend ist, um eine onkologische Therapie ausreichend zu gestalten. Zusätzlich hat sowohl die intra- als auch die intertumorale Heterogenität einen großen Einfluss auf die Auswahl der Biomarker um klinisch relevante Entscheidungen zu treffen (Burrell et al., 2013).

Bislang gibt es keine Studie, die explizit die intra- oder intertumorale Heterogenität von *KRAS*, *BRAF* oder *PIK3CA* im Magenkarzinom untersucht. Auch die oben erwähnten Studien zu Prävalenzen von Mutationen unterschieden nicht zwischen verschiedenen Lokalisationen (Primärtumor, Lymphknoten-, Fernmetastase) (s. Kap. 4.1.1/ 4.1.2/ 4.1.3).

Bei der derzeitigen Prüfung auf Mutationen wird im klinischen Alltag eine Probe pro Tumor untersucht, ohne Rücksicht auf Tumorzentrum oder Invasionsfront (Allegra et al., 2009). Untersuchungen haben jedoch gezeigt, je größer ein Primärtumor ist, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass er in sich selbst heterogen ist. Diese große Diversität stellt den behandelnden Arzt vor die Herausforderung des *sampling errors*. Damit steigt auch das Risiko einer Therapie, die dem individuellen Patienten nicht gerecht wird (Vogelstein et al., 2013). Die Ursachen der intratumoralen Heterogenität scheinen in der Tumorevolution begründet zu sein. Im Rahmen der Karzinogenese bilden sich im Primärtumor maligne Zellen aus. Es kommt zu Wachstum und interzellulärer genetischer Variation, sodass sich im Primärtumor selbst Subpopulationen von Zellen in ihrer jeweiligen Mikroumgebung ausbilden (Nowell, 1976; Cairns, 1975). Diese Mikroumgebung ändert sich je nach Lokalisation, im Rahmen des Fortschreitens der Krankheit oder der Anwendung von Medikamenten. Es bilden sich also unterschiedliche Subpopulationen mit phänotypisch vorteilhaften Merkmalen aus, die zu einer lokalen Überpopulation führen. Gegebenenfalls ist es einem neuen Zellklon möglich alle alten Klone zu ersetzen. Dann wäre der Mutationsstatus an einer Lokalisation homogen. Ist dies nicht möglich, bleibt er heterogen (Welch et al., 2012). Eine weitere Möglichkeit ist die verzweigte Tumorevolution bei der eigene Subklone sich komplett parallel weiter entwickeln, was am Ende zu einer äußerst großen Heterogenität führt. Diese Tatsache wurde auch für solide Karzinome beobachtet, da es möglich ist, dass sie von unterschiedlichen Stammzellen ihren Ursprung nehmen (Cahill et al., 1999). Außerdem wurde beschrieben, dass eine räumliche Trennung auch zu einer genetischen Variabilität führen kann. Beispielsweise können physikalische Barrieren wie Blutgefäße oder unterschiedliche Gewebearten eine genetische Durchmischung teilweise verhindern. Intertumorale Heterogenitäten können demnach durch die neue Mikroumgebung und den Selektionsdruck entstehen. Damit kann eine weitere Metastasierung mit unterschiedlichem genetischem Material stattfinden (Wu et al., 2012). Die genomische Instabilität wird als wesentlich mitverantwortlich für die intratumorale Heterogenität gesehen.

Ohne sie wäre das Auftreten einzelner Mutationen viel seltener. Eine gesunde Zelle zeigt sich in der Regel als sehr stabil. Die meisten soliden Tumore jedoch weisen zumindest eine Form der genomischen Instabilität auf (Gordon et al., 2012). Der eigentliche Level an intratumoraler Heterogenität verursacht durch genomische Instabilität scheint weit höher zu sein, als bisher angenommen. Das könnte mitunter an der Schwierigkeit liegen, Heterogenitäten zwischen einzelnen Zellen überhaupt methodisch aufzudecken (Alexandrov et al., 2013). Tatsächlich ist die Komplexität von Karzinomen bezüglich ihrer unterschiedlichen molekularpathologischen Merkmale generell noch zu wenig in die therapeutische Entscheidungsfindung miteinbezogen. Die Mutationsanalyse bezieht sich meist nur auf Ausschnitte von Gewebepreparaten, welche oft heterogene neoplastische Zellen in Kombination mit entzündetem gesundem Gewebe enthalten. Einerseits besteht die Wahrscheinlichkeit, dass verschiedene Lokalisationen einer Gewebeprobe selbst heterogen sind (intratumoral), andererseits können sich verschiedene Tumorlokalisationen, z.B. Lymphknoten- und Fernmetastasen, molekularpathologisch unterscheiden (intertumoral) (Grundberg et al., 2013). Diese Heterogenität beeinträchtigt die Wirkung der *targeted therapy* (Kim et al., 2014). In einigen Tumorentitäten wurde die Heterogenität von Protoonkogenen der EGFR-Signalkaskade bereits untersucht. Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom beispielsweise scheint intratumorale Heterogenität von *KRAS* eine Rarität zu sein. Alsdorf et al. (2013) untersuchten 40 Patienten auf *KRAS*-Mutationen. Bei einer Prävalenz von 30 Patienten gab es in keinem Fall Heterogenität. Kim et al. (2014) untersuchten intratumorale Heterogenität (*KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*) zwischen chirurgischen Resektaten und perkutanen Biopsien von 34 Adenokarzinomen der Lunge. Es lagen keine *BRAF*- oder *PIK3CA*-Mutationen vor. Zwei Patienten (6%) zeigten eine *KRAS*-Mutation. Bei beiden stimmte die Mutation in Resektat und Biopsie überein. Auch für das kolorektale Karzinom wurde die Heterogenität von *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* untersucht. Baldus et al. (2010) fanden unter 100 Patienten 41% *KRAS*-, 7% *BRAF*- und 21% *PIK3CA*-Mutationen. Innerhalb des Primarius wurde zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront unterschieden (intratumorale Heterogenität bezogen auf alle Patienten: *KRAS* 8%, *BRAF* 1%, *PIK3CA* 5%). Desweiteren wurden die Mutationen im Primärtumor mit denen der vorhandenen Lymphknotenmetastasen verglichen. Es zeigte sich intertumorale Heterogenität von Mutationen von *KRAS* 31%, *BRAF* 4% und *PIK3CA* 13% berechnet auf die Gesamtheit aller Patienten. Die Korrelation der Mutationen von Primarius und Fernmetastase ergab intertumorale Heterogenität für *KRAS* in 10%, *BRAF* in 0% und *PIK3CA* in 5% der Fälle (Baldus et al., 2010). Nur ein Jahr später untersuchten Farber et al. (2011) ein Kollektiv von 169 Patienten mit kolorektalem Karzinom bezüglich *KRAS*-Mutationen und ihrer Heterogenität. Sie stellten eine Prävalenz von 44% fest. Aus technischen Gründen konnten jedoch nur 42 Patienten weitergehend un-

tersucht werden. Es ließ sich keine Heterogenität innerhalb des Primärtumors feststellen. Auch für das Mammakarzinom wurde untersucht, ob *PIK3CA*-Mutationen intratumoral heterogen vorkommen. Bei 63 Patienten waren nur drei heterogen. Daraus schlussfolgerten Kalinsky et al. (2011), dass intratumorale Heterogenität im Mammakarzinom selten sein musste. In der vorliegenden Untersuchung des Magenkarzinoms bestand bei vier Patienten keine intratumorale Heterogenität in verschiedenen Regionen des Primärtumors für *KRAS*. Bei *PIK3CA* lag in 75% (4,2% aller Patienten) intratumorale Heterogenität vor. Das Kollektiv war eher klein, aber es lässt sich vermuten, dass Mutationen dieser Gene im primären Magenkarzinom selten waren. Intertumorale Heterogenität zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase bestand bei *KRAS* zu 50% (2% aller Patienten), bei *PIK3CA* zu 100% (5,6% aller Patienten). Zwischen Primarius und Fernmetastase lag die Heterogenität bei 100% (*KRAS* und *PIK3CA*) (s. Kap. 3.2.6 und 3.4.6). Leider gab es keine Vergleichsmöglichkeiten für das Magenkarzinom mit anderen Autoren. Verglichen mit anderen Karzinomen war die Prävalenz von Mutationen deutlich geringer. Trotzdem gab es hier, verglichen zu den oben genannten Studien anderer Entitäten, eine hohe Rate an Heterogenitäten. Um dies zu verifizieren, benötigt man Studien mit einer noch höheren Fallzahl, um eine größere Anzahl von Mutationen in die Analyse einschließen zu können.

Festzustellen ist, dass es Unterschiede zwischen verschiedenen Tumorentitäten gibt. Sie wiesen unterschiedliche Genome, Prognosen und Ansprechen auf Medikamente vor. Durch das Gewebe des Ursprungs des Primärtumors wird derzeit die Therapie definiert. Die Häufigkeiten von Mutationen von Protoonkogenen der Signalkaskaden unterscheiden sich je nach Tumorart und Zelltyp. Das wirft die Frage auf, ob bei verschiedenen Tumoren zusätzlich eigene Signalwege bestehen, denn intrinsische Eigenschaften beeinflussen u.a. die Therapieantwort und Apoptose. Von daher wäre es wichtig Tumore vor Therapiebeginn in Tumorsubkategorien, bzw. -subklone einzuteilen (Vogelstein et al, 2013; Swanton, 2012). Weiterhin wäre ein longitudinales Tumorsampling während der kompletten Behandlungsphase sinnvoll, anstatt nur eine prätherapeutische histologische Probe zu gewinnen, da wie bereits erwähnt, sich der Mutationsstatus im Verlauf verändern kann. Diese phänotypische Heterogenität kann multifaktoriell bedingt sein (z.B genomische Diversität, Genexpression, Proteinstabilität, epigenetische Veränderungen, Veränderung der Mikroumgebung) Demnach wäre es wichtiger dominante Zellen des Karzinoms zu identifizieren als subklonale Zellen, was jedoch eine Herausforderung darstellt. Hinzu kommt die Möglichkeit, dass sich einige subklonale Zellen erst im Verlauf zu dominanten herausbilden können (Burrell et al., 2013). Bis zu 20 klonale Genveränderungen werden als Durchschnittswert für verschiedene Mutationen angesehen (Vogelstein et al., 2013). Es sind weitere minimal-invasive Methoden nötig, um Heterogenitäten für das

Magenkarzinom vorherzusagen zu können. Genauso braucht es gute klinische prädiktive Marker für das Ansprechen einer möglichen Antikörpertherapie (Burrel et al., 2013).

