Aus der Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie

(Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Ramadori)

im Zentrum Innere Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Immunzellen in primären und metastasierten gastrointestinalen Stromatumoren (GISTs)

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Marieke Dorothea Gieselmann

aus

Oldenburg (Oldb.)

Göttingen 2010

Dekan:Prof. Dr. med. C. FrömmelI. Berichterstatter:Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. RamadoriII. Berichterstatter:Prof. Dr. med. Radzun

Tag der mündlichen Prüfung: 10. November 2010

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung		5
	1.1.	Die gastrointestinalen Stromatumoren	5
	1.2.	Die Rolle von Immunzellen in der Entwicklung von Tumoren	8
	1.3.	Funktionelle Darstellung der fünf untersuchten Oberflächenantigene	10
		1.3.1. Kim-1P	10
		1.3.2. CD68	10
		1.3.3. CD3	11
		1.3.4. CD20	11
		1.3.5. CD56	11
	1.4.	Zytokine der real-time RT-PCR	12
		1.4.1. Interleukin 6	12
		1.4.2. Interleukin 1β	12
		1.4.3. Tumornekrosefaktor α	12
	1.5.	Fragestellung	12
2.	Material u	ind Methoden	15
	2.1.	Patientenkollektiv	15
	2.2.	Manueller Tissue-Mikroarrayer	15
	2.3.	Immunhistochemie	17
		2.3.1. Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung	17
		2.3.2. Immunhistochemische Färbung	18
	2.4.	Auswertungsmethoden	20
		2.4.1. Mikroskopische und fotographische Auswertung	20
		2.4.2. Computergestützte Auswertung	20
	2.5.	Statistik	21
	2.6.	Quantitative real-time RT-PCR	22
		2.6.1. RNS-Extraktion mittels der Trizol-Methode	22
		2.6.2. RNS-Konzentrationsbestimmung	23
		2.6.3. Reverse Transkription	23
		2.6.4. Real-time RT-PCR	23
3.	Ergebniss	e	25
	3.1.	Darstellung des untersuchten Tumorkollektivs	25

		3.1.1. Geschlechterverhältnis und Altersverteilung des	
		Patientenkollektivs	25
		3.1.2. Lokalisation der Proben	26
		3.1.3. Neue und GIST-spezifische immunhistochemische Marker	26
		3.1.4. Morphologie der Proben	27
	3.2.	Darstellung der Ausprägung der Immunzellen in primären und	
	m	etastasierten GISTs	27
	3.3.	Darstellung der Korrelation verschiedener Parameter in GISTs	31
		3.3.1. Tumorgröße	31
		3.3.2. Proliferationsrate	32
		3.3.3. Mitoserate	34
		3.3.4. Malignität nach Miettinen	34
		3.3.5. Risiko nach Fletcher	35
		3.3.6. Organlokalisation der verschiedenen Immunzellen	36
		3.3.7. Morphologie	37
	3.4.	Darstellung der Ergebnisse der real-time RT-PCR an ausgewählten	
		Patientenproben	38
		3.4.1. Interleukin 6	38
		3.4.2. Interleukin 1β	39
		3.4.3. Tumornekrosefaktor α	39
	3.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	40
4.	Diskussio	n	42
5.	Zusamme	enfassung	51
6.	Anhang		54
	6.1.	Abbildungsverzeichnis	54
	6.2.	Tabellenverzeichnis	55
7.	Literatur	verzeichnis	56

7.

1. <u>Einleitung</u>

1.1. Die gastrointestinalen Stromatumoren

Gastrointestinale Stromatumoren (GISTs) sind die häufigsten mesenchymalen Tumoren des Gastrointestinaltrakts. Epidemiologisch treten ca. 15 neue Fälle pro 1000000 Einwohner im Jahr auf (Nilsson et al. 2005). Das entspricht etwa 1500 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland. Sie werden typischerweise definiert über die Präsenz des Oberflächenantigens CD117 (c-kit) (O'Leary und Berman 2002) oder des strukturverwandten PDGF-Rezeptors alpha (PDGFRA). Das c-kit-Antigen ist ein Protoonkogen, das einer Typ-III-Rezeptor-Tyrosinkinase entspricht. Der Ligand ist der Stammzellfaktor (SCF) (Huang et al. 1990, Martin et al. 1990). Eine Mutation in dem zugehörigen Gen führt häufig zu einer Ligandenunabhängigen Aktivierung der Tyrosinkinase, welche die Rate des neoplastischen Wachstums erhöht. Bis vor wenigen Jahren wurden diese Tumoren noch zu den Leiomyosarkomen gerechnet. Seit 1998 ist bekannt, dass sie in der Regel c-kit-positiv sind oder eine Mutation des verwandten PDGFRA zeigen (Rubin 2006) und sich dadurch von Leiomyosarkomen abgrenzen lassen. Da die GISTs sowohl neuronale Oberflächenmarker als auch solche, die der glatten Muskulatur angehören, besitzen, wird eine enge Verwandtschaft zu den Zellen von Cajal diskutiert, die als sogenannte Schrittmacherzellen im gesamten Magen-Darmtrakt vorkommen (Kindblom et al. 1998). C-kit wird nicht nur auf den Zellen von Cajal gefunden, sondern auch auf Knochenmarkstammzellen, Mastzellen, Melanozyten, Erythrozyten und Keimzellen (Huizinga et al. 1995, Maeda et al. 1992, Russel 1979, Tsujimura et al. 1991, Qiu et al. 1998, Kitamura et al. 1978). Vermutlich spielt die Mutation in der Tyrosinkinase c-kit eine große Rolle für die Pathogenese des GIST, da bei 90% der GISTs eine Mutation dieses Protoonkogens oder des PDGFRA-Rezeptors gefunden wurde.

Während GISTs lange Zeit für eine Gruppe histologisch sehr homogener Tumore gehalten wurden, teilt man sie inzwischen ein: Es gibt drei Subtypen. 70% der GISTs sind spindelzellig mit einer regelmäßig zytologischen Uniformität und eosinophilem Zytoplasma. Der epitheloidzellige GIST-Typ zeigt ein eosinophiles und klares Zytoplasma mit einem eher myxoiden Stroma, dieser Typ tritt etwa in 20% der Fälle auf. Alle übrigen Fälle sind vom gemischten Typ, in dem beide, sowohl epitheloide als auch spindelzellige, Anteile vorkommen (Fletcher et al. 2002).

5

Anatomisch ist der GIST im gesamten gastrointestinalen Trakt lokalisiert - vom Ösophagus bis zum Rektum. In Einzelfällen können GISTs auch extraintestinal gefunden werden, zum Beispiel im Mesenterium, im Omentum oder im Retroperitoneum, wobei bisher unklar ist, ob es sich hierbei um Absiedlungen eines nicht bekannten Primarius handelt. Am häufigsten sind GISTs im Stroma des Magens (50%) zu finden. Dann tritt er in absteigender Häufigkeit im Dünndarm (25%), im Kolon und Rektum (10%), in der Abdominalhöhle (10%), und im Ösophagus (5%) auf (DeMatteo et al. 2000, Brainard und Goldblum 1997, Miettinen et al. 2000 a, Miettinen et al. 2000 b, Miettinen et al. 2005, Tworek et al. 1997, Tworek et al. 1999 a, Tworek et al. 1999 b).

In der Immunphänotypisierung zeigt sich, neben der oben genannten c-kit-Positivität (95%), in 60-70% der Fälle das CD34-Antigen besonders kolorektal und ösophageal. In 30-40% der Fälle findet sich SMA (smooth-muscle-antigen), besonders im Dünndarm (Miettinen et al. 1995), und das S100-Antigen ist in 5% der GISTs positiv. Eine Desmin-Positivität kann nur in 1-2% der Fälle nachgewiesen werden (Fletcher et al. 2002, Kindblom et al. 1998, Sarlomo-Rikkala et al. 1998).

Die Hälfte der neu diagnostizierten GISTs haben bei Erstdiagnose bereits Fernmetastasen, wobei GISTs vor allem in Leber und Peritoneum metastasieren. Sehr selten entstehen auch pleurale Metastasen und Filiae in der Lunge und im Knochen. Es findet fast nie eine Metastasierung in regionale Lymphknoten statt. Häufiger sind dagegen lokoregionäre Rezidive (Hohenberger et al. 2003).

Die Beurteilung der Malignität eines GIST durch die Tumor-Node-Metastasis (TNM)-Klassifikation ist nicht möglich, da GISTs nicht infiltrierend, sondern expandierend wachsen und - wie erwähnt - nicht regelhaft in Lymphknoten metastasieren. Daher wurden eigene Malignitätskriterien eingeführt. Die Malignität eines GIST wird durch die Tumorgröße und die Anzahl der Mitosen nach Miettinen et al. (2002) bestimmt, denn sie spielen eine wichtige Rolle für das Proliferationsrisiko. Diese beiden Parameter sind einfach zu ermitteln und haben einen guten prognostischen Wert (Miettinen und Lasota 2001, Appelman 1990, Franquemont 1995, Suster 1996, Emory et al. 1999). Diese Aufteilung der GISTs ist in Tabelle 1 nach Miettinen et al. (2002) dargestellt. Außerdem gibt es eine Einteilung des Risikos für aggressives Wachstumsverhalten, die sog. Risikoeinteilung nach Fletcher et al. (2002) (siehe Tabelle 2). Prognostisch günstige Faktoren sind ein spindelzelliger Typ, eine Größe bis 5cm, weniger als 3 Mitosen /50 HPF und Missense-Mutationen des Exon 11 (Fletcher et al. 2002).

Tumorgröße und Mitoserate bei der Malignität nach Miettinen von GISTs (modifiziert nach Miettinen et al. 2002)

Vermutlich gutartig	Darm	
	max. Durchmesser: ≤2cm	und weniger als 5 Mitosen pro 50 HPFs
	Magen	
	max. Durchmesser: ≤5cm	und weniger als 5 Mitosen pro 50 HPFs
Vermutlich bösartig	Darm	
	max. Durchmesser: >5cm	oder mehr als 5 Mitosen pro 50 HPFs
	Magen	
	max. Durchmesser: >10cm	oder mehr als 5 Mitosen pro 50 HPFs
Unsicher/ Niedriges	Darm	
malignes Potential	max. Durchmesser: >2cm,aber ≤5cm	und weniger als 5 Mitosen pro 50 HPFs
	Magen	
	max. Durchmesser: >5cm, aber ≤10cm	und weniger als 5 Mitosen pro 50 HPFs

Tabelle 1: Tumorgröße und Mitoserate bei der Malignität nach Miettinen von GISTs (Miettinen et al. 2002, S. 479)

Fletcher-Kriterien für aggressives Verhalten bei GISTs							
	Größe	Mitosen /50HPF					
Sehr geringes Risiko	<2cm	<5					
Geringes Risiko	2 bis 5cm	<5					
Mittleres Risiko	<5cm	6 bis 10					
Hohes Risiko	>5cm	>5					
	>10cm	jede Rate					
	jede Größe	>10					

Tabelle 2: Fletcher-Kriterien für aggressives Verhalten bei GISTs (nach Fletcher et al. 2002, S. 464)

Auf Basis dieser Faktoren kann die Gefahr der Metastasierung meist sehr genau evaluiert werden, allerdings gibt es Ausnahmen, die zeigen, dass auch kleine Tumoren (<5cm) mit einer niedrigen Mitoserate (<5/50HPFs) gelegentlich metastasieren (Miettinen et al. 2002).

Die Symptome des GIST treten erst spät auf und hängen sehr stark mit der Lokalisation des Primarius zusammen. Sie reichen von Schmerzen (vor allem bei Magen und Duodenum) über gastrointestinale Blutungen und Obstruktion zu Dysphagie (bei ösophagealer Lokalisation).

Die Therapie des Primärtumors ist die Resektion mit kleinem Sicherheitsabstand. Von den resezierten Tumoren scheinen etwa die Hälfte in einem Zeitfenster von circa 2 Jahren zu rezidivieren oder metastasieren und die andere Hälfte nicht (Emory et al. 1999, Cameron et al. 2008). Die Lymphknotendissektion ist angesichts der niedrigen Rate lymphogener Metastasierung nicht indiziert.

Seit Juni 2002 ist Imatinib für die Therapie nicht-resezierbarer Tumore zugelassen. Dieses Medikament blockiert die Tyrosinkinase c-kit kompetitiv in der ATP-Bindungsstelle. Unter der Therapie mit Imatinib verlängert sich die Zeit ohne Rezidiv um durchschnittlich 19 Monate (Heinrich et al. 2003). Seit Dezember 2008 besteht die Zulassung auch für die adjuvante Therapie (in Europa seit Mai 2009) (De Matteo et al. 2009).

Imatinib Mesylat (STI 571, [Glivec]) ist ein Pyrimidinderivat, das sowohl an die bcr-abl-Kinase, die häufig bei der Chronisch Myeloischen Leukämie zu finden ist, bindet, als auch an den PDGFA-Rezeptor und die c-kit(CD117)-Tyrosinkinase, die bei GISTs überexprimiert bzw. daueraktiviert ist. Die c-kit-Tyrosinkinase, wird bei der Inhibition durch Imatinib an der Bindung zu ATP gehindert. Auf diese Weise kann keine Phosphorylierung und damit keine Aktivierung der darauf folgenden Signalkaskade stattfinden. Diese Kaskade sorgt normalerweise für eine Proliferation der Zelle, Chemotaxis und Adhäsion.

