

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

---

**Quantitative Proteinexpressionsanalysen  
in den klinisch-pathologischen Subtypen  
Gastrointestinaler Stromatumoren (GIST)**

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

vorgelegt von

Joel Helfrich

aus

Kapstadt (RSA)

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Haller

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Kube

3. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Ghadimi

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2011

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	<i>Historischer Überblick, Definition und Epidemiologie von GIST</i> .....	1
1.2	<i>Klinisch-pathologische Faktoren</i> .....	3
1.2.1	Anatomische Lokalisation .....	3
1.2.2	Tumorgröße .....	4
1.2.3	Mitosenanzahl.....	4
1.2.4	Morphologie .....	5
1.2.5	Mutationsstatus .....	5
1.2.6	Aktuelle Risikoklassifikationen.....	6
1.3	<i>Aufbau und Mutationen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen KIT und PDGFRA</i> .....	7
1.4	<i>Signaltransduktionswege</i> .....	9
1.4.1	<i>SFK-Signaltransduktionsweg</i> .....	10
1.4.2	<i>Ras/ ERK-Signaltransduktionsweg</i> .....	11
1.4.3	<i>PI3K/ AKT-Signaltransduktionsweg</i> .....	12
1.4.4	<i>PLCγ-Signaltransduktionsweg</i> .....	13
1.5	<i>Zielsetzung</i> .....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.1	<i>Untersuchungsmaterial</i> .....	16
2.2	<i>Untersuchungsmethoden</i> .....	16
2.2.1	Tissue Mikroarrays .....	16
2.2.2	Immunhistochemie .....	19
2.2.2.1	Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung.....	19
2.2.2.2	Immunhistochemische Färbung.....	20
2.3	<i>Auswertungsmethoden</i> .....	21
2.3.1	Quantitative Auswertung .....	21
2.3.2	Statistische Auswertung.....	22
2.4	<i>Reagenzien und Geräte</i> .....	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>25</b>
3.1	<i>Darstellung des untersuchten Tumorkollektivs</i> .....	25
3.1.1	Geschlechts- und Altersverteilung der Patienten.....	25
3.1.2	Anatomische Lokalisation .....	26
3.1.3	Tumorgröße .....	26
3.1.4	Mitosenanzahl.....	26
3.1.5	Morphologie .....	27
3.1.6	Mutationsstatus .....	27
3.1.7	Aktuelle Risikoklassifikation .....	27

---

3.1.7.1	Einteilung nach Fletcher .....	27
3.1.7.2	Einteilung nach Miittienen .....	27
3.1.8	Progress und tumorfreie Überlebenszeit.....	28
3.2	<i>Vergleich der klinisch-pathologischen Parameter</i> .....	28
3.2.1	Mutationsstatus .....	28
3.2.1.1	Vergleich von Mutationsstatus und Lokalisation .....	28
3.2.1.2	Vergleich von Mutationsstatus und TumorgroÙe .....	29
3.2.1.3	Vergleich von Mutationsstatus und Mitosenanzahl.....	29
3.2.1.4	Vergleich von Mutationsstatus und Morphologie.....	30
3.2.2	Lokalisation .....	31
3.2.2.1	Vergleich der Lokalisation mit der TumorgroÙe .....	31
3.2.2.2	Vergleich der Lokalisation mit der Mitosenanzahl.....	31
3.2.2.3	Vergleich der Lokalisation mit der Morphologie .....	32
3.3	<i>Vergleich der Expression der untersuchten Signalproteine und der klinisch-pathologischen Parameter</i> .....	33
3.3.1	Mutationsstatus .....	33
3.3.2	Lokalisation .....	35
3.3.3	Mutationsstatus / Lokalisation .....	37
3.3.4	Morphologie .....	42
3.3.5	Vergleich zwischen Mutationsstatus und Morphologie .....	45
3.3.6	TumorgroÙe .....	48
3.3.7	Mitosenanzahl.....	48
3.4	<i>Klinischer Verlauf</i> .....	49
3.4.1	Klinisch-pathologische Parameter .....	49
3.4.1.1	Anatomische Lokalisation .....	49
3.4.1.2	TumorgroÙe.....	50
3.4.1.3	Mitosenanzahl .....	51
3.4.1.4	Morphologie.....	51
3.4.1.5	Mutationsstatus .....	52
3.4.2	Antikörperexpression.....	53
3.4.2.1	AKT-1 .....	53
3.4.2.2	phospho-AKT-1 .....	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>55</b>
4.1	<i>Einordnung und Vergleich des untersuchten Tumorkollektivs</i> .....	55
4.2	<i>Bedeutung der klinisch-pathologischen Parameter</i> .....	58
4.2.1	Mutationsstatus .....	58
4.2.2	Lokalisation .....	60
4.3	<i>Bedeutung der Expression der untersuchten Signalproteine in Bezug auf die klinisch-pathologischen Parameter</i> .....	63
4.3.1	KIT.....	63
4.3.2	PDGFRA .....	64
4.3.3	CRKL.....	64

---

4.3.4	AKT-1 und phospho-AKT-1 .....	65
4.3.5	FAK .....	66
4.3.6	PKC- $\alpha$ und phospho-PKC- $\alpha$ .....	67
4.3.7	phospho-Lyn .....	68
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>71</b>
6.1	<i>Abbildungsverzeichnis</i> .....	71
6.2	<i>Tabellenverzeichnis</i> .....	73
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>74</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AB2	Biotinylated Secondary Antibodies
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog, Protein Kinase B
Ala	Alanin
AP	Alkaline Phosphatase
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl2 antagonist of cell death
bi-dest. H <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serum Albumin
CH <sub>3</sub> COOH	Essigsäure
c-Myc	Myc proto-oncogene protein
cPLA2	cytosolic phospholipase A2
CRKL	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like
CSF-1	macrophage colony-stimulating-factor receptor
c-Src	cellular sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
DAG	Diacylglycerol
ED	Extrazelluläre Domäne
ERK-1	Mitogen-activated protein kinase 3
ERK-2	Mitogen-activated protein kinase 1
Fgr	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase FGR
Flk-2	fms-related tyrosine kinase 2
Flk-3	fms-related tyrosine kinase 3
Fyn	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn
GDP	Guanosindiphosphat
GIST	Gastrointestinale(r) Stromatumor(en)
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
Hck	Hemopoietic cell kinase
HPF	High Power Fields
ICC	Interstitielle Cajal-Zellen
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
JMD	Juxtamembranäre Domäne
KIT	v-kit-Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

Lck	Lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin
Mek-1	MAPK/ERK kinase 1
Mek-2	MAPK/ERK kinase 2
Mnk-1/2	MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1/2
Lyn	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFRA	platelet derived growth factor receptor alpha
PDK1	Phosphatidylinositol-dependent protein kinase 1
PH-Domäne	Pleckstrin homology-Domäne
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat
PKC- $\alpha$	Proteinkinase C $\alpha$
PLC- $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
Raf-1	RAF1 proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
Ras	Rat sarcoma virus oncogene
RSK-1	Ribosomal protein S6 kinase alpha-1
SCF	Stemcellfactor
SH2	Src-homology-2
SFK	Src-family-protein-kinase
Sos	Son of sevenless homolog 1
TMA	Tissue Mikroarray
TK	Tyrosin-Kinase-Domäne
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
Yes	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1

# 1 Einleitung

## 1.1 Historischer Überblick, Definition und Epidemiologie von GIST

Der Gastrointestinale Stromatumor (GIST) gehört zur Gruppe der mesenchymalen Tumoren des Gastrointestinaltraktes und ist als eigenständige Entität erst seit wenigen Jahren diagnostisch eindeutig von anderen mesenchymalen Tumoren abzugrenzen (Corless et al. 2004; Mechtersheimer et al. 2003; Miettinen und Lasota 2001). Auf der Basis lichtmikroskopischer Untersuchungen wurde bis in die sechziger Jahre des 20. Jahrhunderts von einem glattmuskulären Ursprung der mesenchymalen Tumoren ausgegangen und eine Klassifikation in Leiomyome, Leiomyosarkome oder Leiomyoblastome gewählt (Dei Tos 2003; Stout 1962).

Im Zuge elektronenmikroskopischer Untersuchungen in den frühen siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts kamen erste Zweifel eines rein glattmuskulären Ursprungs auf. Man beobachtete bei einigen Tumoren eine Ausprägung neurogener Merkmale, die bei rein myogenen Tumoren nicht auftraten (Welsh und Meyer 1969). Die in den achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts aufkommende Immunhistochemie bestätigte durch den Nachweis einer stark unterschiedlichen Ausprägung neurogener (S100) und myogener (Aktin, Desmin) Marker schließlich die große Heterogenität der Gruppe der mesenchymalen Tumoren des Gastrointestinaltraktes (Hjermstad et al. 1987; Saul et al. 1987). Im Jahr 1983 wurde dann erstmalig durch Mazur und Clark versucht, mit dem Begriff des Stromatumors eine neue eigenständige Entität gegenüber den rein leiomyogenen bzw. neurogenen Tumoren des Gastrointestinaltraktes zu etablieren (Mazur und Clark 1983). Mitte der neunziger Jahre stand mit einem Antikörper für das CD34-Antigen schließlich auch ein immunhistochemischer Marker für die pathologische Routinediagnostik zur Verfügung, der eine relativ spezifische Abgrenzung der neuen Entität ermöglichte (Miettinen et al. 1995; Monihan et al. 1994; van de Rijn et al. 1994). Als weiterer Durchbruch ergab sich daraufhin die immunhistochemische Entdeckung der gemeinsamen Expression des CD-117-Antigens, sowohl von GIST als auch von interstitiellen Cajal-Zellen (Hirota et al. 1998; Kindblom et al. 1998; Robinson et al. 2000).



Die interstitiellen Cajal-Zellen stellen einen Mischtyp mit sowohl neurogenen als auch myogenen Zellmerkmalen dar, deren vornehmliche Aufgabe die Vermittlung zwischen dem autonomen Nervensystem und der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes ist (Faussonne-Pellegrini und Thuneberg 1999). Durch die Gemeinsamkeit der Expression des CD117-Antigens, das einer durch das Protoonkogen c-KIT codierenden Rezeptor-Tyrosin-Kinase entspricht (Hirota et al. 1998), steht zudem eine konzeptionelle Vorstellung einer Entstehung von GIST aus interstitiellen Cajal-Zellen bzw. deren stammzellartigen Vorläuferzellen zur Verfügung.

Umfassende Analysen von mesenchymalen Tumoren aus dem Gastrointestinaltrakt zeigten unter Verwendung der neuen Antikörper CD34 und CD117 im Folgenden, dass GIST mit insgesamt 70 % die häufigsten mesenchymalen Tumoren im Gastrointestinaltrakt darstellen und dass mehr als 95 % aller GIST positiv für CD117 sind (Fletcher et al. 2002; Miettinen et al. 2000; Yamaguchi et al. 2004). Mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 0,68 – 1,45 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern und geschätzten 600-1200 Neuerkrankungen an GIST pro Jahr in Deutschland stellen GIST dennoch weniger als 1 % aller Tumore des Gastrointestinaltraktes dar und sind somit als relativ selten zu betrachten (Nilsson et al. 2005; Tran et al. 2005; Tryggvason et al. 2005).

GIST können vom Kindesalter an bis ins hohe Erwachsenenalter auftreten, wobei jedoch der Häufigkeitsgipfel bei einem Lebensalter um die 60 Jahre liegt (Corless et al. 2004). Des Weiteren lässt sich zwar keine eindeutige Geschlechtsprävalenz feststellen, es weisen jedoch einige Studien auf ein häufigeres Auftreten von malignen GIST bei Männern hin (Miettinen und Lasota 2006). Metastasen treten am häufigsten in der Leber und am zweithäufigsten als peritoneale Aussaat auf und können sich auch noch nach 10- 15 Jahren nach primärer Resektion manifestieren (DeMatteo et al. 2000; Nilsson et al. 2005). Lungen-, sowie Knochen- und Lymphknotenmetastasen sind relativ selten und häufig erst in fortgeschrittenen Tumorstadien zu beobachten.

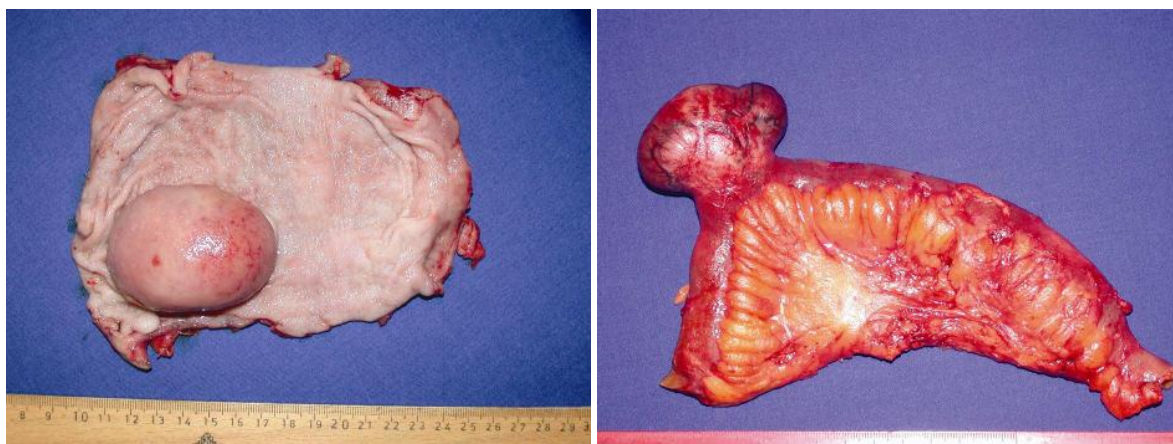
GIST können neben den meist sporadischen Fällen auch im Rahmen von Syndromen vorkommen und sich bei der Carney-Trias gemeinsam mit Paragangliomen und pulmonalen Chondromen, sowie als multiple GIST bei der Neurofibromatose Typ 1 zeigen (Carney 1979;

Miettinen et al. 2006). Zudem sind auch familiäre Formen im Rahmen von Keimbahnmutationen beschrieben (Nishida et al. 1998).

## 1.2 Klinisch-pathologische Faktoren

### 1.2.1 Anatomische Lokalisation

GIST finden sich, entsprechend ihrer Herkunft aus interstitiellen Cajal-Zellen, in der muskulären Wandung der Hohlorgane des Gastrointestinaltraktes und wachsen als scharf begrenzte, nicht-invasive, intramural-submukös gelegene Tumoren verdrängend ins Lumen oder nach außen in die Serosa vor (Corless et al. 2004; Mechttersheimer et al. 2003; Miettinen und Lasota 2001). Grundsätzlich können GIST im gesamten Gastrointestinaltrakt, vom unteren Ösophagus bis hin zum Rektum, auftreten, wobei jedoch die Häufigkeit in den einzelnen anatomischen Abschnitten stark variiert. Die häufigsten in der Literatur angegebenen Lokalisationen sind in absteigender Reihenfolge Magen (60%), Jejunum und Ileum (30%), Duodenum (5%), Colon und Rektum (<5%) und Appendix und Ösophagus (<1%) (Miettinen und Lasota 2003). Nur sehr selten finden sich GIST außerhalb des Gastrointestinaltraktes wie zum Beispiel im Omentum oder im Retroperitoneum.



**Abb. 1.2.1-1:** typisches GIST-Wachstum: Magenteilresektat mit einem nach innen gewachsenen 6,5 cm großen GIST (links); Dünndarmteilresektat mit einem nach außen gewachsenen 5,5 cm großen GIST (rechts) (entnommen aus Haller et al. 2008, Seite 5).

Hinweise auf eine unterschiedliche Prognose in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation ergaben sich bereits früh (Emory et al. 1999). Ein grundsätzlich günstigeres

klinisches Verhalten wurde in großen Studien bei einem Auftreten von GIST im Magen gegenüber einem Auftreten im Dün- oder Dickdarm beobachtet (Dematteo et al. 2008; Miettinen und Lasota 2006; Miettinen et al. 2006; Miettinen et al. 2005). Etwa 20-25% der GIST im Magen und 40-50% der GIST im Dünndarm äußern sich im Verlauf als klinisch maligne (Miettinen und Lasota 2006).

### **1.2.2 Tumorgröße**

Die Tumorgröße ist signifikant mit dem klinischen Verhalten von GIST korreliert, dabei erhöht sich die Wahrscheinlichkeit eines malignen Verhaltens mit steigender Tumorgröße (Dematteo et al. 2008; Miettinen et al. 2006; Miettinen et al. 2005; Nilsson et al. 2005; Rutkowski et al. 2007). Während Tumore über 10 cm Größe häufig malignes Verhalten aufweisen, metastasieren Tumore unter 2 cm extrem selten. Im Bereich zwischen 2 und 10 cm Durchmesser ist die Tumorgröße als einzelner Prognosefaktor nicht hinreichend aussagekräftig (Miettinen und Lasota 2006).

