

Aus der Abteilung Allgemein- und Viszeralchirurgie  
(Prof. Dr. med. M. Ghadimi)  
im Zentrum Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Relative Häufigkeit, Charakterisierung  
und prognostischer Stellenwert  
lymphogener Mikrometastasierung  
beim Magenkarzinom**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

---

vorgelegt von

Kai Wesselhöft

aus

Hamburg

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Olaf Horstmann

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Felix Hermann Brembeck

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2014

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis .....	II
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Einführung .....	1
1.2 Das Magenkarzinom.....	8
1.3 Fragestellung .....	13
<b>2 Patienten und Methode</b> .....	<b>15</b>
2.1 Studiendesign .....	15
2.2 Patientenkollektiv .....	15
2.3 Methoden.....	17
2.3.1 Histopathologische Routinediagnostik.....	17
2.3.2 Immunhistochemische Detektion von Mikrometastasen mit dem Antikörper Ber-EP4 .....	17
2.3.3 Phänotypische Charakterisierung der Mikrometastasen durch immunhistochemische Doppelfärbung mit Darstellung von EpCAM und p53 .....	22
2.3.4 Immunhistochemischer Nachweis von p53-Akkumulationen im Primärtumor.....	26
2.3.5 Dokumentation und biometrische Statistik .....	26
2.3.6 Material.....	28
2.3.7 Ethik und Datenschutz.....	28
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
3.1 Nachweis lymphogener Mikrometastasen.....	29
3.2 Zusammenhang zwischen klassischen prognostischen Faktoren und Lymphknoten- metastasen.....	32
3.3 Prognostische Relevanz der Mikrometastasen .....	36
3.4 Phänotypische Charakterisierung der Mikrometastasen .....	41
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>46</b>
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>65</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>66</b>
<b>7 Addendum</b> .....	<b>80</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
CK	<i>Cytokeratin</i> ; Zytokeratin
DAB	Diaminobenzidin
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
Fab	<i>Fragment antigen binding</i> ; Antigen-bindendes Fragment
G	<i>Grading</i> ; Differenzierungsgrad
HE	Hämatoxylin-Eosin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H.p.	<i>Helicobacter pylori</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
ITC	Isolierte Tumorzelle(n)
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
kDa	Kilodalton
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin
MM	Mikrometastase(n)
MRD	<i>Minimal residual disease</i> ; minimale Residualerkrankung
n	<i>Number</i> ; Fallzahl
p	<i>Probability</i> ; Wahrscheinlichkeit
p53	Tumorsuppressorprotein 53
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PT	Primärtumor
pTNM	postoperative histopathologische Tumorklassifikation T = Ausdehnung des Primärtumors N = regionäre Lymphknotenmetastasierung M = Fernmetastasierung
R	Residualtumor
SD	<i>Standard deviation</i> ; Standardabweichung
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung
TP53	Tumorsuppressorgen 53
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
uPAR	Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor
$\bar{x}$	Mittelwert

# **1 Einleitung**

## **1.1 Einführung**

Die Sensitivität des Lymphknoten-Stagings muss beim Magenkarzinom erhöht werden, weil Mikrometastasen der konventionellen Diagnostik entgehen und eine klinische Relevanz dieser Zellen vermutet wird.

Die Erforschung der okkulten Lymphknotenmetastasierung des Magenkarzinoms bedarf einer weiteren Intensivierung, damit ihr prognostischer Stellenwert und die daraus resultierende klinische Relevanz genau eingeschätzt werden können. Die Therapieplanung einer soliden Tumorerkrankung wird neben individuellen Faktoren und Wünschen der Patienten vorrangig auf das Ergebnis der Tumorklassifikation nach dem pTNM-System abgestimmt. Dieses Stagingverfahren nimmt somit eine herausragende Stellung ein, da sich aus ihm individuelle therapeutische Konsequenzen ergeben. Des Weiteren ermöglicht die pTNM-Klassifikation die Abschätzung einer Prognose, die jedoch lediglich eine statistische Aussage über den Verlauf einer Krebserkrankung und keinesfalls eine individuelle Vorhersage ist. Je exakter das Staging, desto genauer kann aber auch die Prognose für den einzelnen Patienten bestimmt werden. Die Forschung an diesem Thema muss sich daher mit einer kritischen Überprüfung der heute etablierten Routinediagnostik beschäftigen.

Ziel ist, durch eine besonders sensitive Diagnostik relevante Pathologien zu erkennen und ein primäres Therapieversagen als Folge einer inadäquaten Behandlung zu verhindern. Diese Gefahr besteht, wenn beim Staging mit den heute verwendeten diagnostischen Routineverfahren in der Frühphase der malignen Erkrankung im Körper verbliebene Tumorzellen übersehen werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Detektion und klinischen Konsequenz dieser so genannten Mikrometastasen in lokoregionären Lymphknoten eines Patientenkollektivs mit Magenkarzinom. Die Optimierung dieser Diagnostik ist besonders wichtig, da beim Magenkarzinom die regionären Lymphknotenkompartimente zum Operationszeitpunkt am häufigsten von einer metastatischen Aussaat betroffen sind und diese Metastasen oft bereits im Frühstadium der Erkrankung nachgewiesen werden können.

Eine stadiengerechte Therapie und eine möglichst genaue Vorhersage des Krankheitsverlaufs sind bei der Betreuung krebserkrankter Patienten vorrangige Ziele.

Die Diagnose „Krebs“ stellt für die betroffenen Menschen neben der organischen Erkrankung auch in besonderem Maße eine psychische Belastung dar, denn es sind vor allem die malignen Krankheiten, die rasch mit Begriffen wie Hoffnungslosigkeit, Unheilbarkeit und Leiden assoziiert werden. Zudem sind Krebserkrankungen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Daher gehört die Forschung im Bereich der Onkologie zu den wichtigsten Aufgaben der Medizin. Weltweit handelt es sich bei den meisten Krebserkrankungen um solide Tumoren, die von epitheliale Gewebe ausgehen (Wikman et al. 2008). Zu dieser großen Gruppe der malignen Neoplasien gehört auch das Magenkarzinom.

Das Magenkarzinom nimmt in Deutschland eine wichtige epidemiologische Stellung ein. Trotz eines rückläufigen Trends stand es 2010 für die weibliche Bevölkerung immer noch an neunter und für die männliche an siebter Stelle der jährlichen Krebsneuerkrankungen (ohne den nicht-melanotischen Hautkrebs). Für das Magenkarzinom wird im Vergleich zu allen anderen Krebserkrankungen eine unterdurchschnittliche relative 5-Jahres-Überlebensrate registriert (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013). Die stetige Verbesserung der Diagnostik und die Optimierung der Therapie müssen aber nicht nur wegen der epidemiologischen Datenlage angestrebt werden, sondern auch weil die Erkrankung im fortgeschrittenen Stadium die Lebensqualität der betroffenen Menschen besonders stark einschränkt. Rückläufige Zahlen für Inzidenz und Mortalität resultierten in den letzten Jahrzehnten aus dem zunehmenden Kenntnisgewinn über die Ätiologie, den daraus resultierenden Präventionsmaßnahmen und der stetigen Therapieoptimierung. Es ist also offensichtlich, dass die Karzinomerkrankung des Magens beeinflussbar ist. Die weitere Erforschung der Erkrankung wird daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in Zukunft zu neuen Behandlungserfolgen führen.

Das Magenkarzinom ist ein potenziell heilbarer Tumor. Es ist zunächst noch lokal begrenzt und bietet somit die Möglichkeit einer kompletten chirurgischen Entfernung. Trotz der zunehmenden Radikalität des Eingriffs konnte die operationsbedingte Mortalität in der Vergangenheit reduziert werden (Izbicki et al. 2002). Es rücken somit andere Faktoren in den Vordergrund, die für die insgesamt weiter unbefriedigende Prognose verantwortlich sind. Für einen initial kurativen Therapieansatz sind bei einem überwiegenden Anteil der Fälle die vollständige lokale Tumorsektion mit systematischer Lymphadenektomie und der Ausschluss von Fernmetastasen obligat. Nach histopathologischer Aufarbeitung der Resektate können die Infiltrationstiefe des Primärtumors (pT-Stadium), das Ausmaß des metastatischen Lymphknotenbefalls (pN-Stadium) und mit weiteren diagnostischen Schritten eine etwaige Fernmetastasierung (cM-/pM-Stadium) festgestellt werden. Bei der Evaluierung des Lymphknoten-Status stellen das Färben der Lymphknoten mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) an

der Stelle ihres größten Durchmessers und die Beurteilung unter einem Lichtmikroskop die derzeitige histopathologische Standarddiagnostik dar. Mit diesen Informationen wird das Magenkarzinom dann in das Stagingssystem der pTNM-Klassifikation eingeordnet. Bei Patienten mit soliden Tumoren ist im Laufe ihrer Erkrankung die Metastasierung die häufigste Todesursache (Wikman et al. 2008), und mehr als die Hälfte der initial in kurativer Intention operierten Patienten entwickelt ein Lokalrezidiv (Lim et al. 2005). Wenn nach dem Beginn einer Therapie kein Residualtumor diagnostiziert wird (R0-Status), ist bei den meisten soliden Tumoren der Nachweis bzw. Ausschluss einer lokoregionären Lymphknotenmetastasierung der wichtigste Prognosefaktor (Pantel et al. 1999). So stellt auch beim Magenkarzinom die Lymphknotenmetastasierung eine entscheidende prognostische Größe dar (Hartgrink et al. 2009).

Die Erforschung der lymphogenen Metastasierung wurde intensiviert, weil auch Patienten mit einem lokal begrenzten und radikal operierten Magenfrühkarzinom an einem Rezidiv verstarben, obwohl mit den Standardverfahren zum Operationszeitpunkt keine malignen Zellen in den regionären Lymphknoten nachgewiesen werden konnten (Maehara et al. 1996, Sano et al. 1993). Dieser Krankheitsverlauf lässt sich durch im Körper verbliebene Tumorzellen erklären, die der Routinediagnostik entgehen. Dieser auch „minimal residual disease“ (MRD) genannte Status ist möglicherweise ein Indikator für ein erhöhtes Rezidivrisiko. Die onkologische Chirurgie als Monotherapie erzielt also bei dieser minimalen Residualerkrankung häufig keine dauerhafte Heilung, und deshalb müssen zusätzliche effektive systemische Therapien etabliert werden.

Seit langem ist bekannt, dass eine Krebserkrankung nicht lokal auf den Ort des Primarius beschränkt bleiben muss. Bereits im 19. Jahrhundert konnte gezeigt werden, dass neben einem Primärtumor auch zirkulierende Tumorzellen im Blut existieren (Ashwort 1896). Seit den achtziger Jahren des vorigen Jahrhunderts gewinnt die Überlegung, dass disseminierte Tumorzellen eine klinische Relevanz haben könnten, zunehmend an Bedeutung. Dabei steht die Frage im Mittelpunkt, ob sie ein malignes Potenzial und einen prognostischen Einfluss wie diejenigen Metastasen haben, die mit der etablierten Diagnostik gefunden werden. Mit Hilfe der Immunhistochemie (IHC) und molekulargenetischer Verfahren wurden Tests etabliert, die im Vergleich zu den konventionellen zyto- und histomorphologischen Untersuchungen die Sensitivität der Detektion okkultur Tumorzellen deutlich erhöhen. Ihr Nachweis ist damit je nach Metastasierungsmuster des Primärtumors in verschiedenen Kompartimenten möglich.

Das Magenkarzinom metastasiert hämatogen über die periphere Blutbahn und das Knochenmark und kann von dort aus sekundär Fernmetastasen bilden. Nach Einbruch in die freie Bauchhöhle ist dies auch kavitär möglich. Vor allem stellt aber die lymphogene

Metastasierung eine bedeutende klinische Komplikation der Erkrankung dar. Das Lymphsystem ist zum Operationszeitpunkt das am häufigsten betroffene Kompartiment.

Beim Magenkarzinom wird der Nachweis okkulten Lymphknotenmetastasen bis heute von den internationalen Krebsgesellschaften nicht offiziell für die Einteilung der pN- und Tumorstadien berücksichtigt. Grundlegendes Problem ist die weiterhin ungeklärte Frage, ob diese Zellen auch tatsächlich eine prognostische Relevanz haben. Für die Entwicklung der inkonstanten Forschungsergebnisse gibt es mehrere Gründe wie zum Beispiel wechselnde methodische Ansätze mit variierenden Studiendesigns, unterschiedliche technische und statistische Methoden sowie uneinheitliche Definitionen der Zielfaktoren. Des Weiteren ist der biologische Charakter und damit auch das metastatische Potenzial der Tumorzellen nicht hinreichend geklärt.

Eine Unterteilung von Lymphknotenmetastasen anhand ihrer Größe in Makrometastasen und Mikrometastasen erfolgte erstmals durch Huvos et al. (1971). Der Terminus „Mikrometastase“ wurde von der Krebsgesellschaft *Union for International Cancer Control* (UICC) Ende der 1970er Jahre in die Klassifikation maligner Tumoren aufgenommen. Bis heute ist man sich bei der Verwendung des Begriffs aber uneinig. In vielen Studien basierte er auf morphologischen Kriterien oder wurde von den Nachweisverfahren abhängig gemacht und zum Teil auch durch neue Begriffe ersetzt oder ergänzt (Cai et al. 1999, Fukagawa et al. 2001, International (Ludwig) Breast Cancer Study Group 1990, Turner et al. 1999). Ende der 1990er Jahre schlugen Hermanek et al. (1999) vor, anhand exakterer morphologischer Kriterien okkulte Tumorzellen in „isolierte Tumorzellen“ (ITC) und „Mikrometastasen“ (MM) zu unterteilen. So werden diese Befunde nun auch in der allgemeinen Einleitung der UICC-Stagingvorschrift definiert (Wittekind und Meyer 2010). In der Literatur fehlt bei der Verwendung der Begriffe jedoch weiterhin ein Konsens bezüglich der Definitionen (Übersicht bei Yanagita et al. 2008 a). Problematisch ist zudem, dass nicht alle histopathologischen Befunde sicher in eine der beiden Kategorien eingeordnet werden können (Cserni et al. 2005).

Die immunhistochemischen Methoden für den Nachweis von okkulten Tumorzellen in Lymphknoten konnten bisher nicht standardisiert werden. Verschiedene monoklonale Antikörper gegen Zytokeratine (CK) wurden in den letzten Jahren zum Nachweis epithelialer Tumorzellen in mesenchyalem Gewebe eingesetzt. An dem diagnostischen Wert der CK-Antikörper für die Detektion dieser Zellen bleiben jedoch aufgrund ihrer eingeschränkten Sensitivität und Spezifität bis heute Zweifel bestehen (Domagala et al. 1992, Fukagawa et al. 2001, Moll et al. 1982). Mit dem monoklonalen Antikörper Ber-EP4, der sich gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM richtet, wurde eine aussichtsreiche Alternative gefunden. Ber-EP4 konnte sich beim Magenkarzinom für diese Fragestellung bisher noch nicht als Standardantikörper etablieren. Die vorliegende Arbeit setzt Ber-EP4 deshalb bei



dieser Erkrankung ein und konzentriert sich auf den immunhistochemischen Nachweis von lymphogenen Mikrometastasen bei histologisch nodal-negativen Patienten.

Mikrometastasierungen und isolierte Tumorzellen in Lymphknoten von pN0-klassifizierten Patienten wurden mittels Immunhistochemie bereits bei diversen soliden Tumoren untersucht (Übersichten bei Balic et al. 2011, Hermanek et al. 1999). Beim Magenkarzinom lag der prozentuale Anteil von Patienten mit okkulten lymphogenen Tumorzellen zwischen 10% und 90% (Übersichten bei Arigami et al. 2013, Wolfrum et al. 2005). Die Einschätzungen der prognostischen Signifikanz dieser Befunde variierten in Studien ebenfalls deutlich (Übersichten bei Arigami et al. 2013, Yanagita et al. 2008 a). Fukagawa et al. (2001) konnten beispielsweise zeigen, dass bei 35,5% der Patienten im Stadium pT2N0M0 unabhängig von klinisch-pathologischen Faktoren Mikrometastasen nachweisbar waren. Die 5- und 10-Jahres-Überlebensraten der MM-positiven Erkrankten unterschieden sich jedoch von den Patienten mit negativem Lymphknotenstatus nicht signifikant. Choi et al. (2002) beobachteten nach Durchführung immunhistochemischer Färbungen einen erhöhten Anteil lymphogener Mikrometastasen, konnten aber ebenfalls keine prognostische Relevanz aufzeigen. Morgagni et al. (2003) wiesen bei 10% der Magenfrühkarzinome (pT1-Stadien) okkulte Tumorzellen in den lokoregionären Lymphknoten nach, die aber die Prognose der Patienten nicht beeinflussten. Auch Kim JJ et al. (2009) detektierten immunhistochemisch bei 10% nodal-negativer Magenfrühkarzinome Mikrometastasen in Lymphknoten. Im Nachbeobachtungszeitraum starb im Gesamtkollektiv aber kein einziger Patienten an einem Tumorrezidiv. Auf der anderen Seite existieren Studien, die Hinweise für die prognostische Relevanz finden konnten. Unter anderem zeigten sich in einem Kollektiv histopathologisch pN0-klassifizierter Patienten bei 32% immunhistochemisch positive Zellen in den Lymphknoten, und die 5-Jahres-Überlebensrate dieser Gruppe war signifikant reduziert (Yasuda et al. 2002). Bei weiteren Studien wurden nach fünf Jahren geringere Gesamt- und krankheitsfreie Überlebensraten (Kim JH et al. 2008) sowie eine erhöhte Rezidivrate und eine niedrigere 2-Jahres-Überlebensrate beobachtet (Ru et al. 2012), wenn Mikrometastasen in den regionären Lymphknoten vorhanden waren. Auch bei Magenfrühkarzinomen konnten lymphogene Mikrometastasen als ein unabhängiger prognostischer Faktor mit negativer, signifikanter Beeinflussung der 5-Jahres-Überlebensrate identifiziert werden (Cao et al. 2011). Alle die zuvor genannten Studien erbrachten die Zellnachweise über immunhistochemische Verfahren mit Antikörpern gegen Zytokeratine. Scheunemann et al. (2009) führten mit dem Einsatz des epithelspezifischen Antikörpers Ber-EP4 bei 67% der im konventionellen histologischen Diagnostikverfahren pN0-klassifizierten Magenkarzinom-Patienten einen positiven Zellnachweis. Ber-EP4-immunoreaktive Zellen in regionären Lymphknoten stellten dabei nachweislich

einen unabhängigen Negativfaktor für rezidivfreie Zeit und das Gesamtüberleben der Patienten dar.

Bezüglich des prognostischen Einflusses von Mikrometastasen variieren die Studienergebnisse vermutlich auch wegen der ungenügenden Kenntnis des biologischen Charakters der Zellen stark. Eine Methode, die sich zur weiteren Phänotypisierung dieser Tumorzellen eignet, ist die immunhistochemische Doppelfärbung. Durch den sequenziellen Einsatz von zwei monoklonalen Antikörpern können - neben der reinen Detektion mit einem epithelialen Marker - ergänzende Informationen über die Zellen gewonnen werden. Beispielsweise gelingt dies mit dem zusätzlichen Nachweis eines tumorspezifischen Epitops (Übersicht bei Pantel und Brakenhoff 2004, Pantel et al. 1999). Nach diesem Prinzip wurden bei verschiedenen soliden Tumoren vor allem disseminierte Tumorzellen im Knochenmark analysiert. Für das Magenkarzinom gelang in diesem Kompartiment der Nachweis eines unabhängigen prognostischen Nachteils bei Detektion eines Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptors (uPAR) auf Zytokeratin-positiven Zellen (Heiss et al. 2002). Es wurde in der Vergangenheit darauf hingewiesen, dass Mikrometastasen aufgrund ihres geringen Proliferationsindexes möglicherweise nicht aktive Metastasen repräsentieren (Pantel et al. 1993). Im Gegensatz dazu konnte jedoch über die Darstellung des Proliferationsantigens Ki-67 gezeigt werden, dass ein Großteil der lymphogenen Mikrometastasen des Magenkarzinoms doch replikativ ist und damit frühe metastatische Aktivität aufweisen könnte (Yanagita et al. 2008 b, Yonemura et al. 2007). Es ist deswegen von großer Bedeutung, Mikrometastasen in Lymphknoten des Magenkarzinoms phänotypisch weiter zu charakterisieren. Das Ziel muss sein, ihr biologisches Potenzial zu kennen und bei isoliertem Nachweis die Frage nach der prognostischen Relevanz in einem dann sehr frühen Krankheitsstadium beantworten zu können.

Molekularbiologische Veränderungen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen sind hochgradig spezifisch für maligne Zellen. Mutationen des Tumorsuppressorgens TP53 werden bei Krebserkrankungen sehr häufig gefunden (Greenblatt et al. 1994). Mit dem Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen das Protein p53 erhält man wichtige Informationen über den Charakter metastatischer Tumorzellen. Bei Nachweis einer Protein-Akkumulation kann angenommen werden, dass in den betroffenen Zellen die p53-Funktionen wie Regulation des Zellzyklus und Einleitung einer DNA-Reparatur oder Apoptose nicht mehr intakt sind. Der p53-Nachweis ist bei einer immunhistochemischen Doppelfärbung in Kombination mit Ber-EP4 auch methodisch vorteilhaft, da die nukleäre Färbung einen guten Kontrast zu der membranösen und zytoplasmatischen EpCAM-Epitopdarstellung ergibt.

Die vorliegende Arbeit soll mit der skizzierten Diagnostik einen Beitrag zu der Diskussion leisten, ob es sich bei Mikrometastasen nur um klinisch irrelevante Artefakte oder um einen Befund mit malignem Potenzial und damit klinischer Relevanz handelt. Die Erforschung der

lymphogenen Mikrometastasierung und ihre Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf des Magenkarzinoms sind von großer Bedeutung, da der klinische Stellenwert der Mikrometastasen bei dieser Tumorentität noch nicht definitiv eingeordnet werden kann. Die bereits etablierten diagnostischen Verfahren müssen dabei durch Methoden erweitert werden, die zusätzliche Informationen bereitstellen, aus denen sich für die Patienten prognostische und therapeutische Konsequenzen ergeben.

## **1.2 Das Magenkarzinom**

### **Ätiologie und Epidemiologie**

Die Entstehung des Magenkarzinoms ist ein multifaktorielles Geschehen. Neben genetischen Merkmalen und prädisponierenden Vorerkrankungen spielen Ernährungs- und Konsumgewohnheiten sowie die Helicobacter pylori- (H.p.-) Infektion eine wesentliche Rolle. Die sinkende Erkrankungsrate in Europa wurde daher vorrangig auf die abnehmende H.p.-Infektionsrate und die Verbesserung der Ernährung und Nahrungsmittelkonservierung zurückgeführt (Levi et al. 2004).

Seit mehreren Jahrzehnten ist die Inzidenz des Magenkarzinoms weltweit abnehmend (Bertuccio et al. 2009). In der globalen Krebsstatistik von Jemal et al. (2010) ist es bei Männern aber immer noch die viert- und bei Frauen die fünfthäufigste Krebserkrankung und wird bei den tumorbedingten Todesursachen bei der männlichen Bevölkerung an dritter und bei der weiblichen Bevölkerung an fünfter Stelle genannt.

Das Robert Koch-Institut legt in Deutschland Schätzungen über die Epidemiologie onkologischer Erkrankungen vor. 2010 lag das Magenkarzinom mit 9150 jährlichen Neuerkrankungen bei Männern und 6690 bei Frauen an siebter bzw. neunter Stelle der jährlichen Inzidenz der Krebserkrankungen. Die Mortalität wurde an fünfter beziehungsweise sechster Stelle angegeben. In absoluten Zahlen ausgedrückt verstarben im Jahr 2010 in Deutschland 5777 Männer und 4400 Frauen an dieser Krankheit. Wie bei der Inzidenz ist auch bei der Mortalität die Entwicklung insgesamt rückläufig. Für die männliche Bevölkerung betrug das mittlere Erkrankungsalter 71 Jahre, für Frauen 75 Jahre (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013).

## Tumorklassifikation

Etwa 95% der Malignome des Magens sind Adenokarzinome.

Die postoperative histopathologische Tumorklassifikation pTNM beschreibt die lokale Ausdehnung des Primärtumors (pT-Stadium), die Anzahl der metastatisch befallenen loko-regionären Lymphknoten (pN-Stadium) und den Nachweis oder das Fehlen von Fernmetastasen (M-Stadium) (Tabelle 1.1).

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

**Tabelle 1.1:** pTNM-Klassifikation des Magenkarzinoms nach der UICC.

Benachbarte Strukturen: Milz, Colon transversum, Leber, Diaphragma, Pankreas, Bauchwand, Nebennieren, Niere, Dünndarm, Retroperitoneum (Wittekind und Meyer 2010, S. 70-71)

Aus den Konstellationen dieser drei Staging-Parameter ergeben sich die Tumorstadien I-IV der internationalen Krebsgesellschaft UICC (Tabelle 1.2).

Die R-Klassifikation informiert nach einer Behandlung über das Vorhandensein oder das Fehlen eines Residualtumors. Im R0-Stadium des Magenkarzinoms ist dieser nicht vorhanden oder zum Zeitpunkt der postoperativen Diagnostik nicht nachweisbar, R1 definiert einen mikroskopisch und R2 einen makroskopisch verbliebenen Resttumor.

Stadium	pTNM-Klassifikation		
	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIB	T1	N3	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
IIIA	T2	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N1	M0
IIIB	T3	N3	M0
	T4a	N2	M0
	T4b	N0, N1	M0
IIIC	T4a	N3	M0
	T4b	N2, N3	M0
IV	jedes T	jedes N	M1

**Tabelle 1.2:** UICC-Tumorstadien des Magenkarzinoms nach der pTNM-Klassifikation (Wittekind und Meyer 2010, S. 72)

### Metastasierung

Neben der hämatogenen Metastasierung und dem Wachstum per continuitatem ist vor allem die lymphogene Verbreitung der Magenkarzinomzellen relevant, da dieser Metastasierungsweg besonders häufig vorkommt und bereits in frühen klinischen Stadien auftritt.

Zu den regionären Lymphknotenstationen des Magens werden die perigastrischen entlang der kleinen und großen Magenkurvatur, die hepatoduodenalen sowie die entlang der Arteria gastrica sinistra, hepatica communis, lienalis und coeliaca gezählt. Die retropankreatischen, mesenterialen, paraaortalen und supradiaphragmal gelegenen Knoten erhalten bei tumoröser Infiltration den Status von Fernmetastasen (pM1).

Die pTNM-Klassifikation definiert über die Anzahl der positiven regionären Lymphknoten das pN-Stadium, wobei für die pN0-Kategorie eine Mindestanzahl von 16 analysierten Lymphknoten üblich sein sollte.

### **Mikrometastasen und isolierte Tumorzellen**

In der Regel werden Mikrometastasen (MM) und isolierte Tumorzellen (ITC) mit immunhistochemischen oder molekulargenetischen Verfahren in verschiedenen Metastasierungskompartimenten außerhalb der Routinediagnostik detektiert. Nach der Definition der UICC haben MM einen Durchmesser von über 0,2 mm bis maximal 0,2 cm. Der Begriff ITC umfasst Einzelzellen und Zellcluster, deren größter Durchmesser 0,2 mm nicht überschreitet. Auch ein Zellcluster, der in einem histologischen Einzelschnitt aus weniger als 200

Tumorzellen besteht, kann als ITC gewertet werden. Isolierte Tumorzellen weisen normalerweise keine metastatische Aktivität in Form von Zellproliferation oder Penetration von Gefäßwänden auf, und reaktive Veränderungen des umgebenden Gewebes werden nicht beobachtet. Die internationalen Krebsgesellschaften berücksichtigen beim Magenkarzinom-Staging nicht explizit die Nachweise von ITC und MM bei den Definitionen der pN-Stadien und den Einteilungen der Tumorstadien. Werden allein Mikrometastasen nachgewiesen, können sie aber die Kennzeichnung „(mi)“ erhalten. Im Gegensatz zu isolierten Tumorzellen, deren Nachweis die Klassifikation pN0 nicht beeinflusst, führt die Beachtung von Mikrometastasen zu einer Änderung des Lymphknoten-Stagings, zum Beispiel von pN0 zu pN1(mi), und gegebenenfalls auch zu einem Upstaging innerhalb der UICC-Tumorstadien (Edge et al. 2010, Wittekind und Meyer 2010).

