

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

**Ki-67 weist beim perioperativ behandelten
Magenkarzinom eine inter- und intratumorale
Heterogenität auf**

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

vorgelegt von
Magnus Kock am Brink
aus Neumünster

Kiel 2023

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kai Bachmann, Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-,
Transplantations- und Kinderchirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2024

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 21.08.2024

gez. Prof. Dr. Christoph Röcken

(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Magenkarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie.....	2
1.1.3 Klassifikationen.....	3
1.1.4 Therapie und Prognose.....	4
1.1.5 Zusammenfassung Kernprobleme des Magenkarzinoms.....	7
1.2 Tumorheterogenität.....	7
1.3 Ki-67.....	9
1.4 Tumorregression.....	10
1.5 Fragestellung.....	11
2 Materialien und Methoden.....	12
2.1 Materialien.....	12
2.1.1 Ethik.....	12
2.1.2 Studienkollektiv.....	12
2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.4 Antikörper.....	13
2.1.5 Kit-Systeme.....	13
2.1.6 Bindegewebsfärbung.....	14
2.1.7 Software.....	14
2.2 Methoden.....	14
2.2.1 Histologie.....	14
2.2.2 Blockauswahl.....	14
2.2.3 Ganzgewebeschnitte.....	15

2.2.4	Färbeprotokolle	15
2.2.5	Durchsicht des Kollektivs	16
2.2.6	Digitale Auswertung.....	16
2.2.7	Studiendesign	19
2.2.8	Statistik.....	19
3	Ergebnisse	21
3.1	Methodische Aspekte	21
3.2	Homogenität und Heterogenität der Ki-67-Expression	26
3.3	Inter- und intratumorale Heterogenität der Ki-67-Expression	26
3.4	Blockweise-Analyse	29
3.4.1	Ki-67 und Tumorbettanteil.....	29
3.5	Fallweise-Analyse	30
3.5.1	Ki-67 und Tumorbettanteil.....	30
3.5.2	Überlebensanalyse	32
3.5.3	Ki-67-Proliferationsindizes und Alter der Paraffinblöcke	32
3.5.4	Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika	32
4	Diskussion	35
4.1	Diskussion der Methodik	35
4.1.1	Allgemeine Evaluation von Ki-67.....	35
4.1.2	Evaluation von Ki-67 in einer neoadjuvant behandelten Magenkarzinomkohorte	38
4.2	Diskussion der Ergebnisse	41
4.2.1	Intratumorale Heterogenität von Ki-67	41
4.2.2	Ki-67 als prognostischer Biomarker	43
4.2.3	Ki-67 und Tumorregression	44
5	Zusammenfassung.....	51
6	Literaturverzeichnis.....	53
7	Anhang	67
7.1	Anhangstabelle.....	67

8	Danksagung	68
9	Eidesstattliche Erklärung	69
10	Veröffentlichungen	70

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i> (engl.)
CAB	Trichrom-Färbung nach Masson
CIN	chromosomal instabil
EBV	Epstein-Barr Virus
GS	genomisch stabil
HE	Hämatoxylin und Eosin
H. pylori	<i>Helicobacter pylori</i> (gr.)
ITH	intratumorale Heterogenität
KI	künstliche Intelligenz
KiD	Differenz zwischen KiH und KiL
KiH	höchster Ki-67-Proliferationsindex eines Paraffinschnitts
KiL	niedrigster Ki-67-Proliferationsindex eines Paraffinschnitts
L	Status der Lymphgefäßinfiltration gemäß TNM-Klassifikation
MSI	Mikrosatelliten-instabil
M	Status der Fernmetastasen gemäß TNM-Klassifikation
N	Status der Lymphknotenmetastasen gemäß TNM-Klassifikation
(m)TBA	(medianer) Tumorbettanteil
TMA	<i>tissue micro array</i> (engl.)
p	Präfix in der TNM-Klassifikation für einen postoperativen histopathologischen Befund
Pn	Status der Perineuralscheideninvasion gemäß TNM-Klassifikation
PCK	Pan-Zytokeratin
PI	Proliferationsindex
R	Resektionsstatus gemäß TNM-Klassifikation
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i> (engl.)
T	Ausdehnung des Primärtumors gemäß TNM-Klassifikation
TNM	Tumor-Nodal-Metastasen-Status nach UICC
TRG	Tumorregressionsgrad

UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i> (deutsch: Internationale Vereinigung gegen Krebs)
V	Status der Veneninvasion gemäß TNM-Klassifikation
VMP	virtuelle Mikroskopie-Plattform
WMTS	Ganzgewebeschnitt (engl.: <i>whole mount tissue section</i>)
yp	Präfix in der TNM-Klassifikation für einen postoperativen histopathologischen Befund nach neoadjuvanter Therapie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumorevolution.	8
Abbildung 2: Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67.	18
Abbildung 3: Studiendesign.	20
Abbildung 4: Proliferationsindizes.	22
Abbildung 5: Morphologie der Auswertungsareale.	23
Abbildung 6: Inter- und intratumorale Heterogenität von Ki-67 und der Tumorregression des gesamten Kollektivs.	25
Abbildung 7: Homogenität und Heterogenität von Ki-67.	27
Abbildung 8: Intratumorale Heterogenität von Ki-67 und der Tumorregression.	28
Abbildung 9: Gesamt- und tumorspezifisches Überleben anhand Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit der Ki-67-Proliferationsindizes.	31
Abbildung 10: Ki-67-Proliferationsindizes in Abhängigkeit vom Alter der Tumorblöcke.	33
Abbildung 11: Einfluss der neoadjuvanten (Radio-)Chemotherapie auf Ki-67 und die Tumorregression.	45
Abbildung 12: Selektionseffekt durch die neoadjuvante Therapie.	46
Abbildung 13: Ki-67 als Marker für intratumorale Heterogenität.	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms.	5
Tabelle 2: UICC-Stadien des Magenkarzinoms.	5
Tabelle 3: Einteilung der Tumorregression.	10
Tabelle 4: Assoziation zwischen den Ki-67-Proliferationsindizes und dem Tumorbettanteil in der Blockweisen-Analyse.	29
Tabelle 5: Assoziation zwischen den Ki-67-Proliferationsindizes und dem medianen Tumorbettanteil in der Fallweisen-Analyse.	30
Tabelle 6: Klinisch-pathologische Patientencharakteristika und Überlebensdaten der untersuchten Kohorte.	34
Tabelle 7: Übersicht relevanter Studien mit Bezug auf den Ki-67-Proliferationsindex unter Aufführung der verwendeten Methodik.	37
Anhangstabelle 1: Heterogenität von Ki-67 in Abhängigkeit der zugeführten Therapie.	67

*Ein Punkt nur ist es, kaum ein Schmerz,
Nur ein Gefühl, empfunden eben;
Und dennoch spricht es stets darein,
Und dennoch stört es dich zu leben [1].*

Theodor Storm

Verstorben am Magenkarzinom 1888

1 Einleitung

1.1 Das Magenkarzinom

Maligne Tumoren des Magens umfassen unterschiedliche histologische Entitäten, zu denen unter anderem Lymphome, Sarkome und Karzinome zählen. Mit über 90 % findet der überwiegende Anteil seinen Ursprung im Schleimhautepithel des Magens und es handelt sich meistens um Adenokarzinome [2]. Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich an Adenokarzinomen des Magens durchgeführt, weshalb „Magenkarzinom“ und „Adenokarzinom des Magens“ im Folgenden synonym verwendet wurden. Zudem wurde bei personenbezogenen Hauptwörtern und bei Personenbezeichnungen das generische Maskulinum verwendet. Das diente nur der sprachlichen Vereinfachung und damit einer leichteren Lesbarkeit. Sämtliche Bezeichnungen stehen im Sinne der Gleichbehandlung repräsentativ für alle Geschlechter.

1.1.1 Epidemiologie

Das Magenkarzinom stellt nach wie vor ein großes Gesundheitsproblem dar und trägt nach dem Lungen- und Leberkarzinom den drittgrößten Anteil an den tumorassoziiert verlorenen gesunden Lebensjahren (engl.: *disease adjusted life years lost*) [3]. Es ist weltweit mit über 1 000 000 Neuerkrankungen die fünfthäufigste Tumorentität und steht mit geschätzten 769 000 jährlichen Todesfällen an vierter Stelle der krebsbedingten Todesursachen [4]. Im europäischen Vergleich liegt Deutschland mit jährlich 15 600 Neuerkrankungen und 9 600 Todesfällen im Mittelfeld [5]. Global betrachtet lassen sich klare geographische Unterschiede in den Inzidenzen feststellen. Während der afrikanische Kontinent sowie die westlichen Länder niedrige Inzidenzen aufweisen, ist der asiatische und osteuropäische Raum von hohen Neuerkrankungsraten geprägt. Obwohl seit Jahrzehnten ein stetiger Rückgang der absoluten Inzidenzen zu verzeichnen ist, lassen sich für proximale Tumoren (Kardia und ösophagogastrale Überganszone) sowie für Tumoren bei jüngeren Menschen eine Zunahme der Inzidenzen beobachten [4]. Dem gegenüber steht das insgesamt hohe Erkrankungsalter. In Deutschland beispielsweise erkranken Männer durchschnittlich im Alter von 72 und Frauen im Alter von 76 Jahren [6]. Neben der Assoziation zum Alter der Patienten ist außerdem eine Häufung beim männlichen Geschlecht zu beobachten, das im Vergleich zum weiblichen Geschlecht etwa doppelt so häufig betroffen ist [4].

1.1.2 Ätiologie

Topographisch lässt sich das Magenkarzinom prinzipiell in einen proximal (Kardia und ösophagogastrale Übergangszone) und distal gelegenen Tumor (Rest des Magens) unterteilen. Insbesondere für proximale Tumoren erweist sich eine eindeutige Einteilung jedoch als schwierig, da, neben einer uneinheitlichen anatomischen Definition der Kardia, die Veränderungen der distalen Ösophagus- und proximalen Magenschleimhaut histologische und immunphänotypische Überschneidungen aufweisen [7]. Das Magenkarzinom präsentiert sich als multifaktoriell bedingte Erkrankung. Als eine der Hauptursachen lässt sich das Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) benennen, das 1984 von Barry Marshall und Robin Warren entdeckt [8] und 1994 durch die Internationale Agentur für Krebsforschung als Kanzerogen der Klasse I eingestuft wurde [9]. Mit einer weltweiten Durchseuchungsprävalenz von fast 60 % gilt *H. pylori* [10], insbesondere für distale Tumoren [11–13], als einer der wichtigsten Risikofaktoren [14]. Pathophysiologisch werden direkte und indirekte proinflammatorische Prozesse diskutiert, die bei ausbleibender Eradikation von *H. pylori* über Meta- und Dysplasien in der Entstehung eines Karzinoms münden [15]. Die Infektion mit *H. pylori* allein reicht jedoch nicht für die Entstehung eines Karzinoms, da Varianzen in den Virulenzfaktoren sowie Wirts- und Umweltfaktoren diesen Prozess maßgeblich beeinflussen [16–18]. In diesem Zusammenhang zeigt sich, dass Kochsalz als Induktor von Virulenzfaktoren den prokarzinogenen Effekt von *H. pylori* verstärken kann [19], weshalb Fortschritte in der Eradikationstherapie von *H. pylori* und Nahrungskonservierung zur einer Verringerung distal lokalisierter Tumoren geführt haben [20]. Bei proximalen Tumoren hingegen lässt sich eine Assoziation zum Übergewicht und einem gesteigerten Reflux nachweisen, obwohl die Datenlage hierzu nicht eindeutig ist [21]. Es wird vermutet, dass das proximale Magenkarzinom, je nach anatomischer Lage, in der Ätiologie einem Ösophaguskarzinom, beziehungsweise einem distalen Magenkarzinom, ähnelt [22,23]. Als weitere allgemeine Risikofaktoren gelten der übermäßige Konsum von Zigaretten und Alkohol sowie chronische Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV). Das hieraus entstehende Magenkarzinom wird als gesonderte Entität gewertet [24]. Zudem lässt sich bei rund 10 % der Patienten eine familiäre Vorbelastung nachweisen, wobei das Magenkarzinom in aller Regel sporadisch auftritt [25].

1.1.3 Klassifikationen

Histologie

Neben einer Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation aus dem Jahre 2010 [26] wird heutzutage vor allem die Klassifikation nach Laurén verwendet, die drei Subtypen voneinander unterscheidet [27]. Es wird ein intestinaler Typ, der sich durch scharf begrenzte, differenzierte und kohäsive Drüsenverbände auszeichnet, von einem diffusen Typ abgrenzt, der vor allem durch eine undifferenzierte, lose Gruppierung von Tumorzellen gekennzeichnet ist. Als kleinere, dritte Gruppe wird der gemischte Typ beschrieben, der phänotypische Merkmale beider Subtypen aufweist [27]. Die Subtypen unterscheiden sich unter anderem in ihrer Ätiologie, Epidemiologie, Pathogenese und in der Prognose [27–29].

Molekulargenetik

Dank der rasanten Fortschritte in der Sequenzierung der nächsten Generation (engl. *next generation sequencing*), etablierten sich in den letzten Jahren molekulargenetische Klassifikationen, die es ermöglichen, das Magenkarzinom anhand seines Mutationsprofils einzuteilen [30–32]. Eine umfassende Klassifikation wurde 2014 im Rahmen des Projektes The Cancer Genome Atlas (TCGA) veröffentlicht. Die vier Subtypen, EBV-positiv, chromosomal instabil (CIN), Mikrosatelliten-instabil (MSI) und genomisch stabil (GS), weisen jeweils ein distinktes genetisches Profil auf [33]. CIN-Tumoren stellen mit einer Prävalenz von 50 % die größte Gruppe dar und sind durch eine proximale Tumorlokalisation, häufige Inaktivierungsmutationen des *TP53*-Gens, dem histologisch intestinalen Typ und fokalen Amplifikationen von Genen gekennzeichnet, die proliferationsassoziierte Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) kodieren (zum Beispiel EGFR, FGFR, HGF/MET). MSI-Tumoren zeichnen sich vor allem durch Hypermutationen in Signalwegen aus, die die Mitose betreffen. GS-Tumoren lassen sich mit Mutationen in Genen der Zellmotilität (*CDH1*, *RHOA*) und dem histologisch diffusen Typ assoziieren. Die kleine Gruppe der EBV-positiven Tumoren (9 %) weist häufiger Mutationen des *ARID1A*- und *PIK3CA*-Gens sowie eine Überexpression von PD-L1 und -L2 auf, wodurch sie vielversprechende Angriffspunkte für zukünftige Immuncheckpoint-Inhibitoren bieten. Im Hinblick auf die Prognose zeigte jedoch keiner der vier Subtypen einen signifikanten Vorteil [33]. Trotz zahlreicher Überschneidungen zwischen den molekulargenetischen Klassifikationen fehlt es weiterhin an einer allgemeingültigen Einteilung, um die individuelle Therapie der Patienten zu optimieren [34–36].

1.1.4 Therapie und Prognose

Konventionelle Therapie

In der Therapieplanung, Prognoseabschätzung sowie im Tumorstaging spielt die TNM-Klassifikation (Tabelle 1) eine große Rolle und stellt bislang den einzigen routinemäßig bestimmten prognostischen Biomarker dar [37]. Sie verschlüsselt neben anderen histopathologischen Merkmalen die Ausbreitung des Primärtumors (T-Kategorie), den regionären Lymphknotenbefall (N-Kategorie) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Kategorie). Der postoperative histopathologische Befund wird mit der Schreibweise pTNM versehen, der bei stattgefundener neoadjuvanter Therapie zu ypTNM erweitert wird. Die Kriterien werden regelmäßig aktualisiert und von der *Union internationale contre le cancer* (UICC) und der *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) in vier Stadien eingeteilt (Tabelle 2) [38]. In der Therapie des resektablen Magenkarzinoms wird auf ein multimodales Konzept aus chirurgischer Intervention, Bestrahlung und Chemotherapie gesetzt, wobei die operative Sanierung weiterhin den einzigen kurativen Therapieansatz darstellt. Für kleinere, auf die Mukosa beschränkte Tumoren (T1a nach TNM-Klassifikation [38]) bietet sich alternativ eine endoskopische Abtragung an [39]. Neben der operativen Säule wird vor allem der Chemotherapie ein hoher Stellenwert beigemessen, für die weltweit unterschiedliche Therapiekonzepte ausgearbeitet wurden. Während im asiatischen Raum primär eine postoperative (adjuvante) Chemotherapie nach erfolgter Gastrektomie durchgeführt wird, basiert die Therapie im nordamerikanischen Raum auf einer adjuvanten Radiochemotherapie [36]. In Europa hat sich seit der Veröffentlichung der MAGIC-Studie aus dem Jahre 2006 ein präoperatives (neoadjuvant) beziehungsweise perioperatives Regime aus Epirubicin, Cisplatin und 5-Fluorouracil (ECF) etabliert [40,41]. Darauf folgend erarbeitete die Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie 2019 ein perioperatives Chemotherapie-Regime aus 5-Fluorouracil, Folsäure, Oxaliplatin, und Docetaxel (FLOT), das mittlerweile als Standardkonzept in Europa gilt [42]. Im Folgenden wird „neoadjuvant“ synonym für „präoperativ“ und „perioperativ“ verwendet. Trotz Einführung dieser aggressiven Therapieansätze liegen die Ansprechraten weiterhin auf einem niedrigem Niveau und fluktuieren von Patient zu Patient [30,43].

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms. Gemäß der 8. Auflage der TNM-Klassifikation maligner Tumoren [38]

T - Primärtumor	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Nachweis eines Primärtumors
Tis	Carcinoma in situ
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 ohne Beteiligung des viszeralen Peritoneums
T4	Tumor perforiert Subserosa (viszerales Peritoneum) oder infiltriert benachbarte Strukturen
T4a	Tumor perforiert Subserosa
T4b	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen
N - regionale Lymphknoten	
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in ein bis zwei Lymphknoten
N2	Metastasen in drei bis sechs Lymphknoten
N3	Metastasen in sieben oder mehr Lymphknoten
N3a	Metastasen in sieben bis 15 Lymphknoten
N3b	Metastasen in 16 oder mehr Lymphknoten
M - Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen oder positive peritoneale Zytologie

Tabelle 2: UICC-Stadien des Magenkarzinoms. Gemäß der 8. Auflage der TNM-Klassifikation maligner Tumoren [38]

UICC-Stadium	T-Kategorie	N-Kategorie	M-Kategorie
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
IIB	T4a	N0/1	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
IIIB	T4b	N0/1	M0
	T4a	N2/3	M0
	T3	N3	M0
IIIC	T4b	N2/3	M0
	T4a	N3	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

Antikörpertherapie

Aufgrund der fortschreitenden Erkenntnisse über die genetische und immunologische Zusammensetzung des Magenkarzinoms rücken die gezielte Krebstherapie (engl. *targeted therapy*) und die Immuncheckpoint-Inhibitoren zunehmend in den Fokus. Während für das nicht resektable Magenkarzinom mit dem gegen den Wachstumsrezeptor Her2/neu gerichteten Antikörper Trastuzumab ein Antikörper in der Erstlinientherapie zugelassen ist [44], befinden sich Antikörper für die Therapie des resektablen Magenkarzinoms noch in klinischer Prüfung [36]. Die Zulassung für das nicht resektable Magenkarzinom beruht auf den Ergebnissen der ToGa-Studie aus dem Jahre 2010, die eine Überlebensverlängerung von rund zwei Monaten durch Zugabe von Trastuzumab erzielte. Im Hinblick auf die insgesamt schlechte Prognose (medianes Überleben 13,8 Monate), ist die Überlebensverlängerung jedoch als unzulänglich anzusehen [45]. Ein Grund hierfür liegt möglicherweise darin, dass Her2/neu in der Studienkohorte nur zu 22,1 % überexprimiert war und, dass die Positivraten für Her2/neu zwischen Biopsie und Resektat variierten [46]. Für das resektable Magenkarzinom befinden sich Antikörper gegen Strukturen wie Her2/neu und den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (VEGF-R2) in klinischer Prüfung, ohne bislang wegweisende Phase-III Daten vorweisen zu können [47,48]. Auch Studien zu anderen Tyrosinkinase wie HGF/MET oder EGFR zeigten bisher keine nennenswerten Ergebnisse [36]. Hingegen bieten sich mit Claudin 18.2, FGFR und VISTA weitere Ansatzpunkte, die derzeit untersucht werden [49]. Eine vielversprechende Substanzgruppe sind zudem die Immuncheckpoint-Inhibitoren, zu denen schon erste aussichtsreiche Daten vorliegen [36,50]. Somit befinden sich für das Magenkarzinom zwar erfolgsversprechende Antikörper gegen verschieden Proteinstrukturen in klinischer Testung [49], dennoch bildet das Grundgerüst der leitliniengerechten Therapie des Magenkarzinoms weiterhin die (Radio-)Chemotherapie und die gegebenenfalls anschließende operative Entfernung [44].

Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 33 % über alle Tumorstadien hinweg ist die Prognose des Magenkarzinoms als ungünstig anzusehen. Einige entscheidende Faktoren hierfür sind, dass sich bei etwa einem Drittel der Patienten zum Diagnosezeitpunkt Metastasen nachweisen lassen [6] und dass das Magenkarzinom, trotz Resektion in sano (R0-Resektion), eine hohe Rezidivrate von bis zu 60 % aufweist [40,51]. Zusätzlich lässt sich bei bis zu 20 % der Patienten eine frühe lymphogene Metastasierung (ab T1b nach TNM-Klassifikation [38]) feststellen, die mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist [52].

1.1.5 Zusammenfassung Kernprobleme des Magenkarzinoms

Es lässt sich festhalten, dass einige der Kernprobleme im Management des Magenkarzinoms in den uneinheitlichen molekulargenetischen Klassifikationssystemen [34–36], einem schlechten und variablen Ansprechen auf Chemotherapeutika [30,43] sowie in den wenigen derzeit zugelassenen Antikörpertherapien liegen [36]. Als Ursache für diese Probleme wird eine auf genetischer und translationaler Ebene beschriebene intratumorale Heterogenität (ITH) diskutiert [53–55].

1.2 Tumorheterogenität

Ausgangspunkt eines malignen Tumors ist die Entartung einer Zelle, die durch somatische Mutationen tumorspezifische Eigenschaften erwirbt (engl.: *Hallmarks of Cancer*) und dadurch das invasive Wachstum sowie die Ausbreitung des Tumors ermöglicht [56]. Aus tumorbiologischer Sicht wird ein maligner Tumor nicht mehr als genetisch homogene Entität, sondern als hoch komplexer und heterogener „Organismus“ angesehen, der sich in einem permanenten Wandel befindet [57].

Peter Nowell erarbeitete 1972 ein Modell, das besagt, dass Tumore sich aus mehreren genetisch unterschiedlichen Tumorzellclustern, sogenannten Subklonen, zusammensetzen, die das Ergebnis evolutionärer Selektionsprozesse sind [58]. Entscheidend für die Tumorevolution ist das zufällige Auftreten von Mutationen, die an nachfolgende Generationen vererbt werden und so zur Ausbildung einer subklonalen Struktur beitragen (Abbildung 1) [58]. Diese Struktur von genetisch distinkten Subpopulationen wird gemeinhin als genetische ITH bezeichnet [59]. Je nach Art und Lokalisation werden die Mutationen in Treibermutationen (engl.: *driver*) und neutrale (engl.: *passenger*) Mutationen unterteilt. Eine Treibermutation resultiert in einem Fitness-Vorteil gegenüber den anderen Tumorzellen, wodurch der Progress der betroffenen Tumorzelle gefördert wird. Neutrale Mutationen weisen hingegen weder einen Vor- noch einen Nachteil im Hinblick auf die Fitness der Tumorzelle auf [60,61]. Zur phylogenetischen Einordnung der Mutationen wurde zudem ein Modell vorgestellt, das Stammmutationen (engl. *trunk*) von Zweigmutationen (engl. *branch*) unterscheidet. Stammmutationen treten in der Tumorevolution früh auf und sind folglich in einer Mehrzahl der Subklone zu finden, während Zweigmutationen verhältnismäßig spät auftreten und nur in einigen wenigen Subklonen vorhanden sind [62]. Im Verlauf der Zeit kommt es zur Akkumulation der Mutationen und zur Ausbildung einer weitreichenden subklonalen Architektur, in der die genetische Komposition der einzelnen Subklone einen maßgeblichen Einfluss auf die Fitness

der jeweiligen Tumorzellen des Subklons hat [57,60]. Während die konkrete subklonale Architektur eines Malignoms individuell verschieden ist, lassen sich für die einzelnen Tumorentitäten unterschiedliche Evolutionsmodelle nachweisen. Dabei können mehrere Modelle gleichzeitig gelten und/oder fließend ineinander übergehen [53,61]. Somit ist die Tumorevolution als ein hochkomplexer Prozess zu verstehen, der durch zahlreiche Faktoren, wie die Tumormikroumgebung, intersubklonale Konkurrenz, räumliche Begrenzungen oder Chemotherapie beeinflusst wird [57,60,63–65].

Im Magenkarzinom zeigt sich die ITH unter anderem darin, dass zahlreiche Biomarker wie Claudin 18.2, Her2/Neu, FGFR, PD-L1, KRAS oder Ki-67 innerhalb des Tumors eine heterogene Expression aufweisen [66–75]. Eine Folge dieser ITH ist die inkorrekte Erfassung des Biomarkers, was eine Über- oder Unterschätzung der tatsächlichen Expression zur Folge haben kann [67,70].

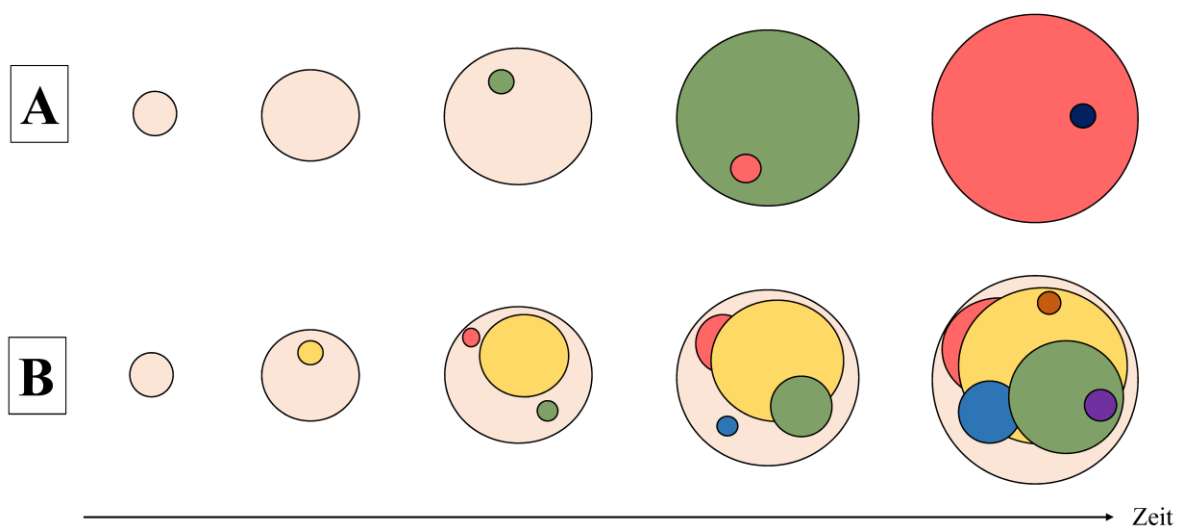


Abbildung 1: Tumorevolution. Dargestellt sind zwei mögliche Modelle der Tumorevolution in Abhängigkeit von der Zeit. Jeder farbige Kreis repräsentiert eine in sich genetisch homogene Tumorzellpopulation innerhalb eines Tumors (Gesamtheit der Kreise). Die Größe des Kreises korreliert mit der Größe des Subklons. In **(A)** ist die lineare Tumorevolution gezeigt, in der es durch regelmäßige Treibermutationen (*driver* Mutationen) zur Ausbildung eines neuen dominanten Tumorklons (neuer, anders gefärbter Kreis) kommt, der den vorherigen Klon verdrängt. **(B)** zeigt mit der verzweigten Evolution einen möglichen Evolutionsweg, der in der Ausbildung einer subklonalen Architektur mündet. Durch das zufällige Auftreten von Treiber- oder neutralen Mutationen entsteht eine subklonale Struktur, in der genetisch unterschiedliche Subklone für eine gewisse Zeitspanne gleichzeitig im Tumor existieren. Die Subklone können mit anderen Subklonen in Konkurrenz, Symbiose oder friedlicher Koexistenz leben. Modifiziert nach Marusyk et al. [60]. *Creative-Commons*-Lizenznummer: 5531250570605.