1.2. Die Rolle von Immunzellen in der Entwicklung von Tumoren

Bis vor einigen Jahren stand die Untersuchung der zellulären Entartung bei der Entstehung von Tumoren im Vordergrund, d.h. durch Mutation von Onkogenen und den Verlust von Tumor-Suppressorgenen. Als Beispiel kann die Adenom-Karzinom-Sequenz zur Entstehung kolorektaler Karzinome angeführt werden (Fearon und Vogelstein 1990). Inzwischen hat sich gezeigt, dass Tumore, wie auch die gastrointestinalen Stromatumore, ein sehr vielfältiges Zellbild zeigen, zu dem neben den Tumorzellen auch Fibroblasten, Epithelzellen, Gefäßzellen und Zellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort gehören. Diese genetisch nichtveränderten Zellen bilden das Tumorstroma (Joyce 2005). Es konnte festgestellt werden, dass verschiedene Tumorentitäten Immunzellen zeigen (Balkwill und Mantovani 2001), wobei diese oftmals nicht nur peritumoral, sondern auch im Tumorstroma liegen (Bingle et al. 2002, Vakkila et al. 2006, Vermi et al. 2003, O'Keefe et al. 2004, Sandel et al. 2005). Hier hat sich nun vielfach die Frage gestellt, ob die Immunzellen eher eine Unterstützung zur Abwehr des malignen Prozesses darstellen, oder ob sie diesen sogar in seinem Progress vorantreiben. Eine komplette Aktivierung der adaptiven Immunantwort würde dabei möglicherweise die Eradikation maligner Zellen unterstützen, während die angeborene Immunantwort bei chronischer Entzündung stärker die Tumorentstehung und den Progress triggert (de Visser et al. 2006). Die Ursache dieser Tatsache liegt in dem distinkten Aufbau zwischen angeborener und adaptierter Immunantwort. Die angeborene Immunantwort ist besonders durch ihre schnelle Möglichkeit, in pathologische Prozesse einzugreifen, charakterisiert. Hier finden wir die dendritischen Zellen (DCs), die natürlichen Killerzellen (NKs), aber auch Makrophagen und Granulozyten (neutrophile, basophile und eosinophile). Die dendritischen Zellen wirken dabei als Verbindung zum erworbenen Immunsystem. In nicht-lymphoidem Gewebe sind dendritische Zellen unreif. Sie endozytieren Pathogene, prozessieren Antigene und apoptotische Zellen (Sandel et al. 2005). Durch die Beladung der DCs mit fremden Antigenen kommt es zu einer Reifung der dendritischen Zellen. Sie können jetzt nach Auswanderung in Lymphknoten naive T-Lymphozyten aktivieren. Hier entsteht also eine Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem (de Visser und Coussens 2005). Das erworbene Immunsystem seinerseits mit seinen typischen Vertretern, den CD20⁺-B-Lymphozyten, den CD4⁺-T-Helferzellen und den zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen, benötigt für seine Aktivierung ein proinflammatorisches Milieu mit reifen Antigenpräsentierenden Zellen. Die T-Zellen können nun mit Hilfe kontakt-vermittelter Signale und über die Sekretion von IFN-γ Makrophagen stimulieren (Boehm et al. 1997). Makrophagen gehören zum System der mononukleären Phagozyten. Sie stellen eine entscheidende Quelle zur Sekretion von drei wichtigen Akute-Phase-Proteinen dar: Interleukin 6 (II-6), Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Interleukin 1 β (II-1 β) (Gabay und Kushner 1999). Bei Tumoren geht man davon aus, dass die Aktivierung des erworbenen Immunsystems und die Ausreifung unreifer dendritischer Zellen, zum Beispiel durch immunsupprimierende Faktoren (II-10, II-12), ausbleiben.

1.3. Funktionelle Darstellung der fünf untersuchten Oberflächenantigene

1.3.1. Kim-1P

KIM-1P stellt einen unspezifischen Marker für gewebsständige (Radzun et al. 1991), fibrohistiozytäre Zellen im Tumorstroma dar, die zu den Antigenen des Mononukleären-Phagozyten-Systems gehören (Graeme-Cook et al. 1993). Zellen, die mit anti-Kim-1P angefärbt werden, zeigen dendritische Ausläufer (siehe Abb. 1).



Abbildung 1: Kim-1P-posititve Zellen (rot) mit dendritischen Ausläufern

1.3.2. CD68

CD68 ist ein hochgradig glykosyliertes, lysosomales Membranprotein mit einer relativen Molekülmasse von 110.000. Es gehört zu einer Familie lysosomaler Glykoprotein-/Plasmamembran-Shuttle-Proteine, die eine wichtige Funktion bei der Endozytose oder auch bei lysosomalen Transportvorgängen haben. CD68 wird vor allem in zytoplasmatischen Granula sehr stark exprimiert und zeigt eine schwache Expression auf der Oberfläche folgender Zellen: Makrophagen, Monozyten, neutrophilen und basophilen Granulozyten sowie natürlichen Killerzellen. Der Antikörper anti-CD68 markiert Makrophagen und hat sich außerdem bei der Identifizierung der Typen M4 (myelomonozytisch) und M5 (monozytisch) der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) und des histiozytischen Sarkoms als nützlich erwiesen (Falini et al. 1993).

1.3.3. CD3

Der CD3-Antikörper markiert T-Zellen und verwandte Neoplasmen (Alibaud et al. 2000). Der CD3-Komplex besteht aus sechs Polypeptiden mit normalerweise vier verschiedenen transmembranischen CD3-Ketten: Gamma, Delta, Epsilon und Zeta. Die relative Molekülmasse beträgt 20 000 (Saito und Yamazaki 1996). CD3 kann bereits in den Frühstadien der Thymozyten nachgewiesen werden und ist wahrscheinlich somit ein frühes Zeichen der T-Zelllinie (Campana et al. 1987). Das Antigen ist zunächst in kortikalen Thymozyten ein intrazytoplasmatischer Bestandteil und wird später in enger Verbindung zum T-Zellrezeptor an der Oberfläche exprimiert, wobei es dann vor allem für die Signalisierung zuständig ist. Das Antigen ist somit ein hochspezifischer Marker für T-Zellen.

1.3.4. CD20

Das CD20-Antigen ist ein nicht-glykosyliertes Membranphosphoprotein (Dörken et al. 1989), das vier Transmembrandomänen enthält. Wir finden es auf allen B-Zellen, mit Ausnahme der Prä-B-Zelle, denn in dieser Phase wird es erstmalig exprimiert, und der Plasmazelle, die es wieder verliert (Dörken et al. 1989). Bei verschiedenen Leukämien exprimieren die Zellen ebenfalls CD20, hierzu zählen die Akute Lymphatische Leukämie (ALL), die Chronische Lymphatische Leukämie (B-Zell-CLL) und die Haarzellleukämie, außerdem ist es auf den Burkitt-Lymphom-Zellen (Pezzutto et al. 1989) zu finden.

1.3.5. CD56

CD56 ist ein Membranglykoprotein, das in verschiedenen Isoformen auftritt, welche durch alternatives Spleißen eines einzelnen Gens auf dem Chromosom 11 zustande kommen (Costa 1997). Hauptsächlich wird es exprimiert von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen. Es kann aber auch in bestimmten Geweben nachgewiesen werden, wie im Kleinhirn, in der Großhirnrinde und an neuromuskulären Synapsen. Bestimmte Leukämien der NK-Zelllinie (LGL-Leukämien), das kleinzellige Bronchial-Karzinom und auf neuronale Strukturen zurückgehende Tumoren weisen ebenfalls eine Expression des CD56 auf (Poggi 2002).

1.4. Zytokine der real-time RT-PCR

1.4.1. Interleukin 6

Interleukin 6 ist ein Glykoprotein, das zu den Akute-Phase-Proteinen gehört und von vielen verschiedenen Zellen gebildet wird, wie zum Beispiel Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten, aber mitunter auch von Zellen der glatten Muskulatur (Donnelly et al. 1993). Besonders hohe II-6-Werte konnten bislang in Gewebe, das sich in einer akuten Entzündungsreaktion befindet, detektiert werden. Aktiviert von bakteriellen Lipopolysacchariden und proinflammatorischen Zytokinen, wie II-1 und TNF- α , induziert II-6 die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen. Differenzierung und Antikörperproduktion durch B-Zellen und eine T-Zell-vermittelte Immunantwort werden verstärkt (Donnelly et al. 1993).

1.4.2. Interleukin 1β

Interleukin 1 β gehört zu den Zytokinen. Es handelt sich um ein Glykoprotein, das als Regulatorprotein dient und somit neben vielen anderen Interleukinen auch die Kommunikation zwischen verschiedenen Immunzellen (z.B. Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen) ermöglicht (Herold 2007). Unter anderem wird durch Interleukin 1 β die Freisetzung von Interleukin 6 getriggert (Luo et al. 2003).

1.4.3. Tumornekrosefaktor α

Der Tumornekrosefaktor TNF-α wird von Makrophagen und Monozyten gebildet und ist ebenfalls ein Glykoprotein. Dieses Zytokin kann zu einer hämorrhagischen Nekrose in Tumoren führen, ohne dabei gesundes Gewebe zu zerstören (Herold 2007).

1.5. Fragestellung

GISTs gelten als histologisch homogene Tumoren. Sie zeigen eine spindelzellige, epitheloide oder gemischte Morphologie. Die Tumorzellen des GIST sind eingebettet in ein Tumorstroma, das aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen besteht. In anderen soliden Tumoren zeigt sich eine Bedeutung des Tumorstromas für das Tumorwachstum, sodass die Untersuchung der Tumor-Stroma-Interaktion immer mehr in den Vordergrund rückt (Tlsty und Coussens 2006). In diesem Zusammenhang wird auch die Bedeutung von Immunzellen diskutiert. Einerseits geht man davon aus, dass Immunzellen, insbesondere diejenigen, die marginal des Tumors gelegen sind, den Tumor bekämpfen, auf der anderen Seite wurden auch Immunzellen innerhalb von mesenchymalen Tumoren gefunden, deren Rolle zur Zeit diskutiert wird. Ein Beispiel hierfür wäre das Melanom als mesenchymaler Tumor (Vermi et al. 2003). Auch GISTs gehören zu den mesenchymalen Tumoren. In epithelialen Tumoren wie dem Kolonkarzinom konnten ebenfalls unterschiedliche Immunzellen, wie dendritische Zellen, Makrophagen und Lymphozyten, nachgewiesen werden (Xie et al. 2006).

In dieser Arbeit sollen deswegen die Immunzellen untersucht werden, die im Tumorstromaliegen und die Tumorstroma-Interaktion möglicherweise beeinflussen.

In einer früheren Untersuchung konnte an 47 primären c-kit⁺-GISTs, die unbehandelt waren, gezeigt werden, dass Immunzellen in den GISTs vorkommen. Die Untersuchung hat ergeben, dass eine große Mehrheit der Immunzellen in den gastrointestinalen Stromatumoren KIM-1P+ sind (Cameron et al. 2008). Diese Arbeit soll nun die Vorergebnisse auf ein größeres Kollektiv primärer GISTs übertragen und insbesondere die bisher nicht untersuchten GIST-Metastasen mit den Immunzellen der primären Tumoren vergleichen. Außerdem soll festgestellt werden, ob ein Unterschied zwischen dem Vorhandensein und der Lokalisation der Metastasen im Hinblick auf zum Beispiel Malignität und Tumorgröße besteht.

Hierzu wurden 22 TMAs hergestellt, auf die jeweils drei bis sechs Stanzen einer Probe platziert wurden. Zum Teil konnte Probenmaterial für Primärtumor und Metastasengewebe von demselben Patienten gewonnen werden. Die Stanzen wurden immunhistochemisch mit fünf verschiedenen Antikörpern (KIM-1P, CD20, CD3, CD56 und CD68) gefärbt, die die verschiedenen Immunzellen repräsentieren. Um auch eine mögliche Aktivierung der Immunzellen in den Metastasen beurteilen zu können, wurden zusätzlich von 9 Patienten 17 Proben von verschiedenen GIST-Metastasen gewonnen und gezielt eine real-time RT-PCR hergestellt, um das Gewebe auf Zytokine (TNF- α , Il-6 und Il-1 β) zu untersuchen, die eine wichtige Rolle für die Aktivierung von Immunzellen spielen.

In der vorliegenden Arbeit soll nun versucht werden, eine Antwort auf die folgenden Fragen zu finden:

- Können die Ergebnisse der Voruntersuchung mit 47 unbehandelten c-kit⁺-GISTs Immunzellen in primären GISTs betreffend im größeren Kollektiv (189 primäre c-kit⁺-GISTs) bestätigt werden?
- 2. Bestehen Unterschiede in der Ausprägung der Immunzellen im Tumorstroma von primären GISTs und ihren Metastasen?
- 3. Welchen Effekt haben Tumorgröße, Lokalisation, Proliferationsrate und Mitoserate des Primärtumors auf die Wahrscheinlichkeit für malignes Verhalten und zeigt sich hier auch eine Korrelation zu den Immunzellen?
- 4. Finden die Ergebnisse der Immunhistochemie Bestätigung in der Untersuchung der Interleukine an ausgewählten Patienten in der real-time RT-PCR?

2. <u>Material und Methoden</u>

2.1. Patientenkollektiv

Um eine signifikante Aussage bezüglich der Expression der jeweiligen Marker für die verschiedenen Immunzellen machen zu können, ist es sinnvoll, ein größeres Kollektiv zu wählen. In diesem Fall besteht das Kollektiv aus 188 Proben von Patienten für primäre GISTs und weiteren 52 Proben von sekundären GISTs. Das Kollektiv besteht damit insgesamt aus 196 Patienten, die zum OP-Zeitpunkt zwischen 33 und 90 Jahre alt waren. Keiner der Tumoren war zum Zeitpunkt der Operation, und somit auch zum Zeitpunkt der Probenentnahme, mit Imatinib oder Sutent vorbehandelt. Die Untersuchung wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen bewilligt.

2.2. Manueller Tissue-Mikroarrayer

Mit dem Tissue-Arrayer steht ein manuell zu bedienendes Laborgerät zur Verfügung, das es ermöglicht, Gewebeproben in Form präziser Stanzkerne in einem einzigen Paraffinblock als Matrix anzulegen. Dazu besitzt der Tissue-Arrayer zwei Hohlstanzen (siehe Abb. 2). Mit der ersten Stanze wird eine regelmäßige Matrix von Löchern in einen Empfängerparaffinblock (siehe Abb. 3) gestanzt, um anschließend präzise Stanzkerne aus selektierten Bereichen eines Spenderparaffinblocks, die durch die zweite Hohlstanze entnommen werden, in den vorgefertigten Löchern des Empfängerblocks zu platzieren (siehe Abb. 4).