### Therapie

Das Magenkarzinom ist eine potenziell heilbare Krebserkrankung. Voraussetzungen hierfür sind jedoch die operative Entfernung des Primärtumors mit negativem Tumornachweis an den Resektionsgrenzen (R0-Resektion) sowie der Ausschluss von Fernmetastasen. Nach den Ergebnissen einer deutschen Magenkrebsstudie konnte bei 71,5% aller Patienten primär eine R0-Resektion erreicht werden (Siewert et al. 1998). Andere internationale Studien gaben einen Anteil von nur 50% an (Van Cutsem et al. 2006). Die Abhängigkeit des Erreichens einer R0-Resektion von den pN- und pT-Stadien (Tabelle 1.3) ist auch im Hinblick auf den Langzeitverlauf interessant, da der R-Status ein starker prognostischer Faktor ist.

pT- und pN-Stadien	R0-Resektion (in Prozent)
T1	96,4
T2	83,8
T3	55,9
T4	37,4
N0	92,0
N1	68,1
N2	57,8

**Tabelle 1.3:** Prozentualer Anteil der R0-Resektionen bei operierten Magenkarzinom-Patienten in verschiedenen pN- und pT-Stadien der pTNM-Klassifikation (Roder et al. 1993, S. 2092)

Bei kurativem Therapiekonzept können andere Behandlungsoptionen die Operation nicht ersetzen. Systemisch applizierbare Zytostatika und die Strahlentherapie sind vor allem als adjuvante und neoadjuvante Verfahren sowie in der Palliation im Rahmen eines multimodalen Therapieansatzes indiziert. Der R1-Status ohne Möglichkeit der Nachresektion, R2 und M1

stellen in jedem Fall palliative Ausgangssituationen dar. Die onkologische Therapie des Magenkarzinoms richtet sich primär vor allem nach der pTNM-Klassifikation. Die Entscheidung über den Einsatz von Zusatztherapien ist in hohem Maße von einem exakten Tumorstaging abhängig, wodurch die Notwendigkeit einer adäquaten Durchführung nochmals unterstrichen wird.

Für die Therapie des Magenkarzinoms ist die Evaluation des Nutzens einer (neo-)adjuvanten Chemo- oder Radiochemotherapie weiterhin Gegenstand klinischer Studien. In den letzten Jahren hat sich aber die Evidenz zunehmend gefestigt, dass bestimmte Patientengruppen von einer multimodalen Therapie profitieren. Zum aktuellen Zeitpunkt besteht ein Konsens darüber, dass Patienten - abhängig von der individuellen Allgemeinkonstitution - eine postoperative Radiochemotherapie erhalten sollten, wenn die lokale Primärtumor- und Lymphknotenresektion nicht ausreichend radikal durchgeführt werden konnte. Des Weiteren wird bei erhöhtem Rezidivrisiko (Tumorstaging pT3-4 oder N+M0) der Einsatz der neoadjuvanten perioperativen Chemotherapie oder adjuvanten Radiochemotherapie empfohlen (Van Cutsem et al. 2006).

Die verbesserten Überlebensdaten nach einer neoadjuvant-perioperativen Chemotherapie können dadurch erklärt werden, dass als Folge der Behandlung häufiger R0-Resektionen erreicht werden und damit ein Zustand mit entscheidender prognostischer Bedeutung. Möglicherweise werden in den Lymphknoten auch okkulte Tumorzellen - ein potenzieller Rezidiv-Risikofaktor - mit dieser zusätzlichen Zytostatikatherapie bekämpft. Zurzeit ergibt sich aber aus dem alleinigen Nachweis isolierter Tumorzellen und Mikrometastasen außerhalb von Studien noch keine Indikation für neoadjuvante oder adjuvante Behandlungen.

### **Prognose**

In Deutschland sind beim Magenkarzinom die relativen 5-Jahres-Überlebensraten mit 33% bei Männern und Frauen im Verhältnis zu den Überlebensraten anderer Krebsarten unterdurchschnittlich (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013).

Die Prognose ist nach erfolgreicher R0-Resektion vor allem von den auf der pTNM-Klassifikation basierenden UICC-Stadien abhängig (Tabelle 1.4).



UICC-Stadium	Relative 5-Jahres-Überlebensraten (in Prozent)
IA	88,8
IB	68,9
II	38,5
IIIA	15,3
IV	4,3

**Tabelle 1.4:** UICC-Stadien-abhängige relative 5-Jahres-Überlebensraten für Patienten mit Magenkarzinom im Zeitraum 1998 bis 2011 (Tumorregister München 2013, S. 7, Tab. 4d)

### **1.3 Fragestellung**

Ziele dieser Studie sind der Nachweis, die Charakterisierung und die Beurteilung des prognostischen Stellenwertes von lymphogenen Mikrometastasen bei konventionell pN0-klassifizierten Magenkarzinomen.

Die Arbeit ist in vier Hauptbereiche aufgeteilt:

#### **1. Detektion und Nachweis der Frequenz von Mikrometastasen**

Die grundlegende Aufgabe dieser Studie ist die Beantwortung der Frage, ob und wie häufig Mikrometastasen in den regionären Lymphknoten des pN0-Magenkarzinom-Kollektivs mit einem immunhistochemischen Nachweisverfahren detektiert werden können. Für die Bearbeitung dieser Fragestellung wurde der in der Routinediagnostik noch nicht etablierte monoklonale Antikörper Ber-EP4 eingesetzt, der sich gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) richtet. Aufgrund seiner beschriebenen guten Spezifität und Sensitivität verspricht er einen besonders großen diagnostischen Wert, der hier bestätigt werden sollte. Bei der Befundung der immunhistochemisch gefärbten Lymphknoten-Präparate blieben zytomorphologische Malignitätskriterien der Ber-EP4-positiven Zellen bewusst unbeachtet, damit gezielt geprüft werden konnte, ob ein von subjektiven Kriterien unabhängiger und sicher reproduzierbarer Befund eine prognostische Relevanz besitzt.

#### **2. Untersuchung des Einflusses klinisch relevanter Faktoren auf die Entstehung von Mikrometastasen**

Merkmale, die als klassische prognostische Einflussgrößen bekannt sind, wurden darauf untersucht, ob sie das Auftreten von Lymphknotenmetastasen begünstigen. Diese statistischen Analysen wurden für alle Untergruppen der lymphatischen Metastasierung angefertigt. Bei den Untersuchungen sollte vor allem herausgefunden werden, ob Faktoren existieren, die das Risiko einer mikrometastatischen Lymphknotenbeteiligung erhöhen.

### **3. Evaluierung der prognostischen Relevanz nachgewiesener Mikrometastasen**

Die Auswirkung der Mikrometastasen auf die Überlebenszeit der Patienten wurde uni- und multivariat unter Berücksichtigung nachgewiesener prognostisch signifikanter Einflussgrößen getestet. Dies lässt sich nur über einen ausreichend langen Untersuchungszeitraum evaluieren, sodass die Arbeit auf einem retrospektiven Studiendesign basiert. Der klinische Stellenwert mikrometastatischer Magenkarzinomzellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Daher hat die Analyse ihrer prognostischen Relevanz eine besonders große Bedeutung.

### **4. Phänotypische Charakterisierung identifizierter Mikrometastasen**

Die in den Lymphknoten immunhistochemisch detektierten Tumorzellen wurden mit der zusätzlichen Darstellung eines tumorspezifischen Merkmals weiter charakterisiert, um dadurch eine ergänzende Aussage über das Tumorpotenzial dieser Zellen treffen zu können. Mit Hilfe einer immunhistochemischen Doppelfärbung wurden die Zellen erneut mit Ber-EP4 detektiert und sequenziell über den Nachweis des akkumulierten p53-Proteins indirekt auf eine Mutation des Tumorsuppressorgens TP53 untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Gegenüberstellung des p53-Status der Mikrometastasen mit dem des Primärtumors. Nach der vorliegenden Literatur wurde bisher bei einem pN0-Magenkarzinom-Kollektiv noch keine simultane Markierung der Lymphknotenmikrometastasen mit Ber-EP4 und einem p53-Antikörper unternommen.

## **2 Patienten und Methode**

### **2.1 Studiendesign**

In der Abteilung für Allgemein Chirurgie des Universitätsklinikums Göttingen waren für alle Patienten, die in der Zeit vom 1. August 1994 bis 31. Dezember 2000 an einem Magenkarzinom operiert worden waren, die wesentlichen klinischen Parameter prospektiv gesammelt worden. Für die Bearbeitung der Fragestellungen dieser Studie erfolgten retrospektiv die Identifikation, Präparation und immunhistochemischen Färbungen der Resektate sowie die statistische Auswertung der Daten. Die Patientennachsorge wurde im Dezember 2001 abgeschlossen.

### **2.2 Patientenkollektiv**

#### **Überblick**

Von insgesamt 177 an einem Magenkarzinom erkrankten Patienten konnten 141 (79,7%) in primär kurativer Intention operiert werden. Das chirurgische Vorgehen umfasste jeweils eine Gastrektomie und eine erweiterte systematische Lymphadenektomie (D2-Resektion). Bei 35 Patienten (19,8%) erfolgte aufgrund einer palliativen Ausgangssituation lediglich die Operation des Primärtumors. In einem Fall blieb die Therapieintention unbekannt.

#### **Verteilung auf die pN-Stadien und weitere klinische Faktoren**

Um das Patientenkollektiv auf den für diese Arbeit maßgeblichen Faktor der lymphogenen Metastasierung zu untersuchen, wurde es zunächst anhand der Ergebnisse der histopathologischen Routineuntersuchungen der regionären Lymphknoten-Resektate in die Gruppen Makrometastasen-negativ (pN0) und Makrometastasen-positiv (pN+) unterteilt. Bei 113 Patienten (63,8%) waren mittels HE-Färbungen bereits Metastasen detektiert und 64 Patienten (36,2%) als frei von lymphogenen Makrometastasen beurteilt worden.

Eine Zusammenfassung wesentlicher Daten der klinischen Dokumentation, chirurgischer Parameter, des Stagings und zusätzlicher histopathologischer Befunde ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

Zu beachten ist, dass die aktuell gültige siebte Auflage der TNM-Klassifikation von den zum Zeitpunkt des Stagings der Patienten verwendeten Tumorklassifikationen abweicht.

<b>Faktor</b>	<b>Ausprägung</b>	<b>Median (Bereich)</b>	
<b>Alter</b>	Jahre	63 (31 - 91)	
	<b>Ausprägung</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>
<b>Geschlecht</b>	männlich : weiblich	117 : 60	66,1 : 33,9
<b>Tumorlokalisation</b>	proximal, Mitte distal k.A.	138 34 5	78,0 19,2 2,8
<b>Therapieintention</b>	kurativ palliativ k.A.	141 35 1	79,7 19,8 0,6
<b>pT-Stadium</b>	pTis, pT1, pT2 pT3, pT4 k.A.	118 58 1	66,7 32,8 0,6
<b>pN-Stadium</b>	pN0 pN+	64 113	36,2 63,8
<b>pM-Stadium</b>	M0 pM1	151 26	85,3 14,7
<b>UICC-Stadium</b>	0, I, II III, IV k.A.	89 87 1	50,3 49,2 0,6
<b>R-Klassifikation</b>	R0 R1, R2 k.A.	156 19 2	88,1 10,7 1,1
<b>Grading</b>	G2 G3 k.A.	55 115 7	31,1 65,0 4,0
<b>Laurén-Typ</b>	intestinal diffus k.A.	72 72 33	40,7 40,7 18,6
<b>Multiviszzerale Resektion</b>	nein ja k.A.	90 80 7	50,8 45,2 4,0
<b>Infiltration von Nachbarorganen</b>	nein ja	135 42	76,3 23,7
<b>Infiltration von Nachbarstrukturen</b>	nein ja	133 44	75,1 24,9
<b>Klinikletalität</b>	ja	4	2,3

**Tabelle 2.1:** Verteilung klinischer, chirurgischer und histopathologischer Faktoren auf 177 Patienten mit Magenkarzinom (k.A.= keine Angabe) (Horstmann et al. 2004, Tabelle 1)

## Nachsorge

Für die Darstellung des Langzeitverlaufs und die Evaluierung einer Korrelation zwischen möglichen prognostischen Faktoren und den Überlebenszeiten der Patienten erfolgte im Dezember 2001 die Erfassung weiterer Patientendaten. In Kooperation mit Hausärzten, dem Tumorzentrum Niedersachsen und Einwohnermeldeämtern wurde der Frage nachgegangen, ob der Patient noch lebte bzw. wann er verstorben war. Nach Ausschluss von acht Patienten, für die keine Angaben vorlagen, konnte für 169 Patienten (96%) der Langzeitverlauf ihrer Erkrankung dokumentiert werden. Die mittlere Nachsorgedauer lag bei 804 ( $\pm$  671) Tagen.

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Histopathologische Routinediagnostik**

Bei Gewebe, das aus einem lebenden Organismus entfernt wird, beginnt nach der Entnahme die Auto- und Heterolyse. Deshalb muss diese Zersetzung zunächst mit einer Fixierungsflüssigkeit aufgehalten werden. Am häufigsten wird Formalin (verdünnte und gepufferte Formaldehyd-Lösung) verwendet, das zu einer Vernetzung von Proteinen führt. Nach dem Zuschnitt der Präparate ist es wichtig, dass sie eine Stabilität und gleichmäßige Konsistenz erlangen, damit sie später in dünne Schnitte weiterverarbeitet werden können. Zu diesem Zweck wird das Material mit heißem Paraffinwachs getränkt, das bei Abkühlung erhärtet (Einbettung). Da Paraffin nicht wasserlöslich ist, muss dem Gewebe vor der Einbettung in einer aufsteigenden Alkoholreihe Wasser entzogen werden. Danach entfernt Xylol den Alkohol und ermöglicht durch seine paraffinlösende Wirkung die gleichmäßige Durchdringung des eingebetteten Materials mit Paraffin. Nach dem Erkalten kann im Anschluss der gewebehaltige Paraffinblock in dünne histologische Präparate geschnitten werden. Üblicherweise wird dann mit Hilfe einer Routinefärbung, für die vor allem Hämatoxylin-Eosin (HE) eingesetzt wird, die histopathologische Befundung durchgeführt. Mit diesem Verfahren wird auch das pN-Stadium eines soliden Tumors festgelegt. Nach den Regeln der pTNM-Klassifikation erfolgt dann mit der Befundung der konventionellen HE-Schnitte die Einteilung in nodal-negativ (pN0) und Metastasen-positiv (pN+). Diese Diagnostik kann in Abhängigkeit von der Fragestellung zum Beispiel durch immunhistochemische Detektionsverfahren erweitert werden.

### **2.3.2 Immunhistochemische Detektion von Mikrometastasen mit dem Antikörper Ber-EP4**

Die bei der Operation des Magenkarzinoms resezierten Lymphknoten des regionären Lymphabstromgebietes waren bereits im Rahmen der histopathologischen Routinediagnostik im Zentrum für Pathologie des Göttinger Universitätsklinikums aufgearbeitet worden. Mit den immunhistochemischen Methoden sollten in der vorliegenden Studie nur die Patienten weiter untersucht werden, bei denen in keinem der entfernten Lymphknoten Makrometastasen nachzuweisen gewesen waren. Von diesen 64 pN0-Patienten mussten acht ausgeschlossen werden, da die entsprechenden Resektionspräparate nicht zur Verfügung standen. Bei 56 Patienten konnten die Lymphknoten-Präparate im Archiv der Abteilung für Pathologie

identifiziert und im Folgenden insgesamt 1148 Lymphknoten, davon pro Patient im Mittel 20 (Bereich 9 - 44), weiter untersucht werden.

Mit Hilfe immunenzymatischer Färbemethoden lassen sich Zellen nach dem Prinzip, dass Primärantikörper mit spezifischen Zellantigenen reagieren und ihre Präsenz in nachfolgenden Reaktionsschritten farblich visualisierbar ist, phänotypisch charakterisieren. So können beispielsweise in Lymphknoten Einzelzellmetastasen oder kleinere metastatische Tumorzellverbände (Cluster) sichtbar werden, die mit der Routinediagnostik nicht detektabel sind.

Als Primärantikörper kommen häufig monoklonale Varianten zum Einsatz. Diese Immunglobuline werden überwiegend von einem Plasmazell-Klon immunisierter Mäuse gebildet und reagieren nur mit dem speziellen Epitop, gegen das sie generiert wurden. Gegenüber den polyklonalen Antikörpern haben sie vor allem den Vorteil einer höheren Spezifität. Antikörperbindungen sind in Abhängigkeit vom Antigen an verschiedenen Zelllokalisationen möglich, sodass zytoplasmatische, membranöse, nukleäre und kombinierte Reaktionsmuster entstehen können.

Für den Nachweis der lymphogenen Mikrometastasen wurde in dieser Arbeit der monoklonale Maus-Antikörper Ber-EP4 (Anti-Human Epithelial Antigen, Isotyp IgG1, kappa) verwendet, der sich gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM richtet. Dabei erkennt das Immunglobulin zwei Polypeptide mit einer Größe von 34 kDa (Kilodalton) bzw. 39 kDa, die dem epithelspezifischen Antigen entsprechen. Das Glykoprotein EpCAM wird von den meisten benignen Epithelzellen und Tumoren epithelialen Ursprungs auf der Membran und im Zytoplasma exprimiert. Auch Magenkarzinomzellen sind in einem hohen Prozentsatz Ber-EP4-immunoreaktiv (Lacza et al. 1990, Went et al. 2006). In diesem Kontext ist für die vorliegende Studie zudem die Beobachtung wichtig, dass der Primärantikörper nicht mit mesenchyalem oder lymphatischem Gewebe reagiert (Lacza et al. 1990, Momburg et al. 1987, Sheibani et al. 1991, Went et al. 2004). Nach Abschluss der immunenzymatischen Reaktionsschritte zeigen die Antigen-positiven Zellen ein membranöses und zytoplasmatisches Färbemuster. Der EpCAM-Antikörper ist laut Herstellerangaben für immunhistochemische Detektionsverfahren in formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe geeignet. Zusammenfassend ergeben sich bei Einsatz von Ber-EP4 ideale Voraussetzungen für den Nachweis mikrometastatischer Magenkarzinomzellen in lymphatischem Umgebungsgewebe.

Bevor die gewebehaltigen Paraffinblöcke bearbeitet werden konnten, mussten sie auf einer Eisplatte für mindestens 30 Minuten gekühlt werden, damit ein Zustand erreicht wurde, der die Anfertigung ausreichend dünner und qualitativ hochwertiger Schnitte mit einem

Mikrotom ermöglichte. Entsprechend der Empfehlung von Turner et al. (1999) wurden pro Präparat in zwei 40 µm voneinander entfernten Ebenen jeweils 4 µm dünne Gewebeschnitte hergestellt. In einem 37 Grad Celsius warmen Wasserbad entfalteten sich die Präparate zurück in ihre Ausgangsgröße und Form und konnten dann auf Objektträger aufgebracht werden. Diese wiesen eine Silan-Beschichtung auf, die während des gesamten Färbeprozesses den Verbleib des Gewebes auf dem Objektträger gewährleistete. Die Präparate wurden anschließend über Nacht bei 37 Grad Celsius dehydriert.

Vor dem eigentlichen Färbeprozess der Gewebeschnitte waren mehrere Vorbehandlungsschritte notwendig. Dafür wurden die Präparate zunächst deparaffinisiert, indem sie 20 Minuten in einem frischen Xylol-Bad verblieben, eine Minute in einem weiteren Xylol-Bad und dann jeweils zwei Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96% und 70% Äthanol) inkubiert wurden. Die Rehydrierung erfolgte in demineralisiertem Wasser und anschließend in einer Tris-gepufferten Salzlösung. Dieser TBS (Tris-buffered saline) genannte Puffer konnte als Waschflüssigkeit verwendet, aber auch zur Verdünnung der Antikörper eingesetzt werden. Die zwischen den einzelnen Teilschritten durchgeführten Waschvorgänge dienten dazu, nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper mit der Pufferlösung vom Gewebe zu entfernen, um dadurch ein möglichst spezifisches Färberegebnis zu erhalten.

Während der Fixierung des Gewebes kommt es durch das Formalin zu einer Veränderung der dreidimensionalen Antigenstruktur und zu Aldehydvernetzungen. Damit trotzdem eine Antigen-Antikörper-Bindung möglich wurde, musste zuvor eine Antigendemaskierung durchgeführt werden. Diese kann je nach Epitop mit einer enzymatischen oder hitzeinduzierten Vorbehandlung des Gewebes erreicht werden. Im Falle des epithelialen Antigens dieser Studie führen beide Varianten zu einer Wiederherstellung der Antigen-Reaktivität. Für die Versuchsreihe der Mikrometastasen-Detektion wurde die enzymatisch-proteolytische Antigendemaskierung durchgeführt. Dabei inkubierte das Gewebe zehn Minuten in 0,1-prozentiger Proteaselösung bei 37 Grad Celsius und wurde anschließend dreimal in TBS-Puffer zur Unterbrechung der Proteolyse gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde das Gewebe zehn Minuten in einprozentigem Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert. Dadurch ergibt sich eine Absättigung unspezifischer elektrostatischer Ladungen und eine Reduktion hydrophober Wechselwirkungen zwischen Gewebeproteinen und Immunglobulinen, indem das BSA die hydrophoben Gewebestellen konkurrierend zum Primärantikörper blockiert. Eine weitere Maßnahme zur Reduzierung der hydrophoben Wechselwirkungen ist das Absenken der Oberflächenspannung des Wassers durch Zugabe des Detergens Tween 20 zum Puffer, der dadurch eine höhere Waschkraft erhält. Eine

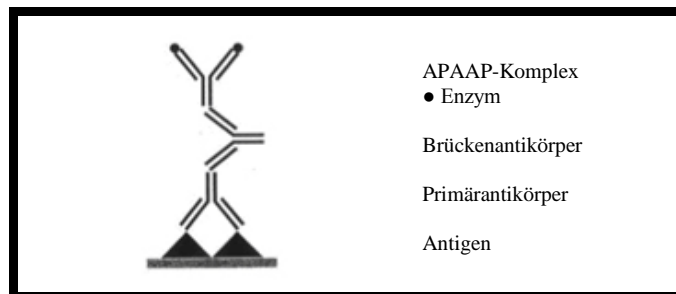
Reduktion der ionischen und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Gewebe und Antikörper wird mit Hilfe des Natriumchlorids im TBS-Puffer erreicht. Durch diese Maßnahmen konnten unspezifische Bindungen zwischen Immunglobulinen und Gewebe und die daraus resultierende unspezifische Hintergrundfärbung reduziert werden. Das BSA wurde anschließend nur abgeklopft, damit die Absättigung der Ladungen nicht wieder verloren ging.

Nach diesen Vorbehandlungen schloss sich der Einsatz der Antikörper an. Das hier verwendete Detektionssystem basierte auf der APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode), einem löslichen Enzym-Immunkomplex-Verfahren, das in drei Schritten (Farbentwicklung nicht mitgezählt) indirekt zur Visualisierung des Epitops führt (Abbildung 2.1). Als indirekte Verfahren werden die Nachweismethoden bezeichnet, bei denen nicht wie bei der direkten Ein-Schritt-Methode der Primärantikörper, sondern ein sekundärer oder tertiärer Antikörper mit einem Markerenzym oder Fluorochrom konjugiert ist. Ein wesentlicher Vorteil der indirekten gegenüber der direkten Methode ist die Möglichkeit, den Primärantikörper in einer höheren Verdünnung einzusetzen, da pro Antigenbindungsstelle mehr als ein Enzymmolekül vorhanden ist und gleichzeitig die Sensitivität des Nachweisverfahrens verbessert wird. Heute werden in der Immunhistochemie vermehrt die noch sensitiveren, biotinhaltigen Avidin-Biotin-Komplex- (ABC-) und Labeled-Streptavidin-Biotin- (LSAB-) Methoden eingesetzt. Bei einer immunhistochemischen Versuchsreihe zur Darstellung lymphogener Mikrometastasen ist jedoch das Fehlen von Biotin im APAAP-Immunkomplex von Vorteil, da endogenes Biotin in lymphatischem Gewebe vorkommen und die Ergebnisse negativ beeinflussen kann.

Zunächst wurde im ersten Schritt des Detektionsverfahrens der Primärantikörper Ber-EP4 auf den Gewebeschnitt aufgebracht. In dieser Untersuchungsreihe führte eine Antikörper-Verdünnung von 1:50 mit TBS-Puffer und eine 30-minütige Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur zu guten und konstanten Färbeergebnissen. Pro Gewebeschnitt wurden 80 µl der Antikörper-TBS-Pufferlösung aufgebracht. Anschließend folgte ein zweimaliger Waschschrift der Objekte in TBS-Puffer. In einem zweiten Schritt wurde ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper hinzugegeben. Es war wichtig, dass der Einsatz dieses zweiten Antikörpers im Überschuss erfolgte, damit während der folgenden 20-minütigen Inkubation Ber-EP4 nur eine der zwei Antigenbindungsstellen (Fab-Regionen) des Sekundärantikörpers besetzen konnte. Nach dem nächsten Waschvorgang wurde erneut über 20 Minuten inkubiert. Beim dritten Schritt reagierte der mit jeweils zwei Molekülen alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte dritte Antikörper als Enzym-Immunkomplex mit dem noch freien zweiten Fab-Arm des Sekundärantikörpers. Da der zweite Antikörper die Verbindung zwischen Primärantikörper und Enzym-Immunkomplex herstellt, wird er auch als



Brückenantikörper bezeichnet. Beim Einsatz des beschriebenen Systems müssen der Primärantikörper und das Immunglobulin des Enzym-Immunkomplexes aus derselben Tierspezies (hier Maus) stammen, damit der Brückenantikörper aus einer anderen Spezies (hier Kaninchen) mit beiden reagieren kann. Im Anschluss wurde erneut zweimal mit TBS-Puffer gewaschen.



**Abbildung 2.1:** Schema der APAAP-Methode mit Darstellung von Antigen, Primär- und Brückenantikörper sowie Enzym-Immunkomplex (APAAP-Komplex) (modifiziert nach Noll und Schaub-Kuhnen 2000, S. 16)

Der letzte Schritt des Detektionssystems war die Inkubation des antikörpergebundenen Enzyms AP mit einer Substrat-Chromogen-Lösung, die durch das Mischen von 25 Teilen AP-Substrat-Puffer und je einem Teil des aus drei verschiedenen Komponenten bestehenden Fast Red Chromogens (jeweils 28-fach konzentriert) hergestellt wurde. Zu diesem Zeitpunkt musste zusätzlich das einprozentige Levamisol-Hydrochlorid (1µl 501-fach konzentrierte Levamisol-Lösung pro 840µl Substrat-Chromogen-Lösung) zugefügt werden, das eine unspezifische Hintergrundfärbung durch Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase unterdrückt. Für die beste Farbqualität musste beachtet werden, dass die Substrat-Chromogen-Lösung sofort nach dem Ansetzen, spätestens jedoch nach 20 Minuten, verwendet wurde, da sonst die Intensität des Farbstoffes verloren ging. Enzyme beschleunigen chemische Reaktionen und werden daher zu den Katalysatoren dieser Abläufe gezählt. AP mit einem Molekulargewicht von 100 kDa wird aus Kälberdarm isoliert. Nach dem Aufbringen der Substrat-Chromogen-Lösung auf den Objektträger hydrolysiert die AP das Substrat Naphtholphosphatester in Phosphate und Phenolverbindungen. Die Phenole reagieren mit den farblosen Diazoniumsalzen (Chromogene) und bilden dann beispielsweise das hier verwendete kräftig rote Chromogen Fast Red. Nach 20 Minuten wurden die Lösung abgeklopft und die Objektträger mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Nach anschließendem zweiminütigen Verbleib in einem wässrigen Hämalaun-Bad (Hämatoxylin nach Mayer) folgte für weitere zwei Minuten die Spülung in demineralisiertem Wasser. Durch dieses „Bläuen“

konnte eine Gegenfärbung der Zellkerne erreicht werden. Das Gewebe wurde abschließend auf dem Objektträger mit einem wässrigen Medium und einem dünnen Glas eingedeckt.