### **1.2.3 Mitosenanzahl**

Die Mitosenanzahl gilt als Maß für die Zellteilungsaktivität und folglich Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors und eignet sich als valider Parameter zur Prognosebeurteilung. Die Anzahl der Mitosefiguren wird pro 50 High-Power-Fields (HPF) angegeben. Bis zu 5 Mitosefiguren/ 50 HPF werden bei GIST als potenziell benigne angesehen. Eine Mitosenanzahl  $> 5$  Mitosen/ 50 HPF wird gewöhnlich als maligne und eine Mitosenanzahl  $> 50$  Mitosen/ 50 HPFs als hochmaligne bezeichnet (Emory et al. 1999).

GIST weisen im Vergleich zu Sarkomen zwar deutlich weniger Mitosen auf (Rudolph et al. 1998), dennoch kann es auch bei geringer Mitosenanzahl zur Metastasenbildung kommen (Dematteo et al. 2008; Fletcher et al. 2002; Miettinen et al. 2006; Miettinen et al. 2005; Rutkowski et al. 2007).

#### 1.2.4 Morphologie

GIST zeichnen sich als histologisch zellreich und zytomorphologisch meist monomorph aus, wobei die drei Wachstumsmuster spindelzellig, epitheloidzellig und gemischtzellig unterschieden werden (Corless et al. 2004; Mechttersheimer et al. 2003; Miettinen und Lasota 2006). Insgesamt ist die Aussagekraft morphologischer Kriterien zur Dignität von GIST eingeschränkt. Dies steht im Gegensatz zu den leiomyogenen Tumoren, die als eindeutig benigne (Leiomyom) oder maligne (Leiomyosarkom) Formen unterschieden werden können.

#### 1.2.5 Mutationsstatus

Insgesamt weisen 60-70 % aller GIST eine aktivierende Mutation in der Typ-III-Rezeptor-Tyrosin-Kinase *KIT* (*v-kit-Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*) auf (Duensing et al. 2004; Heinrich et al. 2003b; Lasota und Miettinen 2008; Rubin et al. 2001). Die Tyrosin-Kinase *KIT*, die mit dem CD117-Antigen identisch und dessen Ligand der Stammzellfaktor (*SCF*) ist, wird beim Erwachsenen neben den Cajal-Zellen auch von hämatopoetischen Zellen, dendritischen Zellen, Mastzellen und Spermatozyten gebildet (Roskoski 2005b; Torihashi et al. 1999). Als physiologische Funktion stehen die Phosphorylierung und Aktivierung intrazellulär nachgeschalteter Signalmoleküle im Vordergrund, die eine entscheidende Rolle in der Differenzierung und Proliferation der Zellen spielen (Lennartsson et al. 2005; Roskoski 2005a). Bei GIST mit einer aktivierenden *KIT*-Mutation kommt es zu einer liganden-unabhängigen, dauerhaften *KIT*-Aktivierung, die eine nachfolgend unkontrollierte Zellproliferation bewirkt (Hirota et al. 1998).

Bei den GIST, die keine aktivierende *KIT*-Mutation aufweisen, sind in der Mehrzahl aktivierende Mutationen des *PDGFRA*-Rezeptors nachweisbar, der strukturell und funktionell große Ähnlichkeit zum *KIT*-Rezeptor besitzt (Corless et al. 2005; Heinrich et al. 2003a; Lasota und Miettinen 2008). *KIT*-mutierte und *PDGFRA*-mutierte GIST zeigen hinsichtlich des klinischen Verlaufs und der Prognose deutliche Unterschiede, wobei GIST mit einer *PDGFRA*-Mutation insgesamt eine günstigere Prognose aufweisen als GIST mit einer *KIT*-Mutation (Lasota et al. 2004; Lasota et al. 2006; Wardelmann et al. 2004).

### 1.2.6 Aktuelle Risikoklassifikationen

Eine sichere Unterscheidung zwischen einem benignen oder malignen Verhalten ist im Vergleich zu den leiomyogenen oder auch anderen Tumoren nicht möglich. Bei GIST wird stattdessen von einem unsicheren Malignitätspotential gesprochen, für dessen Abschätzung die Parameter Tumorgöße, Mitoserate und auch die anatomische Lokalisation herangezogen werden. Nach dem Vorschlag einer internationalen Konsensus-Konferenz aus dem Jahr 2002 wurde eine Risiko-Klassifikation erstellt, die mittels Tumorgöße und Mitosenanzahl vier verschiedene Risiko-Stadien unterscheidet (Tabelle 1.1.3-1) (Fletcher et al. 2002).

Risikogruppe	Tumorgöße	Mitosenanzahl
Sehr niedriges Risiko	< 2 cm	<5/50 HPFs
Niedriges Risiko	2-5 cm	<5/50 HPFs
mittleres Risiko	< 5 cm	<i>und</i> 6 - 10/50 HPFs
	<i>oder</i> 5-10 cm	<i>und</i> <5/50 HPFs
Hohes Risiko	> 5cm	<i>und</i> >5/50 HPFs
	<i>oder</i> >10 cm	<i>und</i> jede Anzahl
	jede Größe	<i>und</i> >10/50 HPFs

**Tab. 1.2.6-1: Risikoklassifikation nach Fletcher (teilweise Übernommen aus Fletcher et al. 2002)**

Gleichzeitig wurde am Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) in den U.S.A. eine weitere Risikoklassifikation erarbeitet, die als zusätzlichen Parameter die anatomische Lokalisation mit einbezieht (Miettinen et al. 2002). Diese Klassifikation wurde inzwischen mit klinischen Daten von ca. 1600 GIST unterlegt und im Jahr 2006 leicht revidiert veröffentlicht (Tabelle 1.1.3-2) (Miettinen und Lasota 2006).

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

**Tab. 1.2.6-2: Risikoklassifikation nach Miettinen (teilweise Übernommen aus Miettinen und Lasota 2006).**

\* Keine Fälle beobachtet.

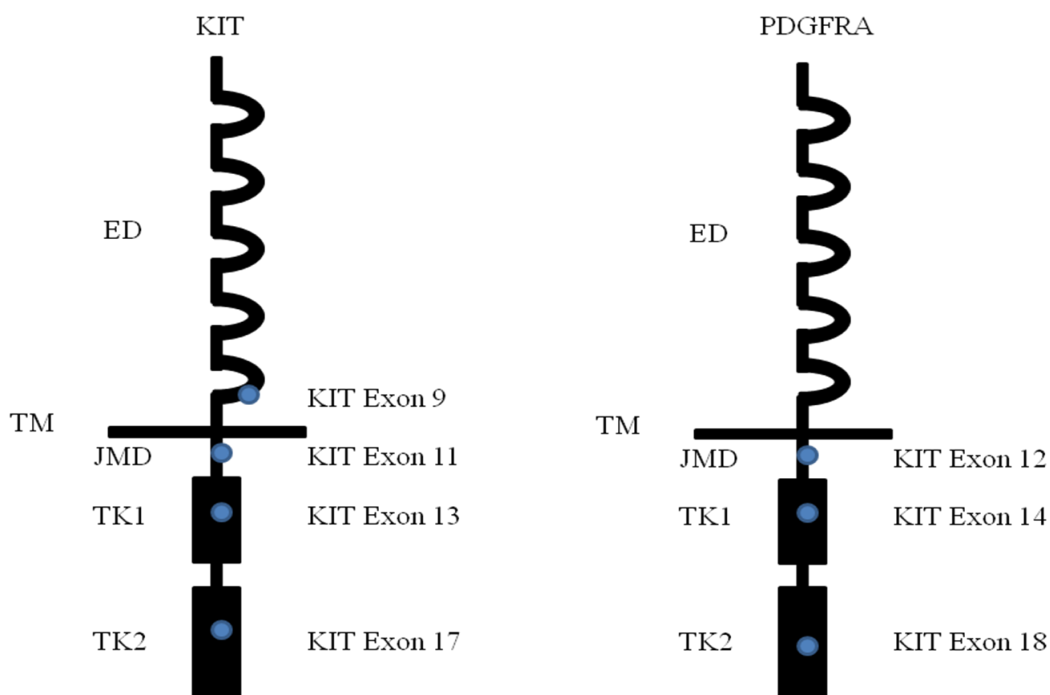
### 1.3 Aufbau und Mutationen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen *KIT* und *PDGFRA*

*KIT*- und *PDGFRA*-Rezeptoren gehören zur Familie der Typ-III-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und teilen sich, neben weiteren Rezeptoren dieser Familie wie dem *CSF-1* und der *Flk2* und *Flt3*, eine gemeinsame Topologie: eine extrazelluläre, liganden-bindende Domäne (ED) mit fünf immunoglobulin-ähnlichen Anteilen, ein transmembranäres Segment mit der sogenannten juxtamembranären Domäne (JMD) und eine zytoplasmatische Tyrosin-Kinase-Domäne (TK), die aus zwei durch ein Insert getrennte Tyrosin-Kinase-Domänen besteht (Fantl et al. 1993; Lasota und Miettinen 2008; Yarden et al. 1987) (Abbildung 1.3.1-1). Die Tyrosin-Kinase-Domäne-1 (TK1) stellt dabei eine ATP-Bindungsstelle und die Tyrosin-Kinase-Domäne-2 (TK2) eine Phosphotransferase-Region dar (Pawson 2002).

Onkogene *KIT*- und *PDGFRA*-Mutationen bewirken eine konstitutive Phosphorylierung und somit andauernde Aktivität der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Basierend auf der Lokalisation können diese Mutationen in zwei Kategorien aufgeteilt werden: Mutationen der regulierenden Rezeptorregionen (ED und JMD) und Mutationen der enzymatischen Domänen (TK1 und TK2) (Longley et al. 2001). In GIST treten die meisten *KIT*-Mutationen in der juxtamembranären Domäne (Exon 11) (60 - 70%) auf und können sowohl als Punktmutation, Deletion oder Duplikation vorliegen (Andersson et al. 2006). Mutationen in der JMD (Exon 11) bewirken eine liganden-unabhängige spontane Kinase-Aktivität (Ma et al. 1999), die

normalerweise von der autoinhibitorisch-wirkenden JMD unterbunden wird (Mol et al. 2004). Am zweithäufigsten sind Mutationen im Exon 9 des *KIT*-Gens (5-10%), die sich nahezu ausschließlich als Duplikationen der Codone Ala<sup>502</sup> und Tyr<sup>503</sup> darstellen. Diese Veränderungen in der ED bewirken eine Störung der Antidimerisierung und führen zu einer spontanen Homodimerisation und Aktivierung des Rezeptors (Heinrich et al. 2003b; Hirota et al. 2001). *KIT*-Mutationen in den Kinase-Domänen (Exon 13, Exon 17) kommen nur sehr selten vor und sind meist Punktmutationen (Lasota und Miettinen 2008).

Mit der Punktmutation, die zur Substitution von Val zu Asp<sup>842</sup> im Exon 18 führt, kommen bei *PDGFRA*-mutierten GIST häufig Mutationen in der enzymatischen Domäne (TK2) (10–15% aller GIST) vor und sind andererseits in den regulierenden Domänen (Exon 12) mit weniger als 2% aller GIST sehr selten (Lasota et al. 2004; Lasota et al. 2006). Eine Punktmutation im *PDGFRA* Exon 14 ist zwar beschrieben, aber ebenfalls extrem selten (<1%) (Lasota et al. 2006).



**Abb. 1.3-1:** Schematische Übersicht des *KIT*-Rezeptors (links) und des *PDGFRA*-Rezeptors (rechts) mit der Zuordnung der Mutationen zu den Exonen und den durch sie kodierten Proteindomänen. ED: Extrazelluläre Domäne; TM: Transmembranäre Domäne; JMD: Juxtamembranäre Domäne; TK1: Tyrosin-Kinase-Domäne-1; TK2: Tyrosin-Kinase-Domäne-2. Schema der Abbildung teilweise übernommen aus Miettinen und Lasota 2006.

Die einzelnen beschriebenen Mutationen sind teilweise stark mit bestimmten klinisch-pathologischen Faktoren vergesellschaftet. GIST mit einer *KIT*-Exon-9-Mutation sind fast ausschließlich intestinal vorzufinden und sind vom klinischen Verlauf als eher ungünstig einzustufen (Antonescu et al. 2003; Hirota et al. 2001; Lasota et al. 2003a), während im Gegensatz dazu die *KIT*-Exon-11-Duplikationen (Lasota et al. 2003b) sowie die *PDGFRA*-Mutationen (Lasota et al. 2004; Wardelmann et al. 2004) sehr viel häufiger im Magen anzutreffen sind und ein geringeres Malignitätspotential zeigen. Die eben beschriebenen Zusammenhänge sind mit weiteren Beobachtungen in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tab.1.3-1):

<u>Genregion</u>	<u>Mutationstyp</u>	<u>Häufigkeit</u>	<u>Anatomische Lokalisation</u>	<u>Histologischer Typ</u>	<u>Klinisches Verhalten</u>
KIT Exon 9 (ED)	Duplikation	8 %	90 % intestinal	spindelzellig	Ungünstig
KIT Exon 11 (JMD)	Punktmutation	30 %	k.P	k.P	k.P
	Deletion	30 %	k.P	k.P	Ungünstig
	Duplikation	8 %	90 % gastral	k.P	Günstig
KIT Exon 13 (TK1)	Punktmutation	<2 %	k.P	k.P	k.P
KIT Exon 17 (TK2)	Punktmutation	<2 %	k.P	k.P	k.P
PDGFRA Exon 12 (JMD)	Punktmutation	<2 %	>95 % gastral	Epitheloid	Günstig
PDGFRA Exon 14 (TK1)	Punktmutation	<1 %	>95 % gastral	Epitheloid	Günstig
PDGFRA Exon 18 (TK2)	Punktmutation	10 %	>95 % gastral	Epitheloid	Günstig
	Deletion	<2 %	>95 % gastral	Epitheloid	Günstig

**Tab. 1.3-1: Zusammenhänge zwischen den klinisch-pathologischen Faktoren und den Mutationstypen; k.P.: keine Prävalenz (entnommen aus Haller 2008, Seite 15).**

## 1.4 Signaltransduktionswege

*KIT*- und *PDGFRA*-Rezeptoren werden durch ihre Liganden, den Stammzellfaktor und die *PDGFs*, aktiviert. Die Ligandenbindung an der extrazellulären Domäne führt zu einer Rezeptordimerisierung und anschließenden Autophosphorylierung von Tyrosingruppen der intrazellulären Domänen. Die initialen Residuen des *KIT*-Rezeptors, die einer Autophosphorylierung unterzogen werden, sind die Tyrosinreste Tyr568 und Tyr570 im juxtamembranären Segment, weitere Tyrosinreste in der Kinase-Insert-Domäne (Tyr703,



Tyr721, Tyr730) und der distalen Kinase-Domäne (Tyr823, Tyr900, Tyr936) können folgen (Roskoski 2005a).

Der phosphorylierte und aktivierte Rezeptor dient nun als Bindungsstelle für weitere Signaltransduktionsmoleküle, die eine Phosphotyrosinbindungsstelle oder eine SH2-Domäne besitzen und katalysiert deren Phosphorylierung (Blume-Jensen et al. 1991; Zhang et al. 2000). Die sich anschließenden Signaltransduktionswege wurden für *KIT*- und *PDGFRA*-mutierte GIST sehr ähnlich beobachtet (Heinrich et al. 2003a) und werden im Folgenden zusammenfassend am Beispiel von *KIT* beschrieben.

### 1.4.1 *SFK*-Signaltransduktionsweg

Die *SFKs* (*Src-family-protein-kinases*) sind benannt nach ihrem ersten Prototypen, der Proteinkinase *c-Src*. Weitere Mitglieder sind *Yves* und *Fan*, die ebenso wie *c-Src* ubiquitär exprimiert werden, sowie *Fgr*, *Hck*, *Lck* und *Lyn*, die einer gewebespezifischen Expression unterliegen und hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen zu finden sind (Abram und Courtneidge 2000; Rönstrand 2004). Die *SFKs* sind in einer Reihe von Zellfunktionen wie dem Ablauf des Zellzyklus, der Chemotaxis und dem intrazellulären Proteintransport beteiligt (Thomas und Brugge 1997).

Am Beispiel von *Lyn* konnte gezeigt werden, dass die Bindung von *SCF* an den *KIT*-Rezeptor zu einem schnellen Anstieg der *SFK*-Aktivität führt (Linnekin et al. 1997). Die Bindung und Aktivierung von *Lyn* und den anderen Proteinkinasen der *SFKs* erfolgt mittels ihrer SH2-Domäne über die Tyrosinreste Tyr568 und Tyr570 der juxtamembranären Domäne von *KIT* (Lennartsson et al. 1999). Durch Versuche mit *KIT*-Tyr568- und *KIT*-Tyr570-Mutanten konnte zudem gezeigt werden, dass es dabei auch zu einer verringerten Aktivität in anderen Signaltransduktionswegen wie dem *RAS/ERK*-Signaltransduktionsweg kommt (Lennartsson et al. 1999; Lennartsson et al. 2005).

Obwohl die genaue Rolle und Interaktion von *Lyn* und anderen *SFKs*, besonders im Hinblick auf weitere Adapterproteine, nicht hinreichend geklärt ist, verdeutlicht die Bindung an die regulierenden Rezeptorregionen, sowie eine vermittelnde Rolle in anderen

Signaltransduktionswegen, eine höchstwahrscheinlich entscheidende Rolle in der *SCF/ KIT*-Signaltransduktion (Lennartsson et al. 2005; Roskoski 2005a).

