Aus der Abteilung Gastroenteropathologie (Prof. Dr. med. L. Füzesi) im Zentrum Pathologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Differenzielle Regulation und prognostische Bedeutung von zellzyklusassoziierten Regulatoren der G1- und G2-Phase in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation in Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST)

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

vorgelegt von

Judith Cortis aus

aus

Eschwege

Göttingen 2010

## Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- 1. Berichterstatter: PD Dr. med. F. Haller
- 2.Berichterstatter/in: PD Dr. med. Armbrust
- 3. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: Montag, den 27. September 2010

# Inhaltsverzeichnis

# Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitu	ng	1
	1.1 Pat	hogenese und Epidemiologie von GIST	1
	1.1.1	Historischer Überblick	1
	1.1.2	Epidemiologie	2
	1.1.3	Pathologie und klinische Symptome	3
	1.1.4	Pathogenese	4
	1.1.5	Immunhistochemische Marker	6
	1.2 Kla	ssische Prognosefaktoren	7
	1.2.1	Lokalisation	7
	1.2.2	Morphologie	7
	1.2.3	Tumorgröße	
	1.2.4	Mitosenanzahl	
	1.2.5	Mutationsstatus	9
	1.2.6	Aktuelle Risikoklassifikation	11
	1.3 Re	gulation des Zellzyklus	12
	1.3.1	Frühe Proliferation	14
	1.3.2	Späte Proliferation	15
	1.3.3	Myc	16
	131	E2E1- und c-Myc-induzierte Apoptose	
	1.3.4		
	1.4 Zie	lsetzung	
2	1.4 Zie Materia	I und Methoden	
2	1.4 Zie Materia 2.1 Uni	lsetzung I und Methoden	
2	1.4 Zie Materia 2.1 Uni 2.2 Tis	Isetzung I und Methoden rersuchungsmaterial sue Mikroarrays	
2	1.4 Zie Materia 2.1 Uni 2.2 Tis 2.3 Imr	Isetzung I und Methoden rersuchungsmaterial sue Mikroarrays	
2	1.4 Zie. Materia 2.1 Uni 2.2 Tis. 2.3 Imr 2.3.1	Isetzung ersuchungsmaterial sue Mikroarrays nunhistochemie Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung	
2	1.4 Zie Materia 2.1 Uni 2.2 Tis 2.3 Imr 2.3.1 2.3.2	Isetzung I und Methoden Fersuchungsmaterial sue Mikroarrays nunhistochemie Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung Immunhistochemische Färbung	
2	1.4 Zie. Materia 2.1 Uni 2.2 Tis. 2.3 Imr 2.3.1 2.3.2 2.4 Qui	Isetzung I und Methoden Fersuchungsmaterial sue Mikroarrays nunhistochemie Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung Immunhistochemische Färbung	
2	1.4 Zie. <b>Materia</b> 2.1 Uni 2.2 Tis. 2.3 Imr 2.3.1 2.3.2 2.4 Qui 2.5 Sta	Isetzung I und Methoden Fersuchungsmaterial sue Mikroarrays nunhistochemie Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung Immunhistochemische Färbung antitative Auswertung	
2	1.4       Zie         Materia         2.1       Uni         2.2       Tis         2.3       Imr         2.3.1       2.3.2         2.4       Qui         2.5       Stat         2.6       Real	Isetzung I und Methoden Fersuchungsmaterial sue Mikroarrays nunhistochemie Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung Immunhistochemische Färbung antitative Auswertung tistische Auswertung	
2	<ol> <li>1.4 Zie.</li> <li>Materia</li> <li>2.1 Uni</li> <li>2.2 Tis.</li> <li>2.3 Imr</li> <li>2.3.1</li> <li>2.3.2</li> <li>2.4 Qui</li> <li>2.5 Sta</li> <li>2.6 Rea</li> <li>Ergebn</li> </ol>	I und Methoden I und Methoden Fersuchungsmaterial sue Mikroarrays nunhistochemie Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung Immunhistochemische Färbung immunhistochemische Färbung antitative Auswertung tistische Auswertung agenzien und Geräte	
2	<ol> <li>1.4 Zie.</li> <li>Materia</li> <li>2.1 Uni</li> <li>2.2 Tis.</li> <li>2.3 Imr</li> <li>2.3.1</li> <li>2.3.2</li> <li>2.4 Qui</li> <li>2.5 Sta</li> <li>2.6 Rea</li> <li>Ergebn</li> <li>2.1 Doc</li> </ol>	I und Methoden I und Methoden rersuchungsmaterial sue Mikroarrays nunhistochemie Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung Immunhistochemische Färbung immunhistochemische Färbung antitative Auswertung tistische Auswertung agenzien und Geräte isse	
2	1.4       Zie.         Materia         2.1       Uni         2.2       Tis.         2.3       Imr         2.3.1       2.3.2         2.4       Qui         2.5       Sta         2.6       Rea         Ergebn       3.1       Dai         3.1       1	I und Methoden I und Methoden rersuchungsmaterial sue Mikroarrays nunhistochemie Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung Immunhistochemische Färbung immunhistochemische Färbung antitative Auswertung antitative Auswertung agenzien und Geräte isse rstellung des untersuchten Kollektivs	
2	1.4       Zie.         Materia         2.1       Uni         2.2       Tis.         2.3       Imr         2.3.1       2.3.2         2.4       Qui         2.5       Sta         2.6       Rea         Ergebn       3.1         3.1.1       3.1.2	I und Methoden I und Methoden Fersuchungsmaterial sue Mikroarrays nunhistochemie Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung Immunhistochemische Färbung immunhistochemische Färbung antitative Auswertung antitative Auswertung fistische Auswertung	
2	1.4       Zie.         Materia         2.1       Uni         2.2       Tis.         2.3       Imr         2.3.1       2.3.2         2.4       Qual         2.5       Sta         2.6       Rea         S.1       Dai         3.1.1       3.1.2         3.13       1.3	I und Methoden I und Methoden ersuchungsmaterial	
3	<ol> <li>1.4 Zie.</li> <li>Materia</li> <li>2.1 Uni</li> <li>2.2 Tis.</li> <li>2.3 Imr</li> <li>2.3.1</li> <li>2.3.2</li> <li>2.4 Qui</li> <li>2.5 Sta</li> <li>2.6 Rea</li> <li>Ergebn</li> <li>3.1 Dai</li> <li>3.1.1</li> <li>3.1.2</li> <li>3.1.3</li> <li>3.1.4</li> </ol>	I und Methoden I und Methoden ersuchungsmaterial sue Mikroarrays nunhistochemie Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung Immunhistochemische Färbung inmunhistochemische Färbung antitative Auswertung antitative Auswertung tistische Auswertung agenzien und Geräte isse Geschlechterverhältnis und Altersverteilung der Patienten Lokalisation Morphologie Tumorgröße	

3.1.5	Mitosenanzahl pro 50HPFs	31
3.1.6	Mutationsstatus	31
3.1.7	Risikoklassifikation	32
3.1.7.1	I Klassifikation nach Fletcher	32
3.1.7.2	2 Klassifikation nach Miettinen (2006)	32
3.1.8	Follow up	32
3.2 Vei	rgleich der klinisch- pathologischen Parameter untereinander	33
3.2.1	Lokalisation	33
3.2.1.1	I Im Vergleich zur Morphologie	33
3.2.1.2	2 Im Vergleich zur Tumorgröße	33
3.2.1.3	3 Im Vergleich zur Mitosenanzahl	34
3.2.1.4	1 Im Vergleich zum Mutationsstatus	35
3.2.2	Mutation	35
3.2.2.1	I Im Vergleich zur Morphologie	35
3.2.2.2	2 Im Vergleich zur Tumorgröße	36
3.2.2.3	3 Im Vergleich zur Mitosenanzahl	36
3.2.3	Morphologie	37
3.2.3.1	I Im Vergleich zur Tumorgröße	37
3.2.3.2	2 Im Vergleich zur Mitosenanzahl	37
3.3 Dai	rstellung der Expression der untersuchten Proteine	37
3.3.1	Im Vergleich zur Lokalisation	37
3.3.2	Im Vergleich zur Morphologie	39
3.3.3	Im Vergleich zur Tumorgröße	41
3.3.4	Im Vergleich zur Mitosenanzahl	42
3.3.5	Im Vergleich zur Mutation	43
3.3.6	Im Vergleich zur Mutation unter Berücksichtigung der Lokalisation	45
3.3.7	Im Vergleich zur Mutation unter Berücksichtigung der Morphologie	48
3.4 Dai	rstellung des klinischen Verlaufs in Zusammenhang mit den klinisch-	
pathologis	schen Parametern	50
3.4.1	Lokalisation und klinischer Verlauf	50
3.4.2	Morphologie und klinischer Verlauf	50
3.4.3	Tumorgröße und klinischer Verlauf	51
3.4.4	Mitosenanzahl und klinischer Verlauf	52
3.4.5	Mutationsstatus und klinischer Verlauf	52
3.4.6	Mutationsstatus unter Berücksichtigung der Lokalisation und klinischer	
	Verlauf	53
3.4.7	Mutationsstatus unter Berücksichtigung der Morphologie und klinischer	
	Verlauf	54
3.5 Pro	ognostische Bedeutung der proliferationsassozijerten Antikörper	55
3.5.1	E2F1 und klinischer Verlauf	55
3.5.1.1	Lokalisationsspezifische Unterschiede bei E2F1	
3.5.2	Cyclin A2 und klinischer Verlauf	58
3.5.3	Cyclin B1 und klinischer Verlauf	59
3.5.4	Cyclin D1 und klinischer Verlauf	59
	•	

	3.5.5	Myc und klinischer Verlauf	
4	Diskus	ssion	61
	4.1 Be	edeutung der klinisch-pathologischen Parameter	61
	4.1.1	Lokalisation	61
	4.1.2	Mutationsstatus	
	4.1.3	Morphologie	
	4.1.4	Tumorgröße	
	4.1.5	Mitosenanzahl	
	4.2 Be	edeutung der Expression der untersuchten Proteine	
	4.2.1	E2F1	
	4.2.2	Cyclin D1	71
	4.2.3	Cyclin A2	73
	4.2.4	Cyclin B1	74
	4.2.5	Myc	75
5	Zusam	nmenfassung	77
6	Abbild	lungs- und Tabellenverzeichnis	
	6.1 Al	bbildungen	
	6.2 Ta	abellen	
7	Literat	urverzeichnis	

# Abkürzungsverzeichnis

AB2	Biotinylated Secondary Antibodies
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AP	Alkaline Phosphatase
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
bi-dest.	Zweifach destilliert
BSA	Bovines Serum Albumin
CCNA2	Cyclin A2
CCNB1	Cyclin B1
CCND1	Cyclin D1
Cdc2	Cell division cycle 2
Cdc25A	Cell division cycle 25 homolog A
CDK	Cyclin-dependent kinase
CH₃COOH	Essigsäure
D	Dickdarm
DD	Dünndarm
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ED	Extrazelluläre Domäne
E2F1	E2F transcription factor 1
EP-GEM	Epitheloid-gemischt
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
G-Phase	Engl. <i>gap,</i> Lücken-Phase
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPF	High-Power-Field
ICC	Interstitielle Cajal-Zellen
JMD	Juxtamembranäre Domäne
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase
КІТ	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
LDH-A	Lactate dehydrogenase A
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin

Μ	Magen
Mdm2	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)
M-Phase	Mitosephase, Kernteilungsphase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NF-ĸB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
PDGFRA	platelet-derived-growth-factor receptor alpha
PP1	Protein phosphatase 1
RB	Retinoblastoma
RIP	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
S-100	S100 calcium binding protein
SAPK	Stress-activated phospho-kinases
SCF	Stammzellfaktor
SMA	Smooth muscle antigen
SP	Spindelzellig
S-Phase	Synthesephase
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Stdabw.	Standardabweichung
TK 1	Tyrosin-Kinase-Domäne 1
TK 2	Tyrosin-Kinase-Domäne 2
TMA	Tissue-Microarray
TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

# 1 Einleitung

## 1.1 Pathogenese und Epidemiologie von GIST

#### 1.1.1 Historischer Überblick

Der gastrointestinale Stromatumor (GIST) gehört zur Gruppe der mesenchymalen Tumoren des Gastrointestinaltraktes. Er ist erst seit wenigen Jahren als eigene histologische Entität definiert und diagnostisch sicher von anderen mesenchymalen Stromatumoren abzugrenzen (Corless et al. 2004; Miettinen und Lasota 2001). Noch in den dreißiger bis fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts wurden GIST auf der Basis lichtmikroskopischer Beschreibungen als glattmuskuläre Neoplasien angesehen und oft als Leiomyome, Leiomyosarkome oder Leiomyoblastome klassifiziert (Stout 1962). In den späten sechziger und frühen siebziger Jahren zeigten elektronenmikroskopische Studien, dass bei einigen dieser Tumoren neurogene Merkmale ausgesprägt waren, welche bei ausschließlich myogenen Tumoren nicht vorkommen (Welsh und Meyer 1969). Diese elektronenmikroskopisch gefundenen Hinweise wurden in den achtziger Jahren durch Verfahren mit immunhistochemischen Antikörpern bestätigt. Es zeigte sich, dass myogene Marker (Aktin, Desmin) bei diesen Tumoren weitaus variabler ausgeprägt waren als bei Leiomyomen oder Leiomyosarkomen und dass einige dieser Tumoren zudem positiv für neurogene Marker (S-100) waren, was bei rein glattmuskulären Tumoren nicht der Fall ist (Miettinen et al. 2000a; Saul et al. 1987).

Die Ergebnisse dieser Studien ließen darauf schließen, dass es sich hierbei um eine eigenständige Entität handelt, die von den rein neurogenen oder myogenen Tumoren abzugrenzen ist. So wurde im Jahr 1983 von Mazur und Clark (Mazur und Clark 1983) der Begriff "Stromatumor" eingeführt. 1994 wurde durch weitere immunhistochemische Untersuchungen von van de Rijn et al. und Monihan et al. (Monihan et al. 1994; van de Rijn et al. 1994) herausgefunden, dass eine große Anzahl gastrointestinaler mesenchymaler Tumore das Antigen CD34 exprimiert, was ein Jahr später durch Miettinen et al. (Miettinen et al. 1995) in weiteren Studien bestätigt wurde. Im Jahr 1998 konnte schließlich gezeigt

werden, dass gastrointestinale mesenchymale Tumoren zudem CD117 exprimieren, eine durch das Protoonkogen *KIT* codierte Rezeptor-Tyrosin-Kinase (Hirota et al. 1998).

Diese Ergebnisse lenkten den Blick auf die interstitiellen Cajal-Zellen (ICC) als mögliche Ursprungszellen. ICC wurden im Jahr 1893 erstmal von Santiago Ramon y Cajal beschrieben (Haller 2008). Es handelt sich bei den ICC um ein komplexes Zellsystem, gelegen im Plexus myentericus der Darmwandmuskulatur, welches eine Vermittlungsfunktion zwischen den autonomen Nerven und den glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes einnimmt und als eine Art Schrittmacher fungiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl ICC als auch GIST jeweils positiv für das CD34-Antigen und für das CD117-Antigen sind (Hirota und Isozaki 2006; Hirota et al. 1998; Kindblom et al. 1998). Aufgrund der Tatsache, dass ICC die einzigen Zellen in der physiologischen Wandung des Gastrointestinaltraktes sind, die doppelt positiv für beide oben genannte Marker sind, liegt eine Entstehung von GIST aus ICC bzw. deren stammzellartigen Vorläuferzellen nahe (Robinson et al. 2000; Sircar et al. 1999).

#### 1.1.2 Epidemiologie

GIST zählen mit ca. 70% zu den häufigsten mesenchymalen Tumoren des Gastrointestinaltraktes, machen jedoch insgesamt nur weniger als 1% aller Tumoren des Gastrointestinaltraktes aus (Fletcher et al. 2002; Nilsson et al. 2005; Yamaguchi et al. 2004). Die jährliche Inzidenz beträgt 0,68 - 1,45 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Nilsson et al. 2005; Tran et al. 2005; Tryggvason et al. 2005). GIST können vom Kindesalter an bis ins hohe Erwachsenenalter auftreten; der Häufigkeitsgipfel der Patienten mit GIST liegt jedoch im mittleren Alter bei ca. 60 Jahren (Corless et al. 2004). Es gibt keine eindeutige Geschlechtsprävalenz, jedoch scheinen in manchen Studien maligne GIST etwas häufiger bei Männern vorzukommen (Miettinen und Lasota 2006).

GIST können vom Ösophagus bis zum Rektum im gesamten Gastrointestinaltrakt auftreten. Die häufigsten Lokalisationen sind in absteigender Reihenfolge Magen (60%), Jejunum und Ileum (30%), Duodenum (5%) und Colon/Rektum (< 5%). Nur wenige GIST (< 1%) sind im Ösophagus oder in der Appendix lokalisiert (Miettinen und Lasota 2003). Lokalisationen außerhalb des Gastrointestinaltraktes, wie z.B. im Omentum oder im Retroperitoneum, sind vereinzelt beschrieben worden. Etwa 20- 25% der GIST im Magen und 40- 50% der GIST im Dünndarm sind klinisch maligne (Miettinen und Lasota 2006).

Metastasen treten am häufigsten in der Leber und am zweithäufigsten als peritoneale Aussaat auf (DeMatteo et al. 2000; Nilsson et al. 2005). Knochen-, Lymphknoten- oder Lungenmetastasen sind relativ selten und häufig erst im fortgeschrittenen Tumorstadium zu beobachten. Da sich Metastasen auch noch nach 10 bis 15 Jahren nach bereits erfolgter primärer Resektion entwickeln können, ist ein langzeitliches klinisches Follow-up notwendig (Miettinen und Lasota 2006).

Neben den meisten Fällen sporadisch auftretender GIST können diese auch hereditär und im Rahmen von Syndromen vorkommen. So können zum Teil multiple GIST bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 beobachtet werden, aber auch im Rahmen der Carney-Trias (Carney 1979; Miettinen et al. 2006b). Schließlich sind auch familiäre Formen von GIST bekannt, bei denen Keimbahnmutationen ursächlich sind (Nishida et al. 1998).

#### 1.1.3 Pathologie und klinische Symptome

GIST zeigen ein breites klinisch-pathologisches Spektrum. Ihre Größe variiert zwischen <1 cm bis hin zu 35 cm; die mittlere Größe liegt bei ca. 5 cm. In den letzten Jahren wurden kleine GIST (<1 cm) vermehrt als Zufallsbefund bei endoskopischen oder chirurgischen Eingriffen entdeckt (Agaimy et al. 2008a; Agaimy et al. 2008b; Corless et al. 2002; Hasegawa et al. 2002).

Typischerweise findet sich GIST in der muskulären Wandung eines gastrointestinalen Hohlorgans. Der Tumor ist submukös gelegen, scharf begrenzt und wölbt sich verdrängend ins Lumen oder nach außen vor, wobei er die Mukosa bzw. Serosa vor sich her schiebt (Miettinen und Lasota 2003). Die Schleimhautbedeckung erscheint dabei häufig intakt, kann aber auch infolge lokaler Ischämie ulzerös aufgebrochen sein. GIST sind gewöhnlich solide Tumoren, können jedoch zentrale zystische Degenerationen, Hämorrhagien oder Nekrosen aufweisen (Rubin 2006). Ein echtes invasives Wachstum kann bei GIST nicht beobachtet werden, selten wachsen die Tumorzellen infiltrativ in die Mukosa oder in die Muskularis, was dann mit einer schlechten Prognose assoziiert ist.



Abb. 1.1.3-1: Die Abbildung zeigt ein Magenteilresektat mit einem nach innen gewachsenen 6,5 cm großen GIST mit darüber liegender intakter Schleimhaut (übernommen aus Haller 2008, S. 5).

Histologisch sind GIST sehr zellreich und zeigen ein spindelzelliges (70%), epitheloides (20%) oder gemischtes (< 10%) Wachstumsmuster (Fletcher et al. 2002; Miettinen und Lasota 2006). Zytomorphologisch erscheinen GIST relativ monomorph. Daher ist die Zytomorphologie auch nur bedingt für die Einschätzung der Dignität heranzuziehen.

Da bereits auch kleine, mitotisch wenig aktive Tumoren metastasieren können, kann beim GIST keine sichere Unterscheidung in benigne oder maligne Tumoren getroffen werden wie es z.B. bei Leiomyomen und Leiomyosarkomen möglich ist. Stattdessen wird bei GIST von einem "unsicheren Malignitätspotential" gesprochen und die Dignität anhand der Parameter Tumorgröße, Mitoserate und Lokalisation abgeschätzt (Fletcher et al. 2002; Miettinen et al. 2002; Miettinen und Lasota 2006).

Klinisch treten die Tumoren mit relativ unspezifischen Symptomen und oft erst im fortgeschrittenen Stadium in Erscheinung. Die Symptome variieren je nach Lokalisation und reichen von Dysphagie über obere bzw. untere GI-Blutung bis hin zur Darmperforation (Miettinen et al. 2000b; Miettinen und Lasota 2003; Miettinen und Lasota 2006; Ueyama et al. 1992).

#### 1.1.4 Pathogenese

In der Pathogenese des GIST spielen Mutationen in KIT- (CD117) oder PDGFRA-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen die Hauptrolle (Miettinen und Lasota 2006).

KIT und PDGFRA gehören zur Familie der Typ-III-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Das CD117-Antigen ist identisch mit der Typ-III-Rezeptor-Tyrosin-Kinase *v-kit Hardy-Zuckerman 4*  *feline sarcoma viral oncogene homolog* (KIT). Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind transmembranäre Proteine mit einer extrazellulären Domäne (ED), an die ein Ligand bindet, einem transmembranären Anteil, der die Selbstaktivierung hemmt (der sogenannten juxtamembranären Domäne (JMD)), und zwei Tyrosin-Kinase-Domänen (TK 1 und 2) (Roskoski 2005a) (Abbildung 1.1.4-1).



Abb. 1.1.4-1: Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau und die Struktur der Typ-III-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen KIT und PDGFRA. ED: Extrazelluläre Domäne; JMD: Juxtamembranäre Domäne; TK 1: Tyrosin-Kinase-Domäne 1; TK 2: Tyrosin-Kinase-Domäne 2 (Schema der Abbildung teilweise übernommen aus Miettinen und Lasota 2006, S. 1468).

Der Ligand für KIT ist der Stammzellfaktor (SCF) (Roskoski 2005a). Beim Erwachsenen werden KIT und SCF von hämatopoetischen Stammzellen, Mastzellen, dendritischen Zellen, Spermatozyten und ICC exprimiert (Rönnstrand 2004; Torihashi et al. 1999). Physiologischerweise führt die Bindung von zwei homodimerisierten SCF-Molekülen an zwei Wild-Typ-KIT-Proteine zu einer Dimerisierung der letztgenannten und in der Folge zur Autophosphorylisation und Aktivierung intrazellulärer Tyrosin-Kinase-Domänen. Diese wiederum vermitteln über Phosphorylierung die Aktivierung verschiedener nachgeschalteter Signalkaskaden und sorgen so für die Differenzierung, Proliferation und das Überleben der Zellen (Rönnstrand 2004). In GIST werden durch KIT und PDGFRA unter anderem ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), AKT (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) und die Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (*signal transducer and activator of transcription*) aktiviert (Roskoski 2005b), die nachfolgend die Expression weiterer proliferationsassoziierter Proteine induzieren.

Hirota et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass in GIST aktivierende Mutationen des *KIT*-Gens zu einer liganden-unabhängigen und somit dauerhaften Aktivierung der Signalkaskade führen. Diese unkontrollierte Signalweitergabe führt nachfolgend zu einer übermäßigen Zellproliferation, einem Rückgang der Apoptose und schließlich zur Neoplasie (Hirota et al. 1998).

In ca. 60-80% der GIST sind aktivierende Mutationen des *KIT*-Gens nachzuweisen. Ca. 5-15% der übrigen GIST weisen aktivierende Mutationen des *platelet derived growth factor receptors A* (PDGFRA) auf. PDGFRA gehört ebenso wie KIT zur Familie der Typ-III-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ist strukturell nahe verwandt zu KIT (Rubin 2006).