Abbildung 2: Manueller Tissue-Arrayer (im Bild mittig: zwei Hohlstanzen)



Abbildung 3: Beispiel für zwei Empfängerparaffinblöcke (TMAs)



Abbildung 4: Grafik zum Ablauf der Gewinnung eines TMA

Zum Schneiden des Array-Paraffinblocks müssen die Stanzen zunächst mit dem umgebenden Paraffin verbunden werden. Nach einer halbstündigen Erwärmung bei 37°C können zunächst gröbere Ungleichheiten in der Eindringtiefe der Stanzkerne in den Empfängerblock durch manuelle Kompression mittels eines Glasobjektträgers ausgeglichen werden. Anschließend wird 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 wird. Nun können nach einer abschließenden Abkühlung des Blockes bei -20°C für 5 Minuten mit dem Mikrotom Schnitte von 1-2 μm Stärke abgenommen und auf einen Objektträger übertragen werden.

2.3. Immunhistochemie

2.3.1. Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung

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

Die weitere Vorbehandlung beinhaltet eine Auftragung von Zitratpuffer-Lösung auf die Gewebeproben, die sich aus zwei Stammlösungen zusammensetzt:

- Stammlösung I $21g CH_3COOH/1l bi-dest. H_2O$
- Stammlösung II
 29,4g tri-CH₃COO-Na x 2H₂O/ 1l bi-dest. H₂O

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

Nach erfolgter Zitratpuffer-Auftragung werden die Objektträger für 45 Minuten in einem Dampfgarer inkubiert und die für die immunhistochemischen Färbungen benötigten Primärantikörper verdünnt (siehe Tab. 3).

Antikörper	Verdünnung	Vorbehandlung zur Rückgewinnung des Antigens (Citrat)	Firma (Cat. no.)
c-kit (CD117)	1:200	Hitze	DAKO (A4502)
Aktin	1:50	Keine	Immunotech (PN IM 1144)
Desmin	1:1	Keine	Immunotech (IM 1073)
S-100	1:20	Protease (Sigma)	Immunotech (IM 1071)
CD34	1:20	Keine	Immunotech (Cat. No. 1185)
MIB1 (Ki67 clone MIB1)	1:200	Hitze	DAKO (M7240)
CD68 (clone KP1)	1:6000	Hitze	DAKO (M0814)
KIM-1P	1:6000	Protease (Sigma)	Pathology, Kiel ^a
CD3 (polyclonal)	1:100	Hitze	DAKO (A0452)
CD20cy (clone L26)	1:200	Hitze	DAKO (M0755)
CD56 (clone 123C3)	1:100	Hitze	Zymed (18-0152)

Tabelle 3: Tabelle der Antikörper für die Immunhistochemie

^a Kommerziell nicht erwerblich, Antikörper erhalten von Professor Parwaresch, Kiel.

2.3.2. Immunhistochemische Färbung

Für das immunhistochemische Verfahren wird das Dako REAL[™] Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse verwendet. Die auf der LSAB-Methode (markiertes Streptavidin-Biotin) beruhende KIT-Färbung wird in einem Drei-Schritte-Verfahren eingesetzt. Zuerst wird das Gewebe mit dem optimal verdünnten Primärantikörper, danach mit Dako REAL [™] Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) und zuletzt mit Dako REAL[™] Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP) konjugiert. Abschließend wird die Reaktion mit dem im Kit ebenfalls enthaltenen RED Chromogen sichtbar gemacht.

Bei diesem Färbevorgang erfolgt als erstes eine fünfminütige Waschung der Tissue Microarrays in einem neutralen TRIS-Puffer (12g TRIS + 18 g NaCl / 2 l bi-dest H₂0, pH: 7,4). Zum Blockieren des endogenen Biotins wird mit der BSA-Fraktion-V (2g BSA / 100ml TRIS-Puffer) inkubiert, worauf sich eine zehnminütige Einwirkung mit dem primären Antikörper (Tabelle 3) anschließt. Nach dreimaligem Waschen mit dem TRIS-Puffer wird der sekundäre Antikörper (Dako REAL [™] Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Link, Biotinylated Secondary Antibody) für 20 Minuten hinzugegeben. Nun wird abermals mit dem TRIS-Puffer dreimal gewaschen und daraufhin das AP-Enzym-Konjugat (Dako Real [™] Detection, Alkaline Phosphatase/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 [™] Detection System, Chromogen (RED)) ablaufen kann. Hierbei wirkt 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, werden die Objektträger mit demineralisiertem Wasser abgespült. Eine anschließende Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer bläut die nicht antikörperbesetzten Zellbestandteile, sodass später unter dem Mikroskop sowohl die positiv gefärbten als auch die für den Antikörper negativen Gewebeproben sichtbar sind. Um die Tissue Microarrays auf dem Objektträger eindecken zu können, muss als letzter Schritt das Wasser wieder aus dem Gewebe heraus gespült und Xylol eingezogen werden, da das Eindeckmedium Xylolhaltig ist und somit eine längere Haltbarkeit der Proben gewährleistet wird. Eine aufsteigende Alkoholreihe mit 75% igem Alkohol, 96% igem Alkohol und dreimal 100% igem Alkohol und ein abschließendes, dreimaliges Xylol-Bad führen schließlich zu dem gewünschten Ergebnis.

2.4. Auswertungsmethoden

2.4.1. Mikroskopische und fotografische Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Tissue-Mikroarrays werden für die Auswertung der Ergebnisse fotografiert. Pro Tissue Array können je bis zu sechs Gewebeproben von 16 Patienten untersucht werden (siehe Tab. 4). Daraus ergibt sich, dass von jeder Probe maximal sechs Fotos gemacht werden, wobei jede Stanze jeweils nur einmal fotografiert wird. Die Gewebeproben werden hierbei einzeln mikroskopiert, wobei die aussagekräftigste Stelle gleich im Anschluss daran in einer Original-Auflösung von 200facher Vergrößerung digital fotografiert und später analysiert wird.

TMA-1	Zeile/Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	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

Tabelle 4: Beispiel einer Matrix für ein Tissue-Mikroarray mit je sechs Gewebeproben von 16 Patienten

2.4.2. Computergestützte Auswertung

Die digitalen Fotos der einzelnen Gewebeproben werden schließlich mit Hilfe einer computergestützten Anwendung ausgewertet, wobei die Auswertung eines Fotos etwa fünf bis zehn Minuten beansprucht.

Das Auswertungsprogramm, welches von Dr. Robert Cameron (Cameron et al. 2008) entwickelt wurde, markiert und zählt auf jedem einzelnen Foto zunächst alle Hämalaun

(blau) gefärbten Zellkerne, die in dem fotographierten Objektausschnitt zu sehen sind. In einem zweiten Durchlauf werden nur die immunhistochemisch (rot) gefärbten Zellen markiert und gezählt (siehe Abb. 5). Da drei bis sechs fotographierte Stanzen pro Gewebe zur Verfügung stehen, kann aus der ermittelten Zellzahl ein Mittelwert gebildet werden.

Aus dem Verhältnis Antikörper-markierter Zellen zu allen markierten Zellkernen lassen sich objektive Aussagen über die Expressivität der einzelnen Marker treffen, sodass diese im Folgenden ins Verhältnis zum klinischen Verlauf und weiteren Parametern gesetzt werden können.

Aufnahme einer Kim-1P-gefärbten Probe mit den Auszählungen durch das Programm



Abbildung: 5: a)Ursprüngliches Foto einer mit Kim-1P gefärbten Probe mit 200facher Vergrößerung, b) Hämatoxilingefärbte Nuklei als Marker aller Zellen (blau), c) Markierung von Antikörper-gefärbten Zellen (rot) mit Chromogen RED (DAKO)

2.5. Statistik

Die absoluten Werte der Immunzellen aus der Auszählung der Fotos (maximal 3-6 Fotos pro Probe), wurden in prozentuale Werte umgewandelt, in dem jeweils die mit Antikörper rot gefärbten Zellen dividiert wurden durch die absolute Anzahl der mit Hämatoxilin blau gegengefärbten Zellkerne. Aus den so entstandenen Werten wurden dann jeweils die Mittelwerte (Mean) und ihre Standardabweichung (SD) pro Patient berechnet (Mean ±SD in Prozent angegeben), sowie der Median und schließlich für das Gesamtkollektiv in verschiedenen Untergruppen (Organlokalisation, primär/sekundär, etc.) zum besseren Vergleich ermittelt. Bei signifikanten Unterschieden zwischen den Mittelwerten wurde zur Bestätigung der Students-t-Test angewandt. Bei Differenzen der p-Werte unter 0,01 (entspricht <1%) wurde der Test als statistisch signifikant gewertet.

2.6. Quantitative real-time RT-PCR

Aus einigen Proben der Patienten konnte frisches Gewebe isoliert und schockgefroren werden. Diese 17 Proben von 9 Patienten wurden weiter aufbereitet, um einige Interleukine der Akute-Phase-Antwort zu quantifizieren.

2.6.1. RNS-Extraktion mittels der Trizol-Methode

Zunächst wurde die RNS mit der Trizol-Methode (Haller et al. 2005) aus schockgefrorenen Gewebsproben gewonnen. Hierbei wurden die Gewebestücke in 3ml Guanidinlösung mit dem Handhold/Potter lysiert. Mit dem Lysat wurden dann 2ml einer im Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegten Zäsiumchloridlösung überschichtet. Hiernach wurde das Röhrchen bis 1 mm an den Rand mit Guanidin-Lösung aufgefüllt. Bei 35 000 UpM, 20°C und für mindestens 12 Stunden konnte die RNS durch Ultrazentrifugation separiert werden. Bei der anschließenden Resuspendierung wurden die Proben vorsichtig zweimal in je 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und in 200 µl Ampuwa (steriles, pyrogenfreies Wasser) gelöst.

Nachdem die Proben zur Präzipitation der RNS bei -80°C für eine halbe Stunde unter der Zugabe von 400 μ l Ethanol (absolut) und 20 μ l 2 M Natriumazetatlösung (pH 5,2) gekühlt wurden, konnte die entstandene Lösung daraufhin für 30 Minuten mit 12 000 UpM bei 4°C zentrifugiert werden.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet abschließend wieder in 100 µl Ampuwa gelöst. Wenn sich das Pellet nicht löste, wurde dieses bei 65°C im Hitzeblock erwärmt und damit gelöst. Die isolierte RNS konnte bei - 80°C gelagert werden.

22

2.6.2. RNS-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten RNS konnte mittels Biophotometer bestimmt werden. Nachdem die Probe für die Messung 1:100 mit Ampuwa verdünnt (1µl Probe auf 99µl Ampuwa) wurde, pipettierte man sie in eine Küvette und maß sie bei einer Wellenlänge von 260 nm (RNS-Faktor 40).

2.6.3. Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde mittels eines M-MLV-reverse-Transkriptase KITs (moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase) (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) durchgeführt. Es wurde hierbei 1 µg RNS-Probe eingesetzt, wobei das Gesamtvolumen der Probe 9µg betrug und die Differenz mit Ampuwa aufgefüllt wurde. Die Proben wurden zunächst kurz bei 14 000 UpM anzentrifugiert und bei 4°C auf Eis gestellt, dann für 10 min bei 65°C zur Denaturierung mit 1 µl Rnase Inhibitor inkubiert und schließlich wieder auf Eis gestellt. Anschließend wurden zu jeder RNS-Probe die folgenden Volumina der Systemkomponenten pipettiert: 8 µl First-Strand-Buffer (M-MLV 5x RT-Buffer), 8 µl p(dT)15-Primer, 8 µl dNTP - Mix, 4 µl DTT und 2 µl M-MLV-Reverse- Transkriptase. Dieser Ansatz wurde in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen vermischt und für eine Stunde bei 38°C inkubiert. Um die entstandenen RNS-cDNS Doppelstränge wieder zu denaturieren und die reverse Transkriptase zu inaktivieren, wurde der Ansatz für 10 Minuten auf 72°C erhitzt. Das Reaktionsgefäß mit der fertigen cDNS der vorher isolierten RNS konnte nun auf Eis gelagert abkühlen. Schließlich wurden die Proben mit 120 µl Ampuwa vermischt und bei -20°C eingefroren gelagert. Die erforderlichen Primer der einzelnen Gene wurden synthetisch hergestellt, von der Firma Invitrogen bezogen und in Tabelle 5 aufgelistet.

2.6.4. Real-time RT-PCR

Die 17 Gewebsproben verschiedener GIST-Metastasen wurden dann im ABI Prism-7900-realtime-PCR-Cycler (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) unter Verwendung des Platinum[®]-SYBR[®]-Green-qPCR-SuperMix-UDG-Kits aufgearbeitet. Die quantitative Untersuchung wurde mit dem Sybr Green UDG Master-Mix (Invitrogen) durchgeführt. ß-Aktin stellte das "house-keeping-Gen" dar, damit die Gen-Expression der unterschiedlichen Proben miteinander vergleichbar waren. Die Untersuchung wurde jeweils in

23

Doppelbestimmung durchgeführt. Es wurde ein Platten-Belegungsschema per Computer mit dem Programm *Abiprism* (Applied Biosystems, Foster City, USA) erstellt. Je Loch der 96-Loch-Platte wurden 2 µl cDNS-Probe und 24 µl Master-Mix pipettiert. Der Master-Mix wurde aus den Reagenzien des oben genannten Kits folgendermaßen zusammengesetzt: 13,5 µl SYBR-Green, 7,5 µl Ampuwa, 1,5 µl Primer (sense forward), 1,5 µl Primer (sense reverse). Um Luftblasen aus den einzelnen Löchern zu entfernen, wurde die Platte vor Beginn der PCR kurz zentrifugiert.