4.3. Technische Artefakte

Es stellt sich nun die Frage, ob es möglich ist, durch die erworbenen Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung auf die Population aller Magenkarzinomerkrankten zu schließen. Zum einen ist hervorzuheben, dass hier lediglich 72 Tumorpatienten retrospektiv untersucht wurden. Unter Verwendung eines noch größeren Kollektivs wäre die Mutationsanalyse noch vorhersagekräftiger. Eine noch größere Fallzahl wäre in nachfolgenden Untersuchungen wünschenswert. Weiterhin waren bei 72 Patienten 47 Lymphknotenpräparate vorhanden und nur in drei Fällen Fernmetastasen betroffen. Wegen dieser geringen Fallzahl war es schwierig, überhaupt Mutationen in Metastasen zu entdecken und allgemein geltende Rückschlüsse für die Therapie zu ziehen. Wie bereits in Kapitel 4.2. erwähnt wurde ist der *sampling error* bezüglich des Bereiches des Tumors, der mikroskopisch untersucht wird nicht zu unterschätzen. Schließlich war die exakte Identifizierung des zu untersuchenden Tumorareals ein wichtiger Arbeitsschritt. Sie erfolgte zunächst durch den Chirurgen, der das Gebiet nur makroskopisch einengte, weiterhin durch den Pathologen, der mikroskopisch im HE-gefärbten Schnitt das Tumorareal markierte. In diesem Leerschnitt konnten die Tumorzellen nicht noch einmal mikroskopisch erfasst werden, sodass keine Re-Evaluierung erfolgen konnte. Wenn zu viele gesunde Zellen die DNA-Masse der eventuell mutierten Tumorzellen überlagert haben sollten, wären sie der Mutationsanalyse fälschlicherweise entgangen. Um diesen *mismatch* künftig zu vermeiden könnte man eine erneute Evaluierung vornehmen, indem man sich mikroskopisch noch einmal davon überzeugt, dass wirklich der Bereich der tumortragenden Zellen eingekreist wurde, um vollständig selektiv isoliert zu werden. Um diesen Arbeitsschritt noch weiter zu optimieren, könnte man auch eine Laser-Mikrodissektion vornehmen. Diese Methode ermöglicht es, ganz selektiv einzelne Tumorzellen oder -zellverbände zu extrahieren. Vorzugsweise verwendet man HE-gefärbte Blockpräparate in dünnen Schichten, die auf Objektträgern fixiert sind. Die lichtmikroskopische Begutachtung ermöglicht eine genaue Selektion. Ein UV-Licht- oder Infrarotlaser löst die gewünschte Region heraus. Durch eine nur 1ns kurze Kontaktzeit des Lasers wird das zu untersuchende Gewebe selbst nicht beeinträchtigt (Decarlo et al., 2011).

Eine andere Möglichkeit zur Quantifizierung der isolierten DNA wäre der Einsatz der Real-time PCR anstatt einer PCR. Für die Quantifizierung nutzt man Fluoreszenzmessungen, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit erfasst werden. Möglich ist beispielsweise der Einsatz

von Ethidiumbromid als Fluoreszenzmittel. Je mehr DNA-Produkte entstehen, desto stärker ist die Fluoreszenz. Eine Messung findet jeweils am Ende der Elongationsphase statt (s. Kap. 2.9). Ganz spezifisch ist diese Methode jedoch auch nicht, da fälschlicherweise Nebenprodukte anstatt der gewünschten DNA gemessen werden können. Dieses Problem entsteht durch die wesentlich höhere Sensitivität der rt-PCR im Vergleich zur einfachen PCR (Heid et al., 1996). Unter Verwendung dieser Technik könnte man die zu untersuchenden isolierten DNA-Produkte noch besser darstellen und eventuelle Fehler durch Überlagerungen von mutierter und nicht mutierter DNA nach der Isolierung vermindern.

4.4 Antikörpertherapie

Es ist dringend notwendig, geeignete individuelle Therapien für Magenkarzinompatienten zu entwickeln, da die Prognose bei lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Tumoren bislang sehr schlecht ist. Ohne Therapie liegt das Überleben im fortgeschrittenen Stadium bei ca. drei bis fünf Monaten, mit palliativer Chemotherapie bei ca. einem Jahr (Duraes et al., 2014). Jedoch nur ungefähr die Hälfte der Patienten spricht überhaupt auf die Triplechemotherapie (Cisplatin, 5-Fluorouracil, Anthrazykline oder Taxane) an. Bis heute berücksichtigt die Therapie nicht zielgerichtet phäno- und genotypische Merkmale (mit Ausnahme von Trastuzumab). Daher sind dringend neue Therapiestrategien und prädiktive Therapiemarker nötig (Kulig et al., 2012; Warnecke et al., 2013). Zukünftiges Ziel ist die selektive Zerstörung von Tumorzellen unter Schutz des gesunden Gewebes, damit Nebenwirkungen, Morbidität und Mortalität möglichst gering ausfallen (Ciardiello & Tortora, 2008). Obwohl die *targeted therapy* bereits gute Ergebnisse für die Therapie anderer Tumorentitäten gezeigt hat (s. Kap. 1.9), wird bislang nur der Anti-HER2-Antikörper Trastuzumab bei positivem HER2-Rezeptorstatus routinemäßig beim Magenkarzinom eingesetzt (Kulig et al., 2012) (vgl. Kap. 4.3.1). Es sind prädiktive Faktoren nötig, um die Patienten für die Therapie ein- oder ausschließen zu können. Ein möglicher Erklärungsansatz für die Resistenz gegenüber monoklonalen Antikörpern ist die Heterogenität der untersuchten Tumormasse. Finden sich Mutationen bestimmter Protoonkogene, kann die Therapie möglicherweise unwirksam sein. Eine Fehlentscheidung bezüglich des Einsatzes von monoklonalen Antikörpern kann entstehen, wenn prätherapeutisch untersuchtes Gewebe Wildtypstatus zeigt, in nicht untersuchten Lokalisationen aber Mutationen vorhanden sind (Warnecke et al., 2013). Bezüglich der schlechten *drug response* werden die verschiedenen klonalen Genveränderungen mit verantwortlich gemacht (s. Kap. 4.2). Daher ist eine Kombination von Medikamenten einer Monotherapie vorzuziehen (Vogelstein et al., 2013).

Im Folgenden werden mögliche Therapieansätze im Sinne von Medikamentenklassen genauer beleuchtet.

4.4.1 Anti-HER2-Antikörper

Es hat sich herausgestellt, dass eine Modifikation von HER2 (s. Kap. 1.5) die EGFR-Signalkaskade überaktivieren kann. In vielen Tumoren (Mamma-, Ovarial-, Prostata-, Pankreas-, Kolonkarzinom) ist eine Überexpression des HER2-Proteins bzw. eine Amplifikation des *HER2*-Gens beschrieben, so auch im Magenkarzinom. Jedoch existiert eine große Anzahl sehr widersprüchlicher Ergebnisse. Deshalb untersuchten Gu et al. (2014) 11 Studien in einer Metaanalyse. HER2-Überexpression und -Amplifikation fanden sich in 4-53%. Sie waren jedoch nicht mit dem *overall survival* assoziiert. Als Beispiel ist die Studie von Tanner et al. (2005) zu nennen. In 16 von 131 Patienten mit Magenkarzinom war *HER2* amplifiziert (12,2%). Es gab einen signifikanten Zusammenhang zum histopathologischen Typ nach Laurén. Verteilt waren die Amplifikationen zu 21,5% auf den intestinalen und zu 2% auf den diffusen Typ. Weiterhin untersuchten Maresch et al. (2012) die Bedeutung von HER2 durch Auswertung und Vergleich von 35 Studien mit insgesamt 9063 Patienten. In 22 davon stellte sich die HER2-Rezeptorexpression als prädiktiver Marker für die Wirksamkeit der Therapie mit Trastuzumab heraus, in 13 jedoch nicht. Durch die große Streubreite der verschiedenen Studien bleiben die eigentliche Prävalenz und der Vorhersagewert bis heute unklar. Das ist problematisch, da nur Patienten für die Anti-HER2-Antikörpertherapie geeignet sind, bei denen HER2 exprimiert oder das *HER2*-Gen amplifiziert ist (Deng et al., 2012). Trastuzumab als Vertreter dieser Gruppe ist ein humanisierter Antikörper, bindet an die extrazelluläre Domäne des HER2-Rezeptors und blockiert diesen und dessen *downstream*-Kaskaden (z.B. Ras/MEK/ERK; PI3K/Akt). Dieses Medikament wird schon seit längerer Zeit erfolgreich in der Therapie des HER2-Rezeptor-positiven Mammakarzinoms eingesetzt. Es verbessert dabei das Überleben sowohl bei nicht-metastasierten Primärtumoren als auch beim Vorhandensein von Metastasen. Sowohl Trastuzumab, als auch Lapatinib (dualer HER2/EGFR-Inhibitor) zeigten die besten Überlebensraten, wenn entweder die HER2-Expression mittels Immunhistochemie oder die *HER2*-Genamplifikation mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) festgestellt wurde. Für den klinischen Alltag wird die Immunhistochemie als initiale Testmethode empfohlen (Gravalos & Jimeno, 2008).

Nach dem Vorbild dieser neuen Therapiestrategie des Mammakarzinoms wurde versucht diese *targeted therapy* auf das Magenkarzinom auszuweiten (Gravalos & Jimeno, 2008; Bang et al.,

2012). Es gab viele Gemeinsamkeiten bezüglich des HER2-Status im Magen- und im Mammakarzinom. Ein entscheidender Unterschied lag jedoch darin, dass beim Magenkarzinom deutlich häufiger intratumorale Heterogenität von *HER2* vorlag als beim Mammakarzinom (Tajiri et al., 2014; Andersson et al., 2004). Tajiri et al. (2014) haben 475 Patienten mit bestehendem Magenkarzinom immunhistochemisch untersucht. 60 von ihnen wiesen eine Überexpression des HER2-Proteins auf. Diese wurden anschließend mittels FISH untersucht, wobei das *HER2*-Gen bei 51 Patienten amplifiziert war. Der unterschiedliche Anteil positiver Tumorzellen schwankte im selben Tumor zwischen 10 bis fast 100%. Von diesen 51 Patienten lag bei 21 intratumorale Heterogenität vor (41%). In der vorliegenden Studie wurde HER2 nicht explizit untersucht, sondern drei Protoonkogene der EGFR-Signalkaskade. Das macht einen direkten Vergleich nicht möglich. Tatsächlich aber sah man, dass die Heterogenität auch hier eine entscheidenden Rolle spielte. Bei fast allen (drei von vier) Patienten mit *PIK3CA*-Mutationen lag intratumorale Heterogenität vor. An *KRAS*-Mutationen betraf es die Hälfte (zwei von vier Patienten). Die intertumorale Heterogenität war noch häufiger anzutreffen. In allen vier Fällen war *PIK3CA* heterogen mutiert zur Metastase. Das betrifft 5,6% am Gesamtkollektiv von 72 Patienten. Obwohl Mutationen in der vorliegenden Arbeit verhältnismäßig selten waren, konnte die Bedeutung der Mutationsheterogenität bereits sichtbar werden. Es lässt sich vermuten, dass ebenso Heterogenitäten im EGF-Rezeptor häufiger vorkommen, was Yoshida et al. (2014) bestätigten. Sie untersuchten die intratumorale Heterogenität von HER2-Überexpression bzw. Amplifikation bei 207 Patienten mit bestehendem invasivem intestinalem Magenkarzinom im chirurgischen Resektat und wenn vorhanden (bei 158 Patienten) zusätzlich im präoperativen Biopsiematerial. HER2-Proteinexpression in der immunhistochemischen Untersuchung fand sich jeweils in 17%. Diese positiv getesteten Gewebeproben wurden zusätzlich einer FISH unterzogen, wobei sich in 31% *HER2*-Genamplifikation in den Resektaten und 32% in den Biopsieproben fanden. Die Überprüfung aller Proben der *HER2*-Genamplifikation mittels FISH ergab eine Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen chirurgischen Resektaten und Biopsieproben von 72,7%. Als wahrscheinliche Ursache nahm diese Arbeitsgruppe ebenso die intratumorale Heterogenität als Ursache an. Bezüglich der Wirksamkeit von Trastuzumab brachte die ToGA-Studie im Jahre 2010 sehr positive Ergebnisse hervor. In dieser multizentrischen klinischen Studie wurde die konventionelle Chemotherapie beim fortgeschrittenen Magenkarzinom, bestehend aus Capecitabine und Cisplatin oder 5-Fluorouracil mit Cisplatin, als *first-line* Therapie mit und ohne Zugabe von Trastuzumab untersucht. Insgesamt waren 594 Patienten in 122 Zentren eingeschlossen, bei denen eine HER2-Überexpression bestand. Das mediane OS konnte durch Trastuzumab von 11,1 auf 13,8 Monate gesteigert werden. Die *response rate* betrug 22,1%. Trastuzumab wurde gut toleriert. Eine

Addierung von Nebenwirkungen wurde nicht beobachtet (Bang et al., 2010). Vor allem die ToGA-Studie trug maßgeblich dazu bei, dass Trastuzumab von der *European Medicines Agency* (EMA) 2010 als erster monoklonaler Antikörper als *first-line* Therapie (in Kombination mit Capecitabine oder 5-Fluorouracil und Cisplatin) für das fortgeschrittene Magenkarzinom zugelassen wurde (Kulig et al., 2012). Prätherapeutisch war es wegen möglicher intratumoraler Heterogenität nötig, acht bis zehn Probenbiopsien auf die Expression von HER2 zu untersuchen. Dasselbe wird aktuell für die Standardtherapie des Magenkarzinoms diskutiert (Bang et al., 2012).