#### **1.4.2 *Ras/ ERK*-Signaltransduktionsweg**

Zahlreiche Studien implizieren die große Bedeutung des *Ras/ ERK*-Signaltransduktionswegs in der Zellproliferation und Zellteilung (Steelman et al. 2004) und deren Aktivierung durch *SCF* (Rönstrand 2004).

Zu Beginn steht das kleine G-Protein *Ras*, das zwischen einer GTP-gebundenen, aktivierten und einer GDP-gebundenen, inaktivierten Form oszillieren kann. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie *KIT* und *PDGFRA* sind in der Lage, mittels Assoziation mit einem Komplex aus dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor *Sos* und dem Adapterprotein *Grb2*, das über seine SH2-Domäne an die phosphorylierten Tyrosinreste Tyr936 und Tyr703 der aktivierten Rezeptoren bindet, *Ras* in seine aktivierte, GTP-gebundene Form zu überführen und letztendlich zu aktivieren (Rönstrand 2004; Thömmes et al. 1999) (siehe Abbildung 1.4.2-1).

Das aktivierte *Ras* interagiert mit der Serin/ Threonin-Kinase *RAF-1* und initiiert dessen Aktivierung. Anschließend kommt es in einer folgenden Phosphorylierungskaskade zur Aktivierung der Kinasen *Mek-1* und *Mek-2* (Kyriakis et al. 1992), die wiederum durch Phosphorylierung die Seronin/ Threonin-Kinasen *ERK-1* und *ERK-2* aktivieren (Crews und Erikson 1992) (siehe Abbildung 1.4.2-1). Ziele der aktivierten *ERKs* im Zytoplasma sind *RSK-1*, *Mnk-1/2*, *c-Myc* sowie *cPLA2* (Pearson et al. 2001). Ein Teil der aktivierten *ERKs* translozieren auch direkt in den Zellkern, wo durch die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren die mitogene Gentranskription entscheidend beeinflusst werden kann (Lennartsson et al. 2005).

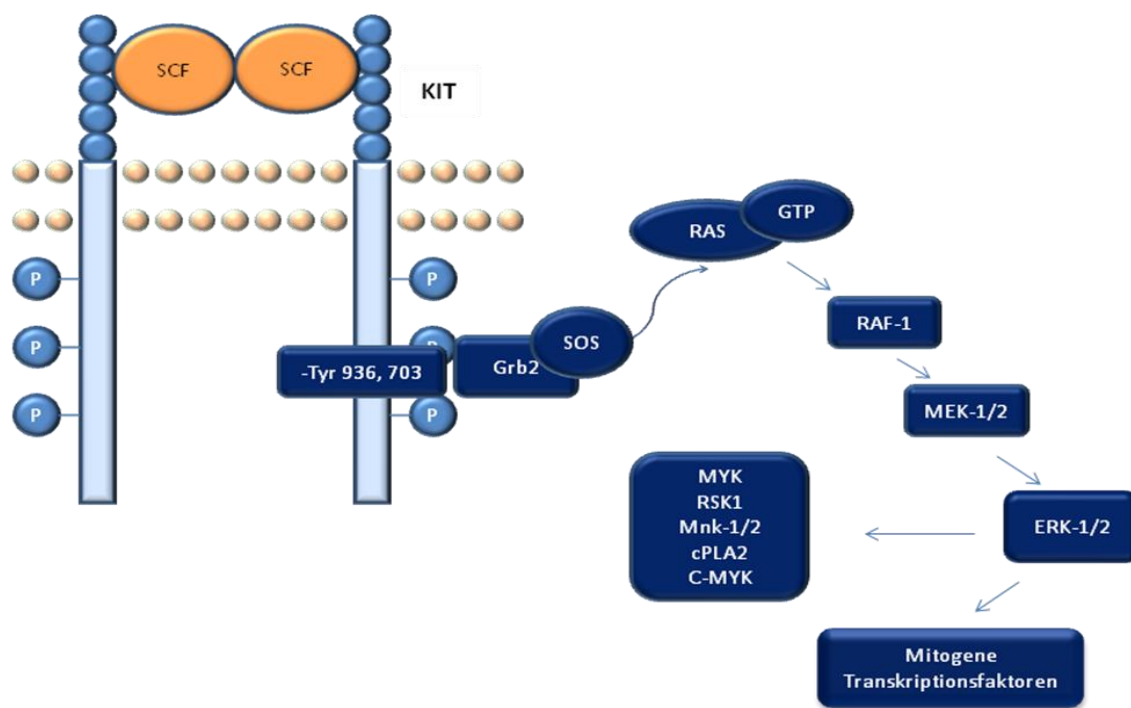


Abb. 1.4.2-1: Schematische Darstellung des *Ras/ERK*-Signaltransduktionswegs.

### 1.4.3 *PI3K/AKT*-Signaltransduktionsweg

Die Phosphatidylinositol 3-Kinasen (*PI3K*) repräsentieren eine Klasse von Lipidkinasen, die die Phosphorylierung von 3-Hydroxyl-Gruppen des Inositolringes von Phosphatidylinositolderivaten katalysieren. In vivo ist das bevorzugte Substrat das Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (*PIP<sub>2</sub>*) und das Produkt das Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat (*PIP<sub>3</sub>*) (Foster et al. 2003). Die für die *SCF*-Signaltransduktion wichtige Klasse IA der *PI3K* besteht aus einem heterodimeren Komplex mit einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen (p110) Subeinheit. Die regulierende p85-Subeinheit bindet Phosphotyrosinreste von aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen über eine oder zwei ihrer beiden SH2-Domänen (Carpenter CL. et al. 1993), dabei stellen die phosphorylierten Tyrosin-Reste 721 und 730 bei *KIT* die Bindungsstellen für die *PI3K* dar (Lev et al. 1992). Diese Bindung ergibt eine Konformationsänderung, die eine allosterische Aktivierung der enzymatischen p110-Subeinheit nach sich zieht (Ueki et al. 2002). Beeinflusst werden kann diese Interaktion u.a. von dem Adaptorprotein, das über seine SH3-Domäne an der p85-Subeinheit der *PI3K* bindet und regulatorisch auf den entstehenden Komplex aus Rezeptor-Tyrosin-Kinase, *PI3K* und *CRKL* einwirkt (Sattler et al. 1997).

Die Bindung und Aktivierung der *PI3K* findet in der Nähe der Zellmembran statt, wo die Substrate (*PIP<sub>2</sub>*) lokalisiert sind. Ein nachgeschaltetes Ziel der von der *PI3K* generierten Phospholipide stellt die Serin/ Threonin-Kinase *AKT* dar, die über eine *PH*-Domäne zur Bindung von *PIP<sub>3</sub>* verfügt (Lennartsson et al. 2005). Durch diese Bindung in der Nähe der Zellmembran wird die Phosphorylierung und Aktivierung von *AKT* durch die Serin/ Threonin-Kinase *PDK1* ermöglicht (Roskoski 2005a) (siehe Abbildung 1.4.3-1). *AKT* spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellproliferation und beeinflusst u.a. die Translation von Cyclin D1, einem starken Wachstums- und Proliferationssignal (Ruggero und Sonenberg 2005) und wirkt zudem inhibierend auf das pro-apoptotisch wirkende Protein *Bad* (Blumenjensen et al. 1998).

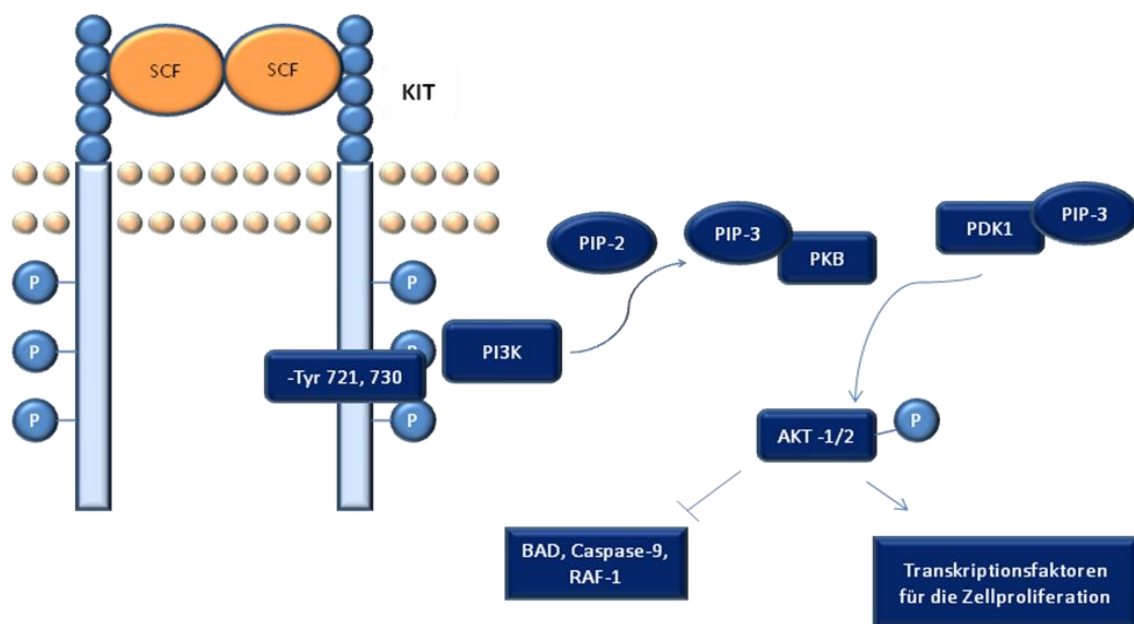


Abb. 1.4.3-1: Schematische Darstellung des *PI3K/ AKT*-Signaltransduktionswegs.

#### 1.4.4 *PLC $\gamma$* -Signaltransduktionsweg

Phospholipase C (*PLC*) repräsentiert eine Enzymfamilie, die die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (*PIP<sub>2</sub>*) zu Inositol-1,4,5-Triphosphat (*IP<sub>3</sub>*) und Diacylglycerol (*DAG*) katalysiert. Vier verschiedene Subtypen sind bekannt, wobei die beiden  $\gamma$ -Isoformen bei der Regulation durch Tyrosin-Kinasen die wichtigste Rolle spielen

(Carpenter G und Ji 1999). *PLC $\gamma$ -1* wird ubiquitär exprimiert, während *PLC $\gamma$ -2* hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen vorzufinden ist (Wilde und Watson 2001).

Die *PLC $\gamma$* -Assoziation mit *KIT* erfolgt über eine SH2-Domäne an die Tyrosinreste Tyr730 und Tyr936 (Herbst et al. 1995). Die anschließende Aktivierung von *PLC $\gamma$*  führt über die Hydrolyse von *PIP<sub>2</sub>* zur Erhöhung der beiden Second Messenger *DAG* und *IP<sub>3</sub>*. *DAG* führt wiederum zur Aktivierung der Proteinkinase C- $\alpha$  (*PKC- $\alpha$* ) während *IP<sub>3</sub>* über spezifische Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum bindet und eine intrazelluläre Calciumerhöhung bewirkt (Berridge et al. 2003). *PKC- $\alpha$*  sowie freies Calcium regulieren eine Vielzahl von Zellfunktionen wie Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Roskoski 2005a) (siehe Abbildung 1.4.4-1).

Die Bedeutung des *PLC $\gamma$* -Signaltransduktionswegs im Hinblick auf die Aktivierung durch *SCF* ist bisher nicht eindeutig zu klären. Während bei Studien mit löslichem *SCF* in den meisten Fällen keine Erhöhung der Aktivität oder Phosphorylierung der *PLC $\gamma$*  nachgewiesen werden konnte (Koike et al. 1993), gelang es bei der Arbeit mit einer membrangebundenen Form von *SCF*, eine Rolle der *PLC $\gamma$*  in der *SCF*-induzierten Proliferation zu zeigen (Gommerman et al. 2000; Trieselmann et al. 2003). Des Weiteren belegen Studien, dass die Aktivierung von *PLC $\gamma$*  durch *KIT* in direkten Zusammenhang mit der *SCF*-vermittelten Protektion gegenüber Chemo- und Strahlentherapie steht (Maddens et al. 2002; Plo et al. 2001).

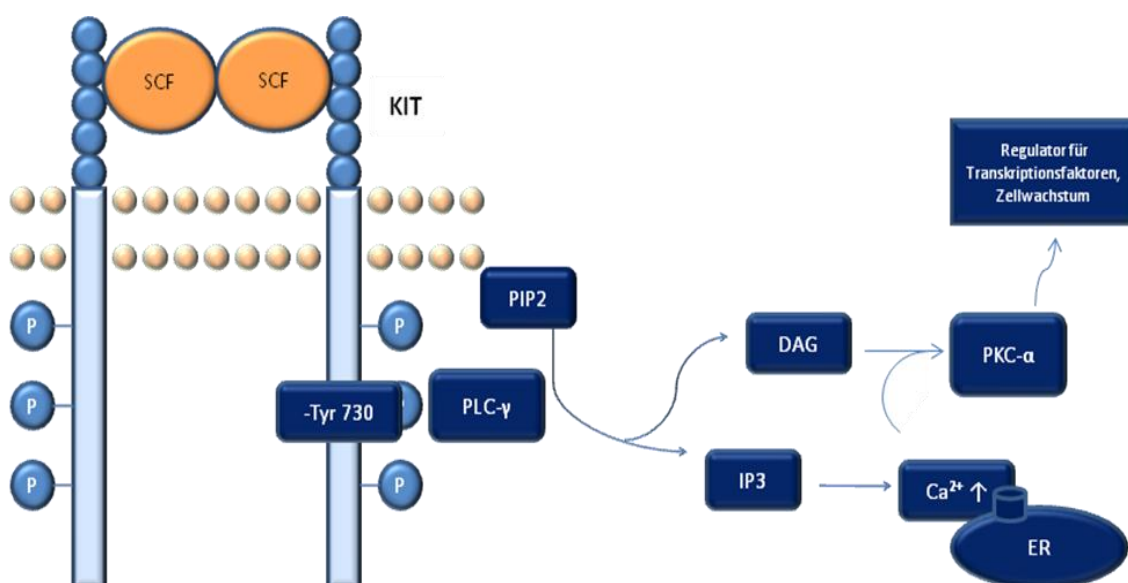


Abb. 1.4.4-1: Schematische Darstellung des *PLC $\gamma$* -Signaltransduktionswegs.

## 1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Dissertation soll die quantitative Proteinexpression von *KIT*, *PDGFRA*, *SCF*, *PKC-alpha*, *phospho-PKC-alpha*, *SRC*, *phospho-LYN*, *CRKL*, *AKT-1*, *phospho-AKT-1*, *ERK-2*, *FAK*, *PYK-2* und *cyt-PP2A* mittels Tissue-Microarray-Technologie und immunhistochemischer Färbungsmethoden in GIST untersucht und mit den klinisch-pathologischen Parametern verglichen werden.

- Ist das untersuchte GIST-Kollektiv unter Berücksichtigung klinisch-pathologischer Parameter mit anderen Studien vergleichbar bzw. bestehen Unterschiede?
  
- Ergibt sich eine besondere Bedeutung beim Vergleich der klinisch-pathologischen Parameter für eine Untergruppe von GIST im vorliegenden Tumorkollektiv?
  
- Ist die Expression eines oder mehrerer Proteine bei GIST mit einem klinisch-pathologischen Parameter assoziiert und lässt sich dadurch die Bedeutung eines bestimmten Signaltransduktionswegs in einer Untergruppe von GIST hervorheben?

## **2 Material und Methoden**

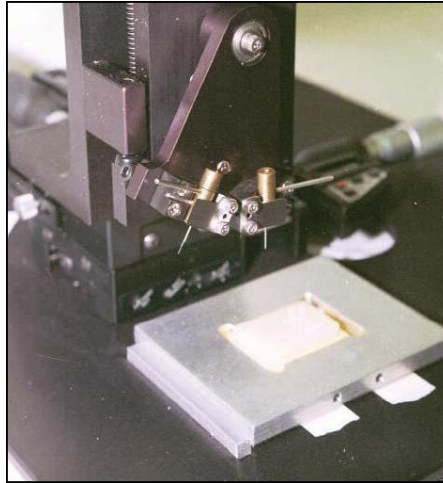
### **2.1 Untersuchungsmaterial**

In der vorliegenden Dissertation wurden 167 Patienten mit einem gastrointestinalen Stromatumor untersucht. Die Diagnose „GIST“ wurde histomorphologisch und immunhistochemisch gestellt. Mitosen wurden in 50 hochauflösenden Gesichtsfeldern ausgezählt. Die Klassifikation erfolgte nach dem Schema von Fletcher (Fletcher et al. 2002) und nach dem Schema von Miettinen (Miettinen und Lasota 2006). Der klinische Verlauf nach der Operation wurde durch Anschreiben an die Hausärzte erfragt und aus den Patientenakten erhoben. Ein Tumorbefall von Leber, Peritoneum, Lunge, Lymphknoten oder anderen Organen, sowie das Auftreten eines Lokalrezidivs wurden als Progress gewertet. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Göttingen befürwortet (Ethik-Votum Nr. 8/9/07 vom 10.04.2008).