Für die PCR-Zyklen wurden folgende RT-PCR-Bedingungen festgelegt: 50°C für 2 Minuten, 95°C für 2 Minuten, und 45 Zyklen jeweils 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 30 Sekunden. So dauerte ein PCR-Lauf etwa zwei Stunden. Mit der folgenden Formel konnten die Ergebnisse als relative Quantifikation der Zytokine der mRNS dargestellt werden: relative Erhöhung = $2^{-\Delta CT}$, wobei die Zyklen-Schwelle Δ (CT) = (CT vom Ziel-CT des ß-Aktin) war (Pfaffl 2001). Zur besseren Visualisierung wurden die Ergebnisse mit 1000 multipliziert.

Gen		Primer Sequenz	Produktgröße (bp)
II-6	Sense:	5'-TGG CTG AAA AAG ATG GAT GCT	82bp
(IFN _{β2})	Antisense:	5'-AAC TCC AAA AGA CCA GTG ATG ATT	
ΙΙ-1β	Sense:	5'-AAT TTG AGT CTG CCC AGT TCC C	105bp
	Antisense:	5'-AGT CAG TTA TAT CCT GGC CGC C	
TNF-α	Sense:	5'-CCC AGG CAG TCA GAT CAT CTT C	85bp
	Antisense:	5'-AGC TGC CCC TCA GCT TGA	
β-Aktin	Sense:	5'-CTG GCA CCC AGC ACA ATG	68bp
	Antisense:	5'-CCG ATC CAC ACG GAG TAC TTG	

Tabelle 5: Primer der drei Zytokine II-1 β , II-6 und TNF- α und des house-keeping-Gens β -Aktin.

3. Ergebnisse

3.1. Darstellung des untersuchten Tumorkollektivs

3.1.1. Geschlechterverhältnis und Altersverteilung des Patientenkollektivs

Das Kollektiv für die vorliegende Arbeit besteht aus insgesamt 196 Patienten. Von einigen Patienten konnten Proben sowohl vom Primärtumor als auch von Metastasen gewonnen werden, sodass diese Patienten mehrfach in die Untersuchung eingehen. Der Anteil weiblicher Patienten beträgt 45,1% (88 Patienten) und der männlicher Patienten 52,5% (103 Patienten). Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis von 1:1,2 (w:m). Bei fünf Patienten (2,6%) sind uns Geschlecht und Alter zum Zeitpunkt der OP unbekannt. Das Alter der Patienten liegt zum Zeitpunkt der Probenentnahme bei Frauen und Männern zusammen bei 65,3 Jahre (±12,0 Jahre). Die Frauen haben ein Durchschnittsalter von 66,4 Jahren (±13,1 Jahre), während die Männer etwas jünger sind mit 64,4 Jahren (±11,1 Jahre). In Abbildung 6 ist die Verteilung in den unterschiedlichen Altersgruppen dargestellt.



Abbildung 6: Anzahl der Patienten in verschiedenen Altersgruppen

3.1.2. Lokalisation der Proben

Von den obengenannten 196 Patienten wurden 240 Proben gewonnen. Von diesen Proben waren 188 Proben primärer GISTs und 52 Proben sekundäre GISTs. 60,1% (113 Proben) der primären GISTs sind im Magen lokalisiert. 29,2% (55 Proben) sind im Dünndarm entstanden und 8% (15 Proben) im Dickdarm. Weitere 2,7% (5 Proben) konnten keiner Lokalisation zugeordnet werden. Bei den sekundären Tumoren wurde unterschieden zwischen Leber-(42,3% der Metastasen, 22 Proben) und Peritonealmetastase (57,7% der Metastasen, 30 Proben), wobei fünf Metastasen retroperitoneal lagen, in der Auswertung jedoch den Peritonealmetastasen zugerechnet wurden, da angenommen wird, dass Peritoneal und Retroperitonealmetastasen ein ähnliches Verhalten in der Tumorstroma-Interaktion aufweisen. In Abbildung 7 sind die GISTs der einzelnen Lokalisationen in einem Diagramm dargestellt.



Abbildung 7: Prozentuale Darstellung der Verteilung der Organlokalisation des gesamten Patientenkollektivs (keine Unterscheidung primär/sekundär)

3.1.3. Neue und GIST-spezifische immunhistochemische Marker

Die Proben waren in 97,7% der Fälle c-kit⁺ (CD117). Außerdem zeigten 70,1% eine Positivität für CD34. Diese Werte sind auch in vorherigen GIST-Studien so erhoben worden (Rubin 2006). Aktin zeigt in dieser Studie eine unterschiedlich starke Färbung und ist in 55% der

Proben positiv, während in der Literatur meist nur von 30-40% die Rede ist (Rubin 2006). Mit dem S100-Antikörper, reagierten 3% der Tumore positiv (vergleichbar Rubin 2006), wobei eine fokale Positivität eingelagerter S100-positiver unreifer dendritischer Zellen in 56% gefunden werden konnte. 73% der Proben hatten eine Genmutation (Deletion, Punktmutation oder Duplikation) im Exon 11.

3.1.4. Morphologie der Proben

Morphologisch waren die Proben der Primärtumoren in 56,6% (107 Proben) spindelzellig, in 11,6% epitheloid (22 Proben) und 28,6% (54 Proben) zeigten beide Strukturmerkmale und wurden somit als gemischt beschrieben. Fünf Proben (2,6%) konnten morphologisch nicht zugeordnet werden. Ein ganz ähnliches Bild zeigte sich bei den sekundären Tumoren. 49% (25 Proben), also die überwiegende Mehrzahl, waren spindelzellig, 9,8% (5 Proben) epitheloid und 27,5% (14 Proben) waren gemischt. Keiner der Patienten, von denen die Proben stammen, ist bis zur Operation mit Imatinib oder Sutent behandelt worden. Es handelte sich also hier um unbehandelte Proben.

3.2. Darstellung der Ausprägung der Immunzellen in primären und metastasierten GISTs

In diesem Abschnitt wurden alle Proben, unabhängig von ihrer Lokalisation, ihrer Morphologie oder wegen anderer Merkmale in zwei Gruppen (primär, sekundär) zusammengefasst, sodass verglichen werden konnte, wie sich im Allgemeinen die Zahlen der Ausprägung der Immunzellen im Unterschied zwischen primären und sekundären Tumoren verhalten. Die Ausprägung der Immunzellen zeigte sich in den vorliegenden Proben wie folgt: Die häufigsten Immunzellen im Stroma der GISTs waren sowohl in den primären als auch in den sekundären Tumoren die Kim- $1P^+$ -Zellen. In den primären Proben waren im Schnitt 28,8% (\pm 7,1) der Zellen positiv für Kim-1P. Die sekundären Tumoren zeigten unter anti-Kim-1P 26,7% (\pm 6,3) positive (rot gefärbte) Zellen. Die CD3⁺-Zellen waren in den primären Tumoren signifikant seltener (2,2% \pm 1,8) als in den Metastasen (7,3% \pm 2,3) (p<0,01). CD68⁺-Zellen wurden gefärbt, um den Unterschied zwischen gewebsständigen, fibrohistiozytären Zellen (Kim1P⁺) und Makrophagen (CD68⁺) darzustellen. Die CD68⁺-Zellen waren in den primären Tumoren etwas häufiger (3,6% ±2,1) als in den sekundären GISTs (4,6% ±1,5). Während bei den CD20⁺-Zellen in den primären Tumoren nur sehr wenige positive Zellen gefunden werden konnten (0,6% ±0,7), war die Anzahl der CD20⁺-Zellen in den Metastasen geringer (1,8% ±0,3) (p<0,05). Die Zellen im GIST-Stroma, die CD56⁺ waren, zeigten sich in den primären Tumoren mit einer Häufigkeit von 1,1% ±0,9 und in den sekundären Tumoren mit 2,4% ±0,7 (p<0,05). Die Abbildungen 8 bis 12 zeigen Beispielbilder mit den jeweiligen untersuchten Immunzellen.



Abbildung8: Paraffinschnitt, Kim-1P-Färbung, Originalvergrößerung 200fach



Abbildung 9: Paraffinschnitt, CD3-Färbung, Originalvergrößerung 200fach



Abbildung 10: Paraffinschnitt, CD68-Färbung, Originalvergrößerung 200fach



Abbildung 11: Paraffinschnitt, CD20-Färbung, Originalvergrößerung 200fach



Abbildung 12: Paraffinschnitt, CD56-Färbung, Originalvergrößerung 200fach



Abbildung 13: Prozentuale Darstellung der Ausprägung verschiedener Immunzellen in primären und sekundären GISTs in Prozent (ohne Darstellung der Standardabweichungen)

Im Vergleich der Lebermetastasen mit den Metastasen, die im Peritoneum gelegen waren, zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede (siehe Abbildung 14). Während die Lebermetastasen deutlich weniger Kim1P⁺-Zellen hatten (18,2% ±3,8), als die Peritonealmetastasen, bei denen 31,8% ± 7,5 der Zellen Kim1P+ waren, zeigte sich ein gegenläufiges Bild bei den CD3⁺-Zellen. Hier waren deutlich mehr gefärbte Zellen in den Lebermetastasen (11,7% ±1,8) als in den Peritonealmetastasen (4,4% ±2,6). Nicht nur die T-Lymphozyten waren in der Leber häufiger. Die selteneren B-Lymphozyten, dargestellt durch den anti-CD20-Antikörper, traten in der Leber (3,8% ±0,1) und im Peritoneum (0,4% ±0,4) auf. Die mit anti-CD56 markierten Zellen waren in den Metastasen der Leber (4,4% ±0,2) häufiger anzutreffen als im Peritoneum (1,1% ±0,9). In den mit anti-CD68 angefärbten Proben waren dagegen keine wesentlichen Unterschiede zwischen Leber- (4,5% ±0,2)und Peritonealmetastasen (4,7% ±2,1) zu sehen.



Abbildung 14: Vergleich des Anteils an Antikörpern zwischen Leber- und Peritonealmetastasen

3.3. Darstellung der Korrelation verschiedener Parameter in GISTs

In diesem Kapitel geht es um die Korrelation der Immunzellen in den Proben von primären und metastasierten GISTs mit verschiedenen Parametern, um Signifikanzen zu finden und Zusammenhänge aufzudecken. Aus dem Foto jeder Stanze wurde zunächst der prozentuale Anteil der mit Antikörpern rot gefärbten Zellen von der Gesamtheit der Zellen errechnet. Im nächsten Schritt wurde der Mittelwert (Mean) und die Standardabweichung aus den Einzelwerten der bis zu sechs Stanzen pro Patient gebildet. Außerdem wurden die Parameter der maximalen Tumorgröße, der Anzahl an Mitosen in 50 HighPowerFields und die Proliferationsaktivität verwendet. Diese Parameter wurden dann jeweils den Werten, die von 3.3.1. bis 3.3.7. aufgelistet sind, gegenübergestellt.

3.3.1. Tumorgröße

Die Tumorgröße wurde bestimmt anhand des größten Durchmessers des Tumors. In der vorliegenden Arbeit wurden fünf Gruppen unterteilt: <1 cm, <2 cm, <5 cm, <10 cm und >10 cm. Hier wurde die Tumorgröße verglichen mit den Mitosen in 50 HPFs, der Proliferationsaktivität, CD3-Mean, CD20-Mean, CD56-Mean, CD68-Mean und KIM1P-Mean. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Proliferationsaktivität in Abhängigkeit von der Tumorgröße variiert. Tumoren, die kleiner als 5 cm (6,8% ±8,3) sind, haben eine signifikant

niedrigere Proliferationsaktivität als Tumoren, die größer als 10 cm sind (12,9% ±10,8) (p<0,01). Außerdem zeigte sich eine signifikante Differenz der Werte für KIM1P-Mean zwischen den Tumoren <1 cm (20,3% ±7,3) und denen >10 cm (31,8% ±9,1) (p<0,01). Bemerkenswerterweise traf dies nicht auf solche GISTs <2 cm (30,6% ±14,2) zu. Wie auch schon unter 3.3.6. hatten auch hier GISTs <2 cm (2 ±2) und <5 cm (12,2 ±25,5) eine deutlich niedrigere Mitoserate als die >10 cm (29 ±31,1) (p<0,01). (Siehe Abb. 15)



Abbildung 15: Boxplots der Tu-Size-groups in <1cm,<2cm,<5cm,<10cm und >10cm im Verhältnis zu a) Proliferationsaktivität und b) Kim1P-Mean

3.3.2. Proliferationsrate

Die Proliferationsaktivität wurde gemessen anhand der Bestimmung des Ki67-Antigens, das ein Marker für Proliferation ist, da es nur von Zellen in der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, während ruhende Zellen (G0-Phase) es nicht exprimieren. Die Bestimmung der Proliferationsrate mittels der Ki67-Antigenbestimmung ermöglichte die Ermittlung des Zellwachstums auch in kleinen Proben, zum Beispiel Biopsien, in denen keine 50 HPFs untersucht werden konnten. Daher spielte die Untersuchung der Proliferationsrate insbesondere bei der Beurteilung von Metastasen, z.B. aus Leberstanzbiopsien, eine wichtige Rolle. Die Proliferationsrate wurde dann aus der Proliferationsaktivität in zwei Gruppen eingeteilt. Zum einen wurden alle Proben zusammengefasst, die eine Proliferationsaktivität kleiner zehn Prozent zeigten. Auf der anderen Seite wurden alle Proben mit einer Proliferationsrate größer zehn Prozent zusammengefasst.