Ein weiterer Anti-HER2-Antikörper ist Pertuzumab. Er bindet ebenso an HER2, aber an einem anderen Epitop als Trastuzumab. Dadurch blockiert er die Heterodimerisierung des Rezeptors mit anderen Mitgliedern der HER-Familie. Beim Mammakarzinom hat Pertuzumab bereits gute Ergebnisse gezeigt und ist für die Therapie zugelassen. Für das Magenkarzinom werden derzeit klinische Studien durchgeführt (Qiu & Xu, 2013; Bang et al., 2012).

Als neues mögliches Medikament wird Lapatinib diskutiert. Es ist als dualer Tyrosinkinaseinhibitor in der Lage, HER2 und EGFR bei bestehender Überexpression zu inhibieren. Derzeit wird dessen Wirkung in Kombination mit Chemotherapeutika beim fortgeschrittenen Magenkarzinom untersucht (z.B. LoGIC-trial, TYTAN-Studie) (Qiu & Xu, 2013; Bang et al., 2012).

4.4.2 Anti-EGFR-Antikörper

Weitere Medikamente, die direkt auf die EGFR-Signalkaskade einwirken, sind die Anti-EGFR-Antikörper. Als wichtige Substanzen sind Cetuximab und Panitumumab zu nennen (Lee & Ou, 2013) (s. Kap. 1.9). Da ihre Zielstruktur die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors darstellt, ist es für die Wirkung von Vorteil, wenn dieser vermehrt exprimiert ist (z.B. durch EGFR-Überexpression, -Amplifikation). Doch leider ist bei diesen Patienten gleichzeitig die Ansprechrate auf konventionelle Chemotherapeutika schlechter und die Prognose ungünstiger (Rivera et al., 2008). Salomon et al. (1995) haben ein Kollektiv von 130 Patienten mit Adenokarzinomen des Magens untersucht. EGFR-Überexpression trat in 33% auf, v.a. im fortgeschrittenen Tumorstadium und beim intestinalen Typ nach Laurén (Salomon et al., 1995).

Für die Behandlung von metastasierten kolorektalen Karzinomen mit *KRAS*-Wildtyp und Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich besteht derzeit schon eine Behandlungszulassung als Kombinationstherapie (z.B. Chemotherapie beim kolorektalen Karzinom, Radiotherapie bei Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches) (Rivera et al., 2008; Adams & Weiner,

2005). In Testreihen des Magenkarzinoms, welche die Wirkung von Cetuximab auf Zelllinien untersuchten, zeigte sich auch eine gute Ansprechrate. Cetuximab wurde an fünf Zelllinien untersucht. Davon war die Wirksamkeit auf zwei Zelllinien positiv. In diesen wurde eine starke EGFR-Expression gefunden. Zelllinien mit vorhandener *KRAS*-Mutation waren auf Cetuximab resistent (Heindl et al., 2012). Pinto et al. (2009) haben in der DOCETUX-Studie untersucht, inwieweit es möglich ist, Cetuximab als *first-line* Therapie beim fortgeschrittenen Magenkarzinom bzw. Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs in Kombination mit den Standardchemotherapeutika Docetaxel und Cisplatin einzusetzen. Schließlich wird das Magenkarzinom in vielen Fällen erst im UICC Stadium 3 oder 4 entdeckt. In diesen fortgeschrittenen Tumorstadien ist eine kurative Therapie meist nicht mehr durchführbar. Ergebnis der DOCETUX-Studie war eine deutlich gesteigerte ORR (*overall response rate*) durch additive Cetuximabgabe im Vergleich zu alleiniger Gabe von Cisplatin und Docetaxel. Auch sah man keine gesteigerte Rate an Nebenwirkungen. Trotzdem blieben die TTP (*time to progression*) und OS (*overall survival*) unbeeinflusst. Das bedeutet, dass Cetuximab bisher für die Routinetherapie des Magenkarzinoms nur wenig relevant ist. Andererseits haben Kim et al., die 2011 die Cetuximab-Anwendung bei 44 bislang unbehandelten Patienten in Kombination mit Capecitabine und Oxaliplatin untersuchten, positive Ergebnisse erzielt. Sie berichteten von einem *progression-free-survival* (PFS) von 6,5 Monaten unter Verwendung von Cetuximab (5,8 Monate bei Chemotherapie allein). Auch die Kombination von Cetuximab mit anderen Chemotherapieschemata wurde untersucht (FOLFIRI, FUFOX, FOLFOX). Die *response rate* (RR) schwankte zwischen 44-65%, *time to progression* (TTP) 5,5-8 Monate und *overall survival* (OS) 9,5-16 Monate. Im Gegenteil zu den oben genannten Ergebnissen hat die derzeit größte Studie (EXPAND-Studie), die den Therapieerfolg von Cetuximab auf das Magenkarzinom untersuchte, keine positiven Effekte gezeigt. Darin wurden 904 Patienten aus 24 Ländern mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Magenkarzinom eingeschlossen. Diese erhielten Chemotherapie (Capecitabine, Cisplatin) mit oder ohne Cetuximab. Überraschenderweise lag das PFS in der Gruppe mit Cetuximab nur bei 4,4 Monaten, verglichen zu 5,6 Monaten bei der Gruppe mit alleiniger Chemotherapie. Es gab unter Verwendung von Cetuximab mehr Nebenwirkungen (54% zu 44%) (Lordick et al., 2013).

Ein weiterer Anti-EGFR-Antikörper, der derzeit eingehend für den therapeutischen Einsatz beim Magenkarzinom untersucht wird, ist Panitumumab (s. Kap. 1.9). In einer großen klinischen Erprobung, der REAL3-Studie, waren die Ergebnisse ebenso ernüchternd wie die der EXPAND-Studie bezüglich Cetuximab. Für die REAL3-Studie wurden 553 Magenkarzinompatienten in 63 Zentren Großbritanniens eingeschlossen. Es wurde das OS bezüglich der alleinigen Verabreichung des EOC-Chemotherapieschemas (Epirubicin, Capecitabine, Oxalipla-

tin) und des EOC-Schemas mit Ergänzung von Panitumumab verglichen. Es hat sich herausgestellt, dass das OS bei dem mit Panitumumab behandelten Kollektiv deutlich schlechter war (8,8 Monate verglichen mit 11,3 Monaten). Zusätzlich bemerkte man häufiger Nebenwirkungen wie Diarrhoe und Hauttoxizität. Aus diesen Gründen wurde Panitumumab derzeit für die routinemäßige Behandlung des Magenkarzinoms nicht empfohlen (Waddell et al., 2013).

Aktuell wird diskutiert, ob die Kombination mehrerer Anti-EGFR-Antikörper zu einer verbesserten Wirkung von Cetuximab und Panitumumab auf das Magenkarzinom führt. Ein solches Vorgehen birgt jedoch die Gefahr, dass sich auch die Nebenwirkungen addieren (Hynes & Lane, 2005). Trotzdem sind Vogelstein et al. (2013) der Meinung, dass sich eine Kombination durchaus lohnen würde, da wie bereits in Kap. 4.2 erwähnt, sich der Mutationsstatus des Magenkarzinoms im Laufe der Erkrankung verändern kann. Gerade *KRAS*- und *PIK3CA*-Mutationen sind Mutationen, die eine klonale Expansion auslösen können, was zu einer höheren Rate an Heterogenität führen kann. Da monoklonale Antikörper derzeit oft erst als *second-* oder *third-line* Medikamente eingesetzt werden ist die Wahrscheinlichkeit der genetischen Heterogenität von Mutationen nochmals größer. Zudem könnte es in diesem Fall bereits zu einer intermetastatischen Heterogenität gekommen sein.

4.4.3 Tyrosin-Kinase-Inhibitoren

Eine weitere mögliche neue Substanzklasse, die für die Therapie des Magenkarzinoms diskutiert wird, sind die *small molecules* (s. Kap. 1.9).

Derzeit wird die Wirkung von Erlotinib auf Magenkarzinomzellen untersucht. Bei 70 histologischen Proben haben Rojo et al. (2006) die Wirkung von Erlotinib untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Medikament tatsächlich die EGFR-Expression reduziert. Zusätzlich fand sich eine verminderte Expression von Akt und es trat vermehrt Apoptose auf.

In klinischen Studien aber hat sich Erlotinib bislang als unwirksam bei der Behandlung des Magenkarzinoms herausgestellt. Dragovich et al. (2006) haben im Rahmen einer Studie Erlotinib bei 25 Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Magenkarzinom angewendet. Ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen für Karzinome des gastroösophagealen Übergangs derselben Studie, die zumindest eine Ansprechrate von 9% aufweisen konnten, war für die Magenkarzinome überhaupt kein Ansprechen der Therapie erkennbar.

4.4.4 PI3K-Inhibitoren

Über PI3K-Inhibitoren ist bislang weniger bezüglich der Anwendung auf das Magenkarzinom bekannt. Sie könnten aber eine wichtige Therapieoption für Patienten mit *PIK3CA*-Mutation sein, bei denen beispielsweise Tyrosinkinaseinhibitoren unwirksam sind (Mueller et al., 2012). Als potenzielle Therapeutika werden sie derzeit in Zelllinien des Magenkarzinoms untersucht. Mueller et al. (2012) verwendeten dazu die PI3K-Inhibitoren BEZ235 und BKM120. Beide Medikamente gehören zur Gruppe der Imidazoquinolone. Sie inhibieren die katalytische Untereinheit von PI3K. BEZ235 inhibiert zusätzlich die katalytische Aktivität von mTOR. Es resultierte ein gesteigerter proapoptotischer Effekt. Zellen mit *PIK3CA*-Mutationen waren sensibel auf beide Medikamente. Jedoch fielen die Effekte geringer aus, als bei Zelllinien des kolorektalen Karzinoms. Aktuell finden klinische Studien für diese Substanzklasse auch für das Magenkarzinom statt (Mueller et al., 2012).

4.5 Prädiktive/prognostische Faktoren des Magenkarzinoms

Das Magenkarzinom ist sowohl biologisch, als auch genetisch eine sehr heterogene Erkrankung. Es existieren im Rahmen der Karzinogenese eine Vielzahl von Alterationen. Um die Therapie des Magenkarzinoms zu verbessern, ist es daher dringend notwendig, prädiktive und prognostische Therapiemarker zu etablieren. Der bislang einzige Therapiemarker, der im klinischen Alltag angewendet wird, ist die HER2-Expression/-Amplifikation für die Behandlung mit Trastuzumab (Pietrantonio et al., 2013).