Als Positivkontrolle wurde bei der hier beschriebenen Untersuchungsreihe ein bekanntermaßen durch Adenokarzinomzellen infiltrierter Lymphknoten und als Negativkontrolle ein im Rahmen einer gutartigen Erkrankung resezierter Lymphknoten mitgeführt.

Die Befundung aller in dieser Studie angefertigten Präparate erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. L. Füzesi, damaliger Leiter der Abteilung für Gastroenteropathologie des Universitätsklinikums Göttingen. Die Patienten, bei denen in mindestens einem Lymphknoten immunoreaktive Einzelzellen oder Zellcluster bis zu einem Durchmesser von maximal 0,2 cm nachweisbar waren, wurden als Mikrometastasen-positiv (MM+) gewertet. In dieser Arbeit wurde an einigen Stellen die Bezeichnung okkulte Tumorzellen synonym für Mikrometastase verwendet. Morphologische Kriterien blieben bei der Befundung der Mikrometastasen bewusst unberücksichtigt.

### **2.3.3 Phänotypische Charakterisierung der Mikrometastasen durch immun-histochemische Doppelfärbung mit Darstellung von EpCAM und p53**

Eine ergänzende phänotypische Charakterisierung der detektierten Zellen wurde mit der sequenziellen immunhistochemischen Doppelfärbung erreicht. Durch den Einsatz von zwei monoklonalen Primärantikörpern, die gegen spezifische Epitope in jeweils verschiedenen Zellkompartimenten gerichtet sind, und die Kennzeichnung dieser Antigene über unterschiedliche Chromogene mit einem guten Farbkontrast lassen sich zwei Antigene simultan visualisieren.

Für den epithelialen Antigennachweis wurde erneut der bei der initialen Detektion der Mikrometastasen beschriebene Primärantikörper Ber-Ep4 eingesetzt. Durch ihn ergab sich wieder die zytoplasmatisch-membranöse Zellfärbung. Die Darstellung des zweiten Antigens realisierte der monoklonale Maus-Antikörper DO-1, der eine Reaktion mit dem Tumorsuppressorprotein p53 eingeht. Dieser p53-Antikörper (Klon DO-1, Isotyp IgG2a) richtet sich gegen ein aus 393 Aminosäuren bestehendes nukleäres Phosphoprotein mit einer Molekülmasse von 53 kDa. DO-1 erkennt fixationsresistente Epitope an den N-terminalen Aminosäuren 37 und 45. Der Antikörper reagiert prinzipiell sowohl mit dem in gesunden humanen Zellen vorhandenen p53-Wildtyp als auch mit dem Protein, das von einem mutierten TP53-Gen codiert wird. Das Wildtyp-Protein entzieht sich aber wegen seiner kurzen Halbwertszeit dem immunenzymatischen Nachweis. Mutationen von TP53 führen hingegen zu Proteinen, die durch Änderung des molekularen Aufbaus und durch eine verlängerte Halb-

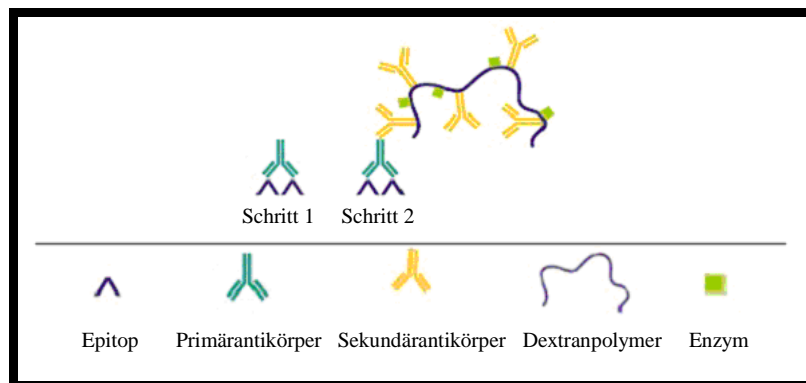
wertszeit aufgrund einer höheren Stabilität akkumulieren und so detektabel werden (Vojtěšek et al. 1992). Die genetischen Veränderungen haben eine Inaktivierung und einen Verlust der Kontrollfunktion des Tumorsuppressors zur Folge. TP53-Mutationen können in vielen malignen Neoplasien - darunter auch beim Magenkarzinom - beobachtet werden (Bártek et al. 1991).

Nachdem nachgewiesen worden war, in welchen Lymphknoten Mikrometastasen existierten, mussten für die praktische Durchführung der sequenziellen immunhistochemischen Doppelfärbung Gewebeschnitte vorliegen, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit eine erneute Detektion dieser Zellen ermöglichten. Hierfür wurden neun histologische Präparate verwendet, die bereits zuvor jeweils aus dem Lymphknotenareal hergestellt worden waren, das zwischen den beiden Ebenen für den initialen MM-Nachweis lag. Ein nachträgliches Anschneiden der MM-positiven Gewebelöcke wäre aus Gründen der Mikrotom-Schnitttechnik problematisch gewesen, da einige Ansätze mit dem Messer nötig sind, bis ein planes Areal für einen qualitativ hochwertigen Schnitt vorliegt. Bei diesem Vorgehen hätte sich daher die Gefahr vergrößert, dass der Lymphknotenbereich mit den gesuchten Zellen bei der Präparation verloren geht.

Zu Beginn wurden die Gewebeschnitte wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben deparaffinisiert und rehydriert. Beide nachzuweisenden Epitope benötigen in formalinfixierter Form eine Antigendemaskierung. Sowohl für EpCAM als auch für p53 eignet sich die hitzeinduzierte Demaskierung in einem Mikrowellenofen. Die Objektträger wurden in einer Plastikkuvette, die mit einer geeigneten Puffer-Lösung („Target Retrieval Solution“) gefüllt war, bei 800 Watt bis nahe dem Siedepunkt erhitzt (95-99 Grad Celsius). Diese Temperatur wurde dann dreimal fünf Minuten bei 600 Watt gehalten. In den Pausen musste verdunsteter Puffer durch destilliertes Wasser ersetzt werden, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern. Für die Einhaltung standardisierter Bedingungen wurde jede Küvette immer mit derselben Anzahl an Objektträgern bestückt und grundsätzlich in der Mitte des Ofens platziert. Nach dieser Hitzebehandlung waren die durch Formalinfixierung entstandenen Proteinvernetzungen aufgehoben und die Immunreaktivität der Epitope wieder hergestellt. Nach langsamem Abkühlen folgten der Austausch der Target-Retrieval-Lösung gegen TBS-Puffer und zwei Waschschrte.

Die immunhistochemische Doppelfärbung basierte auf der Polymerkonjugat-Methode (Abbildung 2.2). Dabei kommen Dextran-Trägermoleküle (Polysaccharide) zum Einsatz, an die Enzyme und Antikörper gekoppelt sind. In dieser Versuchsreihe wurde das von seinem Hersteller als EnVision™ bezeichnete Verfahren benutzt, bei dem das Polysaccharid-Grundgerüst mit Enzymmolekülen und Ziegen-Sekundärantikörpern gegen Maus- oder

Kaninchen-Immunglobuline konjugiert ist. Dieser Komplex markiert ein nachzuweisendes Epitop über die Reaktion des Sekundärantikörpers mit dem an das Antigen gekoppelten Primärantikörper. Die wesentlichen Vorteile dieser Methode sind die hohe Sensitivität und die Zeitersparnis, die sich im Vergleich zur Drei-Schritt-APAAP-Methode aus einer reduzierten Anzahl an Versuchsschritten ergibt. Das EnVision™-System ermöglichte die sequenzielle Detektion und abschließend die simultane Darstellung zweier Zellantigene. Dabei wurden nacheinander mit jeweils unterschiedlichen Enzymen konjugierte Dextranpolymere eingesetzt und die Visualisierungen der Epitope wieder nach den Enzym-Substrat- und Chromogen-Reaktionen abgeschlossen.



**Abbildung 2.2:** Schema der EnVision™-Methode mit Darstellung von Epitop, Primärantikörper, Enzym- und Sekundärantikörper-konjugiertem Dextranpolymer als Trägergerüst (modifiziert nach Boenisch 2003, S. 39)

Die Gewebeschnitte wurden zur Verringerung unspezifischer Färbungen 15 Minuten in einer feuchten Kammer mit einprozentigem BSA inkubiert und das Rinderserumalbumin dann anschließend nur abgeklopft.

Für die Beurteilung des besten Chromogen-Farbkontrastes wurden Versuchsreihen mit wechselnder Reihenfolge der beiden Primärantikörper durchgeführt. Da die Abfolge der roten und braunen Chromogene in dem Versuchsprotokoll unverändert blieb, ergaben sich zwei mögliche Kombinationen der Zellfärbung: 1. Kern braun / Zytoplasma und Membran rot, 2. Kern rot / Zytoplasma und Membran braun.

Bei der Darstellung des ersten Antigens wurde für die Farbestehung das Enzym Peroxidase aus dem Meerrettich (HRP) mit einem Molekulargewicht von 40 kDa verwendet. Im Gewebe musste zur Vermeidung einer unspezifischen Hintergrundfärbung eine möglicherweise vorhandene endogene Peroxidase-Aktivität mit einem Peroxidase-Block (0,03% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Natriumazid) eliminiert werden. Die Hemmung der endogenen enzymatischen Aktivität kommt dadurch zustande, dass der Komplex aus Peroxidase und im

Überschuss vorhandenem  $H_2O_2$  in Abwesenheit einer chromogenen Substanz blockiert ist. Die Gewebeschnitte mussten fünf Minuten mit dem Peroxidase-Block behandelt, anschließend vorsichtig mit dem Waschpuffer abgespült und in ein frisches Pufferbad gestellt werden. Die dann eingeleitete 40-minütige Inkubation mit dem ersten Primärantikörper (Ber-EP4 1:50 bzw. DO-1 1:100 mit TBS-Puffer verdünnt) führte im Folgenden zu qualitativ sehr guten Ergebnissen. Erneut wurde gewaschen und dann 30 Minuten mit den HRP- und Sekundärantikörper-konjugierten Polymeren in der feuchten Kammer inkubiert. Nach zwei Waschvorgängen erfolgte anschließend das Auftragen der gepufferten Substrat-Chromogen-Lösung. Nach Bildung eines Enzymsubstratkomplexes entstand durch die Elektronendonator-Oxidation das 3,3'-Diaminobenzidin (DAB+), ein braunes Farbprodukt am Locus des ersten Epitops.

Vor Beginn der zweiten Färbung kam für drei Minuten ein so genannter „Doublestain Block“ zum Einsatz, der die Gefahr nachfolgender Kreuzreaktionen zwischen Immunglobulinen verhindert. Dabei wurden die kompletten Antikörper-Dextranpolymer-Komplexe vom Gewebe entfernt, und nur das DAB+-Chromogen blieb zurück.

Nach Spülung in destilliertem Wasser begannen die Versuchsschritte zur Darstellung des zweiten Epitops. Die Blockierung des Gewebes mit einprozentigem BSA dauerte erneut fünf Minuten, bis danach die Flüssigkeit wieder abgeklopft werden musste. Der zweite Primärantikörper wurde anschließend aufgetragen und 40 Minuten in der feuchten Kammer mit dem Gewebe inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TBS-Puffer folgte die Applikation der mit alkalischer Phosphatase markierten Polysaccharid-Grundgerüste. 30 Minuten später schlossen sich erneut zwei Waschschritte an. Danach entwickelte sich über 20 Minuten das Chromogen Fast Red (Details siehe oben). Die histologischen Präparate wurden in demineralisiertem Wasser gespült, die Zellkerne des Umgebungsgewebes mit Hämatoxylin blau gegengefärbt und abschließend in einem wässrigen Medium eingedeckt.

Als Positivkontrolle dieser Untersuchungsreihe diente das Mitführen gastrointestinalen Karzinomgewebes mit bekannter p53-Überexpression und als Negativkontrolle ein im Rahmen einer gutartigen Erkrankung resezierter Lymphknoten.

Bei der histopathologischen Befundung wurden diejenigen Zellen als p53-positive Mikrometastasen gewertet, die sowohl eine positive zytoplasmatisch-membranöse Ber-EP4- als auch eine nukleäre p53-Reaktion aufwiesen. Bei Tumorzellclustern reichte eine Immunoreaktivität in mindestens einer der Zellen für eine positive p53-Klassifikation aus. Der p53-Status des korrespondierenden Primärtumors war zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt.

### **2.3.4 Immunhistochemischer Nachweis von p53-Akkumulationen im**

#### **Primärtumor**

Für die Gegenüberstellung des p53-Status der Lymphknotenmikrometastasen mit der p53-Expression des Primärtumors musste auch das Magenkarzinomgewebe mit einem immunhistochemischen Detektionsverfahren auf eine p53-Akkumulation untersucht werden. Es wurden nur die Primärtumoren bearbeitet, deren Mikrometastasen mit der Doppelfärbung auch erneut dargestellt werden konnten.

Analog zu den bereits im Detail erläuterten Versuchsschritten wurden hierfür die archivierten Präparate identifiziert und aus den Paraffinblöcken Gewebeschnitte hergestellt. Nach hitzeinduzierter Antigendemaskierung folgte die Inkubation des Tumorgewebes mit dem Primärantikörper DO-1. Der Einsatz des APAAP-Detektionssystems sowie die farbliche Markierung des Epitops durch das Chromogen Fast Red (detaillierte Versuchsschritte siehe Kapitel 2.3.2) schlossen diesen praktischen Teil ab.

Die Befundung erfolgte nach dem Vorschlag von Baas et al. (1994). Dabei wurde ein Markierungsindex verwendet, der sich aus dem prozentualen Anteil p53-positiver Zellen im Tumorgewebe ergibt. Eine hoher Index liegt bei  $\geq 30\%$ , ein niedriger bei  $1\%$  bis  $< 30\%$  und ein negativer bei  $< 1\%$  positiven Tumorzellen vor. Während der Beurteilung des Primärtumors war der p53-Status der Mikrometastasen nicht bekannt.

### **2.3.5 Dokumentation und biometrische Statistik**

Die prospektive Erfassung der Patientendaten (siehe Kapitel 2.2, Tabelle 2.1, S. 15) erfolgte über standardisierte Dokumentationsbögen. Die mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2000 verwaltete Datenbank wurde dann im weiteren Studienverlauf durch die Ergebnisse der retrospektiven Untersuchungen ergänzt.

Die statistische Auswertung der Studiendaten wurde unter Aufsicht der Abteilung für Medizinische Statistik der Universität Göttingen (damaliger Leiter Prof. Dr. E. Brunner) und mit Hilfe der Software Statistica 6.0 durchgeführt.

Bei der deskriptiven Statistik wurden die Daten der qualitativen Merkmale als absolute Zahlen und mit Prozentangaben zur Stichprobe erfasst. In einigen Fällen ergeben die Additionen der Patientenzahlen der Faktor-Ausprägungen nicht die exakte Größe des Gesamtkollektivs, da die klinisch-pathologischen Befunde nicht bei allen Patienten vollständig erhoben werden konnten. Geringe Abweichungen der Summen der Prozentwerte von 100% der Stichprobe oder der Subkollektive sind auf mathematische Rundungen auf die erste Dezimalstelle nach dem Komma zurückzuführen. Des Weiteren wurde der Faktor

Patientenalter als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern beziehungsweise als Median mit Bereich in Klammern angegeben.

Die Untersuchung der Verteilung prognostischer Faktoren erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test, dem exakten Test nach Fisher und dem t-Test. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert kleiner oder gleich 0,05 festgesetzt.

Für die beurteilende Teststatistik zur prognostischen Relevanz der Merkmale wurden die spezifischen Überlebenszeiten und Überlebensraten nach der Kaplan-Meier-Methode dargestellt und die vergleichenden Überlebenszeitanalysen mit dem Log-Rank-Test und dem Gehan-Wilcoxon-Test vorgenommen.

In einer abschließenden multivariaten Analyse wurde getestet, ob die Mikrometastasen innerhalb des pN0-Patientenkollektivs einen von anderen signifikanten Faktoren unabhängigen prognostischen Einfluss auf die Überlebenszeit hatten. Dafür mussten zunächst die klassischen Merkmale auf eine univariate prognostische Relevanz überprüft werden. Zusammen mit der Einflussgröße Mikrometastase erfolgte dann der Einschluss derjenigen Parameter mit einem p-Wert gleich oder kleiner 0,20 in das Cox Proportional Hazards Model. Bei dieser Überlebenszeitanalyse wurden dann schrittweise Faktoren mit einem p-Wert größer 0,20 entfernt.

## 2.3.6 Material

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Human Epithelial Antigen, Clone Ber-EP4, Code N1554	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
APAAP / Red ChemMate™ Detektionskit, Code K5000 - Kaninchen-Anti-Maus-Brückenantikörper - APAAP-Immunkomplex - Chromogen Red 1,2,3 (Fast Red) - AP Substrat-Puffer - Levamisole	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
Aquatex-Eindeckmittel	Merck, Darmstadt, Deutschland
1% BSA (Bovine Serum Albumin)	Paesel und Lorei, Frankfurt, Deutschland
DAKO EnVision™ Doublestain System, Code K1395 - Peroxidase-Block - HRP- u. Ziege-Anti-Maus-konjugierte Polymere - Substratpuffer für DAB+ - DAB+-Chromogen - Doublestain Block (Elutionsreagenz) - AP- u. Ziege-Anti-Maus-konjugierte Polymere - Substratpuffer für Fast Red - Fast Red Chromogen	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
Hämatoxylin nach Mayer, Code S3309	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
Microsoft Excel 2000	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
p53-monoklonaler Antikörper, Clone DO-1, Cat.No. 1767	Immunotech, Marseille, Frankreich
Protease Typ XXIV	Sigma, Steinheim, Deutschland
Statistica 6.0	StatSoft GmbH, Hamburg, Deutschland
Target Retrieval Lösung, Code S1699	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
TBS-Puffer: 2-Liter-Gebrauchslösung: 2l demineralisiertes Wasser, 12g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), 18g Natriumchlorid, ggf. 2N Salzsäure für Einstellung auf pH 7,4, 500µl Tween 20	Eigene Herstellung
Tween 20	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

**Tabelle 2.2:** Material mit Herstellerangabe

## 2.3.7 Ethik und Datenschutz

In Übereinstimmung mit den vom Weltärztebund 1964 in der Deklaration von Helsinki erstmals formulierten ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen wurden in der vorliegenden Studie die international anerkannten ethischen und wissenschaftlichen Regeln klinischer Studien eingehalten. Die für die statistischen Auswertungen verwendete Patienten-Datenbank mit persönlichen Angaben und klinischen Befunden wurde in anonymisierter Form erstellt.

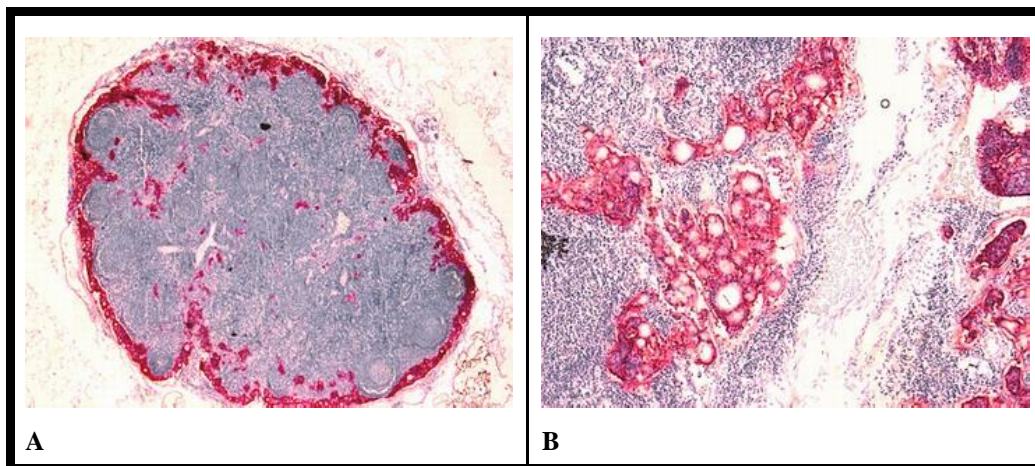


### **3 Ergebnisse**

Aus dem Kollektiv der 177 an einem Magenkarzinom operierten Patienten mussten zunächst die Fälle ausgeschlossen werden, für die sich retrospektiv keine relevanten Daten erheben ließen. Dabei handelte es sich um acht Patienten des pN0-Subkollektivs, deren Lymphknotenresektate im Archiv nicht zur Verfügung standen, und weitere acht ohne Informationen über den Verlauf ihrer Erkrankung. Für die Studie verblieb somit ein aus insgesamt 161 Patienten bestehendes Gesamtkollektiv. Nach den Ergebnissen der histologischen Routinediagnostik waren 105 Patienten (65,2%) lymphogen makrometastasiert (Stadium pN+) und 56 Patienten (34,8%) nodal frei von Metastasen (Stadium pN0).

#### **3.1 Nachweis lymphogener Mikrometastasen**

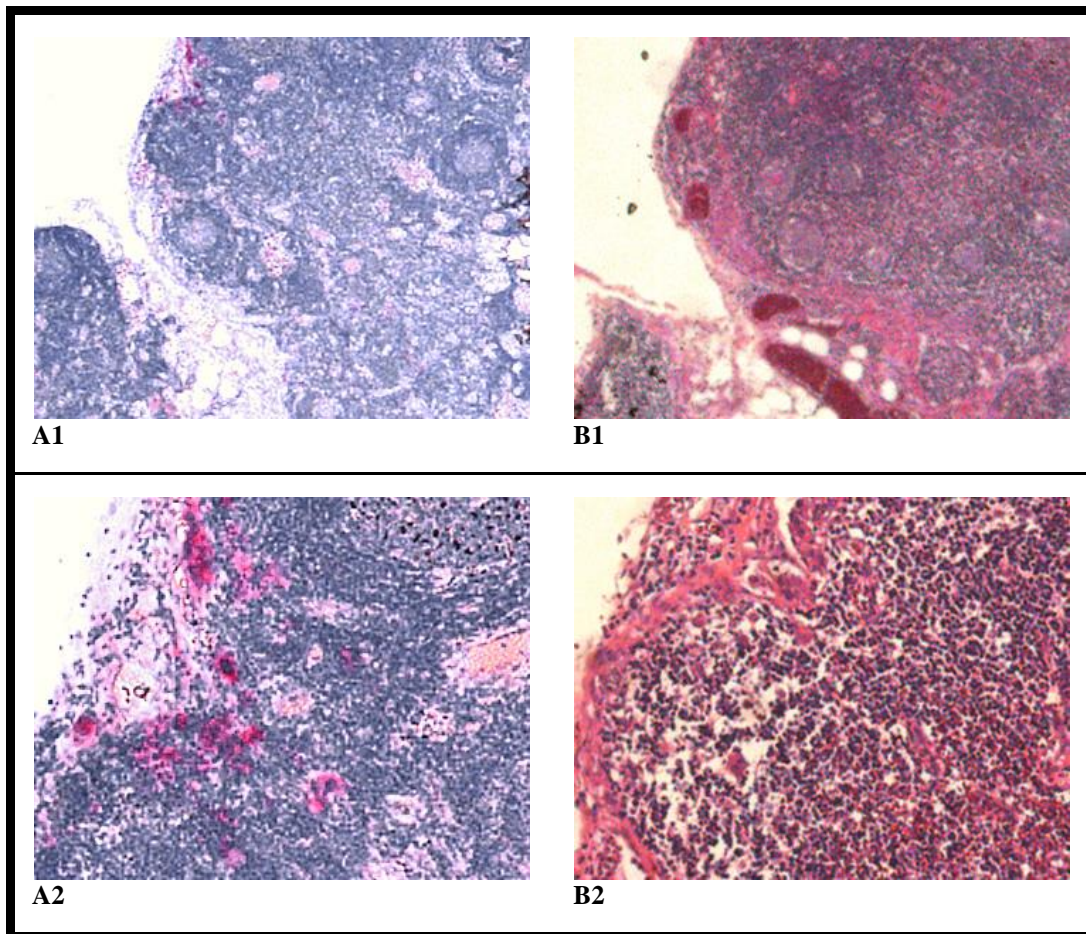
Die technische Durchführung des immunhistochemischen Färbeprotokolls erwies sich als zuverlässig, da die Karzinomzellen der Positivkontrollen nach Markierung mit dem Antikörper Ber-EP4 eine konstant reproduzierbare, leuchtend rote membranös-zytoplasmatische Färbung zeigten (Abbildung 3.1) und die Negativkontrollen ungefärbt blieben.



**Abbildung 3.1:** Positivkontrolle der Ber-EP4-Färbung.  
Magenkarzinomzellen in pN+-Lymphknoten mit dem Primärantikörper Ber-EP4 markiert und dem Chromogen Fast Red gefärbt.  
**A:** 25fache Vergrößerung **B:** 100fache Vergrößerung

Nach Befundung der 1148 aufgearbeiteten Lymphknoten konnte gezeigt werden, dass sich in der pN0-Untergruppe bei 33 der 56 Patienten (58,9%) in mindestens einem der analysierten Lymphknoten Ber-EP4-positive Einzelzellen oder Zellcluster mit einem Durchmesser von nicht mehr als 0,2 cm befanden (Abbildungen 3.2, 3.3, 3.4). Diese Patienten wurden in das

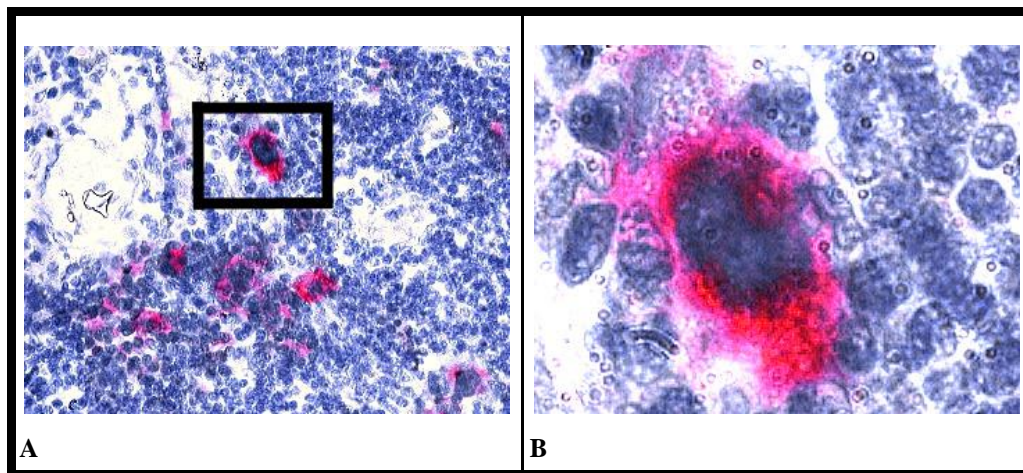
Subkollektiv Mikrometastasen-positiv (MM+) eingeordnet. Die restlichen 23 Fälle (41,1%) boten auch nach der Immunhistochemie keinen Hinweis auf Metastasen in ihren regionären Lymphknoten und gehörten somit zur Mikrometastasen-negativen Gruppe (MM-).



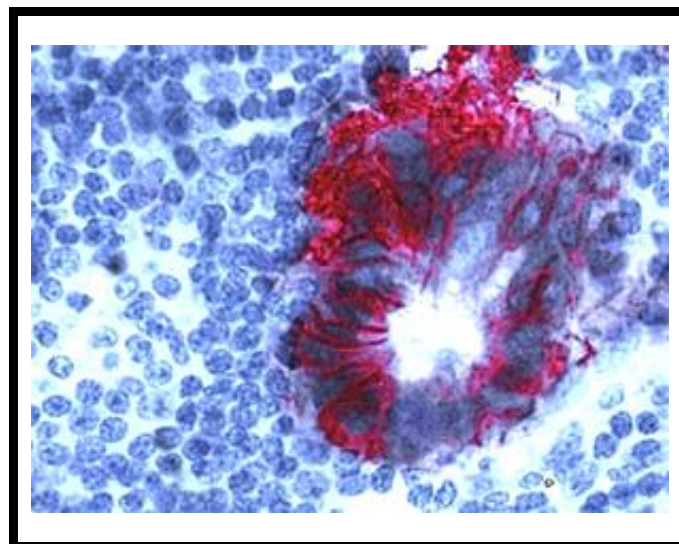
**Abbildung 3.2:** Ber-EP4-positive Zellen in einem histologisch nodal-negativ befundenen regionären Lymphknoten eines Magenkarzinoms.