1.3 Ki-67

Die Assoziation zwischen Ki-67 und der Zellproliferation wurde erstmals 1983 von einer Kieler Arbeitsgruppe beschrieben [76]. Während Ki-67 von jeder proliferierende Zelle in den aktiven Zellteilungsphasen (G₁-, S-, G₂- und M-Phase) obligat exprimiert wird, ist das Protein in der Ruhephase der Zelle (G₀-Phase) nicht vorzufinden [77,78]. Ki-67 wird normalerweise in einem kleinen Teil der Tumormasse (sogenannte Wachstumsfraktion) erfasst und als Proliferationsindex (PI) angegeben. In verschiedenen Tumorentitäten, wie dem Mammakarzinom [79], neuroendokrinen Tumoren [80] oder Lymphomen [81], gilt der Ki-67-PI als ein etablierter Prognosemarker. Beim Magenkarzinom hingegen wird diese Rolle von Ki-67 kontrovers diskutiert [70,82,83]. Das wird besonders im Hinblick auf den seit der MAGIC-Studie [40] stattgefundenen Paradigmenwechsel hin zu einem neoadjuvanten Therapiekonzept deutlich, da es zu Ki-67 als Prognosemarker nach neoadjuvanter Therapie an stichhaltigen Studienergebnissen fehlt [84,85].

Die Evaluation von Ki-67 wird ebenfalls kontrovers diskutiert. Durch variierende Expressionsmuster mit unterschiedlichen Färbeintensitäten, die unter anderem von dem verwendeten Antikörper [86], der Zellzyklus- sowie der Mitosephase [77,78,86,87] abhängen, wird eine zwischen den Laboratorien konsistente Auswertung von Ki-67 und eine Reproduktion der Ergebnisse erschwert [88,89]. Das spiegelt sich auch in der Datenlage zu Ki-67 beim Magenkarzinom wider, da vor allem in Bezug auf die Auswertekriterien und Grenzwerte wenig Konsens besteht [70,83,90–92].

Die Evaluation von Ki-67 wird entweder anhand vollständiger Gewebeschnitte oder kleiner Gewebeproben (engl. *tissue micro array*, TMA) aus in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe vorgenommen. Es zeigt sich jedoch, dass TMAs in der Beurteilung von Biomarkern als umstritten gelten. So wurde durch Warneke et al. und Böger et al. eine hohe Rate an falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen durch TMAs in der Evaluation von Her2/neu und Ki-67 bei therapienaiven Magenkarzinomen beschrieben. Als ein Grund hierfür wird die ITH der Biomarker diskutiert [67,70]. Aufgrund dieser Fehleranfälligkeit wurden vermehrt vollständige Gewebeschnitte zur Evaluation von Ki-67 verwendet, wobei gemeinhin nur ein repräsentativer Tumorblock pro Fall untersucht wurde [70,82,90,92].

1.4 Tumorregression

Die Tumorregression ist ein häufig erfasster Biomarker, der das Ansprechen des Tumors auf die neoadjuvante Therapie quantifiziert. Hierfür wird der exzidierte Tumor in Paraffin eingebettet und der Gesamttrückgang der Tumormasse anhand von immunhistochemisch gefärbten Schnitten des eingebetteten Tumors beurteilt. Es existieren verschiedene Klassifikationssysteme, die unterschiedliche Evaluationskriterien und Tumorregressionsgrade (TRG) systematisieren [93–95], wobei der TRG nach Becker et al. zu den am häufigsten verwendeten Klassifikationen gezählt wird [95,96] (Tabelle 3).

Hinsichtlich der Prognose zeigt sich ein uneinheitliches Bild. Während eine Metaanalyse einen Zusammenhang zwischen Prognose und der Tumorregression nachweisen konnte [97], zeigte sich in einer Studie an 850 Magenkarzinomen keine Assoziation zwischen Patientenprognose und der Tumorregression [98]. Das spiegelt sich auch in den verschiedenen Klassifikationssystemen wider, in denen bisher kein eindeutiger Konsens darüber herrscht, ab welchem Grenzwert die Prognose des Patienten am besten abgeschätzt werden kann [99–102]. Hierzu trägt eine ausgeprägte Inter- und Intraobserver-Variabilität möglicherweise entscheidend bei [103].

Allen Klassifikationssystemen ist gemein, dass sie den Gesamttrückgang der Tumormasse beurteilen und dadurch eine homogene Reaktion der Tumorzellen auf die Chemotherapie implizieren, obwohl zahlreiche Faktoren, wie die unmittelbare Umgebung der Tumorzellen (sogenannte Tumormikroumgebung) [104], der histologische Phänotyp oder die anatomische Lokalisation, das individuelle Verhalten der Tumorzellen auf die Therapie beeinflussen können [96,105]. Zudem wurden interindividuelle Unterschiede in DNS-Reparaturmechanismen und genetische Polymorphismen für das Magenkarzinom beschrieben, weshalb die Annahme einer homogenen Reaktion des gesamten Tumors, insbesondere vor dem Hintergrund der genetischen ITH, möglicherweise unzureichend ist [106,107].

Tabelle 3: Klassifikation der Tumorregression. Gemäß Becker et al. [95]

Histopathologische Einteilung der Tumorregression	
Tumorregressionsgrad	Definition
1a	Kein Residualtumor vorhanden
1b	<10% Residualtumor im Vergleich zum vorherigen Tumorbett
2	10-50% Residualtumor im Vergleich zum vorherigen Tumorbett
3	>50% Residualtumor im Vergleich zum vorherigen Tumorbett

1.5 Fragestellung

Die ITH und die daraus resultierenden Herausforderungen für Therapie und Diagnostik des Magenkarzinoms haben im letzten Jahrzehnt an Bedeutung gewonnen. Insbesondere die Evaluation von Biomarkern wird durch die ITH erheblich erschwert. Gleichzeitig ist wenig über die Folgen der neoadjuvanten Therapie auf die Expression der Biomarker bekannt. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Einfluss der neoadjuvanten Therapie auf die Expression von Ki-67 unter Berücksichtigung der ITH zu untersuchen.

Hierfür wurden die folgenden Hypothesen überprüft:

1. Die neoadjuvante Therapie erschwert die Evaluation des Ki-67-PI.
2. Der Ki-67-PI weist nach neoadjuvanter Therapie eine ITH auf, da aufgrund der subklonalen Architektur eines malignen Tumors dessen Subklone unterschiedlich auf die Therapie ansprechen.
3. Demzufolge stehen auch der Ki-67-PI und die Tumorregression miteinander in Zusammenhang.
4. Der Ki-67-PI kann trotz der ITH als prognostischer Biomarker dienen.

Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurden der Proliferationsmarker Ki-67 und die Tumorregression anhand von bis zu fünf Tumorproben pro Fall aus einer neoadjuvant vorbehandelten Kohorte untersucht. Bei den Tumorproben handelte es sich um in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe. Die Auswertung erfolgte in zwei Schritten. Zum einen wurden die Tumorblöcke unabhängig von ihrer Fallzugehörigkeit untersucht (Blockweise-Analyse mit Blockweisen-Parametern). Zum anderen wurden die Paraffinblöcke ihren jeweiligen Fällen zugeordnet und diese miteinander verglichen (Fallweise-Analyse mit Fallweisen-Parametern).

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Ethik

Alle in dieser Studie unternommenen Versuche entsprechen den Vorgaben der Deklaration von Helsinki aus dem Jahr 1964 und ihren späteren Versionen sowie den ethischen Standards des verantwortlichen Ausschusses für Humanexperimente (institutionell und national) [108]. Vor Aufnahme in die Studie wurde von jedem Patienten das schriftliche Einverständnis oder ein entsprechender Ersatz eingeholt. Die Studien waren von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, genehmigt worden (D 453/10 und D525/15). Bei allen Experimenten wurden die vorgeschriebenen Gesundheits- und Sicherheitsvorschriften des Labors eingehalten.

2.1.2 Studienkollektiv

Es wurden 108 Fälle von Adenokarzinomen des Magens und der ösophagoastralen Übergangszone aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, herausgesucht. Alle Tumoren waren zwischen den Jahren 2009 und 2018 reseziert worden. Folgende klinisch-pathologischen Patientencharakteristika wurden erhoben: Alter bei Diagnosestellung, Geschlecht, Tumorlokalisierung, histologischer Tumortyp, T-Kategorie, N-Kategorie, Anzahl der untersuchten Lymphknoten, Veneninvasion (V-Kategorie), Lymphgefäßinfiltration (L-Kategorie), Perineuralscheideninvasion (Pn-Kategorie) und der Resektionsstatus (R-Status). Die Tumorregression wurde nach der Klassifikation von Becker et al. in den TRG 1a (komplette Regression), TRG 1b (<10 % residuale Tumorzellen), TRG 2 (zwischen 10 % und 50 % residuale Tumorzellen) und TRG 3 (>50 % residuale Tumorzellen) eingeteilt [95]. Folgende Kriterien mussten zum Einschluss in die Studie erfüllt sein:

(1) Zustand nach neoadjuvanter/perioperativer Chemotherapie, (2) totale oder partielle Gastrektomie, (3) histologisch gesichertes Adenokarzinom, (4) Vorhandensein von Sterbe- und Überlebensdaten. Alle Patienten mit einem klassifiziertem Tumorstadium T1a nach der 8. Ausgabe der UICC [38] und einer vollständigen Tumorregression (TRG 1a nach Becker et al. [95]) wurden von der Studie ausgeschlossen. Jedes resezierte Präparat wurde unter fachärztlicher Aufsicht präpariert und histologisch begutachtet. Alle Daten bezüglich des Todeszeitpunktes und der Todesursache wurden aus dem epidemiologischen

Krebsregister des Landes Schleswig-Holstein, Deutschland, entnommen. Anhand der Krankenhausdokumentation und auf Anfrage bei den zuständigen Hausärzten wurden die Follow-Up-Daten der noch lebenden Patienten eingeholt. Sämtliche Patienten wurden nach Aufnahme in die Studie pseudonymisiert und die zugehörigen Daten ausschließlich in kumulativer Form anonymisiert ausgewertet.

2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Folgende Geräte kamen zum Einsatz: Rotationsmikrotom Leica RM2245 (Leica Biosystems Nussloch, Nussloch, Deutschland), Färbeautomat Tissue-Tek Prisma® (Sakura Finetek Germany, Staufen, Deutschland), Eindeckautomat Tissue-Tek Film® (Sakura Finetek Germany, Staufen, Deutschland), Mikroskop Leica DM 1000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), Autostainer BOND™ Max System (Leica Biosystems Nussloch, Nussloch, Deutschland), Leica SCN400 Slidescanner (Leica Biosystems Nussloch, Nussloch, Deutschland), Medite COP 30 Cooling Plate (Medite Medical, Burgdorf, Deutschland), Tissue Flotation Bath TFB 45 (Medite Medical, Burgdorf, Deutschland), Inkubationskammer für Objektträger (Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland), Trocken- und Wärmeschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland), Labor-Kühlschrank (Philipp Kirsch, Willstätt-Sand, Deutschland).

Die folgenden Verbrauchsmaterialien wurden verwendet: Mikrotomklinge A22 (FEATHER Safety Razor Co. LTD, Osaka, Japan), Leica BOND™ Plus Slides Objektträger 25,5 mm x 75,5 mm x 1,0 mm (Leica Biosystems Nussloch, Nussloch, Deutschland), BOND Epitope Retrieval Solution 2 (Leica Biosystems, Richmond, Vereinigte Staaten), Antibody Diluent B (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland).

2.1.4 Antikörper

Die immunhistochemischen Färbungen wurde unter Verwendung eines monoklonalen anti-Ki-67 Kaninchen-Antikörpers (clone SP6 Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) und eines monoklonalen anti-Pan-Zytokeratin (PCK) Maus-Antikörpers (#MS-343-P1, Clone AE1/AE3, Epredia, Breda, Niederlande) durchgeführt.

2.1.5 Kit-Systeme

Zur Visualisierung fand das folgende Kit-System Verwendung: Bond™ Polymer Refine Detection Kit (braune Färbung; A.Menarini Diagnostics Deutschland, Berlin, Deutschland).

2.1.6 Bindegewebsfärbung

Zur Darstellung des Bindegewebes wurde die Trichrom-Färbung nach Masson verwendet (Trichrom-Färbelösung AB -Lösung, HT10516, Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten).

2.1.7 Software

Die folgende Software wurde verwendet: Windows 8.1 (Microsoft, Redmond, Vereinigte Staaten), Microsoft® Office 2019 Home and Student (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland), IBM® SPSS® Statistics 25.0 und 27.0 (IBM, New York, Vereinigte Staaten). Zur Auswertung wurde auf ein Viewer-Programm zurückgegriffen („virtuelle Mikroskopie Plattform; VMP“, Dr. rer. medic. HM Behrens, persönliche Mitteilung, 03.02.2023), über das eine digitale Auswertung ermöglicht wurde. Das VMP-Programm wurde bereits in Arbeiten mit ähnlichem Auswertungsansatz verwendet [72,109].

2.2 Methoden

2.2.1 Histologie

Die Gewebeproben waren nach Resektion in 10 % neutral gepuffertem Formalin fixiert worden. Nach Entwässerung der Proben folgte die Einbettung in Paraffin. Alle Tumorproben stammten aus den Jahren 2009 bis 2018. Die resezierten Tumoren waren in der Regel vollständig eingebettet worden. Es wurden nur die Paraffinblöcke in die Auswertung aufgenommen, in denen das Tumorbett eingebettet war. Alle ausgewählten Blöcke enthielten Anteile der Schleimhaut, des Tumorzentrums und der Invasionsfront. Anhand von Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten, entparaffinierten Gewebeschnitten erfolgte die Einteilung aller Tumoren gemäß der Laurén- Klassifikation [27]. Die Einschätzung der Tumorregression wurde anhand des TRG nach Becker et al. vorgenommen [95]. Primärtumorausdehnung, Nodal- und Fernmetastasenstatus (TNM) wurde nach der 8. Ausgabe der UICC klassifiziert [38]. Das gesamte Tumorbett der resezierten Tumoren wurde in Paraffin eingebettet, sodass die Anzahl der zur Auswahl stehenden Tumorblöcke von der Größe des Tumors abhing.

2.2.2 Blockauswahl

Für jeden Patient wurden ein bis fünf Tumorblöcke ausgewählt und HE-gefärbte Schnitte der ausgewählten Tumorblöcke zur Bestätigung der Einschlusskriterien nachmikroskopiert. Die Größe des resezierten Tumorgewebes war von Patient zu Patient unterschiedlich, wodurch die Anzahl der zur Auswahl stehenden Tumorblöcke variierte. Wenn weniger als fünf

tumortragende Blöcke von einem Patienten vorhanden waren, wurden alle Tumorblöcke (d.h. alle fünf) in die Studie eingeschlossen. Wenn mehr als fünf Tumorblöcke vorhanden waren (zum Beispiel 20 tumortragende Paraffinblöcke), wurden fünf repräsentative Tumorblöcke randomisiert aus den zur Auswahl stehenden Blöcken gewählt. In sieben Fällen war nur in einem Tumorblock Resttumor vorhanden, obwohl das ganze Tumorbett eingebettet worden war. Insgesamt erfüllten 108 Fälle mit 443 Blöcken die Einschlusskriterien.

2.2.3 Ganzgewebeschnitte

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die feingewebliche Beurteilung von Biomarkern durch die ITH beeinträchtigt werden kann [67,70]. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit nur Ganzgewebeschnitte der primär in Paraffinblöcken eingebetteten Gewebeproben verwendet (engl. *whole mount tissue sections*, WMTS). Diese unterscheiden sich in der Flächengröße (ca. 2-4 cm²) deutlich von TMAs (3,1 mm²).

2.2.4 Färbeprotokolle

Für die Durchführung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden zwei µm dicke Serienschnitte hergestellt. Nach Überführung der hergestellten Paraffinschnitte in ein 37° Celsius warmes Wasserbad wurden die Schnitte auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach einer Trocknungsphase über 24 Stunden bei 53° Celsius in einem Inkubationsschrank wurden die Schnitte der immunhistochemischen und histologischen Färbung zugeführt. Zur Untersuchung der Fragestellung wurden jeweils zehn Serienschnitte pro Tumorblock angefertigt, sodass insgesamt 4 430 Leerschnitte vorhanden waren. Jeweils drei aufeinanderfolgende Serienschnitte pro Tumorblock wurden in unterschiedlichen Färbungen angefärbt, während die übrigen sieben Leerschnitte eines Blocks als Reserve dienten.

Immunhistochemische Ki-67- and Pan-Zytokeratin-Färbung

Die immunhistochemischen Färbung von Ki-67 und PCK wurde mit einem vollautomatischen Färbeautomat (Autostainer BOND™ Max System, Leica Biosystems Nussloch, Nussloch, Deutschland) durchgeführt. Zur Freilegung der Antigene erfolgte für einen Zeitraum von 20 Minuten eine Vorbehandlung mittels BOND Epitope Retrieval Solution 2 (Leica Biosystems, St. Louis, Vereinigte Staaten) bei 37° Celsius. Der anti-Ki-67-Antikörper wurde anschließend in einer Verdünnung von 1:300 und der anti-PCK-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen (Antibody Diluent B, Zytomed Systems, Berlin, Deutschland).

Histologische Trichrom-Färbung nach Masson

Die Trichrom-Färbung nach Masson wurde mittels des vollautomatisierten Färbeautomaten Tissue-Tek Prisma® durchgeführt [110]. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte mit dem Eindeckautomaten Tissue-Tek Film® eingedeckt (Färbeautomat und Eindeckautomat von Sakura Finetek Germany, Staufen, Deutschland).

2.2.5 Durchsicht des Kollektivs

Zur mikroskopischen Durchsicht des Kollektivs wurden die Schnitte verwendet, die einer PCK-Färbung zugeführt wurden. Es wurde geprüft, ob ausreichend Tumorgewebe vorhanden war, um in die Auswertung aufgenommen werden zu können. Als Grenzwert wurde eine Mindestzellzahl von 50 Tumorzellen pro Schnitt festgelegt. Da es sich um Serienschnitte handelte, lagen die gefärbten Schnitte in direkter Nachbarschaft zueinander (2 µm Schnittdicke), sodass die Größe und Ausdehnung des Tumors in den korrespondierenden Serienschnitten als annähernd identisch angesehen wurde. Nach Durchsicht des Kollektivs wurden 14 Tumorblöcke (3,2 %) aufgrund von zu geringem Resttumorgewebe aus der Studie ausgeschlossen. Das Studienkollektiv verkleinerte sich dadurch auf 58 Fälle (54,7 %) mit fünf Blöcken, 19 Fälle (17,9 %) mit vier Blöcken, zwölf Fälle (11,3 %) mit drei Blöcken, zehn Fälle (9,4 %) mit zwei Blöcken und sieben Fälle (6,6 %) mit einem Block. Das finale Studienkollektiv bestand aus 106 Fällen mit 429 Tumorblöcken (durchschnittlich 4,1 Blöcke pro Fall), die der Färbung zugeführt wurden.

2.2.6 Digitale Auswertung

Ein Leica-SCN400 Slide Scanner (Leica Biosystems Nussloch, Nussloch, Deutschland) wurde verwendet, um die immunhistochemisch und histologisch gefärbten WMTS (N=1 287) einzuscannen. Die größtmögliche Vergrößerung in den gescannten Bildern betrug 400-fach bei einer maximalen räumliche Auflösung von 0,26 µm pro Pixel. Für die weitere Auswertung wurden die Bilder in Leica-SCN-Dateien exportiert und mithilfe des VMP-Programmes ausgewertet, das speziell für Arbeiten an histologischen Präparaten programmiert wurde. Die im VMP-Programm dargestellten Schnitte wurden anschließend in ihrer gesamten Fläche untersucht. Wichtige Funktionen waren unter anderem die stufenlos einstellbaren Vergrößerungsstufen, die Aufnahme hochauflösender Bilder von Ausschnitten der eingescannten Schnitte sowie die Polygon-Linienzeichnungsfunktion. Letztere wurde verwendet, um die Umrisse eines zu untersuchenden Areal einzuzichnen. Das Polygon wurde per Mausklick aufgespannt und konnte durch weitere Mausklicks

vergrößert werden [109]. Das VMP-Programm wurde um die Funktion erweitert, verschiedenfarbige Punkte zu platzieren.

Evaluation des Ki-67-Proliferationsindex

Die mit einem gegen Ki-67-gerichteten Antikörper immunhistochemisch gefärbten Schnitte (N=429) wurden zur Bestimmung des Ki-67-PI verwendet. Jede Färbereaktion des Nukleolus oder eine überwiegende Färbung des Karyoplasmas wurde als Ki-67-positiv gewertet. Tumorzellen, die nur eine zytoplasmatische Färbereaktion aufwiesen, wurden als Ki-67-negativ gewertet (Abbildung 2). Es wurde keine weitere Unterteilung der Ki-67-positiven Tumorzellen in unterschiedliche Färbeintensitätsstufen vorgenommen. Üblicherweise wurde der Ki-67-PI in der Region mit der höchsten Dichte (engl. *hot spot*) an Ki-67-positiven Tumorzellen bestimmt [70,92]. In dieser Arbeit wurde zusätzlich ein weiterer Ki-67-PI in der Region mit der geringsten Dichte an Ki-67-positiven Tumorzellen bestimmt, sodass für jeden Schnitt die höchste (Ki-67 *high* PI, KiH) und niedrigste (Ki-67 *low* PI, KiL) Proliferationsrate ermittelt wurde. Durch die Berechnung der Differenz (KiD) zwischen KiH und KiL wurde die Spannbreite (=Heterogenität) der Proliferation beurteilt. Zur Evaluation von Ki-67 wurde in jedem Schnitt jeweils die Region mit der visuell höchsten (für den KiH) und niedrigsten Dichte (für den KiL) an Ki-67-positiven Zellen aufgesucht. Mithilfe der Polygon-Linienzeichnungsfunktion wurden die Regionen unabhängig voneinander eingegrenzt. Jedes gesetzte Polygon wurde als Auswertungsareal bezeichnet, sodass pro Schnitt zwei Auswertungsareale vorhanden waren. Innerhalb eines Auswertungsareals wurden die Ki-67-positiven Tumorzellen mit einem roten Punkt und die Ki-67-negativen Tumorzellen mit einem blauen Punkt markiert. Der Ki-67-PI des jeweiligen Auswertungsareals wurde anschließend automatisch durch das VMP-Programm errechnet, indem die Anzahl der roten Punkte (entspricht den Ki-67-positiven Tumorzellen) ins Verhältnis zur Gesamtzahl der gesetzten Punkte (entspricht allen Ki-67-positiven und Ki-67-negativen Tumorzellen) des gleichen Auswertungsareals gesetzt wurde. Sowohl für den KiH als auch für den KiL eines Schnittes wurden bis zu 500 Tumorzellen manuell ausgezählt. Insgesamt wurden 376 142 Tumorzellen in entweder Ki-67-positiv oder Ki-67-negativ eingeteilt.

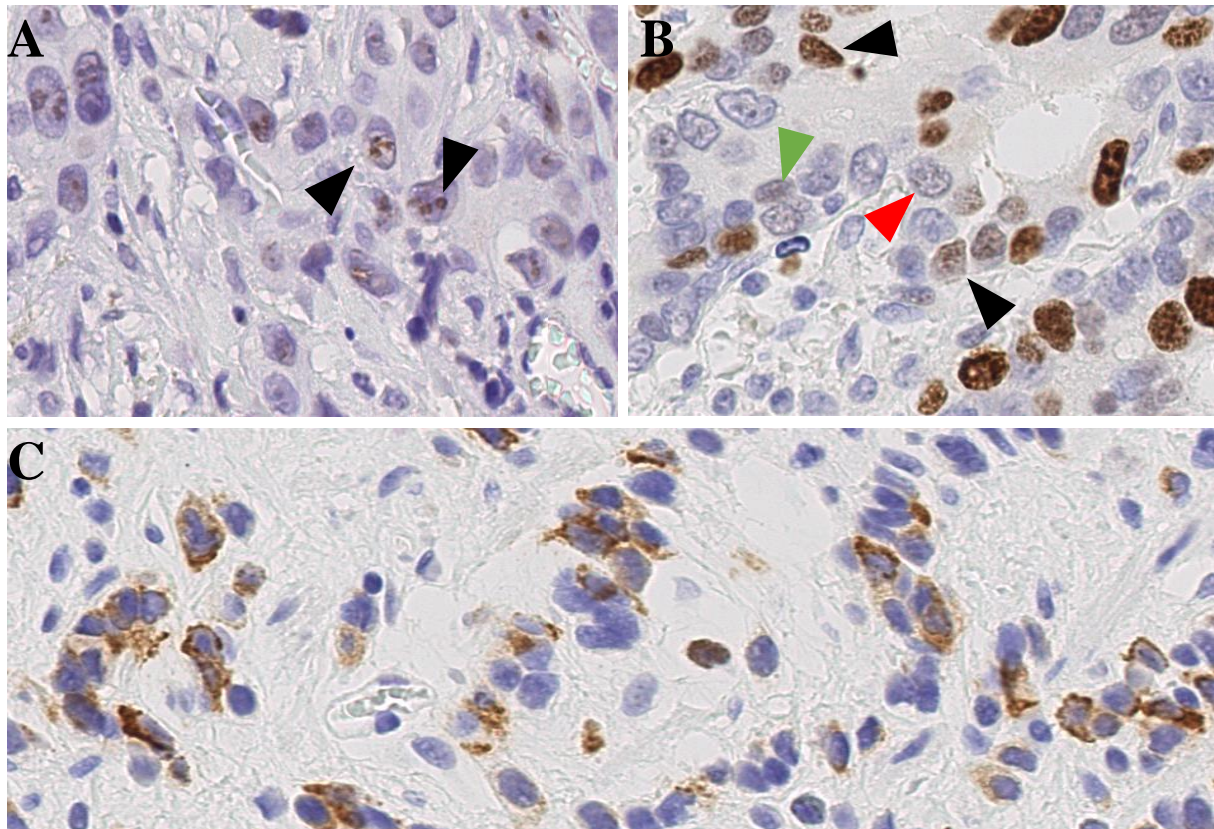


Abbildung 2: Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67. Dargestellt sind Beispiele für die Einteilung der Tumorzellen in Ki-67-positiv und Ki-67-negativ. Die Pfeile in (A) markieren Zellen, die einen angefärbten Nukleolus aufweisen und somit Ki-67-positiv sind. (B) zeigt Grenzfälle in der Färbintensität des Karyoplasmas. Der rote Pfeil markiert eine Ki-67-negative Zelle, während der grüne Pfeil eine schwach Ki-67-positive Tumorzelle kennzeichnet. Die schwarzen Pfeile zeigen zum Vergleich eindeutig Ki-67-positive Tumorzellen. Zytoplasmatische Färbereaktionen sind in (C) gezeigt (Ki-67-negativ). Anti-Ki-67-Immunfärbung, (A,B) 400-fache Vergrößerung, (C) 200-fache Vergrößerung.