Im Vergleich der maximalen Tumorgröße mit der Proliferationsrate kann zwischen hoher und niedriger Proliferationsrate ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Kleinere Tumoren haben eher eine Proliferationsaktivität <10% (5,9cm ±4,6), während größere Tumoren (8,6cm ±5,8) eine Proliferationsaktivität >10% aufweisen (p<0,01). Dagegen zeigten die Proben, die eine niedrige Proliferationsrate (<10%) aufweisen, enthalten eine signifikant kleinere Anzahl an Mitosen in 50 HPFs (4 ±7,8) als GISTs mit einer höheren Proliferationsaktivität (48,8 ±45,7) (p<0,01). Diese Aussage unterstützt die Einteilung nach Miettinen et al. (2002), in der die Mitoserate ein Kriterium für Malignität darstellt und verifiziert diese Art der Proliferationsaktivitätsbestimmung im Vergleich zur Zählung der Mitosen in 50 HPFs. GISTs mit einer geringeren Proliferationsaktivität haben signifikant weniger CD3⁺-Zellen (2,3% ±4,9) als solche mit einer Proliferationsaktivität >10% (5,8% ±7,6) (p<0,01). CD56-Mean, CD68-Mean, CD20-Mean und KIM1P-Mean zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den hohen und niedrigen Proliferationsraten. Würde man die P-Wert-Grenze bei p<0,05 anlegen, so wären die CD20⁺-Zellen ebenfalls deutlich stärker ausgeprägt in GISTs mit einer höheren Proliferationsaktivität (1,7% ±5,6; Proliferationsrate <10%: CD20-Mean 6% ±1,3) (p<0,05). (Siehe Abb. 16)



Abbildung 16: Vergleich der Proliferationsaktivität zu a) der maximalen Tumorgröße, b) der Mitoserate in 50 HPFs und c) dem CD3-Mean

3.3.3. Mitoserate

Die Mitoserate wurde aufgeteilt in Werte kleiner gleich (\leq) fünf Mitosen in 50 HPFs und über fünf Mitosen in 50 HPFs. Die Proliferationsaktivität ist bei den GISTs, die unter fünf Mitosen/50 HPFs liegen (3,9 ±3,1), signifikant geringer (p<0,01), als bei denen über fünf Mitosen/50 HPFs (15,4 ±11,1). GISTs mit weniger CD3⁺-Zellen haben gleichermaßen wenig Mitosen (Mitosen <5: 1,5 ±2,6 und >5: 4,4 ±6,7) (p<0,01). Außerdem haben kleine Tumoren (5,7cm ±4,5) eine signifikant geringere Anzahl an Mitosen als größere (8,7 ±5,4) (p<0,01). Ansonsten zeigen sich keine signifikanten Differenzen bei der Betrachtung der Mitoserate und der Tumorgröße, dem CD3-Mean, CD20-Mean, CD56-Mean, CD68-Mean und KIM1P-Mean. (Siehe Abb. 17)



Abbildung 17: Mitoserate im Vergleich zu a) Proliferationsaktivität, b) CD3-Mean und c) maximaler Tumorgröße

3.3.4. Malignität nach Miettinen

Die Malignität nach Miettinen wurde anhand mehrerer Kriterien bestimmt. Danach gelten solche Tumoren als maligne, die, sofern intestinal gelegen, größer als 5cm sind oder mehr als 5 Mitosen in 50 HPFs zeigen. Im Magen muss der Tumor mindestens eine Größe von 10 cm erreichen oder mehr als 5 Mitosen in 50 HPFs haben (Miettinen et al. 2002) (siehe Tab. 1). Die Statistiken deuten nun auf eine signifikante Erhöhung der CD3⁺-Zellen in den sekundären GISTs (8,1% ±9,4) im Vergleich zu den gutartigen (1,1% ±1,8), niedrig malignen (1,5% ±2,5) und malignen GISTs (3,7% ±5,8) hin (p jeweils <0,01). Die als gutartig eingestuften GISTs

haben im Vergleich zu den malignen GISTs signifikant weniger CD3⁺-Zellen (p<0,01). Ein ähnliches Bild zeigen die Untersuchungen der Mitoserate in 50 HPFs. Benigne (1,7 ±1,5) und niedrig-maligne GISTs (1,9 ±1,8) haben jeweils im Vergleich zu malignen (40,8 ±70,2) und sekundären GISTs (32,8 ±29) eine signifikant niedrigere Rate an Mitosen (p<0,01). Die Proliferationsaktivität ist ebenfalls bei den benignen (3,1% ±2) und niedrig-malignen Tumoren (4,4% ±3,8) im Vergleich zu den malignen (12,2% ±10,5) und sekundären Tumoren (16,1% ±8,2) vermindert (p<0,01). Kleine Tumoren (2,8cm ±1,4) sind eher gutartig (p<0,01) als niedrig-maligne (6cm ±2,3), maligne (9,2cm ±5,3) und sekundäre (6,8cm ±5,5). Niedrigmaligne Tumoren sind signifikant kleiner als maligne Tumoren (p<0,01). (Siehe Abb. 18)



Abbildung 18: Malignität nach Miettinen im Vergleich zu a) der maximalen Tumorgröße, b) den Mitosen in 50 HPFs, c) der Proliferationsaktivität und d) dem CD3-Mean

3.3.5. Risiko nach Fletcher

Das Risiko nach Fletcher et al. (2002) teilt sich ein in die Kategorien sehr geringes Risiko (very low risk), geringes Risiko (low risk), mittleres Risiko (intermediate risk), hohes Risiko (high risk) und sekundäre Tumoren (siehe Tab. 2). Wie auch schon bei der Malignität nach Miettinen (siehe 3.3.4.) gibt es hier zahlreiche Signifikanzen. Die Mitosen/50 HPFs haben die gleichen Signifikanzen wie die Proliferationsaktivität. Hohes Risiko nach Fletcher und sekundäre GISTs weisen eine signifikant höhere Mitoserate und Proliferationsrate auf als GISTs mit sehr geringem, geringem und mittlerem Risiko (p<0,01). Mit der Tumorgröße verhält es sich ähnlich. GISTs mit einem sehr geringen Risiko der Metastasierung (very low) sind signifikant kleiner (1,4cm ±0,5) als Tumoren der Kategorien "gering" (*low*) (3,6cm ±0,9), "mittel" (*intermediate*) (6,7cm ±2,1), "hoch" (*high*) (10,7cm ±6) und als die sekundären GISTs (6,8cm ±5,5) (jeweils p<0,01).

CD3⁺-Lymphozyten sind signifikant höher in den sekundären GISTs (8,1% \pm 9,4) als in den GISTs, die mit einem sehr geringen (0,7% \pm 1), geringen (1,7% \pm 2,6), mittleren (1,9% \pm 3,5) oder sogar hohem Risiko (3,6% \pm 5,7) assoziiert wurden (p<0,01).

3.3.6. Organlokalisation der verschiedenen Immunzellen

Bei der Organlokalisation unterscheidet diese Untersuchung zwischen Magen, Dünndarm, Dickdarm und bei den Lokalisationen sekundärer GISTs zwischen Leber und Peritoneum. Hier zeigt sich eine signifikant höhere Proliferationsaktivität im Peritoneum (18,3% ±7,3) als in Dünndarm (8,3% ±8,7) (p<0,01), Magen (6,1% ±7) (p<0,01) und in der Leber (12,9% ±8,2) (p<0,05). Während Proben, die aus dem Dickdarm entnommen wurden, eine große Streuung in den Werten der Proliferationsaktivität (11,7% ±11,3) aufweisen und somit keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu allen übrigen Lokalisationen zeigen, ist die Proliferationsaktivität der Leberproben signifikant höher als die des Magens (p<0,01). Außerdem ist die prozentuale Anzahl von CD3⁺-Zellen (T-Lymphozyten) in der Leber (11,7% ±11,6) höher als im Magen (1,3% ±2,1), Dünndarm (3,7% ±5,4) und Peritoneum (4,4% ±4,6) (jeweils p<0,01). Magen-GISTs haben signifikant weniger CD3⁺-Zellen als GISTs des Dünndarms und Peritoneums (p<0,01). Die CD20⁺-Zellen zeigen sich signifikant seltener in Magen-GISTs (0,7% ±2) als in Lebermetastasen (3,7% ±9) (p<0,01). Würde man den p-Wert hier auf p<0,05 anheben, so wären auch im Dünndarm (0,6% ±1) weniger CD20⁺-Zellen als in der Leber (p<0,01). Auf der anderen Seite ist die Ausprägung der KIM1P⁺-Zellen im Peritoneum (32,3% ±9,1) sowie in Dünndarm (28,6%± 11,8), Dickdarm (30,4% ±12) und Magen (28,7% \pm 11,4) deutlich stärker als in Lebermetastasen (18,2% \pm 11,4) (p<0,01). CD56⁺-Zellen sind häufiger in Lebermetastasen $(4,4\% \pm 8,7)$ als in Magentumoren $(0,8\% \pm 2,4)$ (p<0,01). Peritonealmetastasen (9,9 cm ±7,2) sind signifikant größer als Magen-GISTs (6,2 cm ±4,6) (p<0,01). Alle anderen Lokalisationen zeigen hier und auch in den übrigen Antikörperfärbungen keine Signifikanzen bezüglich der Organlokalisation. (Siehe Abb. 19)



Abbildung 19: Organlokalisation im Vergleich zu a) Proliferationsaktivität, b) CD-3-Mean und c) Kim-1P-Mean

3.3.7. Morphologie

Diese Untersuchung unterscheidet zwischen spindelzelligen und epitheloid Tumoren sowie einer Form, die beide Morphologien enthält und entsprechend als gemischt bezeichnet wird. Im vorliegenden Kollektiv finden sich signifikante Unterschiede zwischen den spindelzelligen GISTs (26,3% ±10,8) und den epitheloiden (32,7% ±12) sowie den gemischten (31,7% ±11,1) bei der Anzahl der Kim-1P⁺-Zellen (p<0,01). In Bezug auf Tumorgröße, Mitoserate, Proliferationsaktivität, CD3, CD20, CD56, CD68 und KIM1P konnten in den übrigen Konstellationen keine richtungsweisenden Ergebnisse erzielt werden. (Siehe Abb. 20)



Abbildung 20: Morphologie im Vergleich zu Kim-1P

3.4. Darstellung der Ergebnisse der real-time RT-PCR an ausgewählten Patientenproben

Es konnten 17 Proben Frischgewebe von metastasierten GISTs neun verschiedener Patienten (5 Frauen, 4 Männer) gewonnen werden. Diese Proben wurden auf die Interleukine II-6, II-1 β und TNF- α untersucht, um sie mit den Ergebnissen der vorangehenden Untersuchung (Cameron et al. 2008) zu vergleichen. Die Ergebnisse sind statistisch nicht endgültig verwertbar, da das Kollektiv zu klein ist, um signifikante Aussagen treffen zu können. Es war nicht möglich, mehr Frischgewebe zu metastasierten GISTs zu bekommen. Die Ergebnisse werden hier dennoch verwertet. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass weitere Untersuchungen diesbezüglich nötig sind.

3.4.1. Interleukin 6

Die real-time RT-PCR hat ergeben, dass II-6 zwar bei 8 von 9 Patienten nur sehr gering nur ausgebildet wird. Interessanterweise fiel jedoch ein Patient (Patient 5) extrem aus der Reihe (siehe Abbildung 21).



Abbildung 21: Detektiertes II-6 bei Patient 1-9 im Vergleich zu β -Aktin als "housekeeping"-Gen

3.4.2. Interleukin 1β

Interleukin 1 β zeigt einen ähnlichen Effekt wie II-6. Bei einem einzelnen Patienten, hierbei handelt es sich um denselben Patienten wie bei Interleukin 6, wurden sehr hohe Werte ermittelt im Vergleich zu den übrigen Patienten. Allerdings gab es hier zwei weitere Patienten, deren Metastasen deutlich hohe II-1ß-Werte hatten. (Siehe Abb. 22)





3.4.3. Tumornekrosefaktor α

Der Tumornekrosefaktor α kommt bei zwei Patienten in einer um das Vielfache erhöhten Menge an TNF- α vor, während sich die Messdaten der übrigen Patienten im kaum messbaren Bereich bewegen. Die beiden Patienten mit erhöhtem Tumornekrosefaktor α weisen auch schon auffällige II-1ß-Werte auf, während ihre II-6-Werte keine Auffälligkeit zeigen. (Siehe Abb. 23)



Abbildung 23: Detektiertes TNF- α bei Patient 1-9 im Vergleich zu β -Aktin als "housekeeping"-Gen

	Insgesamt	Patient 3	Patient 5	Patient 6
Kim1P	26,7 ±6,3	28,7 ±7	49,5 ±17	23,2
CD3	7,3 ±2,3	17,4 ±2,3	0,006 ±0,042	31,6
CD68	4,6 ±1,5	4,4 ±0,8	0,1 ±0,002	3,6
CD20	1,8 ±0,3	1,3 ±1,1	0,06 ±0,07	13,2
CD56	2,4 ±0,7	0,7 ±1	0,07 ±0,1	0,1

Tabelle 6: Vergleich der prozentualen Anzahl an Immunzellen (in Mean in % ± Standardabweichung) zwischen dem gesamten Kollektiv sekundärer Tumoren und den drei Patienten, die extreme Werte bei der PCR zeigten. Die Werte, die deutlich über oder unter der Norm liegen, sind rot markiert.

3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Während die Kim-1P⁺-Zellen die häufigsten Zellen in primären und sekundären GISTs sind (siehe Abb. 13) und etwa gleich häufig vorkommen, zeigt sich beim Vergleich primärer GISTs mit sekundären, dass vor allem die lymphozytären Zellen der T-Zelllinie (CD3) in den Metastasen der GISTs signifikant häufiger sind als in den primären Tumoren (p<0,01). Bei einem p-Wert unter 0,05 gilt dasselbe für CD20⁺-B-Zellen. Weiterhin konnte ein signifikanter Unterschied der Lebermetastasen im Vergleich mit den Peritonealmetastasen festgestellt werden. Hier befand sich eine größere Anzahl der lymphozytären Zellen sowie der Natürlichen-Killerzellen (CD56) in der Leber. Desweiteren hat sich aus der Untersuchung ergeben, dass die Proliferationsaktivität in den primären GISTs des Magens niedriger ist als in den Lebermetastasen und dort wiederum geringer als in den Peritonealmetastasen. Auch die T-Lymphozyten (CD3) finden sich vermehrt in den sekundären Lebermetastasen als in Magen-GISTs. Und schließlich ist nicht nur die Proliferationsaktivität der kleinen Tumoren niedriger, als die der Tumoren größer 2 cm, sondern es sinkt mit abnehmender Größe auch die Anzahl der Kim-1P+ Zellen. In der real-time RT-PCR sind in dem kleinen Kollektiv ebenfalls einige interessante Beobachtungen zu machen. Es lässt sich feststellen, dass die Mehrzahl der Metastasen und ihre Immunzellen die untersuchten Interleukine zwar nur in sehr geringen Mengen exprimieren, gleichzeitig aber jeweils ein bis zwei Patienten durch sehr hohe Werte deutlich auffallen (siehe Tab. 6).