4.5.1 TNM-Stadium

Das TNM-Stadium ist ein sehr wichtiger Faktor, der maßgeblich die Prognose der Magenkarzinompatienten bestimmt. Gravalos & Jimeno (2008) stellten fest, dass diese Stadieneinteilung der bedeutendste aller Prognosefaktoren ist. Besonders ungünstig waren Fernmetastasen (Leber und Peritoneum). Duraes et al. (2014) räumten ein, dass das TNM-Stadium als alleiniger Prognosefaktor ungenügend ist, da es trotzdem Unterschiede zwischen den Patienten mit denselben TNM-Stadien bezüglich Prognose und auch Lymphknotenmetastasierung gab. Einige Autoren erwähnten, dass ein im proximalen Drittel lokalisiertes Adenokarzinom prognostisch ungünstiger ist (Dicken et al., 2005). Siewert et al. (1998) explorierten den Lymphknoten-

status als herausragenden Prognosefaktor. In einer Studie von 1998 konnten sie zeigen, dass sich durch eine R0-Lymphknotenresektion die 10-Jahres-Überlebensrate von 26,3% auf 36,1% steigerte. Fast ebenso wichtig war der Residualtumorstatus. Erst danach war das T-Stadium für die Prognose relevant. Das *grading* korrelierte mit der Aggressivität der Neoplasie. Die prognostische Relevanz blieb aufgrund unterschiedlicher Ergebnisse bislang unklar. Die Größe des Primärtumors (in seiner größten Ausdehnung) war assoziiert mit dem Risiko für Lymphknotenmetastasierung und damit auch entscheidend für das Überleben. Lymph- und Blutgefäßinvasion waren unabhängige Prognosefaktoren bezüglich des Überlebens. Die Lymphknotenmetastasierung war mit dem Überleben und dem Entstehen von Rezidiven assoziiert. Bislang konnte nicht nachgewiesen werden, dass Alter oder Geschlecht prädiktive Variablen für das Überleben sind (Dicken et al., 2005).

4.5.2 EGFR

EGFR-Überexpression bzw. -genamplifikation wurden beim Magenkarzinom häufiger beobachtet. Traten sie auf, war die Sensitivität gegenüber Medikamenten, deren Angriffspunkt der EGF-Rezeptor ist (Anti-EGFR-Antikörper, *small molecules*) verbessert (Kim et al., 2008). Die Häufigkeiten der EGFR-Überexpression unterschieden sich je nach Studien sehr stark. Sie reichten von 7,7% (Kiyose et al., 2012) über 27,4% (Kim et al., 2008) bis zu 44% (Wong & Yao, 2013). Kim et al. (2008) beschrieben eine Assoziation dieser Überexpression mit fortgeschrittenem Lebensalter, schlechter Differenzierung und einem fortgeschrittenen Stadium. Eine *EGFR*-Genamplifikation fanden sie in 2,3% (Kim et al., 2008).

Gao et al. (2013) beschrieben, dass von 78 Patienten 57% auf eine *EGFR*-Genexpression positiv mittels Immunhistochemie getestet wurden. Ebenso wie bei Kim et al. (2008) korrelierte der Level von EGFR-Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einem geringeren Differenzierungsgrad. Zusätzlich korrelierte er außerdem mit der Größe des Primärtumors (>5cm) und dem TNM-Stadium. Bei Patienten, die EGFR übermäßig exprimierten betrug die 5-Jahres-Überlebensrate 6%. Bei Patienten mit einem normalen Level an Expression von EGFR lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei 36% (Gao et al., 2013). Eine Metaanalyse von Chen et al. (2013) ergab ebenso, dass ein erhöhter Level von EGFR-Expression mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einherging. Eingeschlossen wurden 7 Studien, die EGFR-Expression betrachteten. In diesen gab es kein Anhalt für Heterogenität. Aus diesem

Grund schlug diese Arbeitsgruppe vor, die Expression bzw. Amplifikation von EGFR als unabhängigen Prognosefaktor zu verwenden (Chen et al., 2013).

4.5.3 PTEN

Der Negativregulator der EGFR-Signalkaskade PTEN (s. Kap. 1.5) wird derzeit auch auf seine Rolle als prädiktiver Biomarker untersucht. Als Tumorsuppressorgen agiert PTEN als Phospholipidphosphatase und desphosphoryliert PIP₃, dadurch kann Akt nicht aktiviert werden und das Zellwachstum wird gehemmt (Byun et al., 2003). Die Expression von PTEN korreliert im Magenkarzinom invers zu Tumorgröße, TNM-Stadium, Lymphknoten- und Gefäßinvasion (Yang et al., 2012). Inaktivierende Mutationen oder Deletionen von *PTEN* können im Magenkarzinom auftreten. Es ist bekannt, dass durch die verminderte Expression von PTEN aggressivere Phänotypen des Karzinoms entstehen (Mina et al., 2012). Bezüglich des Mammakarzinoms hat man festgestellt, dass bei Karzinomen mit inaktiviertem PTEN, beispielsweise durch Deletion, die Therapie mit Trastuzumab fehlschlug. Daher stellte sich die Frage, ob die Selektion von Trägern dieser Veränderungen das Ansprechen von Trastuzumab auch beim Magenkarzinom verbessern könnte. Mina et al. (2012) haben Gewebeproben von 180 Patienten mit Magenkarzinom auf *PTEN*-Deletionen untersucht. Die Häufigkeiten waren relativ niedrig (4,4%). Jedoch korrelierte das Auftreten signifikant mit dem Vorhandensein von Lymphknoten- und Fernmetastasen. Aufgrund der geringen Fallzahl ist trotz allem die klinische Relevanz von *PTEN*-Mutationen noch nicht endgültig geklärt.

4.5.4 Mutationen in Protoonkogenen der EGFR-Signalkaskade

Wie bereits oben erwähnt, können Mutationen in Protoonkogenen im Bereich der EGFR-Signalkaskade zum einen die Prognose der Patienten als auch die Wirkung der Chemo- und *targeted therapy* beeinflussen. Prognostisch ungünstig waren *KRAS*-Mutationen, besonders wenn sie in Karzinomen des proximalen Magens auftraten. Bislang war es noch nicht möglich, *KRAS* direkt als Zielstruktur für Medikamente zu verwenden. Man beobachtete aber *response rates* <3% für die Verwendung von Anti-EGFR-Antikörpern bei bestehender *KRAS*-Mutation (Raponi et al., 2008). Im Gegensatz zum kolorektalen Karzinom wurde beim Magenkarzinom noch nicht endgültig geklärt, ob *KRAS* als prädiktiver Marker tauglich ist, da das Auftreten in den bisherigen Studien sehr selten war (Duraes et al., 2014). Warnecke et al. (2013) beschrie-

ben die 3,6% *KRAS*-Mutationen in einer Untersuchung mit 475 Patienten als prognostisch ungünstig. Die mittlere Überlebensdauer von den Patienten mit *KRAS*-Mutation betrug nur 3,5 Monate, während Patienten mit *KRAS*-Wildtypstatus im Mittel 12,7 Monate überlebten.

BRAF-Mutationen können beim Magenkarzinom aufgrund ihres seltenen Auftretens nicht als prognostischer Marker verwendet werden (Corso et al., 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie (0% *BRAF*-Mutationen) stimmen mit den Berichten in der Literatur überein.

Es konnte bislang nicht nachgewiesen werden, dass Mutationen von *PIK3CA* tatsächlich als prognostischer Marker dienen könnten. Es ist jedoch ratsam, den *PIK3CA*-Mutationsstatus vor einer eventuellen Therapie mit PI3K-Hemmern zu bestimmen (Mueller et al., 2012). Shi et al. (2012) haben aufgedeckt, dass *PIK3CA*-Amplifikationen scheinbar deutlich häufiger sind als Mutationen. Bei 131 Patienten mit Magenkarzinom haben sie nur 7,1% Mutationen, aber 67% Amplifikationen gefunden. In repräsentativen amplifizierten Proben wurde jeweils ein erhöhter Level von Akt festgestellt. Diese Patienten hatten eine signifikant kürzere durchschnittliche Überlebensdauer (516 Monate bei *PIK3CA*-Amplifikation, 758 Monate ohne). Weitere Studien existieren derzeit noch nicht. Es lässt sich jedoch vermuten, dass *PIK3CA*-Amplifikationen als prognostischer Marker verwendet werden können.

4.5.5 Fazit

Mutationen in Protoonkogenen der EGFR-Signalkaskade beeinflussen die Wirkung von EGFR-spezifischen Antikörpern auf Karzinome negativ. Jedoch sind solche Mutationen beim Magenkarzinom im Vergleich zu anderen Karzinomen eher selten. In der vorliegenden Studie wurden vier *KRAS*-Mutationen im Hotspot von Exon 2 identifiziert (5,6% des Gesamtkollektivs). Dieses Ergebnis ist mit der bereits vorhandenen Literatur zu vereinbaren. Unterschiedliche Studien gaben die Prävalenz von *KRAS*-Mutationen mit Werten von 0-18% an. Weiterhin schienen *BRAF*-Mutationen eine untergeordnete Rolle beim Magenkarzinom zu spielen. In verschiedenen Studien wurden keine *BRAF*-Mutationen aufgedeckt, ebenso wie in dieser Studie. Von den beschriebenen Hotspot-Regionen Exon 9 und 20 von *PIK3CA* wurden in der vorliegenden Studie keine Mutationen in Exon 9 und vier Mutationen (5,6%) in Exon 20 aufgedeckt. Die Tatsache, dass die Prävalenz von *PIK3CA*-Mutationen beim Magenkarzinom eher niedrig war, lässt sich gut mit den Daten anderer Autoren vereinbaren. Traten Mutationen auf, betrafen sie häufiger Exon 20 als Exon 9. Diese Studie war die erste, die explizit die Heterogenität von Mutationen von *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* im Magenkarzinom bezüglich der unterschiedlichen Lokalisationen (Primärtumor, Lymphknoten-, Fernmetastase) unter-