### **2.2 Untersuchungsmethoden**

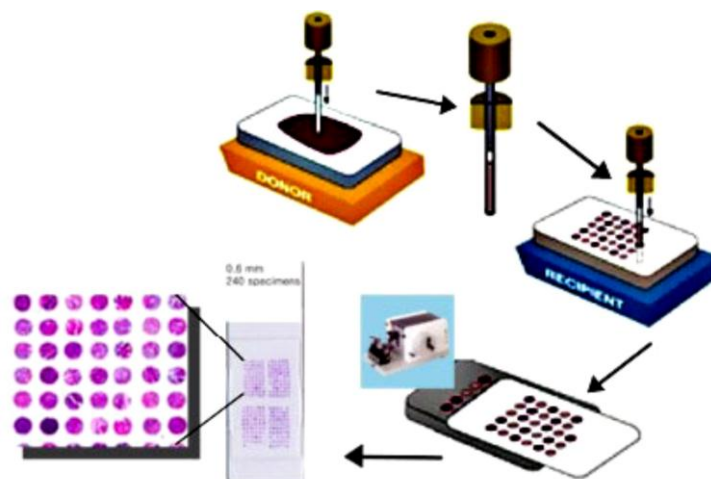
#### **2.2.1 Tissue Mikroarrays**

Mit dem Tissue Mikroarrayer stand ein manuell zu bedienendes Laborgerät zur Verfügung, das es ermöglicht, zahlreiche Gewebeproben verschiedener Patienten in Form kleiner Stanzkerne von 0,1 cm Durchmesser in einem einzigen Paraffinblock als gemeinsame Matrix anzulegen. Dazu besitzt der Tissue Mikroarrayer zwei Hohlstanzen. Mit der ersten Stanze wird ein Loch in einen Empfängerparaffinblock gestanzt. Anschließend wird ein präziser Stanzkern aus einem selektierten Bereich eines Spenderparaffinblocks, in diesem Fall aus dem Gewebeparaffinblock, durch die zweite Hohlstanze entnommen und in das vorgefertigte Loch des Empfängerblocks platziert (Abbildung 2.2.1-1).



**Abb. 2.2.1-1:** Die Abbildung zeigt den manuellen Tissue Mikroarrayer mit dem korrekten Sitz eines Empfängerblocks (AlphaMetrix Biotech GmbH 2005a)

Der Vorteil der Tissue-Microarray-Technologie liegt hierbei in der Möglichkeit, eine große Anzahl von Gewebeproben simultan immunhistochemisch untersuchen zu können, was Reagenzien, Arbeitszeit und Paraffinmaterial spart, und eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglicht. Abhängig von der Dicke der Originalblöcke können aus einem Array-Block bis zu 300 Schnitte entstehen. Bei einer Stanzgröße von 0,1 cm und einer regelmäßigen Matrix mit einem Mittelpunktsabstand von 1,8 mm können auf einem Objektträger 96 Gewebestanzen aufgebracht werden, die anschließend histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen zur Verfügung stehen (Abbildung 2.2.1-2).



**Abb. 2.2.1-2:** Die Abbildung zeigt die Herstellung eines TMAs. Zunächst wird ein präziser Stanzkern aus einem selektierten Bereich eines Spenderparaffinblocks durch eine Hohlstanze entnommen und in das



vorgefertigte Loch des Empfängerblocks platziert. Der Empfängerparaffinblock kann anschließend mit dem Mikrotom geschnitten werden und die Schnitte werden auf einem Objektträger aufgebracht. Schließlich können die auf dem Objektträger aufgebrachten Gewebeproben unter dem Mikroskop betrachtet werden (AlphaMetrix Biotech GmbH 2005b).

Auf einem Tissue Array wurden je sechs Gewebeproben von 16 Patienten untersucht (siehe Tabelle 2.2.1-1).

<b>Spalte</b>	<b><u>1</u></b>	<b><u>2</u></b>	<b><u>3</u></b>	<b><u>4</u></b>	<b><u>5</u></b>	<b><u>6</u></b>	<b><u>7</u></b>	<b><u>8</u></b>	<b><u>9</u></b>	<b><u>10</u></b>	<b><u>11</u></b>	<b><u>12</u></b>	<b><u>13</u></b>
A	Leber	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
B	Leber	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4
C	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-PDGFR A	13	13	13	13	13	13	14	14	14	14	14	14
H	PK-PDGFR A	15	15	15	15	15	15	16	16	16	16	16	16

**Tab. 2.2.1-1:** Die Tabelle zeigt das Beispiel einer Matrix für einen Tissue Mikroarray. In der ersten Spalte wurden Gewebeproben aus der Leber, Magen-Mukosa, Magen-Muskulatur, sowie ein *PDGFR A*-mutierter GIST eingefügt, um sich hinterher bei der Mikroskopie und Auswertung orientieren zu können. Desgleichen konnten diese Normalgewebe als Positiv-Kontrollen für verschiedene Antikörper verwendet werden. Die Ziffern geben an, welchem Patienten das Gewebe zuzuordnen ist (Bsp.: Zeile A, Spalte 2 beinhaltet eine Gewebeprobe von Patient 1).

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

## 2.2.2 Immunhistochemie

### 2.2.2.1 Antikörper-Vorbehandlung und Verdünnung

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

- Stammlösung I      21g CH<sub>3</sub>COOH/ 1l bi-dist. H<sub>2</sub>O
- Stammlösung II    29,4g tri-CH<sub>3</sub>COO-Na x 2H<sub>2</sub>O/ 1l bi-dist. H<sub>2</sub>O

18ml von Stammlösung I und 82ml von Stammlösung II ergaben auf 1l bi-dist. H<sub>2</sub>O den erforderlichen pH-Wert von 6,0. Nach erfolgter Citratpuffer-Auftragung wurden die Objektträger für 45 Minuten in einem Dampfgerät inkubiert und die für die immunhistochemischen Färbungen benötigten Primärantikörper verdünnt (Tabelle 2.2.2.1-1):

KIT, PDGFRA, SCF, PKC-alpha, phospho-PKC-alpha, SRC, phospho-LYN, CRKL, AKT-1, phospho-AKT-1, ERK-2, FAK, PYK-2 und cyt-PP2A.

Antikörper	Clone-ID	Bestell-Nr.	Firma (Stadt, Land)	Verdünnung	zelluläre Lokalisation
<b>KIT</b>	YR145	1522-1	Epitomics (Burlingame, USA)	1:250	zytoplasmatisch
<b>PDGFRA</b>	polyclonal rabbit	RB-9027-P	NeoMarkers (Fremont, CA, USA)	1:200	zytoplasmatisch
<b>SCF</b>	EP665Y	2062-1	Epitomics (Burlingame, USA)	1:100	zytoplasmatisch
<b>PKC-<math>\alpha</math></b>	Y143	1608-1	Epitomics (Burlingame, USA)	1:100	nukleär

<b>phospho- PKC-<math>\alpha</math></b>	E195	1195-1	Epitomics (Burlingame, USA)	1:50	zytoplasmatisch
<b>SRC</b>	EG107	1587-1	Epitomics (Burlingame, USA)	1:100	zytoplasmatisch
<b>phospho- LYN</b>	EP504Y	1659-1	Epitomics (Burlingame, USA)	1:100	zytoplasmatisch
<b>CRKL</b>	Y244	1524-1	Epitomics (Burlingame, USA)	1:50	zytoplasmatisch
<b>AKT-1</b>	E45	1085-1	Epitomics (Burlingame, USA)	1:1000	zytoplasmatisch
<b>phospho- AKT-1</b>	EPR4157	3188-1	Epitomics (Burlingame, USA)	1:100	zytoplasmatisch
<b>ERK-2</b>	E460	1586-1	Epitomics (Burlingame, USA)	1:1000	nukleär
<b>FAK</b>	EP695Y	1700-1	Epitomics (Burlingame, USA)	1:100	zytoplasmatisch
<b>PYK-2</b>	YE353	1509-1	Epitomics (Burlingame, USA)	1:250	zytoplasmatisch
<b>cyt-PP2A</b>	Y119	1512-1	Epitomics (Burlingame, USA)	1:250	zytoplasmatisch

**Tab. 2.2.2.1-1: In der Tabelle sind die verwendeten Antikörper inklusive der herstellenden Firma und des Firmensitzes dargestellt. Weiterhin sind für jeden Antikörper die benutzten Verdünnungen angegeben.**

### **2.2.2.2 Immunhistochemische Färbung**

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

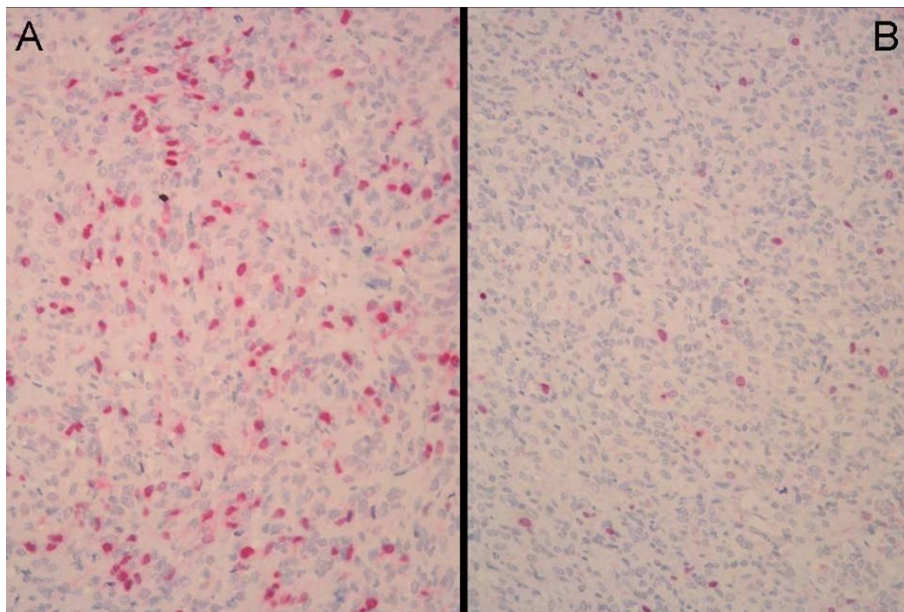
Bei diesem Färbeporgang erfolgte als erstes eine fünfminütige Waschung der Tissue Mikroarrays in einem neutralen TRIS-Puffer (12g TRIS + 18 g NaCl / 2 l bi-dest H<sub>2</sub>O, pH: 7,4). Zum Blockieren des endogenen Biotins wurde mit der BSA-Fraktion-V (2g BSA / 100ml TRIS-Puffer) inkubiert, worauf sich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

## **2.3 Auswertungsmethoden**

### **2.3.1 Quantitative Auswertung**

Die immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben wurden zunächst jeweils einzeln unter dem Mikroskop aufgesucht und dann mit einer 200-fachen Vergrößerung digital fotografiert (Abbildung 2.3.1-1). Die digitalen Fotos der einzelnen Gewebeproben wurden anschließend mit Hilfe einer Computer-gestützten Anwendung quantitativ ausgewertet. Die Software, die von Dr. Robert Cameron (Cameron et al. 2008) programmiert wurde, erkennt und zählt die

Zellkerne in zwei getrennten Durchläufen. Zunächst werden nur die rot angefärbten, positiven Zellkerne ausgezählt, welche das gesuchte Protein exprimieren. In einem zweiten Durchlauf werden dann alle Zellkerne ausgezählt, auch die blau gefärbten, welche das gesuchte Protein nicht exprimieren. Aus dem Verhältnis der markierten positiven Zellkerne zu allen markierten Zellkernen lässt sich quantitativ bestimmen, wie viel Prozent der Tumorzellen ein gesuchtes Protein exprimieren (z.B. 12%).



**Abb. 2.3.1-1:** Die Abbildung zeigt die immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben bei 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop. A) Dieses Gewebe weist ca. 20% positive Zellkerne nach immunhistochemischer Färbung mit dem Primärantikörper Cyclin A2 auf; B) Dieses Gewebe zeigt ca. 5% positive Zellkerne nach immunhistochemischer Färbung mit dem Primärantikörper Cyclin A2.

### 2.3.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung des Computerprogramms Statistika 8.0 (StatSoft, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Ein statistisches Ergebnis wurde als signifikant gewertet, wenn der p-Wert  $< 0,05$  betrug. Zunächst wurden die klinisch-pathologischen Parameter Lokalisation, Morphologie, Tumorgröße, Mitosenanzahl/ 50 HPFs und Mutationsstatus untereinander verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte dabei mithilfe von t-Tests für unverbundene Stichproben, sowie  $\chi^2$ -Tests. Für unverbundene Stichproben wurden bei nominalen Daten ebenfalls t-Tests angewandt. Die graphische

Darstellung dieser Ergebnisse erfolgte mittels Box-Plots (siehe einzelne Abbildungen; Balken innerhalb der Box: Median, Box: 25 bzw. 75% Quantil, äußere Begrenzungsbalken: Minimum/Maximum ohne Ausreißer, Dreiecke: Originaldaten).

Chi<sup>2</sup>-Tests wurden bei kategorialen Variablen angewandt. Hierbei wurde im Rahmen des Vierfeldertests der Zusammenhang zwischen zwei Alternativmerkmalen untersucht. Die Darstellung dieser Ergebnisse erfolgte tabellarisch. Anschließend wurde die Expression der untersuchten Proteine auf Korrelationen mit den oben genannten klinisch-pathologischen Parametern getestet. Dies erfolgte ausschließlich mittels t-Tests für unverbundene Stichproben, wobei auch hier die Ergebnisse durch Box-Plots graphisch dargestellt wurden. Der klinische Verlauf wurde abschließend mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt, wobei die Signifikanzen der Ergebnisse mit dem Log-Rang-Test überprüft wurden. Der Log-Rang-Test basiert ebenfalls auf der Chi<sup>2</sup>-Verteilung und dient dazu, die Überlebenswahrscheinlichkeiten zweier Gruppen miteinander zu vergleichen, wobei auch zensierte Daten erlaubt sind.

## 2.4 Reagenzien und Geräte

Gerät/ Reagenz	Firma	Firmensitz	Land
Manueller Tissue- Arrayer MTA-1	AlphaMetrix Biotech GmbH	Rödermark	Deutschland
Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse	Dako Denmark A/S	Glostrup	Dänemark
Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)	Dako Denmark A/S	Glostrup	Dänemark
Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP)	Dako Denmark A/S	Glostrup	Dänemark
Dako REAL™ Chromogen Red 1	Dako Denmark A/S	Glostrup	Dänemark

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

Tab. 2.4-1: Reagenzien und Geräte

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Darstellung des untersuchten Tumorkollektivs

#### 3.1.1 Geschlechts- und Altersverteilung der Patienten

Das untersuchte Tumorkollektiv umfasst 167 Patienten, davon waren anteilig 89 Patienten männlich (53%) und 78 Patienten weiblich (47%). Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis von 1:1,14. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 33 und 90 Jahren und betrug im Mittel bei den weiblichen Patienten 67,2 Jahre ( $\pm 12,8$  Jahre) und bei den männlichen Patienten 64,6 Jahre ( $\pm 11,5$  Jahre). Es bestand keine signifikante Korrelation hinsichtlich des Geschlechts und dem Zeitpunkt der Operation ( $p=0,17$ ).

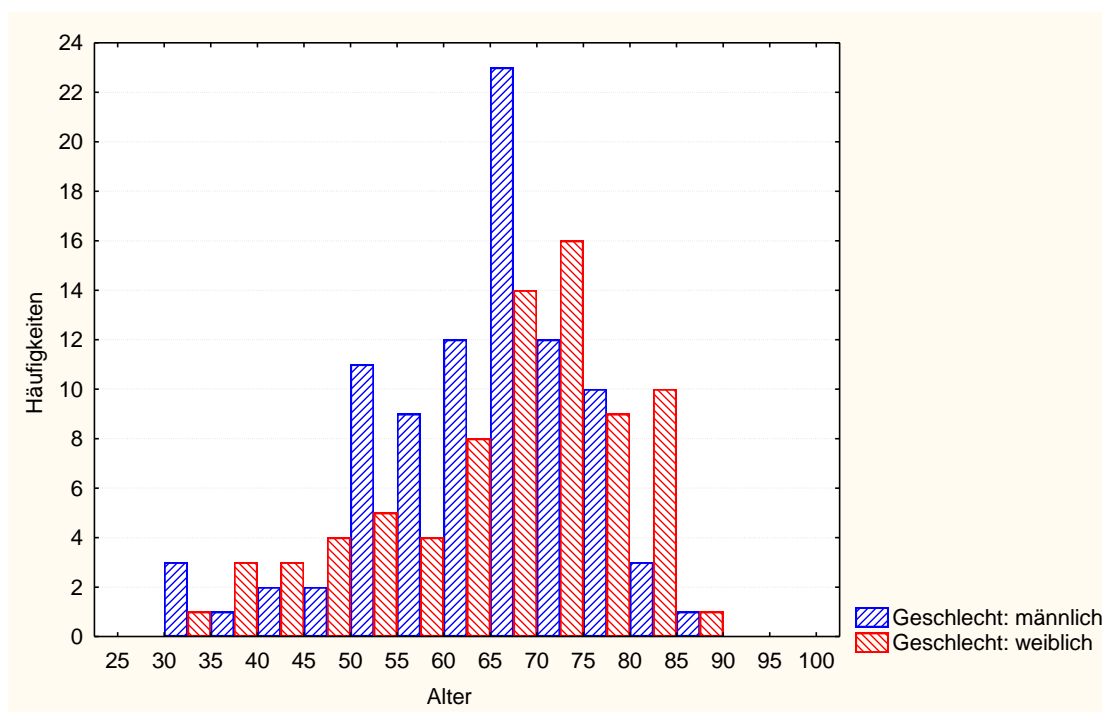


Abb. 3.1.1-1: Altersverteilung der 89 männlichen und 78 weiblichen Patienten mit GIST, getrennt nach Geschlecht.