**Linke Spalte:** immunhistochemische Färbung  
**A1:** 25fache Vergrößerung  
**A2:** 100fache Vergrößerung

**Rechte Spalte:** korrespondierender HE-Schnitt  
**B1:** 25fache Vergrößerung  
**B2:** 100fache Vergrößerung



**Abbildung 3.3:** Ber-EP4-positive Zelle.  
Vergrößerungen aus Abbildung 3.2/A2.  
**A:** 400fache Vergrößerung  
(Milsmann et al. 2008, Abbildung 2 a)  
**B:** 1000fache Vergrößerung (Ausschnitt)  
(Horstmann et al. 2004, Abbildung 1 D)



**Abbildung 3.4:** Ber-EP4-immunoreaktiver Tumorzellcluster mit roter membranöser und zytoplasmatischer Zellfärbung in ursprünglich metastasenfrem befundetem Lymphknoten. Ausschnitt aus 400facher Vergrößerung.

Einen Überblick über die Verteilung der Patienten des Gesamtkollektivs auf die lymphogenen Metastasierungsformen dieser Studie (histologisch Makrometastasen, immunhistochemisch Mikrometastasen, immunhistochemisch keine Mikrometastasen) gibt Tabelle 3.1. Tabelle 3.2 zeigt den Anteil der Subkollektive MM+ und MM- an der Gruppe der histologisch nodal-negativen Patienten.

pN-Stadium		Anzahl (n = 161)	Prozent
pN+		105	65,2
pN0	MM+	33	20,5
	MM-	23	14,3

**Tabelle 3.1:** Verteilung der Patienten des Gesamtkollektivs auf die drei Gruppen der Lymphknotenmetastasierung: histologisch Makrometastasen (pN+), immunhistochemisch Mikrometastasen (MM+) und immunhistochemisch keine Mikrometastasen (MM-)

pN0-Stadium		Anzahl (n = 56)	Prozent
MM+		33	58,9
MM-		23	41,1

**Tabelle 3.2:** Verteilung der pN0-Patienten auf die Subkollektive mit (MM+) und ohne lymphogene Mikrometastasen (MM-)

### **3.2 Zusammenhang zwischen klassischen prognostischen Faktoren und Lymphknotenmetastasen**

Für die Beurteilung eines Zusammenhanges zwischen den Ausprägungen der klinischen, chirurgischen sowie histopathologischen Faktoren und dem Auftreten lymphogener Metastasen wurden initial alle Patienten des Gesamtkollektivs auf diese klassischen prognostischen Parameter untersucht.

Zunächst erfolgte die Darstellung der Verteilung der Ausprägungen folgender zwölf Merkmale auf die Untergruppen pN+, MM+ und MM- der Zielgröße: Alter (Mittelwert mit Standardabweichung), Geschlecht (männlich versus (vs.) weiblich), Tumorlokalisation (proximal, Mitte vs. distal), Therapieintention (kurativ vs. palliativ), pT-Stadium (pTis, pT1, pT2 vs. pT3, pT4), UICC-Stadium (0, II, II vs. III, IV), R-Stadium (R0 vs. R1, R2), Grading (G2 vs. G3), Laurén-Typ (intestinal vs. diffus), multiviszerales Resektion, Infiltration von Nachbarorganen und Infiltration von Nachbarstrukturen (jeweils ja vs. nein) (Tabelle 3.3). Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich bei der Verteilung der Ausprägungen des Patientenalters, der Lokalisation des Primärtumors im Magen und der histopathologischen Einteilung nach Laurén auf die drei Kollektive ( $p > 0,20$ ). Mit einer Tendenz zur Signifikanz konnten das Geschlecht, die multiviszerales Resektion und die R-Klassifikation gewertet werden ( $0,05 < p \leq 0,20$ ). Sicher statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ) waren die Unterschiede bei den Aufteilungen folgender Einflussgrößen auf die Zielgröße: Therapieintention, Infiltrationen von Nachbarstrukturen und Nachbarorganen, pT-Stadium, UICC-Stadium und zellulärer Differenzierungsgrad (Grading). Diese Unterschiede bestanden nicht zwischen den Gruppen MM+ und MM-, sondern waren allein dadurch zu erklären, dass die pN+-Patienten signifikant häufiger ungünstige Prognosekriterien aufwiesen (p-Werte nicht gezeigt).

<b>Faktoren</b>	<b>pN+</b> (n = 105)	<b>MM+</b> (n = 33)	<b>MM-</b> (n = 23)	<b>p-Wert</b>
<b>Alter</b> Jahre ( $\bar{x}$ , SD)	62,9 ( $\pm$ 11,3)	62,5 ( $\pm$ 11,6)	64,5 ( $\pm$ 13,4)	0,89
<b>Geschlecht</b> männlich (n = 107) weiblich (n = 54)	61 (57,0%) 44 (81,5%)	27 (25,2%) 6 (11,1%)	19 (17,8%) 4 (7,4%)	0,09
<b>Tumorlokalisation</b> proximal, Mitte (n = 128) distal (n = 32)	85 (66,4%) 19 (59,4%)	26 (20,3%) 7 (21,9%)	17 (13,3%) 6 (18,8%)	0,68
<b>Therapieintention</b> kurativ (n = 127) palliativ (n = 34)	75 (59,1%) 30 (88,2%)	30 (23,6%) 3 (8,8%)	22 (17,3%) 1 (2,9%)	0,006
<b>pT-Stadium</b> pTis, pT1, pT2 (n = 104) pT3, pT4 (n = 57)	56 (53,8%) 49 (86,0%)	28 (26,9%) 5 (8,8%)	20 (19,2%) 3 (5,3%)	0,0002
<b>UICC-Stadium</b> 0, I, II (n = 77) III, IV (n = 83)	25 (32,5%) 80 (96,4%)	30 (39,0%) 2 (2,4%)	22 (28,6%) 1 (1,2%)	0,0001
<b>R-Stadium</b> R0 (n = 142) R1, R2 (n = 18)	88 (62,0%) 16 (88,9%)	31 (21,8%) 2 (11,1%)	23 (16,2%) 0 (0%)	0,06
<b>Grading</b> G2 (n = 51) G3 (n = 108)	26 (51,0%) 78 (72,2%)	12 (23,5%) 20 (18,5%)	13 (25,5%) 10 (9,3%)	0,05
<b>Laurén-Typ</b> intestinal (n = 64) diffus (n = 70)	38 (59,4%) 44 (62,9%)	15 (23,4%) 17 (24,3%)	11 (17,2%) 9 (12,9%)	0,54
<b>Multiviszerele Resektion</b> nein (n = 80) ja (n = 80)	46 (57,5%) 59 (73,8%)	21 (26,3%) 12 (15,0%)	13 (16,3%) 9 (11,3%)	0,09
<b>Infiltration von Nachbarorganen</b> nein (n = 117) ja (n = 43)	68 (58,1%) 37 (86,1%)	28 (23,9%) 5 (11,6%)	21 (17,9%) 1 (2,3%)	0,003
<b>Infiltration von Nachbarstrukturen</b> nein (n = 119) ja (n = 41)	70 (58,8%) 35 (85,4%)	29 (24,4%) 4 (9,8%)	20 (16,8%) 2 (4,9%)	0,008

**Tabelle 3.3:**

Magenkarzinom-Gesamtkollektiv (n = 161), unterteilt in die Subkollektive der lymphogenen Metastasierung, mit Darstellung der Ausprägungen klassischer prognostischer Faktoren. Prozentangaben beziehen sich auf die n-Werte (Fallzahlen) der differenzierten Faktoren.

$\bar{x}$  = Mittelwert, SD = Standard Deviation (Standardabweichung)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Ber-EP4-positive Zellen und somit mutmaßliche Tumorzellen, die mit dem Routineverfahren der Histopathologie unerkannt geblieben waren, in regionären Lymphknoten des Magenkarzinoms existierten, sollten nun die Subkollektive MM+ und MM- direkt miteinander verglichen werden. Für die Analyse des Einflusses der klassischen prognostischen Faktoren auf die Bildung von Mikrometastasen wurden die in Tabelle 3.3 gezeigten Ausprägungen auf Unterschiede ihrer Verteilungen in diesen beiden Gruppen untersucht. Rein prozentual betrachtet wurden sie bei folgenden Ausprägungen häufiger diagnostiziert: weibliches Geschlecht der Patienten, proximale/mittlere Tumorklassifikation im Magen, palliative Therapieintention, pT-Klassifikation pT3/4, UICC-Stadium III/IV, R1/2-Status, zelluläre Entdifferenzierung G3, diffuser Laurén-Typ, multiviszerales Resektionsverfahren und Tumordinfiltrationen von Nachbarorganen und -strukturen. Es stellte sich aber heraus, dass keine dieser Beziehungen statistisch signifikant war (Tabelle 3.4).

<b>Faktoren</b>	<b>MM+ (n = 33)</b>	<b>MM- (n = 23)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Alter</b> Jahre ( $\bar{x}$ , SD)	62,5 ( $\pm$ 11,6)	64,5 ( $\pm$ 13,4)	0,55
<b>Geschlecht</b> männlich (n = 46) weiblich (n = 10)	27 (58,7%) 6 (60,0%)	19 (41,3%) 4 (40,0%)	0,93
<b>Tumorlokalisation</b> proximal, Mitte (n = 43) distal (n = 13)	26 (60,5%) 7 (53,8%)	17 (39,5%) 6 (46,2%)	0,67
<b>Therapieintention</b> kurativ (n = 52) palliativ (n = 4)	30 (57,7%) 3 (75,0%)	22 (42,3%) 1 (25,0%)	0,49
<b>pT-Stadium</b> pTis, pT1, pT2 (n = 48) pT3, pT4 (n = 8)	28 (58,3%) 5 (62,5%)	20 (41,7%) 3 (37,5%)	0,82
<b>UICC-Stadium</b> 0, I, II (n = 52) III, IV (n = 3)	30 (57,7%) 2 (66,7%)	22 (42,3%) 1 (33,3%)	0,75
<b>R-Stadium</b> R0 (n = 54) R1, R2 (n = 2)	31 (57,4%) 2 (100%)	23 (42,6%) 0 (0%)	0,22
<b>Grading</b> G2 (n = 25) G3 (n = 30)	12 (48,0%) 20 (66,7%)	13 (52,0%) 10 (33,3%)	0,16
<b>Laurén-Typ</b> intestinal (n = 26) diffus (n = 26)	15 (57,7%) 17 (65,4%)	11 (42,3%) 9 (34,6%)	0,69
<b>Multiviszzerale Resektion</b> nein (n = 34) ja (n = 21)	21 (61,8%) 12 (57,1%)	13 (38,2%) 9 (42,9%)	0,73
<b>Infiltration von Nachbarorganen</b> nein (n = 49) ja (n = 6)	28 (57,1%) 5 (83,3%)	21 (42,9%) 1 (16,7%)	0,72
<b>Infiltration von Nachbarstrukturen</b> nein (n = 49) ja (n = 6)	29 (59,2%) 4 (66,7%)	20 (40,8%) 2 (33,3%)	0,21

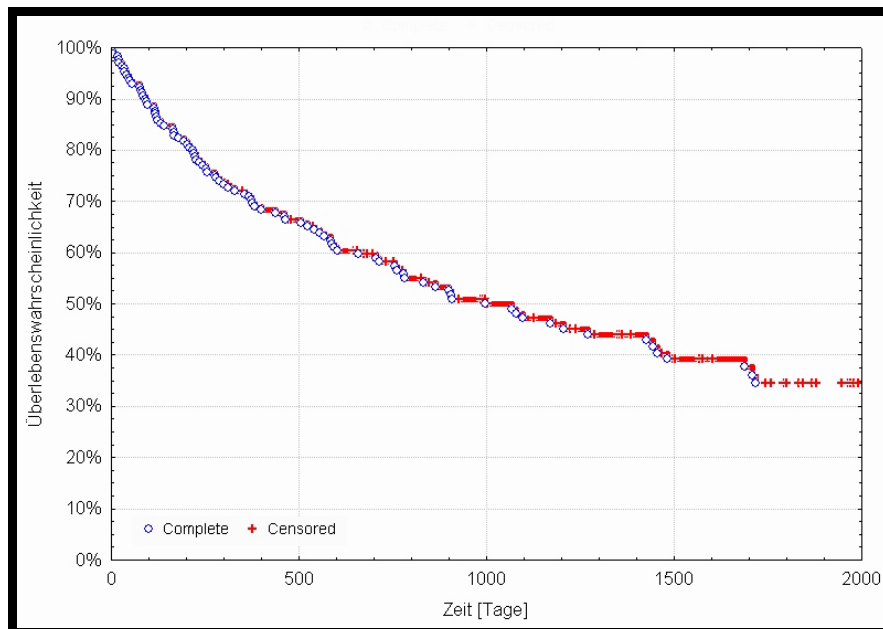
**Tabelle 3.4:**

pN0-Subkollektiv (n = 56) des Magenkarzinoms mit der Verteilung klassischer prognostischer Faktoren auf Patienten mit und ohne MM in regionären Lymphknoten. Prozentangaben beziehen sich auf die Fallzahlen der Ausprägungen.

$\bar{x}$  = Mittelwert, SD = Standard Deviation (Standardabweichung)  
(Horstmann et al. 2004, Tabelle 2)

### 3.3 Prognostische Relevanz der Mikrometastasen

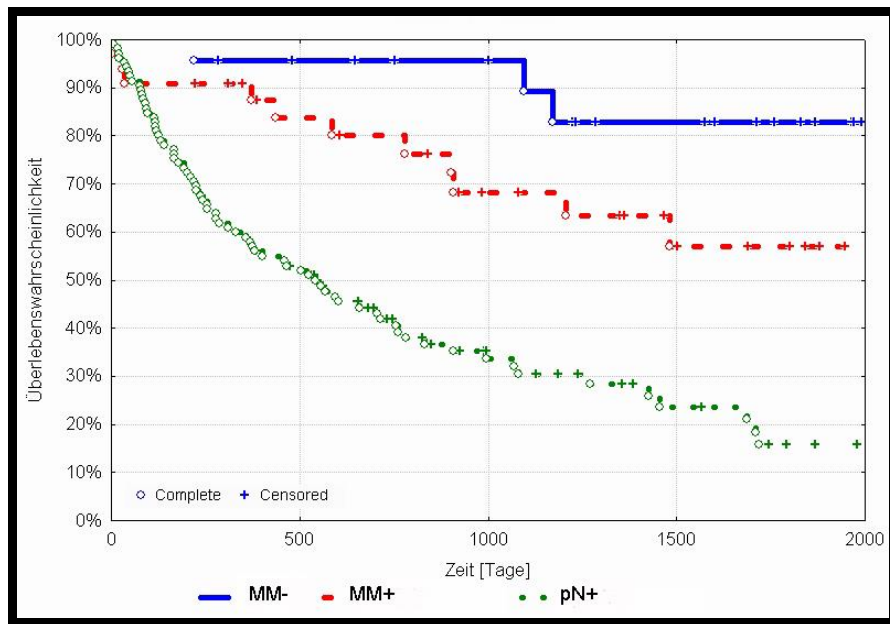
Die Auswertung der Nachsorgedaten ergab für das Gesamtkollektiv aus 161 Magenkarzinom-Patienten eine 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 35% (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5:** Überlebenskurve des Magenkarzinom-Gesamtkollektivs (n = 161) mit kumulativer 5-Jahres-Überlebensrate von 35% (Horstmann et al. 2004, Abbildung 2)

Die geringste 5-JÜR von 17% hatte das Subkollektiv mit bereits in der Routinediagnostik histologisch diagnostizierten Lymphknotenmetastasen (pN+). Gegenüber den beiden Untergruppen mit und ohne Mikrometastasen (MM+ und MM-) war dieser Überlebensnachteil jeweils statistisch hoch signifikant ( $p = 0,005$  bzw.  $p < 0,001$ ). Die 5-JÜR bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen in den konventionellen HE-Färbungen und Bestätigung dieses Status per Immunhistochemie lag bei 82%. Gegenüber diesen Patienten zeigten die Überlebenszeiten in der MM-positiven Gruppe mit einer auf 58% gesunkenen 5-JÜR einen ungünstigeren Krankheitsverlauf an. Dieser Unterschied lag mit einem p-Wert von 0,059 nur knapp außerhalb des statistischen Signifikanzniveaus von  $p \leq 0,05$  (Abbildung 3.6).

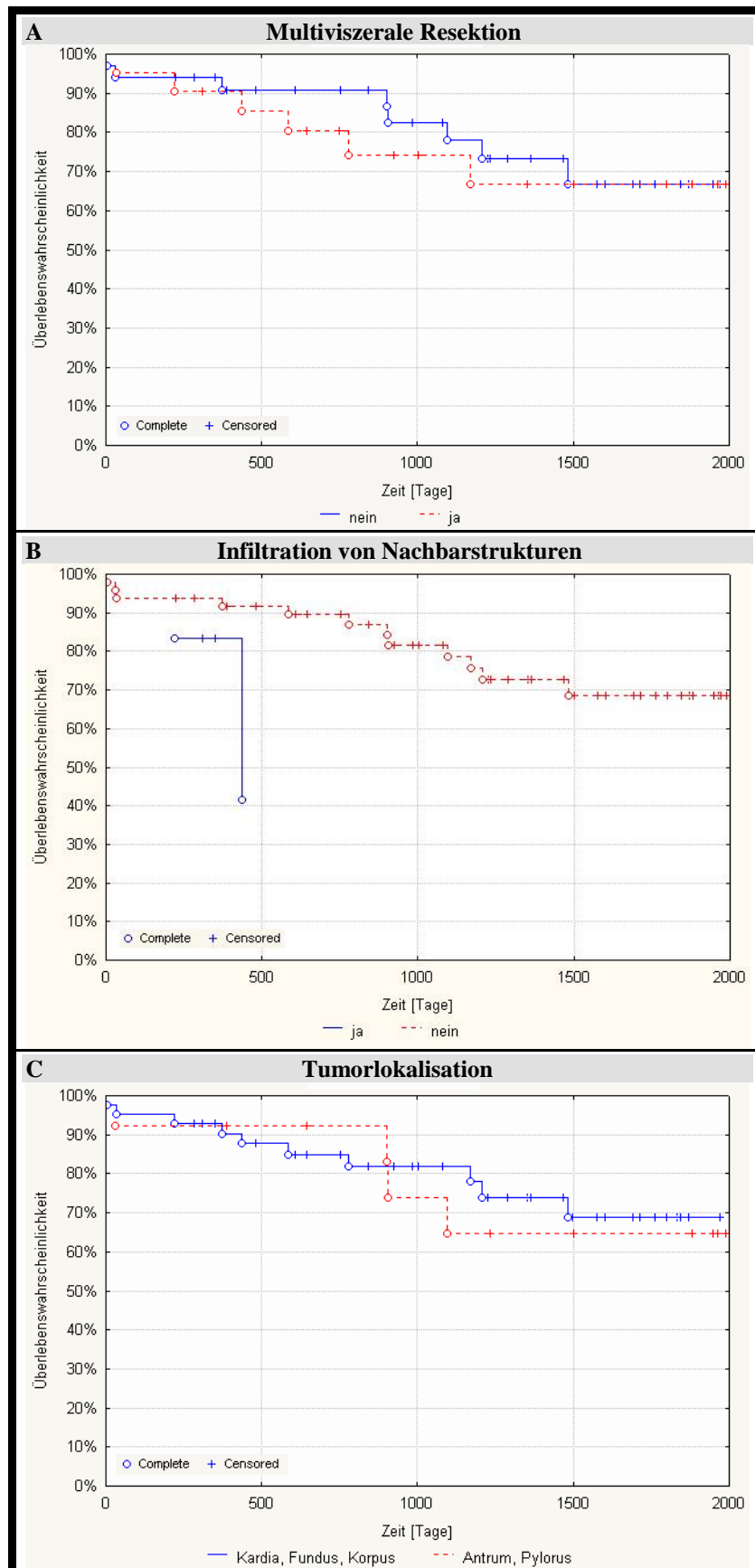




**Abbildung 3.6:** Überlebenskurven der Subkollektive pN+, MM+ und MM- mit kumulativen 5-Jahres-Überlebensraten:  
 - MM-: 82%  
 - MM+: 58%  
 - pN+: 17%  
 (nach Horstmann et al. 2004, Abbildung 3)

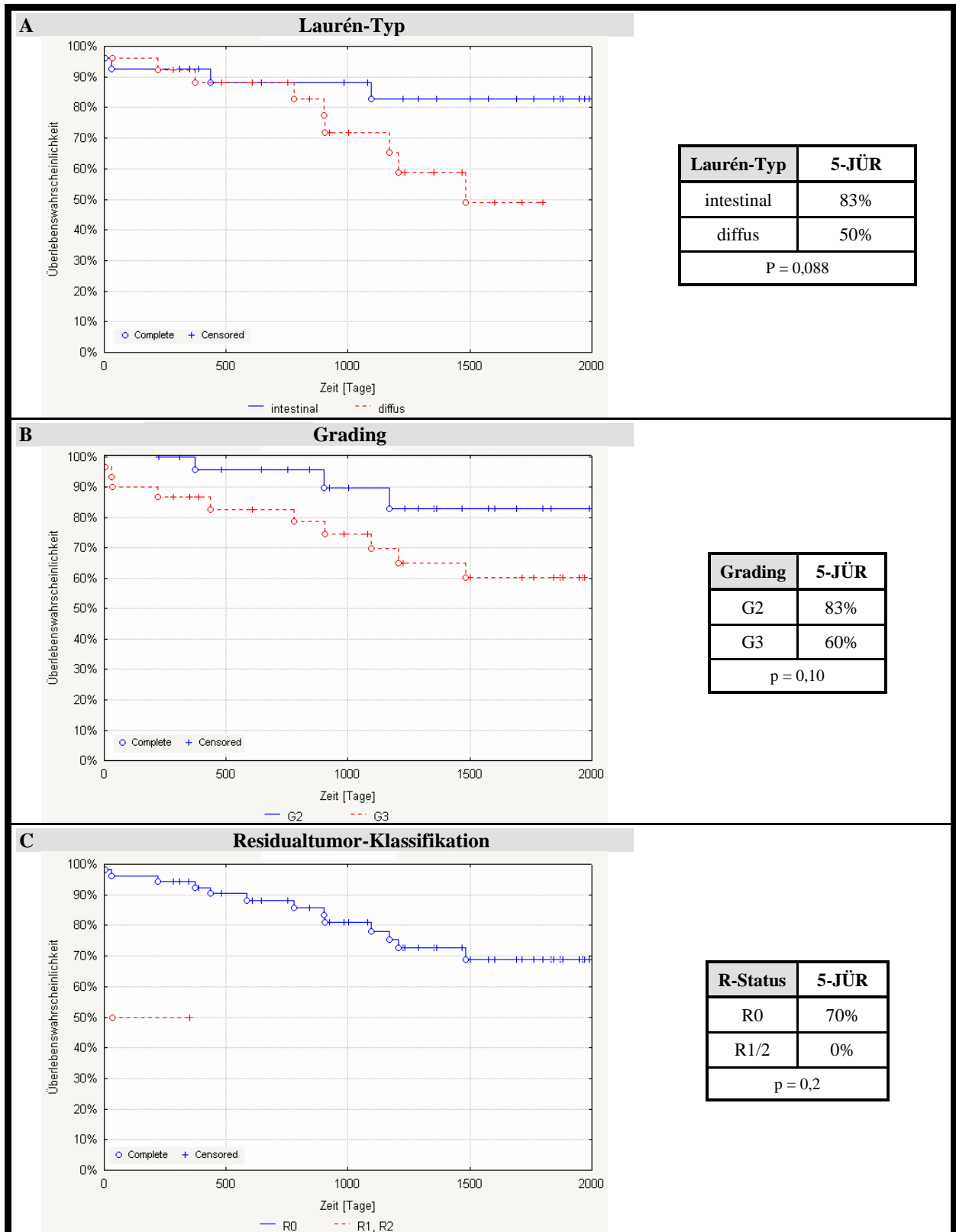
Für die Vorbereitung der multivariaten Testung einer etwaigen unabhängigen prognostischen Auswirkung der Mikrometastasen wurden die oben gezeigten klassischen Faktoren univariat auf ihre prognostische Relevanz untersucht (Abbildungen 3.7, 3.8, 3.9).

Die Ergebnisse zeigten, dass das Patientenalter, das Geschlecht, die Infiltration von Nachbarstrukturen, die multiviszerale Resektion und die Tumorlokalisation ohne signifikanten Einfluss blieben (jeweils  $p > 0,20$ ).



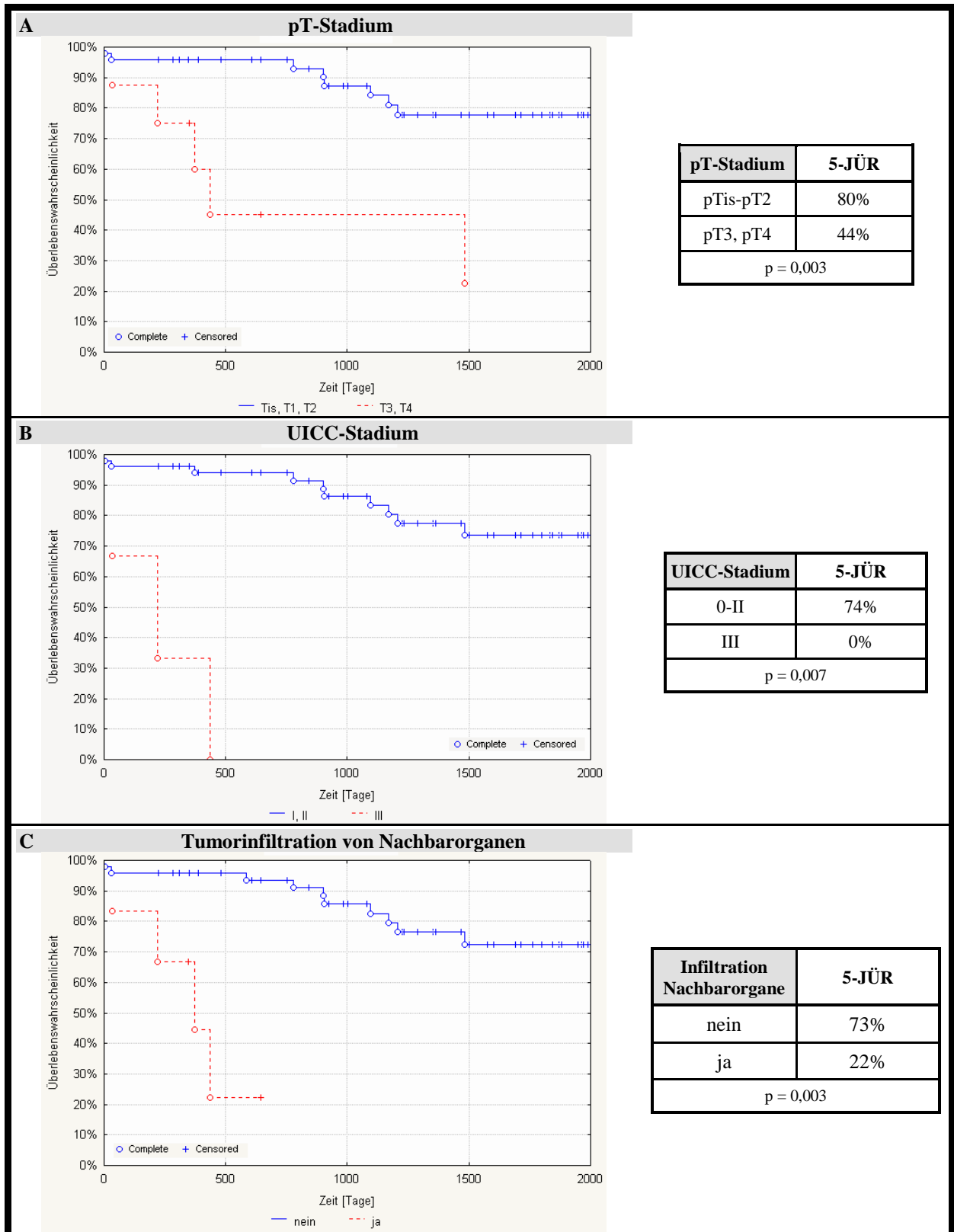
**Abbildung 3.7:** Beispiele für Faktoren ohne prognostischen Einfluss ( $p > 0,20$ ). Überlebenszeitkurven von pN0-Magenkarzinom-Patienten in Abhängigkeit von multiviszeraler Resektion (A), Infiltration von Nachbarstrukturen (B), Tumorlokalisation (C).