Seit 2001 steht der Tyrosin-Kinase-Inhibitor Imatinib (Glivec/STI-571, Novartis, Basel, Schweiz) in der Therapie des nicht-resezierbaren und metastasierten GIST zur Verfügung. Er hemmt die übermäßige Aktivierung des *KIT*-Gens und führt zu einer Blockade der Tumorzellproliferation und einer Reduktion der Tumormasse (Joensuu et al. 2001). Resistenzen auf Imatinib sind bereits bekannt und ursächlich womöglich durch eine zweite Mutation von *KIT* oder *PDGFRA* ausgelöst (Rubin 2006).

#### 1.1.5 Immunhistochemische Marker

Etwa 60-70% aller GIST sind positiv für das CD34-Antigen, welches in unreifen hämatopoetischen Stammzellen gebildet wird. Hier weisen vor allem ösophageale und rektale GIST die höchste Expression von CD34 (> 90%) auf. Ein signifikanter Unterschied in der Expression von CD34 zwischen benignen und malignen Tumoren konnte nicht gefunden werden (Miettinen et al. 2000a).

30-40% der GIST zeigen eine Positivität für SMA, das *smooth muscle antigen*. SMA ist typischerweise in normalen und neoplastischen glattmuskulären Zellen und in manchen Myofibroblasten exprimiert (Fletcher et al. 2002). Die Expression von SMA bei GIST verhält sich häufig reziprok zu der Expression von CD34 (Miettinen et al. 2000a).

Bis zu 10% der GIST sind positiv für das neurogene S100-Antigen und ca. 1-2% sind positiv für Desmin, ein Intermediärfilamentprotein, welches sowohl in glatter als auch in quergestreifter Muskulatur zu finden ist (Fletcher et al. 2002).

Negativ sind GIST hingegen für Neurofilamente und das Glial fibrillary Acidic Protein, ein astrozytenspezifisches Protein (Miettinen und Lasota 2006).

6

# 1.2 Klassische Prognosefaktoren

### 1.2.1 Lokalisation

Die anatomische Lokalisation des GIST zählt zu den klassischen Prognosefaktoren, da bereits sehr früh ein signifikant unterschiedlicher klinischer Verlauf in Abhängigkeit von der Lokalisation festgestellt werden konnte (Emory et al. 1999).

Grundsätzlich zeigen GIST aus dem Magen ein günstigeres klinisches Verhalten als GIST aus dem Dünn- oder Dickdarm gleicher Größe und gleicher mitotischer Aktivität, was in mehreren Studien dargestellt werden konnte (Miettinen und Lasota 2006; Miettinen et al. 2005; Miettinen et al. 2006a). GIST aus dem Ösophagus sind insgesamt relativ selten, zeigen jedoch bei Auftreten meist ein malignes Verhalten und beinhalten eine schlechte Prognose (Miettinen und Lasota 2001; Miettinen und Lasota 2003).

### 1.2.2 Morphologie

Die Morphologie zählt nicht zu den klassischen Prognosefaktoren, da insgesamt die Aussagekraft bezüglich der Dignität von GIST mittels morphologischer Kriterien stark eingeschränkt ist.

GIST sind histologisch sehr zellreich. Spindelzellige GIST bestehen typischerweise aus relativ uniformen eosinophilen Zellen, welche in kurzen Faszikeln oder Wirbeln angeordnet sind. Epitheloide GIST bestehen aus runden Zellen mit variablem eosinophilen oder klaren Zytoplasma und sind in Zellnestern oder -bögen angeordnet. GIST mit gemischter Morphologie können sowohl spindelzellige als auch epitheloide Anteile aufweisen und zum Teil einen abrupten Wechsel der Wachstumsmuster zeigen (Fletcher et al. 2002). Von einigen Autoren wurde eine epitheloidzellige Morphologie bei GIST aus dem Dünndarm mit einer ungünstigen Prognose in Verbindung gebracht (Miettinen und Lasota 2006).



Abb. 1.2.2-1: Die Abbildung zeigt einen GIST mit einem epitheloidzellartigen Wachstumsmuster (übernommen aus Miettinen und Lasota 2006, S. 1470).

#### 1.2.3 Tumorgröße

Die Tumorgröße zählt zu den wichtigsten und auch einfach zu bestimmenden Parametern. Die Größe eines GIST korreliert in den meisten Fällen mit seinem klinischen Verhalten, d.h., je größer der Tumor, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit für ein malignes Verhalten (DeMatteo et al. 2000; DeMatteo et al. 2008).

GIST mit einer Größe unter 2 cm sind in der Regel als benigne einzustufen und metastasieren sehr selten. GIST mit einer Größe über 10 cm hingegen sind häufig maligne. Bei Tumoren mit einer Größe zwischen >2 bis <10 cm kann das klinische Verhalten anhand der Tumorgröße allein nicht abgeschätzt werden und es sollten zusätzliche Prognosefaktoren, wie z.B. die Mitoserate, herangezogen werden (Miettinen und Lasota 2006).

Die Bedeutung der Tumorgröße ist auch lokalisationsabhängig. Besonders GIST aus dem Magen neigen dazu – auch bei einer Größe über 5 cm - weniger aggressiv zu sein als GIST aus dem Dünn- und Dickdarm (Emory et al. 1999; Ueyama et al. 1992).

#### 1.2.4 Mitosenanzahl

Die Mitosenanzahl beschreibt die Zellteilungsaktivität und somit die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors und ist für die Beurteilung der Prognose ein guter

Parameter. Die Mitosefiguren werden vom Pathologen unter dem Mikroskop ausgezählt und die Anzahl der Mitosen wird pro 50 High-Power-Fields (HPFs), d.h., hochauflösenden Gesichtsfeldern, angegeben. 50 HPFs entsprechen dabei einer Fläche von 10 mm<sup>2</sup>.

Eine Anzahl  $\leq 5$  Mitosen/ 50 HPFs ist die Grenze, bis zu der von einem GIST ein benignes klinisches Verhalten erwartet wird. Eine Mitosenanzahl >5 Mitosen/ 50 HPFs wird gewöhnlich als maligne bezeichnet; eine Anzahl >50 Mitosen/ 50 HPFs bezeichnet hochmaligne GIST (Miettinen und Lasota 2001).

Dennoch können auch kleine, mitotisch wenig aktive Tumoren bereits metastasieren (Fletcher et al. 2002).

#### 1.2.5 Mutationsstatus

Mit 60-70% sind *KIT*-Mutationen im Exon 11 die häufigsten Mutationen, wobei Deletionen, Punktmutationen oder Duplikationen auftreten können (Corless et al. 2002; Corless et al. 2004; Rubin et al. 2001). Exon 11 kodiert für die intrazelluläre juxtamembranäre Domäne, welche regulatorische Funktion besitzt und die liganden-unabhängige Selbstaktivierung des KIT-Rezeptors inhibiert. Durch Mutationen im Exon 11 kommt es zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz im juxtamembranären Abschnitt und in der Folge zu einer dauerhaften, liganden-unabhängigen Aktivierung des KIT-Rezeptors (Hirota et al. 1998; Rubin et al. 2001). Mutationen im Exon 9 des *KIT*-Gens, welches für die Extrazelluläre Domäne kodiert, kommen mit einer Häufigkeit von 5–13% vor (Lux et al. 2000). In *KIT* Exon 13 und in *KIT* Exon 17 werden sehr selten Mutationen gefunden ( $\leq 1\%$ ). Beide Exone kodieren für die eigentlichen Kinase-Domänen TK 1 und TK2 (Lasota et al. 2008) (Abbildung 1.2.5-1).

Beim PDGFRA-Rezeptor sind drei verschiedene Genabschnitte bekannt, welche bei GIST mutiert sein können. In aufsteigender Reihenfolge sind es die Genabschnitte Exon 18, Exon 12 und Exon 14. Diese Regionen sind in gleicher Reihenfolge analog zu *KIT* Exon 17, Exon 11 und Exon 13 (Corless et al. 2005).

Die Mehrzahl (ca. 60-80%) der *PDGFRA*-Mutationen sind Punktmutationen im Exon 18. *PDGFRA*-Mutationen im Exon 12 und Exon 14 sind sehr viel seltener (Corless et al. 2005; Lasota et al. 2006) (Abbildung 1.2.5-1).



Abb. 1.2.5-1: Schematische Übersicht des KIT-Rezeptors (links) und des PDGFRA-Rezeptors (rechts). Die Exone, die jeweils mutiert sein können, sind den Proteindomänen zugeordnet.

Die genannten Mutationen sind zum Teil stark mit den klinisch-pathologischen Parametern assoziiert, wobei die Ursachen für diese Zusammenhänge noch unklar sind (Lasota und Miettinen 2008).

GIST mit einer *KIT*-Exon-11-Duplikation werden in > 80% im Magen gefunden (Lasota et al. 2003). Auch *PDGFRA*-Mutationen kommen häufiger im Magen vor (Lasota et al. 2004). Im Gegensatz dazu werden *KIT*-Exon-9-Mutationen sehr viel häufiger im Dünndarm gefunden (Antonescu et al. 2003). Die seltenen *KIT*-Exon-13- und *KIT*-Exon-17-Mutationen sind in einer kürzlich durchgeführten Studie ebenfalls häufiger im Dünndarm beschrieben (Lasota et al. 2008).

*PDGFRA*-Mutationen kommen zum größten Teil in GIST mit epitheloider oder gemischter Morphologie vor (Corless et al. 2005). Zwischen *KIT*-Exon-11-Mutationen und der Tumormorphologie besteht keine signifikante Korrelation, jedoch scheinen *KIT*-Exon-11-Mutationen eher bei spindelzelligen GIST vorzukommen. Auch die *KIT*-Exon-9-, -Exon-13-, und -Exon-17-Mutationen finden sich häufiger in GIST mit spindelzelliger Morphologie (Lasota et al. 2008; Wardelmann et al. 2002). Dennoch wurden kürzlich epitheloide Zellmerkmale in malignen GIST aus dem Dünndarm mit einer *KIT*-Exon-9-, -Exon-13- oder -Exon-17-Mutation beschrieben. Dies wird als maligne Transformation angesehen und ist nicht gleichzusetzen mit der epitheloiden Morphologie der GIST aus dem Magen (Lasota et al. 2008; Wasag et al. 2004). Zudem konnten für einzelne Mutationen auch Zusammenhänge mit dem klinischen Verlauf beobachtet werden. GIST mit einer *PDGFRA*-Mutation weisen eine eher günstige Prognose auf (Lasota et al. 2004; Lasota et al. 2006). GIST mit einer *KIT*-Exon-11-Duplikation zeigen ebenfalls eine günstige Prognose (Lasota et al. 2003). GIST aus dem Magen mit einer *KIT*-Exon-11-Punktmutation weisen eine bessere Prognose auf als GIST mit einer *KIT*-Exon-11-Deletion (Miettinen et al. 2005). Einen ungünstigen Verlauf präsentieren GIST mit einer *KIT*-Exon-9-Mutation (Antonescu et al. 2003).

#### 1.2.6 Aktuelle Risikoklassifikation

Da die Aussagekraft über die Dignität von GIST mittels histo- bzw. zytomorphologischer Kriterien eingeschränkt ist, werden für die Abschätzung der Dignität bei GIST die Parameter Tumorgröße, Mitoserate und zum Teil die anatomische Lokalisation verwendet.

Die Prognose ist umso ungünstiger, d.h., das Metastasierungsrisiko ist umso höher, je größer ein Tumor ist und je höher die Mitoserate ist.

Im Rahmen einer internationalen Konsensus-Konferenz wurde im Jahr 2002 eine Risikoklassifikation erarbeitet, die die Parameter Tumorgröße und Mitoserate einschließt und es wurden daraus vier Risiko-Stadien abgeleitet (Fletcher et al. 2002) (Tabelle 1.2.6-1).

Risikogruppe	Tumorgröße	Mitosenanzahl
Sehr niedriges Risiko	< 2 cm	< 5/ 50 HPFs
Niedriges Risiko	2-5 cm	< 5/ 50 HPFs
Mittleres Risiko	< 5 cm	6-10/ 50 HPFs
	oder	
	5-10 cm	< 5/ 50 HPFs
Hohes Risiko	> 5 cm	> 5/ 50 HPFs
	oder	
	> 10 cm	jede Anzahl
	oder	
	jede Größe	> 10/ 50 HPFs

Tab. 1.2.6-1: Risikoklassifikation, welche im Jahr 2002 auf der internationalen Konsensus-Konferenz ausgearbeitet wurde (übernommen aus Fletcher et al. 2002, S. 464).

Etwa zeitgleich wurde in den USA eine weitere Risikoklassifikation erarbeitet, welche zusätzlich den Parameter der anatomischen Lokalisation einbezieht. Im Jahr 2006 wurde diese Klassifikation leicht überarbeitet, nachdem sie mit klinischen Daten von ca. 1600 GIST unterlegt wurde (Miettinen und Lasota 2006) (Tabelle 1.2.6-2).

			Magen	Intestinum
<u>Gruppe</u>	<u>Tumorgröße</u>	<u>Mitosenanzahl</u>	Risikogruppe (% mit Tumorprogress)	
1	≤2 cm	<5/50 HPFs	sehr niedriges Risiko (0)	sehr niedriges Risiko (0)
2	>2 ≤5 cm		niedriges Risiko (1,9)	niedriges Risiko (4,3)
3a	>5 ≤10 cm		niedriges Risiko (3,6)	intermediäres Risiko (24)
3b	>10 cm		intermediäres Risiko (12)	hohes Risiko (52)
4	≤2 cm	>5/50 HPFs	niedriges Risiko (0*)	hohes Risiko (50)
5	>2 ≤5 cm		intermediäres Risiko (16)	hohes Risiko (73)
ба	>5 ≤10 cm		hohes Risiko (55)	hohes Risiko (85)
6b	>10 cm		hohes Risiko (86)	hohes Risiko (90)

Tab. 1.2.6-2: Risikoklassifikation, welche im Jahr 2006 unter Einbezug der klinisch-pathologischen Daten von ca. 1600 Patienten erarbeitet wurde (übernommen aus Miettinen und Lasota 2006, S. 1474).

## 1.3 Regulation des Zellzyklus

Der Zellzyklus besteht aus vier voneinander abgrenzbaren Phasen: in der G1-Phase wird die DNA-Synthese vorbereitet. Ihr schließt sich die S-Phase an, in der die DNA-Synthese vollzogen wird. Daraufhin gelangt die Zelle nach Durchlaufen der G2-Phase, in der Vorbereitungen zur Segregation der replizierten DNA getroffen werden, in die M-Phase, die Mitose. Die Mitose bezeichnet die Kernteilung einer Zelle. Ist diese abgeschlossen, wird schließlich die Zellteilung beendet und die daraus entstandenen Tochterzellen befinden sich erneut in der G1- Phase. Ruhende Zellen befinden sich der G0-Ruhephase (Gillett und Barnes 1998) (Abbildung 1.3-1).



Abb. 1.3-1: Schematische Darstellung des Zellzyklus mit der Interphase – bestehend aus der G1-, S- und G2- Phase – und der M-Phase.

Der Zellzyklus wird durch verschiedene externe mitogene und antimitogene Signale reguliert, welche von der Zelle verarbeitet werden. Arthur Pardee fand heraus, dass Zellen jedoch nur während der ersten zwei Drittel der G1-Phase externe mitogene Signale durch Wachstumsfaktoren benötigen, um im Zellzyklus voranzuschreiten. Sobald Zellen eine kontinuierliche mitogene Stimulation in dieser Zeit erhalten haben, können sie den Rest des Zellzyklus bis hin zur Mitose ohne weitere Exposition gegenüber Mitogenen vervollständigen. Diese Beobachtung legte den Schluss nahe, dass es einen bestimmten Punkt in der G1-Phase geben muss, der darüber entscheidet, ob die Zelle im Zellzyklus fortschreitet oder zurück in die GO-Phase eintritt. Pardee bezeichnete diesen Punkt als G1-Restriktionspunkt (Pardee 1974). Sobald eine Zelle den G1-Restriktionspunkt überschritten hat und in die S-Phase eingetreten ist, verläuft der Rest der Zellzyklus-Progression relativ unabhängig und zeitlich konstant (Lundberg und Weinberg 1999). Zusätzliche Checkpunkte in der S-Phase, G2-Phase und in den einzelnen Schritten der M-Phase kontrollieren hingegen weiterhin den Fortschritt der Zellen durch den Zellzyklus und sorgen bei Schäden des Genoms der Zelle für den Arrest und die Reparatur, bevor die Zelle in die nächste Phase fortschreitet (Nurse 1997).

#### **1.3.1** Frühe Proliferation

Mitogene Signale vermitteln den Übergang von der G0-Ruhephase in die G1-Phase, indem sie die Transkription der G1-Phasen-Zykline und dadurch die entsprechenden *cyclindependent kinases* (CDK) aktivieren. Vor allem Cyclin D1 stellt ein starkes Wachstums- und Proliferationssignal dar und sorgt als zentrales Protein zusammen mit Cyclin E für das Überschreiten des G1-Restriktionspunktes (Wang et al. 2004).

Transkriptionsfaktoren binden an den Promotor des Cyclin-D1-Gens und aktivieren dadurch eine verstärkte Ablesung des Gens. In der Folge kommt es zu einer Hochregulation der physiologischerweise niedrigen mRNA-Menge von Cyclin D1 und anschließend zur Translation in das entsprechende Protein. Die Expression von mRNA-Cyclin-D1 wird reguliert durch ERK und STATs, die Translation von Cyclin D1 durch AKT (Bromberg et al. 1999; Lavoie et al. 1996; Matsumura et al. 1999).

Das neu gebildete Cyclin-D1-Protein bindet in der frühen G1-Phase an die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6, die dadurch aktiviert werden. Der Cyclin-D/CDK4- bzw. Cyclin-D/CDK6-Komplex vermittelt anschließend die Phosphorylierung des *retinoblastoma* (RB)-Proteins (Lundberg und Weinberg 1998).

Das RB-Protein ist ein Tumorsuppressor-Protein. In seiner unphosphorylierten Form verhindert RB den G1/S-Phasen-Übergang, indem es reversibel den Transkriptionsfaktor E2F1 bindet und inhibiert. Durch das Anfügen von Phosphatresten an RB durch den aktivierten Cyclin-D/CDK4- bzw. Cyclin-D/CDK6-Komplex wird RB inhibiert. RB kann daraufhin E2F1 nicht mehr binden und dessen Hemmung wird aufgehoben (Lundberg und Weinberg 1998; Weinberg 1995). Das dadurch frei gewordene E2F1 kann nun seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben. Zielgene von E2F1 sind weitere regulierende Gene und Faktoren, die im Zellzyklus und DNA-Metabolismus eine Rolle spielen, so z.B: Cyclin E, Cyclin A, c-Myc, cdc2 oder auch die Dihydrofolatreduktase (Hunter und Pines 1994; Müller et al. 2001).

Sowohl der aktivierte Cyclin-D/CDK4- bzw. Cyclin-D/CDK6-Komplex, als auch E2F1 führen in der mittleren G1-Phase zu einer Hochregulation von Cyclin E, das einen Komplex mit CDK2 bildet (Geng et al. 1996; Lundberg und Weinberg 1999). Der aktivierte Cyclin-E/CDK2-Komplex löst einen zweiten und letzten RB-Phosphorylierungsschritt in der späten G1-Phase aus, der für den Übergang in die S-Phase und die Zellzyklus-Progression notwendig ist (Lundberg und Weinberg 1999) (Abbildung 1.3.1-1).



Abb. 1.3.1-1: Die Abbildung zeigt die für die Dissertation relevanten Signalwege der frühen und späten Proliferation. Die genauen Erläuterungen finden sich im Text (1.3.1-1.3.3). Die in Rot dargestellten Proteine wurden in der vorliegenden Dissertation untersucht.

#### **1.3.2** Späte Proliferation

RB bleibt während der S-Phase und der G2-Phase im hyperphosphorylierten Zustand und wird erst in der M-Phase dephosphoryliert. Den hyperphosphorylierten Zustand in o.g. Phasen erhalten Cyclin A und Cyclin B im aktivierten Komplex mit ihren jeweiligen CDKs. Zu Beginn der S-Phase wird Cyclin A hochreguliert und bildet zunächst einen Komplex mit CDK2, in der späten S-Phase und dem S-/G2-Übergang mit Cdc2 (CDK1). Sobald die Expressionsspiegel von Cyclin A am Beginn der G2-Phase wieder abfallen, wird Cyclin B verstärkt gebildet und sorgt als Komplex mit Cdc2 (CDK1) in der G2-Phase und dem G2-/M-Übergang für den hyperphosphorylierten Zustand von RB (Hunter und Pines 1994; Lundberg und Weinberg 1999, Pagano et al. 1992).

Während die CDKs im Laufe des Zellzyklus einen relativ konstanten Expressionsspiegel zeigen, variieren die der Cycline in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus und werden

beim Übergang in die jeweils nächste Phase rasch nach Ubiquitinierung über das Proteasom abgebaut (Glotzer et al. 1991). Sobald Cyclin B mit Eintritt in die M-Phase herunterreguliert und abgebaut wird, wird auch RB zunehmend durch die Phosphatase PP1 dephosphoryliert und kehrt so in seinen wachstumsbehindernden hypophosphorylierten Zustand zurück. Die Tochterzelle befindet sich daraufhin erneut in der G1-Phase (Abbildung 1.3.1-1).

#### 1.3.3 Myc

Myc-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die in der Kontrolle der Zellproliferation, Differenzierung und des programmierten Zelltods eine Rolle spielen. C-*myc* gehört zur Familie der *myc*-Gene, welche außerdem B-*myc*, L-*myc*, N-*myc* und s-*myc* beinhalten; neoplastisches Potential besitzen jedoch nur c-*myc*, L-*myc* und N-*myc* (Cole 1986).

Die Expression von c-Myc korreliert mit der Proliferation einer Zelle: in ruhenden Zellen ist die c-Myc-Expression niedrig; nach Stimulation einer Zelle mit Wachstumsfaktoren und durch E2F1-Induktion wird die Expression von c-Myc rapide erhöht (Cole 1986; Thalmeier et al. 1989). Das c-Myc-Protein beinhaltet am C-terminalen Ende eine Helix-Loop-Helix Leucin-Zipper-Domäne, über welche es mit seinem Ko-Faktor, dem im Überschuss vorliegenden Max-Protein, dimerisiert und dadurch das aktive, DNA-bindende Myc-Max-Heterodimer bildet (Dang et al. 1999; Kato et al. 1992). Dieses Heterodimer induziert daraufhin die Transkription verschiedener Gene, die für den Fortschritt des Zellzyklus in der G1- und S-Phase spezifisch und notwendig sind. C-Myc agiert im Rahmen des Zellzyklus sowohl parallel zum G1-Restriktionspunkt, als auch vor- und nachgeschaltet (Bartek und Lukas 2001). Im Folgenden werden nur die für die vorliegende Dissertation wichtigen Zielgene von c-Myc erläutert.

Es wurde vermutet, dass c-Myc die Expression von Cyclin D1 stimuliert. Die Verbindung zwischen c-Myc und Cyclin D1 scheint jedoch komplex zu sein und von spezifischen Stimuli und Zellsystemen abzuhängen (Roussel 1997; Roussel et al. 1995). In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben darüber, wie c-Myc die Expression von Cyclin D1 beeinflusst. In einigen Studien wurde Cyclin D1 als Zielgen von c-Myc benannt und reagierte unter bestimmten Umständen mit einer gesteigerten Expression auf eine Hochregulation von c-Myc (Daksis et al. 1994). Andere Studien hingegen fanden keine gesteigerte Cyclin-D1-Expression nach Hochregulation von c-Myc (Qi et al. 2007).

Während die Expression von Cyclin D1 nicht zwangsläufig durch c-Myc gesteigert werden kann, sind im Gegensatz dazu sowohl Cyclin E, als auch Cyclin A Zielgene von c-Myc. Studien zeigen gesteigerte Expressionsspiegel von Cyclin E und Cyclin A als Antwort auf eine c-Myc-Überexpression (Dang 1999; Qi et al. 2007).