### 3.1.2 Anatomische Lokalisation

Von den untersuchten 167 GIST befanden sich 101 Tumoren im Magen (60,5%). 47 Tumoren waren im Dünndarm (28,1%) und 13 Tumoren im Dickdarm (7,8%) lokalisiert. Außerdem umfasste das Patientenkollektiv 6 GIST, die sich im Peritoneum und folglich extraintestinal (3,6%) befanden.

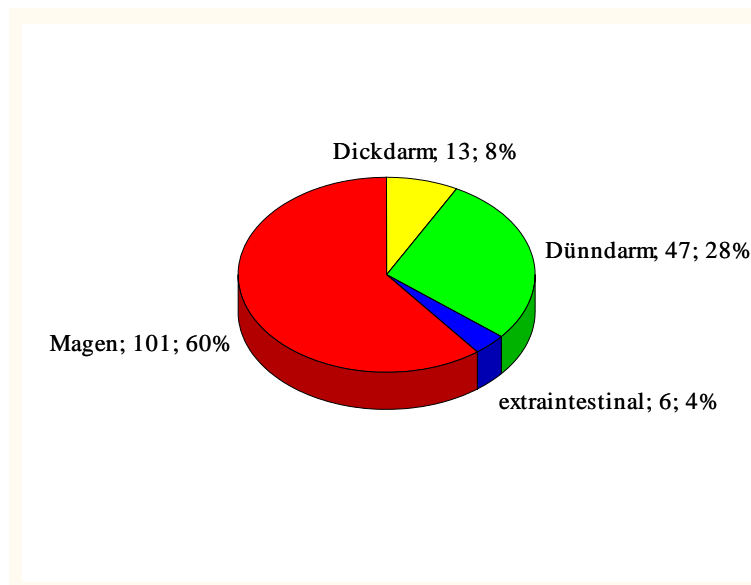


Abb. 3.1.2-1: Kreisdiagramm der anatomischen Lokalisationen von 167 in Göttingen diagnostizierten primären GIST. Angegeben sind jeweils die absoluten Häufigkeiten und die Prozentangaben bezogen auf das Gesamtkollektiv.

### 3.1.3 Tumorgröße

Die Größe der Tumoren reichte von 0,7 cm bis maximal 30 cm. Im Mittel betrug die Größe 6,78 cm (+5,19 cm).

### 3.1.4 Mitosenanzahl

Angegeben wird die Anzahl der Mitosenfiguren in 50 hochauflösende Gesichtsfeldern bzw. High-Power-Fields (HPFs), was einer Fläche von 10 mm<sup>2</sup> entspricht. Von den 167 untersuchten GIST-Fällen besaßen 109 Tumore (65%) Mitosezahlen < 5/ 50 HPFs und 58 Tumore (35%) Mitosefiguren > 5/ 50 HPFs. Der Mittelwert an Mitosefiguren pro jeweiligen GIST betrug hierbei 15,74 ± 30,39.

### 3.1.5 Morphologie

Das untersuchte Kollektiv von 167 GIST bestand aus 98 Fällen mit spindelzelliger Morphologie (58,7%), aus 20 Fällen mit epitheloider Morphologie (12,0%) sowie 49 Tumoren mit gemischter epitheloid-spindelzelliger Morphologie (29,3%).

### 3.1.6 Mutationsstatus

GIST können, ihrem Mutationsstatus entsprechend, in GIST mit einer *KIT*-Mutation, in GIST mit einer *PDGFRA*-Mutation und in einen Wildtyp-GIST unterteilt werden. Hierbei ergaben sich 96 GIST mit einer *KIT*-Mutation (73,8%), 21 GIST mit einer *PDGFRA*-Mutation (16,2%) und 13 Wildtyp-GIST (10%). Bei 37 Tumoren wurde kein Mutationsstatus bestimmt.

### 3.1.7 Aktuelle Risikoklassifikation

#### 3.1.7.1 Einteilung nach Fletcher

In der Risikoklassifikation nach Fletcher (Fletcher et al. 2002) werden aufgrund der Tumorgröße und der Mitoserate vier verschiedene Risiko-Stadien unterschieden. In dem untersuchten Kollektiv fanden sich 20 Tumoren (12,0%) mit sehr niedrigem, 44 Tumoren (26,3%) mit niedrigem, 42 Tumoren (25,2%) mit mittlerem und 61 GIST (36,5%) mit hohem Risiko.

#### 3.1.7.2 Einteilung nach Miettinen

Neben den beiden Parametern der Tumorgröße und der Mitosenanzahl wurde bei der Risikoklassifikation nach Miettinen noch die anatomische Lokalisation miteinbezogen (Miettinen und Lasota 2006). Daraus ergaben sich für das untersuchte Kollektiv 20 Tumoren (12,0%) mit sehr niedrigem, 74 (44,3%) mit niedrigem, 19 (11,4%) mit mittlerem und 54 Tumoren (32,3%) mit hohem Risiko.

### 3.1.8 Progress und tumorfreie Überlebenszeit

Von 139 Patienten lagen die Daten über einen eventuellen Progress und die tumorfreie Überlebenszeit vor. Bei 99 Patienten lag bisher kein Progress vor und die mittlere tumorfreie Überlebenszeit betrug 42,5 ( $\pm 36,1$ ) Monate. 40 Patienten erlitten einen Progress und die tumorfreie Überlebenszeit betrug im Mittel 17,2 ( $\pm 21,3$ ) Monate.

## 3.2 Vergleich der klinisch-pathologischen Parameter

### 3.2.1 Mutationsstatus

#### 3.2.1.1 Vergleich von Mutationsstatus und Lokalisation

Zunächst zeigte sich, dass in dem untersuchten Kollektiv keine *PDGFRA*-Mutationen außerhalb des Magen vorzufinden waren. Außerdem waren keine Wildtyp-Mutationen im Dickdarm und im Extraintestinum vorhanden (siehe Tabelle 3.2.1.1-1).

Signifikante Korrelationen mit p-Werten  $< 0,05$  (siehe Tabelle 3.2.1.1-2) fanden sich zwischen dem *KIT*- und *PDGFRA*-Mutationsstatus hinsichtlich einer Lokalisation im Magen oder im Dünndarm. Demzufolge waren signifikant mehr *KIT*-mutierte Tumoren im Magen (53,1%) als im Dünndarm (33,3%) sowie signifikant mehr *PDGFRA*-mutierte GIST im Magen (95,2%) als im Dünndarm (0%) vorzuweisen ( $p=0,0008$ ) (siehe Tabellen 3.2.1.1-1/ 2). Gleiches zeigte sich bei der Verteilung zwischen *PDGFRA*- und Wildtypmutationen hinsichtlich einer Magen- oder Dünndarmlokalisation, wobei im Dünndarm signifikant seltener ( $p=0,0026$ ) eine Wildtypvariante (38,5%) oder eine *PDGFRA*-Mutation (0%) vorzufinden war als im Magen. Der Magen war anteilig mit 61,5% am Wildtyp-Kollektiv beteiligt.

Des Weiteren waren signifikante Korrelationen zwischen einem Vorkommen im Dünndarm und im Extraintestinum und der *PDGFRA*- und *KIT*-Mutation ( $p=0,010$ ) sowie der *PDGFRA*- und Wildtyp-Mutation ( $p=0,014$ ) erkennbar. *PDGFRA*-mutierte Tumore waren nicht im Dünndarm zu finden, ließen sich jedoch mit einem Fall im Extraintestinum (4,8%) nachweisen. GIST vom Wildtyp fanden sich gehäuft im Dünndarm (38,5%) und waren nicht im Extraintestinum aufzufinden (siehe Tabellen 3.2.1.1-1/ 2).

	<b>KIT</b>	<b>PDGFRA</b>	<b>Wildtyp</b>
	Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)
<b>Magen</b>	51 (53,1)	20 (95,2)	8 (61,5)
<b>Dünndarm</b>	32 (33,3)	0	5 (38,5)
<b>Dickdarm</b>	9 (9,4)	0	0
<b>Extraintestinal</b>	4 (4,2)	1 (4,8)	0
<b>Gesamt</b>	96 (100)	21 (100)	13 (100)

Tab. 3.2.1.1-1: Absolute und relative Verteilung der Mutationstypen hinsichtlich ihrer anatomischen Lokalisation.

	<b>KIT/ PDGFRA</b>	<b>KIT/ Wildtyp</b>	<b>PDGFRA/ Wildtyp</b>
<b>Magen/ Dünndarm</b>	p= 0,0008	p= 0,99	p= 0,0026
<b>Magen/ Dickdarm</b>	p= ,0660	p= 0,24	Nicht möglich
<b>Magen/ Extraintestinal</b>	p= 0,21	p= 0,43	p=0,087
<b>Dünndarm/ Dickdarm</b>	Nicht möglich	p= 0,24	Nicht möglich
<b>Dünndarm/ Extraintestinal</b>	0,010	p= 0,43	p= 0,014
<b>Dickdarm/ Extraintestinal</b>	0,16	Nicht möglich	Nicht möglich

Tab. 3.2.1.1-2: Darstellung der statistischen Ergebnisse (Chi<sup>2</sup>-Test) beim Vergleich von Lokalisation und Mutationsstatus.

### 3.2.1.2 Vergleich von Mutationsstatus und Tumorgroße

Die maximale Tumorgroße in Bezug zum Mutationsstatus zeigte Mittelwerte für die *KIT*-Mutation von 7,50 ( $\pm$  5,65) cm, für die *PDGFRA*-Mutation von 5,87 ( $\pm$  3,59) cm und für die Wildtyp-Mutation von 5,14 ( $\pm$ 2,99) cm. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

### 3.2.1.3 Vergleich von Mutationsstatus und Mitosenanzahl

Der Vergleich zwischen Mitosenanzahl und dem Mutationsstatus ergab für die *KIT*-Mutation einen Mittelwert von 20,77 ( $\pm$  34,92) / 50 HPF, für die *PDGFRA*-Mutation von 7,10 ( $\pm$  16,85) und für die Wildtyp-Variante von 3,92 ( $\pm$  10,29) / 50 HPF. Die durchgeführten t-Tests für unverbundene Stichproben zeigten keine signifikanten Korrelationen auf.

### 3.2.1.4 Vergleich von Mutationsstatus und Morphologie

Von den insgesamt 96 *KIT*-mutierten Tumoren ergab sich in 66 Fällen (68,8%) eine spindelzellige, in 27 Fällen (28,1%) eine gemischte und in 3 Fällen eine epitheloide Morphologie. Die 21 *PDGFRA*-Mutationen waren mit jeweils 9 Tumoren (42,85%) von epitheloider oder gemischter Morphologie. Drei Tumoren erwiesen sich als spindelzellig (14,3%). Die 13 Wildtyp-GIST waren in 6 Fällen (46,2%) von spindelzelliger, in 3 Fällen (23%) von epitheloider und in 4 Fällen (30,8%) von gemischter Morphologie (Tabelle 3.2.1.4-1). Somit sind *KIT*-mutierte GIST signifikant häufiger von spindelzelliger Morphologie als *PDGFRA*-mutierte ( $p=0,00$ ) oder Wildtyp-mutierte Tumore ( $p=0,0021$ ). Eine *PDGFRA*-Mutation ist hingegen positiv mit dem Vorliegen einer epitheloiden ( $p=0,00$ ) oder gemischten ( $p=0,0019$ ) Morphologie gegenüber einer spindelzelligen ( $p=0,0000$ ) Morphologie bei den *KIT*-mutierten GIST korreliert (Tabelle 3.2.1.4-2).

	<b>KIT</b>	<b>PDGFRA</b>	<b>Wildtyp (WT)</b>
	Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)
<b>Spindelzellig</b>	66 (68,8)	3 (14,3)	6 (46,2)
<b>Epitheloid</b>	3 (3,1)	9 (42,85)	3 (23)
<b>Gemischt</b>	27 (28,1)	9 (42,85)	4 (30,8)
<b>Gesamt</b>	96 (100)	21 (100)	13 (100)

Tab. 3.2.1.4-1: Absolutes und relatives Vorkommen der einzelnen Morphologien im Hinblick auf den Mutationsstatus.

	<b>KIT/ PDGFRA</b>	<b>KIT/ Wildtyp</b>	<b>PDGFRA/ Wildtyp</b>
<b>Spindelzellig/ Epitheloid</b>	$p= 0,0000$	$p= 0,0021$	$p= 0,056$
<b>Spindelzellig/ Gemischt</b>	$p= 0,0016$	$p= 0,47$	$p= 0,096$
<b>Epitheloid/ Gemischt</b>	$p= 0,0019$	$p= 0,034$	$p= 0,75$

Tab. 3.2.1.4-2: Ergebnisse der Chi<sup>2</sup>-Tests beim statistischen Vergleich zwischen Mutationsstatus und Morphologie.

### 3.2.2 Lokalisation

#### 3.2.2.1 Vergleich der Lokalisation mit der Tumorgröße

Die durchschnittliche Tumorgröße betrug im Magen 6,18 ( $\pm$  4,60) cm, im Dünndarm 7,29 ( $\pm$  5,02) cm, im Dickdarm 5,55 ( $\pm$  4,18) cm und extraintestinal 16,17 ( $\pm$  8,75) cm. Bei den durchgeführten t-Tests für unverbundene Stichproben ergaben sich signifikante Zusammenhänge bezüglich der Tumorgröße zwischen Magen und Extraintestinum ( $p=0,000040$ ), zwischen Dünndarm und Extraintestinum ( $p=0,00050$ ) sowie zwischen Dickdarm und Extraintestinum ( $p=0,00049$ ). Die GIST, die extraintestinal lokalisiert waren, stellten sich in ihrer Tumorausdehnung als deutlich größer heraus. (Abbildung 3.2.3.1-1)

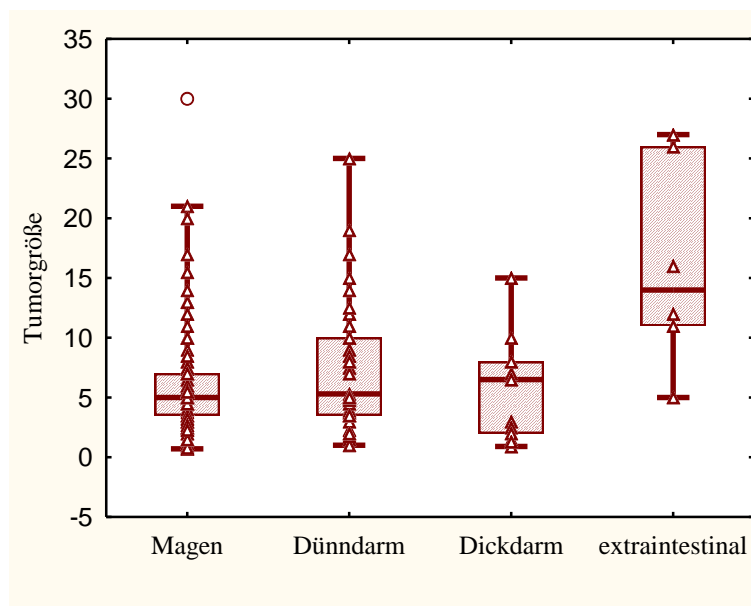


Abb. 3.2.2.1-1: Box-Plot-Darstellung der Tumorgröße in Bezug zur anatomischen Lokalisation.

#### 3.2.2.2 Vergleich der Lokalisation mit der Mitosenanzahl

Der Mittelwert der Mitosenanzahl betrug beim Magen 12,01 ( $\pm$  24,72) / 50 HPF, beim Dünndarm 17,30 ( $\pm$  31,94) / 50 HPF, beim Dickdarm 34,23 ( $\pm$  54,06) / 50 HPF und beim Extraintestinum 24,83 ( $\pm$  27,58) / 50 HPF. Eine signifikante Korrelation wurde beim Vergleich zwischen Magen und Dickdarm deutlich ( $p=0,012$ ). GIST des Dickdarms zeigten eine signifikant höhere durchschnittliche Mitosenanzahl als Tumore des Magens (Abbildung 3.2.3.2-1). Weitere t-Tests für unverbundene Stichproben zwischen Mitosenanzahl und Lokalisation ergaben keine signifikanten Zusammenhänge.