suchte. Ebenso wurde zum ersten Mal die intratumorale Heterogenität von Mutationen mit in Betracht gezogen, indem Tumorzentrum und -invasionsfront getrennt voneinander bearbeitet wurden. Für *KRAS* fand sich keine intratumorale Heterogenität. Bei *PIK3CA* Exon 20 betrug sie 75% der aufgedeckten Mutationen (4,2% des Gesamtkollektivs). Intertumorale Heterogenität zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase bestand bei *KRAS* zu 50% der Mutationen (2% aller Patienten) und bei *PIK3CA* zu 100% (5,6% des Gesamtkollektivs). In dem jeweils einzigen Fall für *KRAS* und *PIK3CA*, bei dem eine Fernmetastase vorhanden war, waren Primärtumor und Fernmetastase zueinander heterogen. Der Vergleich mit anderen Tumorarten legt nahe, dass sowohl intra- als auch intertumorale Heterogenität von Mutationen zur Resistenz der *targeted therapy* beiträgt. Trotz der niedrigen Prävalenz an Mutationen von *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* konnten in der vorliegenden Studie Heterogenitäten aufgedeckt werden. Aus diesem Grund sollte neben den bereits existierenden prädiktiven und prognostischen Faktoren die Heterogenität von Mutationen der EGFR-Signalkaskade weitergehend untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Das Magenkarzinom ist derzeit der vierthäufigste Tumor weltweit und mit einer hohen Letalität verbunden, was nicht zuletzt an der späten Diagnosestellung im fortgeschrittenen Tumorstadium liegt. Beim intestinalen Typ des Magenkarzinoms nach Laurén verläuft die Karzinogenese häufig über den *Correa-Pathway*. Der EGFR-Signalkaskade kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Rolle zu. Sie bewirkt eine Proliferation sowohl von gesunden als auch von transformierten Zellen. Entstehen aktivierende Mutationen in an ihr beteiligten Genen, können diese sich von der Signalkaskade entkoppeln. Dadurch entfällt inhibitorisches *feedback* und Tumorzellen können ungehindert wachsen. In der vorliegenden Arbeit wurden Hotspot-Mutationen folgender Protoonkogene untersucht: *KRAS* Exon 2, *BRAF* Exon 15 und *PIK3CA* Exon 9 und 20. Da die EGFR-Signalkaskade an der Karzinogenese vieler Tumorentitäten beteiligt ist, versuchten verschiedene Forschungsgruppen mit Hilfe molekularer Antikörper zielgerichtet den EGF-Rezeptor zu blockieren, um Tumorstadium zu unterdrücken. Zu nennen sind Medikamente wie Cetuximab und Panitumumab, die z.B. beim kolorektalen Karzinom bereits im klinischen Alltag verwendet werden. Trotzdem lag die Ansprechrate der *targeted therapy* nur bei ca. 10-20%. Eine mögliche Ursache könnten aktivierende Mutationen von Protoonkogenen der EGFR-Signalkaskade sein. Wenn man diese vor Beginn einer EGFR-Antikörpertherapie durch Mutationsanalysen herausfiltert, könnte man eine individuelle Tumorthherapie gewährleisten, wobei aufwendige und kostspielige Medikamente wie Cetuximab nur Patienten zukämen, die wirklich von ihnen profitieren. Die Prävalenzen von Mutationen in Protoonkogenen der EGFR-Kaskade wurden beim Magenkarzinom bisher schlecht untersucht. Ein wichtiger Faktor, der den Erfolg der Antikörpertherapie einschränkt, kann die Heterogenität von Mutationen von Primärtumor und Metastasen sein. In der vorliegenden Arbeit wurden 72 Patienten untersucht, bei denen jeweils Tumorzentrum und Invasionsfront getrennt voneinander betrachtet wurden. Weiterhin existierten bei 50 Patienten Lymphknotenmetastasen und bei drei Patienten zusätzlich Fernmetastasen. Es fanden sich insgesamt vier *KRAS*-Mutationen in Exon 2 (5,6% des Gesamtkollektivs), in drei Fällen die Mutation G12D, einmal G12V. Es ließ sich nach statistischer Berechnung keine Korrelation zwischen Auftreten von Mutationen und histopathologischen Parametern feststellen. In keinem Fall herrschte intratumorale Heterogenität zwischen Tumorzentrum und -invasionsfront (0%). Bezogen auf das Gesamtkollektiv lag zu 2% intertumorale Heterogenität zwischen *KRAS*-Mutationen in Primärtumor und Lymphknotenmetastase vor. Das entspricht bei zwei betroffenen Lymphknotenmetastasen 50% der Patienten mit Mutationen. Außerdem bestand zu 33,3% intertu-

morale Heterogenität zwischen Primärtumor und Fernmetastase, bei insgesamt drei Metastasen im Gesamtkollektiv. Es konnten keine Mutationen in den Hotspots von *BRAF* Exon 15 und *PIK3CA* Exon 9 exploriert werden. *PIK3CA* Exon 20 war in unserem Kollektiv bei vier Patienten mutiert (5,6% des Gesamtkollektivs). In allen Fällen handelt es sich um die Mutation H1047R. Intratumorale Heterogenität im Primärtumor gab es in 4,2% bezogen auf alle Patienten (Wildtyp im Tumorzentrum und Mutation an der Invasionsfront 2,8%; Mutation im Tumorzentrum und Wildtyp an der Invasionsfront 1,4%). Betrachtet man die vier Mutationen einzeln lag intratumorale Heterogenität zu 75% vor. Intertumorale Heterogenität zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase existierte in 8% im Gesamtkollektiv aller 72 Patienten, dementsprechend 100% aller Lymphknotenmetastasen bei vorliegender *PIK3CA*-Mutation. Bezüglich Primärtumor und Fernmetastase herrschte in 33,3% des Gesamtkollektivs intertumorale Heterogenität und 100% bei Fernmetastasen mit *PIK3CA*-Mutation. Das seltene Auftreten von *KRAS*-, *BRAF*- und *PIK3CA*-Mutationen lässt vermuten, dass diese beim Magenkarzinom primär nicht die Ursache für die Resistenz gegenüber der Therapie mit EGFR-spezifischen Antikörpern darstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. **Adams, G. P.; Weiner, L. M. (2005):** Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 23: 1147-1157.
2. Alexandrov, L. B.; Nik-Zainal, S.; Wedge, D. C.; Aparicio, S. A.; Behjati, S.; Biankin, A.V.; Bignell, G. R.; Bolli, N.; Borg, A.; Borresen-Dale, A. L.; Boyault, S.; Burkhardt, B.; Butler, A. P.; Caldas, C.; Davies, H. R.; Desmedt, C.; Eils, R.; Eyfjörd, J. E.; Foekens, J. A.; Greaves, M.; Hosoda, F.; Hutter, B.; Ilicic, T.; Imbeaud, S.; Imielinski, M.; Jäger, N.; Jones, D. T.; Jones, D.; Knappskog, S.; Kool, M.; Lakhani, S. R.; López-Otín, C.; Martin, S.; Munshi, N. C.; Nakamura, H.; Northcott, P. A.; Pajic, M.; Papamannuil, E.; Paradiso, A.; Pearson, J. V.; Puente X. S.; Raine, K.; Ramakrishna, M.; Richardson, A. L.; Richter, J.; Rosenstiel, P.; Schlesner, M.; Schumacher, T. N.; Span, P. N.; Teague, J. W.; Totoki, Y.; Tutt, A. N.; Valdés-Mas, R.; van Buuren, M. M.; van 't Veer, L.; Vincent-Salomon, A.; Waddell, N.; Yates, L. R.; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative; ICGC Breast Cancer Consortium; ICGC MMM-L-Seq Consortium, ICGC PedBrain Zucman-Rossi J.; Futreal, P. A.; McDermott, U.; Lichter, P.; Meyerson, M.; Grimmond, S. M.; Siebert, R.; Campo, E.; Shibata, T.; Pfister, S. M.; Campbell, P. J.; Stratton, M. R. **(2013):** Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500: 415-421.
3. Allegra, C. J.; Jessup, J. M.; Somerfield, M. R.; Hamilton S. R.; Hammoud, E. H.; Hayes, D. F.; McAllister, P. K.; Morton, R. F.; Schilsky, R. L. **(2009):** American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion. testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*, 27: 2091-2096.
4. Alsdorf, W. H.; Clauditz, T. S.; Hoening, T.; Quaas, A.; Sirma, H.; Koenig, A. M.; Izbicki, J.; Sauter, G.; Marx, A. H.; Grob, T. **(2013):** Intratumoral heterogeneity of KRAS mutation is rare in non-small-cell lung cancer. *Exp Mol Pathol*, 94: 155-159.
5. Andersson, J.; Linderholm, B.; Bergh, J.; Elmberger, G. **(2004):** HER-2/neu (c-erbB-2) evaluation in primary breast carcinoma by fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry with special focus on intratumor heterogeneity and comparison of invasive and in situ components. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 12: 14-20.

6. Arkenau, H.-T. **(2009)**: Gastric cancer in the era of molecularly targeted agents: current drug development strategies. *J Cancer Res Clin Oncol*; 135: 855-866.
7. **Baldus, S. E.; Schaefer, K.-L.; Engers, R.; Hartleb, D.; Stoecklein, N. H; Gabbert, H. E. (2010)**: Prevalence and Heterogeneity of KRAS, BRAF and PIK3CA Mutations in Primary Colorectal Adenocarcinomas and their Corresponding Metastases. *Clin Cancer Res*; 16: 790-798.
8. Bang, Y.-J.; van Cutsem, E.; Feyereislova, A.; Chung, H. C.; Shen, L.; Sawaki, A.; Lordick, F.; Ohtsu, A.; Omuru, Y.; Satoh, T.; Aprile, G.; Kulikov, E.; Hill, J.; Lehle, M.; Rüschoff, J.; Kang, Y.-K. **(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.
9. Bang, Y.-J. **(2012)**: Advances in the Management of HER2-positive Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer. *J Clin Gastroenterol*; 46: 637-648.
10. Barbi, S.; Cataldo, I.; Manzoni, G.; Bersani, S.; Lamba, S.; Mattuzzi, S.; Bardelli, A.; Scarpa, A. **(2010)**: The analysis of PIK3CA mutations in gastric carcinoma and metanalysis of literature suggest that exon-selectivity is a signature of cancer type. *J Exp Clin Cancer Res*; 29.
11. Betts, G.; Valentine, H.; Pritchard, S.; Swindell, R.; Williams, V.; Morgan, S.; Griffiths, E. A.; Welch, I.; West, C.; Womack, C. **(2014)**: FGFR2, HER2 and cMET in gastric adenocarcinoma. detection, prognostic significance and assessment of downstream pathway activation. *Virchows Arch*; 464: 145-156.
12. Böcker, W.; Denk, H.; Heitz, P. U.; Moch, H. **(2008)**: Pathologie. Unter Mitarbeit von H. Denk, P. U. Heitz und H. Moch. 4. Aufl. München, Jena: Elsevier, Urban&Fischer.
13. Bollag, G., McCormick, F. **(1991)**: Regulators and effectors of ras proteins. *Annu Rev Cell Biol*; 7: 601-632.
14. Brenner, H.; Rothenbacher, D.; Arndt, V. **(2009)**: Epidemiology of Stomach Cancer. *Methods Mol Biol*; 472: 467-477.
15. Burrell, R. A.; McGranahan, N.; Bartek, J.; Swanton, C. **(2013)**: The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. Review. *Nature*, 501: 338-345.

16. Byun, D.-S.; Cho, K.; Ryu, B.-K; Lee, M.-G; Park, J.-I; Chae, K.-S; Kim, H.-J; Chi, S.-G. **(2003)**: Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma. *Int J Cancer*; 104: 318-327.
17. **Cahill, D. P.**; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Lenauer, C. **(1999)**: Genetic instability and darwinian selection in tumors. *Trends Biochem. Sci.*, 24: M57-60.
18. Cairns, J. **(1975)**: Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, 255: 197-200.
19. Carpenter, G.; Cohen, S. **(1990)**: Epidermal growth factor. *J Biol Chem*; 265: 7709-7712.
20. Cervera, P.; Fléjou, J.-F. **(2011)**: Changing Pathology with Changing Drugs: Tumors of the Gastrointestinal Tract. *Pathobiology*; 78: 76-89.
21. Chen, C.; Yang, J.-M; Hu, T.-T; Xu, T.-J; Yan, G.; Hu, S.-L; Wei, W.; Xu, W.-P. **(2013)**: Prognostic Role of Human Epidermal Growth Factor Receptor in Gastric Cancer. A Systematic Review and Meta-analysis. *Archives of Med Res*; 44: 380-389.
22. Ciampi, R., Nikiforov, Y. E. **(2007)**: RET/PTC Rearrangements and BRAF Mutations in Thyroid Tumorigenesis. *Endocrinology*; 148: 936-941.
23. Ciardiello, F.; Tortora, G. **(2008)**: EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*; 358: 1160-1174.
24. Ciardiello, F.; Tortora, G. **(2001)**: A novel approach in the treatment of cancer: Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor. *Clin Cancer Res*; 7: 2958-2970.
25. Citri, A.; Yarden, Y. **(2006)**: EGF-ERBB signalling: towards the system level. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 7: 505-516.
26. Correa, P. **(1992)**: Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep and Multifactorial Process First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Research*; 52: 6735-6740.
27. Corso, G.; H.; Velho, S.; Paredes, J.; Pedrazzani, C.; Martins, D.; Milenzi, F.; Pascale, V.; Vindigni, C.; PinheiroLeite, M.; Marrelli, D.; Sousa, S.; Carneiro, F.; Oliveira, C.; Roviello, F.; Seruca, R. **(2011)**: Oncogenic mutations in gastric cancer with microsatellite instability. *Eur J Cancer*; 47: 443-451.
28. Cunningham, D.; Allum, W. H.; Stenning, S. P.; Thompson, J. N.; van de Velde, C. J.; Nicolson, M.; Scarffe, J. H.; Lofts, F. J.; Falk, S. J.; Iveson, T. J.; Smith, D. B.; Langley,