4. <u>Diskussion</u>

Dies ist die erste Untersuchung, die sich vergleichend mit den Immunzellen zwischen primären und sekundären Tumoren in unbehandelten GISTs beschäftigt. GISTs gelten als histologisch homogene Tumoren. Sie besitzen ein Tumorstroma mit Gefäßen und Immunzellen (Cameron et al. 2008). Nach meinen Erkenntnissen unterscheidet sich die Verteilung der Immunzellen zwischen primären und sekundären GISTs und diese Konstellation könnte in Zukunft zum Beispiel Hinweise auf die Prognose geben.

Im Folgenden soll versucht werden, die Fragen aus der Fragestellung (siehe Kapitel 1.5.) in ihrer Reihenfolge zu beantworten:

Ad 1: In dieser Untersuchung mit 189 primären c-kit⁺-GISTs, die bei Probenentnahme nicht mit Imatinib oder Sutent behandelt waren, konnten die Ergebnisse der Untersuchung von 47 GISTs (Cameron et al. 2008) bestätigt werden. Es zeigte sich auch in der neuen Untersuchung, dass GISTs ein Tumorstroma besitzen. Dieses Stroma enthält verschiedene Immunzellen. Die häufigsten Immunzellen in primären GISTs sind fibrohistiozytäre Zellen, die mit dem Marker anti-Kim1P angefärbt wurden. Die Kim1P⁺-Zellen verteilen sich unregelmäßig im Tumorstroma und zeigen eine für dendritische Zellen typische Oberflächenstruktur. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der Voruntersuchung, dass Kim1P⁺-Zellen die häufigsten Immunzellen im gastrointestinalen Stroma darstellen und eine Subpopulation der dendritischen Zellen vertreten. Gleichzeitig sind CD68⁺-Zellen, die die Gruppe der Makrophagen präsentieren, sehr viel seltener. Beide Zellreihen müssen also voneinander getrennt beurteilt werden. Bedenkt man bei den Differenzierungsmöglichkeiten der Monozyten, dass sie sich im Tumorstroma in Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) oder unreife, dendritische Zellen differenzieren können (Kim et al. 2006 b), weist bislang die weitestgehende Abwesenheit von Zytokinen in primären GISTs (Cameron et al. 2008) auf einen unreifen, inaktiven Status der Immunzellen hin. Offenbar bilden die Kim1P+ Zellen aber eine sehr heterogene Subpopulation der dendritischen Zellen. Histomorphologisch unterscheiden sie sich oftmals deutlich voneinander (siehe Abbildung 24). Es gibt stark angefärbte und runde Zellen und auf der anderen Seite Zellen, die nur zart angefärbt sind. Hier stellt sich weiter die Frage, welche Rolle die anwesenden Immunzellen im Tumorstroma übernehmen. Es lässt sich vermuten, dass sich möglicherweise nicht alle Kim1P⁺-Zellen in einem inaktiven Status befinden, sondern dass es aktive Subpopulationen unter ihnen gibt,

die möglicherweise unterschiedlichen Einfluss auf das Tumorwachstum, die Proliferationsaktivität und somit letztendlich auch auf den Progress des einzelnen Tumors haben.



Abbildung 24: Primäre GISTs mit anti-Kim1P gefärbt. Eine Darstellung der histomorphologischen Heterogenität A) runde, pralle Zellen, die aktiviert wirken, B) viele zartgliedrige Kim1P⁺-Zellen mit Ausläufern, C) stark angefärbte Zellen mit dendritischen Ausläufern, D) wenige zarte Zellen.

Auf der einen Seite ist es möglich, dass die DCs Antigene, die von benachbarten Tumorzellen freigesetzt werden, einfangen und prozessieren, um dann in die entsprechenden Lymphknoten zu migrieren, wo die Antigene den jeweiligen Lymphozyten präsentiert werden (Lespagnard et al. 1999). Die hieraus resultierende Immunantwort wird unterschiedlich diskutiert. Eine Möglichkeit besteht darin, dass eine adäquate Immunantwort im jeweiligen Lymphknoten unterdrückt wird (Kim et al. 2006 a) und so eine Art residente Toleranz gegenüber dem Tumor aufgebaut wird. In diesem Sinne wird ebenfalls diskutiert, dass die DCs unreif bleiben, weil ihre Reifung durch den Tumor selbst unterdrückt wird. Auf diese Weise würde die Effizienz der DCs in der Kontrolle des Tumorwachstums stark abnehmen (Xie et al. 2006). Auf der anderen Seite wäre es möglich, dass Tumorwachstum mit Hilfe dendritischer Zellen verhindert oder zumindest verringert

werden könnte, sodass die Immunzellen sogar schon mit einer besseren Prognose assoziiert wurden (Okuyama et al. 1998).

Die Lymphozyten waren wie in der Voruntersuchung im Vergleich zu den dendritischen Zellen insgesamt sehr selten und am häufigsten durch die CD3⁺-T-Zellen vertreten. CD56+ NK-Zellen waren selten, so wie auch die CD20⁺-B-Zellen. In der geringen Anzahl der Lymphozyten spiegelte sich die Unterlegenheit des erworbenen Immunsystems im Tumorstroma der GISTs wieder. Da die Tumorprogression aber mit der Anzahl der Lymphozyten invers zusammenhängt (Xie et al. 2006), scheint eine niedrige Anzahl an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten ungünstig für die Prognose zu sein. Die Risikoscores nach Miettinen et al. (2002) und Fletcher et al. (2002) spiegeln das für die T-Zellen entsprechend wider. Nach Miettinen sind signifikant weniger CD3⁺-Zellen in den benigne klassifizierten Tumoren als in malignen oder auch den sekundären (p<0,01). Bei der Berechnung des Risikos für maligne Entartung nach Fletcher ergab sich erwartungsgemäß ein ähnliches Ergebnis. Tumoren mit einem hohen Risiko der Entartung zeigen signifikant mehr CD3⁺-Zellen als die mit sehr niedrigem Risiko (p<0,01). Für GISTs bestätigt sich die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen Anzahl der T-Zellen und dem Risiko der Entartung. Für andere Tumorentitäten wurde bei Bell und Hussein bereits die Möglichkeit einer fehlerhaften Reifung der ortsständigen Tumor-assoziierten DCs diskutiert als Folge eines fehlenden T-Zell-Primings (Bell et al. 1999, Hussein 2005).

Ad 2: Bisherige Untersuchungen an Immunzellen in Tumoren beschreiben meist die Verteilung der Immunzellen im Primärtumor, nicht jedoch in den Metastasen. In GIST-Metastasen konnten wir nun zeigen, dass die häufigsten Immunzellen die Kim1P⁺-Zellen waren, während die übrigen Immunzellen wie in den Primärtumoren auch, in den Metastasen deutlich seltener vorkamen als Kim-1P⁺-Zellen (siehe Abb. 13). Dennoch zeigen sich Unterschiede. Die CD3⁺-T-Zellen sind zum Beispiel in den Metastasen signifikant häufiger als in den primären Tumoren (p<0,01). Die CD20⁺-B-Zellen sind ebenfalls deutlich häufiger in den Metastasen zu finden als in den primären GISTs (p<0,05). Das Gleiche gilt für CD56⁺-Zellen (p<0,05). In der Literatur ist bislang beschrieben, dass primäre Tumoren von Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen infiltriert sind und dabei offenbar auch eine Bedeutung für die Prognose des Tumors haben, was den Vorschlag erbrachte, Typ, Dichte und Lokalisation insbesondere von Lymphozyten zu bestimmen, um so einen neuen

44

prognostischen Faktor zu etablieren (Pagès et al. 2009). Es stellte sich die Frage, ob diese Beobachtung auch auf Metastasen ausgeweitet werden könnte. Der Anstieg besonders der lymphozytären Zellen in den GIST-Metastasen, die in den primären GISTs wesentlich geringer ausgeprägt sind, ist zwar signifikant, doch seine Bedeutung ist in der Literatur bisher umstritten. Einerseits könnten T-Zellen mit der Produktion von II-4 die Metastasierung verstärken, indem sie Makrophagen aktivieren, die wiederum Tumorinvasion anregen (Pardoll 2009). Unter dieser Voraussetzung könnte man sich vorstellen, dass vor allem solche GISTs metastasieren, die eine höhere Anzahl an lymphozytären Zellen aufweisen und dadurch die Metastasierung mit Hilfe aktivierter Makrophagen favorisieren. Auf der anderen Seite konnte die lymphozytäre Infiltration auch schon mit einer besseren Prognose und seltenerer Metastasierung in Verbindung gebracht werden (Lulgi et al. 2009). Zukünftig müssten hier die verschiedenen Subpopulationen der T-Lymphozyten, wie zum Beispiel CD4⁺- und CD8⁺-Zellen, untersucht werden, um die Rollen der einzelnen Lymphozyten bei der Immunantwort genauer zu differenzieren. Eine stärkere Infiltration mit lymphozytären Zellen sekundärer Tumore, wie es bei den Metastasen der GISTs der Fall ist, könnte auch auf eine stärkere Immunreaktion des Körpers gegen den Tumor hindeuten.

Immunzellen befinden sich im Tumorstroma, ohne dabei den Tumor abzuwehren. Es ist möglich, dass sie eine Funktion für das Tumormikroenvironment haben. Die Frage, ob die Immunzellen zum Beispiel im Sinne einer Immunantwort Zytokine produzieren, wurde in Ansätzen unter Ad 4 aufgegriffen, bedarf aber sicherlich weiterer Untersuchung.

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass die Immunzellen im Stroma der Peritonealmetastasen tatsächlich andere Häufigkeiten haben als in den Lebermetastasen. Lebermetastasen scheinen im Gegensatz zu den Primärtumoren und den peritonealen Metastasen bezüglich der Immunzellen insgesamt heterogener. Das kann bedeuten, dass die Peritonealmetastasen den Primärtumoren gegenüber bezüglich des Tumorstromas ähnlicher sind. Während in Lebermetastasen mehr CD3⁺-Zellen vorkommen (p<0,01) als in Peritonealmetastasen, ist es bei Kim-1P⁺-Zellen umgekehrt (p<0,01). Gleichzeitig wäre die Proliferationsaktivität in der Leber signifikant geringer als im Peritoneum bei einem p-Wert unter 0,05 (p<0,05). Möglicherweise unterscheiden sich die beiden Metastasenlokalisationen nicht nur in der quantitativen Zusammensetzung der infiltrierenden Immunzellen, sondern haben eine unterschiedliche Bedeutung für die

45

Prognose, wobei der Verlauf anhand der Patientenakten in dieser Untersuchung nicht überprüft werden konnte.

Da die Immunzellen in primären Tumoren bereits vorbeschrieben sind als prognostischer Marker (Pagès et al. 2009), könnte man folgern, dass die Immunzellen im Stroma der Metastasen genauso die Prognose des Tumors beeinflussen.

Ad 3:

Für verschiedene solide Tumoren, wie zum Beispiel Mammakarzinome und Melanome, wird die intratumorale Präsenz von Immunzellen und deren Aufgabe diskutiert (Bell et al. 1999, Lespagnard et al. 1999, Vermi et al. 2003). Die genannten Tumore sind allerdings mesenchymalen und epithelialen Ursprungs und deswegen nicht unbedingt vergleichbar mit GISTs. Für GISTs haben wir versucht, mit Hilfe der Untersuchung von Immunzellen im Vergleich mit den für GISTs spezifischen Parametern Tumorgröße, Proliferationsrate, Mitoserate, Malignität, Organlokalisation und Morphologie, Zusammenhänge aufzudecken und es ergaben sich einige bemerkenswerte Ergebnisse.

Betrachtet man als erstes die häufigsten Immunzellen, die **Kim-1P⁺-Zellen** im Tumorstroma sowohl primärer als auch sekundärer GISTs, so werden verschiedene, interessante Zusammenhänge deutlich.

 Wie beschrieben, ist die Proliferationsrate insgesamt in kleinen Tumoren niedriger. Gleichzeitig ist in GISTs <1 cm die Anzahl an Kim-1P⁺-Zellen signifikant geringer als in Tumoren >10 cm (p<0,01). Für Tumoren <2 cm und <10 cm im Vergleich zu denen <1 cm bestünde auch Signifikanz bezüglich der Kim-1P⁺-Zellen, wenn der p-Wert auf <0,05 festgelegt worden wäre. Der direkte Vergleich zwischen Proliferationsrate und Kim-1P⁺-Zellen wäre signifikant bei p<0,05, sodass Tumoren mit niedriger Proliferationsaktivität auch weniger Kim-1P⁺-Zellen haben. Bedeutet dies, dass kleine Tumoren einfach auf Grund ihrer Größe kaum Immunzellen anlocken? Es könnte außerdem einen Zusammenhang zwischen Kim-1P⁺-Zellen und Tumorprogress widerspiegeln.

Betrachtet man die Metastasen getrennt bezüglich ihrer Proliferationsrate, dann zeigt sich, dass Lebermetastasen insgesamt eine geringere Proliferationsrate aufweisen als Peritonealmetastasen (p<0,05). Außerdem enthalten Lebermetastasen

signifikant weniger Kim-1P⁺-Zellen als primäre GISTs und Peritonealmetastasen (p<0,01).