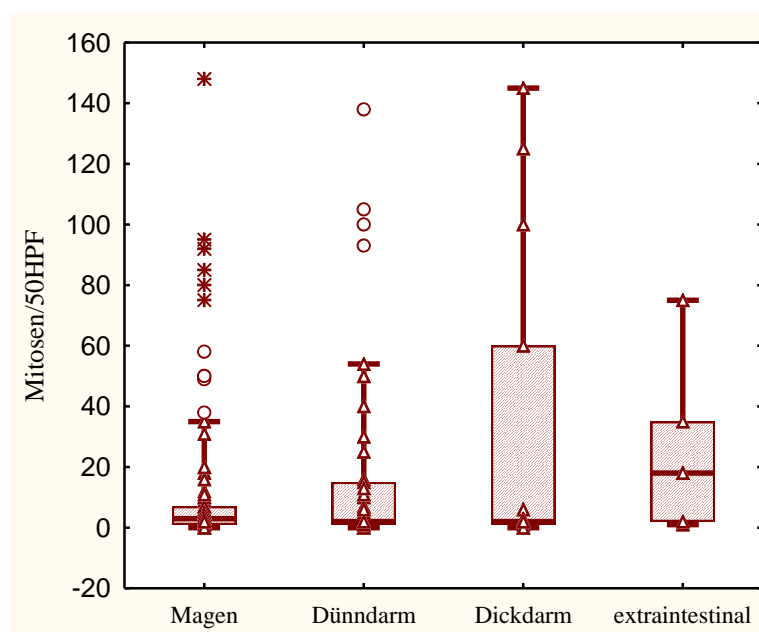


Abb. 3.2.2.2-1: Box-Plot-Darstellung der Mitosenanzahl in Bezug zur Lokalisation.

### 3.2.2.3 Vergleich der Lokalisation mit der Morphologie

Von den 101 GIST, die sich dem Magen zuordnen ließen, besaßen 55 eine spindelzellige (54,5%), 15 eine epitheloide (14,9%) und 31 (30,7%) eine gemischte Morphologie. Die 47 GIST des Dünndarms waren mit 32 Fällen (68,1%) von spindelzelliger, mit 3 Fällen (6,4%) von epitheloider und mit 12 Fällen (25,5%) von gemischter Morphologie. Im Dickdarm waren anteilig 9 spindelzellige und 4 gemischte Tumoren vorzufinden. Es fand sich kein Tumor von epitheloider Morphologie. Die lediglich 6 extraintestinal vorkommenden GIST sind jeweils mit 2 Tumoren von spindelzelliger, epitheloider und gemischter Morphologie (siehe Tabelle 3.2.3.3-1). Chi<sup>2</sup>-Tests für nicht-parametrische Verfahren ergaben zwischen den Gruppen keine signifikanten Korrelationen.

	<b>Magen</b>	<b>Dünndarm</b>	<b>Dickdarm</b>	<b>Extraintestinal</b>
	Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)
<b>Spindelzellig</b>	55 (54,4)	32 (68,1)	9 (69,2)	2 (33,3)
<b>Epitheloid</b>	15 (14,9)	3 (6,4)	0	2 (33,3)
<b>Gemischt</b>	31 (30,7)	12 (25,5)	4 (30,8)	2 (33,3)
<b>Gesamt</b>	101 (100)	47 (100)	13 (100)	6 (100)

Tab. 3.2.2.3-1: Verteilung der anatomisch-lokaliserten GIST auf die jeweilige Morphologie.

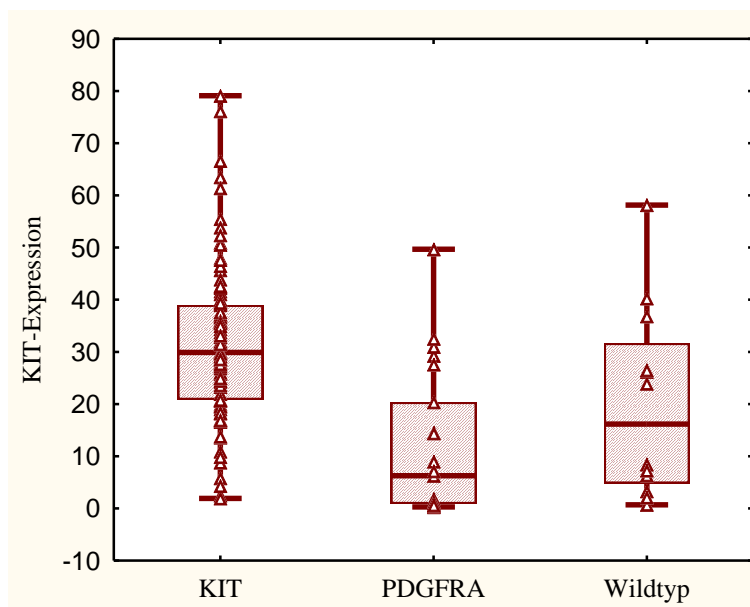
### 3.3 Vergleich der Expression der untersuchten Signalproteine und der klinisch-pathologischen Parameter

Im Folgenden wurden aus Übersichtsgründen nur die Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der t-Tests von den Antikörperexpressionen angegeben, die eine Signifikanz bei den einzelnen Vergleichen zeigten. Die untersuchten Signalproteine waren *KIT*, *PDGFRA*, *SCF*, *PKC-alpha*, *phospho-PKC-alpha*, *SRC*, *phospho-LYN*, *CRKL*, *AKT-1*, *phospho-AKT-1*, *ERK-2*, *FAK*, *PYK-2* und *cyt-PP2A*.

#### 3.3.1 Mutationsstatus

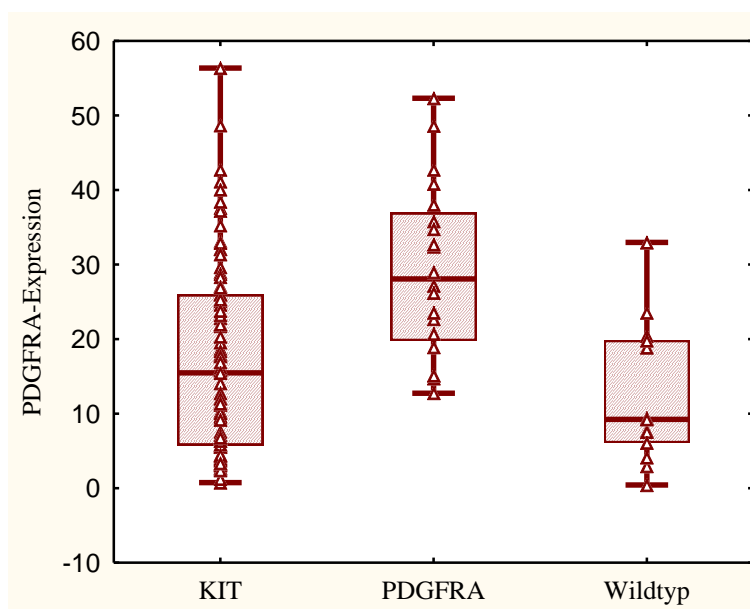
Bei dem Vergleich der Expression der untersuchten Antikörper mit dem Mutationsstatus ergaben sich bei den durchgeführten t-Tests für unverbundene Stichproben signifikante Korrelationen bei den Vergleichen von *KIT*-mutierten, *PDGFRA*-mutierten und Wildtyp-mutierten GIST bei der *KIT*-Expression, der *PDGFRA*-Expression und bei der phospho-PKC- $\alpha$ -Expression. Die *KIT*-Expression zeigte bei den *KIT*-mutierten Tumoren (31,53 [ $\pm$  14,65]) signifikant ( $p < 10^{-6}$ ) höhere Werte als bei den *PDGFRA*-mutierten GIST (11,89 [ $\pm$  14,39]) und auch signifikant ( $p = 0,014$ ) höhere Werte als bei den Wildtyp-Fälle (19,99 [ $\pm$  18,33]).





**Abb. 3.3.1-1: Box-Plot-Darstellung der *KIT*-Expression in Abhängigkeit vom Mutationsstatus.**

Die *PDGFRA*-Expression war bei den *PDGFRA*-mutierten Tumoren (29,20 [ $\pm$ 11,59]) signifikant ( $p=0,000076$ ) gegenüber den *KIT*-mutierten GIST (16,76 [ $\pm$ 12,46]) und signifikant ( $p=0,000157$ ) gegenüber den Wildtyp-mutierten (12,54 [ $\pm$ 9,636]) Tumoren erhöht.



**Abb. 3.3.1-2: Box-Plot-Darstellung der *PDGFRA*-Expression in Abhängigkeit vom Mutationsstatus.**

Als weiteren signifikanten Zusammenhang ergab sich die *phospho-PCK- $\alpha$* -Expression, die sich bei den *PDGFRA*-mutierten Tumoren (10,52 [ $\pm$ 5,879]) signifikant ( $p=0,046$ ) höher darstellte als bei den *KIT*-mutierten GIST (6,939 [ $\pm$ 5,869]).

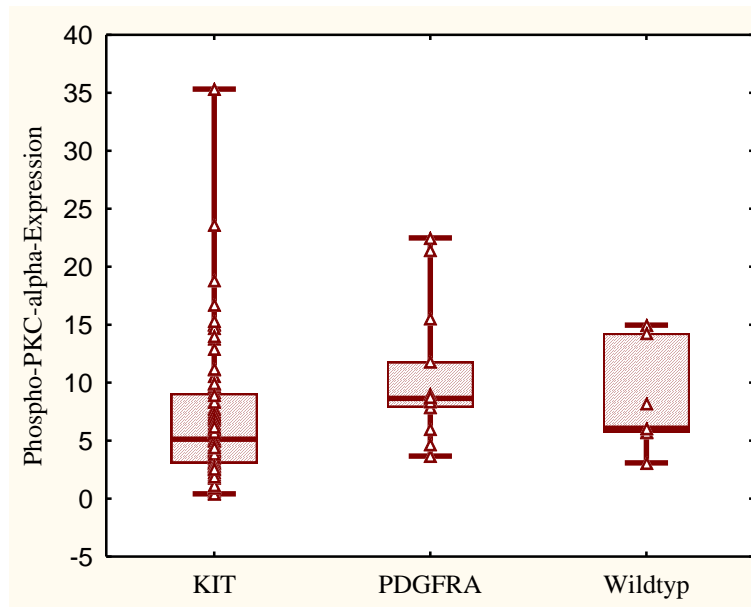


Abb. 3.3.1-3: Box-Plot-Darstellung der *Phospho-PKC- $\alpha$* -Expression in Abhängigkeit vom Mutationsstatus.

### 3.3.2 Lokalisation

Es ergaben sich signifikante Korrelationen bei dem Vergleich der untersuchten Antikörper-Expressionen und der jeweiligen anatomischen Lokalisation hinsichtlich der *KIT*-, *PDGFRA*- und *CRKL*-Antikörper-Expressionen.

Die *KIT*-Expression zeigte durchschnittlich signifikant ( $p=0,0041$ ) höhere Werte im Dünndarm ( $33,46 [\pm 13,03]$ ) als im Magen ( $24,42 [\pm 19,01]$ ) und auch signifikant ( $p=0,0022$ ) höhere Werte als im Extraintestinum ( $14,59 [\pm 17,08]$ ). Ebenfalls war statistisch eine signifikant ( $p=0,020$ ) erhöhte *KIT*-Expression im Dickdarm ( $33,52 [\pm 14,03]$ ) gegenüber einer Expression im Extraintestinum nachzuweisen.

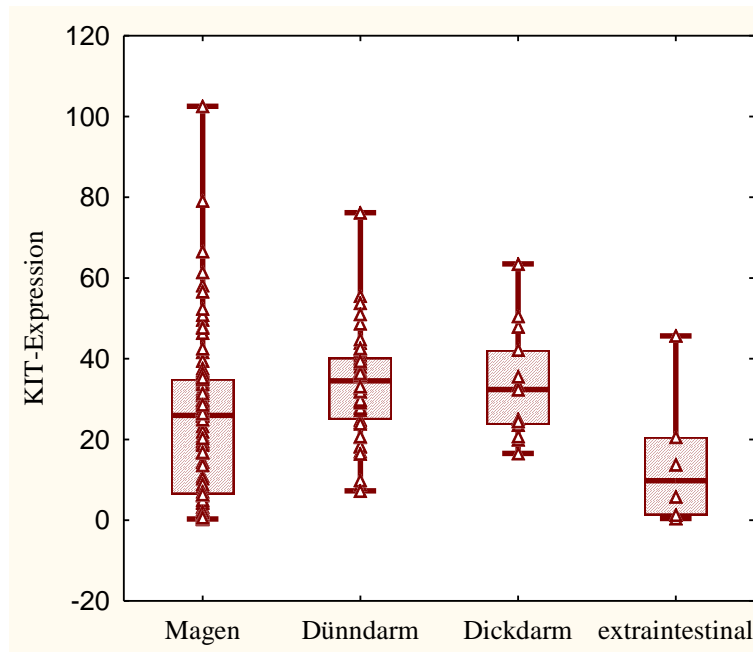


Abb. 3.3.2-1: Box-Plot-Darstellung der *KIT*-Expression in Abhängigkeit zur anatomischen Lokalisation.

Die *PDGFRA*-Expression war entgegen der *KIT*-Expression signifikant ( $p=0,000003$ ) im Magen ( $22,38 [\pm 11,91]$ ) gegenüber einer Lokalisation im Dünndarm ( $12,35 [\pm 11,18]$ ) und auch signifikant ( $p=0,026$ ) gegenüber einer Lokalisation im Dickdarm ( $14,16 [\pm 15,14]$ ) erhöht.

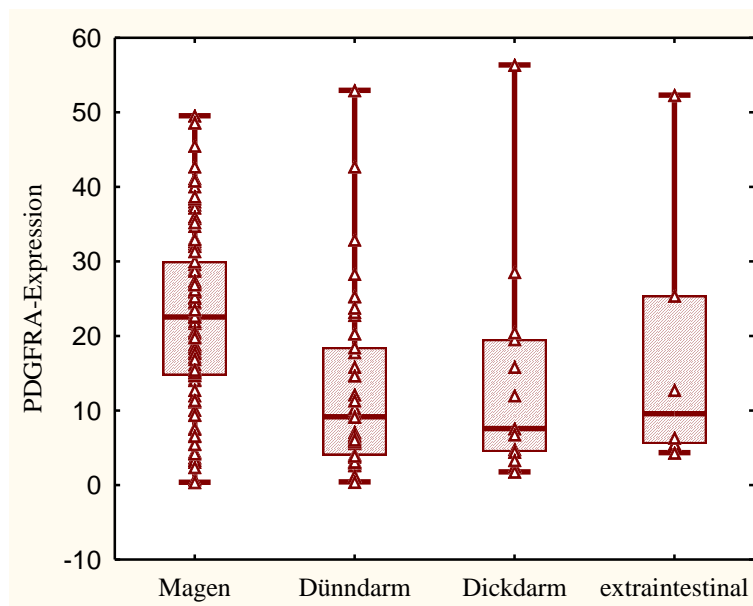


Abb. 3.3.2-2: Box-Plot-Darstellung der *PDGFRA*-Expression in Abhängigkeit zur anatom. Lokalisation.

Bei der *CRKL*-Expression zeigten sich signifikant ( $p=0,037$ ) höhere Werte im Dickdarm ( $5,901 [\pm 5,408]$ ) gegenüber einem Vergleich bei einem Auftreten im Dünndarm ( $3,131 [\pm 2,742]$ ).