Eine statistisch grenzwertige Signifikanz ergaben die variierenden Überlebenszeitanalysen der Ausprägungen des Laurén-Typs, des Gradings und der R-Klassifikation ( $0,05 < p \leq 0,20$ ).



**Abbildung 3.8:** Faktoren mit statistisch grenzwertigem prognostischen Einfluss ( $0,05 < p \leq 0,20$ ). Überlebenszeitkurven und 5-Jahres-Überlebensraten (5-JÜR) von pN0-Magenkarzinom-Patienten in Abhängigkeit von Laurén-Typ (A), Grading (B), R-Klassifikation (C).

Einflussgrößen mit statistisch gesicherter prognostischer Signifikanz waren die pT-Kategorie, das UICC-Stadium und die Tumorinfiltration von benachbarten Organen ( $p \leq 0,05$ ).



**Abbildung 3.9:** Faktoren mit statistisch signifikantem Einfluss auf die Prognose ( $p \leq 0,05$ ). Überlebenszeitkurven und 5-Jahres-Überlebensraten (5-JÜR) von pN0-Magenkarzinom-Patienten in Abhängigkeit von pT-Stadium (A), UICC-Stadium (B), Tumorinfiltration von Nachbarorganen (C).

Da bei diesen Analysen mutmaßlich günstige und ungünstige Ausprägungen der prognostischen Parameter nur gezielt im pN0-Subkollektiv untersucht wurden, lagen bei den ungünstigen Ausprägungen zum Teil nur noch sehr kleine Fallzahlen vor. Dies hatte eine eingeschränkte Aussagekraft der statistischen Tests zur Folge.

Die Faktoren mit einem p-Wert gleich oder kleiner 0,20 wurden nun für die multivariate prognostische Testung in das Cox Proportional Hazards Model integriert. Zusammen mit dem Faktor Mikrometastase wurden die Einflussgrößen Laurén-Typ, Grading, R-Klassifikation, pT-Kategorie, UICC-Stadium und Tumorinfiltration benachbarter Organe in das statistische Verfahren eingeschlossen. Bei der Cox-Regression schloss sich dann eine schrittweise durchgeführte Eliminierung nicht mehr signifikanter Parameter mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit über 20% ( $p > 0,20$ ) an. Das Ergebnis der multivariaten Testung zeigte, dass der diffuse Typ nach Laurén, die höhergradige zelluläre Entdifferenzierung G3, das Vorhandensein einer Nachbarorganinfiltration und auch die in dieser Studie im Fokus stehende lymphogene Mikrometastasierung voneinander unabhängig zu einer Verkürzung der Überlebenszeit der Magenkarzinom-Patienten führten.

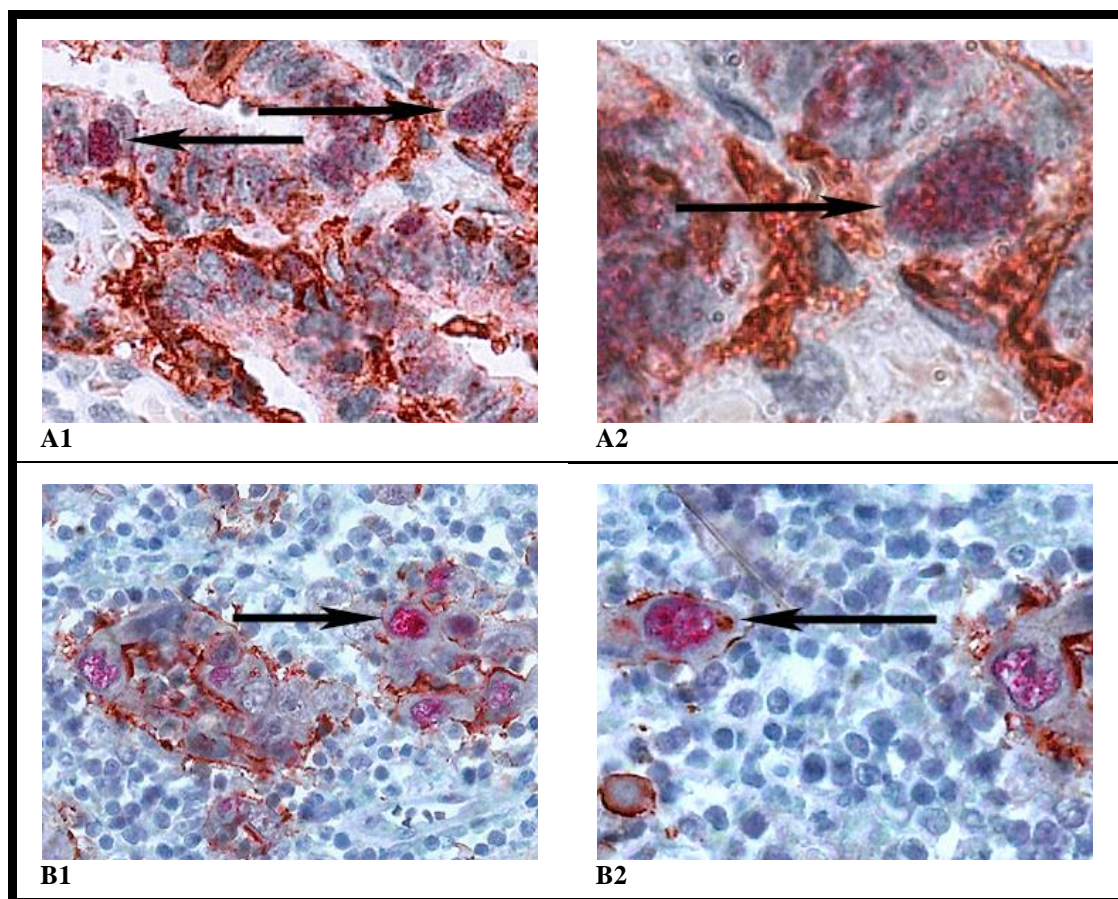
<b>Prognostische Faktoren</b>	<b>p-Werte Schritt 1</b>	<b>p-Werte Schritt 2</b>
Laurén-Typ	0,024	0,02
Grading	0,09	0,04
R-Klassifikation	0,68	-
pT-Kategorie	0,76	-
UICC-Stadium	0,56	-
Infiltration von Nachbarorganen	0,045	0,0004
<b>Mikrometastasen</b>	<b>0,11</b>	<b>0,09</b>

**Tabelle 3.5:** Cox-Regression für die multivariate Testung der Mikrometastasen und weiterer prognostischer Faktoren mit einer univariaten Irrtumswahrscheinlichkeit von maximal 20%

### **3.4 Phänotypische Charakterisierung der Mikrometastasen**

Das in dieser Versuchsreihe eingesetzte Färbeprotokoll für die sequenzielle immunhistochemische Darstellung eines membranös-zytoplasmatischen (EpCAM) und nukleären (p53) Epitops ermöglichte durchgehend technisch zuverlässige Ergebnisse. Diese wurden durch regelmäßiges Mitführen von Positivkontrollen aus gastrointestinalen Karzinomen mit bekannter p53-Überexpression gewährleistet (Abbildung 3.10). Die Negativkontrollen bestanden aus Lymphknotengewebe, das im Rahmen einer gutartigen Erkrankung gewonnen worden war. Es wies zu keiner Zeit immunoreaktive Befunde auf.

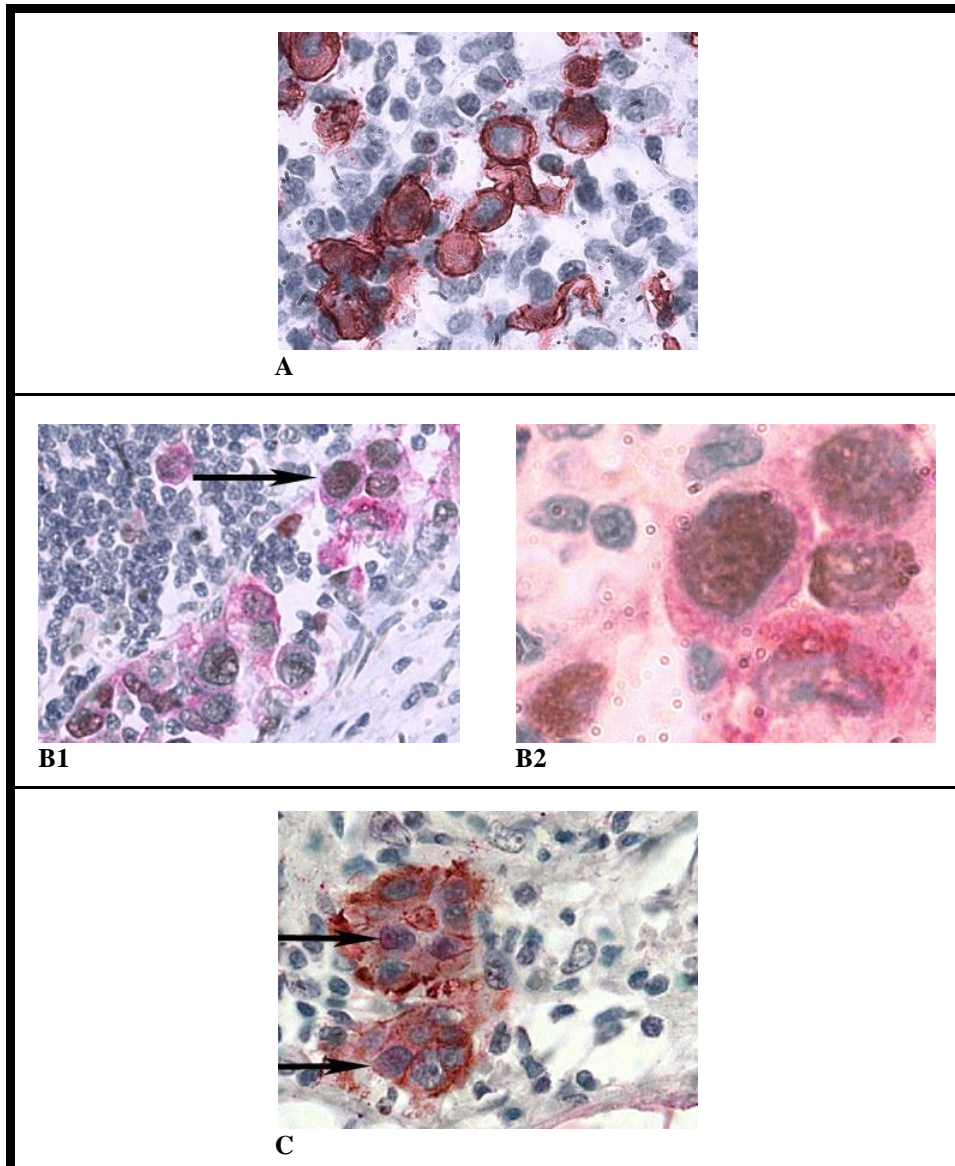
Die Reihenfolge des Einsatzes der beiden Primärantikörper wurde variiert, um das farblich-visuell beste Ergebnis der Doppelfärbung zu testen. Da die Chromogene in der zeitlichen Abfolge unverändert blieben, ergaben sich die zwei möglichen Farbkombinationen braune Kernfärbung / rote membranös-zytoplasmatische Färbung und umgekehrt. Beide Varianten führten zu optimalen Farbkontrasten und ermöglichten eine vergleichbar gute Befundung.



**Abbildung 3.10:** Gewebe mit bekannter p53-Überexpression als Positivkontrolle der Doppelfärbung. Pfeile kennzeichnen doppelt gefärbte Zellen.  
 Membranöse Markierung durch Antikörper Ber-EP4 und Färbung mit braunem Chromogen DAB+.  
 Nukleäre p53-Markierung und Kernfärbung mit rotem Chromogen (Fast Red).  
**A:** Magenkarzinom  
 Ausschnitt aus 400facher (**A1**) und 1000facher Vergrößerung (**A2**)  
**B:** Metastase eines Pankreaskarzinoms  
 Ausschnitte aus 400facher Vergrößerung (**B1/2**)

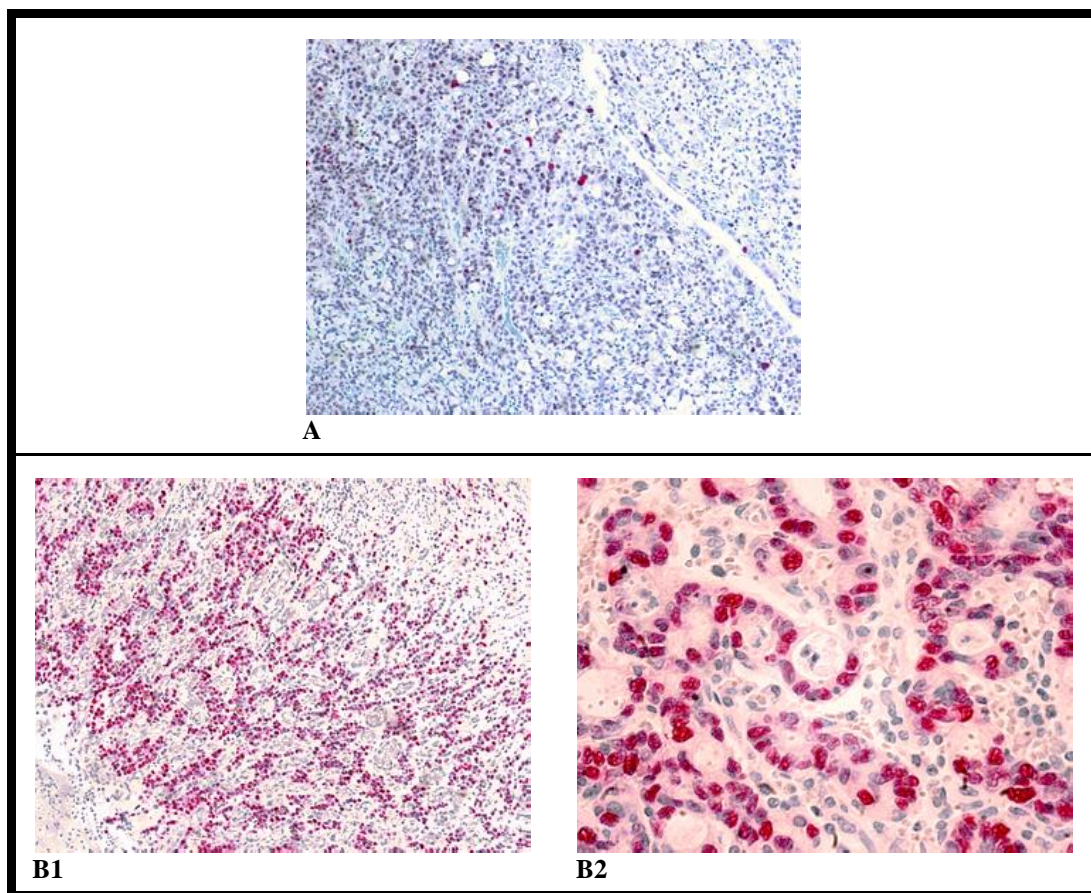
Von den 33 Patienten mit Mikrometastasen wurden die Lymphknoten, die bei der initialen MM-Diagnostik positiv befundet worden waren, für die Doppelfärbung verwendet. Dabei kam dieses Detektionsverfahren bei den neun Gewebeschnitten pro Lymphknoten-Präparat zum Einsatz, die zwischen den beiden Ebenen für die alleinige Ber-EP4-Färbung lagen. Bei der Befundung der Doppelfärbung konnten die Mikrometastasen lediglich bei sechs Patienten erneut identifiziert werden, sodass sich eine geringe Wiederfindungsrate (Antigen-Retrieval-

Rate) von 18,2% ergab. Bei vier dieser sechs MM-positiven Präparate war der p53-Status negativ (Beispiel in Abbildung 3.11/A). Zwei Patienten zeigten in ihren Lymphknoten Zellen, die neben der epithelialen Antigen-Markierung auch eine nukleäre Immunoreaktivität aufwiesen. Die Betroffenen wurden bezüglich ihrer Mikrometastasen als p53-positiv gewertet (Beispiele in Abbildungen 3.11/B, C).



**Abbildung 3.11:** Immunhistochemische Doppelfärbung mit Antikörpern gegen EpCAM und p53 an Mikrometastasen von Magenkarzinomen.  
**Abbildungen A und C:** EpCAM braun / p53 rot  
**Abbildungen B1/2:** EpCAM rot / p53 braun  
**A:** p53-negative MM, 1000fache Vergrößerung (Milsman et al. 2008, Abbildung 5 a)  
**B:** p53-positive MM (Pfeil), Ausschnitt aus 400facher (**B1**) und 1000facher (**B2**) Vergrößerung (Milsman et al. 2008, Abbildung 5 b)  
**C:** p53-positive MM (Pfeil), Ausschnitt aus 400facher Vergrößerung

Zusätzlich wurde der Status der p53-Überexpression der lymphogenen Mikrometastasen mit dem des korrespondierenden Primärtumors verglichen (Tabelle 3.6). In einem Fall mit positivem Antigen-Retrieval war dies nicht möglich, da Gewebe des Karzinoms für die Diagnostik nicht mehr zur Verfügung stand. Die p53-Befundung des Primarius erfolgte nach dem von Baas et al. (1994) vorgeschlagenen Markierungsindex, der den prozentualen Anteil p53-positiver Zellen innerhalb des Tumorgewebes angibt und der in drei Kategorien aufgeteilt wird: hoch positiver ( $\geq 30\%$ ), niedrig positiver (1% bis  $< 30\%$ ) und negativer Tumorzellanteil ( $< 1\%$ ) (Beispiele in Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12:** Darstellung von p53-Überexpressionen in Magenkarzinom-Primärtumoren durch Markierung mit dem Antikörper DO-1 und Visualisierung über das Fast Red Chromogen.

**A:** niedrig positiver Markierungsindex, 100fache Vergrößerung

**B:** hoch positiver Markierungsindex,  
100fache (**B1**) und 400fache (**B2**) Vergrößerung

Sowohl Primärtumoren mit positiven Markierungsindices beider Kategorien als auch ein p53-negatives Magenkarzinom konnten in der Gruppe der Patienten mit erfolgreichem Antigen-Retrieval gefunden werden. Die beiden p53-positiven Mikrometastasen wiesen auch in ihren Primärtumoren Überexpressionen dieses Genproduktes auf. Sie verteilten sich auf je eine Kategorie mit hoch positivem (85%) und niedrig positivem Index (25%). Es fiel auf, dass



der Primärtumor mit dem höchsten Markierungsindex von 85% auch Mikrometastasen gebildet hatte. Demgegenüber wurde aber auch beobachtet, dass Magenkarzinome mit hoch positiven p53-Überexpressionsindices (30% bzw. 50%) jeweils negative p53-Status in ihren MM aufwiesen. Die Indices dieser Primärtumoren waren dabei höher als der p53-positive Tumorzellanteil des weiteren Falles mit Ber-EP4/p53-doppelt positiver Immunhistochemie (25%). Der Patient mit negativem Mutationsnachweis im Primärtumor zeigte auch in seinen Mikrometastasen keine p53-Markierung.

Aufgrund der niedrigen Antigen-Retrieval-Rate bildeten die Patienten, bei denen die p53-Untersuchung der Mikrometastasen erfolgreich abgeschlossen werden konnte, eine nur sehr kleine Gruppe. Es kann aber als sehr interessante Beobachtung festgehalten werden, dass Mikrometastasen von p53-positiven Primärtumoren einen positiven oder einen negativen p53-Status haben können. Die Höhe dieser Tumorsuppressorprotein-Überexpression im Muttergewebe erlaubt somit keinen Rückschluss auf den p53-Status der Mikrometastasen.

p53-Status MM (n = 6)	p53-Markierungsindex PT (n = 6)				Summe
	< 1%	1 - < 30%	≥ 30%	unbekannt	
negativ	1		2	1	4
positiv		1	1		2
Summe	1	1	3	1	

**Tabelle 3.6:** P53-Status der Mikrometastasen (MM) im Vergleich zu den p53-Markierungsindices der korrespondierenden Primärtumoren (PT).  
Bei einem Patienten stand kein PT zur Verfügung.  
Erneute MM-Identifizierung und p53-Darstellung mittels immunhistochemischer Doppelfärbung bei 6 (18,2%) der 33 MM-positiven Patienten.

Bezüglich einer aus dem p53-Status der Mikrometastasen abzuleitenden Prognose ist erwähnenswert, dass bei Betrachtung der Überlebensdaten das Versterben beider Patienten mit doppelt positiver Immunhistochemie im Beobachtungszeitraum der Studie auffiel. Drei von vier der Patienten mit p53-negativen Mikrometastasen waren hingegen zum Zeitpunkt der Nachsorgeerhebung noch am Leben. Wegen der sehr kleinen Fallzahl sind für die Bestätigung des Zusammenhanges, dass ein positiver p53-Nachweis in Lymphknoten-Mikrometastasen den Krankheitsverlauf des Magenkarzinoms ungünstig beeinflusst, jedoch weitere Studien notwendig.

## **4 Diskussion**

Die Überlebenszeiten der in kurativer Intention operierten Magenkarzinom-Patienten sind unbefriedigend. Obwohl häufig radikale Resektionen des Primärtumors und des regionären Lymphabstromgebietes möglich sind, werden viele Patienten nicht geheilt. Man könnte erwarten, dass sich bei postoperativ tumorfreien Resektionsrändern, fehlender ausgedehnter Lymphknotenmetastasierung und nach Ausschluss von Fernmetastasen eine gute Prognose ergibt. Zu diesem nach den Ergebnissen der histopathologischen Routinediagnostik residuumtumorfreien Kollektiv gehören viele Patienten, bei denen alle resezierten Lymphknoten zunächst frei von Metastasen sind. Der Krankheitsverlauf jener vermeintlich am ehesten kurativ behandelten Gruppe zeigt jedoch, dass ein bedeutender Anteil dieser Erkrankten im Verlauf doch tumorbedingt verstirbt. 22% bis 66% der Patienten in den frühen klinischen Stadien UICC I und II, bei denen lymphogene Makrometastasen ausgeschlossen werden, entwickeln später Lokalrezidive oder Fernmetastasen (Lim et al. 2005).

Diese Diskrepanz zwischen initial kurativen Therapieansätzen und unbefriedigenden Überlebensdaten bestätigen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Bei einem hohen Anteil von 88,1% des Gesamtkollektivs konnte primär eine Operation durchgeführt werden, bei der es keine Hinweise für den Verbleib eines Residualtumors gab (R0-Resektion). Diese Rate war höher als der R0-Anteil von 71,5% in einer großen deutschen Magenkrebsstudie (Siewert et al. 1998). Die kumulative 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) beträgt in der vorliegenden Studie jedoch nur 35% und deckt sich im Wesentlichen mit der relativen 5-JÜR von 33%, die das Robert Koch-Institut veröffentlicht hat (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013).

Neben dem positiven Residualtumor-Status ist der metastatische Lymphknotenbefall einer der stärksten prognostischen Negativfaktoren (Kim JW et al. 2009, Maruyama et al. 1989, Nakamura et al. 1992, Siewert et al. 1998, Yokota et al. 2004, Youn et al. 2010). In diese Beobachtung reiht sich auch die 5-JÜR des hier untersuchten Subkollektivs mit Lymphknotenmetastasen in den HE-Färbungen (pN+) ein, die sich gegenüber dem pN0-Kollektiv statistisch hoch signifikant reduziert zeigte. Die ebenfalls unbefriedigende Prognose der pN0-Patienten führte zu der Überlegung, dass weitere und bisher unbekannte Faktoren existieren müssen, die den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen. Da in der Vergangenheit der Lymphknotenstatus beim Magenkarzinom bereits umfangreich auf seine klinische Bedeutung untersucht wurde, weiß man heute, dass die Anzahl der metastatisch infiltrierten Lymphknoten mit der Prognose korreliert (Ajisaka et al. 1999, Saito et al. 2007).

In der offiziellen Stagingvorschrift der internationalen Krebsgesellschaft UICC wird das pN-Stadium nach der Anzahl der positiven regionären Lymphknoten bestimmt, wobei für das pN0-Stadium eine Mindestanzahl von 16 untersuchten Knoten vorliegen sollte (Wittekind und Meyer 2010). Ein prognostischer Vorteil kann mit einer hohen Anzahl resezierter Lymphknoten und einer niedrigen Lymphknoten-Ratio (Verhältnis von befallenen zu untersuchten Knoten) erreicht werden (Biffi et al. 2011, Hsu et al. 2013, Petrelli et al. 2011, Siewert et al. 1998). Zudem wird allgemein bei soliden Tumorerkrankungen der Zusammenhang vermutet, dass der Nachweis maligner Zellen in Lymphknoten auch ein Indikator für eine systemische metastatische Dissemination sein könnte (Izbicki und Hosch 2000). Aufgrund dieses außerordentlichen Einflusses des pN-Stadiums auf den Krankheitsverlauf liegt die Vermutung nahe, dass Patienten mit pN0-Status okkulte lymphogene Tumorzellen aufweisen könnten. Dies sind Zellen, die beim Staging des Magenkarzinoms der konventionellen Diagnostik entgehen. Dieser Parameter stellt möglicherweise einen Hinweis für das erhöhte Risiko dar, ein Lokalrezidiv oder Fernmetastasen zu entwickeln. Mittlerweile existieren für diverse Tumorentitäten umfangreiche Daten über lymphogene Mikro-metastasen und isolierte Tumorzellen, die diesen okkulten Zellen entsprechen. Ihre klinische Relevanz bleibt jedoch bis heute auch für das Magenkarzinom unklar.

Die weitere Erforschung dieses Metastasierungskompartimentes ist für eine individuellere Abschätzung der Prognose und eine zukünftig an diese Ergebnisse adaptierte Therapie sehr wichtig. Sie ist methodisch vorteilhaft, da von fast allen operierten Patienten entsprechende Resektionspräparate zur Verfügung stehen und das Kompartiment zum Operationszeitpunkt am häufigsten von Metastasen befallen ist. Die vorliegende Arbeit untersucht ein Kollektiv, dessen Patienten in der überwiegenden Zahl an einer Krebserkrankung im Frühstadium leiden. Es ist gerade diese Gruppe, für die sich durch intensive Forschung möglicherweise eine kurative Therapie für eine größere Patientenzahl etablieren lässt.

Die genannten Punkte zeigen, dass von einem besseren Verständnis der okkulten Lymphknotenmetastasen ein bedeutender klinischer Nutzen zu erwarten ist. Aus diesem Grunde widmet sich die vorliegende Studie dieser Thematik.

## **Auswahl des Detektionsverfahrens für die lymphogenen Mikrometastasen**

Für die spezielle Diagnostik der lymphogenen Mikrometastasen (MM) muss das Detektionsverfahren dem Anspruch einer hohen Spezifität mit sicherer Differenzierung zwischen benignen Zellen und ortsfremden Tumorzellen sowie einer hohen Sensitivität mit zuverlässigem Nachweis der malignen Zellen genügen. Es stehen heute Methoden auf molekulargenetischer und immunhistochemisch-morphologischer Basis zur Verfügung, die sich gegenüber der konventionellen Zytologie und Histologie durch eine deutliche Steigerung der Sensitivität auszeichnen. Mit ihnen lassen sich beispielsweise epithel- oder tumorspezifische Genprodukte darstellen, die diese Zellen dann vom lymphatischen Umgebungsgewebe abgrenzen. Ein Vorteil der genetischen Analyse mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ist unter anderem die Analyse des gesamten Lymphknotengewebes mit einer im Vergleich zur Immunhistochemie (IHC) höheren Sensitivität (Arigami et al. 2013, Izbicki et al. 2002, Matsumoto et al. 2002). Bei Einsatz eines morphologischen Verfahrens sind immunhistochemische Techniken sinnvoll, da mehr als 60% der Mikrometastasen kleiner als 0,1 mm sind (Weaver et al. 2000) und daher die meisten mit der konventionellen HE-Färbung nicht sichtbar werden. Immunhistochemische Methoden detektieren Zellen über spezifische Antigen-Antikörper-Bindungen und beispielsweise enzymatisch vermittelte farbliche Visualisierungen. Sie versprechen eine geringere Rate falsch positiver Ergebnisse als bei molekulargenetischen Verfahren (Hermanek et al. 1999) und ermöglichen zudem eine zyto- und histomorphologische Beurteilung des Gewebes.