Es ist noch unklar, wie genau c-Myc die Expression von Cyclin E steigert. Neuere Studien vermuten eine direkte Aktivierung, obwohl der Mechanismus noch nicht geklärt werden konnte, da keine Myc-Bindestellen im Promotor existieren (Pérez-Roger et al. 1997). C-Myc kann jedoch auch die Expressionsspiegel des Cyclin-E-CDK2-Komplexes erhöhen, indem es p27 – einen CDK2-Inhibitor – hemmt (Pérez-Roger et al. 1997; Vlach et al. 1996).

Parallel zum G1-Restriktionspunkt kann eine ektope Expression von c-Myc die DNA-Synthese in solchen Zelllinien induzieren, in denen die E2F1-Aktivität durch konstitutiv aktivierte RB-Mutanten geblockt ist. Dieser Effekt von c-Myc ist assoziiert mit der Aktivierung des Cyclin-E/CDK2-Komplexes und der Cdc25A Phosphatase. Letztere dephosphoryliert die Kinasen Cyclin E/CDK2 und Cyclin A/CDK2 und ist somit für den Eintritt in die S-Phase notwendig. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es parallel zu dem klassischen RB/E2F-Signaltransduktionsweg einen weiteren Pfad gibt, über den c-Myc durch Regulation von Cyclin E den G1-/S-Phasen-Übergang fördert. Eine einwandfreie Transkription von Cyclin E und Cdc25A Phosphatase am G1-/S-Phasen-Übergang erfordert jedoch sowohl c-Myc-, als auch E2F1-Aktivität (Santoni-Rugiu et al. 2000).

#### **1.3.4 E2F1- und c-Myc-induzierte Apoptose**

Verschiedene Studien zeigten, dass E2F1 nicht nur Zellproliferation, sondern auch Apoptose induzieren kann. Es wurde beobachtet, dass E2F1-negative Mäuse eine hohe Inzidenz an Tumoren zeigten, was implizierte, dass E2F1 eher als Tumorsuppressor statt als Onkogen fungiert (Field et al. 1996; Yamasaki et al. 1996).

Schließlich wurden drei verschiedene Mechanismen identifiziert, welche bei der E2F1induzierten Apoptose eine Rolle spielen.

Der erste Mechanismus beinhaltet die Hemmung anti-apoptotischer Signale durch E2F1. In der Zelle sind zwei apoptotische Signalwege beschrieben – der intrinsische und der extrinsische Weg. Der intrinsische Signalweg führt nach Aktivierung durch apoptotische Stimuli über Bcl-2-verwandte Proteine zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren aus dem Mitochondrium. Dies führt zur Aktivierung von Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) und Caspase 9, welche schließlich die Effektorcaspase 3 aktivieren (Green und Reed 1998). Der extrinsische Signalweg wird eingeleitet durch Ligandenbindung an einen Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie. Diese sogenannten Todesrezeptoren besitzen in ihrem zytoplasmatischen Teil eine Todesdomäne, woran weitere Proteine gebunden und autoaktiviert werden. Schließlich resultiert daraus die Aktivierung der Caspase 8, die die Caspase-Kaskade einleitet und ebenfalls wie der intrinsische Signalweg in der Aktivierung der Effektorcaspase 3 mündet (Ashkenazi und Dixit 1998). Der TNF-Rezeptor sendet seine Signale jedoch nicht nur an die Caspase-Kaskade, sondern induziert auch die NF-κB und JNK/SAPK-Funktion, welche die apoptotischen Signale hemmen können. Diese Überlebenssignale durch NF-κB und JNK/SAPK können durch E2F1 ausgeschaltet werden, möglicherweise durch Induktion der Degradation des Signalkomplexes am Rezeptor (Hsu et al. 1995; Klefstrom et al. 1997; Phillips et al. 1999) (Abbildung 1.3.4-1).



Abb. 1.3.4-1: Die Abbildung zeigt den intrinsischen (rechts) und den extrinsischen (links) Apoptose-Signalweg. Der intrinsische Weg führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium und über Aktivierung von Apaf-1 und Caspase 9 zur Mobilisierung der Caspase 3. Der extrinsische Signalweg

führt nach Ligandenbindung an den TNF-Rezeptor über verschiedene (Auto-)Aktivierungen zur Einleitung der Caspase-Kaskade. Diese Kaskade mündet ebenfalls in der Aktivierung der Capase 3, die schließlich für den programmierten Zelltod verantwortlich ist. Inhibiert wird die Apoptose durch NF-κB und JNK/SAPK. E2F1 kann die Funktion von NF-κB und JNK/SAPK ausschalten (nicht dargestellt in der Abbildung) (Abbildung teilweise übernommen aus Phillips und Vousden 2001, S. 176).

Der zweite Mechanismus, der für die E2F1-induzierte Apoptose beschrieben wurde, resultiert in der transkriptionellen Hochregulation von p73 durch ektopische oder endogene E2F1-Expression (Irwin et al. 2000). P73 gehört zur p53-Familie und besitzt ebenso die Fähigkeit Apoptose auszulösen.

Schließlich führt der dritte beschriebene Mechanismus zur Stabilisierung von p53 selbst durch einen indirekten Effekt. Es konnte gezeigt werden, dass E2F1 über die Induktion des Tumorsuppressorproteins p14<sup>ARF</sup> p53 stabilisieren kann. P14<sup>ARF</sup> bindet und inhibiert MDM2, welches in normalen, nicht geschädigten oder gestressten Zellen zur Degradation von p53 führt und somit für einen niedrigen Expressionsspiegel von p53 sorgt (Bates et al. 1998; Kamijo et al. 1998; Pomerantz et al. 1998). Durch die Hemmung von MDM2 sind die Spiegel von p53 erhöht und der programmierte Zelltod wird ausgelöst (Abbildung 1.3.4-2).



Abb. 1.3.4-2: E2F1 kann das Tumorsuppressorprotein p14<sup>ARF</sup> aktivieren. Daraufhin wird MDM2 inhibiert, welches seinerseits die Hemmung von p53 nicht mehr fortführen kann. Die Expression von p53 und somit die Apoptoserate werden gesteigert (Abbildung teilweise übernommen aus Phillips und Vousden 2001, S. 177). Auch für c-Myc wurde eine Apoptose-induzierende-Funktion beschrieben. Ebenso wie E2F1 kann c-Myc über eine Hemmung anti-apoptotischer Signale und über Stabilisierung von p53 Apoptose auslösen (Phillips und Vousden 2001). Des Weiteren wurde in einigen Studien ein p53-unabhängiger Signalweg beschrieben, der in direktem Zusammenhang zu erhöhter LDH-A-Expression stehen könnte (Shim et al. 1998).

## 1.4 Zielsetzung

Betrachtet man GIST unter Berücksichtigung der klinisch-pathologischen Parameter, so zeigen diese Tumore je nach Lokalisation, Morphologie, Tumorgröße, Mitosenanzahl oder Mutationsstatus unterschiedliche klinische Verläufe.

Folgende Fragen lassen sich daraus formulieren:

- Bestehen im untersuchten GIST-Kollektiv Zusammenhänge zwischen den klinischpathologischen Parametern Lokalisation, Morphologie, Mutationsstatus, Tumorgröße und Mitosenanzahl bzw. lassen sich die bereits in der Literatur gefundenen Assoziationen im vorliegenden Kollektiv bestätigen?
- Wie stellt sich der klinische Verlauf der Patienten mit GIST hinsichtlich der unterschiedlichen klinisch-pathologischen Paramter dar?
- Wie stark sind jeweils die proliferationsassoziierten Proteine E2F1, Myc, Cyclin D1, Cyclin A2 und Cyclin B1 in Bezug auf die einzelnen klinisch-pathologischen Parameter exprimiert?
- Bestehen signifikante Unterschiede in den Expressionsspiegeln oben genannter Proteine bei GIST in Abhängigkeit von Lokalisation, Morphologie, Mutation, Tumorgröße oder Mitosenanzahl?
- Wie stellt sich der klinische Verlauf der Patienten mit GIST dar, die jeweils hohe bzw. niedrige Expressionen der proliferationsassoziierten Proteine aufweisen?
- Lässt sich daraus eine mögliche prognostische Bedeutung ableiten, anhand derer mit oben genannten Antikörpern im klinischen Alltag die Aggressivität und der klinische Verlauf der GIST eingeschätzt werden könnten?

# 2 Material und Methoden

# 2.1 Untersuchungsmaterial

In der vorliegenden Dissertation wurden 148 Patienten mit einem gastrointestinalen Stromatumor untersucht. Die Diagnose "GIST" wurde histomorphologisch und immunhistochemisch gestellt. Mitosen wurden in 50 hochauflösenden Gesichtsfeldern ausgezählt. Die Klassifikation erfolgte nach dem Schema von Fletcher (Fletcher 2002), und auch nach dem Schema von Miettinen (Miettinen und Lasota 2006). Der klinische Verlauf nach der Operation wurde durch Anschreiben an die Hausärzte erfragt und aus den Patientenakten erhoben. Ein Tumorbefall von Leber, Peritoneum, Lunge, Lymphknoten oder von anderen Organen, sowie das Auftreten eines Lokalrezidivs wurden als Progress gewertet. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin befürwortet (Ethik-Votum 9/9/07 vom 10.04.2008).

## 2.2 Tissue Mikroarrays

Mit dem Tissue Mikroarrayer steht ein manuell zu bedienendes Laborgerät zur Verfügung, das es ermöglicht, zahlreiche Gewebeproben verschiedener Patienten in Form kleiner Stanzkerne von 0,1 cm Durchmesser in einem einzigen Paraffinblock als gemeinsame Matrix anzulegen. Dazu besitzt der Tissue Mikroarrayer zwei Hohlstanzen.

Mit der ersten Stanze wurde ein Loch in einen Empfängerparaffinblock gestanzt. Anschließend wurde ein präziser Stanzkern aus einem selektierten Bereich eines Spenderparaffinblocks, in diesem Fall aus dem Gewebeparaffinblock, durch die zweite Hohlstanze entnommen und in das vorgefertigte Loch des Empfängerblocks platziert (Abbildung 2.2-1).



Abb. 2.2-1: Die Abbildung zeigt den manuellen Tissue Mikroarrayer mit dem korrekten Sitz eines Empfängerblockes (aus AlphaMetrix Biotech GmbH 2005b, S. 10).

Der Vorteil der Tissue-Microarray-Technologie liegt hierbei in der Möglichkeit, eine große Anzahl von Gewebeproben simultan immunhistochemisch untersuchen zu können, was Reagenzien, Arbeitszeit und Paraffinmaterial spart, und eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglicht. Abhängig von der Dicke der Originalblöcke können aus einem Array-Block bis zu 300 Schnitte entstehen. Bei einer Stanzgröße von 0,1 cm und einer regelmäßigen Matrix mit einem Mittelpunktsabstand von 1,8 mm können auf einem Objektträger 96 Gewebsstanzen aufgebracht werden, die anschließend histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen zur Verfügung stehen (Abbildung 2.2-2).



Abb. 2.2-2: Die Abbildung zeigt die Herstellung eines TMAs. Zunächst wird ein präziser Stanzkern aus einem selektierten Bereich eines Spenderparaffinblocks durch eine Hohlstanze entnommen und in das vorgefertigte Loch des Empfängerblocks platziert. Der Empfängerparaffinblock kann anschließend mit

dem Mikrotom geschnitten werden und die Schnitte werden auf einem Obkejtträger aufgebracht. Schließlich können die auf dem Objetträger aufgebrachten Gewebeproben unter dem Mikroskop betrachtet werden (aus AlphaMetrix Biotech GmbH 2005a, S. 3).

Auf einem Tissue Array wurden je sechs Gewebeproben von 16 Patienten untersucht (Tabelle 2.2.-1).

1		1	1	1	1	1	1	1	1		1		
<u>Spalte</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>
А	Leber	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
В	Leber	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4
С	PK-Mukosa	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6
D	PK-Mukosa	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8
E	PK-Muskel	9	9	9	9	9	9	10	10	10	10	10	10
F	PK-Muskel	11	11	11	11	11	11	12	12	12	12	12	12
G	PK-PDGFRA	13	13	13	13	13	13	14	14	14	14	14	14
Н	PK-PDGFRA	15	15	15	15	15	15	16	16	16	16	16	16

Tab. 2.2-1: Die Tabelle zeigt das Beispiel einer Matrix für ein Tissue Mikroarray. In der ersten Spalte wurden Gewebeproben aus der Leber, Magen-Mukosa, Magen-Muskulatur, sowie ein *PDGFRA*-mutierter GIST eingefügt, um sich hinterher bei der Mikroskopie und Auswertung orientieren zu können. Desgleichen konnten diese Normalgewebe als Positiv-Kontrollen für verschiedene Antikörper verwendet werden. Die Ziffern geben an, welchem Patienten das Gewebe zuzuordnen ist (Bsp.: Zeile A, Spalte 2 beinhaltet eine Gewebeprobe von Patient 1).

Vor dem Schneiden des Array-Paraffinblocks mussten die Stanzen zunächst mit dem umgebenen Paraffin verbunden werden. Nach einer halbstündigen Erwärmung bei 37°C konnten zunächst gröbere Ungleichheiten in der Eindringtiefe der Stanzkerne in den Empfängerblock durch manuelle Kompression mittel eines Glasobjektträgers ausgeglichen werden. Anschließend wurde durch die Erwärmung des TMAs auf 60°C für 15 Minuten das Paraffin verflüssigt, so dass ein optimaler Verbund zwischen den Stanzkernen und dem umgebenden Paraffin erreicht werden konnte. Nun konnten nach einer abschließenden Abkühlung des Blockes bei -20°C für 5 Minuten mit dem Mikrotom Schnitte von 1 µm Dicke abgenommen und auf einen Objektträger übertragen werden.

# 2.3 Immunhistochemie

#### 2.3.1 Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung

Als erster Schritt der Vorbehandlung stand die Entparaffinierung im Vordergrund. Hierzu wurden die auf Objektträger fixierten Paraffinschnitte zunächst in einer Xylol-Lösung 15 Minuten inkubiert, um das Paraffin zu lösen. Anschließend wurde in einer absteigenden Alkoholreihe das Paraffin ausgewaschen und Wasser in das Gewebe eingelagert, so dass später die immunhistochemische Färbung durchgeführt werden konnte. Hierbei folgte drei 100% igen Alkohol-Lösungen (je 1-2 Minuten) ein 96% iges Alkoholbad (1-2 Minuten), das von einer 75%-Alkohol-Lösung (1-2 Minuten) abgeschlossen wurde. Die Entparaffinierung wurde durch eine Spülung unter demineralisiertem Wasser beendet.

Die weitere Vorbehandlung beinhaltete eine Auftragung von Citrat-Puffer-Lösung auf die Gewebeproben, die sich aus zwei Stammlösungen zusammensetzte:

- Stammlösung I 21g CH<sub>3</sub>COOH/ 11 bi-dest. H<sub>2</sub>O
- Stammlösung II 29,4g tri-CH<sub>3</sub>COO-Na x  $2H_2O/11$  bi-dest.  $H_2O$

18ml von Stammlösung I und 82ml von Stammlösung II ergaben auf 11 bi-dest.  $H_20$  den erforderten pH-Wert von 6,0.

Nach erfolgter Citratpuffer-Auftragung wurden die Objektträger für 45 Minuten in einem Dampfgarer inkubiert und die für die immunhistochemischen Färbungen benötigten Primärantikörper verdünnt (Tabelle 2.3-1):

Antikörper	Clone-ID	Bestell-Nr.	Firma	Verdünnung	Zelluläre
			(Stadt, Land)		Lokalisation
E2F1	KH95	MA1-	Dianova	1:200	nucleär
		26623	(Hamburg,		
			Deutschland)		
Cyclin D1	SP4	Neo-	Medac GmbH	1:100	nucleär
		Markers	(Wedel,		
			Deutschland)		
Cyclin A2	Y193	1540-1	Epitomics, Inc.	1:100	nucleär
			(Burlingame,		
			USA)		

Cyclin B1	Y106	1495-1	Epitomics,	Inc.	1:100	nucleär
			(Burlingame	,		
			USA)			
Myc	Y69	1472-1	Epitomics,	Inc.	1:50	nucleär
			(Burlingame	,		
			USA)			

Tab. 2.3-1: In der Tabelle sind die verwendeten Antikörper mit der jeweiligen Clone-ID, sowie die Bestellnummer und die Firma mit Firmensitz dargestellt. Weiterhin sind für jeden Antikörper die benutzen Verdünnungen angegeben.

#### 2.3.2 Immunhistochemische Färbung

Für das immunhistochemische Verfahren wurde das Dako REAL<sup>™</sup> Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse verwendet. Das auf der LSAB-Methode (markiertes Streptavidin-Biotin) beruhende Kit wurde in einem Drei-Schritte-Verfahren eingesetzt. Zuerst wurde das Gewebe mit dem optimal verdünntem Primärantikörper, danach mit Dako REAL<sup>™</sup> Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) und zuletzt mit Dako REAL<sup>™</sup> Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP) konjugiert. Abschließend wurde die Reaktion mit dem im Kit ebenfalls enthaltenden RED Chromogen sichtbar gemacht.

Bei diesem Färbevorgang erfolgte als erstes eine fünfminütige Waschung der Tissue Mikroarrays in einem neutralen TRIS-Puffer (12g TRIS + 18 g NaCl / 2 l bi-dest H<sub>2</sub>0, pH: 7,4). Zum Blockieren des endogenen Biotins wurde mit der BSA-Fraktion-V (2g BSA / 100ml TRIS-Puffer) inkubiert, worauf sich eine zehnminütige Einwirkung mit dem primären Antikörper (Tabelle 2.3-1.) anschloss. Nach dreimaligem Waschen mit dem TRIS-Puffer der sekundäre Antikörper (Dako REAL<sup>TM</sup> Detection System, Alkaline wurde Phosphatase/RED, Link, Biotinylated Secondary Antibody) für 20 Minuten hinzugegeben. Nun wurde abermals mit dem TRIS-Puffer dreimal gewaschen und daraufhin das AP-Enzym-Konjugat (Dako Real<sup>TM</sup> Detection, Alkaline Phophatase/RED Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP)) für 20 Minuten inkubiert, so dass abschließend nach erneuter dreimaliger Waschung mit TRIS-Puffer die Farbreaktion mit Chromogen (Dako REAL<sup>TM</sup> Detection System, Chromogen (RED)) ablaufen konnte. Hierbei wirkte das Chromogen (Ansatz: 1 ml Puffer + 40µl RED1 + 40µl RED2 + 40µl RED3 + 5µl Levamisol) 20 Minuten ein. Um die nicht gebundenen Antikörper vom Gewebe zu trennen, wurden die Objektträger mit demineralisiertem Wasser abgespült. Eine anschließende Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer bläute die nicht antikörperbesetzten Zellbestandteile, so dass später unter dem Mikroskop sowohl die positiv gefärbten, als auch die für den Antikörper negativen Gewebeproben sichtbar waren. Um die Tissue Mikroarrays auf dem Objektträger eindecken zu können, musste als letzter Schritt das Wasser wieder aus dem Gewebe herausgespült und Xylol eingezogen werden, da das Eindeckmedium xylol-haltig war und somit eine längere Haltbarkeit der Proben gewährleistet wurde. Eine aufsteigende Alkoholreihe mit 75% igem Alkohol, 96% igem Alkohol und dreimal 100% igem Alkohol und ein abschließendes dreimaliges Xylol-Bad führten schließlich zu dem gewünschten Ergebnis.

### 2.4 Quantitative Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben wurden zunächst jeweils einzeln unter dem Mikroskop aufgesucht und dann mit einer Vergrößerung von 200-fach digital fotografiert (Abbildung 2.4-1).

Die digitalen Fotos der einzelnen Gewebeproben wurden anschließend mit Hilfe einer Computer-gestützten Anwendung quantitativ ausgewertet. Die Software, die von Dr. Robert Cameron (Cameron et al. 2008) programmiert wurde, erkennt und zählt die Zellkerne in zwei getrennten Durchläufen. Zunächst werden nur die rot angefärbten, positiven Zellkerne ausgezählt, welche das gesuchte Protein exprimieren. In einem zweiten Durchlauf werden dann alle Zellkerne ausgezählt, auch die blau gefärbten, welche das gesuchte Protein nicht exprimieren (Abbildung 2.4-2). Aus dem Verhältnis der markierten positiven Zellkerne zu allen markierten Zellkernen lässt sich quantitativ bestimmen, wie viel Prozent der Tumorzellen ein gesuchtes Protein exprimieren (z.B. 12%).



Abb. 2.4-1: Die Abbildung zeigt die immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben bei 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop. A) Dieses Gewebe weist eine hohe Expression von Cyclin B1 auf nach immunhistochemischer Färbung mit dem Primärantikörper; B) Dieses Gewebe zeigt eine niedrige Expression von Cyclin B1 nach immunhistochemischer Färbung mit dem Primärantikörper.



Abb. 2.4-2: Die Abbildung zeigt die computer-gestützte quantitative Auswertung der digital fotografierten Gewebeproben. Bild A zeigt eine Gewebeprobe bei 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop, nachdem diese mit dem Primärantikörper E2F1 immunhistochemisch gefärbt wurde. In Bild B werden mithilfe der computer-gestützten Anwendung nur die rot angefärbten, positiven Zellkerne ausgezählt, welche E2F1 exprimieren. In einem zweiten Durchlauf (Bild C) werden alle Zellkerne ausgezählt. Aus dem Verhältnis der markierten positiven Zellkerne zu allen markierten Zellkernen lässt sich quantitativ bestimmen, wie viel Prozent der Tumorzellen E2F1 exprimieren.

# 2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung des Computerprogramms Statistika 8.0 (StatSoft, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Ein statistisches Ergebnis wurde als signifikant gewertet, wenn der p-Wert < 0,05 betrug.

Zunächst wurden die klinisch-pathologischen Parameter Lokalisation, Morphologie, Tumorgröße, Mitosenanzahl/ 50 HPFs und Mutationsstatus untereinander verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte dabei mithilfe von t-Tests für unverbundene Stichproben, sowie Chi<sup>2</sup>-Tests. T-Tests für unverbundene Stichproben wurden bei nominalen Daten angewandt. Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse erfolgte mittels Box-Plots (siehe einzelne Abbildungen; Balken innerhalb der Box: Median, Box: 25 bzw. 75% Quantil, äußere Begrenzungsbalken: Minimum/Maximum ohne Ausreißer, Dreiecke: Originaldaten).

Chi<sup>2</sup>-Tests wurden bei kategorialen Variablen angewandt. Hierbei wurde im Rahmen des Vierfeldertests der Zusammenhang zwischen zwei Alternativmerkmalen untersucht. Die Darstellung dieser Ergebnisse erfolgte tabellarisch.

Anschließend wurde die Expression der fünf untersuchten Proteine auf Korrelationen mit den oben genannten klinisch-pathologischen Parametern getestet. Dies erfolgte ausschließlich mittels t-Tests für unverbundene Stichproben, wobei auch hier die Ergebnisse durch Box-Plots graphisch dargestellt wurden.

Der klinische Verlauf wurde abschließend mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt, wobei die Signifikanzen der Ergebnisse mit dem Log-Rang-Test überprüft wurden. Der Log-Rang-Test basiert ebenfalls auf der Chi<sup>2</sup>-Verteilung und dient dazu, die Überlebenswahrscheinlichkeiten zweier Gruppen miteinander zu vergleichen, wobei auch zensierte Daten erlaubt sind.