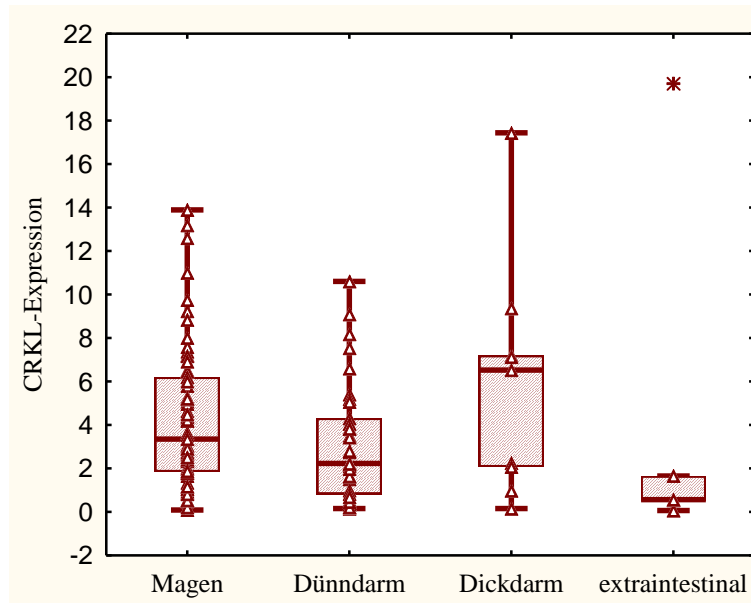
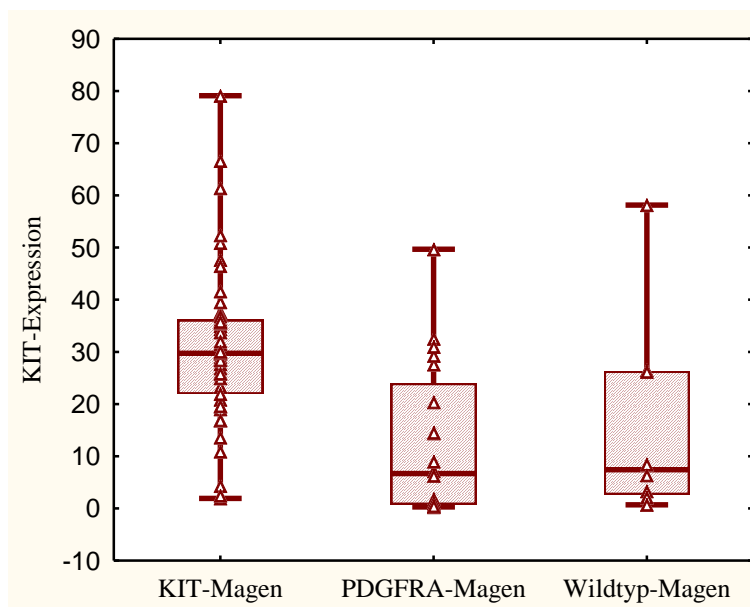


Abb. 3.3.2-3: Box-Plot-Darstellung der *CRKL*-Expression in Abhängigkeit zur anatom. Lokalisation.

### 3.3.3 Mutationsstatus / Lokalisation

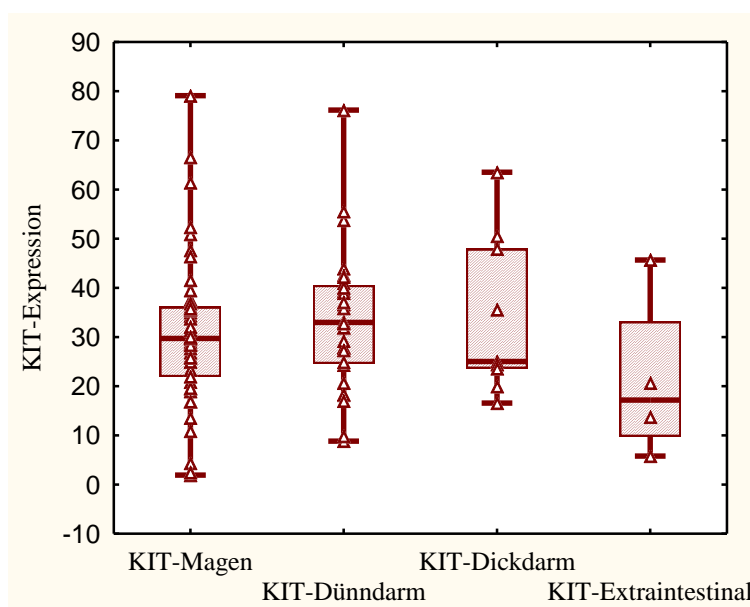
Der Vergleich zwischen dem jeweiligen Mutationsgen und der vorzufindenden anatomischen Lokalisation ergab signifikante Korrelationen bei der *KIT*-, der *PDGFRA*-, der *CRKL*-, der *cyt-PP2A*- und der *PKC-α*-Expression.

Signifikante Korrelationen zu einer erhöhten *KIT*-Expression zeigten sich bei *KIT*-mutierten Tumoren aus dem Magen ( $30,71 [\pm 14,84]$ ), verglichen mit den *PDGFRA*-mutierten ( $12,42 [\pm 14,55]$ ) ( $p=0,000014$ ) und den Wildtyp-mutierten GIST aus dem Magenbereich ( $16,45 [\pm 19,73]$ ) ( $p=0,019$ ).



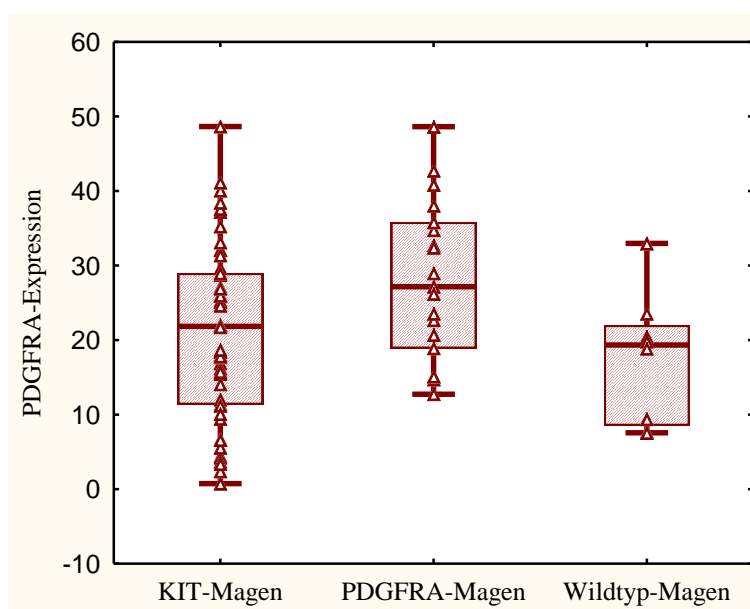
**Abb. 3.3.3-1: Box-Plot-Darstellung der *KIT*-Expression in GIST mit der Lokalisation Magen.**

Des Weiteren wurde eine signifikant ( $p=0,024$ ) erhöhte *KIT*-Expression bei den *KIT*-mutierten Tumoren aus dem Magen ( $21,09 [\pm 11,77]$ ) gegenüber *KIT*-mutierten Tumoren aus dem Extraintestinum ( $7,255 [\pm 3,767]$ ) nachgewiesen (Abb. 3.3.3-2).



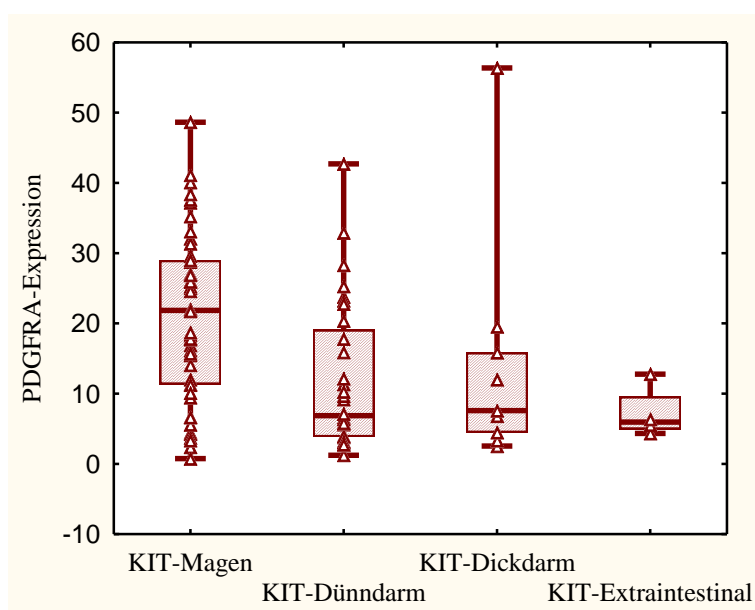
**Abb. 3.3.3-2: Box-Plot-Darstellung der *KIT*-Expression in *KIT*-mutierten GIST verschiedener Lokalisation.**

Die *PDGFRA*-Expression betrug in den im Magen vorkommenden *KIT*-mutierten Tumoren  $21,09 (\pm 11,77)$  und war somit signifikant ( $p=0,029$ ) kleiner als die *PDGFRA*-Expression in *PDGFRA*-mutierten Tumoren aus dem Magen ( $27,98 (\pm 10,51)$ ) (Abb.3.3.3-3).



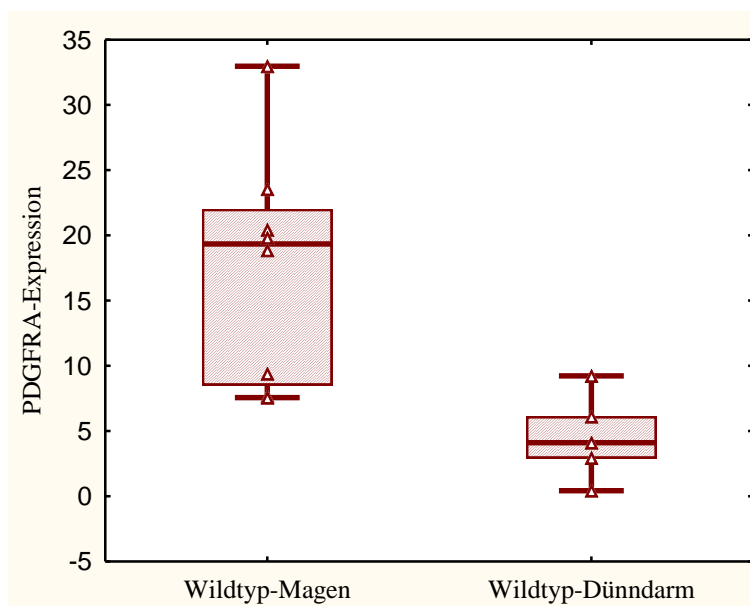
**Abb. 3.3.3-3:** Box-Plot-Darstellung der *PDGFRA*-Expression in GIST im Magen bei unterschiedlichem Mutationsgen.

Außerdem zeigte sich eine signifikant größere *PDGFRA*-Expression innerhalb der *KIT*-mutierten GIST zwischen einer Lokalisation im Magen [21,09 ( $\pm$ 11,77)] und einer Lokalisation im Dünndarm (11,87 [ $\pm$ 10,44]) ( $p=0,00053$ ), sowie beim Vergleich mit einer Lokalisation im Extraintestinum [7,255 ( $\pm$ 3,767)] ( $p=0,024$ ) (Abb.3.3.3-4).



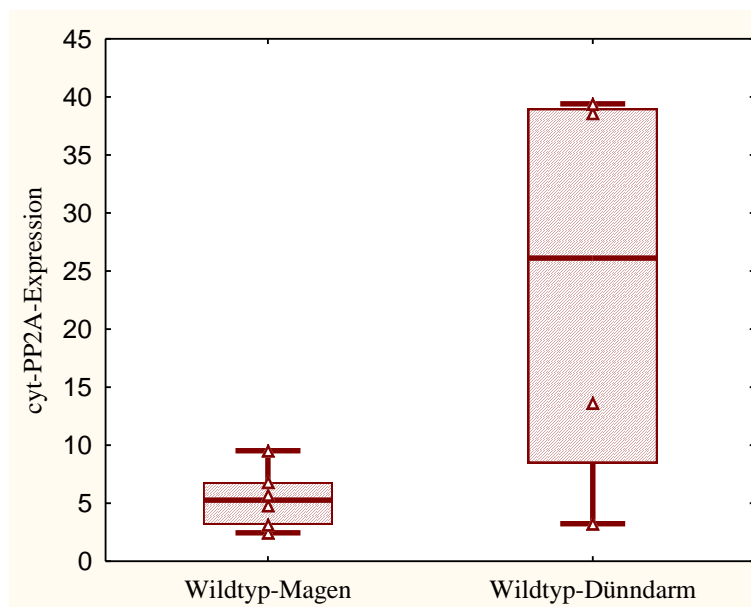
**Abb. 3.3.3-4:** Box-Plot-Darstellung der *PDGFRA*-Expression in *KIT*-mutierten GIST verschiedener Lokalisation.

Weiterhin wurde eine signifikant ( $p=0,010$ ) erhöhte *PDGFRA*-Expression in Wildtyp-mutierten Tumoren aus dem Magen ( $17,53 [\pm 8,883]$ ) verglichen mit Wildtyp-mutierten Tumoren aus dem Dünndarm ( $4,558 [\pm 3,322]$ ) nachgewiesen (Abb.3.3.3-5).



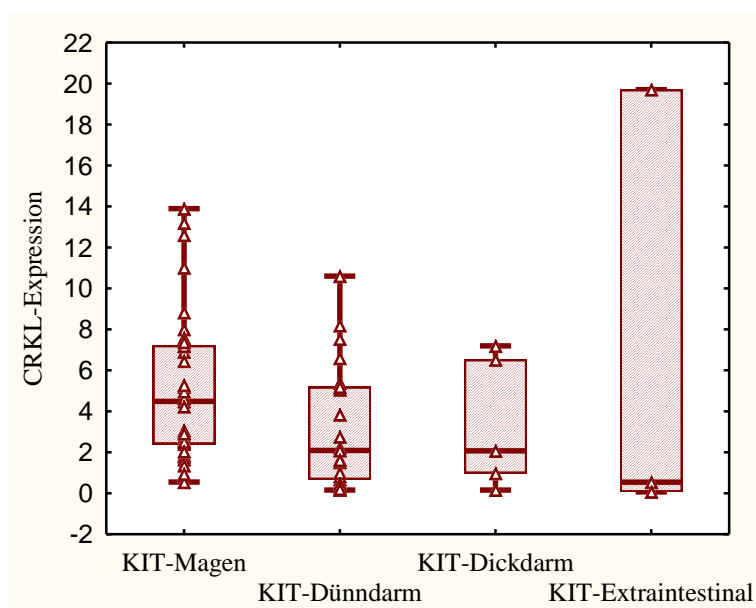
**Abb. 3.3.3-5: Box-Plot-Darstellung der *PDGFRA*-Expression in Wildtyp-mutierten GIST im Magen und in Dünndarm.**

Innerhalb der Wildtyp-mutierten Tumoren ergab die *cyt-PP2A*-Expression ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang ( $p=0,036$ ) zwischen einem Auftreten im Magen ( $5,411 [\pm 2,575]$ ) und im Dünndarm ( $23,72 [\pm 18,15]$ ). Die Wildtyp-mutierten GIST im Dünndarm wiesen eine deutlich höhere Expression auf (Abb.3.3.3-6).



**Abb. 3.3.3-6: Box-Plot-Darstellung der *cyt-PP2A*-Expression in Wildtyp-mutierten Tumoren des Magens und des Dünndarms.**

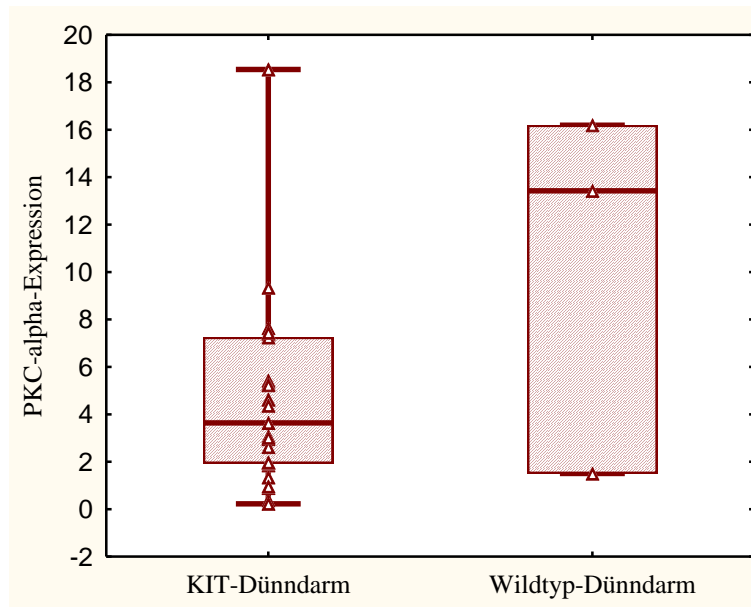
Die *CRKL*-Expression zeigte eine signifikant ( $p=0,033$ ) erhöhte Expression bei *KIT*-mutierten Tumoren im Magen (5,115 [ $\pm 3,622$ ]) verglichen mit *KIT*-mutierten Tumoren aus dem Dünndarm (3,128 [ $\pm 2,960$ ]) auf (Abb.3.3.3-7).



**Abb. 3.3.3-7: Box-Plot-Darstellung der *CRKL*-Expression in *KIT*-mutierten Tumoren.**

Ein signifikanter Unterschied ( $p=0,029$ ) ließ sich auch bei der *PKC- $\alpha$* -Expression unter Berücksichtigung der Expression in *KIT*-mutierten GIST des Dünndarms (4,496 [ $\pm 3,790$ ]) und in Wildtyp-mutierten GIST des Dünndarms (10,37 [ $\pm 7,801$ ]) ausmachen (Abb.3.3.3-8).