Evaluation der Tumorregression

Die Erfassung der Tumorregression in den für diese Arbeit verwendeten Paraffinblöcken wurde durch Frau Laura Dunst im Rahmen ihrer Promotionsarbeit durchgeführt und die zugehörigen Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Im Folgenden wird die Methodik zusammengefasst, wobei für weiterführende Informationen hinsichtlich des Vorgehens auf die Arbeit von Frau Laura Dunst verwiesen wird. Für die Erfassung der Tumorregression wurden die Trichrom (N=429) und die PCK (N=429) gefärbten WMTS verwendet. Anhand der PCK-Färbung wurden residuale Tumorzellen identifiziert, während mittels der Trichrom-Färbung die ehemalige Tumorfläche (=Tumorbett) sichtbar gemacht wurde, die sich durch bindegewebige Veränderungen als Folge der neoadjuvanten Therapie zeigte. Mithilfe der Polygon-Linienzeichnungsfunktion wurde in beiden Schnitten die jeweilige Fläche des residualen Tumors (PCK) und des vorherigen Tumorbetts (Trichrom) eingezeichnet und

automatisch durch das VMP-Programm in der richtigen Größeneinheit registriert. Die Regression errechnete sich anschließend aus dem Größenverhältnis der residualen zur vorherigen Tumorfläche und wurde im Folgenden als Tumorbettanteil (TBA) bezeichnet.

2.2.7 Studiendesign

Für die Studie wurden Serienschnitte von einem bis zu fünf Paraffinblöcken pro Fall mit der Trichrom-Färbung und immunhistochemisch mittels Antikörper gegen Ki-67 sowie PCK gefärbt. Um zu gewährleisten, dass ausreichend Resttumorgewebe vorhanden war, wurden alle PCK gefärbten Schnitte nachmikroskopiert. Es mussten mehr als 50 Tumorzellen vorhanden sein (Grenzwert), damit der Tumorblock in die Studie aufgenommen wurde. Aus jedem Paraffinblock wurden vier Parameter ermittelt (Blockweise-Parameter: KiH, KiL, KiD und TBA). Da pro Fall zwischen ein und fünf Paraffinblöcke vorhanden waren, wurden mindestens vier und maximal 20 Datenpunkte pro Fall gemessen. Die nachfolgende statistische Auswertung bezog sich entweder auf eine Blockweise-Analyse (anhand Blockweise-Parameter), in der alle Datenpunkte unabhängig von ihrem Fall untersucht wurden, oder auf eine Fallweise-Analyse, für die vier weitere Parameter (Fallweise-Parameter: maximale KiH des Falls, der minimale KiL des Falls, die KiD des maximalen KiH und minimalen KiL des Falls und der Median aller TBAs (mTBA) des Falls) festgelegt wurden. Die Messergebnisse wurden mit dem TBA, den klinisch-pathologischen Patientencharakteristika und den Überlebensdaten in Zusammenhang gebracht (Abbildung 3).

2.2.8 Statistik

Für die statistischen Analysen wurde IBM® SPSS® Statistics 25.0 und 27.0 (IBM, New York, Vereinigte Staaten) verwendet. Die Werte zu Ki-67 und dem mTBA wurden am Median dichotomiert. Zur Analyse der nominalen und dichotomierten Variablen wurde der exakte Test nach Fischer benutzt [111]. T- und N-Kategorie, Stadium nach UICC [38] und TRG nach Becker et al. [95] wurden mittels des Kendall-Tau-Korrelationskoeffizienten untersucht [112]. Mit der Pearson Korrelation wurde der Zusammenhang zwischen PI und Tumorblockalter berechnet [113]. Mithilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney Tests wurde der Zusammenhang zwischen zugeführter Therapie und Heterogenität von Ki-67 festgestellt [114]. Die Überlebensraten wurden mittels des Kaplan-Meier-Schätzers ermittelt und als Kaplan-Meier-Kurven graphisch dargestellt [115]. Signifikante Unterschiede in den Überlebenskurven wurden durch den Log-Rank-Test festgestellt [116]. Es wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 angenommen. Das Simes-Verfahren wurde zur Korrektur für multiples Testen verwendet [117].

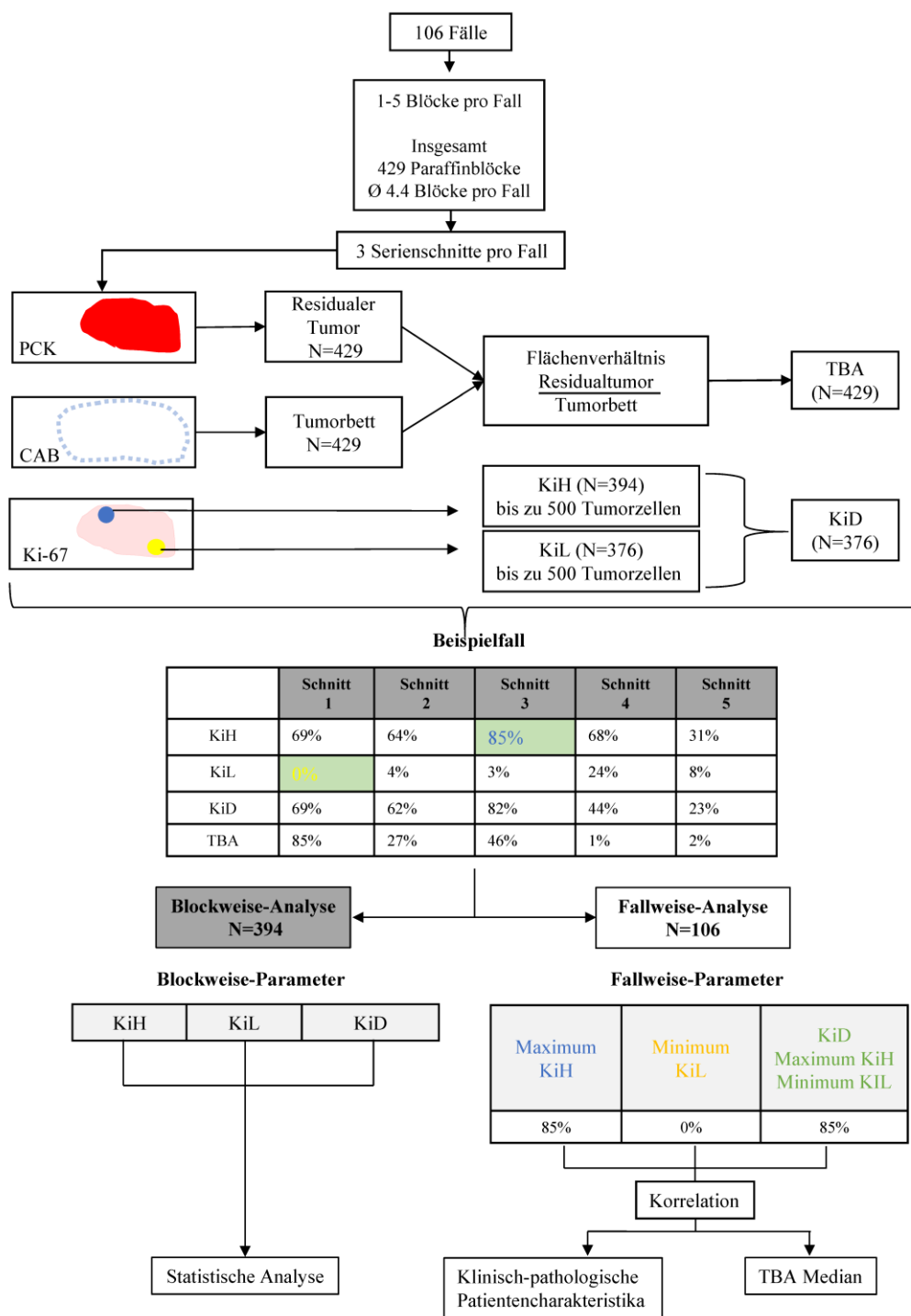


Abbildung 3: Studiendesign. Dargestellt ist das Studiendesign der vorliegenden Arbeit. KiH: Ki-67 *high* Proliferationsindex (PI); KiL: Ki-67 *low* PI; TBA: Tumorbettanteil. PCK: Pan-Zytokeratin-Färbung; CAB: Trichrom-Färbung nach Masson [110]. Modifiziert nach Kock am Brink et al. [118]. Die Abbildung ist unter der *Creative Commons Attribution 4.0 International License* lizenziert. Die Lizenz ist unter folgendem Link einzusehen: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>.

3 Ergebnisse

3.1 Methodische Aspekte

Die Evaluation von Ki-67 bei neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen erforderte die Festlegung spezifischer Auswertekriterien. Durch die neoadjuvante Therapie verkleinerte sich die Tumormasse teils erheblich, wodurch eine Auswertung erschwert wurde. Zum einen war, je nach Ausmaß der Regression, nur noch wenig residuelles Tumorgewebe im Schnitt vorhanden, zum anderen wurde das Resttumorgewebe durch narbiges Bindegewebe zersplittert. Daraus ergaben sich folgende Probleme:

Problem 1: Zellzahl des Proliferationsindex

Zur Bestimmung eines Ki-67-PI musste eine ausreichend große Anzahl an Tumorzellen ausgezählt werden. Sie musste entsprechend groß gewählt werden, um den Einfluss von falsch klassifizierten Tumorzellen (sogenannte Ausreißer) zu minimieren und den Ki-67-PI nicht zu verfälschen. Auf der anderen Seite durfte die Zellzahl nicht zu groß gewählt werden, da die neoadjuvante Therapie in variablem Ausmaß zu einer substanziellen Reduktion der Tumormasse führte und dadurch nicht ausreichend viel Resttumorgewebe für eine Evaluation von Ki-67 vorhanden war. Es galt, die Balance zwischen Ausreißer-Risiko und Resttumorgewebe im Gleichgewicht zu halten, weshalb 500 Tumorzellen pro Ki-67-PI als Kenngröße gewählt wurde. Dennoch konnten, bedingt durch die Tumorregression, die Ki-67-PIs nicht für jeden Schnitt auf der Basis von jeweils 500 Tumorzellen berechnet werden.

Als Lösung wurde festgelegt, dass pro Schnitt mindestens ein Ki-67-PI mit mindestens 100 Tumorzellen ausgezählt werden musste. Wenn ausreichend Resttumorgewebe vorhanden war, wurden bis zu 500 Tumorzellen pro Ki-67-PI ausgezählt. Wenn mehr als 100 Tumorzellen vorhanden waren, aber die Anzahl der Tumorzellen nur für einen Ki-67-PI ausreichend war (zum Beispiel 150 Tumorzellen), wurde der Ki-67-PI unabhängig von der Höhe des PI als KiH gewertet (Abbildung 4). Falls keiner der beiden Ki-67-PIs (KiH oder KiL) anhand von jeweils 100 Tumorzellen berechnet werden konnte, wurde dieser Schnitt in der Auswertung nicht berücksichtigt. 35 Schnitte wurden aufgrund dieser Vorgehensweise von der Auswertung ausgeschlossen. Durch diese Selektion verkleinerte sich das auswertbare Kollektiv auf eine abschließende Größe von 99 Fällen mit insgesamt 394 Blöcken.

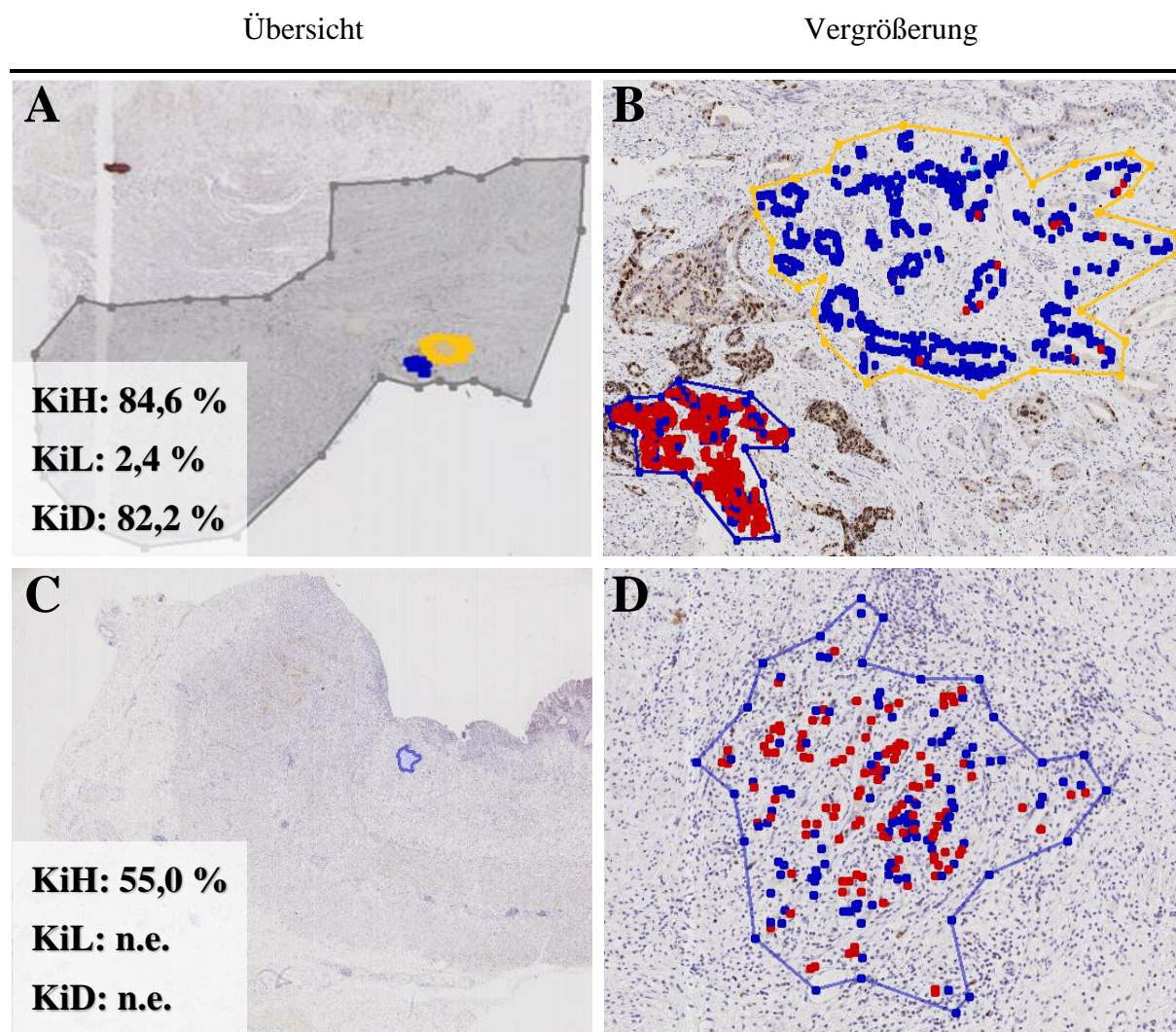


Abbildung 4: Proliferationsindizes. Gezeigt sind Ki-67-Proliferationsindizes (PIs), die unterschiedliche Zellanzahlen aufweisen. (A+B) und (C+D) zeigen Tumorschnitte aus verschiedenen Fällen in zwei Vergrößerungsstufen. Das gelbe Polygon zeigt das Auswertungsareal für den Ki-67 *low* PI (KiL), das blaue Polygon zeigt das Auswertungsareal für den Ki-67 *high* PI (KiH). Jeder rote Punkt markiert eine Ki-67-positive, jeder blaue Punkt eine Ki-67-negative Zelle. In (A+B) ist ausreichend Tumorgewebe vorhanden, um die PIs jeweils anhand von 500 Tumorzellen zu berechnen (KiL: 2,2 %; KiH: 84,6 %; KiD: 82,2 %). Das graue Areal grenzt den Residualtumor ein. (C+D) zeigen einen Schnitt mit wenig Resttumor. Wegen der geringen Resttumormasse wird nur ein PI (KiH) für diesen Schnitt ermittelt. Der PI errechnet sich anhand von 209 Tumorzellen (KiH: 55,0 %). Der KiL und die KiD werden aufgrund der geringen Tumormassen in diesem Schnitt nicht erfasst (n.e.). Anti-Ki-67-Immunfärbung. (B,D) 50-fache Vergrößerung. (A,C) einfache Vergrößerung.

Problem 2: Morphologie der Auswertungsareale

Die Erfassung eines Ki-67-PI erfolgt in der Routine mithilfe eines Mikroskops bei 200- bis 400-facher Vergrößerung, sodass immer ein Ausschnitt aus dem gesamten Tumor in Form eines runden Gesichtsfeld ausgezählt wird [70]. Damit ist der ausgezählte Flächenanteil in seiner Größe „standardisiert“. In dieser Arbeit erfolgte die Auswertung anhand digitaler Scans, wodurch der gesamte Schnitt, ohne Einschränkung durch einen kreisrunden

Sichtfeldausschnitt wie bei der Auswertung mithilfe eines Mikroskops, eingesehen und beurteilt wurde. Daraus ergab sich jedoch das Risiko, dass das Auswertungsareal, unter anderem aufgrund von Regressions- und Überlappungsphänomenen, nicht als kreisrunde Fläche ausgewählt werden konnte. Je nach Ki-67-PI, wurden vermehrt Ki-67-positive oder Ki-67-negative Zellen eingeschlossen. Weiterhin war in den Fällen, in denen nur noch wenig Resttumorgewebe vorhanden war, nicht immer die Möglichkeit gegeben, ein standardisiertes rundes Areal einzugrenzen.

Um diese Stichprobenverzerrungen zu minimieren und ein einheitliches Vorgehen zu ermöglichen, wurden die Auswertungsareale so eingezeichnet, dass sie möglichst dem runden Sichtfeld eines Mikroskops entsprachen (Abbildung 5A). In den Schnitten, in denen diese Möglichkeit durch die Tumorausdehnung nicht bestand, wurde die Form des Auswertungsareals so rund wie möglich eingezeichnet. Weiterhin wurde der Zell-Zell-Abstand innerhalb eines Auswertungsareals auf maximal 1000 μm begrenzt. Dadurch wurde gewährleistet, dass sich die Auswertungsareale auf einen bestimmten Bereich beschränkten und nicht willkürlich groß gezeichnet wurden (Abbildung 5B).

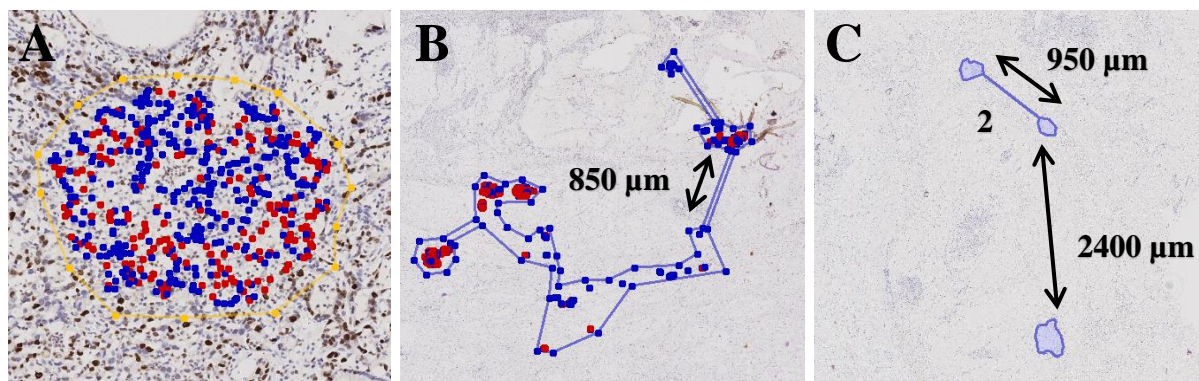


Abbildung 5: Morphologie der Auswertungsareale. Dargestellt sind verschiedene Formen der Auswertungsareale aus unterschiedlichen Fällen. Die Auswertungsareale wurden zur Berechnung der Ki-67-Proliferationsindizes (PIs) verwendet. Das gelbe Polygon zeigt den Ki-67 low PI (KiL), während die Ki-67 high PIs (KiH) in blau dargestellt sind. Jeder rote Punkt markiert eine Ki-67-positive Zelle, jeder blaue Punkt eine Ki-67-negative Zelle. In (A) ist ausreichend Tumorgewebe vorhanden, um ein rundes Areal einzugrenzen. (B) zeigt ein verformtes Auswertungsareal. Es sind keine weiteren Tumorzellen vorhanden, wodurch es keine Möglichkeit gab, ein rundes Auswertungsareal einzuzeichnen. Der Zell-Zell-Abstand beträgt weniger als 1000 μm , weshalb die Zellen in einem Auswertungsareal eingrenzt sind. (C) zeigt den Sonderfall, wenn 500 Zellen für einen PI (in dem Fall KiH) im Schnitt vorhanden waren, aber der Zell-Zell-Abstand über 1000 μm lag. Auswertungsareal 1 enthält 280 Zellen (PI: 49,3 %) und liegt 2400 μm von den nächsten Tumorzellen entfernt. Durch Addition eines zweiten Auswertungsareals (2) mit 220 Zellen (PI: 30,5 %), errechnete sich der PI anschließend auf Basis von 500 Tumorzellen (KiH: 41,0 %). Anti-Ki-67-Immunfärbung. (A) 75-fache Vergrößerung. (B,C) elffache Vergrößerung.

Problem 3: Räumliche Trennung

Die durch die Chemotherapie induzierte Regression resultierte in teilweise spärlich vorhandenem Resttumorgewebe, das unter anderem durch unterschiedliche große Narbenzonen zersplittert war. Durch die Festlegung des maximalen Zell-Zell-Abstands innerhalb eines Auswertungsareals von 1000 μm , konnte die erforderliche Anzahl von 500 Tumorzellen in einigen Schnitten nicht in einem Auswertungsareal ausgezählt werden, da keine weiteren Tumorzellen im Umkreis von 1000 μm um das Auswertungsareal herum vorzufinden waren (Abbildung 5C).

Als Lösung wurde festgelegt, dass in den Schnitten, in denen der Resttumor stark verteilt vorlag, ein Ki-67-PI aus mehreren Auswertungsarealen zusammengesetzt werden durfte. Hierfür wurden, je nach PI, weitere passende Regionen (d.h. Regionen mit einer hohen Dichte an Ki-67-positiven Tumorzellen für den KiH, Regionen mit einer geringen Dichte an Ki-67-positiven Tumorzellen für den KiL) aufgesucht und ausgezählt. Somit wurde die Anzahl von 500 Tumorzellen pro PI durch die Addition von mehreren Auswertungsarealen erreicht (Abbildung 5C). Die zusätzlichen Auswertungsareale mussten keine Mindestanzahl an Zellen vorweisen.

Problem 4: Verfälschung der Proliferationsindizes

Durch die Möglichkeit, mehrere Auswertungsareale zu einem Ki-67-PI zusammenzufassen, bestand das Risiko, trotz ausreichenden Tumorgewebes gezielt jeweils nur kleine Bereiche aus mehreren Regionen (zum Beispiel *hot spot*-Regionen für den KiH) auszuzählen und zu addieren. Dadurch würde sich der PI (beispielsweise der KiH) artifiziell erhöhen lassen.

Es wurde deshalb festgelegt, dass in allen Schnitten, in denen ausreichend Tumorgewebe vorhanden war, die 500 Zellen aus einem einzigen Auswertungsareal stammen mussten.

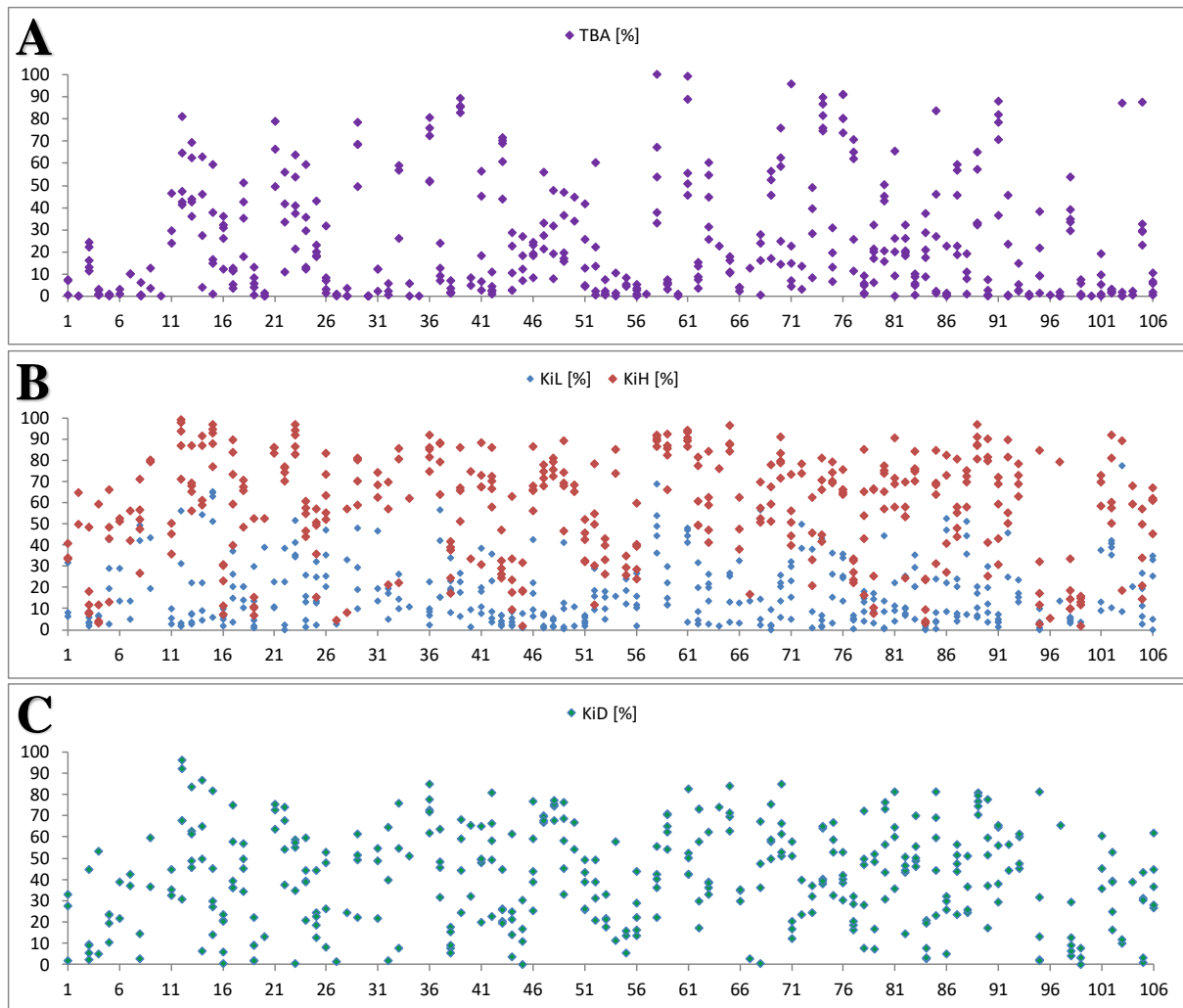


Abbildung 6: Inter- und intratumorale Heterogenität von Ki-67 und der Tumorregression des gesamten Kollektivs. Die Visualisierung der Daten in drei Graphen zeigt eine ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität (ITH) sowohl in der Ki-67-Expression als auch in der Tumorregression. Auf der X-Achse sind jeweils die Fälle in chronologischer Reihenfolge (Fall 1 ist aus 2009; Fall 106 ist aus 2018) zu sehen. Auf der Y-Achse sind die prozentualen Messwerte für die Ki-67-Proliferationsindizes (PIs) und den gemessenen Tumorbettanteil (TBA) angegeben. Jede farbliche Raute stellt einen Datenpunkt für entweder den Ki-67 *high* PI (KiH, rot), den Ki-67 *low* PI (KiL, blau), die Differenz von KiH und KiL (KiD, grün) oder den TBA (lila) dar. Alle Datenpunkte sind orthogonal über ihrem jeweiligen Fall angeordnet. Die Heterogenität bei der Tumorregression zeigte sich darin, dass die TBA-Werte eines Falles über eine Reihe von Prozentsätzen hinweg verteilt waren (A). Die ITH von Ki-67 hingegen zeigte sich in mehrfacher Hinsicht. Zum einen variierten die KiH und KiL-Werte von Schnitt zu Schnitt innerhalb eines Falls (B). Zum anderen zeigten sich vermehrt hohe KiD-Werte (C), was auf eine heterogene Expression von Ki-67 hindeutet (KiH und KiL liegen weit auseinander). Modifiziert nach Kock am Brink et al. [118]. Die Abbildung ist unter der *Creative Commons Attribution 4.0 International License* lizenziert. Die Lizenz ist unter folgendem Link einzusehen: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>.