# 2.6 Reagenzien und Geräte

Gerät/Reagenz	Firma	Firmensitz	Land
Manueller Tissue-Arrayer	AlphaMetrix Biotech GmbH	Rödermark	Deutschland
MTA-1			
Dako REAL <sup>™</sup> Detection	Dako Denmark A/S	Glostrup	Dänemark
System, Alkaline			
Phosphatase/RED,			
Rabbit/Mouse			

Dako REAL <sup>TM</sup> Biotinylated	Dako Denmark A/S	Glostrup	Dänemark
Secondary Antibodies (AB2)			
Dako REAL <sup>™</sup> Streptavidin	Dako Denmark A/S	Glostrup	Dänemark
Alkaline Phosphatase (AP)			
Dako REAL <sup>™</sup> Chromogen	Dako Denmark A/S	Glostrup	Dänemark
Red 1			
Dako REAL <sup>™</sup> Chromogen	Dako Denmark A/S	Glostrup	Dänemark
Red 2			
Dako REAL <sup>™</sup> Chromogen	Dako Denmark A/S	Glostrup	Dänemark
Red 3			
Dako REAL <sup>™</sup> AP Substrate	Dako Denmark A/S	Glostrup	Dänemark
Buffer			
Dako REAL <sup>™</sup> Levamisole	Dako Denmark A/S	Glostrup	Dänemark
BSA-Fraktion V	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Paraffin	Euro OTC Pharma	Bönen	Deutschland
Objektträger	Menzel GmbH & Co. KG	Braunschweig	Deutschland
Deckgläser	Menzel GmbH & Co. KG	Braunschweig	Deutschland
Xylol	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Ethanol	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
H <sub>2</sub> O destilliert	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Citronensäure	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Tri-Natriumcitrat	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
TRIS-Puffer	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Hämalaun/ Hämatoxylin	Dako Denmark A/S	Glostrup	Dänemark
Schlittenmikrotom	Reichert-Jung	Nussloch	Deutschland
Dampfgarer "Multigourmet"	B. Braun Biotech	Melsungen	Deutschland
	International GmbH		
Mirkoskop Olympus BX40	Olympus Europa Holding	Hamburg	Deutschland
	GmbH		
Digitalkamera Olympus	Olympus Europa Holding	Hamburg	Deutschland
C-5050	GmbH		

 Tab. 2.6-1: In der Tabelle sind die verwendeten Reagenzien und Geräte inklusive der Firma und des

 Firmensitzes, von welcher sie stammen, dargestellt.
# 3 Ergebnisse

# 3.1 Darstellung des untersuchten Kollektivs

#### 3.1.1 Geschlechterverhältnis und Altersverteilung der Patienten

68 der 148 Patienten waren weiblich (45,9%), 80 Patienten waren männlich (54,1%). Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis Frauen zu Männer von 1:1,2.

Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 33 und 90 Jahren. Hierbei betrug im Durchschnitt das Alter der Frauen 67,4 Jahre ( $\pm$  12,6 Jahre) und das Alter der Männer 63,7 Jahre ( $\pm$  11,5 Jahre) (Abbildung 3.1.1-1).

Hinsichtlich der Geschlechterverteilung bestand kein signifikanter Unterschied im Alter zum Zeitpunkt der Operation (t-Test für unverbundene Stichproben, p = 0,06).



Abb. 3.1.1-1: Altersverteilung der 148 GIST- Patienten, nach Geschlecht getrennt

#### 3.1.2 Lokalisation

Von den 148 gastrointestinalen Stromatumoren befanden sich 93 Tumoren im Magen (62,8%), 42 Tumoren im Dünndarm (28,4%) und 13 im Dickdarm (8,8%).

#### 3.1.3 Morphologie

Es lagen 90 spindelzellige Tumoren vor (60%), 15 Tumoren waren epitheloid (10,1%) und 43 Tumoren wiesen eine gemischte Morphologie auf (29,1%). Da die epitheloiden und gemischten Tumoren für sich genommen zu selten waren, wurden sie im Folgenden als eine gemeinsame Gruppe betrachtet.

# 3.1.4 Tumorgröße

Die maximale Größe der Tumoren reichte von 0,7 cm bis 30 cm. Im Mittel lag die Größe der Tumoren bei 6,6 cm ( $\pm$  4,8 cm).

#### 3.1.5 Mitosenanzahl pro 50HPFs

Die Anzahl der Mitosen wurde pro 50 HPFs ("High Power Fields") bestimmt.

Im vorliegenden Kollektiv betrugen die Werte zwischen 0 und 148 Mitosen/ 50 HPFs. Im Mittel waren es 16,4/ 50 HPFs ( $\pm$  31,5/ 50HPFs). Für eine einfachere Auswertung wurden entsprechend der Klassifikation nach Miettinen zwei Gruppen mit  $\leq$ 5 bzw. >5 Mitosen pro 50 HPFs gebildet. In der Gruppe < 5 Mitosen/ 50 HPFs waren es 95 Tumoren (64,2%), in der Gruppe > 5 Mitosen/ 50 HPFs waren es 53 Tumoren (35,8%) im untersuchten Kollektiv.

# 3.1.6 Mutationsstatus

Die GIST konnten nach dem Mutationsstatus unterteilt werden in GIST mit einer *KIT*-Mutation und in GIST mit einer *PDGFRA*-Mutation.

Hierbei ergaben sich 92 GIST mit einer *KIT*-Mutation (82,1%) und 20 GIST mit einer *PDGFRA*-Mutation (17,9%). Bei 36 Tumoren wurde der Mutationsstatus nicht ermittelt.

31

#### 3.1.7 Risikoklassifikation

#### 3.1.7.1 Klassifikation nach Fletcher

Nach der Risikoklassifikation von Fletcher lagen im beschriebenen Kollektiv 17 GIST mit einem sehr niedrigen Risiko vor (11,5%), 39 GIST besaßen ein niedriges Risiko (26,4%), 38 Tumoren hatten ein mittleres Risiko (25,7%) und 54 GIST wurden in der Risikoklassifikation mit einem hohen Risiko eingestuft (36,5%).

#### 3.1.7.2 Klassifikation nach Miettinen (2006)

In der Risikoklassifikation nach Miettinen (2006) hatten 17 GIST ein sehr niedriges Risiko (11,5%). 66 Tumoren wurden einem niedrigen Risiko zugeordnet (44,6%), 18 GIST besaßen ein mittleres Risiko (12,2%) und 47 GIST wiesen ein hohes Risiko auf (31,8%).

Da sich die Einteilung der Risikogruppen auf die Grundparamter Lokalisation, Tumorgröße und Mitosenanzahl bezieht, wurden in den folgenden Abschnitten jeweils nur die Grundparameter ausgewertet.

# 3.1.8 Follow up

Von den 148 Patienten lagen zum Zeitpunkt der Erhebung der Daten bei 123 Patienten Angaben zum Progress und zum krankheitsfreien Überleben vor.

Es fand sich bei 36 GIST- Patienten (29,3%) ein Progress, d.h., eine Metastasierung in ein anderes Organ. Das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit Progress lag zwischen 0 und 84 Monaten und betrug im Mittel 19 Monate (± 22 Monate).

87 Patienten (70,7%) wiesen keinen Progress auf. Hier betrug das krankheitsfreie Überleben zwischen 0 und 156 Monaten, im Mittel waren es 44 Monate (± 37 Monate).

# 3.2 Vergleich der klinisch- pathologischen Parameter untereinander

#### 3.2.1 Lokalisation

## 3.2.1.1 Im Vergleich zur Morphologie

52 (57,8%) der insgesamt 90 Tumoren mit spindelzelliger Morphologie waren im Magen lokalisiert, 29 (32,2%) der spindelzelligen Tumoren waren im Dünndarm und 9 (10%) waren im Dickdarm lokalisert. 41 der Tumoren (70,7%) mit epitheloid-gemischter Morphologie waren im Magen lokalisiert, 13 Tumoren (22,4%) waren im Dünndarm und 4 Tumoren (6,9%) mit epitheloid-gemischter Morphologie waren im Dickdarm lokalisiert.

Hinsichtlich der Morphologie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Lokalisationen festgestellt werden (Chi<sup>2</sup>-Test, p> 0,05, Tabelle 3.2.1-1).

	spindelzellig (SP)	epitheloid-gemischt (EP-GEM)	spindelzellig vs epitheloid-gemischt
	Anzahl (%)	Anzahl (%)	p- Wert
Magen	52 (57,8)	41 (70,7)	p= 0,1
Dünndarm	29 (32,2)	13 (22,4)	p= 0,2
Dickdarm	9 (10)	4 (6,9)	p= 0,5
Gesamt	90 (100)	58 (100)	

Tab. 3.2.1-1: Die Tabelle zeigt für jede Lokalisation die absoluten und relativen Häufigkeiten der spindelzelligen und der epitheloid-gemischten Tumoren. Weiterhin sind die beim Chi<sup>2</sup>-Test ermittelten p-Werte beim Vergleich zwischen den Morphologien pro Lokalisation angegeben.

### 3.2.1.2 Im Vergleich zur Tumorgröße

Die maximale Tumorgröße der GIST im Magen lag zwischen 0,7 und 30 cm. Im Mittel betrug die maximale Tumorgröße 6,2 cm ( $\pm$  4,7 cm).

Im Dünndarm waren die GIST zwischen 1 und 25 cm groß, hier lag der Mittelwert bei 7,6 cm  $(\pm 5,1 \text{ cm})$ . Im Dickdarm lag die maximale Tumorgröße zwischen 0,9 und 15 cm und betrug im Mittel 5,6 cm  $(\pm 4,2 \text{ cm})$ .

Der Vergleich der maximalen Tumorgröße im Magen, Dünndarm und Dickdarm zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Lokalisationen (t-Test für unverbundene Stichproben, p>0,05).

# 3.2.1.3 Im Vergleich zur Mitosenanzahl

Die Mitosenanzahl der GIST im Magen lag zwischen 0 und 148/ 50 HPFs und betrug im Mittel 12,6/ 50 HPFs ( $\pm$  25,4/ 50 HPFs). Im Dünndarm betrug die Mitosenanzahl zwischen 0 und 138/ 50 HPFs, der Mittelwert lag bei 19,2/ 50 HPFs ( $\pm$  33,3/ 50 HPFs). GIST im Dickdarm besaßen eine Mitosenanzahl zwischen 0 und 145/ 50 HPFs, hier lag der Mittelwert bei 34,2/ 50 HPFs ( $\pm$  54,1/ 50 HPFs).

Es zeigte sich, dass GIST im Dickdarm eine signifikant höhere Mitosenanzahl/ 50 HPFs aufwiesen als GIST im Magen (t-Test für unverbundene Stichproben, p=0,02). Zwischen den übrigen Organen bestand hinsichtlich der Mitosenanzahl/ 50 HPFs kein signifikanter Unterschied (Abbildung 3.2.1-1).



Abb. 3.2.1-1: Anzahl der Mitosen/ 50 HPFs in den einzelnen Organen

### 3.2.1.4 Im Vergleich zum Mutationsstatus

*PDGFRA*-Mutationen kamen ausschließlich im Magen vor und waren dort relativ betrachtet signifikant häufiger als *KIT*-Mutationen (Chi<sup>2</sup>-Test, p=0,0002). Infolgedessen waren im Dünndarm, wo keine Tumoren *PDGFRA*-mutiert waren, signifikant häufiger *KIT*-mutierte GIST zu finden (p=0,002). Aufgrund der geringen Fallzahl im Dickdarm ließen sich dort keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutationen zeigen (Tabelle 3.2.1-2).

	KIT	PDGFRA	KIT
			vs PDGFRA
	Anzahl (%)	Anzahl (%)	p- Wert
Magen	51 (55,4)	20 (100)	<b>p= 0,0002</b>
Dünndarm	32 (34,8)	0 (0)	p= 0,002
Dickdarm	9 (9,8)	0 (0)	p=0,1
Gesamt	92 (100)	20 (100)	

Tab. 3.2.1-2: Die Tabelle zeigt für jede Lokalisation die absoluten und relativen Häufigkeiten der *KIT*mutierten und der *PDGFRA*-mutierten GIST. Weiterhin sind die beim Chi<sup>2</sup>-Test ermittelten p-Werte beim Vergleich zwischen den Mutationsgruppen pro Lokalisation angegeben.

# 3.2.2 Mutation

#### 3.2.2.1 Im Vergleich zur Morphologie

69,6% der *KIT*-mutierten GIST und 15% der *PDGFRA*-mutierten GIST wiesen eine spindelzellige Morphologie auf; damit wiesen die *KIT*-mutierten GIST signifikant häufiger eine spindelzellige Morphologie auf als die *PDGFRA*-mutierten GIST (Chi<sup>2</sup>-Test, p< 0,0001). Im Gegensatz dazu wiesen die *PDGFRA*-mutierten Tumoren mit einem Anteil von 85% signifikant häufiger eine epitheloid-gemischte Morphologie auf als die *KIT*-mutierten GIST, bei denen der Anteil 30,4% betrug (p< 0,0001) (Tabelle 3.2.2-1).

	KIT	PDGFRA	KIT vs PDGFRA
	Anzahl (%)	Anzahl (%)	p- Wert
spindelzellig	64 (69,6)	3 (15)	p< 0,0001
epitheloid- gemischt	28 (30,4)	17 (85)	p< 0,0001
Gesamt	92 (100)	20 (100)	

Tab. 3.2.2-1: Die Tabelle zeigt für jede morphologische Gruppe die absoluten und relativen Häufigkeiten der *KIT*-mutierten und *PDGFRA*-mutierten GIST. Weiterhin sind die beim Chi<sup>2</sup>-Test ermittelten p-Werte beim Vergleich zwischen den Mutationsgruppen pro morphlogischer Gruppe angegeben.

#### 3.2.2.2 Im Vergleich zur Tumorgröße

In der Untergruppe der *KIT*-mutierten GIST lag die maximale Tumorgröße zwischen 0,7 und 30 cm. Hier betrug der Mittelwert 7,4 cm ( $\pm$  5,4 cm). *PDGFRA*-mutierte GIST wiesen eine maximale Tumorgröße zwischen 1 und 11 cm auf, im Mittel betrug die Größe 5,4 cm ( $\pm$  2,8 cm). Innerhalb der beiden Mutationsgruppen bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Tumorgröße.

#### 3.2.2.3 Im Vergleich zur Mitosenanzahl

*KIT*-mutierte GIST wiesen zwischen 0 und 148 Mitosen/ 50 HPFs auf, im Mittel waren es 20,1/50 HPFs ( $\pm 35,2/50$  HPFs). In der Gruppe der *PDGFRA*-mutierten GIST lag die Anzahl der Mitosen zwischen 0 und 80/ 50 HPFs, der Mittelwert lag bei 7,4/ 50 HPFs ( $\pm 17,2/50$  HPFs). Es bestand innerhalb der Mutationsuntergruppen kein signifikanter Unterschied bezogen auf die Mitosenanzahl/ 50 HPFs.

#### 3.2.3 Morphologie

#### 3.2.3.1 Im Vergleich zur Tumorgröße

Die maximale Tumorgröße bei spindelzelligen GIST lag zwischen 0,7 und 30 cm und betrug im Mittel 6,2 cm ( $\pm$  4,9 cm). Epitheloid-gemischte Tumoren waren zwischen 1 und 21 cm groß und wiesen einen Mittelwert von 7,2 cm ( $\pm$  4,6 cm) auf.

Hinsichtlich der Tumorgröße bestand zwischen den einzelnen Morphologien kein signifikanter Unterschied.

#### 3.2.3.2 Im Vergleich zur Mitosenanzahl

Spindelzellige GIST wiesen zwischen 0 und 125 Mitosen/ 50 HPFs auf, im Mittel waren es 12,5/ 50 HPFs ( $\pm$  26,2/ 50 HPFs). In der Gruppe der epitheloid-gemischten Tumoren lag die Anzahl der Mitosen zwischen 1 und 148/ 50 HPFs; hier lag der Mittelwert bei 22,6/ 50 HPFs ( $\pm$  37,8/ 50 HPFs).

Es zeigte sich zwischen den morphologisch verschiedenen Gruppen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Mitosenanzahl/ 50 HPFs.

# 3.3 Darstellung der Expression der untersuchten Proteine

#### 3.3.1 Im Vergleich zur Lokalisation

Für alle untersuchten fünf Proteine sind die mittleren Expressionswerte (inklusive der Standardabweichung) für die einzelnen Lokalisationen in Tabelle 3.3.1-1 angegeben. Im Folgenden werden nur signifikante Unterschiede beschrieben.

E2F1 zeigte im Dünndarm eine mittlere Expression von 1,6 % ( $\pm$  1,7%) und war damit im Dünndarm signifikant niedriger exprimiert als im Magen (5,1%  $\pm$  4,9%, p= 0,0004), und im Dickdarm (3,9%  $\pm$  4,1%, p= 0,005) (Abbildung 3.3.1-1).



Abb. 3.3.1-1: Die Abbildung zeigt die prozentuale E2F1- Expression in den verschiedenen Lokalisationen.

Die Expression von Cyclin B1 war mit 8,2% ( $\pm$  8,7%) im Dünndarm signifikant höher als im Magen; dort lag die mittlere Expression bei 4,1% ( $\pm$  5,0%) (p= 0,001) (Abbildung 3.3.1-2).



Abb. 3.3.1-2: Die Abbildung zeigt die prozentuale Cyclin-B1- Expression in den verschiedenen Lokalisationen.

	Magen	Dünndarm	Dickdarm	M vs	M vs D	DD vs D
	(±Stdabw.)	(±Stdabw.)	(±Stdabw.)	DD		
				p-Wert	p-Wert	p-Wert
MYC	0,4 (± 0,9)	0,8 (± 0,9)	0,4 (± 0,8)	0,1	0,9	0,4
CCND1	5,3 (± 8,3)	3,2 (± 7,3)	5,0 (± 7,8)	0,2	0,9	0,5
CCNA2	3,3 (± 4,9)	5,3 (± 8,1)	5,9 (± 7,2)	0,08	0,1	0,8
CCNB1	4,1 (± 5,0)	8,2 (± 8,7)	4,5 (± 4,8)	0,001	0,8	0,2
<b>E2F1</b>	5,1 (± 4,9)	1,6 (± 1,7)	3,9 (± 4,1)	0,00004	0,4	0,005

Tab. 3.3.1-1: Die Tabelle zeigt die prozentuale Expression und die dazugehörige Standardabweichung (Stdabw.) der untersuchten Gene im Magen (M), Dünndarm (DD), Dickdarm (D). Weiterhin kann man aus der Tabelle die beim t-Test ermittelten p-Werte beim Vergleich der Proteinexpression zwischen jeweils zwei unterschiedlichen Lokalisationen entnehmen.

#### 3.3.2 Im Vergleich zur Morphologie

Die mittleren Expressionswerte (inklusive der Standardabweichung) für die morphologischen Gruppen sind für alle untersuchten Proteine in Tabelle 3.3.2-1 angegeben. Im Folgenden werden nur signifikante Unterschiede dargestellt.

Die Expression von Cyclin A2 war in epitheloid-gemischten Tumoren 2,1-fach höher als in spindelzelligen Tumoren (p=0,003).

Auch die Expression von Cyclin B1 war in epitheloid-gemischten GIST höher als in spindelzelligen GIST, hier lag der Faktor bei 1,7 (p=0,01) (Abbildung 3.3.2-1).



Abb. 3.3.2-1: Diese Abbildung zeigt die prozentuale Expression von Cyclin A2 und Cyclin B1 in spindelzelligen und epitheloid-gemischten GIST.

	spindelzellig	epitheloid-gemischt	spindelzellig
	(±Stdabw.)	(±Stdabw.)	VS
			epitheloid-gemischt
			Verhältnis/ p-Wert
MYC	0,4 (± 0,6)	0,7 (± 1,1)	0,2
CCND1	4,7 (± 8,3)	4,7 (± 7,6)	1,0
CCNA2	2,9 (± 4,6)	6,0 (± 7,8)	0,48/ 0,003
CCNB1	4,1 (± 5,4)	7,0 (± 7,5)	0,59/ 0,01
E2F1	3,8 (± 4,2)	4,2 (± 4,8)	0,6

Tab. 3.3.2-1: Die Tabelle zeigt die prozentuale Expression und die dazugehörige Standardabweichung (Stdabw.) der untersuchten Gene in spindelzelligen und epitheloid-gemischten GIST. Weiterhin kann man aus der Tabelle die beim t-Test ermittelten p-Werte beim Vergleich der Proteinexpression zwischen jeweils zwei unterschiedlichen Morphologien entnehmen. Bei den signifikanten Unterschieden wurde vor dem p-Wert zusätzlich das Verhältnis der Proteinexpressionen angegeben.

#### 3.3.3 Im Vergleich zur Tumorgröße

Die mittleren Expressionswerte für GIST kleiner als 5 cm und für GIST größer als 5 cm sind für alle untersuchten Proteine in Tabelle 3.3.3-1 angegeben. Im Folgenden werden nur signifikante Unterschiede dargestellt.

Die mittlere Expression von E2F1 betrug in GIST kleiner als 5 cm 3,0 % ( $\pm$  4,4%) und in GIST größer als 5 cm 4,8 % ( $\pm$  4,3%). E2F1 war damit in Tumoren, die größer als 5 cm waren, signifikant höher exprimiert als in GIST, deren Größe weniger als 5 cm betrug (p= 0,02) (Abbildung 3.3.3-1).



Abb. 3.3.3-1: Die Abbildung zeigt die prozentuale Expression von E2F1 in GIST < 5 cm und in GIST > 5 cm.

Bei Cyclin B1 betrug die mittlere Expression in GIST kleiner als 5 cm 4,3% ( $\pm$  5,2%) und in GIST größer als 5 cm 6,1% ( $\pm$ 7,3%). Cyclin B1 war damit in Tumoren, die größer als 5 cm waren, tendenziell höher exprimiert (p=0,09).

Die mittlere Expression von Myc betrug in GIST kleiner als 5 cm 0,3% ( $\pm$  0,4%) und in GIST größer als 5 cm 0,7% ( $\pm$  1,1%), diese höhere Expression von Myc in GIST größer als 5 cm war im Vergleich knapp nicht signifikant (p= 0,06) (Abbildung 3.3.3-2).



Abb. 3.3.3-2: Die Abbildung zeigt die prozentuale Expression von Myc und Cyclin B1 in GIST < 5 cm und in GIST > 5 cm. Beide Proteine zeigten eine tendenziell höhere Expression in GIST größer als 5 cm.

	< 5 (±Stdabw.)	> 5 (±Stdabw.)	p-Wert
MYC	0,3 (± 0,4)	0,7 (± 1,1)	0,06
CCND1	3,7 (± 7,1)	5,4 (± 8,7)	0,2
CCNA2	3,8 (± 6,1)	4,4 (± 6,3)	0,6
CCNB1	4,3 (± 5,2)	6,1 (± 7,3)	0,09
E2F1	3,0 (± 4,4)	4,8 (± 4,3)	0,02

Tab. 3.3.3-1: Die Tabelle zeigt die prozentuale Expression und die dazugehörige Standardabweichung (Stdabw.) der untersuchten Gene in GIST < 5 cm und in GIST > 5 cm. Weiterhin kann man aus der Tabelle die beim t-Test ermittelten p-Werte beim Vergleich der Proteinexpression zwischen den beiden Tumorgrößen-Gruppen entnehmen.

#### 3.3.4 Im Vergleich zur Mitosenanzahl

Für alle untersuchten Proteine sind die mittleren Expressionswerte in GIST mit weniger als 5 Mitosen/ 50 HPFs und in GIST mit mehr als 5 Mitosen/ 50 HPFs in Tabelle 3.3.4-1 angegeben.

Der Unterschied bei E2F1 war zwar knapp nicht signifikant (p=0,053), jedoch kann man erkennen, dass E2F1 in GIST mit mehr als 5 Mitosen/ 50 HPFs höher exprimiert war als in

GIST mit weniger als 5 Mitosen/ 50 HPFs (Abbildung 3.3.4-1). In Tumoren mit mehr als 5 Mitosen/ 50 HPFs betrug die mittlere Expression von E2F1 5,0% ( $\pm$  4,1%), in Tumoren mit weniger als 5 Mitosen/ 50 HPFs lag sie bei 3,4 % ( $\pm$  4,5%).



Abb. 3.3.4-1: Die Abbildung zeigt die prozentuale Expression von E2F1 in GIST mit weniger als 5 Mitosen/ 50 HPFs und in GIST mit mehr als 5 Mitosen/ 50 HPFs.