Zusammenfassend muss man für die fibrohistiozytären, gewebsständigen, dendritischen Zellen mit dem Marker anti-Kim-1P sagen, dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen einer hohen Anzahl an Kim- $1P^+$ -Zellen und einer gesteigerten Proliferationsaktivität besteht, zumindest in Hinblick auf die sekundären GISTs. Hierbei sind offenbar die Metastasen des Peritoneums deutlich aggressiver als die der Leber, da sie nicht nur eine signifikant erhöhte Proliferationsaktivität im Vergleich zu den übrigen Lokalisationen haben (p<0,01), sondern auch die größten Tumoren im Peritoneum gefunden wurden. Hierbei könnte eine Rolle spielen, dass im Peritoneum mehr Raum für das Wachstum des Tumors besteht. Vergleicht man die Proliferationsaktivität der Peritonealmetastasen mit dem Magen zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied (p<0,01). Im Vergleich zu Dünndarm und Leber wäre dies ebenfalls der Fall bei einem p<0,05.

 Morphologisch wiesen die spindelzelligen GISTs, die mit einer besseren Prognose assoziiert werden (Fletcher et al. 2002), signifikant weniger Kim-1P⁺-Zellen auf (p<0,01). Alles deutet auf einen Zusammenhang zwischen Progress und Anzahl der Kim-1P⁺-Zellen hin. Allerdings fehlen an dieser Stelle zur weiteren Diskussion Untersuchungen zu GIST-ähnlichen Tumoren wie Leiomyomen oder Leiomyosarkomen, mit denen die hier gefundenen Ergebnisse verglichen werden könnten.

Neben den unter Ad 1 und Ad 2 aufgeführten Veränderungen zeigen sich Unterschiede der Zusammensetzung und Anzahl der **lymphozytären Zellen**, wie den CD3⁺-T-Lymphozyten und den CD20⁺-B-Lymphozyten, bei dem Vergleich der oben aufgeführten verschiedenen Parameter.

 Besonders die T-Zellen scheinen sich von den Kim-1P⁺-Zellen zu unterscheiden. Bei einer niedrigen Proliferationsrate <10% Ki67-Antigen sind CD3⁺-Zellen signifikant seltener als in der Kategorie der Proliferationsrate >10% (p<0,01). Auch die B-Zellen sind bei einer Proliferationsrate von <10% seltener (p-Wert<0,05). Unsere Daten deuten darauf hin, dass insbesondere die T-Zellen in sekundären GISTs häufiger sind. Gleichzeitig sind T-Zellen in Lebermetastasen häufiger als in Peritonealmetastasen (p<0,01). Es muss betont werden, dass in der Leber, wo verhältnismäßig wenige Kim-1P⁺-Zellen sind, im Vergleich mit den Peritonealmetastasen viele CD3⁺-Zellen liegen.

Eine Vorstellung könnte sein, dass in den Tumoren mit vielen CD3⁺-Zellen eine Immunantwort durch den Körper eingeleitet wird, wobei die T-Zellen durch Chemokine angelockt und aktiviert würden.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Metastasen der GISTs deutlich in der Anzahl der Immunzellen unterscheiden, wenn der Tumor in die Leber oder in das Peritoneum migriert. Einerseits unterscheidet sich die Leber vom Peritoneum als Standort durch die größere Anzahl an Zellen, die das Mikroenvironment bilden. Außerdem könnte eine gewisse Immuntoleranz, die das Organ Leber mit sich bringt, eine Rolle spielen (Vidal-Vanaclocha 2008).

Es lässt sich sagen, dass sich mehr Immunzellen in den Metastasen insgesamt befanden, wobei die lymphozytäre Reaktion in den Lebermetastasen deutlicher war und eventuell sogar die mögliche Tumor-unterstützende Funktion der dendritischen Zellen beeinflusst (Kim et al. 2006 a). Mehr fibrohistiozytäre/dendritische Zellen könnten den Progress des Tumors im einzelnen Patienten begünstigen. Es bleibt aber nach wie vor die Frage, ob die Immunzellen den Tumor erfolgreich bekämpfen können oder ob der Einfluss des Tumors auf das Tumorstroma zu groß ist. Tatsächlich scheint es hier ein Wechselspiel zwischen "Tumorescape" und "Tumorequilibrium" zu geben. In diesem Zusammenhang spricht man von "Immunoediting" (Dunn et al. 2002).

Für die übrigen Korrelationen zwischen Immunzellen und Tumorgröße, Malignität, Proliferationsaktivität und Lokalisation konnten keine wegweisenden Befunde entdeckt werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass GISTs entgegen dem früheren Verständnis eine insgesamt heterogene Gruppe von Tumoren sind, die aufgrund ihrer vielfältigen Lokalisationen auch als GIST-Familie bezeichnet werden (Corless und Heinrich 2008). Während beinahe alle anderen Tumoren des Gastrointestinaltraktes auf ein einzelnes Organ beschränkt sind, wie zum Beispiel das Magenkarzinom, das Pankreaskopfkarzinom oder das Kolonkarzinom, ist der GIST vom Ösophagus bis zum Dickdarm zu finden. Bezüglich des

48

Immunsystems scheint die Häufigkeit und Verteilung der Immunzellen innerhalb der Primärtumoren vergleichbar. Davon abzugrenzen sind die Metastasen, wobei die Peritonealmetastasen den Primärtumoren insbesondere in Bezug auf Kim-1P gleichen. Das könnte mit dem Entstehungsmechanismus der Peritonealmetastasen zusammenzuhängen, die durch direkte Aussaat von Tumorzellen aus Primärtumoren entstehen könnten (zum Beispiel durch Tumorruptur).

Ad 4: Mittels real-time RT-PCR wurde versucht, einen kleinen Überblick anhand eines überschaubaren Kollektivs (bei begrenztem Material) über die Expression von Akute-Phase-Proteinen (zum Beispiel Interleukine) innerhalb der Metastasen zu gewinnen. Es zeigte sich, dass in GIST-Metastasen spezifische Transkripte von Akute-Phase-Zytokinen detektiert werden konnten. In der vorangegangenen Untersuchung durch Cameron (Cameron et al. 2008) hatte sich gezeigt, dass in Primärtumoren II-6, TNF-α und II-1β zwar detektierbar waren und auch signifikante Unterschiede untereinander aufwiesen, aber keine Signifikanz im Hinblick auf die Lokalisation gesehen werden konnte. Im Vergleich mit den primären GISTs wurden in den sekundären Tumoren diese Zytokine ebenfalls detektiert. Dabei gab es jedoch jeweils einen bzw. zwei Patienten, deren Ergebnisse sich sehr stark in der Expression der Interleukine von den anderen Patienten unterschieden. An dieser Stelle stellt sich die Frage, was diese Patienten untereinander unterscheidet, das diese Tatsache erklären könnte.

Eingangs habe ich die Frage aufgeworfen, ob sich die Ergebnisse der Immunhistochemie durch die RT-PCR vielleicht bestätigen lassen. Hierzu ließ sich ermitteln, dass der Patient, der eine starke Transkription von II-6 und II-1 β zeigte, tatsächlich eine sehr viel höhere Anzahl an Kim-1P⁺-Zellen (49,5% ±17) hatte, als es im Durchschnitt (Kim-1P⁺-Zellen der sekundären GISTs: 26,7% ±6,3) der Fall war. Auf der anderen Seite waren die CD3⁺-Zellen bei demselben Patienten prozentual signifikant seltener (0,006% ±0,042) als im Durchschnitt (CD3⁺-Zellen der sekundären GISTs: 7,3% ±2,3). Der Patient erlitt klinisch einen starken Progress des Tumors. Die beiden Patienten, bei denen dagegen II-6 keine Auffälligkeit zeigte, aber TNF- α sehr stark und II-1 β ein wenig mehr transkribiert wurden, hatten eine signifikant höhere Anzahl an CD3⁺-Zellen, also T-Zellen (31,6% und 17,4% ±2,3) als der Durchschnitt (7,3% ±2,3).

aufwies, führte die Behandlung mit durch TNF-α gereiften DCs zu einer regelrechten Explosion der Metastasen (Vohra et al. 2009). Diese interessanten Differenzen zwischen den einzelnen Patienten ermutigen hier, mit einem größeren Kollektiv genauer weiter zu forschen und einen Zusammenhang zwischen klinischem Progress, Immunzellen und der Expression der Akute-Phase-Proteine herzustellen.

5. <u>Zusammenfassung</u>

Einführung

In dieser Arbeit wurde das Tumorstroma von primären und metastasierten GISTs immunhistochemisch auf seine Immunzellen untersucht. GISTs waren bislang eher als histologisch homogene Tumoren bekannt. Es hat sich aber gezeigt, dass sie ein Tumorstroma besitzen, in das verschiedene Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Cameron et al. 2008) eingebettet sind, deren Häufigkeit und Funktion bislang ungeklärt blieb. Untersuchungen verschiedener anderer Tumoren haben ergeben, dass es im peritumoralen Gewebe sowie auch innerhalb der Tumore Immunzellen gibt (Bingle et al. 2002, Vakkila et al. 2006, Vermi et al. 2003, Sandel et al. 2005, O'Keefe et al. 2004). Es stellte sich die Frage nach Zusammenhängen zwischen Proliferationsaktivität, Morphologie, Tumorgröße, Organlokalisation und Malignität sowie den Immunzellen. In vorangegangenen Studien hat sich gezeigt, dass bestimmte Immunzellen eine starke Tumorunterstützende Funktion haben können, insbesondere wenn sie innerhalb des Tumors und nicht marginal gelegen sind (Vohra et al. 2009, Pardoll 2009). Bei einer kleinen Anzahl der Metastasen wurde mit RT-PCR versucht, einen Überblick über die Funktionalität der Immunzellen zu gewinnen.

Methoden

Insgesamt 188 unbehandelte primäre GISTs und 52 unbehandelte sekundäre GISTs wurden immunhistochemisch aufgearbeitet, um den Anteil an gewebsständigen, fibrohistiozytären Zellen (Kim-1P) und Zellen der Makrophagenlinie (CD68) zu bestimmen. Außerdem wurde der Anteil an lymphoplasmazellulären Zellen (CD3, CD20, CD56) in diesen Proben untersucht. Hierzu wurden die Paraffinblöcke der Exzisionspräparate oder der Stanzbiopsien mit Hilfe eines manuellen Tissue-Arrayer in einem Empfängerparaffinblock (TMA) nebeneinander aufgereiht. Die 22 entstandenen TMAs wurden immunhistochemisch aufgearbeitet und mit den fünf oben erwähnten Antikörpern gefärbt. Die Fotographien der Paraffinschnitte erbrachten durch die computergestützte Auswertung mit nachfolgender statistischer Bewertung der Ergebnisse sehr genaue Angaben der prozentualen Anzahl von Immunzellen in den jeweiligen Präparaten. Desweiteren wurde Reverse Transkription und real-time RT-PCR eingesetzt, um aus einem kleinen Pool aus Frischgewebe von Metastasen die Expression der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1 β , Interleukin 6 und Tumornekrosefaktor α zu ermitteln.

Ergebnisse

GISTs haben ein Tumorstroma, in das zahlreiche Immunzellen eingebettet sind. In den primären GISTs ist eine große Anzahl an Kim-1P+ Zellen zu finden, aber auch lymphozytäre Zellen (CD3⁺, CD20⁺, CD56⁺) und Makrophagen (CD68⁺). Interessanterweise ändert sich die Anzahl der Immunzellen in den Metastasen der GISTs. Zum einen zeigen Metastasen mehr lymphozytäre Zellen als die primären GISTs, zum anderen unterscheiden sich die Peritonealmetastasen von den Lebermetastasen. Peritonealmetastasen haben signifikant mehr Kim-1P⁺-Zellen als Lebermetastasen, während letztere wiederum mehr CD3⁺-T-Lymphozyten enthalten als die peritonealen Metastasen. Gleichzeitig differieren die beiden Lokalisationen bei der Proliferationsaktivität. Lebermetastasen haben eine niedrigere Proliferationsaktivität als peritoneale Absiedelungen des GIST. Die Unterschiede zwischen den primären und sekundären GISTs und innerhalb der Metastasenlokalisationen weisen auf ein Wechselspiel zwischen Tumor und Immunzellen hin, das Auswirkungen auf den Progress haben könnte.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Art der Kommunikation zwischen Immunzellen des GIST-Stromas und dem Tumor selbst zu detektieren.

Die Ergebnisse der RT-PCR des Frischgewebes von Metastasen im kleinen Kollektiv deuten auf einen Zusammenhang zwischen Immunzellen und Progress hin. Hierbei zeigte ein Patient mit im Vergleich zum Gesamtkollektiv sehr hohen Kim- $1P^+$ -Zellzahlen nicht nur eine extrem hohe Ausschüttung von II-6 und II- 1β , sondern auch einen klinischen Progress.

Ausblick

Für die Zukunft rückt immer weiter die Individualität des Tumors in den Vordergrund, was verdeutlicht, dass Tumore, die eine unterschiedliche Struktur ihres Tumorstromas, zum

Beispiel der Immunzellen, haben, auch einer auf sie angepassten, individuellen Therapie bedürfen. So ist nicht nur die weitere Aufschlüsselung der Immunzellen notwendig, sondern auch das Verständnis des GIST als Tumorfamilie, der nicht mehr als uniformer, homogener Tumor gesehen werden kann.

6. <u>Anhang</u>

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	10
Abbildung 2:	15
Abbildung 3:	16
Abbildung 4:	16
Abbildung 5:	21
Abbildung 6:	25
Abbildung 7:	26
Abbildung 8:	28
Abbildung 9:	28
Abbildung 10:	29
Abbildung 11:	29
Abbildung 12:	29
Abbildung 13:	30
Abbildung 14:	31
Abbildung 15:	32
Abbildung 16:	33
Abbildung 17:	34
Abbildung 18:	35
Abbildung 19:	37
Abbildung 20:	37
Abbildung 21:	38
Abbildung 22:	39
Abbildung 23:	40
Abbildung 24:	. 43

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	7
Tabelle 2:	7
Tabelle 3:	18
Tabelle 4:	20
Tabelle 5:	24
Tabelle 6:	40

7. Literaturverzeichnis

Alibaud L, Llobera R, Al Saati T, March M, Delsol G, Rubin B (2000): A new monoclonal anti-CD3e antibody reative on paraffin sections. J Histochem Cytochem <u>48</u>, 1609-1616.