Bei der Diagnostik lymphogener Tumorzellen mittels immunhistochemischer Färbemethoden müssen auch Probleme dieser Technik berücksichtigt und diskutiert werden. Es besteht die Gefahr, dass es zu einem „Understaging“, also zu einer Unterschätzung des tatsächlich vorliegenden pN-Stadiums kommt, wenn die Klassifizierung anhand von Befunden durchgeführt wird, die nicht den gesamten Lymphknoten darstellen können, sondern auf einzelne Schnittebenen begrenzt sind. Tumorzellen können sich in einem Areal des Lymphknotens befinden, das von der Präparation gar nicht erfasst wurde. Bekanntermaßen führen HE-Färbungen von umfangreichen Serienschnitten zu einer erhöhten Nachweisrate von Lymphknotenmetastasen und Mikrometastasen (Hata et al. 2011, Isozaki et al. 1997). Dieses Verfahren auf die Immunhistochemie zu übertragen, wäre in der klinischen Routine jedoch wegen des großen Arbeitsaufwandes und des hohen Kostenfaktors unpraktikabel. Des Weiteren erfüllen möglicherweise einzelne Tumorzellen oder kleine metastatische Zellverbände mit einem Durchmesser von höchstens 0,2 cm in einer der analysierten Schnittebenen zunächst die Kriterien von Mikrometastasen. Durch umfangreiche Unter-

suchungen an bis zu 60 Schnitten pro Lymphknoten konnte jedoch gezeigt werden, dass diese initial als Mikroläsionen anmutenden Befunde zum Teil eine lokal viel ausgedehntere Ausbreitung im Gewebe aufweisen, die in Einzelfällen sogar für eine Einteilung in die pN+-Kategorie ausreichen (Liu L und Zhang 2000). Auch wenn nicht alle Studien einen prognostischen Einfluss der lymphogenen Mikrometastasen nachweisen konnten, ist es doch offensichtlich, dass sie keinesfalls als klinisch irrelevant eingestuft und ignoriert werden dürfen. Bei einem immunhistochemischen Hinweis auf Tumorzellen scheint es vielmehr sinnvoll zu sein, unabhängig von vorgegebenen Dimensionen diesen Befund mit zu berücksichtigen.

Obwohl auch bei der Immunhistochemie immer das Restrisiko bestehen bleibt, dass die exakte pN-Klassifikation nicht richtig evaluiert werden kann, wäre es in der Praxis aufgrund des großen Arbeitsaufwandes und der hohen Kosten nicht praktikabel, alle Lymphknoten mit umfangreichen Serienschnitten zu bearbeiten. Untersuchungen konnten auch zeigen, dass eine Vergrößerung der Anzahl an Schnittebenen, bei der der Aufwand für die Routine-diagnostik noch in einem akzeptablen Rahmen bliebe, zu keiner wesentlichen Anhebung der Detektionsfrequenz führt. Zu diesem Ergebnis kamen Turner et al. (1999), in deren Studie die Nachweisrate an Mikrometastasen nur geringfügig um fünf Prozent anstieg, wenn zehn statt zwei Lymphknotenschichten immunhistochemisch untersucht wurden. Dieser relativ geringe Vorteil rechtfertigt den Mehraufwand nicht, weshalb auch in der vorliegenden Arbeit die Diagnostik in jeweils zwei Ebenen pro Lymphknoten erfolgte. Weitere Autoren haben sich diesem Vorgehen angeschlossen (Buskens et al. 2008). Anhand der aktuellen Studienlage wird aber deutlich, dass diesbezüglich bisher noch kein Konsens erreicht wurde. Mit Hilfe der sehr sensitiven Methode gelang hier der Nachweis einer Prognoserelevanz Ber-EP4-positiver Zellen, sodass die aufgezeigten Nachteile der IHC kompensiert werden konnten.

Ein Vorteil der IHC ist, dass das Gewebe während des Untersuchungsvorganges nicht wie bei der PCR-Methode verloren geht und bei Bedarf für eine weitere Diagnostik zur Verfügung steht. Bei der vorliegenden Studie wurde aus diesem Grunde auf ein immunhistochemisches Verfahren zurückgegriffen, denn nach der initialen Detektion lymphogener Tumorzellen konnte eine weitere Charakterisierung derselben Zellen realisiert werden, indem im Anschluss mittels sequenzieller Doppelfärbung der benachbarten Schnittebenen ein zusätzliches tumorspezifisches Merkmal dargestellt wurde.

Seit vielen Jahren hat sich für den immunhistochemischen Nachweis von metastatischen Karzinomzellen in mesenchymalem Gewebe der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen diverse Subtypen der Zytokeratine (CK) etabliert. Es muss jedoch angemerkt werden, dass

dieser weit verbreitete Gebrauch unterschiedlicher Primärantikörperklone zu vielen unterschiedlichen und häufig nicht mehr vergleichbaren Ergebnissen geführt hat (Fukagawa et al. 2001). Die Verwendung eines „Antikörper-Cocktails“ mit verschiedenen Immunglobulinen gegen CK-Untergruppen macht die Diagnostik aufwändiger und teurer. Außerdem reduziert die im Rahmen der malignen Zelltransformation beschriebene Herabregulierung der CK-Expression die Sensitivität dieser Antikörper (Pantel et al. 1994). Zudem wirkt sich bekanntermaßen zu Lasten der Spezifität aus, dass Retikulumzellen in lymphatischen Organen Zytokeratine exprimieren (Moll et al. 1982) und auch Kreuzreaktionen mit hämatopoetischen Zellen auftreten können (Traweek et al. 1993). Die Gefahr der Ergebnisverfälschung aufgrund falsch positiver Färbungen durch CK-Antikörper wurde in der Vergangenheit bereits beschrieben (Domagala et al. 1992). Am diagnostischen Wert dieser Immunglobuline für die Detektion okkulten Tumorzellen bleiben daher bis heute große Zweifel bestehen. Bei immunhistochemischen Färbungen regionärer Lymphknoten des Magenkarzinoms konnte zwar gezeigt werden, dass mit CK-Antikörpern in diesem Kompartiment mehr Zellen epithelialen Ursprungs als mit der konventionellen HE-Färbung detektiert werden können (Cai et al. 2000, Yang et al. 2013), die Ergebnisse der relativen Häufigkeit und die Aussagen zur klinischen Relevanz sind jedoch weiter uneinheitlich (Übersichten bei Arigami et al. 2013, Horstmann et al. 2004, Yanagita et al. 2008 a). In neuesten Studien wurden einerseits bei Patienten mit Kardiakarzinom in 33% der Fälle lymphogene Mikrometastasen und eine negative Beeinflussung der Rezidiv- und Überlebensrate nachgewiesen (Ru et al. 2012). Andererseits hatten 20% durch konventionelle Histopathologie pN0-klassifizierte Magenkarzinom-Patienten anhand der immunhistochemischen Aufarbeitung Mikrometastasen in den regionären Lymphknoten, ohne dass sich dadurch eine signifikante Auswirkung auf das Gesamtüberleben dokumentieren ließ (Jeuck und Wittekind 2014). Für diese Unklarheiten muss neben fehlenden Standardisierungen der technischen Durchführungen und statistischen Auswertungen, uneinheitlichen Definitionen der detektierten Zellen und inkongruenten Patientenkollektiven auch der weit verbreitete Einsatz der für diese Fragestellung suboptimalen CK-Antikörper verantwortlich gemacht werden. Aus diesem Grunde werden neue Antikörper mit einer verbesserten Sensitivität und Spezifität benötigt. Für die vorliegende Studie war es deswegen sehr wichtig, einen Primärantikörper einzusetzen, mit dem sich aufgrund seiner optimalen diagnostischen Eigenschaften möglicherweise eine verbesserte Standardmethode etablieren lässt.

Mit dem monoklonalen Antikörper Ber-EP4, der sich gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM richtet, wurde in dieser Arbeit eine vielversprechende Alternative gewählt. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass in Mäuse injizierte

Zellkulturen, die aus Ber-Ep4-positiven Zellen in pN0-Lymphknoten des Ösophaguskarzinoms gewonnen worden waren, zum Wachstum von Karzinomgewebe führten und dieser Antikörper folglich Zellen mit malignem Potenzial detektabel macht (Scheunemann et al. 1999). Es wird heute davon ausgegangen, dass sich die Funktion von EpCAM neben der Zelladhäsion auch auf Zellmigration, -proliferation und -differenzierung und somit möglicherweise auf die Förderung von Tumorwachstum und Metastasierung auswirkt (Patriarca et al. 2012, Trzpis et al. 2007). EpCAM wird von den meisten benignen Epithelzellen und Tumoren epithelialen Ursprungs exprimiert, und Ber-EP4 geht mit lymphatischem und mesenchymalem Gewebe keine Kreuzreaktionen ein (Lacza et al. 1990, Momburg et al. 1987, Went et al. 2004). Einige Veröffentlichungen stufen zwar die Spezifität dieses Antikörpers herab, weil entgegen den Publikationen der Erstbeschreiber doch unspezifische Bindungen an hämatopoetische Zellen, Makrophagen und Mesothelzellen beobachtet wurden (Jensen und Johansen 1996, Motherby et al. 1999, Nagel et al. 1998). Ber-EP4 wurde aber in den letzten Jahren zur Detektion disseminierter Tumorzellen bei diversen Krebserkrankungen getestet und seine Vorteile gegenüber etablierten Detektionsmethoden vielfach gezeigt. So ergaben sich bei Karzinomen der Papilla Vateri (Bogoevski et al. 2008), des Ösophagus (Buskens et al. 2008, Hosch et al. 2001, Izbicki et al. 1997), des Pankreas (Hosch et al. 1997, Milsmann et al. 2005), des Rektums (Dhayat et al. 2012) und beim Bronchialkarzinom (Kawano et al. 2002, Passlick et al. 1994) in den entsprechenden Lymphknoten hohe Frequenzen zuvor in der Routine übersehener Tumorzellen. Diese Arbeiten wiesen EpCAM-exprimierende Zellen in pN0-Lymphknoten als einen prognostischen Faktor für die entsprechenden Tumorentitäten nach. Ber-EP4 gilt bereits als erste Wahl bei der Diagnostik okkultur Tumorzellen in Lymphknoten des Ösophaguskarzinoms (Buskens et al. 2008).

Das Magenkarzinom wurde bisher mit Ber-EP4 vor allem auf das Auftreten von Tumorzellen in der Peritoneallavage und dem Knochenmark untersucht (Broll et al. 1996, Lorenzen et al. 2010, Macadam et al. 2003, Nekarda et al. 1999, Rosenberg et al. 2006, Schauer et al. 2011). In diesen Studien konnte eine prognostische Relevanz der Zellen belegt werden, sodass der Einsatz des Antikörpers auch in den regionären Lymphknoten sinnvoll ist. Aktuelle Forschungen über die EpCAM-Expression des Magenkarzinoms legten zuletzt jedoch den Fokus auf die Untersuchung des Primärtumors und den Nachweis zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut. Beispielsweise führte eine höhere Expression des Adhäsionsmoleküls im Bereich des invasiv wachsenden Tumorrands als in der Tumormitte zu einem signifikanten Anstieg der Lymphknoten-Metastasierung und einer relevanten Reduktion des Gesamtüberlebens. Zudem korrelierte die Höhe der EpCAM-Expression mit dem Ausmaß der

Zellproliferation (Kroepil et al. 2013). Wenqi et al. (2009) zeigten bezüglich der immunhistochemisch nachgewiesenen Überexpression des Zelladhäsionsmoleküls im Primärtumor eine positive Assoziation mit der lymphogenen Metastasierung und eine negative Korrelation mit der Tumordifferenzierung. Auf der anderen Seite wurde beobachtet, dass eine hohe EpCAM-Expression im Primärtumor auch mit einem prognostischen Vorteil vergesellschaftet sein kann. Patienten mit Magenkarzinomen ohne jeglichen Verlust der EpCAM-Expression hatten eine bessere 10-Jahres-Überlebensrate als diejenigen mit partiellem Verlust dieser Ausprägung, da die EpCAM-vermittelte Zelladhäsion möglicherweise Zellmigration und Metastasierung unterbindet (Songun et al. 2005, Van der Gun et al. 2010). Andere Studien haben zirkulierende Tumorzellen (CTC) aus der Blutbahn mithilfe immunomagnetischer Verfahren und gegen EpCAM gerichteter Antikörper isoliert und quantifiziert. Beim Magenkarzinom wurde eine signifikant höhere Anzahl dieser Tumorzellen im metastasierten Stadium gefunden, ihr Nachweis stand im Zusammenhang mit höheren Tumorstadien sowie peritonealer Aussaat und sie wurden als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert (Hiraiwa et al. 2008). Die Bestimmung der CTC eignet sich zudem bei fortgeschrittenen Magenkarzinomen für die Beurteilung des Ansprechens auf Chemotherapie (Hiraiwa et al. 2008, Matsusaka et al. 2010). Die Detektion lymphogener Mikrometastasen mit Ber-EP4 wurde in der jüngeren Vergangenheit weniger intensiv verfolgt. Nach der aktuellen Datenlage erfolgte der Einsatz des Antikörpers in dieser Intention bisher bei Tumoren des gastroösophagealen Überganges (Schurr et al. 2006). Studien an Magenkarzinomen ohne Abhängigkeit von der Tumorlokalisation liegen nur in Kombination von Ber-EP4 mit CK-Antikörpern (Becker et al. 1999, Siewert et al. 1996) und zuletzt in einer von Scheunemann et al. (2009) publizierten Arbeit vor. Hier ist eine Festigung der Datenlage notwendig.

### **Häufigkeit, Korrelation mit klassischen Faktoren und prognostische Relevanz der Mikrometastasen**

In der vorliegenden Arbeit erwies sich die beschriebene Methode zur Darstellung der Mikrometastasen bei einer hohen Zahl von insgesamt 1148 untersuchten Lymphknoten als ein zeitlich praktikables und für den Routineeinsatz zuverlässiges Detektionsverfahren.

Es konnten bei 58,9% der 56 histologisch nodal-negativen Magenkarzinom-Patienten Ber-EP4-positive Zellen in den regionären Lymphknoten detektiert werden. Bei den 33 positiv gewerteten Fällen waren in mindestens einem ihrer Lymphknoten Ber-EP4-immunoreaktive Zellen oder Cluster mit einem Durchmesser von höchstens 0,2 cm nachweisbar. Die pN0-Patienten wurden daraufhin in die Subkollektive Mikrometastasen-positiv (MM+) und



Mikrometastasen-negativ (MM-) aufgeteilt. Werden Studien der Jahre 2002 bis 2014 betrachtet, bei denen mit immunhistochemischen Verfahren unter Einsatz von Zytokeratin-Primärantikörpern die pN0-Lymphknoten von Magenkarzinom-Patienten auf okkulte Tumorzellen untersucht worden waren, lagen die Nachweisraten in einem Bereich zwischen 10% und 33% und im Durchschnitt bei gut 20% (Cao et al. 2011, Choi et al. 2002, Higashi et al. 2003, Jeuck und Wittekind 2014, Kim JH et al. 2008, Lee et al. 2002, Matsumoto et al. 2002, Morgagni et al. 2003, Ru et al. 2012, Yasuda et al. 2002). Die vorliegende Studie macht somit deutlich, dass viel mehr Patienten lymphogen mikrometastasiert sind, und sie bestätigt die höhere Sensitivität des Primärantikörpers Ber-EP4 gegenüber den häufig eingesetzten CK-Antikörpern. Arbeiten von Scheunemann et al. (2009) und Schurr et al. (2006), in denen mit Ber-EP4 ebenfalls überdurchschnittlich viele Mikrometastasen in Lymphknoten des Magenkarzinoms diagnostiziert werden konnten, kommen auch zu diesem Ergebnis.

Klinische Patientendaten, chirurgische Parameter sowie peri- und postoperativ gesammelte Faktoren für die zyto- und histopathologischen Einteilungen der Tumoren, die als klassische Merkmale mit möglicher prognostischer Relevanz bekannt sind, wurden darauf getestet, ob sie im pN0-Kollektiv einen Einfluss auf die Bildung lymphogener Mikrometastasen hatten. Es konnte hier gezeigt werden, dass das Auftreten der MM von diesen Faktoren unabhängig ist. Dies ist eine Beobachtung, die in vielen anderen Studien nicht gemacht wurde. Häufig wurde gezeigt, dass verschiedene klinisch-pathologische Parameter wie beispielsweise die Tumordinfiltrationstiefe, die histologische Einteilung nach Laurén, die zelluläre Tumorentdifferenzierung oder die Lymphgefäß-Invasion der Primärtumoren einen signifikanten Einfluss auf den Nachweis okkulten Tumorzellen in den Lymphknoten haben (Cai et al. 2005, Fukagawa et al. 2001, Kim JJ et al. 2009, Lee et al. 2002, Ru et al. 2012, Scheunemann et al. 2009, Siewert et al. 1996, Tajima et al. 2010). In dieser Arbeit ergab sich lediglich der Trend, dass Tumoren mit höherem Staging oder prognostisch ungünstigeren zyto- und histologischen Kriterien wie höherem Grading und dem diffusen Typ der Laurén-Klassifikation anteilig häufiger Tumorzellen in den Lymphknoten aufweisen. Die Daten blieben jedoch ohne statistische Signifikanz. Dieses von anderen Studien abweichende Ergebnis könnte zum einen durch teilweise geringe Patientenzahlen in den Subkollektiven bedingt sein. Vor allem bei der Betrachtung der pN0-Untergruppen mit mutmaßlich ungünstigen Faktor-Ausprägungen lagen zum Teil nur noch kleine Fallzahlen vor. Es wurde jedoch auch an anderer Stelle schon beschrieben, dass keine der klinisch-pathologischen Merkmale zu statistisch signifikanten Unterschieden beim Auftreten von Mikrometastasen führen (Maehara et al. 1996, Yasuda et al. 2002). Zum anderen muss eine weitere Möglichkeit in Betracht gezogen werden, die für diese Beobachtung ursächlich sein könnte

und von bedeutender klinischer Konsequenz wäre: Der Nachweis der Mikrometastasen ist von den getesteten Parametern unabhängig, weil Mikrometastasen bei einer beträchtlichen Anzahl von Patienten bereits in sehr frühen Stadien der Erkrankung existieren. In der vorliegenden Studie hatten im pN0-Subkollektiv mehr als die Hälfte der Patienten mit Primärtumoren ohne Infiltrationen von Nachbarstrukturen oder -organen, in den UICC-Stadien I bis II und T-Stadien pT1 bis pT2 jeweils MM-positive Lymphknoten. Diese Diagnostik auf Patientengruppen mit einer vermeintlichen Risikokonstellation zu beschränken, kann daher nicht empfohlen werden.

Die klinische Relevanz der Lymphknotenmetastasierung wird durch die Ergebnisse der Überlebenszeitanalysen untermauert. Zunächst bestätigte sich der bekanntermaßen starke negative prognostische Einfluss der mit dem konventionellen Staging nachweisbaren Makrometastasierung. Die 5-Jahres-Überlebensrate der pN+-Patienten war mit 17% hoch signifikant geringer als die der Subgruppen MM+ (5-JÜR 58%,  $p = 0,005$ ) und MM- (82%,  $p < 0,001$ ).

Die prognostische Relevanz von Mikrometastasen ist aufgrund divergenter Beobachtungen bis heute weiter ungeklärt. Bei der Untersuchung von Lymphknoten des Magenkarzinoms stellten einige Autoren in diesem Metastasierungskompartiment keine Prognoserelevanz okkulten Tumorzellen fest (Choi et al. 2002, Fukagawa et al. 2009, Jeuck und Wittekind 2014, Kikuchi et al. 1999, Kim JJ et al. 2009, Morgagni et al. 2003). Die Daten der vorliegenden Arbeit führen zu einem gegensätzlichen Ergebnis. Zunächst konnte nur vermutet werden, dass es sich bei den Zellen, die im Lymphknotengewebe mit dem Primärantikörper Ber-EP4 markiert und immunhistochemisch visualisiert worden waren, um ortsfremde Zellen epithelialen Ursprungs und somit am ehesten um Metastasen des Primärtumors handelte. Ihr alleiniger Nachweis stellte noch keinen Beweis für ihre klinische Relevanz dar. Mit den Analysen der Überlebensraten konnten dann aber deutliche Unterschiede innerhalb des pN0-Kollektivs gezeigt werden. Die univariate Testung des Faktors Mikrometastase auf die Überlebenszeit der betroffenen Patienten ergab, dass sein Nachweis einen deutlichen Hinweis für einen negativen prognostischen Einfluss liefert. Die Überlebensdaten der pN0-Subgruppen unterschieden sich mit einer 5-JÜR von 58% bei MM+ und 82% bei MM- deutlich voneinander, wenn auch das Ergebnis knapp außerhalb des Signifikanzniveaus blieb ( $p = 0,059$ ). Diese Beobachtung wird wegen der reduzierten Fallzahl der pN0-Subgruppe möglicherweise in ihrer statistischen Aussagekraft limitiert. Dennoch ist es aufgrund der hier festgestellten Daten sehr wahrscheinlich, dass MM-positive Patienten mit einer ungünstigeren Prognose rechnen müssen. Die Relevanz dieses Befundes wird zudem dadurch belegt, dass sich die neu diagnostizierten Tumorzellen mittels einer

multivariaten Testung als unabhängiger prognostischer Faktor der Überlebenszeit herausstellten. Für diese Untersuchung wurden alle bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 20% prognostisch signifikanten Faktoren auf einen voneinander unabhängigen Einfluss analysiert. Neben den Mikrometastasen handelte es sich hierbei um den Laurén-Typ, das Grading, die R-Klassifikation, die pT-Kategorie, das UICC-Stadium und die Tumordinfiltration benachbarter Organe. Als Ergebnis der multivariaten Analyse konnte herausgestellt werden, dass die Ausprägungen diffuser Typ nach Laurén, zelluläre Entdifferenzierung G3, Infiltration von Nachbarorganen und auch die in dieser Arbeit im Fokus stehenden Mikrometastasen jeweils eine unabhängige prognostische Relevanz besitzen. Dies ist von Bedeutung, da mit den in der Vergangenheit beim Magenkarzinom überwiegend eingesetzten Zytokeratin-Primärantikörpern häufig keine prognostische Auswirkung der okkulten Tumorzellen festgestellt werden konnte. Gegenüber den CK-Antikörpern kann die in dieser Studie bewiesene klinische Relevanz als Indikator für eine verbesserte Spezifität und Sensitivität des hier verwendeten Untersuchungsprotokolls gewertet werden. Auch durch eine weitere aktuelle Studie zum Magenkarzinom wird diese Datenlage gestützt: In der Arbeit von Scheunemann et al. (2009) stellte sich unter Verwendung des Antikörpers Ber-EP4 eine große Anzahl zuvor in der Routinediagnostik als tumorfrei befundeter Lymphknoten als immunhistochemisch positiv heraus, und dieser Status übte einen unabhängigen prognostischen Einfluss auf die rückfallfreie Zeit und das Gesamtüberleben aus. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass der Einsatz des Antikörpers Ber-EP4 in der Diagnostik lymphogener Mikrometastasen beim Magenkarzinom sinnvoll ist.

Eines der wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Studie ist, dass lymphogene Mikrometastasen des Magenkarzinoms aufgrund uni- und multivariater statistischer Analysen als unabhängiger prognostischer Faktor angesehen werden müssen. Die vorliegenden Daten heben sich von vielen bisher veröffentlichten Beobachtungen insofern ab, als gezeigt werden konnte, dass sich eine klinische Relevanz dieser Zellen nur durch ihre Ber-EP4-Immunoreaktivität und unabhängig von weiteren morphologischen Kriterien beweisen lässt. In der Vergangenheit wurde gefordert, auch die zyto- und histologische Morphologie des Präparates in die Befundung mit einfließen zu lassen (Hermanek et al. 1999). Die pTNM-Klassifikation der UICC grenzt isolierte Tumorzellen (ITC) von Mikrometastasen anhand ihrer geringeren Größe ab. ITC werden zusätzlich dadurch definiert, dass sie keine metastatische Aktivität in Form von Zellproliferation und Penetration von Gefäßwänden aufweisen und auch keine reaktiven Veränderungen des umgebenden Gewebes beobachtet werden. Andere Arbeiten zum Nachweis okkulten lymphogener Tumorzellen bei soliden Tumorerkrankungen haben die Zellmorphologie mit berücksichtigt und zum Teil zusätzliche

Kriterien wie beispielsweise die Anzahl der nachgewiesenen Zellen, ihre Lokalisation innerhalb des Lymphknotens, andere Größenangaben und daraus resultierend neue Definitionen und Begriffe eingeführt. Bei der Befundung immunhistochemischer Färbungen führt dieses Einbeziehen vieler Parameter zu differenzierten Ergebnissen, und die Beurteilung charakteristischer morphologischer Kriterien kann die Spezifität der Metastasen-Diagnostik steigern. Allerdings sind morphologische Merkmale zu einem gewissen Teil subjektiv und machen die Befunde daher untersucherabhängig. Die Berücksichtigung all dieser Punkte ist zudem für den praktischen Einsatz in der täglichen Routine sehr aufwändig. Je mehr Faktoren berücksichtigt werden und je mehr subjektive Beurteilungen in die Befundung einfließen, desto schwieriger werden auch ihre Reproduzierbarkeit und die Etablierung einer möglichst untersucherunabhängigen Methode. Aus diesen Gründen wurde hier der Ansatz verfolgt, alle Patienten mit Ber-EP4-positiven Einzelzellen und Zellclustern bis zu einer maximalen Größe von 0,2 cm ohne Berücksichtigung weiterer morphologischer Kriterien in das pN0-Subkollektiv MM+ einzuschließen. Die Methode wird schließlich durch das Ergebnis der vorliegenden Studie, dass Mikrometastasen dieser Definition eine unabhängige prognostische Relevanz haben, legitimiert. Das Verfahren kann in Verbindung mit dem spezifischen und sensitiven Primärantikörper Ber-EP4 als geeigneter Standard zur Detektion lymphogener Mikrometastasen angesehen werden.

In dieser Studie wurden Mikrometastasen und isolierte Tumorzellen zusammen betrachtet. Es gibt Hinweise dafür, dass sich die biologischen Eigenschaften und möglicherweise auch die malignen Potenziale und damit ihre prognostischen Bedeutungen voneinander unterscheiden (Buskens et al. 2008, Sloothaak et al. 2014). Die Aufgabe zukünftiger Untersuchungen sollte daher auch eine differenzierende und vergleichende Betrachtung dieser beiden Gruppen sein.

### **Phänotypische Charakterisierung der Mikrometastasen durch p53-Nachweis mittels immunhistochemischer Doppelfärbung und ihre Korrelation mit dem p53-Status des Primärtumors**

Trotz zahlreicher Studien über okkulte Tumorzellen in verschiedenen Metastasierungskompartimenten diverser Tumorentitäten und variierenden methodischen Ansätzen konnte die klinische Bedeutung dieser Zellen in den letzten Jahren noch nicht sicher eingeordnet werden. Die Metastasierung ist ein komplexer Vorgang, und nur 0,05% der zirkulierenden Tumorzellen bilden im Organismus Metastasen (Abati und Liotta 1996). Es bleibt auch eine Unsicherheit bestehen, dass es sich bei den Befunden möglicherweise nicht um maligne Zellen, sondern lediglich um Artefakte bzw. Zellen ohne klinische Konsequenzen handelt. Für die definitive Klärung der Frage, ob sich EpCAM-exprimierende Zellen in lympho-

tischem Umgebungsgewebe tatsächlich auf den Krankheitsverlauf der Patienten auswirken, ist es daher wichtig, die nachgewiesenen Zellen zum besseren Verständnis ihrer biologischen Eigenschaften und ihres malignen Potenzials ergänzend zu untersuchen.