	< 5 (±Stdabw.)	> 5 (±Stdabw.)	p-Wert
МҮС	0,5 (± 0,9)	0,5 (± 0,9)	0,9
CCND1	4,7 (± 8,2)	4,6 (± 7,8)	1,0
CCNA2	3,7 (± 6,4)	4,7 (± 5,8)	0,4
CCNB1	4,8 (± (6,4)	6,0 (± 6,6)	0,3
<b>E2F1</b>	3,4 (± 4,5)	5,0 (± 4,1)	0,053

Tab. 3.3.4-1: Die Tabelle zeigt die prozentuale Expression und die dazugehörige Standardabweichung (Stdabw.) der proliferationsfördernden Gene in GIST mit weniger als 5 Mitosen/ 50 HPFs und in GIST mit mehr als 5 Mitosen/ 50 HPFs. Weiterhin kann man aus der Tabelle die beim t- Test ermittelten p-Werte beim Vergleich der Proteinexpression zwischen den beiden Mitosenanzahl- Gruppen entnehmen.

### 3.3.5 Im Vergleich zur Mutation

Die mittleren Expressionswerte in *KIT*-mutierten und *PDGFRA*-mutierten GIST sind für alle untersuchten fünf Proteine in Tabelle 3.3.5-1 angegeben. Im Folgenden werden nur signifikante Unterschiede dargestellt.

Cyclin D1 wies bei *KIT*-mutierten GIST eine mittlere Expression von 5,6% ( $\pm$  8,7%) auf und war somit in dieser Mutationsuntergruppe signifikant höher exprimiert als in *PDGFRA*-mutierten GIST mit einer mittleren Cyclin-D1-Expression von 1,3% ( $\pm$  3,0%) (p= 0,04) (Abbildung 3.3.5-1).



Abb. 3.3.5-1: Gezeigt ist die prozentuale Expression von Cyclin D1 in *KIT*-mutierten und in *PDGFRA*-mutierten GIST.

	<i>KIT</i> (±Stdabw.)	PDGFRA (±Stdabw.)	<i>KIT</i> vs <i>PDGFRA</i>
MYC	0,5 (± 0,7)	0,8 (± 1,8)	0,4
CCND1	5,6 (± 8,7)	1,3 (± 3,0)	0,04
CCNA2	3,6 (± 6,2)	3,7 (± 6,3)	1,0
CCNB1	5,8 (± 7,1)	3,9 (± 6,0)	0,3
E2F1	3,9 (± 4,1)	2,5 (± 2,0)	0,2

Tab. 3.3.5-1: Aus der Tabelle können die prozentuale Expression (inklusive der Standardabweichung) der untersuchten Proteine in den jeweiligen Mutationen und die Signifikanzwerte beim Vergleich zwischen den beiden Mutationsuntergruppen entnommen werden.

#### 3.3.6 Im Vergleich zur Mutation unter Berücksichtigung der Lokalisation

In Tabelle 3.3.6-1 sind für alle untersuchten fünf Proteine die mittleren Expressionswerte in *PDGFRA*-mutierten GIST im Magen und in *KIT*-mutierten GIST im Magen, Dünndarn und Dickdarm angegeben. Im Folgenden werden nur signifikante Unterschiede dargestellt. Dabei werden zunächst die Unterschiede aufgezeigt, die im Magen zwischen *PDGFRA*-mutierten und *KIT*-mutierten GIST bestanden. Im Anschluss daran werden die Unterschiede aufgezeigt, die je nach Lokalisation in der Gruppe der *KIT*-Mutationen bestehen.

Cyclin D1 wies mit einem prozentualen Anteil von 6,5% ( $\pm$  9,0%) eine signifikant höhere Expression in *KIT*-mutierten GIST im Magen auf als in *PDGFRA*-mutierten GIST im Magen, wo die mittlere Expression 1,3 % ( $\pm$  3,0%) betrug (p= 0,02).

Auch E2F1 zeigte diesen Unterschied und war in *KIT*-Mutationen im Magen mit 5,3% ( $\pm$  4,4%) höher exprimiert als in *PDGFRA*-Mutationen im Magen; bei letzterem betrug der Mittelwert der Expression 2,5% ( $\pm$  2,0%) (p= 0,01) (Abbildung 3.3.6-1).



Abb. 3.3.6-1: Die Abbildung zeigt die prozentuale Expression von Cyclin D1 und E2F1 in *PDGFRA*mutierten GIST im Magen und in *KIT*-mutierten GIST im Magen.

Innerhalb der Gruppe der *KIT*-mutierten Tumore war die E2F1-Expression in den GIST aus Magen und Dickdarm jeweils signifikant höher als in den GIST aus dem Dünndarm (p= 0,0001 bzw. p= 0,04). In *KIT*-mutierten GIST im Magen betrug die mittlere Expression von E2F1 5,3% ( $\pm$  4,4%), im Dünndarm 1,8% ( $\pm$  1,9%) und im Dickdarm 4,1% ( $\pm$  4,9%).

Auch Cyclin D1 zeigte ein ähnliches Muster, wenngleich die Werte nicht signifikant waren. So betrug die Expression von Cyclin D1 in *KIT*-mutierten GIST aus dem Magen 6,5% ( $\pm$  9,0%) und war damit tendenziell höher als in *KIT*-mutierten GIST aus dem Dünndarm, wo die mittlere Expression 3,7% ( $\pm$  8,0%) betrug. In *KIT*-mutierten GIST aus dem Dickdarm lag die mittlere Expression von Cyclin D1 bei 7,2% ( $\pm$  8,7%) und war auch hier tendenziell höher als in *KIT*-mutierten GIST aus dem Dickdarm lag die mittlere Expression von Cyclin D1 bei 7,2% ( $\pm$  8,7%) und war auch hier tendenziell höher als in *KIT*-mutierten GIST aus dem Dünndarm.



Abb. 3.3.6-2: Die Abbildung zeigt die prozentuale Expression von Cyclin D1 und E2F1 in *KIT*-mutierten GIST im Magen, Dünndarm und Dickdarm. E2F1 wies hierbei signifikant niedrigere Werte im Dünndarm auf als im Magen und Dickdarm. Cyclin D1 wies keine signifikanten Werte auf, ahmt das Muster, welches von E2F1 beschrieben wurde, jedoch nach.

Myc, Cyclin A2 und Cyclin B1 zeigten ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlich lokalisierten GIST mit einer *KIT*-Mutation. Alle drei Proteine waren signifikant höher in *KIT*-mutierten GIST im Dünndarm exprimiert als in *KIT*-mutierten Tumoren im Magen (Myc: p=0,01; Cyclin A2: p=0,01; Cyclin B1: p=0,001).

Die mittleren Expressionswerte betrugen für Myc in *KIT*-mutierten GIST im Magen 0,3% ( $\pm$  0,4%), im Dünndarm 0,8% ( $\pm$  1,0%) und im Dickdarm 0,5% ( $\pm$  0,9%).

Bei Cyclin A2 betrugen die mittleren Expressionswerte in *KIT*-mutierten GIST im Magen 2,3% ( $\pm$  2,8%), im Dünndarm 5,8% ( $\pm$  8,9%) und im Dickdarm 3,8% ( $\pm$  7,1).

Bei Cyclin B1 lag die mittlere Expression in *KIT*-mutierten GIST im Magen bei 3,9% ( $\pm$  5,1%), im Dünndarm bei 9,4% ( $\pm$  9,0%) und im Dickdarm bei 4,2% ( $\pm$  5,0) (Abbildung 3.3.6-3).



Abb. 3.3.6-3: Die Abbildung zeigt die prozentuale Expression von Myc, Cyclin A2 und Cyclin B1 in *KIT*mutierten GIST im Magen, Dünndarm und Dickdarm.

	PDGFRA-	KIT-	KIT-	KIT-	PDGFRA-	KIT-	KIT-	KIT-
	Μ	Μ	DD	D	Μ	Μ	Μ	DD
	(±Stdabw.)	(±Std-	(±Std-	(±Std-	vs	vs	VS	VS
		abw.)	abw.)	abw.)	KIT-M	KIT-	KIT-	KIT- D
						DD	D	
MYC	0,8 (±1,8)	0,3 (±0,4)	0,8 (±1,0)	0,5 (±0,9)	0,2	0,01	0,3	0,5
CCND1	1,3 (±3,0)	6,5 (±9,0)	3,7 (±8,0)	7,2 (±8,7)	0,02	0,2	0,8	0,3
CCNA2	3,7 (±6,3)	2,3 (±2,8)	5,8 (±8,9)	3,8 (±7,1)	0,2	0,01	0,3	0,6
CCNB1	3,9 (±6,0)	3,9 (±5,1)	9,4 (±9,0)	4,2 (±5,0)	1,0	0,001	0,9	0,1
E2F1	2,5 (±2,0)	5,3 (±4,4)	1,8 (±1,9)	4,1 (±4,9)	0,01	0,0001	0,5	0,04

Tab. 3.3.6-1: Die Tabelle zeigt die prozentuale Expression (inklusive der Standardabweichung) der utersuchten Proteine in *PDGFRA*-mutierten GIST im Magen (*PDGFRA*-M) und in *KIT*-mutierten GIST im Magen (*KIT*-M), Dünndarn (*KIT*-DD) und Dickdarm (*KIT*-D). Weiterhin können die beim t-Test ermittelten p-Werte beim Vergleich zwischen den unterschiedlich lokalisierten Mutationen entnommen werden.

# 3.3.7 Im Vergleich zur Mutation unter Berücksichtigung der Morphologie

Für alle untersuchten Proteine sind die mittleren Expressionswerte in spindelzelligen GIST mit *KIT*-Mutation und in epitheloid-gemischten GIST mit *KIT*-Mutation und *PDGFRA*-Mutation in Tabelle 3.3.7-1 angegeben. Im Folgenden werden nur signifikante Unterschiede dargestellt.

Beim Vergleich zwischen spindelzelligen und epitheloid-gemischten GIST mit *KIT*-Mutation zeigte sich, dass Cyclin B1 mit einer mittleren Expression von 8,5% ( $\pm$  8,8%) in epitheloid-gemischten GIST signifikant höher exprimiert war als in spindelzelligen GIST mit *KIT*-Mutation, wo die mittlere Expression 4,6% ( $\pm$  5,8%) betrug (p = 0,02) (Abbildung 3.3.7-1).



Abb. 3.3.7-1: Die Abbildung zeigt die prozentuale Expression von Cyclin B1 in spindelzelligen GIST (*KIT*-spindelzellig) und epitheloid-gemischten GIST (*KIT*-ep-gem) mit *KIT*-Mutation und in epitheloid-gemischten GIST mit *PDGFRA*-Mutation (*PDGFRA*-ep-gem).

Vergleicht man den Mutationstyp bei gleicher Morphologie, so zeigt sich, dass Cyclin D1 in *KIT*-mutierten GIST mit epitheloid-gemischter Morphologie mit einer Expression von 5,9% ( $\pm$  7,7%) signifikant höhere Werte aufwies als in *PDGFRA*-mutierten GIST mit epitheloid-gemischter Morphologie; hier betrug die Expression 1,6% ( $\pm$  3,3%) (p= 0,04) (Abbildung 3.3.7-2).



Abb. 3.3.7-2: Die Abbildung zeigt die prozentuale Expression von Cyclin D1 in spindelzelligen GIST (*KIT*-spindelzellig) und epitheloid-gemischten GIST (*KIT*-ep-gem) mit *KIT*-Mutation und in epitheloid-gemischten GIST mit *PDGFRA*-Mutation (*PDGFRA*-ep-gem).

	KIT-	KIT-	PDGFRA-	KIT-	KIT-
	spindelzellig	epitheloid-	epitheloid-	spindelzellig	epitheloid-
	(±Stdabw.)	gemischt	gemischt	VS	gemischt
		(±Stdabw.)	(±Stdabw.)	KIT-	vs PDGFRA-
				epitheloid-	epitheloid-
				gemischt	gemischt
MYC	0,4 (0,7)	0,6 (± 0,8)	0,8 (± 1,8)	0,4	0,7
CCND1	5,5 (± 9,1)	5,9 (± 7,7)	1,6 (± 3,3)	0,9	0,04
CCNA2	2,9 (± 5,1)	5,2 (± 8,0)	4,2 (± 6,8)	0,1	0,7
CCNB1	4,6 (± 5,8)	8,5 (± 8,8)	4,5 (± 6,4)	0,02	0,1
E2F1	3,6 (± 3,8)	4,7 (± 4,7)	2,6 (± 2,1)	0,3	0,1

Tab. 3.3.7-1: Die Tabelle zeigt die prozentuale Expression (inklusive der Standardabweichung) der untersuchten Proteine in spindelzelligen und epitheloid-gemischten GIST mit *KIT*-Mutation (*KIT*-spindelzellig bzw. *KIT*-ep-gem) und in epitheloid-gemischten GIST mit *PDGFRA*-Mutation (*PDGFRA*-ep-gem). Weiterhin können die beim t-Test ermittelten p-Werte beim Vergleich zwischen den morphologisch unterschiedlichen Mutationen entnommen werden.

# 3.4 Darstellung des klinischen Verlaufs in Zusammenhang mit den klinisch-pathologischen Parametern

# 3.4.1 Lokalisation und klinischer Verlauf

Die Lokalisation des gastrointestinalen Stromatumors hatte einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation.

Patienten mit einem GIST im Magen wiesen eine höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit auf als Patienten mit einem GIST im Dünndarm (Log-Rang-Test, p=0,0009) (Abbildung 3.4.1-1).



Abb. 3.4.1-1: Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 148 Patienten mit GIST, getrennt nach der Lokalisation des Tumors.

#### 3.4.2 Morphologie und klinischer Verlauf

Im Vergleich zwischen spindelzelligen und epitheloid-gemischten GIST ergab sich kein signifikanter Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation (p=0,1) (Abbildung 3.4.2-1).



Abb. 3.4.2-1: Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 148 Patienten mit GIST, getrennt nach der Morphologie des Tumors.

## 3.4.3 Tumorgröße und klinischer Verlauf

Die Tumorgröße des gastrointestinalen Stromatumors hatte einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation, wobei die Patienten mit einem GIST kleiner als 5 cm eine höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit aufwiesen als die Patienten mit einem GIST größer als 5 cm (p < 0,00001) (Abbildung 3.4.3-1).



Abb. 3.4.3-1: Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 148 Patienten mit GIST, getrennt nach der Tumorgröße.

# 3.4.4 Mitosenanzahl und klinischer Verlauf

Die Mitosenanzahl/ 50 HPFs hatte einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation. Die Patienten mit einem GIST mit weniger als 5 Mitosen/ 50 HPFs zeigten eine höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit als die Patienten mit einem GIST mit mehr als 5 Mitosen/ 50 HPFs (p<0,00001) (Abbildung 3.4.4-1).



Abb. 3.4.4-1: Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 148 Patienten mit GIST, getrennt nach der Mitosenanzahl/ 50 HPFs.

# 3.4.5 Mutationsstatus und klinischer Verlauf

Der Vergleich zwischen *KIT*-mutierten GIST und *PDGFRA*-mutierten GIST zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation (p=0,1), wobei jedoch Patienten mit einem *KIT*-mutierten GIST tendenziell eine niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit hatten als Patienten mit einem *PDGFRA*-mutierten GIST (Abbildung 3.4.5-1).



Abb. 3.4.5-1: Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 148 Patienten mit GIST, getrennt nach dem Mutationsstatus.

# 3.4.6 Mutationsstatus unter Berücksichtigung der Lokalisation und klinischer Verlauf

Die unterschiedlich lokalisierten Mutationstypen hatten einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation.

Patienten mit *KIT*-mutierten GIST im Dünndarm wiesen eine signifikant niedrigere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit auf als Patienten mit *KIT*-mutierten GIST im Magen (p=0,007) und als Patienten mit *PDGFRA*-mutierten GIST im Magen (p=0,02) (Abbildung 3.4.6-1).



Abb. 3.4.6-1: Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 148 Patienten mit GIST, getrennt nach dem Mutations-Lokalisations-Status.

# 3.4.7 Mutationsstatus unter Berücksichtigung der Morphologie und klinischer Verlauf

Patienten mit *KIT*-mutierten GIST, die eine epitheloid-gemischte Morphologie aufwiesen, zeigten eine signifikant niedrigere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten, deren Tumore ebenfalls epitheloid-gemischt waren, aber *PDGFRA*-Mutationen besaßen (p= 0,048).

Des Weiteren zeigten innerhalb der *KIT*-mutierten GIST die Patienten mit einem epitheloidgemischten Tumor eine signifikant niedrigere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit einem spindelzelligen Tumor (p=0,048) (Abbildung 3.4.7-1).



Abb. 3.4.7-1: Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 148 Patienten mit GIST, getrennt nach dem Mutations-Morphologie-Status.

# 3.5 Prognostische Bedeutung der proliferationsassoziierten Antikörper

Die proliferationsassoziierten Antikörper wurden hinsichtlich des Krankheitsprogresses und des krankheitsfreien Überlebens untersucht und im Hinblick auf den klinischen Verlauf näher betrachtet. Für die prognostische Beurteilung der Expression der einzelnen Proteine wurden die Patienten jeweils in zwei Gruppen unterteilt: in der einen Gruppe waren die Patienten, bei denen die Expression des jeweiligen Proteins oberhalb des Medians lag (bezogen auf alle Patienten), in der anderen Gruppe waren die Patienten mit einer Proteinexpression unterhalb des Medians.

Drei der insgesamt fünf Proteine zeigten sich prognostisch relevant. Bei E2F1 konnte zusätzlich ein lokalisationsspezifischer Unterschied gefunden werden, der bei den anderen Proteinen nicht vorlag.

### 3.5.1 E2F1 und klinischer Verlauf

Die Expression von E2F1 hatte einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation. Beim Vergleich der beiden Gruppen, die eine Expression über bzw. unter dem Median aufwiesen, lag ein signifikanter Unterschied vor (p=0,03). So wiesen GIST, die eine E2F1-Expression unterhalb des Median-Wertes zeigten, eine signifikant höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlich auf als solche, die eine E2F1-Expression oberhalb des Median-Wertes zeigten. (Abbildung 3.5.1-1).



Abb. 3.5.1-1: Die Abbildung zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 148 Patienten mit GIST, getrennt nach der Expression von E2F1 in den Tumoren.

#### 3.5.1.1 Lokalisationsspezifische Unterschiede bei E2F1

Betrachtet man den klinischen Verlauf der GIST im Hinblick auf die Expression von E2F1 näher, so zeigen sich Unterschiede bezogen auf die *KIT*-mutierten GIST im Magen, Dünndarm und Dickdarm.

Die Expression von E2F1 bei *KIT*-mutierten GIST im Magen zeigte beim Vergleich der beiden Gruppen, die eine Expression über bzw. unter dem Median aufwiesen, keinen signifikanten Unterschied (p=0.9) (Abbildung 3.5.1-2).



Abb. 3.5.1-2: Die Abbildung zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 51 Patienten mit *KIT*mutiertem Magen-GIST, getrennt nach der Expression von E2F1.

Hingegen zeigte die Expression von E2F1 bei Patienten mit *KIT*-mutierten GIST im Dünndarm und im Dickdarm einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation. Patienten mit einer E2F1-Expression unterhalb des Medians wiesen im Dünndarm und im Dickdarm eine höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit auf als die Patienten mit einer E2F1-Expression oberhalb des Medians (Dünndarm: p= 0,003; Dickdarm: p= 0,01) (Abbildung 3.5.1-3 und 3.5.1-4).



Abb. 3.5.1-3: Die Abbildung zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 32 Patienten mit *KIT*mutiertem Dündnarm-GIST, getrennt nach der Expression von E2F1.



Abb. 3.5.1-4: Die Abbildung zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 9 Patienten mit *KIT*mutiertem Dickdarm-GIST, getrennt nach der Expression von E2F1.

#### 3.5.2 Cyclin A2 und klinischer Verlauf

Die Expression von Cyclin A2 hatte einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation. Bei den Patienten mit GIST mit einer Cyclin-A2-Expression unterhalb des Median-Wertes lag eine signifikant höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit vor als bei solchen mit einer Cyclin-A2-Expression oberhalb des Median-Wertes (p=0,0008) (Abbildung 3.5.2-1).



Abb. 3.5.2-1: Die Abbildung zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 148 Patienten mit GIST, getrennt nach der Expression von Cyclin A2 in den Tumoren.

#### 3.5.3 Cyclin B1 und klinischer Verlauf

Die Expression von Cyclin B1 hatte einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation. So lag bei den Patienten mit GIST, die eine Cyclin-B1-Expression unterhalb des Median-Wertes zeigten, eine signifikant höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlich vor als bei solchen, die eine Expression von Cyclin B1 oberhalb des Median-Wertes zeigten (p=0,0009) (Abbildung 3.5.3-1).



Abb. 3.5.3-1: Die Abbildung zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 148 Patienten mit GIST, getrennt nach der Expression von Cyclin B1 in den Tumoren.

# 3.5.4 Cyclin D1 und klinischer Verlauf

Die Expression von Cyclin D1 hatte keinen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation (Abbildung 3.5.4-1).



Abb. 3.5.4-1: Die Abbildung zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von 148 Patienten mit GIST, getrennt nach der Expression von Cyclin D1 in den Tumoren.

# 3.5.5 Myc und klinischer Verlauf

Betrachtet man den klinischen Verlauf bei GIST im Hinblick auf die Expression von Myc, so zeigt sich, dass die Expression von Myc keinen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation hatte (Abbildung 3.5.5-1).



Abb. 3.5.5-1: Die Abbildung zeigt die Kaplan- Meier- Überlebenszeitkurve von 148 Patienten mit GIST, getrennt nach der Expression von Myc in den Tumoren.

# 4 Diskussion

# 4.1 Bedeutung der klinisch-pathologischen Parameter

Die klinisch-pathologischen Faktoren Lokalisation, Morphologie, Tumorgröße, Mitosenanzahl und Mutationsstatus wurden in der vorliegenden Dissertation sowohl untereinander verglichen, als auch in Assoziation mit dem klinischen Verlauf untersucht.

#### 4.1.1 Lokalisation

In dem der vorliegenden Dissertation untersuchten Tumorkollektiv stammten 93 Tumoren aus dem Magen (62,8%), 42 Tumoren aus dem Dünndarm (28,4%) und 13 aus dem Dickdarm (8,8%).

Im Vergleich zur Morphologie sind keine signifikanten Unterschiede festgestellt worden. In der Literatur hingegen ist beschrieben, dass im Vergleich epitheloide und epitheloidgemischte GIST häufiger im Magen als im Dünndarm vorkommen (Miettinen et al. 2005; Wasag et al. 2004). In zwei von Miettinen et al. durchgeführten Studien über GIST aus dem Magen und aus dem Dünndarm zeigte sich, dass epitheloide und epitheloid-gemischte GIST aus dem Magen einen Anteil von etwa 50% hatten, wohingegen der Anteil derer aus dem Dünndarm bei ca. 14% lag (Miettinen et al. 2005; Miettinen et al. 2006a). Eine ebensolche Tendenz im Hinblick auf die epitheloid-gemischten Tumoren zeichnete sich auch im vorliegenden Kollektiv ab, wo der Anteil der epitheloid-gemischten GIST aus dem Magen bei 70,7% lag, aus dem Dünndarm hingegen nur bei 22,4%. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant, da bei Betrachtung der spindelzelligen Tumoren der Magen ebenfalls einen weitaus höhern Anteil für sich einnahm (57,8%) als der Dünndarm (32,2%). Der Grund hierfür könnte die im Tumorkollektiv grundsätzlich höhere Fallzahl der GIST aus dem Magen sein.