- R. E.; Verma, M.; Weeden, S.; Chua, Y. J. **(2006)**: Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med*; 355: 11-20.
29. **Davies, H.**; Bignell, G. R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M. J.; Bottomley, W.; Davis, N.; Dicks, E.; Ewing, R.; Floyd, Y.; Gray, K.; Hall, S.; Hawes, R.; Hughes, J.; Kosmidou, V.; Menzies, A.; Mould, C.; Parker, A.; Stevens, C.; Watt, S.; Hooper, S.; Wilson, R.; Jayatilake, H.; Gusterson, B. A.; Cooper, C.; Shipley, J.; Hargrave, D.; Pritchard-Jones, K.; Maitland, N.; Chenevix-Trench, G.; Riggins, G. J.; Bigner, D. D.; Palmieri, G.; Cossu, A.; Flanagan, A.; Nicholson, A.; Ho, J. W. C.; Leung, S. Y.; Yuen, S. T.; Weber, B L.; Seigler, H. F.; Darrow, T. L.; Paterson, H.; Marais, R.; Marshall, C. J.; Wooster, R.; Stratton, M. R.; Futreal, P. A. **(2002)**: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*; 417: 949-954.
30. Decarlo, K.; Emley, A.; Dadzie, O. E.; Mahalingam, M. **(2011)**: Laser capture microdissection: methods and applications. *Methods Mol Biol.*, 755: 1-15.
31. Deng, N.; Goh, L. K; Wang, H.; Das, K.; Tao, J.; Tan, I. B; Zhang, S.; Lee, M.; Wu, J.; Lim K. H.; Lei, Z.; Goh, G.; Lim, Q.-Y; Tan, A. L.-K; Poh, D. Y. S.; Riahi, S.; Bell, S.; Shi, M. M.; Linnartz, R.; Zhu, F.; Yeoh, K. G.; Toh, H. C.; Yong, W. P.; Cheong, H. C.; Rha, S. Y.; Boussioutas, A.; Grabsch, H.; Rozen, S.; Tan, P. **(2012)**: A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut*; 61:673-684.
32. Dicken, B. J.; David, M.; Bigam, L.; Cass, C. **(2005)**: Gastric Adenocarcinoma. Review and Considerations for Future Directions. *Ann Surg*; 241: 27-39.
33. Doi, T.; Muro, K.; Boku, N.; Yamada, Y.; Nishina, T.; Takiuchi, H.; Komatsu, Y.; Hamamoto, Y.; Ohnu, N.; Fujita, Y.; Robson, M.; Ohtsu, A. **(2010)**: Multicenter phase II study of everolimus in patients with previously treated metastatic gastric cancer. *J Clin Oncol.*, 28: 1904-1910.
34. Dragovich, T.; McCoy, S.; Fenoglio-Preiser, C. M.; Wang, J.; Benedetti, J. K.; Baker, A. F.; Hackett, C. B.; Urba, S. G.; Zaner, K. S.; Blanke, C. D.; Abbruzzese, J. L. **(2006)**: Phase II trial of erlotinib in gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: SWOG 0127. *J Clin Oncol*; 24: 4922-4927.

35. Duraes, C.; Almeida, G. M.; Seruca, R.; Oliveira, C.; Carneiro, F. **(2014)**: Biomarkers for gastric cancer: prognostic, predictive or targets of therapy? *Virchows Arch*; 464: 367-378.
36. **Farber, L.**; Efrati, E.; Elkin, H.; Peerless, Y.; Sabo, E.; Ben-Izhak, O.; HersHKovitz, D. **(2011)**: Molecular morphometric analysis shows relative intra-tumoral homogeneity for KRAS mutations in colorectal cancer. *Virchows Arch*; 459: 487-493.
37. Ferlay, J.; Shin, H.-R.; Bray, F.; Forman, D.; Mathers, C.; Maxwell, D. **(2010)**: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*; 127: 2893-2917.
38. Fox, J. G.; Wang, T. C. **(2007)**: Inflammation, atrophy and gastric cancer. *J Clin Invest*; 117: 60-69.
39. Fuchs, C. S.; Tomasek, J.; Yong, C. J.; Dumitru, F.; Passalacqua, R.; Goswami, C.; Safran, H.; dos Santos, L. V.; Aprile, G.; Ferry, D. R.; Melichar, B.; Tehfe, M.; Topuzov, E.; Zalcberg, J. R.; Chau, I.; Campbell, W.; Sivanandan, C.; Pikiel, J.; Koshiji, M.; Hsu, Y.; Liepa, A. M.; Gao, L.; Schwartz, J. D.; Tabernero, J. **(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.
40. **Gajalakshmi, C. K.**; Shanta, V. **(1996)**: Lifestyle and Risk of Stomach Cancer: A Hospital-Based Case-Control Study. *Int J Epidemiol*; 25: 1146-1153.
41. Gao, M.; Liang, X.-J.; Zhang, Z.-S.; Ma, W.; Chang, Z.-W.; Zhang, M.-Z. **(2013)**: Relationship between expression of EGFR in gastric cancer tissue and clinicopathological features. *Asian Pac J Trop Med*; 6: 260-264.
42. Giannini, R.; Ugolini, C.; Lupi, C.; Proietti, A.; Elisei, R.; Salvatore, G.; Berti, P.; Materazzi, G.; Miccoli, P.; Santoro, M.; Basolo, F. **(2007)**: The Heterogeneous Distribution of BRAF Mutation Supports the Independent Clonal Origin of Distinct Tumor Foci in Multifocal Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*; 92: 3511-3516.
43. Gordon, D. J.; Resio, B.; Pellman, D. **(2012)**: Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet.*; 13: 189-203.
44. Grabrocka, E.; Pylayeva-Gupta, Y.; Jones, M. J. K.; Lubkov, V.; Yemanaberhan, E.; Taylor, L.; Jeng, H. H.; Bar-Sagi, D. **(2014)**: Wild-Type H- and N-Ras Promote Mutant

- K-Ras-Driven Tumorigenesis by Modulating the DNA Damage Response. *Cancer Cell*; 25: 243-256.
45. Gravalos, C.; Jimeno, A. (2008): HER2 in gastric cancer. a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol*; 19: 1523-1529.
 46. Greaves, M.; Maley, C.C. (2012): Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481: 306-313.
 47. Gretschel, S.; Astrosini, Ch; Vieth, M.; Jöns, T.; Tomov, T.; Höcker, M.; Schlag, P.-M; Kemmner, W. (2008): Markers of tumor angiogenesis and tumor cells in bone marrow in gastric cancer patients. *Eur J Surg Oncol*; 34: 642-647.
 48. Grieken van, N. C. T.; Aoyama, T.; Chambers, P. A.; Bottomley, D.; Ward, L. C.; Inam, I; Buffart, T. E.; Das, K.; Lim, T.; Pang, B.; Zhang, S. L.; Tan, I. B.; Carvalho, B.; Heideman, D. A. M.; Miyagi, Y.; Kameda, Y.; Arai, T.; Meijer, A.; Tsuburaya, A.; Tan, P.; Yoshikawa, T.; Grabsch, H. I. (2013): KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency in gastric cancer from the East and the West. Results from a large international multicentre study. *Br J Cancer*; 108: 1495-1501.
 49. Grundberg, I.; Kiflemariam, S.; Mignardi, M.; Imgenberg-Kreuz, J.; Edlund, K.; Micke, P.; Sundström, M.; Sjöblom, T.; Botling, J.; Nilsson, M. (2013): In situ mutation detection and visualization of intratumor heterogeneity for cancer research and diagnostics. *Oncotarget*; 4: 2407-2418.
 50. Gu, J. G.; Zheng, L.; Wang, Y.; Zhu, M.; Wang, Q.; Li, X. (2014): Prognostic significance of HER2 expression based on trastuzumab for gastric cancer (ToGA) criteria in gastric cancer. an updated meta-analysis. *Tumor Biol*; 35: 5315-5321.
 51. **Hamashima, C.**; Shibuya, D.; Yamazaki, H.; Inoue, K.; Fukao, A.; Saito, H.; Sobue T. (2008): The Japanese Guidelines for Gastric Cancer Screening. *Jpn J Clin Oncol*; 38: 259-267.
 52. Hamilton S. R.; Aaltonen H. A. (2000): Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. *LARCPress Lyon*: 1-314.
 53. Hartgrink, H. H.; Jansen, E. P.; van Grieken, N. C.; van de Velde, J. C. (2009): Gastric cancer. *Lancet*; 374: 477-490.
 54. Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J.; Williams, P. M. (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6: 986-94.
 55. Heindl, S.; Eggenstein, E.; Keller, S.; Kneissl, J.; Keller, G.; Mutze, K.; Rauser, S.; Gasteiger, G.; Drexler, I.; Hapfelmeier, A.; Höfler, H.; Lubner, B. (2012): Relevance of

- MET activation and genetic alterations of KRAS and E-cadherin for cetuximab sensitivity of gastric cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*; 138: 843-858.
56. Hohenberger, P.; Gretschel, S. **(2003)**: Gastic cancer. *Lancet*; 362: 305-315.
 57. Hu, B.; El Hajj, N.; Sittler, S.; Lammert, N.; Barnes, R.; Meloni-Ehrig, A.. (2012): Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol*; 3: 251-261.
 58. Hynes, N. E.; Lane, H. A. **(2005)**: ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*; 5: 341-351.
 59. **Jang, B. G.; Kim, W. H. (2011)**: Molecular Pathology of Gastric Carcinoma. *Pathobiology*; 78: 302-310.
 60. **Kalinsky, K.; Heguy, A.; Bhanot, U. K.; Patil, S.; Moynahan, M. E. (2011)**: PIK3CA mutations rarely demonstrate genotypic intratumoral heterogeneity and are selected for in breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat*; 129: 635-643.
 61. Kelley, J. R.; Duggan, J. M. **(2003)**: Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol*; 56.
 62. Kim, C.; Lee, J. L.; Ryu, M. H.; Chang, H. M.; Kim, T. W.; Lim, H. Y.; Kang, H. J.; Park, Y. S.; Ryoo, B. Y.; Kang, Y. K. **(2011)**: A prospective phase II study of cetuximab in combination with XELOX (capecitabine and oxaliplatin) in patients with metastatic and/or recurrent advanced gastric cancer. *Invest New Drugs*; 29: 366-373.
 63. Kim, H. K.; Lee, H. Y.; Choi, Y.-I.; Choi, S.-J.; Choi, H.; Lee, J. L.; Han, J.; Ahn, M.-J.; Lee, K. S.; Kim, J. **(2014)**: Assessment of Intratumoral Heterogeneity of Oncogenic Driver Mutations in Surgically-resected Lung Adenocarcinoma. Implications of Percutaneous Biopsy-based Molecular Assay for Target-directed Therapy. *Anticancer Res*; 34: 707-714.
 64. Kim, I.-J.; Park, J.-H.; Kang, H. C. **(2003)**: Mutational analysis of BRAF and K-ras in gastric cancers: absence of BRAF mutations in gastric cancers. *Hum Genet*; 114: 118-120.
 65. Kim, M. A.; Lee, H. S.; Lee, H. E.; Jeon, Y. K.; Yang, H. K.; Kim, W. H. **(2008)**: EGFR in gastric carcinomas. prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathol*; 52: 738-746.
 66. Kiyose, S.; Nagura, K.; Tao, H.; Igarashi, H.; Yamada, H.; Goto, M.; Maeda, M.; Kurabe, N.; Suzuki, M.; Tsuboi, M.; Kahyo, T.; Shinmura, K.; Hattori, N.; Sugimura,