Die Immunhistochemie bietet die Möglichkeit, die Lymphknoten zunächst mit einer Einzelfärbung auf Tumorzellen zu untersuchen. Positive Präparate können dann in einem anschließenden Schritt mit Hilfe einer sequenziellen Doppelfärbung weiter charakterisiert werden. In einer angrenzenden Schnittebene werden dabei beispielsweise ein epithelialer Marker zur Wiedererkennung der Zellen (Antigen-Retrieval) und ein tumorspezifischer Antikörper zur erweiterten Phänotypisierung eingesetzt. Der Vorteil dieses schrittweisen Vorgehens ist, dass nicht alle Präparate von vornherein mit dieser aufwändigen Technik bearbeitet werden müssen und dadurch der Zeitaufwand sowie die Kosten überschaubar bleiben.

Isolierte Tumorzellen und Mikrometastasen in regionären Lymphknoten des Magenkarzinoms wurden bereits mit einer Doppelfärbetechnik nach ihrem Proliferationsindex beurteilt (Yanagita et al. 2008 b, Yonemura et al. 2007). Damit konnte die These, disseminierte Tumorzellen hätten aufgrund einer geringen Proliferationsrate einen Metastasen-atypischen Charakter (Pantel et al. 1993), widerlegt werden. Nach dem Antigen-Retrieval durch Zytokeratin-Antikörper und der zusätzlichen Darstellung des Proliferationsmarkers Ki-67 wurde gezeigt, dass diese Zellen eine proliferative Aktivität und somit möglicherweise das Potenzial für die frühe Initiierung einer Metastase besitzen. Die weitere Erforschung des biologischen Charakters und der potenziellen Malignität der Zellen ist besonders erfolgversprechend, wenn der Zellenachweis mit einem Antikörper sehr hoher Sensitivität und Spezifität geführt wird und die Darstellung eines tumorspezifischen Antigens die Untersuchung ergänzt. Für dieses Ziel eignet sich der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Antikörper Ber-EP4, der sich gegen das epitheliale Antigen EpCAM richtet, in Kombination mit DO-1, der mit dem nukleären Protein p53 reagiert. Die Mutation des Tumorsuppressorgens TP53 gehört zu den häufigsten genetischen Alterationen, die in Malignomen - einschließlich des Magenkarzinoms - nachweisbar sind (Bellini et al. 2012, Tamura 2006). Als Folge der genetischen Veränderungen wird ein p53-Protein codiert, das nach Überexpression akkumuliert und seine tumorsuppressiven Eigenschaften verloren hat. Aus zytopathologischer Sicht gilt der Nachweis von p53 als Marker einer malignen Tumorerkrankung (Hall et al. 1991). Für das Magenkarzinom ist TP53 das Tumorsuppressorgen mit der umfangreichsten molekularbiologischen und pathogenetischen Datenlage. Diese sollte durch den p53-Status der Mikrometastasen erweitert und klinisch eingeordnet werden. Ließe sich mit der Doppelfärbung nachweisen, dass innerhalb eines Lymphknotengewebes p53 in

epithelialen Zellen akkumuliert, würde das auch unterstreichen, dass mit dieser Methode tatsächlich okkulte Karzinomzellen detektabel sind.

Der prognostische Einfluss von überexprimiertem p53 in Primärtumoren wird kontrovers diskutiert. In aktuellen Studien war eine starke Expressionen beim Magenkarzinom mit einem ungünstigen klinischen Verlauf assoziiert (Lazăr et al. 2010, Liu X et al. 2012, Tzanakis et al. 2009). Auf der anderen Seite wurden Daten veröffentlicht, die bei dieser Tumorentität keinen negativen Effekt einer p53-Akkumulation auf die Überlebensraten der Patienten belegen konnten (Gonçalves et al. 2011, Xiao et al. 2013). Des Weiteren ist auch der Zusammenhang zwischen einer p53-Überexpression des Magenkarzinoms und der Lymphknoten-Metastasierung nicht geklärt, da positive (Liu X et al. 2012) und negative Korrelationen (Xiao et al. 2013) beschrieben wurden. Der p53-Status von Tumorzellen in verschiedenen Metastasierungskompartimenten kann unterschiedlich ausfallen. Trotz p53-Überexpressionen in diversen epithelialen Primärtumoren konnten im Knochenmark diese Veränderungen bei den disseminierten Karzinomzellen nur in wenigen Fällen bestätigt werden (Offner et al. 1999). Umgekehrt wiesen, bei ebenfalls häufig diskordantem p53-Status von Primärtumor und Lymphknoten-Metastasen, die Metastasen des Plattenepithel-Karzinoms des Ösophagus öfter einen positiven p53-Befund als die Ausgangstumoren auf (Luo et al. 2011). An anderer Stelle wurde gezeigt, dass Magenkarzinome mit einer p53-Überexpression häufiger lymphogen metastasieren und diese Lymphknotenmetastasen in der überwiegenden Anzahl die Mutation auch tragen (Kakeji 1993). Ein Zusammenhang zwischen TP53-Genmutationen im Magenkarzinom-Primärtumor und in den lymphogenen Mikrometastasen ist unbekannt und bedarf weiterer Klärung. Da für das nicht kleinzellige Bronchialkarzinom und das Ovarialkarzinom ein positiver p53-Nachweis in okkulten Lymphknotenmetastasen bereits als prognostischer Indikator belegt werden konnte (Dobashi et al. 1997, Gu et al. 2002, Suzuki et al. 2001), sollte eine entsprechende Korrelation auch für das Magenkarzinom abgeklärt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse der immunhistochemischen Doppelfärbungen zeigen, dass ein bestimmter p53-Status des Primärtumors keine Voraussetzung für das Auftreten von lymphogenen Mikrometastasen ist. Weder die Feststellung, dass Zellen des Primarius das veränderte Tumorsuppressorprotein exprimieren, noch ihr prozentualer Anteil am gesamten tumorösen Gewebe haben diesbezüglich eine kausale Beziehung. Sowohl bei negativem als auch bei mittlerem und hohem Markierungsindex waren Ber-EP4-positive Zellen in den Lymphknoten nachweisbar.

Bei der Evaluierung eines Zusammenhanges zwischen p53-Überexpressionen des Primärtumors und der lymphogenen Tumorzellen wurden in dieser Versuchsreihe zum Teil

kongruent verlaufende p53-Nachweise beobachtet. Beide Patienten mit doppelt positiver Immunhistochemie in den Mikrometastasen zeigten auch im Primärtumor Hinweise für die Alteration des Tumorsuppressorgens. Bei dem einen Fall handelte es sich um einen niedrigen Index im Muttergewebe und bei dem anderen um das Magenkarzinom mit der höchsten p53-Mutationsrate. Die p53-Phänotypisierungen eines weiteren Patienten waren gleich, da weder eine p53-Überexpression im Primärtumor noch eine nukleäre Immunreaktivität in den Mikrometastasen bestand. Es traten aber auch Konstellationen mit heterogenem Antigenprofil auf. Zwei Primärtumoren mit Markierungsindices der hohen Kategorie hatten p53-negative Mikrometastasen gebildet. In einem dieser Fälle wies der Primarius sogar prozentual deutlich mehr p53-positive Zellen auf als ein anderes Magenkarzinom mit positivem p53-Mikrometastasen-Status. Diese Ergebnisse bestätigen, dass mikrometastatische Zellen des Magenkarzinoms variable tumorspezifische Antigenexpressionsmuster haben können. Karzinomzellen einer Tumorentität exprimieren bestimmte Onko- oder Tumorsuppressorgenprodukte bekanntermaßen nicht einheitlich. Zu der genetischen Heterogenität isolierter Tumorzellen des Magenkarzinoms haben Pituch-Noworolska et al. (2007) herausgefunden, dass diese Zellen in den Metastasierungskompartimenten Blut, Knochenmark und Lymphknoten sehr unterschiedlich bestimmte Moleküle tragen, die in die Metastasenbildung involviert sein können. Die Beobachtung, dass Metastasen eines Tumors mit p53-Überexpression ihren primären Zellverband verlassen, bevor die TP53-Mutation stattgefunden hat, wurde an anderer Stelle beschrieben (Offner et al. 1999).

Aus diesen Beobachtungen und den Ergebnissen der vorliegenden Studie muss als Konsequenz abgeleitet werden, dass sich die p53-Überexpression als alleiniger Marker für den Mikrometastasen-Nachweis nicht eignet. Nur bei einem Drittel der Patienten mit gelungenem Antigen-Retrieval war sie in den hier untersuchten lymphatischen Tumorzellen nachzuweisen. Die biologischen Eigenschaften der Mikrometastasen mit einem tumorspezifischen Antikörper wie p53 im Rahmen einer Doppelfärbung weiter zu analysieren, ist jedoch prinzipiell sinnvoll, da okkulte Tumorzellen sich als Folge der genetischen Varianz möglicherweise auch in ihrer biologischen Aggressivität voneinander unterscheiden. In dieser Arbeit ergab sich zumindest die Tendenz, dass p53-positive Zellen die Prognose ungünstig beeinflussen, da beide Patienten mit dieser Konstellation im Beobachtungszeitraum der Studie verstorben waren. Im Gegensatz dazu waren drei von vier Patienten mit p53-negativen Mikrometastasen noch am Leben.

Beim Einsatz der Immunhistochemie zum Nachweis von p53 muss bedacht werden, dass bestimmte Voraussetzungen zu einer Reduktion der Sensitivität und Spezifität der diagnostischen Methode führen können. Im Falle einer schweren Gen-Deletion wird möglicherweise

kein Protein gebildet und bei einer Punktmutation ein instabiles und daher nicht detektables Produkt (Wynford-Thomas 1992). Andere Mutationen können weitere falsch negative Befunde nach sich ziehen, wenn der p53-Rezeptor als Folge der genetischen Veränderungen fehlt und daher der Primärantikörper auch keine Verbindung mit der Zielzelle eingehen kann (Baas et al. 1994). Falsch positive Ergebnisse kommen unter anderem dadurch zustande, dass der Wildtyp des p53-Proteins auch ohne Mutation in größeren Mengen akkumulieren kann (Wynford-Thomas 1992). Es ist jedoch kaum möglich, die identifizierten Zellen molekular-genetisch weiter zu differenzieren, da es sich häufig um Einzelzellen handelt, die schwierig zu isolieren sind, und das genetische Material für eine Amplifikation nicht ausreicht.

Ein methodisches Problem der Doppelfärbung war die geringe Mikrometastasen-Wiederfindungsrate von 18,2%. Lediglich bei sechs von 33 Patienten gelang mit der sequenziellen immunhistochemischen Doppelfärbung in den angrenzenden Schnittebenen der initial MM-positiv gewerteten Präparate eine erneute Identifizierung der Zellen. Hier wird ein Nachteil der an histologischen Schnitten ausgerichteten Diagnostik deutlich. Es handelte sich bei den positiven Befunden zum Teil um sehr kleine Zellcluster, die nicht in allen Ebenen des Lymphknotens zu finden sind. Auch das Vorgehen, neun an die MM-positiven Bezirke angrenzende Schnitte mit der Doppelfärbung zu analysieren, konnte nicht verhindern, dass Mikrometastasen sehr häufig bereits wenige Mikrometer außerhalb der initialen Nachweisebene nicht mehr sichtbar sind. Die Antigen-Detektionsrate würde sich nur dann erhöhen, wenn von vornherein alle Lymphknotenpräparate mit der Doppelfärbung untersucht werden. Für eine Beantwortung der Frage nach der prognostischen Relevanz p53-positiver Mikrometastasen wären weitere Untersuchungen mit dieser Intention an größeren Patientenkollektiven vielversprechend. Eine statistisch valide Aussage konnte die vorliegende Arbeit diesbezüglich nicht treffen, da die Fallzahl zu gering blieb. Aus den Ergebnissen der p53-Untersuchungen lässt sich jedoch eine wichtige Schlussfolgerung ableiten: Mit der beschriebenen Technik des sequenziellen Nachweises eines epithelialen und eines tumorspezifischen Antigens können tatsächlich okkulte Tumorzellen in Lymphknoten detektiert werden. Da gezeigt werden konnte, dass die mit Ber-EP4 markierten Zellen epithelialen Ursprungs eine unabhängige prognostische Relevanz besitzen und zum Teil Tumorantigene exprimieren, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei ihnen um metastatische Zellen des Magenkarzinoms und keinesfalls um klinisch irrelevante Artefakte handelt. Die immunhistochemische Doppelfärbung hat sich als ein technisch zuverlässiges Verfahren erwiesen. Der methodische Ablauf hingegen, bei dem nach der initialen MM-Detektion das Doppelfärbeprotokoll nachträglich an benachbarten Schnittebenen eingesetzt wird, eignet sich in der klinischen Routine nicht als Standardmethode für eine ergänzende Zellcharak-



terisierung. Die Wiederfindungsrate ist dann zu gering und daher der Kosten- und Arbeitsaufwand nicht gerechtfertigt.

### **Therapeutische Konsequenzen und Ausblick**

Die Studien über Mikrometastasen müssen langfristig zu dem Ziel führen, neben der Einschätzung ihrer klinischen Relevanz auch die Frage zu klären, ob sich anhand der neu gewonnenen Erkenntnisse in Zukunft auch die Effektivität der stadiengerechten Therapie optimieren lässt.

Mit dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Mikrometastasen auch in sehr frühen Stadien des Magenkarzinoms auftreten. Sie in konventionell pN0-befundeten Lymphknoten zu finden, bedeutet in den meisten Fällen, weiterführende Informationen über eine maligne Grunderkrankung in einer sehr frühen Phase zu gewinnen. Hier besteht also ein großes Potenzial, bei meist kurativer Ausgangssituation die Überlebenschancen in Zukunft langfristig weiter zu verbessern. Beispielsweise wiesen hier Tumoren mit geringer Infiltrationstiefe des Primarius und damit potenziell günstiger Ausgangssituation bei 14 der 23 pT1pN0-Patienten Ber-EP4-positive Zellen in ihren regionären Lymphknoten auf. Dieses Ergebnis untermauert die Notwendigkeit, bei allen in kurativer Absicht operierten Patienten eine systematische Lymphadenektomie durchzuführen. Die Empfehlung, aufgrund dieser früh auftretenden Tumorzell dissemination ab Stadium pT1 auf lokal beschränkte chirurgische Therapieformen zu verzichten, wurde auch an anderer Stelle ausgesprochen (Endo et al. 2005). Entgegen der Empfehlung, dass Magenfrühkarzinome vom Mukosatyp unter Beachtung bestimmter makroskopischer und histopathologischer Kriterien endoskopisch reseziert werden können (Soetikno et al. 2005), müssen diese Therapieverfahren nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auch bei den niedrigsten Tumorstadien sehr kritisch beurteilt werden. Es wurde ein Patient des pN0-Kollektivs identifiziert, dessen Primärtumor im Stadium pTis (Carcinoma in situ) trotz dieser geringsten vertikalen Tumorausbreitung lymphogene Mikrometastasen entwickelt hatte. Bei der Nachbeobachtung stellte sich heraus, dass der Patient ein Rezidiv erlitten hatte und im Studienzeitraum an der Krankheit verstorben war. Da ein Carcinoma in situ des Magens das Lymphsystem nicht erreicht und deswegen formal auch keine Lymphknotenmetastasen bilden kann, muss in diesem Fall die histopathologische Beurteilung der Infiltrationstiefe des Primärtumors kritisch gesehen werden. Der Fall unterstreicht aber die Aussage, dass Mikrometastasen häufig bereits in sehr frühen Tumorstadien existieren. Zur Verbesserung der postoperativen Morbidität und Lebensqualität ist es ein interessanter Ansatz, das Ausmaß des chirurgischen Vorgehens nach der Anzahl an Risikofaktoren für die Entstehung von Lymphknotenmetastasen festzulegen,

um dadurch einem bestimmten Patientenkollektiv schonendere, weniger invasive Eingriffe anbieten zu können. Bei nicht nachweisbaren Risikofaktoren wären dann endoskopische Verfahren und bei steigendem Risiko der Metastasierung radikalere Operationstechniken zu wählen (Tajima et al. 2010). Es muss jedoch bedacht werden, dass präoperativ die Existenz lymphogener Mikrometastasen vermutlich nie mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden kann und somit nach minimalinvasiven Behandlungsverfahren das erhöhte Risiko eines Tumorrezidivs bestehen bleibt. Als kurative Therapie der Wahl wird für das operable Magenkarzinoms auch weiterhin die Gastrektomie mit D2-Lymphadenektomie empfohlen (Jiang et al. 2013, Songun et al. 2010). Die Evaluierung des besten operativen Vorgehens ist jedoch anhaltend Gegenstand aktueller Forschung, und das Ausmaß der Lymphadenektomie wird seit langem kontrovers diskutiert (De Steur et al. 2013). Ein prognostischer Vorteil der D2- gegenüber der D1-Resektion wird in großen Kollektiven nicht immer gefunden (Hartgrink et al. 2004, Seevaratnam et al. 2012). In einer Studie ohne Nachweis eines überlegenen Langzeiterfolgs in der D2-resezierten Gruppe profitierte aber das Subkollektiv mit lymphogener Metastasierung möglicherweise doch von der erweiterten Lymphknotenresektion (Degiuli et al. 2014). Ob diese Beobachtung auch auf Patienten mit Mikrometastasen sicher übertragbar ist, müssen folgende Untersuchungen zeigen.

Die Überlebensdaten der Patienten mit Mikrometastasen machen deutlich, dass die Betroffenen gegenüber dem Kollektiv ohne jegliche Lymphknotenmetastasierung mit einer reduzierten Lebenserwartung rechnen müssen. Trotz des meist niedrigen Tumorstadiums gelingt es häufig nicht, durch eine radikale operative Therapie langfristige Heilung zu erzielen. Daher müssen für diese Patienten (neo-)adjuvante Therapieformen etabliert werden.

Studien haben herausgefunden, dass Magenkarzinome mit fortgeschrittener lokaler Tumorausdehnung und/oder lymphogener Makrometastasierung hinsichtlich der progressionsfreien Zeit und des Gesamtüberlebens signifikant von einer adjuvanten Radiochemotherapie profitieren (Macdonald et al. 2001). Als Konsequenz wurde in den USA eine postoperative Strahlen- und Chemotherapie standardmäßig für alle Patienten ohne Fernmetastasen in den UICC-Stadien II bis IV eingeführt. In der vorliegenden Studie gibt es deutliche Hinweise, dass Mikrometastasen aufgrund ihrer klinischen Relevanz als „echte“ Lymphknotenmetastasen angesehen werden müssen. Wertete man diese Befunde auch dementsprechend bei der Tumorklassifikation, entstünde bei vielen Patienten mit pN0-Status ein Upstaging in die UICC-Stadien II oder höher, für die dann ebenfalls ergänzende Behandlungen sinnvoll sein könnten. Bei einer Änderung des Tumorstadiums muss jedoch auch daran gedacht werden, dass nach der vorliegenden Studie die Überlebensdaten der Patienten mit lymphogenen Makrometastasen signifikant schlechter als die der Patienten mit Mikrometastasen

sind. Wegen dieser inkongruenten klinischen Verläufe wäre eine Verschmelzung der MM+- und pN+-Kollektive sicher nicht sinnvoll. Es sollte aber in Zukunft geprüft werden, ob die MM-positiven Patienten ebenfalls von einer adjuvanten Therapie profitieren. Weil zum Zeitpunkt der Operation bereits sehr häufig mikrometastatische Tumorzellen existieren, müssen auch neoadjuvante Behandlungen in klinischen Studien weiter getestet werden, da sich eine effiziente präoperative Eliminierung der Zellen vorteilhaft auswirken könnte. Ein Ansprechen der Mikrometastasen auf einerseits zytostatische (neo-)adjuvante Therapieverfahren kann wegen des erwähnten Nachweises ihrer Zellproliferation erwartet werden. Aufgrund der gegenteiligen Beobachtung, dass sich okkulte Tumorzellen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus befinden und deswegen gegenüber antiproliferativer Therapie unempfindlich sein könnten, sollten andererseits zellzyklusunabhängige Therapieoptionen geprüft werden, die beispielsweise auf immunologischer Basis auch in der Ruhephase der Zellen wirken können. Mit tumorspezifischen monoklonalen Antikörpern steht eine alternative adjuvante Behandlungsstrategie zur Verfügung, die bereits in den 90er Jahren erste klinisch ermutigende Ergebnisse gezeigt hat. Der Einsatz des monoklonalen Antikörpers 17-1A, der sich wie Ber-EP4 gegen das EpCAM-Molekül richtet, führte zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität und der Rückfallrate bei Patienten mit nodal-positiven kolorektalen Karzinomen (Riethmüller et al. 1994). Da sich dieser Vorteil vor allem aus einer geringeren Rate an Fernmetastasen ergab und die Häufigkeit von Lokalrezidiven unbeeinflusst blieb, übt diese spezifische Antikörpertherapie möglicherweise eine zytotoxische Wirkung auch auf okkulte disseminierte Tumorzellen aus. Es sind also Studien notwendig, die die Wirksamkeit immunologischer Therapie auf das Magenkarzinom und die lymphogenen Mikrometastasen prüfen. Als palliative Therapieoption steht mittlerweile der monoklonale Antikörper Catumaxomab zur Verfügung, der das EpCAM-Antigen epithelialer Tumorzellen und gleichzeitig immunologische Effektorzellen bindet und dadurch die Eliminierung der Krebszellen unterstützt (Ruf et al. 2007). Bei EpCAM-positiven Karzinomen mit malignem Aszites führt die intraperitoneale Therapie mit Catumaxomab zu einer Verlängerung der Zeit bis zur nächsten Parazentese und einem verlängerten punktionsfreien Überleben (Heiss et al. 2010). In der Studie zeigte das mit dem EpCAM-Antikörper behandelte Subkollektiv der Magenkarzinom-Patienten auch eine Verbesserung des Gesamtüberlebens.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen, dass Mikrometastasen eine genetische Varianz aufweisen und daher der Einsatz eines einzelnen Antikörpers für eine maximale Effizienz der Therapie voraussichtlich nicht ausreichen wird. In Zukunft wäre die Erstellung eines individuellen Antigenprofils denkbar, das nach Risikostratifizierung Patienten mit einer besonders kritischen Konstellation identifiziert und eine gezieltere Behandlung ermöglicht.

Die vorliegende Arbeit konnte Mikrometastasen in Lymphknoten des Magenkarzinoms als einen unabhängigen prognostischen Faktor identifizieren, sodass ihre Berücksichtigung beim Tumorstaging sinnvoll ist. Ergänzende Studien sind aber notwendig, um die Datenlage weiter zu festigen und die regelhafte Aufnahme der lymphogenen Mikrometastasen in die pN-Klassifikation und die Tumorstadien zu rechtfertigen. Sollten sich die hier präsentierten Ergebnisse in großen Patientenkollektiven bestätigen und führte man dann die beschriebenen Methoden bei allen Magenkarzinom-Patienten durch, erhielte man ein exakteres Staging und eine individuellere Prognose. In Zukunft wird es dann vermutlich auch gelingen, die stadiengerechte Therapie anzupassen und das Langzeitüberleben einzelner Patientengruppen zu verbessern.

## **5 Zusammenfassung**

**Hintergrund:** In der Existenz lymphogener Mikrometastasen (MM), die dem zurzeit etablierten Stagingverfahren verborgen bleiben, liegt möglicherweise eine Ursache für die unbefriedigende Überlebensrate von Patienten mit nodal-negativem Magenkarzinom. Die MM immunhistochemisch nachzuweisen und zu charakterisieren sowie ihre prognostische Relevanz zu prüfen, waren Ziele dieser Arbeit.

**Patienten und Methode:** 56 pN0-Patienten wurden immunhistochemisch mit dem monoklonalen Antikörper Ber-EP4 auf das Vorkommen von MM in den regionären Lymphknoten untersucht. Patienten mit immunoreaktiven Einzelzellen oder Zellclustern bis 0,2 cm Größe wurden positiv gewertet (MM+). Die Evaluierung des prognostischen Einflusses erfolgte uni- und multivariat. Die Mikrometastasen wurden mittels immunhistochemischer Doppelfärbung auf die malignom-spezifische Überexpression des p53-Proteins untersucht und dem p53-Markierungsindex ihres Primärtumors gegenübergestellt.

**Ergebnisse:** Bei 33 (58,9%) der 56 pN0-Patienten konnten MM detektiert werden. Ihr Vorkommen war von klassischen prognostischen Faktoren unabhängig. Das Kollektiv MM+ zeigte gegenüber der Gruppe MM- eine grenzwertig signifikante Reduktion der 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR MM+: 58%, MM-: 82%,  $p=0,059$ ). Die multivariate Analyse identifizierte die MM als einen unabhängigen prognostischen Faktor. Bei der anschließenden Doppelfärbung lag die Antigen-Retrieval-Rate bei geringen 18,2%. Zwei der sechs Patienten wiesen dabei p53-positive MM auf. Bei Primärtumoren mit p53-Überexpression zeigten die MM ein heterogenes p53-Antigenprofil.

**Diskussion und Fazit:** Ber-EP4-immunoreaktive Zellen werden bei über der Hälfte der histologisch nodal-negativen Magenkarzinome in den regionären Lymphknoten gefunden. Die vorliegende Studie bestätigt, dass die hier verwendete Methode okkulte Tumorzellen detektabel macht. Auf diese Weise diagnostizierte MM sind von klassischen Prognosefaktoren unabhängig und können bereits in sehr frühen Stadien der Erkrankung auftreten. Sie stellen auch ohne Berücksichtigung morphologischer Kriterien einen unabhängigen prognostischen Negativfaktor dar. Nach den Ergebnissen der Doppelfärbung ist die Akkumulation von p53 in lymphogenen MM variabel ausgeprägt, und ein positiver p53-Überexpressionsindex des Primärtumors lässt keinen Rückschluss auf den p53-Status der MM zu. Ergänzende Untersuchungen mit Einbeziehung histopathologischer Kriterien, einer detaillierten immunhistopathologischen Zellcharakterisierung und einer Unterteilung in Mikrometastasen und isolierte Tumorzellen sollten Gegenstand weiterer Studien sein. Eine Berücksichtigung dieser Ergebnisse würde zu einem exakteren Tumorstaging führen, mit dem der Krankheitsverlauf der Patienten noch besser abgeschätzt und in Zukunft möglicherweise eine optimierte, stadienadaptierte Therapie etabliert werden kann.