Der Vergleich der maximalen Tumorgröße im Magen, Dünndarm und Dickdarm zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Lokalisationen, wenngleich die maximale Tumorgröße der GIST im Magen mit im Mittel 6,2 cm ( $\pm$  4,7cm) kleiner war als die der GIST im Dünndarm mit im Mittel 7,6 cm ( $\pm$  5,1cm). Auch in der Literatur ist beschrieben, dass GIST aus dem Dünndarm dazu neigen, bei Diagnosestellung größer und fortgeschrittener zu sein als GIST aus dem Magen (Miettinen und Lasota 2006). Dies könnte mit dem klinisch aggressiveren Verhalten der GIST aus dem Dünndarm einhergehen, worauf später sowohl im Hinblick auf den klinischen Verlauf, als auch auf die untersuchten Proteine näher eingegangen wird.

Im Vergleich zur Mitosenanzahl/ 50 HPFs zeigte sich, dass GIST im Dickdarm eine signifikant höhere Mitosenanzahl/ 50 HPFs aufwiesen als GIST im Magen. Die Mitosenanzahl der GIST im Magen betrug im Mittel 12,6/ 50 HPFs (± 25,4/ 50 HPFs), während GIST im Dickdarm im Mittel eine Mitosenanzahl von 34.2/50 HPFs ( $\pm 54.1/50$ HPFs) aufwiesen. Die Mitosenanzahl als Maß für die Zellteilungsaktivität und damit die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors gilt als ein guter Parameter für die Beurteilung der Dignität von Weichteiltumoren. In der vorliegenden Dissertation müsste aufgrund der höheren Mitosenanzahl/ 50 HPFs von einem signifikant schlechteren klinischen Verlauf der GIST aus dem Dickdarm im Vergleich zum Magen ausgegangen werden, was sich jedoch nur annähernd, nicht signifikant, zeigt. Daher vermag die hohe mittlere Mitosenanzahl/ 50 HPFs im Dickdarm zusätzlich dadurch zu erklären sein, dass die Fallzahl der GIST aus dem Dickdarm im vorliegenden Kollektiv sehr gering ist und bereits wenige Tumoren mit einer hohen Mitosenanzahl/ 50 HPFs den Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung deutlich erhöhen können. So beschreiben auch Miettinen et al., dass in vielen Studien GIST aus dem Dickdarm zu selten sind für aussagekräftige statistische Analysen (Miettinen et al. 2000b; Miettinen et al. 2002).

Der Vergleich des Mutationsstatus hinsichtlich der anatomischen Lokalisation ergab ebenfalls signifikante Unterschiede. *PDGFRA*-Mutationen waren im untersuchten Kollektiv ausschließlich im Magen zu finden und somit dort signifikant häufiger als *KIT*-Mutationen. Umgekehrt waren im Dünndarm, wo keine Tumoren *PDGFRA*-mutiert waren, signifikant häufiger *KIT*-mutierte GIST zu finden. Im Dickdarm ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutationen zeigen, was wahrscheinlich erneut auf die zu geringe Fallzahl zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse stimmen mit denen in der Literatur überein. So stammten z.B. in einer Studie von Penzel et al. mit 83 untersuchten primären GIST *PDGFRA*-mutierte Tumoren signifikant häufiger aus dem Magen, während *KIT*-Mutationen je nach

Mutationstyp sowohl im Magen, als auch im Dünn- und Dickdarm vorkamen (Penzel et al. 2005). Auch Miettinen et al. zeigten in zwei groß angelegten Studien, dass *PDGFRA*-Mutationen lediglich im Magen, *KIT*-Mutationen hingegen im Magen und Dünndarm vorkamen (Miettinen et al. 2005; Miettinen et al. 2006a).

Im Hinblick auf den klinischen Verlauf zeigten GIST aus dem Magen eine signifikant höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit als GIST aus dem Dünndarm. Dies spiegelt sich auch häufig in der Literatur wider, da in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass GIST aus dem Magen einen besseren klinischen Verlauf und ein längeres progressfreies Überleben zeigen als GIST aus dem Dünndarm gleicher Größe und gleicher mitotischer Aktivität (Corless et al. 2004; Haller et al. 2007; Hirota und Isozaki 2006; Miettinen und Lasota 2006; Miettinen et al. 2006a). Dieses Ergebnis wurde in der Literatur jedoch nicht durchweg bestätigt. So konnten z.B. Nilsson et al. in einer populations-basierten Studie aus Westschweden keine signifikante Korrelation zwischen der anatomischen Lokalisation und dem Gesamtüberleben zeigen, wenngleich die Patienten dieser Studie mit GIST im Magen ein 10% niedrigeres Risiko zeigten, daran zu versterben, als Patienten mit GIST aus dem Dünndarm (Nilsson et al. 2005).

Die Ursachen für einen aggressiveren Verlauf der GIST aus dem Dünndarm könnten darin liegen, dass GIST aus dem Dünndarm dazu neigen, größer zu sein und eine höhere mitotische Aktivität aufzuweisen als GIST aus dem Magen. Diese Tendenz hängt sicherlich auch damit zusammen, dass *PDGFRA*-Mutationen mit niedrigerem malignen Potential als *KIT*-Mutationen fast ausnahmslos im Magen vorkommen (Lasota et al. 2004). Obwohl die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation hinsichtlich unterschiedlicher Tumorgrößen und Mitosenanzahlen keine Signifikanzen zeigen, weisen sie doch auf eine solche Tendenz hin. Ein weiterer Grund könnte eine unterschiedliche Expression bestimmter Gene bzw. Proteine sein, worauf im späteren Verlauf der Diskussion genauer eingegangen wird.

Es bleibt zunächst jedoch unklar, ob der Unterschied bereits vor der neoplastischen Transformation determiniert wird oder ob die unterschiedlichen klinischen Verläufe der GIST aus dem Magen und Dünndarm Konsequenzen aus verschiedenen genetischen Ereignissen sind, die sich erst nach der neoplastischen Transformation zugetragen haben (Haller et al. 2007).

63

#### 4.1.2 Mutationsstatus

Für die Untersuchungen lagen 92 GIST mit einer *KIT*-Mutation (82,1%) und 20 GIST mit einer *PDGFRA*-Mutation (17,9%) vor.

Der Vergleich der Morphologie in Bezug auf den Mutationsstatus ergab, dass *PDGFRA*mutierte GIST signifikant häufiger eine epitheloid-gemischte Morphologie aufwiesen. Demgegenüber wiesen GIST mit einer *KIT*-Mutation signifikant häufiger ein spindelzelliges Wachstumsmuster auf.

Diese Ergebnisse decken sich mit Äußerungen in der Literatur. In einer populations-basierten Studie aus Nordnorwegen zeigten acht von neun *PDGFRA*-mutierten GIST eine epitheloide Morphologie (Steigen et al. 2007). *KIT*-Mutationen hingegen neigen dazu, eher in spindelzelligen Tumoren aufzutreten (Miettinen et al. 2005; Wardelmann et al. 2002). Ebenso zeigten weitere Studien diesbezüglich ähnliche Ergebnisse (Antonescu et al. 2003; Lasota et al. 2004; Miettinen und Lasota 2006).

Hinsichtlich der Tumorgröße und der Mitosenanzahl/ 50 HPFs konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Mutationsstatus festgestellt werden. Dennoch ist anhand der Ergebnisse zu vermuten, dass *KIT*-mutierte GIST dazu tendieren, größer und mitotisch aktiver zu sein als *PDGFRA*-mutierte GIST. Die letztgenannten zeigten eine mittlere Tumorgröße von 5,4 cm ( $\pm$  2,8 cm) und eine mittlere Mitosenanzahl von 7,4/ 50 HPFs ( $\pm$  17,2/ 50 HPFs), wohingegen *KIT*-mutierte GIST mit im Mittel 7,4 cm ( $\pm$  5,4 cm) größer und mit einer mittleren Mitosenanzahl von 20,1/ 50 HPFs ( $\pm$  35,2/ 50 HPFs) mitotisch aktiver waren. In der Literatur sind wenige Angaben dazu gemacht worden. Lediglich in der populations-basierten Studie von Steigen et al. lässt sich erkennen, dass auch dort *KIT*-mutierte GIST im Mittel zwischen 1,6 bis 3,1 cm größer waren als GIST mit einer *PDGFRA*-Mutation (Steigen et al. 2007). Da die Tumorgröße und auch die Mitosenanzahl zu den klassischen Prognosefaktoren zählen, könnte auch hierin ein zusätzlicher Zusammenhang liegen, dass *KIT*-mutierte GIST ein kürzeres progressfreies Überleben und somit eine schlechtere klinische Prognose zeigen als GIST mit einer *PDGFRA*-Mutation (Haller et al. 2007; Lasota et al. 2004).

Auch in den vorliegenden Ergebnissen war zu erkennen, dass *PDGFRA*-mutierte GIST tendenziell eine höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit aufwiesen als *KIT*-mutierte Tumoren. Betrachtet man weiterhin den klinischen Verlauf des Mutationsstatus unter

Berücksichtigung der Lokalisation, so zeigte sich, dass *PDGFRA*-mutierte und *KIT*-mutierte GIST aus dem Magen jeweils einen signifikant besseren klinischen Verlauf aufwiesen als *KIT*-mutierte GIST aus dem Dünndarm. Dieses Resultat unterstützt die oben genannte Aussage, dass GIST aus dem Magen einen besseren klinischen Verlauf aufweisen als GIST aus dem Dünndarm. Vor allem das Ergebnis, dass innerhalb der *KIT*-Mutationen die Tumoren aus dem Magen eine höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen als solche aus dem Dünndarm, macht dies deutlich.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so gelangt man zu der Schlussfolgerung, dass *PDGFRA*-Mutationen, die vorrangig in epitheloid-gemischten GIST auftreten, fast ausschließlich im Magen vorkommen und eine bessere Prognose aufzeigen als *KIT*-Mutationen, welche häufiger in spindelzelligen GIST auftreten, und im Vergleich häufiger im Dünndarm zu finden sind.

### 4.1.3 Morphologie

Im untersuchten Tumorkollektiv lagen 90 spindelzellige (60%), 15 epitheloide (10,1%) und 43 morphologisch gemischte (29.1%) GIST vor, wobei die epitheloiden und gemischten Tumore aufgrund ihrer geringen Fallzahl als eine gemeinsame Gruppe betrachtet wurden.

Im Vergleich zur Tumorgröße und Mitosenzahl zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Es war jedoch zu erkennen, dass im vorliegenden Kollektiv die epitheloid-gemischten GIST im Mittel 1 cm größer waren und 10,1 Mitosen/ 50 HPFs mehr aufwiesen als die spindelzelligen GIST. In der Literatur ist von einigen Autoren eine epitheloidzellige Morphologie bei GIST aus dem Dünndarm mit einer ungünstigen Prognose und einer malignen Transformation in Verbindung gebracht worden (Miettinen und Lasota 2006). Geht man nun also davon aus, dass die epitheloid-gemischten GIST aus dem Dünndarm im vorliegenden Kollektiv maligne transformiert sind, die epitheloid-gemischten GIST aus dem Magen jedoch einen besseren klinischen Verlauf haben, so könnte die gemeinsame Untersuchung der beiden verschiedenen lokalisierten epitheloid-gemischten GIST der Grund sein, weshalb diese Gruppe geringfügig höhere Werte bei der Tumorgröße und Mitosenanzahl aufgewiesen hat. Es wäre zu überprüfen, ob bei alleiniger Betrachtung der epitheloid-gemischten GIST aus dem Magen ein ebensolches Ergebnis erkennbar ist.
Hinsichtlich des klinischen Verlaufs konnte kein signifikanter Unterschied zwischen spindelzelligen und epitheloid-gemischten GIST festgestellt werden. Auch Nilsson et al. stellten in einer populations-basierten Studie mit 288 GIST keine signifikante Korrelation zwischen der Überlebenszeit und dem histologischen Wachstumsmuster fest (Nilsson et al. 2005). Eine Vorhersage des klinischen Verlaufs, welche auf rein morphologischen Kriterien basiert, sei besonders schwierig, so Fletcher. In der Vergangenheit wurde allerdings vermutet, dass die Gefahr der malignen Entartung in epitheloiden GIST geringer sei als in spindelzelligen GIST (Fletcher et al. 2002). Lediglich zwischen den histologischen Subtypen im Magen konnten Miettinen et al. in einer Studie darstellen, dass spindelzellige sarkomatöse GIST eine signifikant schlechtere Prognose aufwiesen als epitheloide sarkomatöse Tumore (Miettinen et al. 2005). Singer et al. wiederum kamen in einer Studie aus dem Jahr 2002 zu dem Ergebnis, dass Patienten mit spindelzelligem GIST eine 5-Jahres-Überlebensrate von 49 % ( $\pm$  7%) besaßen, Patienten mit einem morphologisch epitheloiden oder gemischten GIST jedoch nur von 23% ( $\pm$ 11%) (Singer et al. 2002).

Betrachtet man weiterhin den klinischen Verlauf der Morphologie unter Berücksichtigung des Mutationsstatus, so zeigte sich, dass epitheloid-gemischte GIST mit einer *PDGFRA*-Mutation einen signifikant besseren klinischen Verlauf aufwiesen als epitheloid-gemischte GIST mit einer *KIT*-Mutation. Die letztgenannten Tumoren zeigten jedoch einen signifikant schlechteren klinischen Verlauf als spindelzellige *KIT*-mutierte GIST. Dies macht deutlich, dass bei gleicher Morphologie vor allem die Art der Mutation für den klinischen Verlauf von Bedeutung ist und eine *PDGFRA*-Mutation in GIST eine höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit bei gleicher Morphologie aufweist als eine *KIT*-Mutation.

Eine epitheloid-gemischte Morphologie der *KIT*-mutierten GIST im Dünndarm ist jedoch signifikant assoziiert mit malignem Verhalten und wies eine schlechtere Prognose auf als eine spindelzellige Morphologie der *KIT*-mutierten GIST im Dünndarm. Das epitheloid-gemischte Wachstumsmuster der GIST aus dem Dünndarm scheint sich morphologisch von dem epitheloiden GIST aus dem Magen zu unterscheiden. Daher wird in diesem Fall eine maligne Transformation vermutet, welche von ursprünglich weniger malignen Spindelzelltumoren ihren Ausgang nimmt (Miettinen und Lasota 2006).

#### 4.1.4 Tumorgröße

Die Tumorgröße hatte einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation. Patienten mit einem GIST kleiner als 5 cm wiesen eine höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit auf als die Patienten mit einem GIST größer als 5 cm.

Dieses Ergebnis deckt sich mit Angaben in der Literatur. DeMatteo et al. fanden in einer Studie heraus, dass die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten nach Entfernung des Primärtumors bei GIST mit einer Größe unter 5 cm bei ca. 70% lag, bei GIST mit einer Größe von über 10 cm jedoch nur bei ca. 20% (DeMatteo et al. 2000). In einer weiteren Studie mit 127 Patienten mit GIST aus dem Jahr 2008 zeigte sich erneut, dass die Tumorgröße ein wichtiger Prognosefaktor ist. Patienten mit einem GIST unter 5 cm wiesen einen deutlich günstigeren klinischen Verlauf auf als Patienten mit einem GIST zwischen 5 und 10 cm, sowie mit einem GIST über 10 cm Größe (DeMatteo et al. 2008). Auch Singer et al. und Nilsson et al. lieferten in ihren Studien ähnlich Ergebnisse bei insgesamt 48 bzw. 288 untersuchten GIST (Nilsson et al. 2005; Singer et al. 2002). In einer Studie mit 906 primären GIST aus dem Dünndarm wurde festgestellt, dass die Tumorgrößer ein wichtiger Prognosefaktor in Tumoren mit niedriger mitotischer Aktivität ist, aber weniger signifikante Ergebnisse in Tumoren mit einer Mitosenanzahl über 5 Mitosen/ 50 HPFs zeigt, da alle der letztgenannten Tumoren eine Mortalität von mindestens 50% haben (Miettinen et al. 2006a). Dennoch garantieren eine kleine Tumorgröße und auch eine niedrige Mitosenanzahl nicht einen benignen Verlauf, da auch solche Tumore in wenigen Fällen bereits metastasieren können (Rubin 2006).

#### 4.1.5 Mitosenanzahl

Die Mitosenanzahl/ 50 HPFs hatte ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation. Die Patienten mit einem GIST mit weniger als 5 Mitosen/ 50 HPFs zeigten eine höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit als die Patienten mit einem GIST mit mehr als 5 Mitosen/ 50 HPFs. In der Literatur ist die Mitosenanzahl ebenfalls ein signifikanter Prognosefaktor für alle Tumorgrößen (Miettinen et al. 2006a). Die bereits unter 4.1.4. beschriebenen Studien lieferten ebensolche Ergebnisse. Auch Steigen et al. kamen in der populations-basierten Studie aus Nordnorwegen zu dem Ergebnis, dass Patienten mit GIST mit mehr als 5 Mitosen/ 50 HPFs ein signifikant schlechteres Überleben zeigten als Patienten mit GIST mit weniger als 5 Mitosen/ 50 HPFs ein signifikant

(Steigen et al. 2007). In einer Studie von Nilsson et al. waren eine erhöhte Mitosenanzahl und ein erhöhter Ki-67-Index, ein Proliferationsindex, ebenfalls mit einem erniedrigten Gesamtüberleben korreliert (Nilsson et al. 2005). Es wurde diskutiert, ob ein Ki-67-Index ein ebenso starker bzw. stärkerer Prognosefaktor ist als die Mitosenanzahl. Einige Studien bestätigen diese Vermutung (Panizo-Santos et al. 2000; Rudolph et al. 1998), andere jedoch widerlegen diese Annahme (Goldblum und Appelman 1995). Grundsätzlich sollte beim Vergleich der Ergebnisse verschiedener Studien hinsichtlich der Mitoserate berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Methoden benutzt werden, die Mitosefiguren zu zählen, welche auch unterschiedliche Anzahlen von HPFs beinhalten (zum Beispiel 10 vs. 50 HPFs). Zudem sollte beachtet werden, dass die Reproduzierbarkeit nicht immer optimal sein muss, da das Zählen der Mitosefiguren durch einen Pathologen geschieht, und auch dass innerhalb eines Tumors verschiedene Areale mit variablen Anteilen an Mitosefiguren existieren (Baak 1990; Goldblum 2002).

### 4.2 Bedeutung der Expression der untersuchten Proteine

Es wurden bereits mehrere Studien hinsichtlich potentieller Prognosefaktoren für GIST durchgeführt. Neben der Tumorgröße, Mitosenanzahl und anatomischen Lokalisation könnten jedoch auch Zellzyklus-regulierende Mechanismen das klinische Verhalten der GIST beeinflussen. Die Literatur hingegen beinhaltet bislang nur wenige Daten bezüglich einer veränderten Regulation der Zellzyklus-assoziierten Proteine in GIST.

### 4.2.1 E2F1

E2F1 war in den Untersuchungen der vorliegenden Dissertation in GIST größer als 5 cm signifikant höher exprimiert als in GIST kleiner als 5 cm. Hinsichtlich der Mitosenanzahl ließ sich zwar kein signifikantes Ergebnis erzielen, jedoch kann man erkennen, dass E2F1 in GIST mit mehr als 5 Mitosen/ 50 HPFs tendenziell höher exprimiert war als in GIST mit weniger als 5 Mitosen/ 50 HPFs. Auch in einer Studie von Haller et al. zeigten GIST mit einer Mitosenanzahl von über 5 Mitosen/ 50 HPFs eine deutlich höhere mittlere Expression von E2F1 als GIST mit weniger als 5 Mitosen/ 50 HPFs (Haller et al. 2005). Die Ergebnisse dieser Studie wiesen zudem darauf hin, dass eine Hochregulierung der E2F1-Expression mit einem

klinisch aggressiveren Verhalten der GIST assoziiert ist. Die GIST, die in der oben genannten Studie in der Risikoklassifikation als "hoch" eingestuft wurden, zeigten eine deutlich stärkere E2F1-Expression auf als solche, die in der Risikoklassifikation als "niedrig" bewertet wurden. Eine weitere Studie aus dem Jahr 2006 lieferte ebensolche Ergebnisse: in 33,3% der GIST mit einem niedrig malignen Potential wurde E2F1 exprimiert, wohingegen in 92,9% der malignen GIST eine E2F1-Expression festgestellt werden konnte (Sabah et al. 2006). Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse unter dem Aspekt, dass sowohl die Tumorgröße, als auch die Mitosenanzahl als klassische Prognosefaktoren für GIST gelten und die E2F1-Expression mit beiden Parametern korreliert, könnte eine Überexpression von E2F1 ebenfalls einen prognostischen Faktor für einen ungünstigen klinischen Verlauf der GIST darstellen. Diese Vermutung wird zusätzlich von dem Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen gefestigt, dass *PDGFRA*-mutierte GIST aus dem Magen mit niedrigerem malignen Potential eine signifikant niedrigere Expression von E2F1 präsentierten als *KIT*-mutierte GIST aus dem Magen. Auch Haller et al. kamen in ihrer Studie zu dem gleichen Ergebnis bezüglich der E2F1-Expression in *KIT*- und *PDGFRA*-mutierten GIST (Haller et al. 2005).

Dennoch sollte eine Überexpression von E2F1 auch differenziert betrachtet werden. So wiesen GIST aus dem Dünndarm eine signifikant niedrigere Expression von E2F1 auf als GIST aus dem Magen und Dickdarm. Betrachtet man die Lokalisation unter Berücksichtigung der Mutation, so zeigte sich auch hier, dass E2F1 in KIT-mutierten GIST aus dem Dünndarm signifikant niedriger exprimiert war als in KIT-mutierten GIST aus dem Magen und Dickdarm. In der Literatur sind bislang keine Angaben dazu gemacht worden. Da grundsätzlich GIST aus dem Dünndarm einen klinisch aggressiveren Verlauf aufzeigen als GIST aus dem Magen, müsste man aufgrund der oben genannten Vermutung erwarten, dass auch die E2F1-Expression in KIT-mutierten GIST aus dem Dünndarm signifikant höher gewesen ist als in GIST aus dem Magen. Ein umgekehrtes Bild stellte sich jedoch dar. Die Gründe dafür könnten folgende sein: zum einen könnten im Magen und im Dünndarm unterschiedliche Aktivierungswege und proliferationsfördernde Proteine von Bedeutung sein, die den Zellzyklus vorantreiben. So könnte etwa die Aktivierung des Zellzyklus im Magen vorrangig über Cyclin D1 und E2F1, die frühen Proliferationsproteine, stattfinden. Durch Phosphorylierung des RB-Proteins durch Cyclin D1 wird E2F1 nicht mehr gehemmt und kann im aktivierten Zustand die Produktion von weiteren, für den Eintritt in die S-Phase wichtigen Proteinen induzieren. Im Dünndarm hingegen könnte die Aktivierung des Zellzyklus vorrangig über die späten Proliferationsproteine geschehen, nachdem diese nicht primär durch Cyclin D1 und E2F1, sondern zum Beispiel durch Myc aktiviert werden. Es ist bereits vermutet worden, dass es parallel zu dem klassischen RB/E2F-Signaltransduktionsweg einen weiteren Pfad gibt, über den c-Myc durch Regulation von Cyclin E den G1-/S-Phasen-Übergang fördert. So konnte in solchen Zelllinien, in denen die E2F1-Aktivität durch konstitutiv aktivierte RB-Mutanten geblockt war, ektope Expression von c-Myc ebenfalls DNA-Synthese induzieren (Santoni-Rugiu et al. 2000).

Ein weiterer Grund für die hohe E2F1-Expression in GIST aus dem Magen im Vergleich zum Dünndarm könnte auch sein, dass in den Tumoren im Magen kaum Proliferation, stattdessen vielmehr Apoptose betrieben wird, wohingegen im Dünndarm weiterhin Zellproliferation durch E2F1 ausgelöst wird. Da auch E2F1 nach Aktivierung über Cyclin D1 den programmierten Zelltod bewirken kann, könnte dies mit dazu beitragen, dass die GIST aus dem Magen einen klinisch besseren Verlauf aufweisen als GIST aus dem Dünndarm.

Die Expression von E2F1 besaß einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation. GIST, die eine E2F1-Expression unterhalb des Median-Wertes zeigten, wiesen eine signifikant höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit auf als solche, die eine E2F1-Expression oberhalb des Median-Wertes zeigten. Dieses Ergebnis untermauert die oben genannte Vermutung, dass es sich bei E2F1 um einen prognostischen Marker für einen ungünstigen klinischen Verlauf handeln könnte.