Appelman HD (1990): Mesenchymal tumors of the gut: Histological perspectives, new approaches, new results and does it make any difference? Monogr Pathol <u>31</u>, 220-246.

Balkwill F, Mantovani A (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet <u>357</u>, 539-545.

Bell D, Chomarat P, Broyels D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau J, Davoust J, Palucka KA, Bancheraeu J (1999): In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. J Exp Med <u>190</u>, 1417-1426.

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE (2002): The role of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications for new anticancer therapies. J Pathol <u>196</u>, 254-265.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997): Cellular responses to interferon gamma. Annu Rev Immunol <u>15</u>, 749-795.

Brainard JA, Goldblum JR (1997): Stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic study of 39 cases. Am J Surg Pathol <u>21</u>, 407-416.

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 <u>20</u>, 327-334.

Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G (1987): The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T-lymphoid lineage. J Immunol <u>138</u>, 648-655.

Corless CL, Heinrich MC (2008): Molecular Pathobiology of Gastrointestinal Stromal Sarcomas. Annu Rev Pathol Mech Dis <u>3</u>, 557-586.

Costa P: NK4. CD56 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. Garland Publishing Inc., New York, London 1997; 271-272

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, Ballman KV, Antonescu CR, Maki RG, Pisters PW, Demetri GD, Blackstein ME, Blanke CD, von Mehren M, Brennan MF, et al. (2009): Adjuvant imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet <u>373</u>, 1097-1104.

de Visser K, Coussens LM (2005): The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer developement. Cancer Immunol Immunother <u>54</u>, 1143-1152.

de Visser K, Eichten A, Coussens LM (2006): Paradoxical roles of the immune system during cancer developement. Nature <u>6</u>, 24-37.

Donnelly RP, Crofford LJ, Freeman SL, Buras J, Remmers E, Wilder RL, Fenton MJ, et al. (1993): Tissue-Specific Regulation of II-6 Production by II-4. Differential effects of IL-4 on nuclear factor-kappa B activity in monocytes and fibroblasts. J Immunol <u>151</u>, 5603-5612.

Dörken B, Möller P, Pezzutto A, et al. : B-cell antigens: CD20. In: Leukocyte Typing IV.White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference, Knapp W, Dörken B et al. Vienna, Austria. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1989; 46-48.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002): Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol <u>3</u>, 991-998

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.

Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H, Eitelbach F, Thiele J, Pacini R, Cavaliere A, et al. (1993): PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. Am J Pathol <u>142</u>, 1359-1372.

Fearon ER, Vogelstein B (1990): A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. Cell <u>61</u>, 759-767.

Fletcher CD, 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.

Franquemont, DW (1995): Differentiation and risk assessment of gastrointestinal stromal tumors. Am J Clin Pathol <u>103</u>, 41-47.

Gabay C, Kushner I (1999): Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med <u>340</u>, 448-454.

Graeme-Cook F, Bhan AK, Harris NL (1993): Immunohistochemical characterization of intraepithelial and subepithelial mononuclear cells of the upper airways. Am J Pathol <u>143</u>, 1416-1422.

Haller F, Gunawan B, von Heydebreck A, Schwager S, Schulten HJ, Wolf-Salgò J, C Langer, G Ramadori, 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.

Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, et al. (2003): Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. J Clin Oncol <u>21</u>, 4342-4349.

Herold G: Innere Medizin, hrsg. v. Herold G, Köln 2007.

Hohenberger P, Reichardt P, Stroszczynski C, Schneider U, Hossfeld DK (2003): Gastrointestinale Stromatumoren – Tumorentität und Therapie mit Imatinib. Dtsch Arztebl <u>100</u>, 1612-1618.

Huang E, Nocka K, Beier DR (1990): The hematopoietic growth factor KL is encoded by the SI locus and is ligand of c-kit receptor, the gene product of the W locus. Cell <u>63</u>, 225-233.

Huizinga JD, Thuneberg L, Klüppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A (1995): W/ kit gene required for intestinal cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. Nature <u>373</u>, 347-349.

Hussein, MR (2005): Dendritic cells and melanoma tumorigenesis: an insight. Cancer Biol Ther <u>4</u>, 501-505.

Joyce JA (2005): Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. Cancer Cell 7, 513-520.

Kim R, Emi M, Tanabe K (2006 a): Functional roles of immature dendritic cells in impaired immunity of solid tumour and their targeted strategies of provoking tumour immunity. Clin Exp Immunol <u>146</u>, 189-196.

Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K (2006 b): Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. Cancer Res <u>66</u>, 5527-5536.

Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM (1998): Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): Gastrointestinal stromal tumors show phenotypiccharacteristics of the interstitial cells of Cajal. Am J Pathol <u>11</u>, 1259-1269.

Kitamura Y, Go S, Hatanaka K (1978): Decrease of mast cells in W/ Wv mice and their increase by bone marrow transplantation. Blood <u>52</u>, 447-452.

Lespagnard L, Gancberg D, Rouas G, Leclercq G, de Saint-Aubain-Sommerhausen N, Di Leo A, Piccart M, Verhest A, Larsimont D (1999): Tumor-infiltrating dendritic cells in adenocarcinomas of the breast: a study of 143 neoplasms with a correlation to usual prognostic factors and to clinical outcome. Int J Cancer <u>84</u>, 309-314.

Lulgi A, Karamitopoulou E, Panayiotides I, Karakitsos P, Rallis G, Peros G, Iezzi G, Spagnoli G, Bihl M, Terracciano L, et al. (2009): CD8+ lymphocytes/ tumor-budding index: an independent prognostic factor representing a pro-/anti-tumor approach to tumor host interaction in colorectal cancer. Br J Cancer <u>101</u>, 1382-1392.

Luo G, Hershko DD, Robb BW, Wray CJ, Hasselgren PO (2003): Il-1 β stimulates Il-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF- κ B. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol <u>284</u>, 1249-1254.

Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Nishi S, Nishikawa K, Kobayashi S (1992): Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker systems. Development <u>116</u>, 369-375.

Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, Morris CF, McNiece IK, Jacobsen FW, Mendiaz EA, et al. (1990): Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. Cell <u>63</u>, 203-211.

Miettinen M, Lasota J (2001): Gastrointestinal stromal tumors: definiton, clinical, histological, immunohistochemical and molecular genetic features and differential diagnosis. Virchows Arch <u>438</u>, 1-12.

Miettinen M, Virolainen M, Sarlomo-Rikala M (1995): Gastrointestinal stromal tumors: Value of CD34 antigen in their identification and seperation from true leiomyomas and schwannomas. Am J Surg Pathol <u>19</u>, 207-216.

Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH, Lasota J (2000 a): Esophageal stromal tumors: a clinicopthologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 17 cases and comparison with esophageal leiomyomas and leiomyosarcomas. Am J Surg Pathol <u>24</u>, 211-222.

Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH, Lasota J (2000 b): 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 cliniopathologic, immunohistochemical, and molecular study of 1765 cases with long-term follow-up. Am J Surg Pathol <u>29</u>, 52-68.

Nilsson B, Bümming P, Meis-Kindblom JM, Odén A, Gustavsson B, Kindblom LG (2005): Gastrointestinal Stromal Tumors: The Incidence, Prevalence, Clinical Course, and Prognostication in the Preimatinib Mesylate Era- A Population-based Study in Western Sweden. Cancer <u>103</u>, 821-829.

O'Keefe J, Doherty DG, Kenna T, Sheahan K, O'Donoghue DP, Hyland JM, O'Farrelly C (2004): Diverse populations of T cells with NK cell receptors accumulate in the human intestine in health and in colorectal cancer. Eur J Immunol <u>34</u>, 2110-2119.

Okuyama T, Maehara Y, Kakeji Y, Tsujitani S, Korenaga D, Sugimachi K (1998): Interreleation between tumor-associated cell surface glycoprotein and host immune response in gastric carcinoma patients. Cancer <u>82</u>, 1468-1475.

O'Leary T, Berman J (2002): Gastrointestinal Stromal Tumors: Answers and Questions. Hum Pathol <u>33</u>, 56-458.

Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH (2009): Immune infiltration in human tumors: a prgnostic factor that should not be ignored. (Oncogene, im Druck)

Pardoll, D (2009): Metastasis-promoting immunity: when T-cells turn to the dark side. Cancer Cell <u>4</u>, 81-82.

Pezzutto A, Behm F, Callard RE: Flow cytometry analysis of the B-cell blind panel: joint report. In: Leukocyte Typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference. Knapp W, Dörken B, Gilks WR et al. Vienna, Austria. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1989; 165-174.

Poggi A: CD 56. CD guide. In: Leukocyte Typing VII. White cell differentiation antigens.Proceedings of the 7th International Workshop and Cenference. Mason D, Andre P, Bensussan A et al. Harrogate, UK. Oxford University Press Inc. New York; 805-806.

Qiu FH, Ray P, Brown K, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, Besmer P (1988): Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family- oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. EMBO J <u>7</u>, 1003-1011.

Radzun HJ, Hansmann ML, Heidebrecht HJ, Bödewadt-Radzun S, Wacker HH, Kreipe H, Lumbeck H, Hernandez C, Kuhn C, Parwaresch MR (1991): Detection of a monocyte/macrophage differentiation antigen in routinely processed paraffin-embedded tissues by monoclonal-antibody Ki-M1P. Lab Invest <u>65</u>, 306-315.

Rubin BP (2006): Gastrointestinal stromal tumors: an update. Histopathology <u>48</u>, 83-96.

Russell ES (1979): Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. Adv Genet <u>20</u>, 357-459.

Saito T, Yamazaki T: TC4. CD3 workshop panel report. In: Leukocyte Typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conferences, Kishimoto T, et al. Kobe, Japan. Garland Publishing Inc. New York, London; 44-48.

Sandel MH, Dadabeyev AR, Menon AG, Morreau H, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH, Janssenvan Rhin CM, Ensink NG, Tollenaar RA, et al. (2005): Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. Clin Cancer Res <u>11</u>, 2576-2582.

Sarlomo-Rikkala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M (1998): CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. Mod Pathol <u>11</u>, 728-734.

Suster S (1996): Gastrointestinal stromal tumors. Semin Diagn Pathol 13, 297-313.

Tlsty TD, Coussens LM (2006): Tumor stroma and regulation of cancer development. Annu Rev Pathol <u>1</u>, 119-150.

Tsujimura T, Hirota S, Nomura S (1991): Characterization of Ws mutant allele of rats: a 12-base deletion in tyrosine kinase domain of c-kit gene. Blood <u>78</u>, 1942-1946.

Tworek JA, Appelman HD, Singelton TD, Greenson JK (1997): Stromal tumors of the jejunum and ileum. Mod Pathol <u>10</u>, 200-209.

Tworek JA, Goldblum JR, Weiss SW, Greenson JK, Appelman HD (1999 a): Stromal tumors of the abdominal colon: a clinicopathologic study of 20 cases. Am J Surg Pathol <u>23</u>, 937-945.

Tworek JA, Goldblum JR, Weiss SW, Greenson JK, Appelman HD (1999 b): Stromal tumors of the anorectum: a clinicopathologic study of 22 cases. Am J Surg Pathol <u>23</u>, 946-954.

Vakkila J, Jaffe R, Michelow M, Lotze MT (2006): Pediatric cancers are infiltrated predominantly by macrophages and contain a paucity of dendritic cells:a major nosolgic difference with tumor adults. Clin Cancer Res <u>12</u>, 2049-2054.

Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, Berenzi A, Cella M, Colonna M (2003): Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. J Pathol <u>200</u>, 255-268.

Vidal-Vanaclocha F (2008): The Prometastatic Microenvironment of the Liver. Cancer Microenviron <u>1</u>, 113-129.

Vohra N, Verhaegen M, Martin L, Mackay A, Pilon-Thomas S (2009): TNF-a-treated DC exacerbates disease in a murine tumor metastasis model. (Cancer Immunol Immunother, im Druck).

Xie ZJ, Jia LM, He YC, Gao JT (2006): Morphological observation of tumor infiltrating immunocytes in human rectal cancer. World J Gastroenterol <u>12</u>,1757-1760.

<u>Danksagung</u>

Ich danke allen, die mich beim Abfassen meiner Dissertation unterstützt haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Direktor Prof. Dr. med. Dr. h.c. Giuliano Ramadori von der Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie im Zentrum Innere Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in seiner Abteilung und unter seiner engagierten Führung zu verfassen, bedanken. Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Dr. med. Silke Cameron, M.A., von der Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie im Zentrum Innere Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen für die wissenschaftliche Kompetenz, mit der sie mich betreut hat, und für die zahlreichen intensiven Gespräche, die mich jedes Mal nicht nur herausgefordert, sondern auch gefördert haben.

Ebenso zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Direktor Prof. Dr. med. Laszlo Füzesi von der Abteilung Gastroenteropathologie der Universitätsmedizin Göttingen für eine immer freundliche Betreuung, für viele Anregungen und die Möglichkeit, die Räumlichkeiten und Gerätschaften der Abteilung Gastroenteropathologie zu nutzen. Mein Dank gilt weiterhin Herrn PD. Dr. med. Florian Haller für die Hilfe insbesondere beim Einstieg in die Thematik und in das wissenschaftliche Arbeiten.

Sehr wertvoll war für mich auch die Unterstützung durch den Astrophysiker und Softwarespezialisten Robert Cameron, Ph.D., vom Max-Planck-Institut für Sonnensystemforschung Katlenburg-Lindau, der nicht nur das Programm für die Auswertung der Proben entwickelte, sondern auch viele Stunden investiert hat, um mich bei der statistischen Beurteilung zu begleiten. Ein spezieller Dank geht an Manori Beyer, Doktorandin im Institut für Gastroenteropathologie der Universitätsmedizin Göttingen, für ihre Hilfe bei der Herstellung der TMAs.

Nicht zuletzt danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern in den Laboren, die mich mit ihrem Wissen bei der technischen Durchführung wesentlich unterstützt haben.