## **6 Literaturverzeichnis**

Abati A, Liotta LA (1996): Looking forward in diagnostic pathology. The molecular superhighway. *Cancer* 78:1–3

Ajisaka H, Yoshimitsu Y, Isobe Y, Takeshita Y (1999): The clinicopathological analysis of lymph node metastasis of gastric cancer. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 96:511-517

Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Nakajo A, Ishigami S, Okumura H, Kijima Y, Ueno S, Natsugoe S (2013): Clinical significance of lymph node micrometastasis in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 20:515-21

Ashwort TR (1896): A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J* 14:146

Baas IO, Mulder JWR, Offerhaus GJA, Vogelstein B, Hamilton SR (1994): An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol* 172:5-12

Balic M, Williams A, Dandachi N, Cote RJ (2011): Micrometastasis: detection methods and clinical importance. *Cancer Biomark* 9:397-419

Bártek J, Bártková J, Vojtěšek B, Stasková Z, Lukás J, Rejthar A, Kovarík J, Midgley CA, Gannon JV, Lane DP (1991): Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 6:1699-1703

Becker K, Fumagalli U, Mueller JD, Fink U, Siewert JR, Höfler H (1999): Neoadjuvant chemotherapy for patients with locally advanced gastric carcinoma: effect on tumor cell microinvolvement of regional lymph nodes. *Cancer* 85:1484-1489

Bellini MF, Cadamuro AC, Succi M, Proença MA, Silva AE (2012): Alterations of the TP53 gene in gastric and esophageal carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol*: 891961, Epub Aug 7

Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, Praud D, Ferlay J, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C (2009): Recent patterns in gastric cancer: a global overview. *Int J Cancer* 125:666-73

- Biffi R, Botteri E, Cenciarelli S, Luca F, Pozzi S, Valvo M, Sonzogni A, Chiappa A, Leal Ghezzi T, Rotmensz N (2011): Impact on survival of the number of lymph nodes removed in patients with node-negative gastric cancer submitted to extended lymph node dissection. *Eur J Surg Oncol* 37:305-311
- Boenisch T: Färbemethoden - Detektionssysteme; in: Handbuch Immunchemische Färbemethoden; hrsg. v. Boenisch T; DakoCytomation Corp., Carpinteria 2003, 34-42
- Bogoevski D, Chayeb H, Cataldegirmen G, Schurr PG, Kaifi JT, Mann O, Yekebas EF, Izbicki JR (2008): Nodal microinvolvement in patients with carcinoma of the papilla of Vater receiving no adjuvant chemotherapy. *J Gastrointest Surg* 12:1830-1837
- Broll R, Lembcke K, Stock C, Zingler M, Duchrow M, Schimmelpenning H, Strik M, Muller G, Kujath P, Bruch HP (1996): Tumor cell dissemination in bone marrow and peritoneal cavity. An immunocytochemical study of patients with stomach or colorectal carcinoma. *Langenbecks Arch Chir* 381:51-58
- Buskens CJ, Ten Kate FJ, Obertop H, Izbicki JR, van Lanschot JJ (2008): Analysis of micrometastatic disease in histologically negative lymph nodes of patients with adenocarcinoma of the distal esophagus or gastric cardia. *Dis Esophagus* 21:488-495
- Cai J, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N, Sakatani T (1999): Clinicopathological value of immunohistochemical detection of occult involvement in pT3N0 gastric cancer. *Gastric Cancer* 2:95-100
- Cai J, Ikeguchi M, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N (2000): Micrometastasis in lymph nodes of mucosal gastric cancer. *Gastric Cancer* 3:91-96
- Cai J, Liu J, Ikeguchi M, Yan QH, Zhou BJ, Song WQ, Wang FA, Xue P, Kaibara N (2005): Clinical significance of micrometastasis in lymph nodes and microinvasion in primary lesion in submucosal gastric cancer. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 43:161-165
- Cao L, Hu X, Zhang Y, Huang G (2011): Adverse prognosis of clustered-cell versus single-cell micrometastases in pN0 early gastric cancer. *J Surg Oncol* 103:53-56
- Choi HJ, Kim YK, Kim YH, Kim SS, Hong SH (2002): Occurrence and prognostic implications of micrometastases in lymph nodes from patients with submucosal gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 9:13-19
- Cserni G, Bianchi S, Boecker W, Decker T, Lacerda M, Rank F, Wells CA, European Working Group for Breast Screening Pathology (2005): Improving the reproducibility of diagnosing micrometastases and isolated tumor cells. *Cancer* 103:358-367

- Degiuli M, Sasako M, Ponti A, Vendrame A, Tomatis M, Mazza C, Borasi A, Capussotti L, Fronda G, Morino M; Italian Gastric Cancer Study Group (2014): Randomized clinical trial comparing survival after D1 or D2 gastrectomy for gastric cancer. *Br J Surg* 101:23-31
- De Steur WO, Dikken JL, Hartgrink HH (2013): Lymph node dissection in resectable advanced gastric cancer. *Dig Surg* 30:96-103
- Dhayat S, Sorescu S, Vallböhmer D, Kraus S, Baldus SE, Rehders A, Kröpil F, Krieg A, Knoefel WT, Stoecklein NH (2012): Prognostic significance of EpCAM-positive disseminated tumor cells in rectal cancer patients with stage I disease. *Am J Surg Pathol* 36:1809-1816
- Dobashi K, Sugio K, Osaki T, Oka T, Yasumoto K (1997): Micrometastatic P53-positive cells in the lymph nodes of non-small-cell lung cancer: prognostic significance. *J Thorac Cardiovasc Surg* 114:339-346
- Domagala W, Bedner E, Chosia M, Weber K, Osborn M (1992): Keratin-positive reticulum cells in fine needle aspirates and touch imprints of hyperplastic lymph nodes. A possible pitfall in the immunocytochemical diagnosis of metastatic carcinoma. *Acta Cytol* 36:241-245
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A: *AJCC Cancer Staging Manual*. Seventh edition; Springer, New York 2010
- Endo K, Kohnoe S, Okamura T, Haraguchi M, Nishiyama K, Toh Y, Baba H, Maehara Y (2005): Evaluation of endoscopic mucosal resection and nodal micrometastasis in pN0 submucosal gastric cancer. *Oncol Rep* 13:1059-1063
- Fukagawa T, Sasako M, Mann GB, Sano T, Katai H, Maruyama K, Nakanishi Y, Shimoda T (2001): Immunohistochemically detected micrometastases of the lymph nodes in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 92:753-760
- Fukagawa T, Sasako M, Shimoda T, Sano T, Katai H, Saka M, Mann GB, Karpeh M, Coit DG, Brennan MF (2009): The prognostic impact of isolated tumor cells in lymph nodes of T2N0 gastric cancer: comparison of American and Japanese gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol* 16:609-613
- Gonçalves AR, Carneiro AJ, Martins I, de Faria PA, Ferreira MA, de Mello EL, Fogaça HS, Elia CC, de Souza HS (2011): Prognostic significance of p53 protein expression in early gastric cancer. *Pathol Oncol Res* 17:349-355



- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994): Mutations in the p53 tumour suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54:4855-4878
- Gu CD, Osaki T, Oyama T, Inoue M, Kodate M, Dobashi K, Oka T, Yasumoto K (2002): Detection of micrometastatic tumor cells in pN0 lymph nodes of patients with completely resected nonsmall cell lung cancer: impact on recurrence and Survival. *Ann Surg* 235:133-139
- Hall PA, Ray A, Lemoine NR, Midley CA, Krausz T, Lane DP (1991): p53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology. *Lancet* 338:513
- Hartgrink HH, van de Velde CJ, Putter H, Bonenkamp JJ, Klein Kranenbarg E, Songun I, Welvaart K, van Krieken JH, Meijer S, Plukker JT (2004): Extended lymph node dissection for gastric cancer: who may benefit? Final results of the randomized Dutch gastric cancer group trial. *J Clin Oncol* 22:2069-2077
- Hartgrink HH, Jansen EP, van Grieken NC, van de Velde CJ (2009): Gastric cancer. *Lancet* 374:477-90
- Hata M, Machi J, Mamou J, Yanagihara ET, Saegusa-Beecroft E, Kobayashi GK, Wong CC, Fung C, Feleppa EJ, Sakamoto K (2011): Entire-volume serial histological examination for detection of micrometastases in lymph nodes of colorectal cancers. *Pathol Oncol Res* 17:835-841
- Heiss MM, Simon EH, Beyer BC, Gruetzner KU, Tarabichi A, Babic R, Schildberg FW, Allgayer H (2002): Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow. *J Clin Oncol* 20:2005-2016
- Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, Kutarska E, Kolesnik OO, Ivanchenko VV, Dudnichenko AS, Aleknaviciene B, Razbadauskas A, Gore M (2010): The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer* 127:2209-2221
- Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C (1999): Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 86:2668-2673
- Higashi H, Natsugoe S, Ishigami S, Uenosono Y, Matsumoto M, Nakajo A, Miyazono F, Hokita S, Takao S, Aikou T (2003): Distribution of lymph node metastasis including micrometastasis in gastric cancer with submucosal invasion. *World J Surg* 27:455-459

- Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, Saikawa Y, Suda K, Ando T, Kumagai K, Irino T, Yoshikawa T, Matsuda S (2008): Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol* 15:3092-3100
- Horstmann O, Füzesi L, Markus PM, Werner C, Becker H (2004): Significance of isolated tumor cells in lymph nodes among gastric cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 130:733-740
- Hosch SB, Knoefel WT, Metz S, Stoecklein N, Niendorf A, Broelsch CE, Izbicki JR (1997): Early lymphatic tumor cell dissemination in pancreatic cancer: frequency and prognostic significance. *Pancreas* 15:154-159
- Hosch SB, Stoecklein NH, Pichlmeier U, Rehders A, Scheunemann P, Niendorf A, Knoefel WT, Izbicki JR (2001): Esophageal cancer: the mode of lymphatic tumor cell spread and its prognostic significance. *J Clin Oncol* 19:1970-1975
- Hsu JT, Lin CJ, Sung CM, Yeh HC, Chen TH, Chen TC, Chiang KC, Yeh TS, Hwang TL, Jan YY (2013): Prognostic significance of the number of examined lymph nodes in node-negative gastric adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol* 39:1287-1293
- Huvos AG, Hutter RV, Berg JW (1971): Significance of axillary macrometastases and micrometastases in mammary cancer. *Ann Surg* 173:44-46
- International (Ludwig) Breast Cancer Study Group (1990): Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. *Lancet* 335:1565–1568
- Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Higashi H, Watanabe T, Aridome K, Hokita S, Aikou T (2003): Clinical impact of micrometastasis of the lymph node in gastric cancer. *Am Surg* 69:573-577
- Isozaki H, Okajima K, Fujii K (1997): Histological evaluation of lymph node metastasis on serial sectioning in gastric cancer with radical lymphadenectomy. *Hepatogastroenterology* 44: 1133-1136
- Izbicki JR, Hosch SB (2000): Significance of immunohistochemically detectable tumor cells in lymph nodes. *Zentralbl Chir* 125:796-798
- Izbicki JR, Hosch SB, Pichlmeier U, Rehders A, Busch C, Niendorf A, Passlick B, Broelsch CE, Pantel K (1997): Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N Engl J Med* 337:1188-1194

- Izbicki JR, Pantel K, Hosch SB (2002): Micrometastasis in solid epithelial tumors: impact on surgical oncology. *Surgery* 131:1-5
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011): Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90
- Jensen ML, Johansen P (1996): Immunocytochemical staining of smears and corresponding cell blocks from serous effusions: a followup and comparative investigation. *Diagn Cytopathol* 15:33-36
- Jeuck TL, Wittekind C (2014): Gastric carcinoma: stage migration by immunohistochemically detected lymph node micrometastases. *Gastric Cancer*: Epub Feb 19
- Jiang L, Yang KH, Guan QL, Zhao P, Chen Y, Tian JH (2013): Survival and recurrence free benefits with different lymphadenectomy for resectable gastric cancer: a meta-analysis. *J Surg Oncol* 107:807-814
- Takeji Y, Korenaga D, Tsujitani S, Baba H, Anai H, Maehara Y, Sugimachi K (1993): Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasising to lymph nodes. *Br J Cancer* 67:589-593
- Kawano R, Hata E, Ikeda S, Sakaguchi H (2002): Micrometastasis to lymph nodes in stage I left lung cancer patients. *Ann Thorac Surg* 73:1558-1562
- Kikuchi Y, Tsuchiya A, Ando Y, Yoshida T, Takenosita S (1999): Immunohistochemical detection of lymph node microinvolvement in node-negative gastric cancer. *Gastric Cancer* 2:173-178.
- Kim JH, Park JM, Jung CW, Park SS, Kim SJ, Mok YJ, Kim CS, Chae YS, Bae JW (2008): The significances of lymph node micrometastasis and its correlation with E-cadherin expression in pT1-T3N0 gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 97:125-130.
- Kim JJ, Song KY, Hur H, Hur JI, Park SM, Park CH (2009): Lymph node micrometastasis in node negative early gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 35:409-414
- Kim JW, Hwang I, Kim MJ, Jang SJ (2009): Clinicopathological characteristics and predictive markers of early gastric cancer with recurrence. *J Korean Med Sci* 24:1158-1164
- Kroepil F, Dulian A, Vallböhmer D, Geddert H, Krieg A, Vay C, Topp SA, am Esch JS, Baldus SE, Gires O (2013): High EpCAM expression is linked to proliferation and lauren classification in gastric cancer. *BMC Res Notes* 6:253

- Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H, Stein H (1990): Ber-Ep4: New monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelia. *J Clin Pathol* 43:213-219
- Lazăr D, Tăban S, Sporea I, Dema A, Cornianu M, Lazăr E, Goldiș A, Rațiu I, Vernic C (2010): The immunohistochemical expression of the p53-protein in gastric carcinomas. Correlation with clinicopathological factors and survival of patients. *Rom J Morphol Embryol* 51:249-257
- Lee E, Chae Y, Kim I, Choi J, Yeom B, Leong A (2002) Prognostic relevance of immunohistochemically detected lymph node micrometastasis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 94:2867-2873
- Levi F, Lucchini F, Gonzalez JR, Fernandez E, Negri E, La Vecchia C (2004): Monitoring falls in gastric cancer mortality in Europe. *Ann Oncol* 15:338-345
- Lim L, Michael M, Mann GB, Leong T (2005): Adjuvant therapy in gastric cancer. *J Clin Oncol* 23:6220–6232.
- Liu L, Zhang Y (2000): Histological diagnosis of regional lymph node micrometastasis with or without stromal reaction in gastric carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 29:339-342
- Liu X, Wang S, Xia X, Chen Y, Zhou Y, Wu X, Zhang J, He S, Tan Y, Qiang F (2012): Synergistic role between p53 and JWA: prognostic and predictive biomarkers in gastric cancer. *PLoS One* 7:e52348, Epub Dec 21
- Lorenzen S, Panzram B, Rosenberg R, Nekarda H, Becker K, Schenk U, Höfler H, Siewert JR, Jäger D, Ott K (2010): Prognostic significance of free peritoneal tumor cells in the peritoneal cavity before and after neoadjuvant chemotherapy in patients with gastric carcinoma undergoing potentially curative resection. *Ann Surg Oncol* 17:2733-2739
- Luo KJ, Hu Y, Wen J, Fu JH (2011): CyclinD1, p53, E-cadherin, and VEGF discordant expression in paired regional metastatic lymph nodes of esophageal squamous cell carcinoma: a tissue array analysis. *J Surg Oncol* 104:236-243
- Macadam R, Sarela A, Wilson J, MacLennan K, Guillou P (2003): Bone marrow micrometastases predict early post-operative recurrence following surgical resection of oesophageal and gastric carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 29:450-454
- Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup JM, Martenson JA (2001): Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* 345:725-730

- Maehara Y, Oshiro T, Endo K, Baba H, Oda S, Ichiyoshi Y, Kohnoe S, Sugimachi K (1996): Clinical significance of occult micrometastasis lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery* 119:397-402
- Maruyama K, Gunvén P, Okabayashi K, Sasako M, Kinoshita T (1989): Lymph node metastases of gastric cancer. General pattern in 1931 patients. *Ann Surg* 210:596-602
- Matsumoto M, Natsugoe S, Ishigami S, Nakashima S, Nakajo A, Miyazono F, Hokita S, Takao S, Eizuru Y, Aikou T (2002): Lymph node micrometastasis and lymphatic mapping determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in pN0 gastric carcinoma. *Surgery* 131:630-635
- Matsusaka S, Chèn K, Ogura M, Suenaga M, Shinozaki E, Mishima Y, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K (2010): Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Sci* 101:1067-1071
- Milsmann C, Füzesi L, Werner C, Becker H, Horstmann O (2005): Significance of occult lymphatic tumor spread in pancreatic cancer. *Chirurg* 76:1064-1072
- Milsmann C, Füzesi L, Heinmöller E, Krause P, Werner C, Becker H, Horstmann O (2008): Morphological and immunohistochemical characterization of isolated tumor cells by p53 status in gastrointestinal tumors. *Langenbecks Arch Surg* 393:49-58
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982): The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24.
- Momburg F, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Möller P (1987): Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissue. *Cancer Res* 47:2883-2891
- Morgagni P, Paragoni L, Scarpi E, Zattini PS, Zaccaroni A, Morgagni D, Bazzocchi F (2003) Lymph node micrometastases in early gastric cancer and their impact on prognosis. *World J Surg* 27:558-561
- Motherby H, Friedrichs N, Kube M, Nadjari B, Knops K, Donner A, Baschiera B, Dalquen P, Böcking A (1999): Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in diagnostic effusion cytology. *Anal Cell Pathol* 19:7-20
- Nagel H, Hemmerlein B, Ruschenburg I, Hüppe K, Droese M (1998): The value of anti-calretinin antibody in the differential diagnosis of normal and reactive mesothelia versus metastatic tumors in effusion cytology. *Pathol Res Pract* 194:759-764

- Nakamura K, Ueyama T, Yao T, Xuan ZX, Ambe K, Adachi Y, Yakeishi Y, Matsukuma A, Enjoji M (1992): Pathology and prognosis of gastric carcinoma. Findings in 10,000 patients who underwent primary gastrectomy. *Cancer* 70: 1030-1037
- Nekarda H, Gess C, Stark M, Mueller JD, Fink U, Schenck U, Siewert JR (1999): Immunocytochemically detected free peritoneal tumour cells (FPTC) are a strong prognostic factor in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 79:611-619
- Noll S, Schaub-Kuhnen S: *Praxis der Immunhistochemie*. 1. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München 2000
- Offner S, Schmaus W, Witter K, Baretton GB, Schlimok G, Passlick B, Riethmüller G, Pantel K (1999): p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6942-6946.
- Pantel K, Brakenhoff RH (2004): Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4: 448–456
- Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G (1993): Differential expression of proliferating-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 85:1419–1424
- Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmüller G (1994): Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Haematother* 3:165-173
- Pantel K, Cote RJ, Fodstad O (1999): Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 91:1113-1124
- Passlick B, Izbicki JR, Kubuschok B, Nathrath W, Thetter O, Pichlmeier U, Schweiberer L, Riethmüller G, Pantel K (1994): Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 12:1827-1832
- Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Mellstedt H (2012): Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat Rev* 38:68-75
- Petrelli F, Borgonovo K, Barni S (2011): The emerging issue of ratio of metastatic to resected lymph nodes in gastrointestinal cancers: an overview of literature. *Eur J Surg Oncol* 37:836-847

- Pituch-Noworolska A, Drabik G, Szatanek R, Białas M, Kołodziejczyk P, Szczepanik A, Stachura J, Zembala M (2007): Immunophenotype of isolated tumour cells in the blood, bone marrow and lymph nodes of patients with gastric cancer. *Pol J Pathol* 58:93-97
- Riethmüller G, Gruber R, Schneider-Gädicke E, Schlimok G, Witte J, Raab R, Pichlmayr R, Pichlmaier H, Schmiegel W, Buggisch P (1994): Randomised Trial of Monoclonal Antibody for Adjuvant Therapy of Resected Dukes' C Colorectal Carcinoma. *Lancet* 343:1177-1183
- Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe; Berlin 2013
- Roder JD, Böttcher K, Siewert JR, Busch R, Hermanek P, Meyer HJ (1993): Prognostic factors in gastric carcinoma. Results of the German Gastric Carcinoma Study. *Cancer* 72:2089-2097
- Rosenberg R, Nekarda H, Bauer P, Schenck U, Hoefler H, Siewert JR (2006): Free peritoneal tumour cells are an independent prognostic factor in curatively resected stage IB gastric carcinoma. *Br J Surg* 93:325-331
- Ru Y, Zhang L, Chen Q, Gao SG, Wang GP, Qu ZF, Shan TY, Qian N, Feng XS (2012): Detection and clinical significance of lymph node micrometastasis in gastric cardia adenocarcinoma. *J Int Med Res* 40:293-299
- Ruf P, Gires O, Jäger M, Fellingner K, Atz J, Lindhofer H (2007): Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *Br J Cancer* 97:315-321
- Saito H, Fukumoto Y, Osaki T, Fukuda K, Tatebe S, Tsujitani S, Ikeguchi M (2007): Prognostic significance of level and number of lymph node metastases in patients with gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 14:1688-1693
- Sano T, Sasako M, Kinoshita T, Maruyama K (1993). Recurrence of early gastric cancer. *Cancer* 72:3174–3178
- Schauer M, Peiper M, Theisen J, Knoefel W (2011): Prognostic factors in patients with diffuse type gastric cancer (linitis plastica) after operative treatment. *Eur J Med Res* 27:29-33
- Scheunemann P, Izbicki JR, Pantel K (1999): Tumorigenic potential of apparently tumor-free lymph nodes. *N Engl J Med* 340:1687

- Scheunemann P, Stoecklein NH, Hermann K, Rehders A, Eisenberger CF, Knoefel WT, Hosch SB (2009): Occult disseminated tumor cells in lymph nodes of patients with gastric carcinoma. A critical appraisal of assessment and relevance. *Langenbecks Arch Surg* 394:105-113
- Schurr PG, Yekebas EF, Kaifi JT, Lasch S, Strate T, Kutup A, Cataldegirmen G, Bubenheim M, Pantel K, Izbicki JR (2006): Lymphatic spread and microinvolvement in adenocarcinoma of the esophago-gastric junction. *J Surg Oncol* 94:307-315
- Seevaratnam R, Bocicariu A, Cardoso R, Mahar A, Kiss A, Helyer L, Law C, Coburn N (2012): A meta-analysis of D1 versus D2 lymph node dissection. *Gastric Cancer* 15:60-69
- Sheibani K, Shin SS, Kezirian J, Weiss LM (1991): Ber-EP4 antibody as a discriminant in the differential diagnosis of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 15:779-784
- Siewert JR, Kestlmeier R, Busch R, Böttcher K, Roder JD, Müller J, Fellbaum C, Höfler H (1996): Benefits of D2 lymph node dissection for patients with gastric cancer and pN0 and pN1 lymph node metastases. *Br J Surg* 83:1144-1147
- Siewert JR, Böttcher K, Stein HJ, Roder JD (1998): Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg* 228:449-461
- Sloothaak DA, Sahami S, van der Zaag-Loonen HJ, van der Zaag ES, Tanis PJ, Bemelman WA, Buskens CJ (2014): The prognostic value of micrometastases and isolated tumour cells in histologically negative lymph nodes of patients with colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol* 40:263-269
- Soetikno R, Kaltenbach T, Yeh R, Gotoda T (2005): Endoscopic mucosal resection for early cancers of the upper gastrointestinal tract. *J Clin Oncol* 23:4490-4498
- Songun I, Putter H, Kranenbarg EM, Sasako M, van de Velde CJ (2010): Surgical treatment of gastric cancer: 15-year follow-up results of the randomised nationwide Dutch D1D2 trial. *Lancet Oncol* 11:439-449
- Suzuki M, Ohwada M, Saga Y, Kohno T, Takei Y, Sato I (2001): Micrometastatic p53-positive cells in the lymph nodes of early stage epithelial ovarian cancer: prognostic significance. *Oncology* 60:170-175
- Tajima Y, Murakami M, Yamazaki K, Masuda Y, Aoki S, Kato M, Sato A, Goto S, Otsuka K, Kato T (2010): Risk factors for lymph node metastasis from gastric cancers with submucosal invasion. *Ann Surg Oncol* 17:1597-1604



- Tamura G (2006): Alterations of tumor suppressor and tumorrelated genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12:192-198
- Traweek ST, Liu J, Battifora H (1993): Keratin gene expression in nonepithelial tissues. *Am J Pathol* 142:1111-1118
- Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC (2007): Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 171:386-395
- Tumorregister München. Überleben C16: Magenkarzinom. 2013. [http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv\\_C16\\_\\_G.pdf](http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv_C16__G.pdf)
- Turner RR, Ollila DW, Stern S, Giuliano AE (1999): Optimal histopathologic examination of the sentinel lymph node for breast carcinoma staging. *Am J Surg Pathol* 23:263–267
- Tzanakis NE, Peros G, Karakitsos P, Giannopoulos GA, Efstathiou SP, Rallis G, Tsigris C, Kostakis A, Nikiteas NI (2009): Prognostic significance of p53 and Ki67 proteins expression in Greek gastric cancer patients. *Acta Chir Belg* 109:606-611
- Van Cutsem E, Dicato M, Arber N, Benson A, Cunningham D, Diaz-Rubio E, Glimelius B, Goldberg R, Haller D, Haustermans K (2006): The neo-adjuvant, surgical and adjuvant treatment of gastric adenocarcinoma. Current expert opinion derived from the Seventh World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2005. *Ann Oncol* 17:vi13-18
- Van der Gun BT, Melchers LJ, Ruiters MH, de Leij LF, McLaughlin PM, Rots MG (2010): EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis* 31:1913-1921
- Vojtěšek B, Bártek J, Midgley CA, Lane DP (1992): An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* 151:237-244
- Weaver DL, Krag DN, Ashikaga T, Harlow SP, O'Connell M (2000): Pathologic analysis of sentinel and nonsentinel lymph nodes in breast carcinoma: a multicenter study. *Cancer* 88:1099-1107
- Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S (2004): Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 35:122-128

- Went P, Vasei M, Bubendorf L, Terracciano L, Tornillo L, Riede U, Kononen J, Simon R, Sauter G, Baeuerle PA (2006): Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer* 94:128-135
- Wenqi D, Li W, Shanshan C, Bei C, Yafei Z, Feihu B, Jie L, Daiming F (2009): EpCAM is overexpressed in gastric cancer and its downregulation suppresses proliferation of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 135:1277-1285
- Wikman H, Vessella R, Pantel K (2008): Cancer micrometastasis and tumour dormancy. *APMIS* 116:754–770.
- Wittekind C, Meyer HJ: *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. 7. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2010
- Wolfrum F, Vogel I, Fändrich F, Kalthoff H (2005): Detection and clinical implications of minimal residual disease in gastro-intestinal cancer. *Langenbecks Arch Surg* 390: 430-441
- Wynford-Thomas D (1992): p53 in tumour pathology: Can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 166:329-330
- Xiao LJ, Zhao S, Zhao EH, Zheng X, Gou WF, Takano Y, Zheng HC (2013): Clinicopathological and prognostic significance of Ki-67, caspase-3 and p53 expression in gastric carcinomas. *Oncol Lett* 6:1277-1284
- Yanagita S, Natsugoe S, Uenosono Y, Arigami T, Arima H, Kozono T, Funasako Y, Ehi K, Nakajo A, Ishigami S (2008 a): Detection of micrometastases in sentinel node navigation surgery for gastric cancer. *Surg Oncol* 17:203-210
- Yanagita S, Natsugoe S, Uenosono Y, Kozono T, Ehi K, Arigami T, Arima H, Ishigami S, Aikou T (2008 b): Sentinel node micrometastases have high proliferative potential in gastric cancer. *J Surg Res* 145:238-243
- Yang Y, Li J, Mao S, Zhu H (2013): Comparison of immunohistology using pan-CK and EMA in the diagnosis of lymph node metastasis of gastric cancer, particularly micrometastasis and isolated tumor cells. *Oncol Lett* 5:768-772
- Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, Inomata M, Takeuchi H, Kitano S (2002): Prognostic effect of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 9:771-774

Yokota T, Ishiyama S, Saito T, Teshima S, Narushima Y, Murata K, Iwamoto K, Yashima R, Yamauchi H, Kikuchi S (2004): Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in gastric cancer: a multiple logistic regression analysis. *Scand J Gastroenterol* 39:380-384

Yonemura Y, Endo Y, Hayashi I, Kawamura T, Yun HY, Bandou E (2007): Proliferative activity of micrometastases in the lymph nodes of patients with gastric cancer. *Br J Surg* 94:731-736

Youn HG, An JY, Choi MG, Noh JH, Sohn TS, Kim S (2010): Recurrence after curative resection of early gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 17:448-454

## **7 Addendum**

Zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis weisen der Verfasser dieser Dissertation Herr Kai Wesselhöft und der Doktorvater Herr Professor Olaf Horstmann darauf hin, dass ein bestimmter und durch Hinweise in den Legenden genau bestimmbarer Anteil dieser Arbeit bereits publiziert wurde.

Der Name des Doktoranden (Kai Wesselhöft) wurde allein durch das Versäumnis des Autors Professor O. Horstmann in den folgenden Publikationen nicht aufgeführt:

- Horstmann O, Füzesi L, Markus PM, Werner C, Becker H (2004): Significance of isolated tumor cells in lymph nodes among gastric cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 130:733-740
- Milsman C, Füzesi L, Heinmöller E, Krause P, Werner C, Becker H, Horstmann O (2008): Morphological and immunohistochemical characterization of isolated tumor cells by p53 status in gastrointestinal tumors. *Langenbecks Arch Surg* 393:49-58

Die Promotionskommission wurde hiervon in Kenntnis gesetzt. Die Kommission hat am 30. Januar 2014 festgestellt, dass Herr Kai Wesselhöft glaubhaft dokumentieren kann, einen signifikanten Beitrag an der Datenerstellung und -auswertung geleistet zu haben, und dass ihm nach anerkannten Grundsätzen der Autorenregelung eine Koauthorschaft auf die genannten Publikationen zustünde.

Die Arbeit wurde am 30. Januar 2014 endgültig als Dissertationsleistung angenommen.

Prof. Dr. med. O. Horstmann

Kai Wesselhöft