3.2 Homogenität und Heterogenität der Ki-67-Expression

Mithilfe der virtuellen Mikroskopie wurden 394 Tumorgroßflächenschnitte aus 99 Fällen auf ihre Ki-67-Expression hin untersucht. Abbildung 6 stellt die Ergebnisse meiner Auswertung graphisch dar. Zusätzlich sind die TBAs der untersuchten Kohorte mit aufgeführt (429 Großflächenschnitte aus 106 Fällen; Für weitere Informationen verweise ich auf die Arbeit von Frau Laura Dunst). Durch die Evaluation des KiH und KiL ließ sich die KiD und damit das Ausmaß der Ki-67-Heterogenität ermitteln (Abbildung 7). In Tumorschnitten mit einer heterogeneren Expression von Ki-67 zeigten sich tendenziell hohe KiD-Werte (KiH und KiL lagen weit auseinander; Abbildung 7A+B), während in Tumorschnitten mit einer homogeneren Expression kleinere KiD-Werte (KiH und KiL lagen näher beieinander) nachgewiesen wurden. Eine homogene Verteilung von Ki-67 (KiD klein) war jedoch nicht zwangsläufig mit einem niedrigen Proliferationsniveau (niedrige Werte für KiH und KiL; Abbildung 7C+D) assoziiert. Auch in Tumorschnitten mit einer insgesamt hohen Ki-67-Expression, und folglich einer gesteigerten Proliferation, zeigten sich homogene Verteilungsmuster der Ki-67-positiven Tumorzellen (KiH und KiL hoch; Abbildung 7E+F).

3.3 Inter- und intratumorale Heterogenität der Ki-67-Expression

Für die Ki-67-PIs wurden beträchtliche Schwankungen innerhalb eines Falls (Abbildung 8) und zwischen den einzelnen Fällen beobachtet. Der KiH wurde in 394 Blöcken (Median: 61,5 %; Spanne von 1,0 % bis 99,0 %) ermittelt, während der KiL (Median: 11,7 %; Spanne von 0 % bis 82,0 %) und die KiD (Median 40,4 %; Spanne von 0 % bis 96,0 %) jeweils in 376 Blöcken bestimmt werden konnte. Wie in Abbildung 6B gezeigt, variierten der KiH und der KiL erheblich zwischen den einzelnen Blöcken eines Falls (=Intratumorale Heterogenität) und zwischen den unterschiedlichen Fällen (=Intertumorale Heterogenität). Außerdem zeigten sich hohe KiD-Werte (Abbildung 6C), was auf eine heterogene Expression von Ki-67 im einzelnen Tumorblock hinwies (Abbildung 7A+B). Somit ließ sich für alle Ki-67-Parameter eine ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität nachweisen. Das traf sowohl auf die Patienten zu, die eine Chemotherapie erhalten hatten, als auch auf die Patienten, die einer Radiochemotherapie zugeführt worden waren (Anhangstabelle 1).

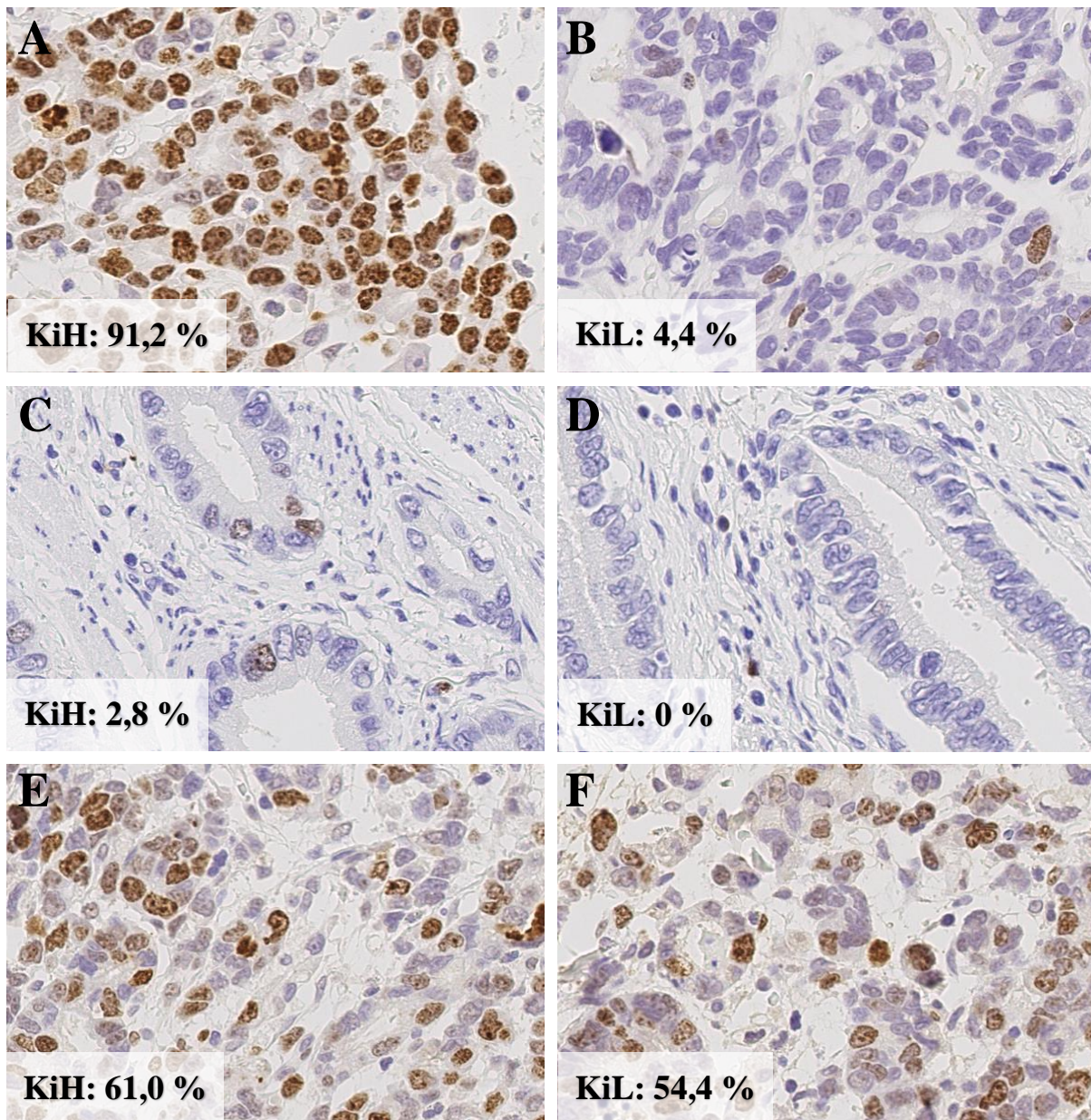


Abbildung 7: Homogenität und Heterogenität von Ki-67. Dargestellt sind exemplarische Expressionsmuster von Ki-67 in drei unterschiedlichen Fällen. (A+B), (C+D) und (E+F) stellen jeweils einen Schnitt eines Falls mit den zugehörigen Ki-67 *high* (KiH) und *low* (KiL) Proliferationsindizes (PI) dar. (A+B) zeigen eine heterogene Verteilung von Ki-67 (KiD groß: 86,8 %). In (C+D) und (E+F) hingegen ist eine homogene Verteilung von Ki-67 (KiD klein; C+D: 2,8 %, E+F: 6,6 %) auf unterschiedlichen Proliferationsniveaus zu erkennen. Anti-Ki-67-Immunfärbung. 300-fache Vergrößerung.

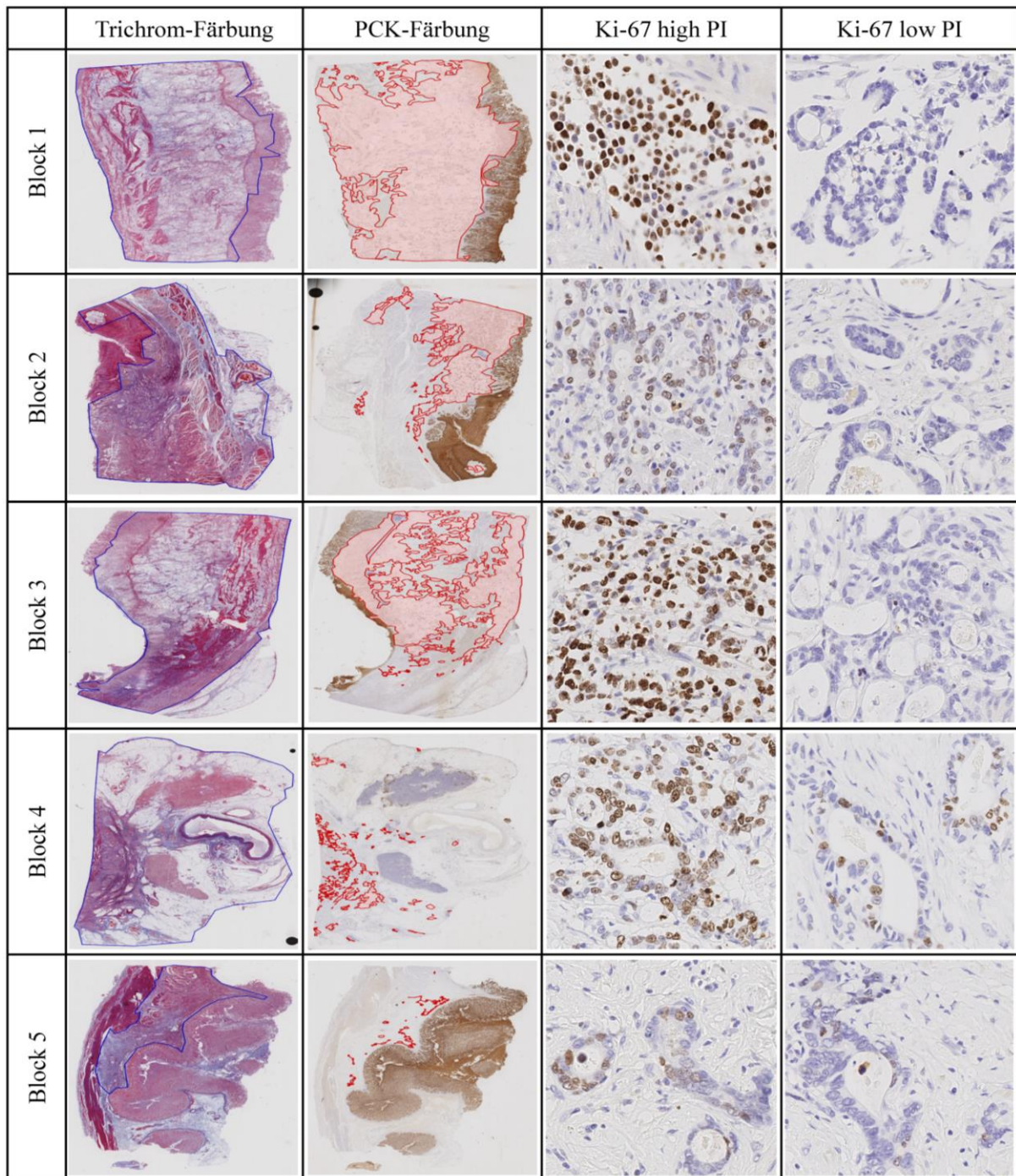


Abbildung 8: Intratumorale Heterogenität von Ki-67 und der Tumorregression. Veranschaulichung der intratumoralen Heterogenität der Ki-67-Expression und der Tumorregression anhand des Beispielfalls. Jede Zeile stellt einen separaten Block desselben Tumors dar. Die Spalten zeigen jeweils die Serienschritte des Blocks in unterschiedlichen Färbungen. Die Tumorregression errechnet sich aus dem Flächenverhältnis des Residualtumors (Pan-Zytokeratin-Immunfärbung; PCK) zur vorherigen Tumorfläche (Trichrom-Färbung). Mit zunehmender Tumorregression verringert sich der Ki-67 *high* (KiH) Proliferationsindex (PI), während der Ki-67 *low* PI (KiL) ansteigt (Werte in Abbildung 3). Anti-Ki-67-Immunfärbung der Bilder in den Spalten „Ki-67 *high* PI“ und „Ki-67 *low* PI“; 200-fache Vergrößerung. Die Bilder in den Spalten „Trichrom-Färbung“ und „PCK-Färbung“ in einfacher Vergrößerung. Modifiziert nach Kock am Brink et al. [118]. Die Abbildung ist unter der *Creative Commons Attribution 4.0 International License* lizenziert. Die Lizenz ist unter folgendem Link einzusehen: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>.

3.4 Blockweise-Analyse

Die Analyse wurde mittels der Blockweise-Parameter durchgeführt (TBA, KiH, KiL, KiD). Für die Analysen wurde auf die von Frau Dunst zur Verfügung gestellten Daten zu der erfassten Tumorregression zurückgegriffen.

Der TBA wurde in 429 WMTS (Median: 13,5 %; Spanne von 0 % bis 99,9 %) erhoben. Im nächsten Auswertungsschritt wurde der Zusammenhang zwischen dem KiH und dem TBA (n=394) sowie jeweils zwischen dem KiL und dem TBA (n=376) und der KiD und dem TBA (n=376) auf der Ebene aller Tumorblöcke untersucht. Hierfür wurden die TBA-Werte der gesamten Kohorte am Median in Tumorblöcke mit Anzeichen einer Tumorregression (TBA<13,5 %; im Folgenden als Responder-Blöcke bezeichnet) und in Tumorblöcke ohne Anzeichen einer Tumorregression (TBA≥13,5 %; im Folgenden als Non-Responder-Blöcke bezeichnet) unterteilt. Die Ki-67-Parameter wurden ebenfalls an ihren jeweiligen Medianen (KiH: 61,5 %; KiL: 11,7 %; KiD: 40,4 %) dichotomiert.

3.4.1 Ki-67 und Tumorbettanteil

Alle drei Ki-67-Parameter (Blockweise-Parameter: KiH, KiL, KiD) waren hochsignifikant mit dem TBA ($p<0,001$, Tabelle 4) assoziiert. Im Vergleich von Responder- zu Non-Responder-Blöcken zeigten sich in den Non-Responder-Blöcken höhere Werte für den KiH und die KiD. Im Gegensatz dazu wiesen Responder-Blöcke im Vergleich zu Non-Responder-Blöcken höhere Werte für den KiL auf.

Tabelle 4: Assoziation zwischen den Ki-67-Proliferationsindizes und dem Tumorbettanteil in der Blockweisen-Analyse. Die Tabelle zeigt den Zusammenhang zwischen den Ki-67-Proliferationsindizes (PI) und der Tumorregression (Tumorbettanteil, TBA) in der Blockweisen-Analyse. Der Ki-67 *high* PI ist als KiH, der Ki-67 *low* PI als KiL und die Differenz der beiden als KiD angegeben. Die Ki-67-Parameter sind an ihrem jeweiligen Median in niedrig (<Median) und hoch (≥Median) dichotomiert (Median KiH: 61,5 %, KiL: 11,7 %, KiD: 40,4 %). Der TBA ist ebenfalls am Median in Responder (<Median) und Non-Responder (≥Median) dichotomiert (Median TBA: 13,5 %).⁽¹⁾ Die *p*-Werte wurden anhand des exakten Tests nach Fisher ermittelt [111]. Hochsignifikante *p*-Werte sind dunkelgrau hinterlegt.

		Gültig	KiH		KiL		KiD	
			niedrig (<Median)	hoch (≥Median)	niedrig (<Median)	hoch (≥Median)	niedrig (<Median)	hoch (≥Median)
		(%)	<i>gültig</i> n (%)	<i>p-Wert</i> n (%)	<i>gültig</i> n (%)	<i>p-Wert</i> n (%)	<i>gültig</i> n (%)	<i>p-Wert</i> n (%)
TBA	n p⁽¹⁾	429	394	<0,001	376	<0,001	376	<0,001
<Median (Responder)		215 (50,1)	110 (61,6)	70 (38,9)	63 (38,4)	101 (61,6)	104 (63,4)	60 (36,6)
≥Median (Non-Responder)		214 (49,9)	87 (40,7)	127 (59,3)	125 (59,0)	87 (41,0)	85 (40,1)	127 (59,9)

3.5 Fallweise-Analyse

Anschließend wurde untersucht, ob die beobachteten Effekte der Blockweisen-Analyse auch vorhanden waren, wenn die Datenpunkte ihrem jeweiligen Fall zugeordnet wurden (Fallweise-Analyse). Hierfür wurden vier neue Parameter (Fallweise-Parameter) festgelegt, die die Parameter der Blockweisen-Analyse widerspiegeln und aus den für jeden Fall angegebenen Datenpunkten abgeleitet wurden. Es wurde der mTBA (n=106 Fälle, Median: 12,2 %, Spanne von 0 % bis 85,6 %), der maximale KiH (n=99 Fälle, Median: 75,8 %, Spanne von 4,1 % bis 99,0 %), der minimale KiL (n=97 Fälle, Median: 4,0 %, Spanne von 0 % bis 41,8 %) und die KiD vom maximalen KiH zu minimalen KiL (n=97 Fälle, Median: 66,8 %, Spanne von 1,7 % bis 97,6 %) für jeden Fall bestimmt. Für die Analyse wurden alle Parameter an ihren jeweiligen Medianen in hoch und niedrig dichotomiert. Analog zur Blockweisen-Analyse wurden die mTBA-Werte in Fälle mit Zeichen einer Tumorregression (mTBA<12,2 %; im Folgenden als Responder-Fälle bezeichnet) und in Fälle ohne Zeichen einer Tumorregression (mTBA≥12,2 %; im Folgenden als Non-Responder-Fälle bezeichnet) eingeteilt.

3.5.1 Ki-67 und Tumorbettanteil

Während der minimale KiL und der KiD-Parameter signifikant mit dem mTBA assoziiert waren ($p=0,002$; $p=0,015$), wurde zwischen dem maximalen KiH und dem mTBA kein signifikanter Zusammenhang festgestellt (Tabelle 5). Analog zu den Ergebnissen der Blockweisen-Analyse wurden in Responder-Fällen hohe Werte für den minimalen KiL gefunden, während Non-Responder-Fälle hohe Werte für den KiD-Parameter aufwiesen.

Tabelle 5: Assoziation zwischen den Ki-67-Proliferationsindizes und dem medianen Tumorbettanteil in der Fallweisen-Analyse. Die Tabelle zeigt den Zusammenhang zwischen den Ki-67-Proliferationsindizes (PI) und der Tumorregression (medianer Tumorbettanteil, mTBA) in der Fallweisen-Analyse. Es sind der Maximum Ki-67 *high* PI (KiH), Minimum Ki-67 *low* PI (KiL) und die Differenz (KiD) der beiden gezeigt. Die Ki-67-Parameter sind an ihrem jeweiligen Median in niedrig (<Median) und hoch (≥Median) dichotomiert (Median Maximum KiH: 75,8 %, Minimum KiL: 4,0 %, KiD Max.KiH/Min.KiL: 66,8 %). Der mTBA ist ebenfalls am Median in Responder (<Median) und Non-Responder (≥Median) dichotomiert (Median mTBA: 12,2 %). ⁽¹⁾ Die p -Werte wurden durch den exakten Test nach Fisher berechnet [111]. Signifikante p -Werte sind dunkelgrau hinterlegt.

		Gültig	Maximum KiH		Minimum KiL		KiD von Max KiH/Min KiL	
			niedrig (<Median)	hoch (≥Median)	niedrig (<Median)	hoch (≥Median)	niedrig (<Median)	hoch (≥Median)
		(%)	<i>gültig</i> n (%)	<i>p-Wert</i> n (%)	<i>gültig</i> n (%)	<i>p-Wert</i> n (%)	<i>gültig</i> n (%)	<i>p-Wert</i> n (%)
mTBA	n	106	99	0,16	97	0,002	97	0,015
<Median (Responder)		53 (50,0)	27 (58,7)	19 (41,3)	15 (34,1)	29 (65,9)	28 (63,6)	16 (36,4)
≥Median (Non-Responder)		53 (50,0)	23 (43,4)	30 (56,6)	35 (66,0)	18 (34,0)	20 (37,7)	33 (62,3)

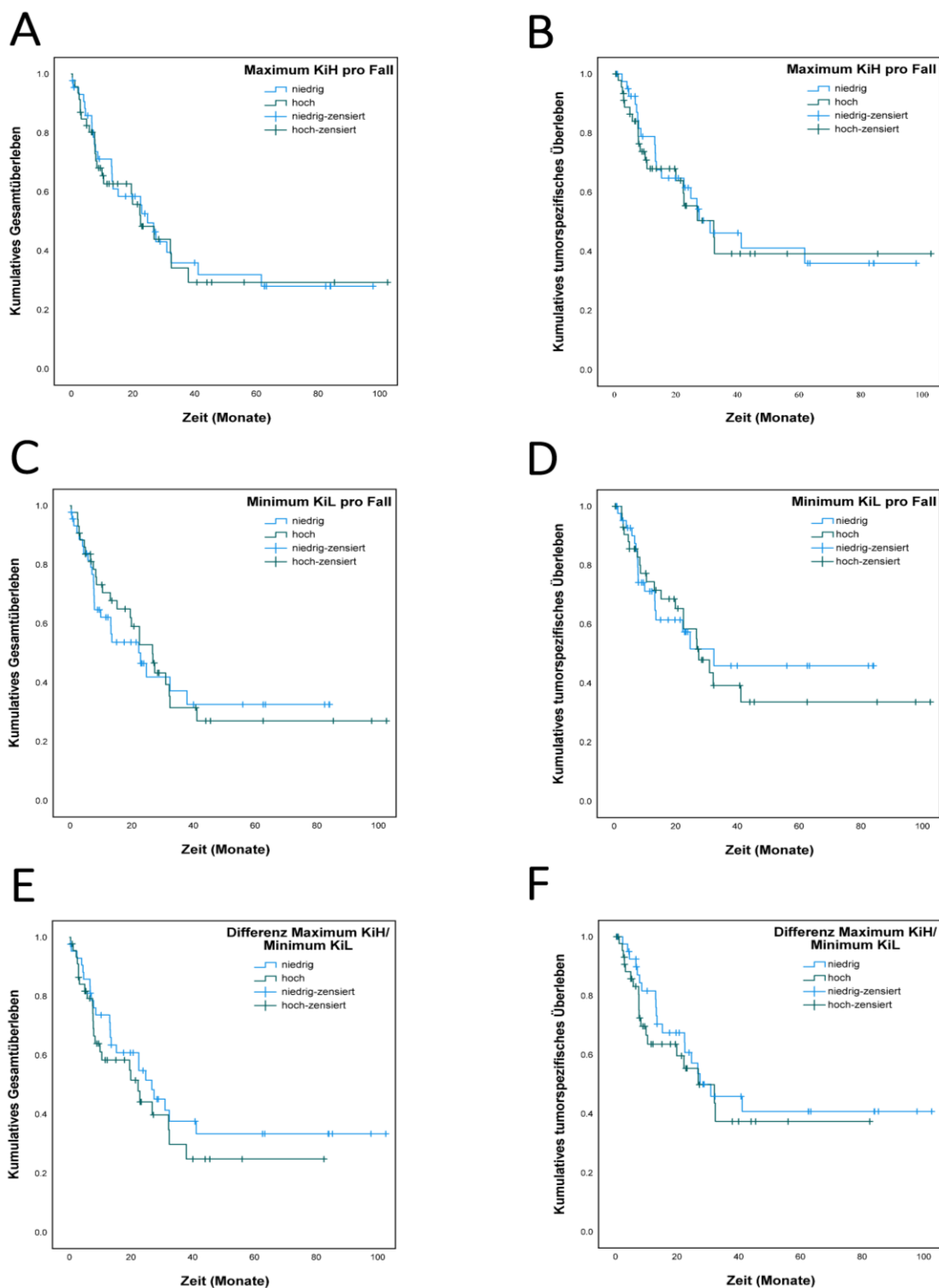


Abbildung 9: Gesamt- und tumorspezifisches Überleben anhand Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit der Ki-67-Proliferationsindizes. Dargestellt sind die Kaplan-Meier Überlebenskurven für den maximalen Ki-67 *high* (Maximum KiH) Proliferationsindex (PI), minimalen Ki-67 *low* PI (Minimum KiL) und die Differenz (KiD) der beiden eines jeden Falls. Alle Parameter sind an ihren Medianen (Tabelle 5) in niedrig und hoch dichotomiert. In (A,C+E) ist das kumulative Gesamtüberleben gezeigt, während in (B,D+F) das kumulative tumorspezifische Überleben abgebildet ist. Die *p*-Werte wurden mithilfe des Log-Rank-Tests ermittelt [116]. Für keinen der Ki-67-Parameter zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem Patientenüberleben (Tabelle 6 für *p*-Werte).

3.5.2 Überlebensanalyse

Des Weiteren wurde geprüft, ob das Patientenüberleben mit den Ki-67-PIs in Zusammenhang stand. Während der mTBA signifikant mit dem Überleben assoziiert war (Gesamtüberleben und mTBA, $p=0,014$; für genauere Ausführungen wird auf die Promotionsarbeit von Frau Laura Dunst verwiesen), wurde in Bezug auf die Ki-67-Parameter kein signifikanter Zusammenhang mit der Prognose nachgewiesen (Abbildung 9).