Bei näherer Betrachtung des klinischen Verlaufs der GIST im Hinblick auf die Expression von E2F1 zeigten sich lokalisationsspezifische Unterschiede bezogen auf die *KIT*-mutierten GIST. Die Expression von E2F1 bei *KIT*-mutierten GIST im Magen zeigte beim Vergleich der beiden Gruppen, die eine Expression über bzw. unter dem Median aufwiesen, keinen signifikanten Unterschied. Hingegen zeigte die Expression von E2F1 bei Patienten mit *KIT*-mutierten GIST im Dünndarm und im Dickdarm einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation: Patienten mit einer E2F1-Expression unterhalb des Medians besaßen im Dünndarm und im Dickdarm eine höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit als die Patienten mit einer E2F1-Expression oberhalb des Medians.

Sollte es so sein, dass E2F1 im Magen ebenfalls die Aktivierung des Zellzyklus und damit Proliferation auslöst, dann wäre E2F1 für diese anatomische Lokalisation jedoch kein geeigneter Prognosemarker. Lediglich im Dünn- und Dickdarm könnte auch von der Höhe des E2F1-Expressionsspiegels auf den klinischen Verlauf geschlossen werden, wenn auch in der ersten oben genannten Hypothese vermutet wurde, dass dort die Proliferation möglicherweise vorrangig durch Myc und die späten Proliferationsproteine geschieht.

Die zweite geäußerte Vermutung, nämlich, dass E2F1 im Magen maßgeblich Apoptose, im Dünndarm jedoch Proliferation auslöst, ließe sich durch den klinischen Verlauf erhärten. Wenn E2F1 im Magen Apoptose auslösen würde, andere Proteine jedoch weiterhin die Proliferation fördern würden, könnte es mehr oder weniger zu einem Gleichgewicht zwischen dem Zellwachstum und dem programmierten Zelltod kommen, so dass allein anhand der E2F1-Expression keine Aussage über den klinischen Verlauf gemacht werden könnte. Im Dünndarm hingegen, wo möglicherweise durch E2F1 Proliferation, aber keine Apoptose ausgelöst wird, würde E2F1 einen guten Marker darstellen, anhand dessen signifikante Aussagen zum klinischen Verlauf gemacht werden könnten.

Letztendlich bleibt festzustellen, dass anhand der vorliegenden Ergebnisse E2F1 bei GIST im Dünn- und Dickdarm gut als prognostischer Marker fungiert und ein höherer Expressionsspiegel mit einem schlechteren klinischen Verlauf korreliert. Die Rolle von E2F1 bei GIST im Magen bedarf jedoch näherer Untersuchungen.

### 4.2.2 Cyclin D1

Die Expression von Cyclin D1 zeigte lediglich hinsichtlich des Mutationsstatus signifikante Unterschiede. In GIST mit einer *KIT*-Mutation war Cyclin D1 demnach signifikant höher exprimiert als in GIST mit einer *PDGFRA*-Mutation. Dies zeigte sich auch unter Berücksichtigung der Lokalisation und der Morphologie. Auch in *KIT*-mutierten GIST aus dem Magen und in epitheloid-gemischten GIST mit einer *KIT*-Mutation war die Expression von Cyclin D1 jeweils signifikant höher als in *PDGFRA*-mutierten GIST aus dem Magen und als in epitheloid-gemischten GIST mit *PDGFRA*-mutierten GIST aus dem Magen und als in epitheloid-gemischten GIST mit *PDGFRA*-mutierten GIST aus dem Magen und als in epitheloid-gemischten GIST mit *PDGFRA*-Mutation. In der Literatur sind diesbezüglich kaum Angaben zu finden. In einer Studie von Haller et al. wurde lediglich CDK4 untersucht, eine der Cyclin-abhängigen Kinasen, welche mit Cyclin D1 in der frühen Proliferationsphase einen aktivierten Komplex bildet und so das RB-Protein phosphoryliert. Dabei zeigte sich, dass auch CDK4 in GIST mit einer *KIT*-Mutation signifikant höher exprimiert war als in GIST mit einer *PDGFRA*-Mutation. Des Weiteren war eine hohe CDK4-Expression ebenfalls mit einer höheren Mitosenanzahl und mit einem hoch-risiko GIST, sowie mit GIST mit Tumorprogress assoziiert (Haller et al. 2005). Es bleibt also zu vermuten, dass auch Cyclin D1 stärker in solchen GIST exprimiert ist, welche zu einem malignen Verhalten neigen.

Hinsichtlich der unterschiedlich anatomisch lokalisierten *KIT*-mutierten GIST zeigte sich ein ähnliches Muster wie bei E2F1, wenngleich die Werte nicht signifikant waren. So betrug die Expression von Cyclin D1 in *KIT*-mutierten GIST aus dem Magen 6,5% ( $\pm$  9,0%) und war damit tendenziell höher als in *KIT*-mutierten GIST aus dem Dünndarm, wo die mittlere Expression 3,7% ( $\pm$  8,0%) betrug. In *KIT*-mutierten GIST aus dem Dickdarm war die mittlere Expression von Cyclin D1 mit 7,2% ( $\pm$  8,7%) ebenfalls tendenziell höher als in *KIT*-mutierten GIST aus dem Dünndarm. Die Cyclin-D1-Expression verhält sich demnach schematisch genauso wie die E2F1-Expression. Dieses Ergebnis unterstützt die oben genannte Theorie, dass die Aktivierung des Zellzyklus im Dünndarm vorrangig über die späten Proliferationsproteine geschieht, wohingegen im Magen entweder Proliferation oder aber Apoptose über die frühen Proliferationsproteine Cyclin D1 und E2F1 ausgelöst wird.

Auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation hatte die Expression von Cyclin D1 jedoch keinen signifikanten Einfluss. Dieses Ergebnis spiegelt sich zum Teil auch in der Literatur wider, wo insgesamt durchaus unterschiedliche Resultate beschrieben sind. In einer Studie von Sabah et al. zeigten 44,4% der niedrig-malignen GIST und 21,4% der malignen GIST positive nukleäre Färbungen von Cyclin D1. Eine signifikante Korrelation zwischen der Klassifikation der Dignität und einer Überexpression von Cyclin D1 konnte hierbei nicht festgestellt werden (Sabah et al. 2006). Letzteres stimmt auch mit den Ergebnissen von Nakamura et al. überein (Nakamura et al. 2005). In einer Studie über mesenchymale Sarkome war eine Überexpression von Cyclin D1 hingegen mit einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert (Kim et al. 1998). Im Gegensatz dazu konnten Wong et al. in einer Studie feststellen, dass eine Cyclin-D1-Überexpression mit einer besseren klinischen Prognose verbunden ist (Wong et al. 2003). Diese scheinbar paradoxe Relation zwischen einer Cyclin D1-Überexpression und einem besseren klinischen Verlauf demonstrierten auch Gillet et al. in einer Studie über Brustkarzinome und vermuteten dabei, dass in den Tumoren, in denen die Cyclin-D1-Expression abnorm niedrig war, andere Mutationen, z.B. im RB-Gen, stattgefunden haben, welche eine weitaus größere Auswirkung auf das Überleben besäßen (Gillett et al. 1996).

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur und den vorliegenden Untersuchungen scheint Cyclin D1 als alleiniger prognostischer Marker für GIST zum gegenwärtigen Stand weniger gut geeignet zu sein. Möglicherweise sollten, wie auch bei E2F1, weitere Untersuchungen zur Rolle von Cyclin D1 im Magen und im Dünndarm unternommen werden.

### 4.2.3 Cyclin A2

Beim Vergleich mit der Lokalisation, welche sowohl *KIT*-, als auch *PDGFRA*-mutierte GIST beinhaltete, zeigte sich zwar kein signifikantes Ergebnis, jedoch kam bei alleiniger Untersuchung der *KIT*-mutierten GIST zu Tage, dass Cyclin A2 in *KIT*-mutierten GIST aus dem Dünndarm signifikant höher exprimiert war als in solchen aus dem Magen. Über eine lokalisationsabhängig unterschiedliche Expression von Cyclin A2 sind bislang keine Ergebnisse in der Literatur bekannt. Dennoch stützt dieses Ergebnis die bereits erwähnte Vermutung, dass im Zellzyklus der GIST aus dem Dünndarm vorrangig die späten Proliferationsproteine bedeutend sind und dass die Proliferation bei *KIT*-mutierten GIST im Dünndarm möglicherweise über andere Proteine, zum Beispiel Myc, aktiviert wird als bei GIST im Magen. Mit einem niedrigen Expressionsspiegel in GIST im Magen und Dickdarm und einem hohen Spiegel in Dünndarm-GIST zeigte Cyclin A2 nämlich ein genau gegensätzliches Muster zu Cyclin D1 und E2F1.

Hinsichtlich der Morphologie war die Expression von Cyclin A2 in epitheloid-gemischten GIST signifikant höher als in spindelzelligen GIST. Diesbezüglich sind in der Literatur keine Aussagen darüber zu finden. Es bleibt zu vermuten, ob sich die hohe Cyclin-A2-Expression in epitheloid-gemischten GIST maßgeblich auf die maligne transformierten Tumore im Dünndarm bezieht.

Die Expression von Cyclin A2 hatte im untersuchten Tumorkollektiv einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation. Bei den Patienten mit GIST mit einer Cyclin-A2-Expression unterhalb des Median-Wertes lag eine signifikant höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit vor als bei solchen mit einer Cyclin-A2-Expression oberhalb des Median-Wertes. Dies stimmt mit Ergebnissen von Nakamura et al. überein. In dieser Studie mit 80 GIST zeigten 20 Tumoren eine positive Reaktion auf die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen Cyclin A. Von diesen 20 GIST wurden 13 Tumoren in der Risikoklassifikation als "hoch" eingestuft. Eine Cyclin-A-Überexpression war somit in dieser Studie signifikant mit einem hohen Tumorgrad assoziiert. Des Weiteren zeigte eine hohe Expression von Cyclin A ebenfalls eine signifikante Korrelation mit einem hohen Ki-67-Index (Nakamura et al. 2005).

Die vorliegenden Ergebnisse und der Vergleich mit der Literatur lassen also vermuten, dass Cyclin A2 einen nützlichen Parameter zur Abschätzung der klinischen Aggressivität eines GIST darstellt.

#### 4.2.4 Cyclin B1

Cyclin B1 zeigte in den Expressionsspiegeln ebenfalls einen signifikanten Unterschied bezüglich der anatomischen Lokalisation. So war Cyclin B1 in GIST aus dem Dünndarm signifikant höher exprimiert als in GIST aus dem Magen. Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei alleiniger Untersuchung der *KIT*-mutierten GIST und weist somit das gleiche Muster auf wie Cyclin A2. Daher erhärtet sich die Vermutung, dass die Regulation des Zellzyklus bei GIST aus dem Dünndarm über einen anderen Aktivierungsweg geschieht als bei GIST aus dem Magen.

Im Vergleich zur Morphologie präsentierte Cyclin B1 eine signifikant höhere Expression in epitheloid-gemischten GIST. Auch die Expression in epitheloid-gemischten *KIT*-mutierten GIST war signifikant höher als in spindelzelligen *KIT*-mutierten GIST. Hinsichtlich der Morphologie wurde dieses Ergebnis ebenfalls bei Cyclin A2 erzielt. Auch bei Cyclin B1 sind jedoch keine Angaben darüber in der Literatur zu finden. Das Ergebnis zeigt aber an, dass die Proteine Cyclin A2 und Cyclin B1, also die späten Proliferationsproteine, maßgeblich gemeinsam reguliert werden bzw. die Aktivierung von Cyclin A2 die anschließende Aktivierung von Cyclin B1 bedingt.

Hinsichtlich der Tumorgröße zeigte sich die Tendenz, dass Cyclin B1 in GIST größer als 5 cm eine höhere Expression aufwies als in GIST kleiner als 5 cm. In GIST kleiner als 5 cm betrug die mittlere Cyclin-B1-Eypression 4,3% ( $\pm$  5,2%) und in GIST größer als 5 cm 6,1% ( $\pm$ 7,3%). Da die Tumorgröße als klassischer Prognosefaktor dient, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass auch eine Überexpression von Cyclin B1 mit einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert sein könnte.

Die Untersuchungen zum Follow-up bekräftigten schließlich die Vermutung, denn auch die Expression von Cyclin B1 hatte einen signifikanten Einfluss auf den klinischen Verlauf. So lag bei den Patienten mit GIST, die eine Cyclin-B1-Expression unterhalb des Median-Wertes zeigten, eine signifikant höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit vor als bei den Patienten, die eine Expression von Cyclin B1 oberhalb des Median-Wertes zeigten. Koon et al. zeigten ebenfalls, dass die mRNA-Spiegel von Cyclin B1 in malignen GIST deutlich höher waren als in gutartigen Tumoren (Koon et al. 2004). Eine weitere Studie aus dem Jahr 2005 konnte deutlich machen, dass eine hohe Expression von Cyclin B1 mit einem hohen Ki-67-Index korreliert. Eine Wechselbeziehung zwischen einer Cyclin-B1-Überexpression und einem schlechten klinischen Verlauf bzw. einem hohen Tumorgrad konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden (Nakamura et al. 2005).

Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen jedoch die Daten von Koon et al. und lassen vermuten, dass eine hohe Expression von Cyclin B1 zumindest teilweise mit einer schlechteren Prognose der GIST assoziiert ist.

### 4.2.5 Myc

Die Expression von Myc zeigte lediglich im Vergleich zum Mutationsstatus unter Berücksichtigung der Lokalisation einen signifikanten Unterschied. Myc war demnach signifikant höher in KIT-mutierten GIST im Dünndarm exprimiert als in KIT-mutierten Tumoren im Magen. Dieses Expressionsmuster gleicht dem von Cyclin A2 und Cyclin B1. Dies erhärtet die Hypothese, dass in GIST im Dünndarm die Aktivierung von Cyclin A2 und Cyclin B1 hauptsächlich durch Myc stattfindet. Im Gegensatz dazu könnten in GIST im Magen grundsätzlich andere Regulationsmechanismen über Cyclin D1 und E2F1 zur Zellproliferation beitragen. In der Literatur ist lediglich die bereits erwähnte Vermutung laut geworden, dass es parallel zu dem klassischen RB/E2F-Signaltransduktionsweg einen weiteren Pfad gibt, über den c-Myc durch Regulation von Cyclin E den G1-/S-Phasen-Übergang fördert (Santoni-Rugiu et al. 2000). Konkrete Bezüge auf die lokalisationsabhängige Myc-Expression bei GIST finden sich nicht.

Im Vergleich zur Tumorgröße war der Unterschied, dass Myc eine höhere Expression in GIST größer als 5 cm aufwies, knapp nicht signifikant. Die mittlere Expression von Myc betrug in GIST kleiner als 5 cm 0,3% ( $\pm 0,4\%$ ) und in GIST größer als 5 cm 0,7% ( $\pm 1,1\%$ ). Dennoch lässt auch dieses tendenzielle Ergebnis vermuten, dass auch eine hohe Expression von Myc mit einem schlechten klinischen Verlauf verbunden sein könnte. Die Untersuchungen bestätigen dies jedoch nicht, denn die Expression von Myc hatte im vorliegenden Tumorkollektiv keinen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation.

Die gegenwärtigen Resultate im Vergleich zu der gefundenen Literaturangabe lassen die prognostische Bedeutung einer Überexpression von Myc kontrovers erscheinen. In einer Studie aus dem Jahr 2000 wurde eine hohe Expression von c-Myc als wichtiger, signifikanter und unabhängiger Prognosefaktor für einen schlechten klinischen Verlauf beschrieben (Panizo-Santos et al. 2000). Die damals durchgeführte Studie war die erste Untersuchung hinsichtlich einer c-Myc-Überxpression in GIST. Nachfolgende Untersuchungen konnten in der Literatur jedoch nicht gefunden werden.

Myc scheint anhand der vorliegenden Ergebnisse insofern eine Bedeutung zu haben, als dass es in GIST im Magen und im Dünndarm unterschiedlich exprimiert ist und dies mit verschiedenen Regulationsmechanismen zusammenhängen könnte, bei denen Myc in Dünndarm-GIST eine tragende Rolle spielen könnte. Dennoch sind weitere Untersuchungen diesbezüglich nötig, um die lokalisationsabhängigen Unterschiede erklären zu können. Als alleiniger Prognosemarker unabhängig von Tumorgröße oder Lokalisation scheint Myc jedoch aufgrund der vorliegenden Ergebnisse weniger gut geeignet zu sein.

# 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden GIST von 148 Patienten immunhistochemisch untersucht und die quantitative Proteinexpression von E2F1, Cyclin D1, Cyclin A2, Cyclin B1 und Myc im Vergleich zu den klinisch-pathologischen Parametern Lokalisation, Morphologie, Tumorgröße, Mitosenanzahl und Mutationsstatus bestimmt. Das Ziel der Arbeit bestand darin, herauszufinden, wie stark die jeweils untersuchten Proteine im Hinblick auf die einzelnen klinisch-pathologischen Parameter exprimiert sind und anhand dieser Ergebnisse zusammen mit dem Follow-up eine mögliche prognostische Bedeutung für GIST abzuleiten. Hierzu wurde das Tumorkollektiv mittels Tissue-Microarray-Technologie und immnhistochemischer Untersuchungsverfahren analysiert.

Zunächst konnten am vorliegenden Tumorkollektiv die Assoziation bestimmter klinischpathologischer Faktoren und deren Bedeutung für die Prognose und den klinischen Verlauf bestätigt werden. *PDGFRA*-Mutationen traten ausnahmslos im Magen auf und waren vorrangig mit einer epitheloid-gemischten Morphologie assoziiert, während *KIT*-Mutationen eher in spindelzelligen GIST und signifikant häufiger im Dünndarm vorkamen. Der klinische Verlauf der GIST aus dem Magen war deutlich besser als der Verlauf der GIST aus dem Dünndarm. Dies spiegelte sich auch unter Berücksichtigung des Mutationsstatus wider. *PDGFRA*-mutierte GIST zeigten tendenziell einen grundsätzlich besseren klinischen Verlauf als *KIT*-mutierte GIST. Der Verlauf der *KIT*-mutierten GIST wies jedoch unter Berücksichtigung der Morphologie einen deutlichen Unterschied auf, da spindelzellige *KIT*mutierte GIST eine bessere Prognose aufzeigten als epitheloid-gemischte GIST mit einer *KIT*-Mutation. Dies erhärtet die in der Literatur geäußerte Vermutung, dass es sich bei den letztgenannten GIST um maligne transformierte Tumoren im Dünndarm handeln könnte. Die Tumorgröße und die Mitosenanzahl als signifikante Prognosefaktoren konnten in den vorliegenden Analysen ebenfalls bestätigt werden.

Zudem konnte gezeigt werden, dass lokalisationsabhängig zwei verschiedene Expressionsmuster unter den fünf Proteinen bestehen. So zeigten E2F1 und Cyclin D1 jeweils eine höhere Expression in *KIT*-mutierten GIST aus dem Magen und aus dem Dickdarm als in *KIT*-mutierten GIST aus dem Dünndarm. Die Expressionen von Cyclin A2, Cyclin B1 und

Myc verhielten sich genau gegensätzlich. Dies legte die Vermutungen nahe, dass es sich zum einen um unterschiedliche Aktivierungswege im Magen und Dünndarm handeln könnte, die den Zellzyklus und damit die Prolifertaion initiieren. So könnte die Aktivierung im Magen vorrangig durch die frühen Proliferationsproteine Cyclin D1 und E2F1 geschehen, während im Dünndarm maßgeblich die späten Proliferationsproteine Cyclin A2 und Cyclin B1 von Bedeutung sind, nachdem diese nicht primär durch Cyclin D1 und E2F1, sondern durch Myc aktiviert worden sind. Eine weitere Hypothese besagte, dass E2F1 mit seiner deutlich höheren Expression in GIST im Magen dort vorrangig Apoptose statt Proliferation auslöst und dies zum klinisch besseren Verlauf der GIST aus dem Magen beiträgt.

Des Weiteren korrelierte E2F1 mit der Tumorgröße, einem klassischen Prognosefaktor, und ließ deshalb vermuten, dass auch E2F1 als ungünstiger prognostischer Marker auftreten könnte. In Bezug auf den klinischen Verlauf des Gesamtkollektivs bestätigte sich dieses. Unter Berücksichtigung der Lokalisation zeigte sich jedoch, dass die E2F1-Expression lediglich im Dünn- und Dickdarm als signifikanter Prognosemarker fungieren könnte; eine ungleiche E2F1-Expression im Magen führte jedoch nicht zu einem Unterschied hinsichtlich des klinischen Verlaufs. Daher erfordert die Rolle von E2F1 in GIST im Magen näherer Untersuchungen. Cyclin D1 ähnelte im Expressionsmuster zwar E2F1, jedoch hatte Cyclin D1 keinen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben und scheint daher als alleiniger Prognosemarker weniger gut geeignet zu sein. Hingegen hatten sowohl die Expression von Cyclin A2, als auch die von Cyclin B1 einen signifikanten Einfluss auf den klinischen Verlauf. Daher könnten beide Proteine, zumindest teilweise, nützliche Parameter zur Abschätzung der klinischen Aggressivität eines GIST darstellen. Es bleibt anzunehmen, dass Myc ebenfalls eine bedeutende Rolle in der GIST-Entstehung einnimmt, da es ebenso wie die bereits beschriebenen Proteine lokalisationsabhängig unterschiedlich exprimiert ist. unabhängiger Prognosemarker jedoch scheint es anhand der vorliegenden Als Untersuchungen weniger zweckdienlich zu sein, da die Myc-Expression keinen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nach der Operation hatte.

Zusammenfassend scheinen E2F1, Cyclin A2 und Cyclin B1 nützliche prognostische Parameter für GIST darzustellen, wenngleich die Rolle von E2F1 in GIST aus dem Magen näherer Untersuchungen bedarf. Cyclin D1 und Myc hingegen scheinen weniger günstige Prognosemarker zu sein. Dennoch ist zu vermuten, dass Myc im Zellzyklus des GIST aus dem Dünndarm eine bedeutende Stellung einnimmt.