- H. **(2012)**: Detection of kinase amplifications in gastric cancer archives using fluorescence in situ hybridization. *Pathol Int*; 62: 477-484.
67. Kulig, J.; Kolodziejczyk, P.; Kulig, P.; Legutko, J. **(2012)**: Targeted therapy for gastric cancer: current status. *J Oncol Pharm Practice*; 19: 75-81.
68. Lee, J.; van Hummelen, P.; Go, C.; Palescandolo, E.; Jang, J.; Park, H. Y.; Kang, S. Y.; Park, J. O.; Kang, W. K.; MacConaill, L.; Kim, K. M. **(2012)**: High-throughput mutation profiling frequent somatic mutations in advanced gastric adenocarcinoma. *PloS one*; 7.
69. Lee, J.; Ou, S. H. **(2013)**: Towards the Goal of Personalized Medicine in Gastric Cancer. Time to move Beyond HER2 Inhibition. Part II: Targeting Gene Mutations and Gene Amplifications and the Angiogenesis Pathway. *Discov Med*; 16: 7-14.
70. Lee, K. H.; Lee, J. S.; Suh, C.; Kim, S. W.; Kim, S. B.; Lee, J. H.; Lee, M. S.; Park, M. Y.; Sun, H. S.; Kim, S. H. **(1995)**: Clinicopathologic significance of the K-ras gene codon 12 point mutation in stomach cancer. An analysis of 140 cases. *Cancer Cell*; 75: 2794-2801.
71. Lee, S. H.; Lee, J. W.; Soung, Y. H.; Kim, S. H.; Lee, J. Y.; Yoo, N. J. **(2003)**: BRAF and KRAS mutations in stomach cancer. *Oncogene*; 22: 6942-6945.
72. Li, V. S.; Wong, C. W. **(2005)**: Mutations of PIK3CA in gastric adenocarcinoma. *BMC Cancer*; 5
73. Lim, S. M.; Lim, J. Y.; Cho, J. Y. **(2014)**: Targeted therapy in gastric cancer. Personalizing cancer treatment based on patient genome. *World J Gastroenterol*; 20: 2042-2050.
74. Liu, Z. M.; Liu, L. N.; Li, M.; Zhang, Q. P.; Cheng, S. H.; Lu, S. **(2009)**: Mutation detection of KRAS by high-resolution melting analysis in Chinese with gastric cancer. *Oncol Rep*; 22: 515-520.
75. Lordick, F.; Kang, Y. K.; Chung, H. C.; Salman, P.; Oh, S. C.; Bodoky, G.; Kurteva, G.; Volovat, C.; Moiseyenko, V. M.; Gorbunova, V.; Park, J. O.; Sawaki, A.; Celik, I.; Götte, H.; Melezínková, H.; Moehler, M.; Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie and EXPAND Investigators **(2013)**: Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND). a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*; 14: 490-499.

76. **Maesawa, C. (1995):** The sequential accumulation of genetic alterations characteristic of the colorectal adenoma-carcinoma sequence does not occur between gastric adenoma and adenocarcinoma. *J Pathol*; 176: 249-258.
77. Mao, C.; Yang, Z. Y.; Hu, X. F.; Chen, Q.; Tang, J. L. **(2012):** PIK3CA exon 20 mutations as a potential biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*; 23: 1518-1525.
78. Maresch, J.; Schoppmann, S. F.; Thallinger, C. M. R.; Zielinski, C. C.; Henja, M. **(2012):** Her-2/neu gene amplification and over-expression in stomach and esophageal adenocarcinoma: from pathology to treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*; 82: 310-322.
79. McCubrey, J. A.; Steelman, L.S.; Chappell W. H.; Abrams, S. L.; Wong, W. T.; Chang, F.; Lehmann, B.; Terrian, D. M.; Milella, M.; Tafuri, E.; Stivala, F.; Libra, M.; Basecke, J.; Evangelisti, C.; Martelli, A. M.; Franklin, R. A. **(2007):** Roles of Raf/MEK/ERK Pathway in cell growth malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*; 1173: 1263-1284.
80. Mina, S. **(2012):** PTEN deletion is rare but often homogeneous in gastric cancer. *J Clin Pathol*; 65: 693-698.
81. Mita, H.; Toyota, M.; Aoki, F.; Akashi, H.; Maruyama, R.; Sasaki, Y.; Suzuki, H.; Idogawa, M.; Kashima, L.; Yanagihara, K.; Fujita, M.; Hosokawa, M.; Kusano, M.; Sabau, S. V.; Tatsumi, H.; Imai, K.; Shinomura, Y.; Tokino, T. **(2009):** A novel method, digital genome scanning detects KRAS gene amplification in gastric cancers. involvement of overexpressed wild-type KRAS in downstream signaling and cancer cell growth. *BMC Cancer*; 9.
82. Moehler, M.; Al-Batran, S.-E; Andus, T.; Anthuber, M.; Arends, J.; Arnold, D.; Aust, D.; Baier, P.; Baretton, G.; Bernhardt, J.; Boeing, H.; Böhle, E.; Bokemeyer, C.; Bornschein, J.; Budach, W.; Burmester, E.; Caca, K.; Diemer, W. A.; Dietrich, C. F; Ebert, M.; Eickhoff, A.; Ell, C.; Fahlke, J.; Feußner, H.; Fietkau, R.; Fischbach, W.; Fleig, W.; Flentje, M.; Gabbert, H. E.; Galle, P. R.; Geissler, M.; Gockel, I.; Graeven, U.; Grenacher, L.; Groß, S.; Hartmann, J. T.; Heike, M.; Heinemann, V.; Herbst, B.; Herrmann, T.; Höcht, S.; Hofheinz, R. D.; Höfler, H.; Höhler, T.; Hölscher, A. H.; Horneber, M.; Hübner, J.; Izbicki, J. R.; Jakobs, R.; Jenssen, C.; Kanzler, S.; Keller, M.; Kiesslich, R.; Klautke, G.; Körber, J.; Krause, B. J.; Kuhn, C.; Kullmann, F.; Lang, H.; Link, H.;

- Lordick, F.; Ludwig, K.; Lutz, M.; Mahlberg, R.; Malfertheiner, P.; Merkel, S.; Messmann, H.; Meyer, H.-J.; Mönig, S.; Piso, P.; Pistorius, S.; Porschen, R.; Rabenstein, T.; Reichardt, P.; Ridwelski, K.; Röcken, C.; Roetzer, I.; Rohr, P.; Schepp, W.; Schlag, P.-M.; Schmid, R.-M.; Schmidberger, H.; Schmiegel, W.-H.; Schmoll, H.-J.; Schuch, G.; Schuhmacher, C.; Schütte, K.; Schwenk, W.; Selgrad, M.; Sandler, A.; Seraphin, J.; Seufferlein, T.; Stahl, M.; Stein, H.; Stoll, C.; Stuschke, M.; Tannapfel, A.; Tholen, R.; Thuss-Patience, P.; Treml, K.; Vanhoefer, U.; Vieth, M.; Vogelsang, H.; Wagner, D.; Wedding, U.; Weimann, A.; Wilke, H.; Wittekind, C. **(2011)**: S3-Leitlinie "Magenkarzinom". Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophago-gastralen Übergangs. *Z Gastroenterol*; 49: 461-531.
83. Mueller, A. **(2012)**: Selective PI3K inhibition by BKM120 and BEZ 235 alone or in combination with chemotherapy in wild-type and mutated human gastrointestinal cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*; 69: 1601-1615.
84. **Nagini, S. (2012)**: Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol*; 4: 156-169.
85. Nowell, P.C **(1976)**: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194: 23-28.
86. **Ohtsu, A.; Shah, M. A.; van Cutsem, E.; Rha, S. Y.; Sawaki, A.; Park, S. R.; Lim, H. Y.; Yamada, Y.; Wu, J.; Langer, B.; Starnawski, M.; Kang, Y. K. (2011)**: Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer. a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *J Clin Oncol*; 29: 3968-3976.
87. Ohtsu, A.; Ajani, J. A.; Bai, Y. X.; Bang, Y. J.; Chung, H. C.; Pan, H. M.; Sahmoud, T.; Shen, L.; Yeh, K. H.; Chin, K.; Muro, K.; Kim, Y. H.; Ferry, D.; Tebbutt, N. C.; Al-Batran, S. E.; Smith, H.; Costantini, C.; Rizvi, S.; Lebwohl, D.; van Cutsem, E. **(2013)**: Everolimus for previously treated advanced gastric cancer. results of the randomized double-blind, phase III GRANITE-1 study. *J Clin Oncol*; 31: 3935-3943.
88. **Pietrantonio, F. (2013)**: A Review on Biomarkers for Prediction of Treatment Outcome in Gastric Cancer. *Anticancer Res*; 33: 1257-1266.
89. Pinto, C.; Di Fabio, F.; Barone, C.; Siena, S.; Falcone, A.; Cascinu, S.; Rojas Llimpe, F. L.; Stella, G.; Schinzari, G.; Artale, S.; Mutri, V.; Giaquinta, S.; Giannetta, L.; Bardelli, A.; Martoni, A. A. **(2009)**: Phase II study of cetuximab in combination with cisplatin and docetaxel in patients with untreated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (DOCETUX study). *Br J Cancer*; 101: 1261-1268.