3.5.3 Ki-67-Proliferationsindizes und Alter der Paraffinblöcke

Da nachgewiesen wurde, dass die Zeitspanne nach Einbettung des Tumors in Paraffin einen Einfluss auf die Antigenität von Ki-67 haben kann [119], wurde mithilfe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson in dieser Kohorte der Zusammenhang zwischen dem Alter der Tumorblöcke und den Ki-67-PIs (KiH und KiL) untersucht (Abbildung 10). Für beide PIs zeigte sich keine signifikante Assoziation mit dem Alter der Paraffinblöcke (KiH: $p=0,955$; KiL: $p=0,305$).

3.5.4 Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika

Abschließend wurde untersucht, inwieweit die Ki-67-Parameter mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika zusammenhängen (Tabelle 6). Es zeigte sich, dass hohe Werte des maximalen KiH und des KiD-Parameters eines Falls signifikant mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium (UICC-Stadium III/IV; $p=0,003$ für beide Parameter) und hochsignifikant mit einer lymphatischen Infiltration (pL1; $p<0,001$ für beide) assoziiert waren. Außerdem zeigten sich signifikant höhere Werte für den maximalen KiH und den KiD-Parameter im gemischten und unklassifizierten Typ nach Laurén, während Tumoren des diffusen Typs niedrigere Werte aufwiesen ($p=0,003$ für beide Parameter) [27]. Proximale Tumoren wiesen im Vergleich zu distalen Tumoren ebenfalls höhere Werte für den maximalen KiH und den KiD-Parameter auf ($p=0,016$; $p<0,001$). Schließlich zeigte sich, dass alle drei Parameter signifikant mit dem TRG nach Becker et al. zusammenhängen [95]. Magenkarzinome mit einem schlechten Ansprechen auf die Chemotherapie (TRG 3) zeigten signifikant höhere Werte des maximalen KiH und des KiD-Parameters ($p<0,001$ für beide Parameter). Im Gegensatz dazu wurden in Tumoren mit einem guten Ansprechen auf die Chemotherapie höhere Werte für den minimalen KiL gefunden (TRG 1; $p=0,012$). Alle angegebenen p -Werte wurden durch das Simes-Verfahren adjustiert [117].

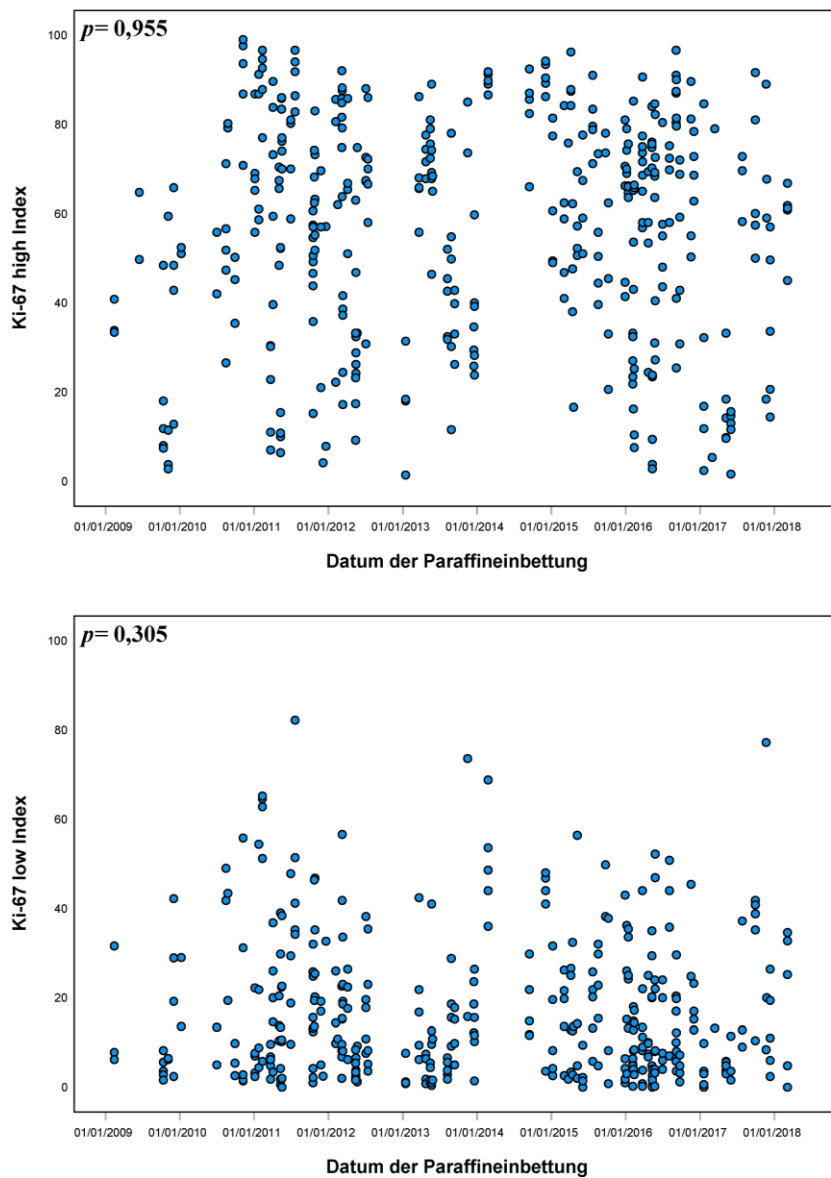


Abbildung 10: Ki-67-Proliferationsindizes in Abhängigkeit vom Alter der Tumorblöcke. Darstellung der Ki-67-Proliferationsindizes (PIs) in Abhängigkeit des Alters nach Einbettung. Index und PI werden synonym verwendet. Der jeweilige Ki-67-PI ist auf der Y-Achse und das Datum der Paraffineinbettung auf der X-Achse angegeben. Anhand des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Blöcke und den Ki-67-PIs nachweisen (oben: Ki-67 *high* PI, Korrelationskoeffizient: 0,003, $p=0,955$; unten: Ki-67 *low* PI, Korrelationskoeffizient: -0,053, $p=0,305$) [113]. Modifiziert nach Kock am Brink et al. [118]. Die Abbildung ist unter der *Creative Commons Attribution 4.0 International License* lizenziert. Die Lizenz ist unter folgendem Link einzusehen: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>.

Tabelle 6: Klinisch-pathologische Patientencharakteristika und Überlebensdaten der untersuchten Kohorte. Die Tabelle zeigt die Assoziationen der verschiedenen Ki-67-Proliferationsindizes (PIs) (KiH: Ki-67 *high* PI; KiL: Ki-67 *low* PI; KiD: Differenz der beiden) mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika und den Überlebensdaten. Signifikante *p*-Werte ($p \leq 0,05$) sind grau hinterlegt. Die Ki-67-Parameter sind am Median in hoch (\geq Median) und niedrig ($<$ Median) dichotomiert. Hochsignifikante Werte ($p < 0,001$) sind in dunkelgrau hinterlegt. Die Art des Tests ist am *p*-Wert angegeben (⁽¹⁾ exakter Test nach Fisher [111], ⁽²⁾ Kendall-Tau [112], ⁽³⁾ Log-Rank-Test [116]). ⁽⁴⁾ beschreibt *p*-Werte, die nach dem Simes-Verfahren nicht mehr signifikant waren [117]. Nicht berechnete Werte sind mit n.b. gekennzeichnet. Das mediane Überleben (*) ist in Monaten angegeben.

		Gültig	Maximum KiH		Minimum KiL		KiD von Max KiH/Min KiL	
			niedrig (<Median)	hoch (\geq Median)	niedrig (<Median)	hoch (\geq Median)	niedrig (<Median)	hoch (\geq Median)
		(%)	<i>gültig</i> n (%)	<i>p</i> -Wert n (%)	<i>gültig</i> n (%)	<i>p</i> -Wert n (%)	<i>gültig</i> n (%)	<i>p</i> -Wert n (%)
Geschlecht	n	106	99	0,023⁽⁴⁾	97	0,805	97	0,047⁽⁴⁾
Männlich		85 (80,2)	35 (44,3)	44 (55,7)	39 (50,6)	38 (49,4)	34 (44,2)	43 (55,8)
Weiblich		21 (19,8)	15 (75,0)	5 (25,0)	11 (55,0)	9 (45,0)	14 (70,0)	6 (30,0)
Alter	n	106	99	0,546	97	1,000	97	0,684
< 64 Jahre		49 (46,2)	24 (54,5)	20 (45,5)	22 (51,2)	21 (48,8)	20 (46,5)	23 (53,5)
\geq 64 Jahre		57 (53,8)	26 (47,3)	29 (52,7)	28 (51,9)	26 (48,1)	28 (51,9)	26 (48,1)
Lokalisation	n	106	99	0,016	97	0,825	97	<0,001
Proximaler Magen		75 (70,8)	29 (42,0)	40 (58,0)	36 (52,9)	32 (47,1)	26 (38,2)	42 (61,8)
Distaler Magen		31 (29,2)	21 (70,0)	9 (30,0)	14 (48,3)	15 (51,7)	22 (75,9)	7 (24,1)
Laurén Phänotyp	n	106	99	0,003	97	0,989	97	0,003
Intestinal		53 (50,0)	26 (55,3)	21 (44,7)	24 (53,3)	21 (46,7)	24 (53,3)	21 (46,7)
Diffus		23 (21,7)	17 (73,9)	6 (26,1)	11 (47,8)	12 (52,2)	17 (73,9)	6 (26,1)
Gemischt		21 (19,8)	5 (25,0)	15 (75,0)	10 (50,0)	10 (50,0)	4 (20,0)	16 (80,0)
Unklassifiziert		9 (8,5)	2 (22,2)	7 (77,8)	5 (55,6)	4 (44,4)	3 (33,3)	6 (66,7)
ypT	n	106	99	0,148	97	0,154	97	0,432
T1a / T1b		17 (16,0)	8 (66,7)	4 (33,3)	5 (41,7)	7 (58,3)	7 (58,3)	5 (41,7)
T2		16 (15,1)	10 (71,4)	4 (28,6)	5 (41,7)	7 (58,3)	9 (75,0)	3 (25,0)
T3		63 (59,4)	26 (41,3)	37 (58,7)	33 (52,4)	30 (47,6)	25 (39,7)	38 (60,3)
T4a / T4b		10 (9,4)	6 (60,0)	4 (40,0)	7 (70,0)	3 (30,0)	7 (70,0)	3 (30,0)
ypN	n	106	99	0,095	97	0,084	97	0,133
N0		35 (33,0)	20 (64,5)	11 (35,5)	15 (50,0)	15 (50,0)	19 (63,3)	11 (36,7)
N1		23 (21,7)	9 (42,9)	12 (57,1)	5 (23,8)	16 (76,2)	7 (33,3)	14 (66,7)
N2		28 (26,4)	13 (48,1)	14 (51,9)	17 (63,0)	10 (37,0)	16 (59,3)	11 (40,7)
N3		20 (18,9)	8 (40,0)	12 (60,0)	13 (68,4)	6 (31,6)	6 (31,6)	13 (68,4)
UICC-Stadium	n	106	99	0,003	97	0,087	97	0,003
IA / IB		17 (16,0)	8 (66,7)	4 (33,3)	6 (50,0)	6 (50,0)	7 (58,3)	5 (41,7)
IIA / IIB		16 (15,1)	12 (75,0)	4 (25,0)	3 (20,0)	12 (80,0)	13 (86,7)	2 (13,3)
IIIA / IIIB / IIIC		60 (56,6)	27 (46,6)	31 (53,4)	34 (58,6)	24 (41,4)	25 (43,1)	33 (56,9)
IV/IVA/IVB		13 (12,3)	3 (23,1)	10 (76,9)	7 (58,3)	5 (41,7)	3 (25,0)	9 (75,0)
ypL	n	106	99	<0,001	97	0,828	97	<0,001
L0		74 (69,8)	44 (64,7)	24 (35,3)	35 (53,0)	31 (47,0)	41 (62,1)	25 (37,9)
L1		32 (30,2)	6 (19,4)	25 (80,6)	15 (48,4)	16 (51,6)	7 (22,6)	24 (77,4)
ypV	n	106	99	0,318	97	1,000	97	0,487
V0		97 (91,5)	47 (52,2)	43 (47,8)	45 (51,1)	43 (48,9)	45 (51,1)	43 (48,9)
V1		9 (8,5)	3 (33,3)	6 (66,7)	5 (55,6)	4 (44,4)	3 (33,3)	6 (66,7)
ypN-Kategorie	n	106	99	0,504	97	0,657	97	0,652
Pn0		79 (74,5)	38 (52,8)	34 (47,2)	35 (50,0)	35 (50,0)	36 (51,4)	34 (48,6)
Pn1		27 (25,5)	12 (44,4)	15 (55,6)	15 (55,6)	12 (44,4)	12 (44,4)	15 (55,6)
R-Status	n	104	97	0,755	95	1,000	95	0,759
R0		92 (88,5)	45 (52,3)	41 (47,7)	42 (50,0)	42 (50,0)	43 (51,2)	41 (48,8)
R1		12 (11,5)	5 (45,5)	6 (54,5)	6 (54,5)	5 (45,5)	5 (45,5)	6 (54,5)
Becker Regressionsgrad	n	106	99	<0,001	97	0,012	97	<0,001
1b		29 (27,4)	16 (72,7)	6 (27,3)	5 (25,0)	15 (75,0)	16 (80,0)	4 (20,0)
2		19 (17,9)	14 (73,7)	5 (26,3)	10 (52,6)	9 (47,4)	15 (78,9)	4 (21,1)
3		58 (54,7)	20 (34,5)	38 (65,5)	35 (60,3)	23 (39,7)	17 (29,3)	41 (70,7)
Gesamtüberleben	p ⁽³⁾	96	90	0,823	88	0,811	88	0,372
Gültig / Events / Zensiert		96 / 52 / 44	44 / 26 / 18	46 / 24 / 22	45 / 24 / 21	43 / 25 / 18	43 / 24 / 19	45 / 25 / 20
Medianes Überleben*		26,6 \pm 3,5	24,6 \pm 3,2	22,4 \pm 5,0	22,8 \pm 6,5	26,6 \pm 3,3	26,6 \pm 4,3	22,1 \pm 7,4
95% K.I.		[19,9 - 33,4]	[18,3 - 30,9]	[12,5 - 32,3]	[10,0 - 35,5]	[20,2 - 33,0]	[18,3 - 35,0]	[7,7 - 36,6]
Tumorspezif. Überleben	p ⁽³⁾	96	90	0,742	88	0,801	88	0,478
Gültig / Events / Zensiert		96 / 41 / 55	44 / 20 / 24	46 / 19 / 27	45 / 17 / 28	43 / 21 / 22	43 / 19 / 24	45 / 19 / 26
Medianes Überleben*		30,9 \pm 2,8	30,9 \pm 8,8	32,0 \pm 9,0	32,3 \pm n.b.	27,3 \pm 5,0	27,3 \pm 8,9	26,7 \pm 8,0
95% K.I.		[25,3 - 36,4]	[13,6 - 48,1]	[14,4 - 49,7]	n.b.	[17,5 - 37,2]	[10,0 - 44,7]	[11,1 - 42,3]

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Allgemeine Evaluation von Ki-67

Ki-67 zählt zu den ältesten und am häufigsten verwendeten Proliferationsmarkern. Trotz der routinemäßigen Nutzung des Biomarkers ist die Evaluation von Ki-67 durch fehlende Standards in Methodik und Präanalytik geprägt, die einen direkten Vergleich der Studien sowie eine konsistente Reproduktion der Ergebnisse erschwert [88,89,119,120]. Hinzu kommen biophysiological Besonderheiten in der Expression des Proteins, die die Etablierung von Ki-67 als verlässlichen Biomarker beeinträchtigen können. Durch die obligate Kopplung von Ki-67 an die aktiven Phasen der Zellteilung unterliegt die Expression naturgemäß einer zyklischen Rhythmik, deren Geschwindigkeit, neben der Genetik der untersuchten Tumorzellen, von zahlreichen Faktoren beeinflusst wird. Gemeinhin wird in der Auswertung von Ki-67 nur ein Bruchteil der Tumormasse auf ihren Ki-67-PI hin untersucht (Wachstumsfraktion) und jede bewertete Tumorzelle, je nach Färbereaktion, in entweder Ki-67-positiv („Zellteilung“) oder Ki-67-negativ („Zellarrest“) dichotomiert [76–78,87] (Abbildung 2). Da somit nur ein geringer Teil der Tumormasse auf ihre Zellteilung hin untersucht wird, erscheint es naheliegend, dass die wenigen untersuchten Tumorzellen eindeutig zu kategorisieren sein sollten, um die Proliferation des Tumors exakt widerzuspiegeln. Zum einen sollte eine Tumorzelle aufgrund der Färbereaktion als eindeutig Ki-67-positiv oder Ki-67-negativ eingeteilt werden können, zum anderen sollte eine Ki-67-positive Zelle die Zellteilung vollständig durchlaufen. Letzteres ist jedoch nicht immer der Fall. Für die Tumorzelle besteht weiterhin die Möglichkeit des spontanen Zellarrests, auch nachdem die DNA-Synthese bereits abgeschlossen wurde [77,78,87]. Durch die Expression von Ki-67 wird somit vielmehr die Tendenz zur Proliferation als der tatsächliche Vollzug der Zellteilung angezeigt. Da es sich außerdem bei den in Paraffin eingebetteten Tumorproben um nicht mehr zellteilungsfähiges Gewebe handelt, ist nur ein momentaner Proliferationszustand der einzelnen Tumorzellen bei Einbettung abgebildet, wodurch kein verlässlicher Rückschluss auf die tatsächliche Proliferationsrate der Tumorzelle möglich ist [87]. Dadurch besteht jedoch das Risiko, dass eine Tumorzelle, die hoch teilungsaktiv ist, durch Zufall (zum Beispiel, weil die Tumorzelle kurz vor der Einbettung in Paraffin den Zellzyklus beendet hat und noch nicht in einen neuen Zyklus eingetreten ist) als Ki-67-negativ und damit als teilungsaktiv kategorisiert wird. Für jede Tumorzelle existiert somit ein naturgegebenes Ausreißer-Risiko.

Ein weiterer Aspekt ist die Einteilung in Ki-67-positiv und Ki-67-negativ, die durch verschiedene Faktoren erschwert wird. Lindboe et al. verglichen vier Ki-67-Antikörper und beobachteten, dass die Färbeintensität und das Färbemuster vom verwendeten Antikörper abhing [86]. Dadurch war jedoch insbesondere in Grenzfällen eine eindeutige Differenzierung zwischen schwach Ki-67-positiven oder Ki-67-negativen Nuklei erschwert. Infolge dessen wurde eine signifikante Varianz der ermittelten PIs nachgewiesen [86], woraus sich die Frage ableitete, inwieweit PIs aus Studien mit unterschiedlichen Antikörpern überhaupt vergleichbar sind. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper SP-6 fand schon in einer vorherigen Studie Verwendung [70] und erwies sich in Untersuchungen an Lungen- und Mammakarzinomen als insgesamt vergleichbar mit dem MIB-1 Antikörper [121–123], der in der Studie von Lindboe et al. die höchste Sensitivität gegenüber Ki-67 aufwies [86]. Dieser Aspekt wird durch uneinheitliche Grenzwerte, ab welcher Färbeintensität eine Tumorzelle Ki-67-positiv gewertet wird, verstärkt (Tabelle 7). Während mehrere Autoren eine Zelle mit Färbung des Nukleus als positiv werteten [70,83,91,92], nahmen andere Autoren keine genauere Definition des Grenzwerts vor [84,90,124]. Außerdem wurden in einigen Studien Tumorzellen mit einer zytoplasmatischen Färbung als Ki-67-positiv bewertet [85,91], obwohl gezeigt wurde, dass die Expression von Ki-67 strikt auf den Nukleus begrenzt ist [77,78]. Den Studien gemein ist jedoch, dass nicht genau spezifiziert wurde, ab welcher Färbeintensität des Nukleus eine Tumorzelle als positiv gewertet wurde. Angesichts der je nach Zellzyklusphase, des Ki-67-Expressionsmusters [77,78,86,87] oder des verwendeten Antikörpers [86] variierenden Färbeintensität, ist eine Inter- und Intraobserver-Variabilität, insbesondere in der Einteilung von Grenzfällen nicht sicher auszuschließen. Ein möglicher Lösungsansatz wäre ein visuelles Korrelat (Abbildung 2B), das einen Grenzfall zwischen schwach Ki-67-positiv und Ki-67-negativ aufzeigt. Hierdurch wäre klar erkenntlich, ab welcher Färbeintensität eine Tumorzelle als positiv klassifiziert wird, was folglich eine Reproduktion der Ergebnisse erleichtern würde [89]. Müller et al. und Ramires et al. haben in ihren Untersuchungen eine Abbildung mit einer Beispielfärbung beigelegt, jedoch ohne konkret auf einen Grenzfall zwischen schwach Ki-67-positiv und Ki-67-negativ einzugehen [90,92]. Die genaue Kategorisierung der Tumorzellen ist vor allem in behandelten Kohorten von Bedeutung. Während in unbehandelten Tumoren mögliche Ausreißer aufgrund unspezifischer Auswertungskriterien über eine größere Anzahl an Tumorzellen zu kompensieren wären, ist dies in einer behandelten Kohorte mit potenziell sehr geringen Tumorzellzahlen nicht immer möglich.

Tabelle 7: Übersicht relevanter Studien mit Bezug auf den Ki-67-Proliferationsindex unter Aufführung der verwendeten Methodik. K.a.: Keine Angabe; N.v.: Nicht vorhanden; HPF: Hochauflösendes Gesichtsfeld (400-fache Vergrößerung); * Bild vorhanden, aber ohne Grenzfall; ** *tissue micro array* oder Biopsie anstatt Ganzgewebeschnitt; *** Automatisierte Auswertung

Studie	Therapie	Kollektiv [n]	Antikörper	Anzahl Tumorzellen [n]	Region	Grenzwert Auswertung	Grenzwert Ki67-positiv	Beispielbild Färbung
Müller et al. (1996)*	Adjuvant	418	MIB-1	>1000 aus zehn HPFs pro Index	3 Regionen pro Fall - Hotspot - Randomisiert - Invasionsfront	Median - \geq / $<$ 53,3%; - \geq / $<$ 32,0%; - \geq / $<$ 34,9%;	Nur Färbung Nucleus	Ja
Ramires et al. (1997)*	Adjuvant	43	MIB-1	1000; zehn Fälle mit 2000	Randomisiert; oberflächlich vs. tief	K.a.	K.a.	Ja
Lee et al. (2010)**	Adjuvant	245	MIB-1	300	Hotspot	10% Schritte; \leq 10%, > 10%; \leq 20%, > 20%	Färbung Nucleus	N.v.
Imano et al. (2010)	Neoadjuvant	63	MIB-1	1000	K.a.	K.a.	K.a.	N.v.
Ott et al. (2011) **	Neoadjuvant	37	MIB-1	2000 oder alle Tumorzellen	K.a.	K.a.	Färbung Nucleus	N.v.
Amrani et al. (2014)	Adjuvant	55	MIB-1	K.a.	K.a.	< 20%, \geq 20%	Färbung Nucleus/ Zytoplasma	N.v.
Wu et al. (2014)***	Perioperativ	78	SC-23900	K.a.	Fünf repräsentative Regionen	\leq 11,9%, >11,9%	K.a.	N.v.
Sun et al. (2014)	Perioperativ	23	MAB-0129	100	> fünf Regionen	K.a.	>10% Färbung Zytoplasma	N.v.
Böger et al. (2016)	Adjuvant	315	SP-6	500	Hotspot	Median (>69%, \leq 69%) Quartile	Jede Färbung Nucleus	N.v.
Seo et al. (2019)	Adjuvant	251	MIB-1	100	K.a.	\leq 25%, 25%-50%, 50-75%, >75%	K.a.	N.v.

4.1.2 Evaluation von Ki-67 in einer neoadjuvant behandelten

Magenkarzinomkohorte

Insgesamt untersuchten bisher nur wenige Studien den Einfluss der neoadjuvanten Therapie auf den Ki-67-Status [84,85,125,126]. Ein möglicher Grund hierfür könnte in den Herausforderungen liegen, die sich einer Evaluation nach neoadjuvanter Therapie stellen. Durch die reduzierte Gesamttumorzellanzahl, die teils durch bindegewebige Vernarbungen räumlich voneinander getrennt vorlagen, war zum einen die Auswertung mithilfe eines Mikroskops erschwert und zum anderen bestand die Notwendigkeit, studienspezifische Auswertungskriterien festzulegen (siehe Kapitel 3.1).

Zellzahl

Ein Aspekt ist die Anzahl der ausgezählten Tumorzellen. Ein Ki-67-PI wird in der Regel anhand mehrerer hundert Tumorzellen gebildet (Tabelle 7). Dadurch wird unter anderem versucht, den Einfluss von Ausreißern, die potenziell als Folge der biophysiologicalen Eigenschaften von Ki-67 sowie der unterschiedlichen Färbegrenzwerte auftreten können, zu minimieren und einen Vergleich der PIs zwischen den Studien zu ermöglichen. Doch auch in Bezug auf die Anzahl der ausgezählten Tumorzellen besteht bisher kein Konsens. So wurde je nach Studie an unbehandelten Magenkarzinomen pro Ki-67-PI zwischen 100 Tumorzellen [124] und 1 000 Tumorzellen ausgewertet [90,92], wobei in einer anderen Studie keine genaue Angabe zur Anzahl der ausgezählten Tumorzellen [91] vorgenommen wurde. In den Studien nach neoadjuvanter Therapie zeigt sich ein ähnliches Bild. Entweder wurde keine genaue Angabe zur Anzahl der ausgewerteten Tumorzellen gemacht [84] oder es wurde eine sehr große Anzahl (>1 000 Tumorzellen) [125,126] beziehungsweise nur eine kleine Anzahl (100 Tumorzellen) ausgezählt [85]. Vor dem Hintergrund, dass sich bei nur 100 Tumorzellen eine geringe Anzahl an falsch klassifizierten (zum Beispiel zehn falsch-positive) Tumorzellen stark auf den eigentlichen Ki-67-PI auswirken könnte, wurden in dieser Studie nach Möglichkeit bis zu 500 Tumorzellen pro Ki-67-PI ausgezählt. Damit wurde versucht, die Robustheit des Ki-67-PI gegenüber dem Einfluss von Ausreißern zu erhöhen. Die teils erhebliche Tumorregression hatte hierauf jedoch einen entscheidenden Einfluss. Zum einen war insgesamt zu wenig Residualtumor vorhanden, sodass sich die erforderliche Mindestanzahl von 100 Tumorzellen im Schnitt nicht nachweisen ließ (folglich wurden 8,1 % der Schnitte ausgeschlossen; kleinste gemessene Tumorzellanzahl betrug 18). Zum anderen variierte, bedingt durch die Regression, die Anzahl der Tumorzellen pro Ki-67-PI (zwischen 100 und 500 Tumorzellen pro PI).