# 6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

# 6.1 Abbildungen

Abbildung 1.1.3-1:	4
Abbildung 1.1.4-1:	5
Abbildung 1.2.2-1:	8
Abbildung 1.2.5-1:	10
Abbildung 1.3-1:	13
Abbildung 1.3.1-1:	15
Abbildung 1.3.4-1:	18
Abbildung 1.3.4-2:	19
Abbildung 2.2-1:	22
Abbildung 2.2-2:	22
Abbildung 2.4-1:	27
Abbildung 2.4-2:	27
Abbildung 3.1.1-1:	
Abbildung 3.2.1-1:	34
Abbildung 3.3.1-1:	
Abbildung 3.3.1-2:	
Abbildung 3.3.2-1:	40
Abbildung 3.3.3-1:	41
Abbildung 3.3.3-2:	42
Abbildung 3.3.4-1:	43
Abbildung 3.3.5-1:	44
Abbildung 3.3.6-1:	45
Abbildung 3.3.6-2:	46
Abbildung 3.3.6-3:	47
Abbildung 3.3.7-1:	48
Abbildung 3.3.7-2:	49
Abbildung 3.4.1-1:	50
Abbildung 3.4.2-1:	51

51
52
53
54
55
56
57
57
58
58
59
60
60

# 6.2 Tabellen

Tabelle 1.2.6-1:	11
Tabelle 1.2.6-2:	12
Tabelle 2.2-1:	23
Tabelle 2.3-1:	24
Tabelle 2.6-1:	
Tabelle 3.2.1-1:	
Tabelle 3.2.1-2:	35
Tabelle 3.2.2-1:	
Tabelle 3.3.1-1:	
Tabelle 3.3.2-1:	40
Tabelle 3.3.3-1:	42
Tabelle 3.3.4-1:	43
Tabelle 3.3.5-1:	44
Tabelle 3.3.6-1:	47
Tabelle 3.3.7-1:	49

### 7 Literaturverzeichnis

- Agaimy A, Wünsch PH, Dirnhofer S, Bihl MP, Terracciano LM, Tornillo L (2008a): Microscopic gastrointestinal stromal tumors in esophageal and intestinal surgical resection specimens: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular study of 19 lesions. Am J Surg Pathol <u>32</u>, 867-873.
- Agaimy A, Dirnhofer S, Wünsch PH, Terracciano LM, Tornillo L, Bihl MP (2008b): Multiple sporadic gastrointestinal stromal tumors (GISTs) of the proximal stomach are caused by different somatic KIT mutations suggesting a field effect. Am J Surg Pathol <u>32</u>, 1553-1559.
- AlphaMetrix Biotech GmbH: Einführung in: Bedienungsanleitung Manueller Tissue Arrayer MTA-1, hrsg. von AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark 2005(a).
- AlphaMetrix Biotech GmbH: Herstellung des Arrays in: Bedienungsanleitung Manueller Tissue Arrayer MTA-1, hrsg. von AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark 2005(b).
- Antonescu CR, Sommer G, Sarran L, Tschernyavsky SJ, Riedel E, Woodruff JM, Robson M, Maki R, Brennan MF, Ladanyi M et al. (2003): Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res <u>9</u>, 3329-3337.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998): Death receptors: signaling and modulation. Science <u>281</u>, 1305-1308.
- Baak JP (1990): Mitosis counting in tumors. Hum Pathol 21, 683-685.
- Bartek J, Lukas J (2001): Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. FEBS Lett <u>490</u>, 117-122.
- Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH (1998): p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. Nature <u>395</u>, 124-125.
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. (1999): Stat3 as an oncogene. Cell <u>98</u>, 295-303.
- Cameron S, Haller F, Dudas J, Moriconi F, Gunawan B, Armbrust T, Langer C, Füzesi L, Ramadori G (2008): Immune cells in primary gastrointestinal stromal tumors. Eur J Gastroenterol Hepatol 20, 327-334.
- Carney JA (1979): The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma, and pulmonary chondroma. Cancer <u>43</u>, 374-382.
- Cole MD (1986): The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. Annu Rev Genet 20, 361-384.
- Corless CL, McGreevey L, Haley A, Town A, Heinrich MC (2002): KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. Am J Pathol <u>160</u>, 1567-1572.
- Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC (2004): Biology of gastrointestinal stromal tumors. J Clin Oncol <u>22</u>, 3813-3825.
- Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, Shiraga S, Bainbridge T, Morich J, Heinrich MC (2005): PDGFRA mutations in gastrointestinal

stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. J Clin Oncol 23, 5357-5364.

- Daksis JI, Lu RY, Facchini LM, Marhin WW, Penn LJ (1994): Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. Oncogene <u>9</u>, 3635-3645.
- Dang CV (1999): c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. Mol Cell Biol <u>19</u>, 1-11.
- Dang CV, Resar LMS, Emison E, Kim S, Li Q, Prescott JE, Wonsey D, Zeller K (1999): Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. Exp Cell Res <u>253</u>, 63-77.
- DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF (2000): Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. Ann Surg 231, 51-58.
- DeMatteo RP, Gold JS, Saran L, Gönen M, Liau KH, Maki RG, Singer S, Besmer P, Brennan MF, Antonescu CR (2008): Tumor mitotic rate, size, and location independently predict recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor (GIST). Cancer <u>112</u>, 608-615.
- Emory TS, Sobin LH, Lukes L, Lee DH, O'Leary TJ (1999): Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors: dependence on anatomic site. Am J Surg Pathol <u>23</u>, 82-87.
- Field SJ, Tsai FY, Kuo F, Zubiaga AM, Kaelin WG, Jr., Livingston DM, Orkin SH, Greenberg ME (1996): E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. Cell <u>85</u>, 549-561.
- Fletcher CDM, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP et al. (2002): Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. Hum Pathol <u>33</u>, 459-465.
- Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA (1996): Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. Oncogene <u>12</u>, 1173-1180.
- Gillett C, Barnes DM (1998): Demystified ... cell cycle. Mol Pathol 51, 310-316.
- Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G, Barnes D (1996): Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. Int J Cancer <u>69</u>, 92-99.
- Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991): Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature <u>349</u>, 132-138.
- Goldblum JR (2002): Gastrointestinal stromal tumors. A review of characteristics morphologic, immunohistochemical, and molecular genetic features. Am J Clin Pathol <u>117 Suppl</u>, S49-S61.
- Goldblum JR, Appelman HD (1995): Stromal tumors of the duodenum. A histologic and immunohistochemical study of 20 cases. Am J Surg Pathol <u>19</u>, 71-80.
- Green DR, Reed JC (1998): Mitochondria and apoptosis. Science 281, 1309-1312.
- Haller F: Molekularbiologische Evaluation prognostischer Parameter in Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST). Med. Habil.-Schr. Göttingen 2008
- Haller F, Gunawan B, von Heydebreck A, Schwager S, Schulten HJ, Wolf-Salgó J, Langer C, Ramadori G, Sültmann H, Füzesi L (2005): Prognostic role of E2F1 and members of the CDKN2A network in gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res <u>11</u>, 6589-6597.
- Haller F, Happel N, Schulten HJ, von Heydebreck A, Schwager S, Armbrust T, Langer C, Gunawan B, Doenecke D, Füzesi L (2007): Site-dependent differential KIT and

PDGFRA expression in gastric and intestinal gastrointestinal stromal tumors. Mod Pathol <u>20</u>, 1103-1111.

- Hasegawa T, Matsuno Y, Shimoda T, Hirohashi S (2002): Gastrointestinal stromal tumor: consistent CD117 immunostaining for diagnosis, and prognostic classification based on tumor size and MIB-1 grade. Hum Pathol <u>33</u>, 669-676.
- Hirota S, Isozaki K (2006): Pathology of gastrointestinal stromal tumors. Pathol Int 56, 1-9.
- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M et al. (1998): Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. Science <u>279</u>, 577-580.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV (1995): The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. Cell <u>81</u>, 495-504.
- Hunter T, Pines J (1994): Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. Cell <u>79</u>, 573-582.
- Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W, Flores ER, Tsai KY, Jacks T, Vousden KH et al. (2000): Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. Nature <u>407</u>, 645-648.
- Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, Silberman SL, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B et al. (2001): Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. N Engl J Med <u>344</u>, 1052-1056.
- Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ (1998): Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. Proc Natl Acad Sci U S A <u>95</u>, 8292-8297.
- Kato GJ, Lee WMF, Chen L, Dang CV (1992): Max: functional domains and interaction with c-Myc. Genes Dev <u>6</u>, 81-92.
- Kim SH, Lewis JJ, Brennan MF, Woodruff JM, Dudas M, Cordon-Cardo C (1998): Overexpression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in extremity soft-tissue sarcomas. Clin Cancer Res <u>4</u>, 2377-2382.
- Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM (1998): Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. Am J Pathol <u>152</u>, 1259-1269.
- Klefstrom J, Arighi E, Littlewood T, Jäättelä M, Saksela E, Evan GI, Alitalo K (1997): Induction of TNF-sensitive cellular phenotype by c-Myc involves p53 and impaired NF-kappaB activation. EMBO J <u>16</u>, 7382-7392.
- Koon N, Schneider-Stock R, Sarlomo-Rikala M, Lasota J, Smolkin M, Petroni G, Zaika A, Boltze C, Meyer F, Andersson L et al. (2004): Molecular targets for tumour progression in gastrointestinal stromal tumours. Gut <u>53</u>, 235-240.
- Lasota J, Miettinen M (2008): Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. Histopathology <u>53</u>, 245-266.
- Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Stachura T, Schneider-Stock R, Kallajoki M, Steigen SE, Sarlomo-Rikala M, Boltze C, Kordek R, Roessner A et al. (2003): Gastrointestinal stromal tumors with internal tandem duplications in 3' end of KIT juxtamembrane domain occur predominantly in stomach and generally seem to have a favorable course. Mod Pathol <u>16</u>, 1257-1264.
- Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, Miettinen M (2004): A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. Lab Invest <u>84</u>, 874-883.

- Lasota J, Stachura J, Miettinen M (2006): GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumors with epithelioid morphology. Lab Invest <u>86</u>, 94-100.
- Lasota J, Corless CL, Heinrich MC, Debiec-Rychter M, Sciot R, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Schildhaus HU, Steigen SE, Stachura J et al. (2008): Clinicopathologic profile of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with primary KIT exon 13 or exon 17 mutations: a multicenter study on 54 cases. Mod Pathol <u>21</u>, 476-484.
- Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Müller R, Pouysségur J (1996): Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. J Biol Chem <u>271</u>, 20608-20616.
- Lundberg AS, Weinberg RA (1998): Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. Mol Cell Biol <u>18</u>, 753-761.
- Lundberg AS, Weinberg RA (1999): Control of the cell cycle and apoptosis. Eur J Cancer <u>35</u>, 531-539.
- Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, Xiao S, Singer S, Fletcher CDM, Fletcher JA (2000): KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. Am J Pathol <u>156</u>, 791-795.
- Matsumura I, Kitamura T, Wakao H, Tanaka H, Hashimoto K, Albanese C, Downward J, Pestell RG, Kanakura Y (1999): Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. EMBO J <u>18</u>, 1367-1377.
- Mazur MT, Clark HB (1983): Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. Am J Surg Pathol <u>7</u>, 507-519.
- Miettinen M, Lasota J (2001): Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. Virchows Arch <u>438</u>, 1-12.
- Miettinen M, Lasota J (2003): Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): definition, occurrence, pathology, differential diagnosis and molecular genetics. Pol J Pathol <u>54</u>, 3-24.
- Miettinen M, Lasota J (2006): Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. Arch Pathol Lab Med <u>130</u>, 1466-1478.
- Miettinen M, Virolainen M, Sarlomo-Rikala M (1995): Gastrointestinal stromal tumors-value of CD34 antigen in their identification and separation from true leiomyomas and schwannomas. Am J Surg Pathol <u>19</u>, 207-216.
- Miettinen M, Sobin LH, Sarlomo-Rikala M (2000a): Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). Mod Pathol <u>13</u>, 1134-1142.
- Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH, Lasota J (2000b): Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcomas in the colon: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases. Am J Surg Pathol <u>24</u>, 1339-1352.
- Miettinen M, El-Rifai W, Sobin LH, Lasota J (2002): Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review. Hum Pathol <u>33</u>, 478-483.
- Miettinen M, Sobin LH, Lasota J (2005): Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. Am J Surg Pathol <u>29</u>, 52-68.

- Miettinen M, Makhlouf H, Sobin LH, Lasota J (2006a): Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up. Am J Surg Pathol <u>30</u>, 477-489.
- Miettinen M, Fetsch JF, Sobin LH, Lasota J (2006b): Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. Am J Surg Pathol <u>30</u>, 90-96.
- Monihan JM, Carr NJ, Sobin LH (1994): CD34 immunoexpression in stromal tumours of the gastrointestinal tract and in mesenteric fibromatoses. Histopathology <u>25</u>, 469-473.
- Müller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E, Prosperini E, Vigo E, Oliner JD, Helin K (2001): E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. Genes Dev <u>15</u>, 267-285.
- Nakamura N, Yamamoto H, Yao T, Oda Y, Nishiyama K, Imamura M, Yamada T, Nawata H, Tsuneyoshi M (2005): Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade. Hum Pathol <u>36</u>, 828-837.
- Nilsson B, Bümming P, Meis-Kindblom JM, Odén A, Dortok A, Gustavsson B, Sablinska K, Kindblom LG (2005): Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era--a populationbased study in western Sweden. Cancer <u>103</u>, 821-829.
- Nishida T, Hirota S, Taniguchi M, Hashimoto K, Isozaki K, Nakamura H, Kanakura Y, Tanaka T, Takabayashi A, Matsuda H et al. (1998): Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. Nat Genet <u>19</u>, 323-324.
- Nurse P (1997): Checkpoint pathways come of age. Cell <u>91</u>, 865-867.
- Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G (1992): Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. EMBO J <u>11</u>, 961-971.
- Panizo-Santos A, Sola I, Vega F, de Alava E, Lozano MD, Idoate MA, Pardo-Mindán J (2000): Predicting Metastatic Risk of Gastrointestinal Stromal Tumors: Role of Cell Proliferation and Cell Cycle Regulatory Proteins. Int J Surg Pathol <u>8</u>, 133-144.
- Pardee AB (1974): A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A <u>71</u>, 1286-1290.
- Penzel R, Aulmann S, Moock M, Schwarzbach M, Rieker RJ, Mechtersheimer G (2005): The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. J Clin Pathol <u>58</u>, 634-639.
- Pérez-Roger I, Solomon DLC, Sewing A, Land H (1997): Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. Oncogene <u>14</u>, 2373-2381.
- Phillips AC, Vousden KH (2001): E2F-1 induced apoptosis. Apoptosis <u>6</u>, 173-182.
- Phillips AC, Ernst MK, Bates S, Rice NR, Vousden KH (1999): E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. Mol Cell <u>4</u>, 771-781.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW et al. (1998): The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. Cell <u>92</u>, 713-723.
- Qi Y, Tu Y, Yang D, Chen Q, Xiao J, Chen Y, Fu J, Xiao X, Zhou Z (2007): Cyclin A but not cyclin D1 is essential for c-myc-modulated cell-cycle progression. J Cell Physiol <u>210</u>, 63-71.

- Robinson TL, Sircar K, Hewlett BR, Chorneyko K, Riddell RH, Huizinga JD (2000): Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD34-positive interstitial cells of Cajal. Am J Pathol <u>156</u>, 1157-1163.
- Rönnstrand L (2004): Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. Cell Mol Life Sci <u>61</u>, 2535-2548.
- Roskoski R, Jr. (2005a): Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. Biochem Biophys Res Commun <u>338</u>, 1307-1315.
- Roskoski R, Jr. (2005b): Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. Biochem Biophys Res Commun <u>337</u>, 1-13.
- Roussel MF (1997): Regulation of cell cycle entry and G1 progression by CSF-1. Mol Reprod Dev <u>46</u>, 11-18.
- Roussel MF, Theodoras AM, Pagano M, Sherr CJ (1995): Rescue of defective mitogenic signaling by D-type cyclins. Proc Natl Acad Sci U S A <u>92</u>, 6837-6841.
- Rubin BP (2006): Gastrointestinal stromal tumours: an update. Histopathology <u>48</u>, 83-96.
- Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA et al. (2001): KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. Cancer Res <u>61</u>, 8118-8121.
- Rudolph P, Gloeckner K, Parwaresch R, Harms D, Schmidt D (1998): Immunophenotype, proliferation, DNA ploidy, and biological behavior of gastrointestinal stromal tumors: a multivariate clinicopathologic study. Hum Pathol <u>29</u>, 791-800.
- Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E (2006): Altered expression of cell cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumors: markers with potential prognostic implications. Hum Pathol <u>37</u>, 648-655.
- Santoni-Rugiu E, Falck J, Mailand N, Bartek J, Lukas J (2000): Involvement of Myc activity in a G(1)/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway. Mol Cell Biol <u>20</u>, 3497-3509.
- Saul SH, Rast ML, Brooks JJ (1987): The immunohistochemistry of gastrointestinal stromal tumors. Evidence supporting an origin from smooth muscle. Am J Surg Pathol <u>11</u>, 464-473.
- Shim H, Chun YS, Lewis BC, Dang CV (1998): A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc. Proc Natl Acad Sci U S A <u>95</u>, 1511-1516.
- Singer S, Rubin BP, Lux ML, Chen CJ, Demetri GD, Fletcher CDM, Fletcher JA (2002): Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. J Clin Oncol <u>20</u>, 3898-3905.
- Sircar K, Hewlett BR, Huizinga JD, Chorneyko K, Berezin I, Riddell RH (1999): Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. Am J Surg Pathol <u>23</u>, 377-389.
- Steigen SE, Eide TJ, Wasag B, Lasota J, Miettinen M (2007): Mutations in gastrointestinal stromal tumors--a population-based study from Northern Norway. APMIS <u>115</u>, 289-298.
- Stout AP (1962): Bizarre smooth muscle tumors of the stomach. Cancer 15, 400-409.
- Thalmeier K, Synovzik H, Mertz R, Winnacker EL, Lipp M (1989): Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter. Genes Dev <u>3</u>, 527-536.
- Torihashi S, Horisawa M, Watanabe Y (1999): c-Kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract. J Auton Nerv Syst <u>75</u>, 38-50.

- Tran T, Davila JA, El-Serag HB (2005): The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 1,458 cases from 1992 to 2000. Am J Gastroenterol 100, 162-168.
- Tryggvason G, Gislason HG, Magnusson MK, Jonasson JG (2005): Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: the icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study. Int J Cancer <u>117</u>, 289-293.
- Ueyama T, Guo KJ, Hashimoto H, Daimaru Y, Enjoji M (1992): A clinicopathologic and immunohistochemical study of gastrointestinal stromal tumors. Cancer <u>69</u>, 947-955.
- van de Rijn M, Hendrickson MR, Rouse RV (1994): CD34 expression by gastrointestinal tract stromal tumors. Hum Pathol <u>25</u>, 766-771.
- Vlach J, Hennecke S, Alevizopoulos K, Conti D, Amati B (1996): Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. EMBO J <u>15</u>, 6595-6604.
- Wang C, Li Z, Fu M, Bouras T, Pestell RG (2004): Signal transduction mediated by cyclin D1: from mitogens to cell proliferation: a molecular target with therapeutic potential. Cancer Treat Res <u>119</u>, 217-237.
- Wardelmann E, Neidt I, Bierhoff E, Speidel N, Manegold C, Fischer HP, Pfeifer U, Pietsch T (2002): c-kit mutations in gastrointestinal stromal tumors occur preferentially in the spindle rather than in the epithelioid cell variant. Mod Pathol <u>15</u>, 125-136.
- Wasag B, Debiec-Rychter M, Pauwels P, Stul M, Vranckx H, van Oosterom A, Hagemeijer A, Sciot R (2004): Differential expression of KIT/PDGFRA mutant isoforms in epithelioid and mixed variants of gastrointestinal stromal tumors depends predominantly on the tumor site. Mod Pathol <u>17</u>, 889-894.
- Weinberg RA (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell <u>81</u>, 323-330.
- Welsh RA, Meyer AT (1969): Ultrastructure of gastric leiomyoma. Arch Pathol 87, 71-81.
- Wong NACS, Young R, Malcomson RDG, Nayar AG, Jamieson LA, Save VE, Carey FA, Brewster DH, Han C, Al-Nafussi A (2003): Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. Histopathology <u>43</u>, 118-126.
- Yamaguchi U, Hasegawa T, Masuda T, Sekine S, Kawai A, Chuman H, Shimoda T (2004): Differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumor and other spindle cell tumors in the gastrointestinal tract based on immunohistochemical analysis. Virchows Arch <u>445</u>, 142-150.
- Yamasaki L, Jacks T, Bronson R, Goillot E, Harlow E, Dyson NJ (1996): Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. Cell <u>85</u>, 537-548.

### Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle ganz herzlich bei Herrn PD Dr. med. Florian Haller bedanken, der zunächst als Betreuer und im weiteren Verlauf als Doktorvater meine Arbeit in jeder Hinsicht hervorragend unterstützt hat. Sowohl bei der praktischen Arbeit und der statistischen Auswertung der Ergebnisse, als auch beim Verfassen der Dissertation war er stets ansprechbar, offen für meine Fragen und hat mich sehr gut wissenschaftlich betreut.

Zugleich möchte ich Herrn Prof. Dr. med. László Füzesi ganz herzlichen Dank aussprechen, der mich bereits seit Beginn meines Studiums und somit auch während der Zeit meiner Dissertation immer unterstützt und gefordert hat. Ich bin ihm und Herrn PD Dr. med. Florian Haller sehr dankbar für die Vergabe des Themas und für die sehr gute Zusammenarbeit in einer angenehmen und freundlichen Arbeitsatmosphäre.

Ebenfalls gilt mein Dank Frau Dr. med. Silke Cameron und Dr. rer. nat. Robert Cameron, welche viele Stunden geopfert haben, um die digitalen Fotos der immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben mittels eines Computerprogramms auszuwerten.

Frau Melanie Gebhardt danke ich für die ausführliche Einführung und Erläuterung in die Tissue-Microarray-Technologie und für die Hilfestellung bei der praktischen Durchführung. Frau Judith Wolf-Sálgó, Frau Stefanie Schwager, Frau Christina Enders und das gesamte Laborteam der Abteilung Gastroenteropathologie waren stets ansprechbar, hilfreich und freundlich. Ich danke ihnen für die guten Ratschläge hinsichtlich methodischer Probleme.

Auch die Mitarbeiter der Abteilung Gastroenteropathologie Herr PD Dr. med. Bastian Gunawan und Frau Karin Hannemann trugen durch ihr Entgegenkommen bei Fragen zum Gelingen der Arbeit bei.

Schließlich möchte ich Herrn cand. med. Joel Helfrich danken, der durch das gleichzeitige Arbeiten an seiner Dissertation in der Abteilung Gastroenteropathologie stets mit fachlichen Informationen, praktischen Hinweisen und aufmunternden Worten hilfreich zur Seite stand.

### Lebenslauf

Ich wurde am 19. September 1984 in Eschwege als erstes Kind des Arztes Stephan Cortis und der Krankenschwester Gabriele Cortis, geb. Schäffer, geboren. Ich wuchs in Ringgau-Röhrda, einem kleinen Dorf in der Nähe von Eschwege, auf und lebte dort bis zum Beginn des Studiums an der Georg-August-Universität Göttingen. Von 1991 bis 1995 besuchte ich die Mittelpunktgrundschule in Ringgau-Röhrda und wechselte anschließend auf das Gymnasium Friedrich-Wilhelm-Schule in Eschwege. Mein zweiwöchiges Schulpraktikum absolvierte ich Anfang 2000 im Zentrum Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen. In der neunten und zehnten Klasse auf dem Gymnasium war ich als Schulsprecherin tätig. Im Jahr 2001 schloss ich die zehnte Klasse an der Friedrich-Wilhelm-Schule ab und wechselte daraufhin auf das Oberstufengymnasium in Eschwege. Ich durchlief erfolgreich die Klassen elf bis dreizehn, so dass ich im Jahr 2004 die allgemeine Hochschulreife erlangte.

Im Oktober 2004 begann ich schließlich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen und absolvierte dort im Herbst 2006 das Physikum. Zuvor war ich im vierten Semester als Hilfwissenschaftler in der Anatomie tätig.

Während des klinischen Abschnitts des Studiums absolvierte ich Famulaturen in der Abteilung Pathologie (02/2007) und in der Abteilung Anaesthesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin (10/2007) der Universitätsmedizin Göttingen, sowie in der Praxis für Allgemeinmedizin und Chirurgie Dr. med. Stephan Cortis (03/2007) in Ringgau-Röhrda. Des Weiteren war ich im Rahmen von Famulaturen im Institut für Rechtsmedizin (09/2008) an der Charité in Berlin, sowie in der Abteilung Gastroenterologie (07/2009) im Akademischen Lehrkrankenhaus in Eschwege tätig. Für die Blockpraktika Innere Medizin und Chirurgie war ich jeweils drei Wochen in der Universitätsmedizin Göttingen bzw. im Evangelischen Krankenhaus Weende in Göttingen tätig. Die jeweils einwöchigen Blockpraktika in der Abteilung Pädiatrie und in der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe absolvierte ich im Lehrkrankenhaus Bremen Mitte und im Lehrkrankenhaus Lüneburg.

Meine PJ-Tertiale werde ich im Pius-Hospital in Oldenburg (Chirurgie, 22.02.2010-13.06.2010), sowie in der Universitätsmedizin Göttingen (Innere Medizin, 14.06.2010-03.10.2010; Pathologie, 04.10.2010-23.01.2011) verbringen.

Meine Doktorarbeit begann ich Anfang des Jahres 2007 in der Abteilung Gastroenteropathologie im Zentrum Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen unter Betreuung von PD Dr. med. Florian Haller.