90. **Qiu, M. Z.; Xu, R. H. (2013):** The process of targeted therapy in advanced gastric cancer. *Biomark Res*; 1.
91. **Raponi, M.; Winkler, H.; Dracopoli, N. C. (2008):** KRAS mutations predict response to EGFR inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*; 8: 413-418.
92. Rivera, F.; Vega-Villegas, M. E.; López-Brea, M. F. **(2008):** Cetuximab, its clinical use and future perspectives. *Anticancer Drugs*; 19: 99-113.
93. Robert Koch Institut **(2012):** Krebs in Deutschland. Magen. Robert Koch Institut. Online verfügbar unter http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Magenkrebs/magenkrebs_nodehtml, zuletzt geprüft am 26.02.2012.
94. Rojo, F.; Tabernero, J.; Albanell, J.; van Cutsem, E.; Ohtsu, A.; Doi, T.; Koizumi, W.; Shirao, K.; Takiuchi, H.; Ramon y Cajal, S.; Ramon Cajal, S.; Baselga, J. **(2006):** Pharmacodynamic studies of gefitinib in tumor biopsy specimens from patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol*; 24: 4309-4316.
95. Roock de, W.; Piessevaux, H.; Schutter, J.; Janssens, M.; Hertogh, G. de; Personeni, N.; Biesmans, B.; van Laethem, J.-L.; Peeters, M.; Humblet, Y.; van Cutsem, E.; Tejpar, S. **(2007):** KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol*; 19: 508-515.
96. **Salomon, D. S.; Brandt, R.; Ciardiello, F.; Normanno, N. (1995):** Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*; 19: 183-232.
97. Samuels, Y.; Wang, Z. **(2004):** High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*; 304.
98. Shi, J.; Yao, D.; Liu, W.; Wang, N.; Lv, H.; Zhang, G.; Ji, M.; Xu, L.; He, N.; Shi, B.; Hou, P. **(2012):** Highly frequent PIK3CA amplification is associated with poor prognosis in gastric cancer. *BMC Cancer*; 12.
99. Siewert, J. R.; Bottcher, K.; Stein, H. J.; Roder, J. D. **(1998):** Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg*; 228: 449-461.
100. Siewert, J. R.; Sendlner, A.; Lordick, F. **(2006):** Praxis der Viszeralchirurgie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

101. Steelman; L.S.; Chappell, W. H; Abrams, S. L; Kempf, C. R; Long, J.; Laidler, P.; Maksimovic-Ivanic, S.; Stivala, F.; Mazzarino, M. C; Donia, M.; Fagone, P.; Malaponte, G.; Nicoletti, F.; Libra, M.; Milella, M.; Tafuri, A.; Bonati, A.; Bäsecke, J.; Cocco, L.; Evangelisti, C.; Martelli, A. M; Montalto, G.; Cervello, M.; McCubrey, J. A. **(2011)**: Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging*, 3: 192-222.
102. Stephens, P.; Hunter, C.; Bignell, G.; Edkins, S.; Davies, H.; Teague, J.; Stevens, C.; O'Meara, S.; Smith, R.; Parker, A.; Barthorpe, A.; Blow, M.; Brackenbury, L.; Butler, A.; Clarke, O.; Cole, J.; Dicks, E.; Dike, A.; Drozd, A.; Edwards, K.; Forbes, S.; Foster, R.; Gray, K.; Greenman, C.; Halliday, K.; Hills, K.; Kosmidou, V.; Lugg, R.; Menzies, A.; Perry, J.; Petty, R.; Raine, K.; Ratford, L.; Shepherd, R.; Small, A.; Stephens, Y.; Tofts, C.; Varian, J.; West, S.; Widaa, S.; Yates, A.; Brasseur, F.; Cooper, C. S.; Flanagan, A. M.; Knowles, M.; Leung, S. Y.; Louis, D. N.; Looijenga, L. H.; Malkowicz, B.; Pierotti, M. A.; Teh, B.; Chenevix-Trench, G.; Weber, B. L.; Yuen, S. T.; Harris, G.; Goldstraw, P.; Nicholson, A. G.; Futreal, P. A.; Wooster, R.; Stratton, M. R. **(2004)**: Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumors. *Nature*; 30: 525-526.
103. Su, X. **(2014)**: FGFR2 amplification has prognostic significance in gastric cancer.results from a large international multicentre study. *Br J Cancer*, 110: 967-975.
104. Swanton, C. **(2012)**: Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res*, 72: 4875-4882.
105. **Tajiri, R.**; Ooi, A.; Fujimura, T.; Dobashi, Y.; Oyama, T.; Nakamura, R.; Ikeda, H. **(2014)**: Intratumoral heterogeneous amplification of ERBB2 and subclonal genetic diversity in gastric cancers revealed by multiple ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol*; 45: 725-734.
106. Tanner, M. **(2005)**: Amplification of HER-2 in gastric carcinoma. association with Topoisomerase IIa gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol*; 16: 273-278.
107. Tashiro, A.; Sano, M.; Kinameri, K.; Fujita, K.; Takeuchi, Y. **(2006)**: Comparing mass screening techniques for gastric cancer in Japan. *World J Gastroenterol*; 12: 4873-4874.
108. Terry, M. B.; Gaudet, M. M.; Garnmon, M. D. **(2002)**: The Epidemiology of Gastric Cancer. *Semin Radiat Oncol*; 12: 111-127.

109. **Vallböhmer, D.; Knoefel, W. T. (2014):** Wie radikal sollte ein Magen- bzw. Kardiazkarzinom operiert werden? *Zentralbl Chir*, 139: 23-27.
110. Vauhkonen, M.; Vauhkonen, H.; Sipponen, P. **(2006):** Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*; 20: 651-674.
111. Velho, S.; Oliveira, C.; Ferreira, A.; Ferreira, A.; Suriano, G.; Schwartz Jr, S.; Duval, A.; Carneiro, F.; Machado, J. C.; Hamelin, R.; Seruca, R. **(2005):** The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer*; 41: 1649-1654.
112. Vogelstein, B.; Papadopoulos, N.; Velculescu, V. E.; Zhou, S.; Diaz, L. A. Jr; Kinzler, K. W. **(2013):** Cancer genome landscapes. *Science*, 339: 1546-1558.
113. **Waddell, T.; Chau, I.; Cunningham, D.; Gonzalez, D.; Okines, C.; Wotherspoon, A.; Saffery, C.; Middleton, G.; Wadsley, J.; Ferry, D.; Mansoor, W.; Crosby, T.; Smith, D.; Waters, J.; Iveson, T.; Falk, S.; Slater, S.; Peckitt, C.; Barbachano, Y. (2013):** Epirubicin, oxaliplatin and capecitabine with or without panitumumab for patients with previously untreated advanced oesohagogastric cancer (REAL3). a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*; 14: 481-489.
114. Warnecke, V. S. **(2013):** Prognostic and Putative Predictive Biomarkers of Gastric Cancer for Personalized Medicine. *Diagn Mol Pathol*; 22: 127-136.
115. Washington, K. **(2010):** 7th edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *Ann Surg Oncol*; 17: 3077-3079.
116. Welch, J. S.; Ley, T. J.; Link, D. C.; Miller, C. A.; Larson, D. E.; Koboldt, D. C.; Wartman, L. D.; Lamprecht, T. L.; Liu, F.; Xia, J.; Kandoth, C.; Fulton, R. S.; McLellan, M. D.; Dooling, D. J.; Wallis, J. W.; Chen, K.; Harris, C. C.; Schmidt, H. K.; Kalicki-Weizer, J. M.; Lu, C.; Zhang, Q.; Lin, L.; O'Laughlin, M. D.; McMichael, J. F.; Delehaunty, K. D.; Fulton, L. A.; Magrini, V. J.; McGrath, S. D.; Demeter, R. T.; Vickery, T. L.; Hundal, J.; Cook L. L.; Swift, G. W.; Reed, J. P.; Alldrege, P. A.; Wylie, T. N.; Walker, J. R.; Watson, M. A.; Heath, S. E.; Shannon, W. D.; Varghese, N.; Nagarajan, R.; Payton, J. E.; Baty, J. D.; Kulkarni, S.; Klco, J. M.; Tomasson, M. H.; Westervelt, P.; Walter, M. J.; Graubert, T. A.; DiPersio, J. F.; Ding, L.; Mardis, E. R.; Wilson, R. K. **(2012):** The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*, 150: 264-278.
117. Wittekind, C.; Meyer, H. J. **(2010):** TNM. Klassifikation maligner Tumore. 7. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.

118. Wöll, E.; Devries, A.; Eisterer, W.; Hejna, M.; Keil, F.; Stein, H.; Zacherl, J.; Greil, R. **(2008)**: Chemotherapy in gastric cancer. *Anticancer Res*; 28: 1213-1219.
119. Wong, H.; Yao, T. **(2013)**: Molecular targeted therapies in advanced gastric cancer. does tumor histology matter? *Therap Adv Gastroenterol*; 6: 15-31.
120. Wu, X.; Northcott, P. A.; Dubuc, A.; Dupuy, A. J.; Shih, D. J.; Witt, H.; Croul, S.; Bouffet, E.; Fults, D. W.; Eberhart, C. G.; Garzia, L.; van Meter, T.; Zagzag, D.; Jabado, N.; Schwartentruber, J.; Majewski, J.; Scheetz, T. E.; Pfister, S. M.; Korshunov, A.; Li, X. N.; Scherer, S. W.; Cho, Y. J.; Akagi, K.; MacDonald, T. J.; Koster, J.; McCabe, M. G.; Sarver, A. L.; Collins, V. P.; Weiss, W. A.; Largaespada, D. A.; Collier, L. S.; Taylor, M. D. **(2012)**: Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma. *Nature*, 482: 529-533.
121. **Yang**, X.; Takano, Y.; Zheng, H. C. **(2012)**: The pathobiological features of gastrointestinal cancers (Review). *Oncol Lett*; 3: 961-969.
122. Yao, J. C.; Schirer, I. I.; Reddy, S.; Chiang, S.; Najam, A.; Yu, C.; Giacco, G.; Hess, K.; Rashid, A.; Xie, K.; Lynch, P.; Ajani, J. A. **(2002)**: Effects of sex and racial/ethnic group on the pattern of gastric cancer localization. *Gastric Cancer*; 5: 208-212.
123. Yashiro, M.; Nishioka, N.; Hirakawa, K. **(2005)**: K-ras mutation influences macroscopic features of gastric carcinoma. *J Surg Res*; 124: 74-78.
124. Yoon, D. H.; Ryu, M. H.; Park, Y. S.; Lee, H. J.; Lee, C.; Ryoo, B. Y.; Lee, J. L.; Chang, H. M.; Kim, T. W.; Kang, Y. K. **(2012)**: Phase II study of everolimus with biomarker exploration in patients with advanced gastric cancer refractory to chemotherapy including fluoropyrimidine and platinum. *Br J Cancer*; 106: 1039-1044.
125. Yoshida, H.; Yamamoto, N.; Taniguchi, H.; Oda, I.; Katai, H.; Kushima, R.; Tsuda, H. **(2014)**: Comparison of HER2 status between surgically resected specimens and matched biopsy specimens of gastric intestinal-type adenocarcinoma. *Virchows Arch*; 465: 145-154.
126. **Zabaleta**, J. **(2012)**: Multifactorial etiology of gastric cancer. *Methods Mol Biol*; 863: 411-435.
127. Zhao, L.; Vogt, P. K. **(2008)**: Helical domain and kinase domain mutations in p110 of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *PNAS*; 105: 2652-2657.

128. Zur Hausen, A.; van Rees, B. P.; van Beek, J.; Craanen, M. E.; Bloemena, E.; Offerhaus, G. J.; Meijer, C. J.; van den Brule, A. J. **(2004)**: Epstein-Barr virus in gastric carcinomas and gastric stump carcinomas: a late event in gastric carcinogenesis. *J Clin Pathol*, 57: 487-491.
129. Zwerenz, K. **(2011)**: Statistik. Einführung in die computergestützte Datenanalyse. 5. Aufl.: Oldenbourg Verlag.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich beim Direktor des Instituts für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. H. E. Gabbert, für die Möglichkeit der Promotion bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. S. E. Baldus für die freundliche Überlassung des Themas und die tatkräftige Unterstützung während dieser Arbeit.

Ich danke Herrn PD Dr. rer. nat. K.-L. Schäfer für die kompetente Unterstützung im experimentellen und methodischen Teil der Arbeit. Dank gilt ebenso der freundlichen Einarbeitung und Unterstützung im Labor, ganz konkret an Ingrid Büchmann, Julia Lange, Daniela Mones, Marianne Niermann-Kaiser und Giuseppe Cadeddu.

Vielen Dank an Dr. rer. nat. Dr. med. M. S. Ostapczuk für die Einarbeitung in die Statistik.

Außerdem danke ich den Korrekturlesern Annemarie und Friedemann Englisch, Dr. rer. nat. Dr. med. M. S. Ostapczuk, Martin Neumann und Helga Schmoll.

Ein besonderer Dank geht an meinen Ehemann Dr. med. Bijay Pokhrel, der mir in jeder Phase verständnisvoll und unterstützend zur Seite stand.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Julianna Englisch

Düsseldorf, 20.08.2014