Hieraus leitet sich die Frage ab, wie groß der Einfluss von unterschiedlichen Tumorzellanzahlen auf den ermittelten PI ist und inwieweit sich PIs, die auf unterschiedlichen Zellanzahlen basieren, miteinander vergleichen lassen. Zudem stellt sich die Frage, ob es womöglich eine faktische Mindestanzahl an Tumorzellen gibt, die ein Ki-67-PI aufweisen sollte, damit dieser Ausreißern gegenüber robust genug ist. In diesem Zusammenhang erscheint es naheliegend, dass ähnliche Dimensionen, im Idealfall größere Anzahlen an Tumorzellen, ausgezählt werden sollten (zum Beispiel 500 und 750 Tumorzellen), damit einzelne Ausreißer weniger stark ins Gewicht fallen. Aussagekräftige Studien hierzu fehlen jedoch. Nur Ramires et al. verglichen probatorisch in zehn Fällen PIs aus 1 000 Zellen mit PIs aus 2 000 Zellen, ohne jedoch einen statistisch signifikanten Unterschied nachzuweisen [90]. Es ist allerdings zu beachten, dass es sich um eine kleine Stichprobe (N=10) mit einer ohnehin großen Anzahl an Tumorzellen (N>1 000) aus einer unbehandelten Kohorte handelte. In dieser Größenordnung sind starke Schwankungen des Ki-67-PI aufgrund von Ausreißern (zum Beispiel 50 falsch-positiv klassifizierte Tumorzellen) als eher unwahrscheinlich zu erachten. Insbesondere im Hinblick auf eine Evaluation nach neoadjuvanter Therapie sollten zukünftige Studien daher den Einfluss von variierenden, kleineren Anzahlen von Tumorzellen (zum Beispiel N=100; N=300; N= 500 Tumorzellen) auf den Ki-67-PI hin untersuchen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine erfolgreiche neoadjuvante Chemotherapie grundsätzlich dazu führen kann, dass nicht mehr ausreichend vitale Tumorzellen in einem Tumorbett vorliegen, um überhaupt einen tumorbiologisch aussagefähigen Ki-67-PI bestimmen zu können.

Region des Proliferationsindex und Art der Auswertung

Die Region, in der der Ki-67-PI ermittelt wird, hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Höhe des PI. Um einen Vergleich der PIs verschiedener Studien zu gewährleisten, braucht es demnach eine exakte Angabe der Region, die nach Möglichkeit einheitlich sein sollte. Hier zeigte sich jedoch eine inkonsistente Vorgehensweise innerhalb der Datenlage (Tabelle 7). In mehreren Arbeiten an unbehandelten Magenkarzinomen wurde der Ki-67-PI entweder in der *hot spot*-Region [70,83,92] oder in zufällig ausgewählten Regionen bestimmt [90–92]. Eine Studie von Amrani et al. hingegen spezifizierte die ausgewertete Region nicht näher [91]. Das trifft auch auf die meisten Studien zu neoadjuvant behandelten Karzinomen zu [85,125,126]. Dadurch lassen sich die publizierten Daten nicht adäquat nachvollziehen, wodurch, im Hinblick auf die heterogene Datenlage bezüglich der ausgewerteten Region, ein Vergleich der PIs der verschiedenen Studien nur unter Vorbehalt möglich ist. Auch eine zufällige Auswahl der

Regionen erscheint, aufgrund der zuvor beschriebenen ITH von Ki-67 [70,92] und dem damit verbundenen Risiko eines Stichprobenfehlers, als verlässlicher Parameter eher ungeeignet. Eine Kenngröße, die gute Voraussetzungen für eine Standardisierung hat, ist die *hot spot*-Region. Zwar unterliegt dieser Parameter einer subjektiven Einschätzung der höchsten Dichte an Ki-67-positiven Tumorzellen, dennoch bietet er im Vergleich zu einer randomisierten Auswahl der Region eine erleichterte Reproduzierbarkeit und damit eine höhere Validität.

Neben der ausgewählten Region ist auch die Art der Auswertung von Bedeutung. In einem unbehandelten Kollektiv lässt sich der Ki-67-PI problemlos anhand eines Mikroskops ermitteln, da ausreichend Tumorzellen vorhanden sind und diese meist in direkter Nachbarschaft zueinander liegen [70]. Bei einem neoadjuvant behandelten Tumor hingegen wird die teils stark reduzierte Tumormasse durch bindegewebige Narben voneinander getrennt, wodurch die Auswertung insgesamt erschwert wird. Doch insbesondere in den Schnitten mit einer ausgeprägten Tumorregression war eine exakte und möglichst fehlerfreie Klassifizierung der wenigen Tumorzellen von großer Wichtigkeit. Durch das eingeschränkte Sichtfeld (kreisrund) und die vergleichsweise langsame Handhabung des Mikroskops (Verschiebung innerhalb des Schnitts, Vergrößerung/Verkleinerung) würden sich die wenigen, aber weit verstreuten Tumorzellen jedoch nur langsam auszählen lassen, wodurch das Risiko für Flüchtigkeitsfehler (zum Beispiel Verzählen oder erneutes Zählen von bereits klassifizierten Tumorzellen) potenziell steigt. Das würde vor allem einen Auswertungsansatz betreffen, in dem mehr als ein PI pro Schnitt (wie in dieser Arbeit) berechnet wird. Hier stellt sich die digitale Analyse als eine geeignete Alternative heraus. Durch die Platzierung und automatische Registrierung der verschiedenfarbigen Punkte ließen sich Tumorzellen eindeutig markieren und dadurch Flüchtigkeitsfehler, die bei einer manuellen Auswertung auftreten können (zum Beispiel Verzählen oder versehentliches erneutes Zählen von Tumorzellen), minimieren. Das traf insbesondere auf die Schnitte zu, in denen die Tumorzellen vereinzelt und/oder verstreut vorlagen. Schon Wu et al. wendeten ein digital-assistiertes Auswertungsverfahren bei Magenkarzinomen an, ohne jedoch auf die verschiedenen hier beschriebenen Probleme einzugehen, sodass die vorliegende Arbeit nach derzeitigem Kenntnisstand die erste Studie ist, die über dieses Thema berichtet [84]. Ein interessanter Ansatz, der in Zukunft die Auswertung von Ki-67 revolutionieren könnte, ist die künstliche Intelligenz (KI). Die Evaluation von Ki-67 mittels digitalem Analyseverfahren unterliegt wahrscheinlich ebenfalls einer Intra- und Interobserver-Variabilität, die durch eine KI weiter minimiert werden könnte. Eine erst kürzlich

veröffentlichte Studie an invasiven Mammakarzinomen zeigte, dass eine Auswertung des Ki-67-PI mittels Assistenz durch eine KI gegenüber einer Auswertung anhand eines Mikroskops eine signifikant höhere Genauigkeit und Reproduzierbarkeit aufwies [127]. Somit bietet diese Herangehensweise auch für das Magenkarzinom Ansatzpunkte, da aufgrund des stattgefundenen Paradigmenwechsels hin zu einer neoadjuvanten Therapie die Evaluation von Ki-67 weiter erschwert wurde und es hierzu Lösungsansätze bedarf.

Es lässt sich abschließend festhalten, dass die Evaluation von Ki-67 in einer neoadjuvant behandelten Kohorte von mehreren Störeinflüssen geprägt ist. Hierzu zählen insbesondere die stark reduzierte Tumorzellzahl und dessen ungleichmäßige Verteilung innerhalb des ehemaligen Tumorbetts, die eine konsistente Auswertung beeinträchtigen. Die digitale Bildanalyse erweist sich hier als ein geeignetes Mittel, um Fehlerquellen zu minimieren. Hierzu sind in Zukunft jedoch weitere Untersuchungen, idealerweise unter Verwendung einer KI, nötig. Nichtsdestotrotz bleiben methodische und labortechnische Schwierigkeiten bestehen, die zusammen mit den uneinheitlichen Grenzwerten und Auswertekriterien ein standardisiertes Vorgehen erschweren. Daher sollten zukünftige Studien besonderen Wert auf exakte Kriterien (unter anderem einheitliche Region der Auswertung, festgelegte Mindestanzahl an Tumorzellen, Grenzfall der Färbeintensität) legen und eine objektive Methodik formulieren, um die Validität der Ergebnisse steigern zu können.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Intratumorale Heterogenität von Ki-67

Die genetische und phänotypische ITH wurde bereits durch mehrere Studien an therapienaiven Magenkarzinomen belegt und unter anderem auch für Ki-67 beschrieben [70,90–92]. Die jüngste Studie hierzu wurde von Böger et al. im Jahre 2016 veröffentlicht, die in rund 60 % der 315 untersuchten Magenkarzinome eine ITH von Ki-67 nachweisen konnten [70]. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie vom Ramires et al., in der 29 der 43 (67 %) untersuchten Karzinome eine heterogene Verteilung von Ki-67 aufwiesen [90]. In beiden Studien basierten die Ergebnisse jedoch auf Befunden, die mit dem Mikroskop erhoben wurden. So wurden zum einen fokale Tumorzellcluster von Ki-67-positiven Zellen in direkter Nachbarschaft von Ansammlungen Ki-67-negativer Tumorzellen (klonales Muster) beobachtet, zum anderen zeigten sich unterschiedliche Dichteverteilungen von Ki-67-positiven Zellen, je nachdem welches Gewebekompartiment untersucht wurde (oberflächlich vs. tief/Invasionsfront) [70,90]. Eine Studie von Amrani et al. vermerkte ebenfalls eine ausgeprägte ITH von Ki-67, ohne diese

jedoch weiter zu spezifizieren [91]. Somit beruhen die Erkenntnisse zur ITH von Ki-67 überwiegend auf subjektiven Eindrücken ohne adäquate Objektivierung. Nur Ramires et al. verifizierten ihre Beobachtungen durch die Erfassung von zwei PIs. Es wurde jeweils ein Ki-67-PI im tiefen und oberflächlichen Kompartiment bestimmt, die sich signifikant voneinander unterschieden [90]. Eine Arbeit von Müller et al. ist die erste Studie, in der die ITH von Ki-67 systematisch über mehrere PIs erfasst wurde. Hierfür wurden in jedem untersuchten Tumorblock ein Ki-67-PI in der *hot spot*-Region (Median 53,3 %), ein Ki-67-PI in der Invasionsfront (Median 34,9 %) und ein Ki-67-PI in einer zufällig ausgewählten Region (Median 32,0 %) erfasst [92].

Obwohl sich eine ausgeprägte Streuung der Ki-67-PIs zeigte, ist es fraglich, ob das gesamte Ausmaß der ITH von Ki-67 erfasst wurde. Um die Heterogenität von Biomarkern zu ermitteln, sollten statt fester Messpunkte (zum Beispiel die Invasionsfront) die Unterschiede in der Expression im Mittelpunkt stehen. Daher wurde in dieser Arbeit eine Methodik verwendet, bei der in jeder untersuchten Probe der höchste (KiH) und niedrigste (KiL) PI bestimmt wurde. Durch die anschließende Berechnung der Differenz (KiD) wurde zusätzlich ein objektives Maß der Heterogenität generiert. Zudem verwendeten vorherige Studien nur einen repräsentativen Tumorblock pro Fall [70,90,92], obwohl es im Zusammenhang mit der ausgeprägten ITH naheliegend ist, dass die Analyse anhand von nur einer Probe zu einer möglichen Unterschätzung des Ki-67-PI führen kann. Diese Annahme wird durch Böger et al. gestützt, die über die Unterschätzung des PIs anhand von TMAs im Vergleich zu WMTS berichteten [70]. Dementsprechend ließe sich das Missverhältnis von TMA- zu WMTS-Befunden auf den gesamten Tumor übertragen (entspricht dem Verhältnis eines einzelnen Tumorblocks zur Gesamtheit der Tumorblöcke). Um einen möglichen Stichprobenfehler zu minimieren, wurden in dieser Arbeit daher bis zu fünf Tumorblöcke pro Fall ausgewählt. Im Hinblick auf die von Müller et al. publizierten Ergebnisse (Median Ki-67-PIs variierten zwischen 53,3 % und 32,0 % [92]), zeigen die hier vorgelegten Daten eine noch weitreichendere Streuung der Ki-67-PIs von 4 % (Median Minimum KiL) bis zu 75,8 % (Median Maximum KiH) (Abbildung 6) [118]. Darüber hinaus wurde eine intertumorale Heterogenität des Ki-67-PI durch Müller et al. (3,0 % bis 92,0 % [92]) und Böger et al. (2,0 % bis 99,0 % [70]) beschrieben, wofür die Resultate dieser Arbeit weitere Anhaltspunkte bieten (Maximum KiH: 4,1 % bis 99,0 %) [118]. Diese Studie ist die erste Arbeit, die eine ITH von Ki-67 nach neoadjuvanter Therapie nachweist und damit, auf der Grundlage der verfügbaren Daten, die Hypothese unterstützt, dass die ITH von Ki-67 nach neoadjuvanter Therapie erhalten bleibt. Es ist jedoch anzumerken, dass

Informationen in Bezug auf den Ki-67-Status vor der Therapie in dieser Kohorte fehlen und dadurch ein direkter Rückschluss auf den tatsächlichen Einfluss der Therapie auf die ITH von Ki-67 nicht möglich ist. Zudem lassen sich die Ergebnisse zur ITH von Ki-67 nur begrenzt mit den Daten anderer Studien vergleichen, da sich die angewandten Methodiken erheblich voneinander unterscheiden und die bisherigen Untersuchungen zur ITH von Ki-67 an unbehandelten Magenkarzinomen durchgeführt wurden (Tabelle 7).

4.2.2 Ki-67 als prognostischer Biomarker

Während sich Ki-67 in mehreren Tumorentitäten als Prognosemarker etablieren konnte, wird dessen Rolle beim Magenkarzinom kontrovers diskutiert. Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse berichtete zwar, dass ein hoher Ki-67-PI mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert ist [82], dennoch wurde in mehreren Studien, diese Arbeit eingeschlossen, kein Zusammenhang zwischen Ki-67 und der Patientenprognose nachgewiesen (Abbildung 9) [70,82,92,118]. Eine Studie von Lee et al. zeigte zudem, dass Patienten mit einem hohen Ki-67-PI im Vergleich zu Patienten mit einem niedrigen Ki-67-PI eine gute Prognose aufwiesen [83]. Im Hinblick auf die Studienlage zu neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen bietet nur eine Arbeit von Wu et al. belastbare Ergebnisse [84]. Hier zeigte sich ebenfalls, dass ein hoher Ki-67-PI mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert war. Allerdings erfolgte die Auswahl der Areale zur Bestimmung des Ki-67-PI per Zufall, wodurch sich ein Stichprobenfehler nicht sicher ausschließen ließ, und der Grenzwert des PI wurde mit 11,9 % vergleichsweise niedrig gesetzt [84]. Erklärungen für die widersprüchlichen Ergebnisse liegen womöglich in den fehlenden Standards der Bewertungskriterien, der Art und der Konzentration des verwendeten Antikörpers, dem immunhistochemischen Färbeprotokoll, der Anzahl an ausgewerteten Tumorzellen sowie Art und Anzahl an untersuchten Tumorproben [82]. Einen möglicherweise viel größeren Einfluss hat die Tatsache, dass der Ki-67-PI in der Regel nur in einer einzelnen Probe pro Fall untersucht und dadurch der Einfluss der ITH auf das gesamte Tumorareal vernachlässigt wird. Eine Studie von Böger et al. demonstrierte, dass die Erfassung des Ki-67-PI anhand von TMAs im Vergleich zu WMTS zu einer durchschnittlichen Unterschätzung des KI-67-PI von 16,9 % führte [70]. In Anbetracht der Schwankungen des PI, die in dieser Studie zwischen den einzelnen Regionen desselben Tumors festgestellt wurden (KiH reicht von 31,0 % bis 85,0 %; Abbildung 3), liefern die erhobenen Daten Anhaltspunkte dafür, dass die ITH von Ki-67 weitreichender ist als ursprünglich angenommen [118]. Dennoch zeigte sich in dieser Arbeit, dass anhand keiner der Ki-67-PIs eine Aussage hinsichtlich der Prognose

getroffen werden kann (Abbildung 9), obwohl die ITH von Ki-67 durch den Einschluss von mehreren Tumorproben pro Fall nach Möglichkeit berücksichtigt wurde.

Somit weisen die Resultate dieser Untersuchung und die bereits diskutierten methodischen Schwierigkeiten darauf hin, dass Ki-67 zurzeit nicht als verlässlicher Prognosemarker für neoadjuvant behandelte Magenkarzinome dienen kann. Dennoch sind, in Anbetracht der wenigen Forschungsdaten zu diesem Thema, weitere Untersuchungen notwendig. Zukünftige Studien sollten darauf achten, mehrere Tumorproben pro Fall, im Idealfall das gesamte Tumorbett, zu untersuchen und genau festgelegte Auswertekriterien zu formulieren, damit eine möglichst exakte Erfassung des Ki-67-PI gewährleistet ist.

4.2.3 Ki-67 und Tumorregression

Indikator für Sensitivität gegenüber der Therapie

Die Chemotherapie ist ein wichtiger Bestandteil der multimodalen Therapie des Magenkarzinoms und hat erhebliche Auswirkungen auf die Proliferation und die Regression eines Tumors (Abbildung 11). Schnell proliferierende Gewebe, wie unter anderem Tumorzellen, sind der primäre Angriffspunkt für die Standardchemotherapie. Dadurch erklärt sich, dass der Ki-67-PI in neoadjuvant behandelten Karzinomen verglichen mit unbehandelten Karzinomen beziehungsweise präoperativen Biopsien signifikant niedriger ausfiel [84,125] und hohe Ki-67 Werte mit einem guten Therapieansprechen assoziiert waren [128]. Gleichzeitig wurde berichtet, dass der Ki-67-PI mit zunehmender Tumorregression sank [84]. Diese Erkenntnisse stimmen mit den hier erhobenen Daten überein (KiH und TBA; Maximum KiH und TRG nach Becker [95], $p < 0,001$) [118]. Es ist jedoch zu beachten, dass in dieser Studie keine Informationen über den Ki-67-Status vor der Chemotherapie und somit über die Ki-67-Dynamik bekannt sind. Das ist wahrscheinlich auch nicht repräsentativ möglich, da die Diagnose anhand einer Biopsie gestellt wird, die ihrerseits das Risiko eines Stichprobenfehlers trägt. Diesen Ergebnissen gegenüber stehen zwei Studien, die keine Assoziation zwischen der Tumorregression und dem Ki-67-PI feststellen konnten [125,126]. Jedoch wurde in beiden Arbeiten die verwendete Methodik (Region der Auswertung, Grenzwerte für den PI; siehe Tabelle 7) nicht näher erläutert, wodurch sich die Ergebnisse nicht adäquat nachvollziehen lassen. Somit bieten die Daten dieser Arbeit weitere Anhaltspunkte dafür, dass Ki-67 als Biomarker für die Empfindlichkeit des Tumors gegenüber der Chemotherapie dienen kann [118].

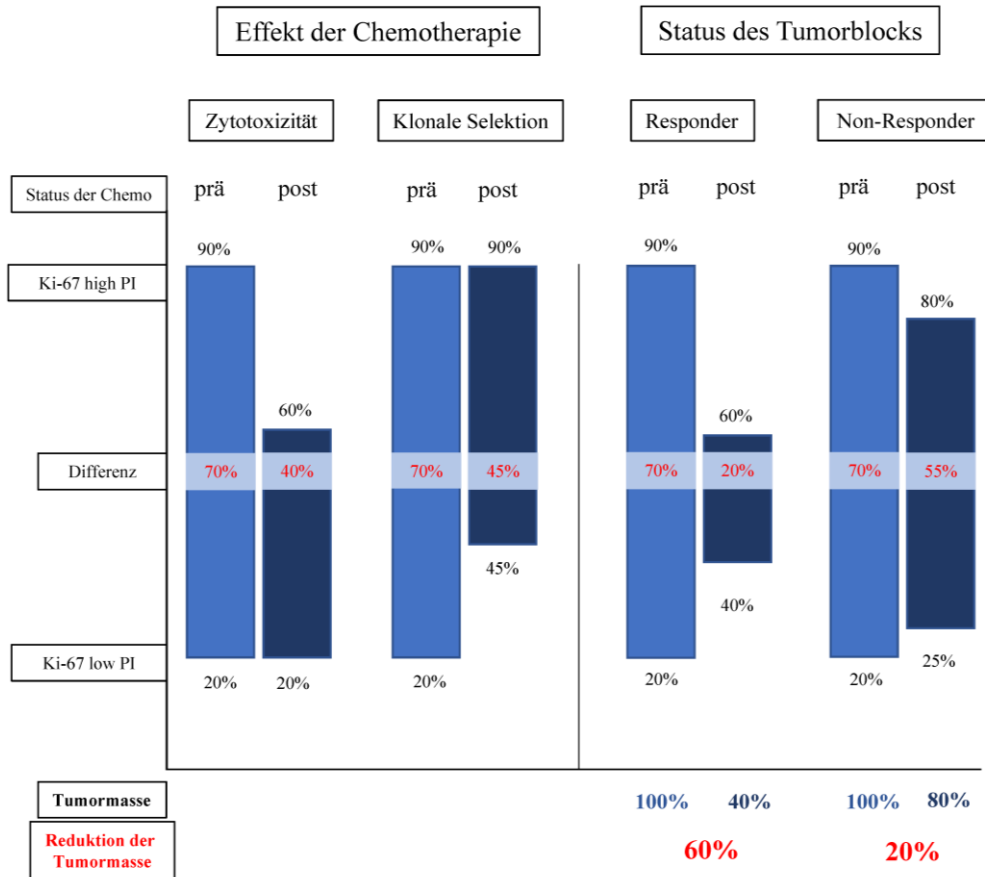


Abbildung 11: Einfluss der neoadjuvanten (Radio-)Chemotherapie auf Ki-67 und die Tumorregression. Dieses schematische Modell zeigt den potenziellen Einfluss der neoadjuvanten Therapie auf die Ki-67-Proliferationsindizes (PIs) und die Tumorregression. Jede Säule repräsentiert den Ki-67-PI vor der Therapie (hellblau; angenommen) und nach der Therapie (dunkelblau; gemessen). Der höchste PI (Ki-67 *high* PI, KiH) und niedrigste PI (Ki-67 *low* PI, KiL) eines Schnitts, die Differenz (KiD) der beiden sowie die Tumorregression (Reduktion der Tumormasse) sind jeweils mitangegeben. Zwei Effekte als Folge der neoadjuvanten Therapie lassen sich beobachten (links). In der Spalte „Zytotoxizität“ zeigt sich eine Abnahme des KiH nach erhaltener Chemotherapie. Gleichzeitig zeigt sich in der Spalte „Klonale Selektion“ eine Zunahme des KiL. Beide Effekte sind in Tumorblöcken mit einer starken Reduktion der Tumormasse (rechts; Responder) aufzufinden. Im Gegensatz dazu zeigt sich in Non-Responder-Tumorblöcken nur eine geringe Veränderung des KiH und KiL. Modifiziert nach Kock am Brink et al. [118]. Die Abbildung ist unter der *Creative Commons Attribution 4.0 International License* lizenziert. Die Lizenz ist unter folgendem Link einzusehen: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>.

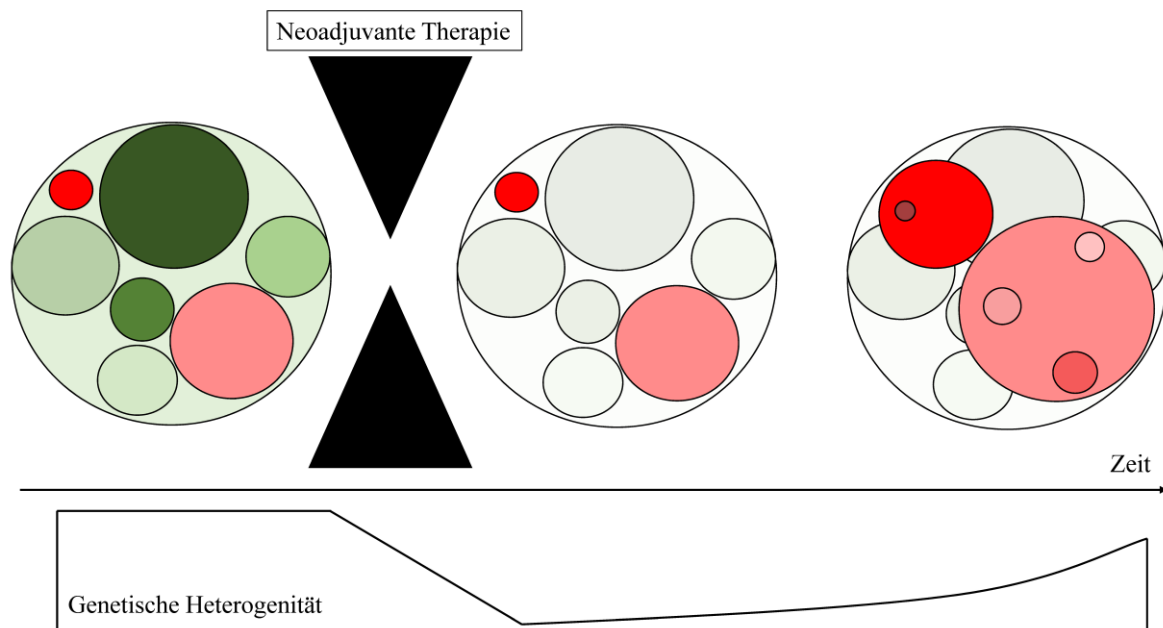


Abbildung 12: Selektionseffekt durch die neoadjuvante Therapie. Dargestellt ist der Selektionseffekt durch die neoadjuvante Therapie. Jeder farbige Kreis entspricht einer in sich genetisch homogen Tumorzellpopulation (Subklon) innerhalb des Tumors (Gesamtheit der Kreise). Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der Tumorzellen des jeweiligen Subklons. Während die grüne Farbe eine Therapieempfindlichkeit anzeigt, spiegelt die rote Farbe eine Therapieresistenz wider. Der Tumor (Gesamtheit der Kreise) ist zu drei Zeitpunkten dargestellt. Vor der Therapie zeigt sich ein hohes Maß an genetischer Heterogenität (links). Durch die neoadjuvante Therapie kommt es zur Eradikation von therapieempfindlichen Subklonen (Mitte; grüne Kreise mit abgeblasster Färbung) und zur Positivselektion der therapieresistenten Subklone (Mitte; Rote Kreise) mit kurzzeitiger Reduktion der genetischen Heterogenität. Anschließend kommt es zur Proliferation der selektierten Subklone und durch die Ausbildung neuer Subklone zur Wiederherstellung der genetischen Heterogenität (rechts; Größenzunahme der roten Kreise und neue rote Kreise). Modifiziert nach Gerlinger et al. [63]. Die Abbildung ist unter der *Attribution-NonCommercial ShareAlike 3.0 Unported License* lizenziert. Die Lizenz ist unter folgendem Link einzusehen: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/legalcode>.

Indikator für subklonale Selektion

Die Chemotherapie hat einen erheblichen Einfluss auf die Biologie des Tumors. So zeigte sich, dass durch Chemotherapeutika ein Selektionsdruck auf subklonale Architekturen ausgeübt werden kann [57,63,65]. Es entsteht ein sogenannter Flaschenhals-Effekt (engl. *bottleneck effect*). Therapieresistente Subklone überleben die neoadjuvante Therapie und werden positiv selektiert, während therapieempfindliche Subklone durch die Therapie ausgelöscht werden (Abbildung 12) [63]. Dieser Effekt wurde bereits für die akute myeloische Leukämie [129] und das Kolonkarzinom beschrieben [130]. Es ist anzunehmen, dass eine therapieinduzierte Abnahme der Tumormasse gleichzeitig eine Verminderung der Anzahl bzw. Diversität der Subklone zur Folge hat [63,130], was im Gegenzug das Wachstum von positivselektierten, therapieresistenten Subklonen befördert. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass

inhibitorische Einflüsse von vor der Chemotherapie existierenden Subklonen (sogenannte Konkurrenz) wegfallen und somit mehr Raum für die Ausbreitung der überlebenden Tumorzellen vorhanden ist [57,60]. Hinzu kommt, dass zwischen dem letzten Chemotherapiezyklus und der Operation eine gewisse Zeitspanne liegt, sodass der Anstieg der Proliferation auch auf die Aneignung von Mutationen zurückgeführt werden kann, die sich vorteilhaft auf die Fitness der positivselektierten Subklone auswirken [131]. Für diese Hypothesen zeigen sich weitere Hinweise, da Tumoren mit einem guten Ansprechen auf die Therapie im Vergleich zu Tumoren mit einem schlechten Ansprechen eine gesteigerte Proliferation am unteren Proliferationsniveau aufweisen (KiL und TBA, $p < 0,001$; Minimum KiL und mTBA $p = 0,002$) [118]. Dem ist entgegenzuhalten, dass eine auf die Chemotherapie folgende gesteigerte Proliferation nicht zwangsläufig mit einem Selektionsprozess in Zusammenhang stehen muss. Einer Studie von Kreso et al. an kolorektalen Karzinomen zufolge variiert die Wachstumsdynamik und das individuelle Ansprechverhalten der Tumorzellen auf die Therapie innerhalb einer genetisch homogenen Zellreihe [132]. Dementsprechend tragen nicht alle Tumorzellen gleichermaßen zum Tumorwachstum bei. Vielmehr gibt es Tumorzellen, die zwischen Ruhe- und Proliferationszuständen oszillieren, und Tumorzellen, die als Reserve dienen. Aus dieser Heterogenität des funktionalen Verhaltens der einzelnen Zelle kann es auch ohne nennenswerte Selektionsprozesse zu einer posttherapeutischen Proliferation des Tumors kommen [132].

Indikator für genetische intratumorale Heterogenität

Aufgrund vorheriger Untersuchungen von Böger et al. [70] und Müller et al. [92] wurde die Hypothese diskutiert, ob Ki-67 ein Surrogatmarker für genetische ITH sein könnte. Die vorliegenden Daten liefern Hinweise für diese Hypothese. Es zeigte sich, dass eine fortgeschrittene Tumorregression signifikant mit einer Abnahme des KiD-Parameters assoziiert war (KiD und mTBA, $p = 0,015$; KiD und TRG nach Becker et al. [95], $p < 0,001$) [118]. Die Chemotherapie sorgt durch die Eradikation von therapiesensiblen Subklonen für einen kurzzeitigen Rückgang der genetischen Tumorheterogenität [63]. Sugimachi et al. stützten diese Annahme in einer Arbeit an kolorektalen Karzinomen, in der ein massiver Untergang von Subklonen zu einer Verringerung der genetischen Diversität des Tumors führte [130]. Auf der anderen Seite wurde eine Zunahme des KiD-Parameters mit einer geringeren Tumorregression und folglich einem schlechteren Tumoransprechen assoziiert [118]. In diesem Zusammenhang wurde für das Mammakarzinom beschrieben, dass es in als Non-Responder klassifizierten Tumoren nur zu einer geringfügigen Änderung der prä- und posttherapeutischen genetischen

Diversität nach neoadjuvanter Therapie kam. Im Gegensatz dazu wurde in Tumoren mit einem hohen Maß an Tumorregression eine geringe prätherapeutische genetische Diversität nachgewiesen [131]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Tumorregression in gewissem Maße mit der genetischen Diversität des Tumors zusammenhängt. Zudem zeigte sich, dass hohe KiD-Werte mit einer proximalen Tumorlokalisierung und dem histologisch gemischten Tumortyp assoziiert waren, während niedrige KiD-Werte mit einer distalen Lokalisation und dem histologisch diffusen Typ in Verbindung standen ($p < 0,001$; $p = 0,003$) [118]. Der Klassifikation des TCGA zufolge, sind genomisch stabile Magenkarzinome überwiegend im distalen Magen lokalisiert und hochsignifikant mit dem histologisch diffusen Typ assoziiert [33]. In diesem Zusammenhang ließ sich nachweisen, dass die Anzahl der Subklone in Tumoren des diffusen Typs geringer ist als in denen des intestinalen Typs [133]. Proximale Tumoren hingegen weisen häufiger eine chromosomale Instabilität auf. In diesen Tumoren zeigten sich vermehrt *TP53*-Mutationen und Amplifikationen von RTK-Genen, die eng mit der Proliferation assoziiert sind (zum Beispiel *EGFR*, *MET*) [33]. Dabei stellt sich die Frage, ob diese Mutationen durch Zufall oder als Folge der *TP53*-Mutation aufgetreten sind. In diesem Kontext beschrieben Pan et al. für das Magenkarzinom, dass Patienten mit einem mutierten *TP53*-Gen eine signifikant höhere Anzahl an somatischen Mutationen aufweisen [134]. Das Protein p53 hat als „Wächter des Genoms“ eine zentrale Stellung in der Regulierung der Zellteilung und Apoptose. Veränderungen des Gens (*TP53*) resultieren in einer unkontrollierten Proliferation und einer Akkumulation von DNA-Schäden, die mit chromosomaler Instabilität und damit einer erhöhten Frequenz somatischer Mutationen einhergehen können [135]. Es erscheint naheliegend, dass diese Mutationen somit auch Genabschnitte betreffen, die mit einer gesteigerten Proliferation assoziiert sind (zum Beispiel *EGFR*, *MET*). Neben diesem „indirekten“ Einfluss von *TP53* auf die Proliferation konnten Xiong et al. zusätzlich eine direkte Interaktion zwischen dem Signalweg von *TP53* und dem Gen von Ki-67 (*MKI67*) nachweisen [82]. Eine Studie von Wong et al. beschrieb zudem eine ITH für *TP53*-Inaktivierungsmechanismen [133]. Somit zeigt sich ein komplexes Zusammenspiel zwischen Ki-67, *TP53*-Mutationen und damit assoziierten somatischen Mutationen. Zum einen könnte die ITH von *TP53*-Mutationen direkt eine ITH von Ki-67 begünstigen. Zum anderen bildet Ki-67 als Proliferationsmarker die gemeinsame „Endstrecke“ von verschiedenen RTKs und Signalkaskaden (zum Beispiel RAS/RAF/MAPK) ab. Für viele dieser Strukturen wurde bereits eine ausgeprägte ITH nachgewiesen (möglicherweise als Folge einer *TP53*-Mutation) [66,68,69,72,75], wodurch eine regional unterschiedlich stark ausgeprägte Proliferation und damit Expression von Ki-67 begünstigt wird (Abbildung 13).

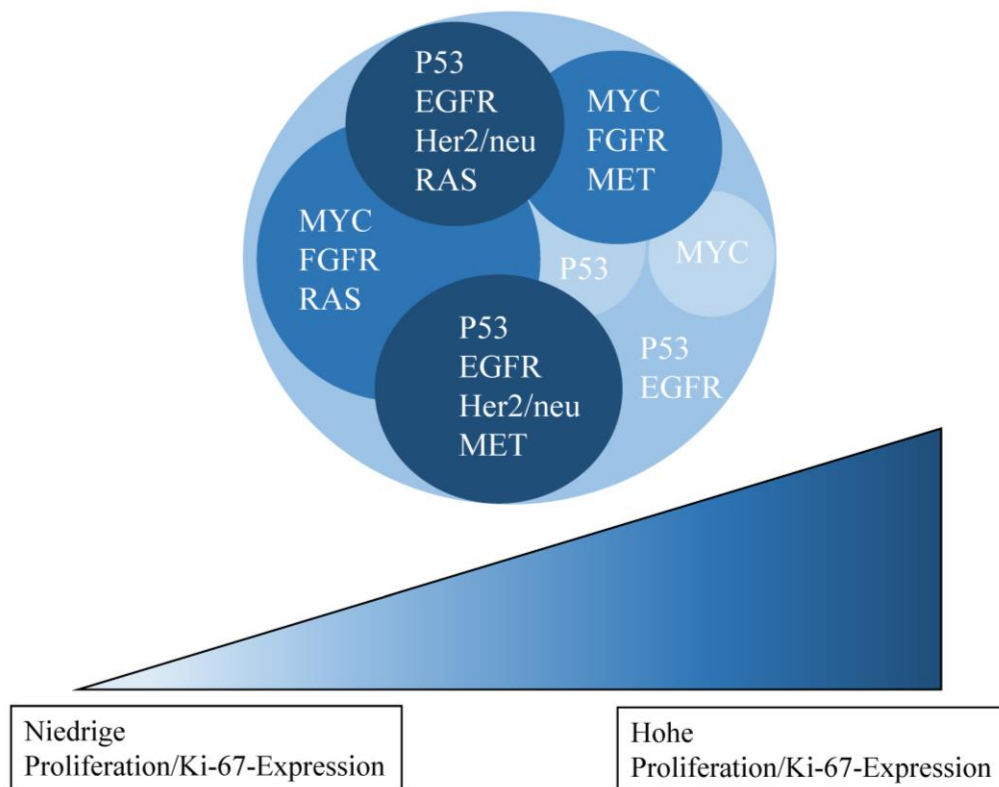


Abbildung 13: Ki-67 als Marker für intratumorale Heterogenität. Dargestellt ist ein schematisches Modell, das eine mögliche Verbindung zwischen Ki-67 und Mutationen, die mit einer gesteigerten Proliferation vergesellschaftet sind, aufzeigt. Jeder farbige Kreis repräsentiert einen Subklon innerhalb eines Tumors (Gesamtheit der Kreise), wobei die Größe mit der Anzahl der zugehörigen Tumorzellen korreliert. Je dunkler die blaue Farbe des jeweiligen Kreises, desto höher ist die Proliferation beziehungsweise die Ki-67-Expression des Subklons (Farbverlauf). Innerhalb eines Kreises (Subklon) sind mögliche Mutationen, die Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Signalwege betreffen, dargestellt. Eine zunehmende Anzahl an Mutationen hat eine Verstärkung der Proliferation zur Folge. Durch die intratumorale Heterogenität der somatischen Mutationen kommt es zu regionalen Unterschieden in der proliferativen Aktivität und somit der Ki-67-Expression.

Gleichzeitig wurden für das Glioblastom und das Magenkarzinom Koamplifikationen von Genen beschrieben, deren Genprodukte Teil von Signalkaskaden [136] und RTKs sind [136,137]. Das legt die Vermutung nahe, dass Koamplifikationen innerhalb eines Subklons synergistisch zu einer gesteigerten Proliferation des jeweiligen Subklons führen können und damit regionale Unterschiede in der Ki-67-Expression verstärken würden (Abbildung 13). Für diese Annahme liefern Luo et al. in einer Untersuchung an Glioblastomen Hinweise, in der Koamplifikationen von verschiedenen RTKs subklonal strukturiert und mit einem höheren proliferativen Potenzial assoziiert waren [138]. Zudem wiesen die Subklone mit amplifizierten RTKs signifikant häufiger *TP53*-Mutationen auf, was sich als kompatibel mit den bisher diskutierten Aspekten bezüglich *TP53* erweist [33,134,138]. Neben den vorangegangenen

Untersuchungen von Böger et al. und Müller et al. liefert somit auch diese Arbeit Anhaltspunkte dafür, dass Ki-67 mit genetischer ITH und somit der subklonalen Struktur assoziiert ist [70,92]. In Anbetracht der Datenlage scheint eine Assoziation auf Ebene von Mutationen, die an eine gesteigerte Proliferation gekoppelt sind, am wahrscheinlichsten (Abbildung 13). Allerdings beruhen diese Erkenntnisse nicht auf einem tatsächlichen Nachweis der genetischen Heterogenität, wodurch eindeutige Beweise fehlen. Zudem sind die Annahmen hypothetischer Natur, da die WMTS ein zweidimensionales Bild wiedergeben und die subklonale Architektur dreidimensional und damit höchstwahrscheinlich sehr komplex ist. Neben der Tumorgenetik beeinflusst zudem auch das regional variierende Tumormikromilieu (Immunzellen, Mikrogefäßdichte, Zugang zu Nährstoffen und Sauerstoff) das Wachstumsverhalten der Tumorzellen [139]. Dennoch zeigten sich Zusammenhänge zwischen der Tumorproliferation und -regression, die meine Hypothese bestätigten und einen Ansatz für weitere Untersuchungen bieten. Insbesondere die Etablierung eines Surrogatmarkers für genetische Heterogenität ist vor dem Hintergrund der aufwendigen und kostenintensiven Sequenzierung der nächsten Generation ein erstrebenswertes Ziel. Zukünftige Studien sollten daher den Zusammenhang zwischen Ki-67 und der genetischen Kompositionen genauer untersuchen, um den diagnostischen Nutzen von Ki-67 beim Magenkarzinom weiter zu evaluieren.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgestellten vier Hypothesen werden durch meine Studien abschließend wie folgt beantwortet: (1) Die neoadjuvante Therapie erschwert die Evaluation des Ki-67-PI, da die Tumorregression Auswirkungen auf das Tumolvolumen, die Ausdehnung und Verteilung der Tumorzellen hat; (2) Der Ki-67-PI weist nach neoadjuvanter Therapie eine erhebliche intra- und intertumorale Heterogenität auf, sowohl den KiH als auch den KiL betreffend. Die Bestimmung des Ki-67-PI birgt damit ein sehr großes Risiko des Stichprobenfehlers und es zeigt außerdem, dass die alleinige Fokussierung auf *hot spot*-Areale (KiH) wichtige tumorbiologische Aspekte der subklonalen Vielfalt nach neoadjuvanter Chemotherapie ausblendet; (3) Meine Ergebnisse bestätigen den Zusammenhang zwischen Ki-67-PI und Tumorregression und (4) widerlegen die Hypothese, dass der Ki-67-PI trotz der ITH einen prognostischen Stellenwert hat. Zukünftige Studien sollten demnach prüfen, ob der Ki-67-PI sich nicht vielmehr eignet, um wichtige Hinweise auf subklonale Vielfalt und Therapieresponse zu liefern.

5 Zusammenfassung

Das Magenkarzinom ist eine Tumorerkrankung mit einer komplexen sowie heterogenen Biologie, die sich durch ein schlechtes therapeutisches Ansprechen, eine ungünstige Prognose sowie eine geringe Anzahl an prädiktiven Biomarkern auszeichnet. Hierzu tragen die intratumorale Heterogenität des Tumors und die damit einhergehende subklonale Architektur entscheidend bei. In den letzten Jahren hat das Verständnis der Tumorbilogie zugenommen und zu einem gesteigerten Interesse an der Objektivierung der intratumoralen Heterogenität und dessen Einfluss auf die Biomarker geführt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Expression des Proteins Ki-67, das als Proliferationsmarker in mehreren Tumorentitäten, unter anderem zur Prognoseabschätzung, verwendet wird. Die Evaluation von Ki-67 erfolgt in der Regel anhand eines Proliferationsindex, der nur in einem Teil der Tumormasse berechnet wird (sogenannte Wachstumsfraktion). Während die Rolle von Ki-67 als Prognosemarker in unbehandelten Karzinomen bereits kontrovers diskutiert wurde, gibt es in Bezug auf neoadjuvant vorbehandelte Magenkarzinome wenig Evidenz. Das trifft auch auf die schon in unbehandelten Magenkarzinomen vorbeschriebene intratumorale Heterogenität sowie den Zusammenhang zwischen Tumorregression und -proliferation zu. Um diese Wissenslücke zu schließen, wurde in dieser Studie der Effekt der neoadjuvanten Therapie auf die Ki-67-Expression unter Berücksichtigung der Tumorregression untersucht.

Hierfür wurden 429 Gewebeschnitte aus 106 Fällen immunhistochemisch gefärbt und mithilfe digitaler Bildanalyse ausgewertet. Die korrespondierenden Daten bezüglich der Tumorregression (sogenannter Tumorbettanteil) wurden freundlicherweise von Frau Laura Dunst zur Verfügung gestellt. Für jeden Gewebeschnitt wurden drei Ki-67-Proliferationsindizes ermittelt; der maximale und minimale Proliferationsindex im Gewebeschnitt sowie die Differenz zwischen den beiden (Blockweise-Parameter). Zusätzlich wurden aus den Gewebeschnitten, die dem gleichen Fall zugehörig waren, drei weitere Parameter bestimmt. Der maximale und minimale Proliferationsindex des Falls sowie die Differenz zwischen diesen (Fallweise-Parameter). Es erfolgte eine zweistufige Analyse, in der zum einen die Gewebeschnitte unabhängig ihres jeweiligen Falls (Blockweise-Analyse anhand Blockweise-Parameter) untersucht wurden und zum anderen die Auswertung auf der Ebene der einzelnen Fälle (Fallweise-Analyse anhand Fallweise-Parameter) vorgenommen wurde. Anschließend wurden die Ergebnisse mit der korrespondierenden Tumorregression, den Überlebensdaten und klinisch-pathologischen Patientencharakteristika assoziiert.

In 394 (91,8 %) Gewebeschnitten aus 99 (93,4 %) Fällen war ausreichend Tumorgewebe für die Analyse von Ki-67 vorhanden. Neben mehreren methodischen Schwierigkeiten zeigte sich, dass der maximale Proliferationsindex sowie der Differenz-Parameter antiproportional und der minimale Proliferationsindex proportional mit der Tumorregression in signifikantem Zusammenhang standen ($p < 0,001$; $p = 0,002$; $p = 0,015$). Zudem wurde eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität von Ki-67 beobachtet (die maximale Proliferation variierte von 31,0 % bis 85,0 % innerhalb eines Falls). Prognostisch hingegen erwies sich keiner der Ki-67-Parameter als signifikant.

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass nach neoadjuvanter Therapie eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität von Ki-67 fortbesteht. Erstmals wird auf der Grundlage digitalpathologischer Auswertelgorithmen gezeigt, welche Störfaktoren (Tumorzellzahl, Tumorzellverteilung) die valide Bestimmung des Ki-67 nach neoadjuvanter Therapie nachhaltig erschweren beziehungsweise unmöglich machen. Die Bestimmung des Ki-67-Proliferationsindex korrelierte nicht mit der Patientenprognose in einem neoadjuvant vorbehandeltem Kollektiv und ist damit als Prognosemarker ungeeignet. Darüber hinaus liefert der Zusammenhang zwischen der Proliferation und der Regression Anhaltspunkte dafür, dass Ki-67 ein möglicher Indikator für die Sensitivität gegenüber der Therapie, für Selektionsprozesse als Folge der neoadjuvanten Therapie sowie für das Ausmaß der subklonalen Struktur ist.

6 Literaturverzeichnis

1. *Storm T.* Beginn des Endes. 1864; Strophe 1, Vers 1-4.
2. *Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F.* Gastric cancer: Descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(5):700–13.
3. *GBD 2017 Stomach Cancer Collaborators.* The global , regional , and national burden of stomach cancer in 195 countries , 1990 – 2017 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5:42–54.
4. *Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
5. *Robert Koch Institut.* Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. 2016;17–77.
6. *Robert Koch Institut.* Abteilung für Epidemiologie und Gesundheitsmonitoring: [Zentrum für Krebsdaten (ZfKD)]. 2020 S. 32–5.
7. *Hu B, Hajj N El, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-ehrig A.* Gastric cancer : classification , histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(3):251–61.
8. *Marshall BJ, Warren JR.* Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1984;323(8390):1311–1315.
9. *IARC working group.* Schistosomes, liver flukes and helicobacter pylori. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1994 S. 1–241.
10. *Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG, Ng SC.* Global prevalence of helicobacter pylori infection: Systematic review and Meta-Analysis. *Gastroenterology.* 2017;153(2):420–9.
11. *Plummer M, Forman D, Martel C De, Franceschi S.* Global burden of gastric cancer attributable to helicobacter pylori. *Int J Cancer.* 2015;136:487–90.
12. *Kamangar F, Dawsey SM, Blaser MJ, Perez-Perez GI, Pietinen P, Newschaffer CJ, Abnet CC, Albanes D, Virtamo J, Philip RT.* Opposing risks of gastric cardia and noncardia gastric adenocarcinomas associated with helicobacter pylori seropositivity. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(20):1445–52.
13. *Webb PM, Law M, Varghese C, Forman D.* Gastric cancer and Helicobacter pylori: A

- combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut*. 2001;49:347–53.
14. *Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH*. Meta-analysis of the relationship between helicobacter pylori seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology*. 1998;114(6):1169–79.
 15. *Correa P*. A Human Model of Gastric Carcinogenesis. *Cancer Res*. 1988;48(13):3554–3560.
 16. *Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA*. Heterogeneity in the Helicobacter pylori vacA and cagA genes: Association with gastroduodenal disease in south africa? *Gut*. 1999;45(4):499–502.
 17. *Ekström AM, Eriksson M, Hansson LE, Lindgren A, Signorello LB, Nyrén O, Hardell L*. Occupational exposures and risk of gastric cancer in a population-based case-control study. *Cancer Res*. 1999;59(23).
 18. *Stoicov C, Saffari R, Cai X, Hasyagar C, Houghton J*. Molecular biology of gastric cancer: Helicobacter infection and gastric adenocarcinoma: Bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. *Gene*. 2004;341:1–17.
 19. *Loh JT, Torres VJ, Cover TL*. Regulation of Helicobacter pylori cagA expression in response to salt. *Cancer Res*. 2007;67:4709–15.
 20. *Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP*. Gastric cancer : epidemiology , prevention , classification , and treatment. *Cancer Manag Res*. 2018;10:239–48.
 21. *Abdi E, Latifi-Navid S, Zahri S, Yazdanbod A, Pourfarzi F*. Risk factors predisposing to cardia gastric adenocarcinoma : Insights and new perspectives. *Cancer Med*. 2019;8:6114–26.
 22. *Derakhshan MH, Malekzadeh R, Watabe H, Yazdanbod A, Fyfe V, Kazemi A, Rakhshani N, Didevar R, Sotoudeh M, Zolfeghari AA, McColl KEL*. Combination of gastric atrophy, reflux symptoms and histological subtype indicates two distinct aetiologies of gastric cardia cancer. *Gut*. 2008;57(3):298–305.
 23. *Mukaisho KI, Nakayama T, Hagiwara T, Hattori T, Sugihara H*. Two distinct etiologies of gastric cardia adenocarcinoma: Interactions among pH, Helicobacter pylori, and bile acids. *Front Microbiol*. 2015;6(412):1–7.
 24. *Machlowska J, Baj J, Sitarz M, Maciejewski R, Sitarz R*. Gastric cancer: Epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies. *Int J Mol*

- Sci. 2020;21(11):1–20.
25. *Vecchia C La, Negri E, Sc D, Franceschi S.* Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer.* 1992;70(1):50–5.
 26. *Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND.* WHO classification of tumors of digestive system. World Health Organisation press 2010 S. 48–80.
 27. *Laurén P.* The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965;64:31–49.
 28. *Ma J, Shen H, Kapesa L, Zeng S.* Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer. *Oncol Lett.* 2016;(5):2959–64.
 29. *Chen YC, Fang WL, Wang RF, Liu CA, Yang MH, Lo SS, Wu CW, Li AFY, Shyr YM, Huang KH.* Clinicopathological variation of lauren classification in gastric cancer. *Pathol Oncol Res.* 2016;22:197–202.
 30. *Tan IB, Ivanova T, Lim KH, Ong CW, Deng N, Lee J, Tan SH, Wu J, Lee MH, Ooi CH, Rha SY, Wong WK, Boussioutas A, Yeoh KG, So J, Yong WP, Tsuburaya A, Grabsch H, Toh HC, Rozen S, Cheong JH, Noh SH, Wan WK, Ajani JA, Lee JS, Tellez MS, Tan P.* Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy. *Gastroenterology.* 2011;141:476–85.
 31. *Lei Z, Tan IB, Das K, Deng N, Zouridis H, Pattison S, Chua C, Feng Z, Guan YK, Ooi CH, Ivanova T, Zhang S, Lee M, Wu J, Ngo A, Manesh S, Tan E, Teh BT, So JBY, Goh LK, Boussioutas A, Lim TKH, Flotow H, Tan P, Rozen SG.* Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to pi3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterology.* 2013;145(3):554–65.
 32. *Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim KM, Ting JC, Wong SS, Liu J, Yue YG, Wang J, Yu K, Ye XS, Do IG, Liu S, Gong L, Fu J, Jin JG, Choi MG, Sohn TS, Lee JH, Bae JM, Kim ST, Park SH, Sohn I, Jung SH, Tan P, Chen R, Hardwick J, Kang WK, Ayers M, Hongyue D, Reinhard C, Loboda A, Kim S, Aggarwal A.* Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med.* 2015;21(5):449–56.
 33. *The Cancer Genome Atlas Research Group.* Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513:202–9.
 34. *Gullo I, Carneiro F, Oliveira C, Almeida GM.* Heterogeneity in gastric cancer: From pure morphology to molecular classifications. *Pathobiology.* 2018;85:50–63.
 35. *Röcken C.* Molecular classification of gastric cancer. *Expert Rev Mol Diagn.*

- 2017;17(3):293–301.
36. *Arai H, Nakajima TE.* Recent developments of systemic chemotherapy for gastric cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(1100):1–30.
 37. *Röcken C, Behrens HM.* Validating the prognostic and discriminating value of the TNM-classification for gastric cancer - A critical appraisal. *Eur J Cancer.* 2015;51:577–86.
 38. *De Bierly J (Editor), Gospodarowicz MK (Editor), Wittekind C (Editor).* TNM Classification of malignant tumors, 8th Edition. Wiley-Blackwell 2016 S. 1–336.
 39. *Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenen H.* Gastric cancer. *Lancet.* 2016;388:2654–64.
 40. *Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJH, Nicolson M, Scarffe H, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ, Smith DB, Langley RE, Verma M, Weeden S, Chua YJ.* Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med.* 2006;355:11–20.
 41. *Yang Y, Yin X, Sheng L, Xu S, Dong L, Liu L.* Perioperative chemotherapy more of a benefit for overall survival than adjuvant chemotherapy for operable gastric cancer : an updated meta-analysis. *Sci Rep.* 2015;5(12850):1–12.
 42. *Al-Batran SE, Homann N, Pauligk C, Goetze TO, Meiler J, Kasper S, Kopp HG, Mayer F, Haag GM, Luley K, Lindig U, Schmiegel W, Pohl M, Stoehlmacher J, Folprecht G, Probst S, Prasnikař N, Fischbacher W, Mahlberg R, Trojan J, Königsmann M, Martens UM, Thuss-Patience P, Egger M, Block A, Heinemann V, Illerhaus G, Moehler M, Schenk M, Kullmann F, Behringer DM, Heike M, Pink D, Teschendorf C, Löhr C, Bernhard H, Schuch G, Rethwisch V, Von Weikersthal LF, Hartmann JT, Kneba M, Daum S, Schulmann K, Weniger J, Belle S, Gaiser T, Oduncu FS, Güntner M, Hozaeel W, Reichart A, Jäger E, Kraus T, Mönig S, Bechstein WO, Schuler M, Schmalenberg H, Hofheinz RD.* Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised phase 2/3 trial. *Lancet.* 2019;393(10184):1948–57.
 43. *Wagner AD, Syn NL, Moehler M, Grothe W, Yong WP, Tai B-C, Ho J, Unverzagt S.* Chemotherapy for advanced gastric cancer (Review). *Cochrane Database Syst Revies.* 2017;8:1–216.
 44. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Magenkarzinom, Langversion 2.0, AWMF Registernummer:

- 032/009OL. AWMF Online 2019 S. 1–237.
45. *Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK.* Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;376:687–97.
 46. *Van Cutsem E, Bang YJ, Feng-yi F, Xu JM, Lee KW, Jiao SC, Chong JL, López-Sánchez RI, Price T, Gladkov O, Stoss O, Hill J, Ng V, Lehle M, Thomas M, Kiermaier A, Rüschoff J.* HER2 screening data from ToGA: targeting HER2 in gastric and gastroesophageal junction cancer. *Gastric Cancer.* 2015;18:476–84.
 47. *Al-Batran S-E, Hofheinz RD, Schmalenberg H, Strumberg D, Goekkurt E, Angermeier S, Zander T, Potenberg J, Kopp HG, Pink D, Siegler GM, Schenk M, Vita FD, Maiello E, Gaiser T, Sookthai D, Bankstahl US, Pauligk C, Goetze TO, Homann N.* Perioperative ramucirumab in combination with FLOT versus FLOT alone for resectable esophagogastric adenocarcinoma (RAMSES/FLOT7): Results of the phase II-portion—A multicenter, randomized phase II/III trial of the German AIO and Italian GOIM. *J Clin Oncol.* 2020;38(15):4501–4501.
 48. *Hofheinz RD, Haag GM, , Ettrich T, Borchert K, Kretzschmar A, Teschendorf C, Siegler GM, Ebert MP, Goekkurt E, Welslau M, Mahlberg R, Homann N, Pink D, Bechstein WO, Reichardt P, Gaiser T, Sookthai D, Pauligk C, Goetze TO, Al-Batran SE.* FLOT Versus FLOT/Trastuzumab/Pertuzumab Perioperative Therapy of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Resectable Esophagogastric Adenocarcinoma: A randomized phase II trial of the AIO EGA study group. *J Clin Oncol.* 2022;40(32):3750–62.
 49. *Röcken C.* Predictive biomarkers in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2023;149(1):467–81.
 50. *Kang YK, Chen LT, Ryu MH, Oh DY, Oh SC, Chung HC, Lee KW, Omori T, Shitara K, Sakuramoto S, Chung IJ, Yamaguchi K, Kato K, Sym SJ, Kadowaki S, Tsuji K, Chen JS, Bai LY, Oh SY, Choda Y, Yasui H, Takeuchi K, Hirashima Y, Hagihara S, Boku N.* Nivolumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in patients with HER2-negative, untreated, unresectable advanced or recurrent gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ATTRACTION-4): a randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2022;23(2):234–47.
 51. *Macdonald JS, Smalley, Stephen R., Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann*

- GN, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup JM, Martenson JA.* Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med.* 2001;345(10):725–30.
52. *Moehler M, Baltin CTH, Ebert M, Fischbach W, Gockel I, Grenacher L, Hölscher AH, Lordick F, Malfertheiner P, Messmann H, Meyer HJ, Palmqvist A, Röcken C, Schuhmacher C, Stahl M, Stuschke M, Vieth M, Wittekind C, Wagner D, Mönig SP.* International comparison of the German evidence-based S3-guidelines on the diagnosis and multimodal treatment of early and locally advanced gastric cancer, including adenocarcinoma of the lower esophagus. *Gastric Cancer.* 2015;18(3):550–63.53.
53. *Röcken C, Amallraja A, Halske C, Opasic L, Traulsen A, Behrens HM, Krüger S, Liu A, Haag J, Egberts JH, Rosenstiel P, Meißner T.* Multiscale heterogeneity in gastric adenocarcinoma evolution is an obstacle to precision medicine. *Genome Med.* 2021;13(177):1–19.
54. *von Loga K, Woolston A, Punta M, Barber LJ, Griffiths B, Semiannikova M, Spain G, Challoner B, Fenwick K, Simon R, Marx A, Sauter G, Lise S, Matthews N, Gerlinger M.* Extreme intratumour heterogeneity and driver evolution in mismatch repair deficient gastro-oesophageal cancer. *Nat Commun.* 2020;11(139):1–14.
55. *Pectasides E, Stachler MD, Derks S, Liu Y, Maron S, Islam M, Alpert L, Kwak H, Kindler H, Polite B, Sharma MR, Allen K, O`Day E, Lomnicki S, Maranto M, Kanteti R, Fitzpatrick C, Weber C, Setia N, Xiao SY, Hart J, Nagy RJ, Kim KM, Choi MG, Min BH, Nason KS, O`Keefe L, Watanabe M, Baba H, Lanman R, Agoston AT, Oh DJ, Turaga K, Gelrud A, Ha G, Freeman SS, Reed S, Gyduch G, Imamura Y, Lee J, Bass AJ, Catenacci DV.* Genomic heterogeneity as a barrier to precision medicine in gastroesophageal adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2018;8(1):37–48.
56. *Hanahan D, Weinberg RA.* Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
57. *Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC.* Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:924–35.
58. *Nowell PC.* The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194:23–8.
59. *Dexter DL, Calabresi P.* Intraneoplastic diversity. *Biochim Biophys Acta.* 1982;695:97–112.
60. *Marusyk A, Polyak K.* Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1805:105–17.

61. *Davis A, Gao R, Navin N.* Tumor evolution: Linear, branching, neutral or punctuated? *Biochim Biophys Acta.* 2017;1867(2):151–61.
62. *Swanton C.* Intratumor Heterogeneity: Evolution through space and time. *Cancer Res.* 2012;72(19):4875–83.
63. *Gerlinger M, Swanton C.* How darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer.* 2010;103:1139–43.
64. *Tarabichi M, Salcedo A, Deshwar AG, Wintersinger J, Wedge DC, Loo PV, Quaid DM, Boutros PC.* A practical guide to cancer subclonal reconstruction from DNA sequencing. *Nat Methods.* 2021;18(2):144–55.
65. *Williams MJ, Werner B, Heide T, Curtis C, Barnes CP, Sottoriva A, Graham TA.* Quantification of subclonal selection in cancer from bulk sequencing data. *Nat Genet.* 2018;50:895–903.
66. *Ye P, Zhang M, Fan S, Zhang T, Fu H, Su X, Gavine PR, Liu Q, Yin X.* Intra-tumoral heterogeneity of HER2, FGFR2, cMET and ATM in gastric cancer: Optimizing personalized healthcare through innovative pathological and statistical analysis. *PLoS One.* 2015;10(11):1–11.
67. *Warneke VS, Behrens HM, Böger C, Becker T, Lordick F, Röcken C, Ebert MPA.* Her2/neu testing in gastric cancer: Evaluating the risk of sampling errors. *Ann Oncol.* 2013;24(3):725–33.
68. *Stahl P, Seeschaaf C, Lebok P, Kutup A, Bockhorn M, Izbicki JR, Bokemeyer C, Simon R, Sauter G, Marx AH.* Heterogeneity of amplification of HER2, EGFR, CCND1 and MYC in gastric cancer. *BMC Gastroenterol.* 2015;15(7):1–13.
69. *Böger C, Krüger S, Behrens HM, Bock S, Haag J, Kalthoff H, Röcken C.* Epstein-Barr virus-associated gastric cancer reveals intratumoral heterogeneity of PIK3CA mutations. *Ann Oncol.* 2017;28:1005–14.
70. *Böger C, Behrens HM, Röcken C.* Ki67 - An unsuitable marker of gastric cancer prognosis unmasks intratumoral heterogeneity. *J Surg Oncol.* 2016;113:46–54.
71. *Tober JM, Halske C, Behrens H, Krüger S, Röcken C.* Intratumoral heterogeneity and loss of ARID1A expression in gastric cancer correlates with increased PD-L1 expression in Western patients. *Hum Pathol.* 2019;94:98–109.
72. *Metzger ML, Behrens HM, Böger C, Haag J, Krüger S, Röcken C.* MET in gastric cancer - discarding a 10% cutoff rule. *Histopathology.* 2016;68:241–53.

73. *Mathiak M, Warneke VS, Behrens HM, Haag J, Böger C, Krüger S, Röcken C.* Clinicopathologic characteristics of microsatellite instable gastric carcinomas revisited: Urgent need for standardization. *Appl Immunohistochem Mol Morph.* 2017;25:12–24.
74. *Coati I, Lotz G, Fanelli GN, Brignola S, Lanza C, Cappelleso R, Pellino A, Pucciarelli S, Spolverato G, Guzzardo V, Munari G, Zaninotto G, Scarpa M, Mastracci L, Farinati F, Realdon S, Pilati P, Lonardi S, Valeri N, Rugge M, Kiss A, Loupakis F, Fassan M.* Claudin-18 expression in oesophagogastric adenocarcinomas: a tissue microarray study of 523 molecularly profiled cases. *Br J Cancer.* 2019;121:257–63.
75. *Rehkaemper J, Korenkov M, Quaas A, Rueschoff J, Pamuk A, Zander T, Hillmer AM, Buettner R, Hoelscher AH, Bruns CJ, Loeser H, Alakus H, Schoemig-Markiefka B.* Amplification of KRAS and its heterogeneity in non-Asian gastric adenocarcinomas. *BMC Cancer.* 2020;20(587):1–8.
76. *Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H.* Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983;31:13–20.
77. *Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AL, van Driel R, Brakenhoff GJ, Ramaekers FCS.* Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci.* 1989;92:123–30.
78. *Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, Beck JL, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FCS.* Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci.* 1989;92:531–40.
79. *Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P.* Proliferation markers and survival in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *The Breast.* 2008;17:323–34.
80. *Van Velthuysen MLF, Groen EJ, Van Der Noort V, Van De Pol A, Tesselaar MET, Korse CM.* Grading of neuroendocrine neoplasms: Mitoses and Ki-67 are both essential. *Neuroendocrinology.* 2014;100:221–7.
81. *He X, Chen Z, Fu T, Jin X, Yu T, Liang Y, Zhao X, Huang L.* Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: Evidence from a systematic meta-analysis. *BMC Cancer.* 2014;14(153):1–13.
82. *Xiong D, Zeng C, Jiang L, Luo D, Chen G.* Ki-67 / MKI67 as a Predictive Biomarker for Clinical Outcome in Gastric Cancer Patients : an Updated Meta-analysis and Systematic

- Review involving 53 Studies and 7078 Patients. *J cancer*. 2019;10:5339–49.
83. *Lee HE, Kim MA, Lee BL, Kim WH*. Low Ki-67 proliferation index is an indicator of poor prognosis in gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2010;102:201–6.
84. *Wu A, Jia Y, Dong B, Tang L*. Apoptosis and KI 67 index correlate with preoperative chemotherapy efficacy and better predict the survival of gastric cancer patients with combined therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;73:885–93.
85. *Sun Z, Zhu R, Yang G, Li Y*. Neoadjuvant chemotherapy with FOLFOX4 Regimen to treat advanced gastric cancer improves survival without increasing adverse events : A retrospective cohort study from a chinese center. *Sci world J*. 2014;2014:1–10.
86. *Lindboe CF, Torp SH*. Comparison of Ki-67 equivalent antibodies. *J Clin Pathol*. 2002;55:467–71.
87. *Scholzen T, Gerdes J*. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182:311–22.
88. *Polley MYC, Leung SCY, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, Viale G, Zabaglo LA, Penault-Llorca F, Bartlett JMS, Gown AM, Symmans WF, Piper T, Mehl E, Enos RA, Hayes DF, Dowsett M, Nielson TO*. An international ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(24):1897–906.
89. *Polley MYC, Leung SCY, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, Zabaglo LA, Bartlett JMS, McShane LM, Enos RA, Badve SS, Bane AL, Borgquist S, Fineberg S, Lin MG, Gown AM, Grabau D, Gutierrez C, Hugh JC, Moriya T, Ohi Y, Osborne CK, Piper T, Porter PL, Sakatani T, Salgado R, Starczynski J, Laenkholm AV, Viale G, Dowsett M, Hayes DF, Nielson TO*. An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Mod Pathol*. 2015;28:778–86.
90. *Ramires M, David L, Leitão D, Seixas M, Sansonetty F, Sobrinho-Simões M*. Ki67 labelling index in gastric carcinomas. An immunohistochemical study using double staining for the evaluation of the proliferative activity of diffuse-type carcinomas. *J Pathol*. 1997;182:62–7.
91. *Amrani HHJ, Marchoudi N, Sadaoui I, Mahfoud W, Elgnaoui N, Haddad F, Fechtali T, Benomar H*. Ki-67 expression in gastric cancer and correlation with clinico-pathological characteristics. *Int J Sci Res Publ*. 2014;4(6):6–9.
92. *Müller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G, Gabbert HE*. Immunohistochemical study on the prognostic value of MIB-1 in gastric carcinoma. *Br J Cancer*. 1996;74:759–65.
93. *Mandard A -M, Dalibard F, Mandard J -C, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot J -F,*

- Roussel A, Jacob JH, Segol P, Samama G, Ollivier JM, Bonvalot S, Gignoux M.* Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer.* 1994;73(11):2680–6.
94. *Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, Füzesi L, Klimpfänger M, Fietkau R, Liersch T, Hohenberger W, Raab R, Sauer R, Wittekind C.* Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(34):8688-96.
95. *Becker K, Mueller JD, Schulmacher C, Ott K, Fink U, Busch R, Böttcher K, Siewert JR, Höfler H.* Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer.* 2003;98(7):1521–30.
96. *Becker K, Langer R, Reim D, Novotny A, Meyer Zum Buschenfelde C, Engel J, Friess H, Höfler H.* Significance of histopathological tumor regression after neoadjuvant chemotherapy in gastric adenocarcinomas: A summary of 480 cases. *Ann Surg.* 2011;253(5):934–9.
97. *Hayashi M, Fujita T, Matsushita H.* Prognostic value of tumor regression grade following the administration of neoadjuvant chemotherapy as treatment for gastric/gastroesophageal adenocarcinoma: A meta-analysis of 14 published studies. *Eur J Surg Oncol.* 2021;47(8):1996–2003.
98. *Schmidt T, Sicic L, Blank S, Becker K, Weichert W, Bruckner T, Parakonthun T, Langer R, Büchler MW, Siewert JR, Lordick F, Ott K.* Prognostic value of histopathological regression in 850 neoadjuvantly treated oesophagogastric adenocarcinomas. *Br J Cancer.* 2014;110:1712–20.
99. *Zhu Y, Sun Y, Hu S, Jiang Y, Yue J, Xue X, Yang L, Xue L.* Comparison of five tumor regression grading systems for gastric adenocarcinoma after neoadjuvant chemotherapy: A retrospective study of 192 cases from National Cancer Center in China. *BMC Gastroenterol.* 2017;17(41):1–18.
100. *Tong Y, Zhu Y, Zhao Y, Shan Z, Liu D, Zhang J.* Evaluation and comparison of predictive value of tumor regression grades according to mandard and becker in locally advanced gastric adenocarcinoma. *Cancer Res Treat.* 2021;53:112–22.
101. *Blackham AU, Greenleaf E, Yamamoto M, Hollenbeak C, Gusani N, Coppola D, Pimiento JM, Wong J.* Tumor regression grade in gastric cancer: Predictors and impact on outcome. *J Surg Oncol.* 2016;114:434–9.
102. *Liu ZN, Wang YK, Zhang L, Jia YN, Fei S, Ying XJ, Zhang Y, Li SX, Sun Y, Li ZY, Ji JF.*

- Comparison of tumor regression grading systems for locally advanced gastric adenocarcinoma after neoadjuvant chemotherapy. *World J Gastrointest Oncol.* 2021;13:2161–79.
103. *Chetty R, Gill P, Govender D, Bateman A, Chang HJ, Deshpande V, Driman D, Gomez M, Greywoode G, Jaynes E, Lee CS, Locketz M, Rowsell C, Rullier A, Serra S, Shepherd N, Szentgyorgyi E, Vajpeyi R, Wang LM, Bateman A.* International study group on rectal cancer regression grading: Interobserver variability with commonly used regression grading systems. *Hum Pathol.* 2012;43:1917–23.
104. *Marin JJG, Perez-silva L, Macias RIR, Asensio M, Peleteiro-vigil A, Sanchez-martin A, Cives-Losada C, Sanchon-Sanchez P, De Blas BS, Herraes E, Briz O, Lozano E.* Molecular bases of mechanisms accounting for drug resistance in gastric adenocarcinoma. *Cancers (Basel).* 2020;12(2116):1–29.
105. *Reim D, Gertler R, Novotny A, Becker K, Meyer Zum Büschenfelde C, Ebert M, Dobritz M, Langer R, Höfler H, Friess H, Schumacher C.* Adenocarcinomas of the esophagogastric junction are more likely to respond to preoperative chemotherapy than distal gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012;19:2108–18.
106. *Lou S, Wang Y, Zhang J, Yin X, Zhang Y.* Patient-level DNA damage repair pathway profiles and anti-tumor immunity for gastric cancer. *Front Oncol.* 2022;12(806324):1–18.
107. *Wang Z, Chen J-Q, Liu J-L, Qin X-G, Huang Y.* Polymorphisms in ERCC1, GSTs, TS and MTHFR predict clinical outcomes of gastric cancer patients treated with platinum/5-Fu-based chemotherapy: a systematic review. *BMC Gastroenterol.* 2012;12(137):1–13.
108. *World Medical Association.* World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2015;310(20):2191–4.
109. *Behrens HM, Warneke VS, Böger C, Klapper W, Mathiak M, Oschlies I, Garbrecht N, Jüttner E, Rudolph U, Stuhlmann-Laeisz C, Trick D, Röcken C, Hufnagl P.* Reproducibility of Her2/neu scoring in gastric cancer and assessment of the 10% cut-off rule. *Cancer Med.* 2014;4(2):235–44.
110. *Masson CLP.* Some histological methods; trichrome stainings and their preliminary technique. *J Tech Methods.* 1983;12:75–90.
111. *Fisher RA.* On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of p. *J R Stat Soc.* 1922;85(1):87–94.

112. *Kendall MG*. A new measure of rank correlation. *Biometrika*. 1938;30:81–93.
113. *Pearson K*. Mathematical contributions to the theory of evolution III. Regression, heredity, and panmixia. *Philos Trans R Soc L Ser B Biol Sci*. 1895;187:253–317.
114. *Mann HB, Whitney DR*. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Stat*. 1947;18(1):50–60.
115. *Kaplan EL, Meier P*. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53(282):457–81.
116. *Peto R, Peto J*. Asymptotically efficient rank invariant test. *J R Stat Soc Ser A*. 1972;135(2):185–207.
117. *Simes RJ*. An improved bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika*. 1986;73(3):751–4.
118. *Kock am Brink M, Dunst LS, Behrens H-M, Krüger S, Becker T, Röcken C*. Intratumoral heterogeneity affects tumor regression and Ki67 proliferation index in perioperatively treated gastric carcinoma. *Br J Cancer*. 2023;128(2):375–86.
119. *Grillo F, Campora M, Pigozzi S, Bonadio S, Valle L, Ferro J, Paudice M, Dose B, Mastracci L*. Methods for restoration of ki67 antigenicity in aged paraffin tissue blocks. *Histochem Cell Biol*. 2021;156(2):183–90.
120. *Arciero CA*. Ki-67 proliferation index and gastric cancer: Answers or more questions. *J Surg Oncol*. 2010;102(3):199–200.
121. *Okudela K, Woo T, Saigusa Y, Arai H, Matsumura M, Mitsui H, Sugiyama M, Sekiya M, Ishikawa Y, Oshiro H, Kameda Y, Ohashi K*. A method to obtain reproducible Ki-67 indices in lung adenocarcinoma. *Histopathology*. 2021;78(3):414–23.
122. *Ekholm M, Beglerbegovic S, Grabau D, Lövgren K, Malmström P, Hartman L, Fernö M*. Immunohistochemical assessment of Ki67 with antibodies SP6 and MIB1 in primary breast cancer: A comparison of prognostic value and reproducibility. *Histopathology*. 2014;65(2):252–60.
123. *Zabaglo L, Salter J, Anderson H, Quinn E, Hills M, Detre S, A'Hern R, Dowsett M*. Comparative validation of the SP6 antibody to Ki67 in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2010;63(9):800–4.
124. *Seo SH, Kim KH, Oh SH, Choi Y, Ahn KJ, Lee JY, Lee SM, Park J, Kim WG*. Ki-67 labeling index as a prognostic marker in advanced stomach cancer. *Ann Surg Treat Res*. 2019;96(1):27–33.

125. *Imano M, Itoh T, Satou T, Sogo Y, Hirai H, Kato H, Yasuda A, Peng YF.* Prospective randomized trial of short-term neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2010;36:963–8.
126. *Ott K, Herrmann K, Schuster T, Langer R, Becker K, Wieder HA, Wester HJ, Siewert JR, Zum Büschenfelde CM, Buck AK, Wilhelm D, Ebert MPA, Peschel C, Schwaiger M, Lordick F, Krause BJ.* Molecular imaging of proliferation and glucose utilization: Utility for monitoring response and prognosis after neoadjuvant therapy in locally advanced gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(12):3316–23.
127. *Cai L, Yan K, Bu H, Yue M, Dong P, Wang X, Li L, Tian K, Shen H, Zhang J, Shang J, Niu S, Han D, Ren C, Huang J, Han X, Yao J, Liu Y.* Improving Ki67 assessment concordance by the use of an artificial intelligence-empowered microscope: a multi-institutional ring study. *Histopathology.* 2021;79(4):544–55.
128. *Li S, Li B, Wang J, Zhang D, Liu Z, Zhang Z, Zhang W, Wang Y, Bai D, Guan J, Zhang Y.* Identification of sensitivity predictors of neoadjuvant chemotherapy for the treatment of adenocarcinoma of gastroesophageal junction. *Oncol Res.* 2017;25:93–7.
129. *Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, Ritchey JK, Young MA, Lamprecht T, McLellan MD, McMichael JF, Wallis JW, Charles L, Shen D, Harris CC, Dooling DJ, Fulton RS, Fulton LL, Chen K, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, Magrini VJ, Cook L, McGrath SD, Vickery TL, Wendli MC, Heath S, Watson MA, Link DC, Thomasson MH, Shannon WD, Payton JE, Kulkarni S, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, Mardis ER, Wilson RK, DiPersio JF.* Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2012;481:506–10.
130. *Sugimachi K, Sakimura S, Kuramitsu S, Hirata H, Niida A, Iguchi T, Eguchi H, Masuda T, Morita M, Toh Y, Maehara Y, Suzuki Y, Mimori K.* Serial mutational tracking in surgically resected locally advanced colorectal cancer with neoadjuvant chemotherapy. *Br J Cancer.* 2018;119:419–23.
131. *Almendro V, Cheng YK, Randles A, Itzkovitz S, Marusyk A, Ametller E, Gonzalez-Farre Xavier, Munoz M, Russnes HG, Helland A, Rye IH, Borresen-Dale AL, Maruyama R, Von Oudenaarden A, Dowsett M, Jones RL, Reis-Filho J, Gascon P, Gönen M, Michor F, Polyak K.* Inference of tumor evolution during chemotherapy by computational modeling and in situ analysis of genetic and phenotypic cellular diversity. *Cell Rep.* 2014;6:514–27.
132. *Kreso A, O'Brien CA, Van Galen P, Gan OI, Notta F, Brown AMK, Ng K, Ma J,*

- Wienholds, Dunant C, Pollett A, Gallinger S, McPherson J, Mullighan CG, Shibata D, Dick JE.* Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science.* 2013;339:543–8.
133. *Wong SS, Kim KM, Ting JC, Yu K, Fu J, Liu S, Cristescu R, Nebozhyn M, Gong L, Yue YG, Wang J, Ronghua C, Loboda A, Hardwick J, Liu X, Dai H, Jin JG, Ye XS, Kang SY, Do IG, Park JO, Sohn TS, Reinhard C, Lee J, Kim S, Aggarwal A.* Genomic landscape and genetic heterogeneity in gastric adenocarcinoma revealed by whole-genome sequencing. *Nat Commun.* 2014;5(5477):1–12.
134. *Pan X, Ji X, Zhang R, Zhou Z, Zhong Y, Peng W, Sun N, Xu X, Xia L, Li P, Lu J, Tu J.* Landscape of somatic mutations in gastric cancer assessed using next-generation sequencing analysis. *Oncol Lett.* 2018;16:4863–70.
135. *Lane DP.* p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992;358:15–6.
136. *Silva ANS, Coffa J, Menon V, Hewitt LC, Das K, Miyagi Y, Bottomley D, Slaney H, Aoyama T, Müller W, Arai T, Tan IB, Deng N, Chan XB, Tan P, Tsuburaya A, Sakamaki K, Hayden JD, Yoshikawa T, Zondervan I, Savola S, Grabsch HI.* Frequent coamplification of receptor tyrosine kinase and downstream signaling genes in japanese primary gastric cancer and conversion in matched lymph node metastasis. *Ann Surg.* 2018;267:114-21.
137. *Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ, Akhavanfard S, Cahill DP, Aldape KD, Betensky RA, Louis DN, Iafrate AJ.* Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell.* 2011;20(6):810–7.
138. *Luo S, Zhang Y, Jia Y, Zhang X.* Comprehensive analysis of intratumoural heterogeneity of somatic copy number alterations in diffuse glioma reveals clonality-dependent prognostic patterns. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2022;48(6):1–13.
139. *Junttila MR, De Sauvage FJ.* Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature.* 2013;501:346–54.

7 Anhang

7.1 Anhangstabelle

Anhangstabelle 1: Heterogenität von Ki-67 in Abhängigkeit der zugeführten Therapie. Dargestellt ist der Zusammenhang zwischen zugeführter neoadjuvanter Therapie (Chemotherapie oder Radiochemotherapie) und der Heterogenität von Ki-67, die durch die Differenz (KiD) des maximalen Ki-67 *high* (KiH) Proliferationsindex (PI) zum minimalem Ki-67 *low* PI (KiL) abgebildet ist. Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu ermitteln [114].

		Gültig (%)	KiD von Max KiH/Min KiL		
			<i>gültig</i> mittlerer Rang	<i>p-Wert</i>	
Neoadjuvante Therapie	n	p⁽¹⁾	96	96	0,919
Chemotherapie			87 (90,6)	48,60	
Radiochemotherapie			9 (9,4)	47,56	

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Christoph Röcken für die Bereitstellung des Themas, der Räumlichkeiten und die persönliche Betreuung. Die ständige Verfügbarkeit, die Zuverlässigkeit in der Kommunikation, die hervorragende Zusammenarbeit sowie die kritischen Fragen und Diskussionen hatten für dieses Projekt einen hohen Stellenwert.

Ein besonderer Dank gebührt außerdem Herrn Doktor rer. medic. Hans-Michael Behrens. Mit seiner äußerst herzlichen Art stand er mir in unzähligen Stunden bei der Lösung der aufwendigen IT-Probleme, der Statistik des Projektes und jeglichen weiteren Fragen zur Seite. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenfalls danke ich Frau Sandra Krüger und Frau Maren Dirks für die Hilfe bei den Labortätigkeiten und der Organisation des Projekts.

Frau Laura Dunst gilt mein Dank für die Bereitstellung der Ergebnisse ihrer Promotionsarbeit und die kooperative Arbeit bei der Veröffentlichung.

Zum Schluss möchte ich besonders bei meiner Familie, meinen Freunden und meiner Partnerin Mara Brunßen bedanken, die mich über die Jahre hinweg begleitet haben und stets ein offenes Ohr für meine Fragen und Sorgen hatten.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Betreuers/meiner Betreuerin und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat, weder ganz noch in Teilen.

Datum, Unterschrift Doktorand

10 Veröffentlichungen

19. Januar 2023

Intratumoral heterogeneity affects tumor regression and Ki67 proliferation index in perioperatively treated gastric carcinoma.

Kock am Brink M, Dunst LS, Behrens HM, Krüger S, Becker T, Röcken C. [Br J Cancer. 2023 Jan;128(2):375-386. Doi: 10.1038/s41416-022-02047-3]