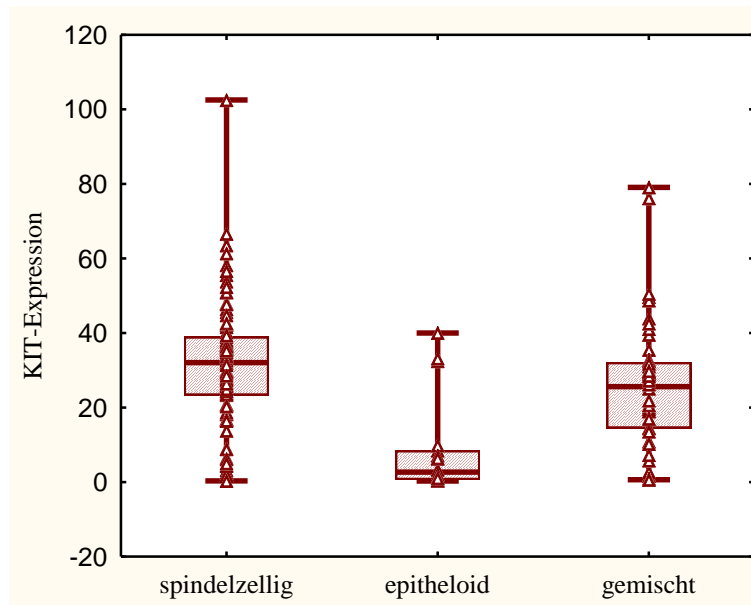


**Abb. 3.3.3-8:** Box-Plot-Darstellung der *PKC-α*-Expression in *KIT*- und Wildtyp-mutierten GIST des Dünndarms.

### 3.3.4 Morphologie

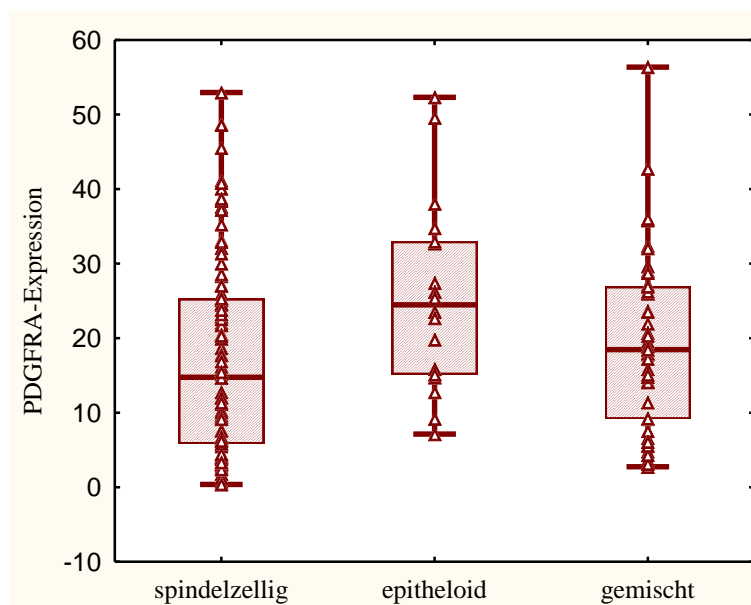
Der Vergleich zwischen der Expression der einzelnen Antikörper und der Morphologie ergab signifikante Korrelationen bei der *KIT*-, der *PDGFRA*-, der *cyt-AKT-1* und der *FAK*-Expression.

Die *KIT*-Expression war in spindelzelligen Tumoren (31,72 [ $\pm$ 16,26]) signifikant ( $p=0,036$ ) größer als in gemischten Tumoren (25,51 [ $\pm$ 17,30]) und ebenfalls signifikant ( $p=0,00$ ) größer als in epitheloiden Tumoren (8,583 [ $\pm$ 12,71]). Die gemischten Tumoren (25,51 [ $\pm$ 17,30]) wiesen wiederum gegenüber den epitheloiden Tumoren (8,583 [ $\pm$ 12,71]) eine signifikant ( $p=0,00035$ ) höhere Expression auf.



**Abb. 3.3.4-1: Box-Plot-Darstellung der *KIT*-Expression in den morphologisch-unterschiedlichen Tumoren.**

Die *PDGFRA*-Expression zeigte signifikant ( $p=0,013$ ) größere Werte bei den Tumoren mit epitheloider Morphologie (25,57 [ $\pm 12,79$ ]) an als bei Tumoren mit spindelzelliger Morphologie (17,03 [ $\pm 13,18$ ]).



**Abb. 3.3.4-2: Box-Plot-Darstellung der *PDGFRA*-Expression in den morphologisch-unterschiedlichen Tumoren.**

Die *cyt-AKT-1*-Expression wies eine signifikante Korrelation zwischen Tumoren mit spindelzelliger und gemischter Morphologie auf. In spindelzelligen Tumoren (8,325 [ $\pm 6,052$ ])

war die *cyt-AKT-1*-Expression signifikant ( $p=0,020$ ) größer als in gemischten Tumoren ( $5,932 [\pm 3,759]$ ).

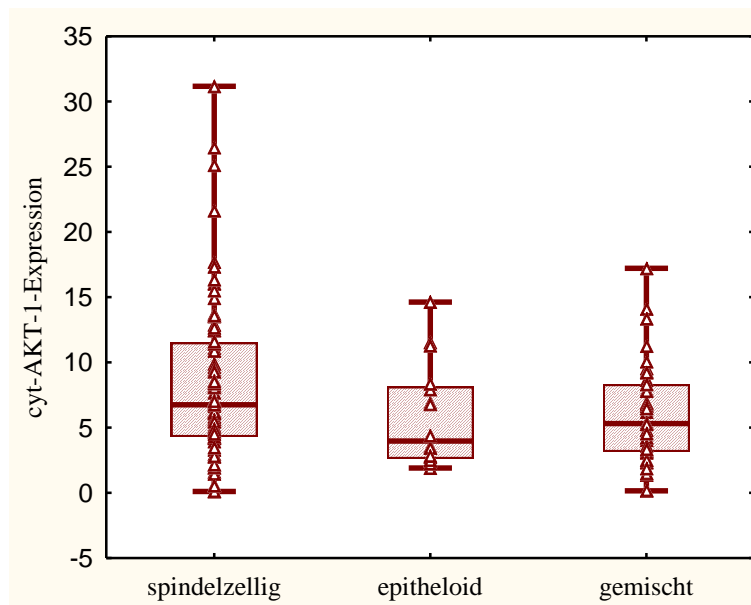


Abb. 3.3.4-3: Box-Plot-Darstellung der *cyt-AKT-1*-Expression in den morphologisch-unterschiedlichen Tumoren.

Bei gemischten Tumoren zeigte die *FAK*-Expression in GIST mit gemischter Morphologie ( $6,300 [\pm 4,843]$ ) signifikant ( $p=0,030$ ) höhere Werte als in GIST mit spindelzelliger Morphologie ( $4,601 [\pm 3,526]$ ).

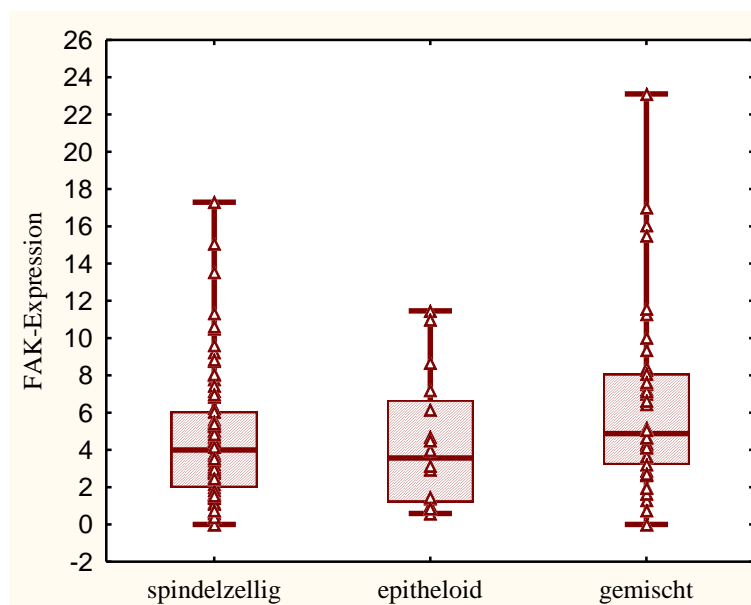


Abb. 3.3.4-4: Box-Plot-Darstellung der *FAK*-Expression in den morphologisch-unterschiedlichen Tumoren.

### 3.3.5 Vergleich zwischen Mutationsstatus und Morphologie

Unter Berücksichtigung des *KIT*-Mutationsstatus und der Morphologie ergaben sich beim Vergleich zu den untersuchten Antikörper-Expressionen Ergebnisse für den *KIT*-, den *PDGFRA*- und den *phospho-PKC-α*-Antikörper.

Die *KIT*-Expression zeigte sich signifikant ( $p=0,0064$ ) erhöht in den *KIT*-mutierten Tumoren mit spindelzelliger Morphologie (32,25 [ $\pm 13,54$ ]) gegenüber den *PDGFRA*-mutierten Tumoren mit spindelzelliger Morphologie (9,871 [ $\pm 10,05$ ]).

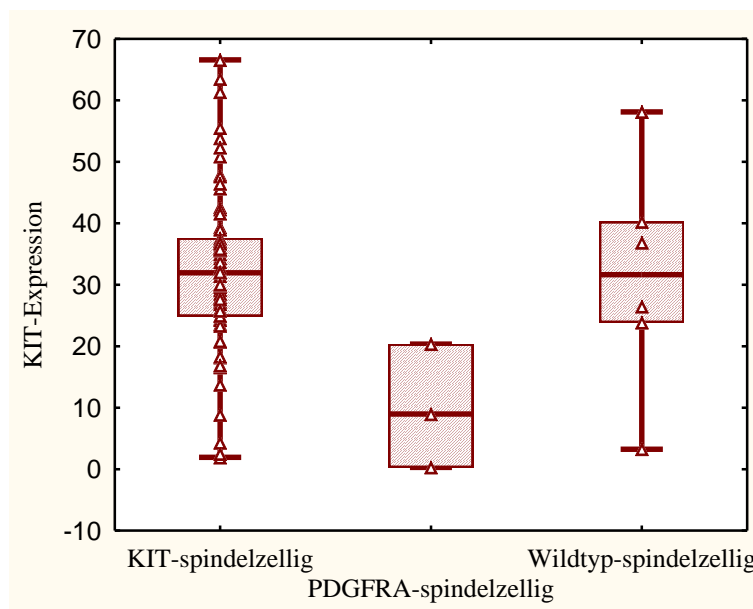
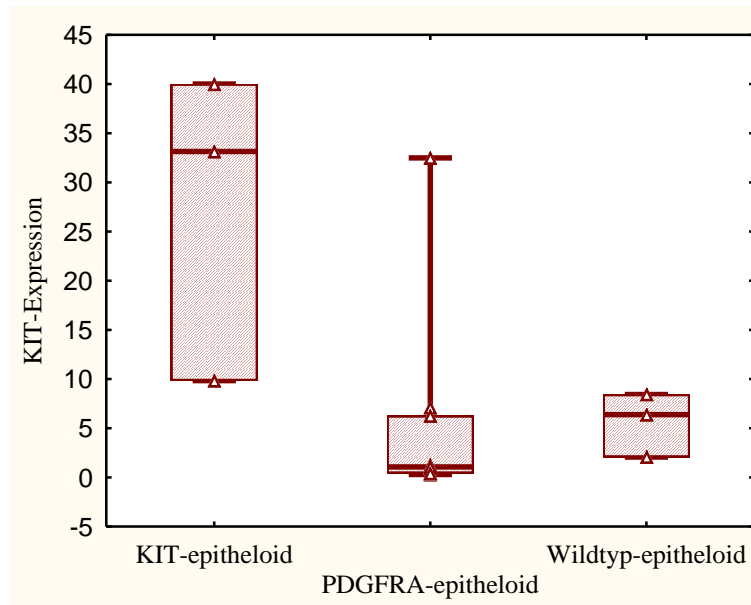


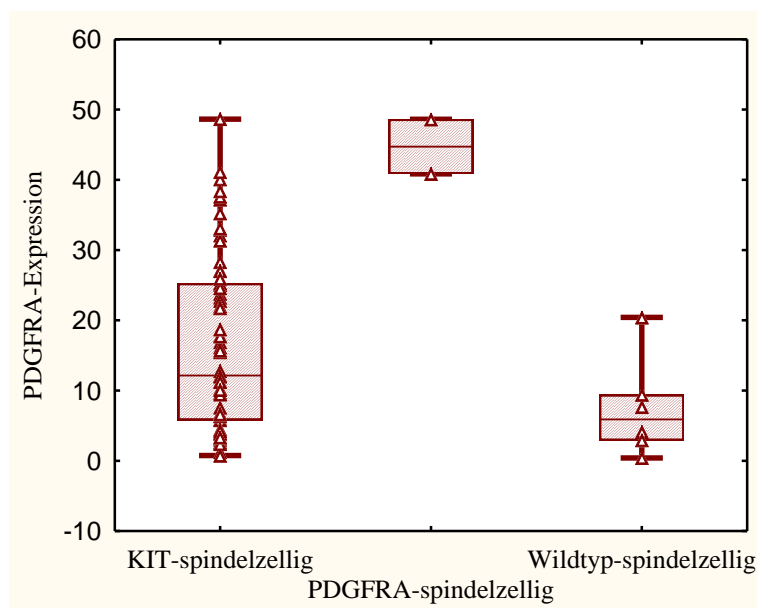
Abb. 3.3.5-1: Box-Plot-Darstellung der *KIT*-Expression in spindelzelligen *KIT*-, *PDGFRA*- und Wildtyp-mutierten Tumoren.

Außerdem war die *KIT*-Expression signifikant ( $p=0,018$ ) erhöht bei den epitheloiden Tumoren mit *KIT*-Mutation (27,66 [ $\pm 15,81$ ]) im Vergleich zu den epitheloiden Tumoren mit *PDGFRA*-Mutation (5,583 [ $\pm 10,42$ ]).



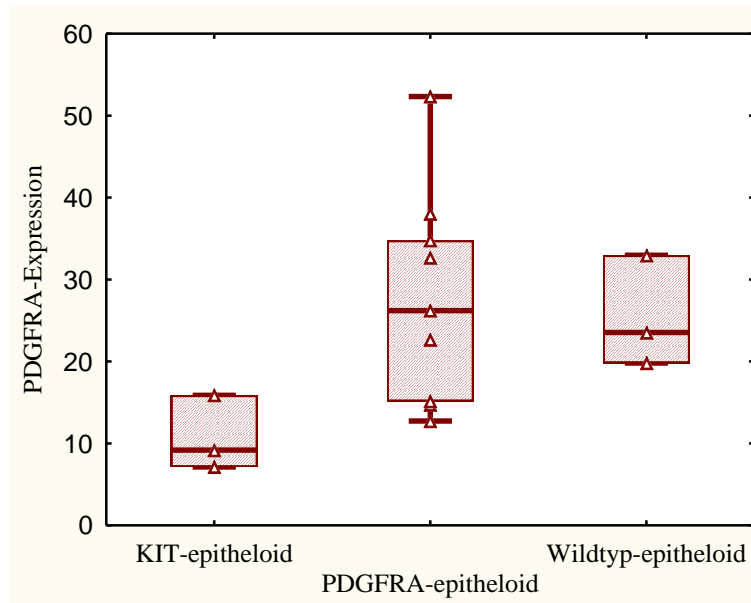
**Abb. 3.3.5-2:** Box-Plot-Darstellung der *KIT*-Expression in epitheloiden *KIT*-, *PDGFRA*- und Wildtyp-mutierten Tumoren.

Die *PDGFRA*-Expression ergab eine signifikante ( $p=0,0020$ ) Korrelation zwischen den *KIT*-mutierten spindelzelligen Tumoren ( $16,38 [\pm 12,35]$ ) und den *PDGFRA*-mutierten Tumoren mit spindelzelliger Morphologie ( $44,74 [\pm 5,50]$ ), wobei letztere sich durchschnittlich deutlich größer darstellten.



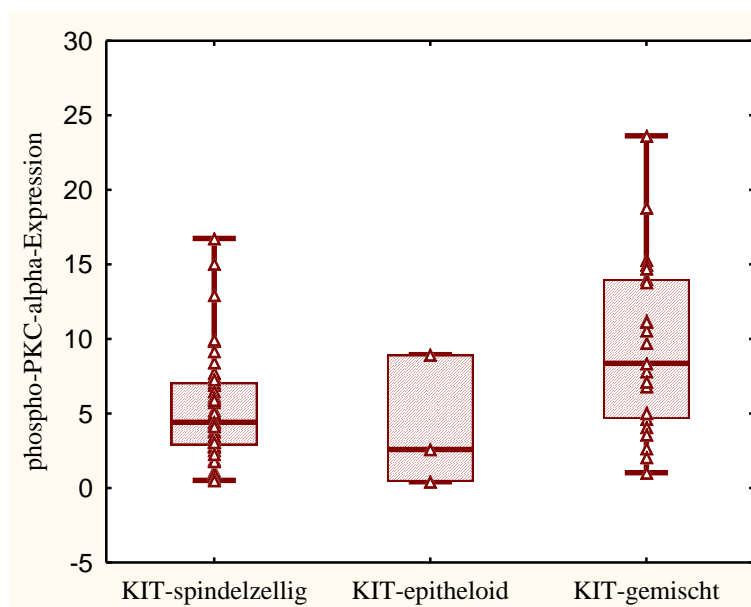
**Abb. 3.3.5-3:** Box-Plot-Darstellung der *PDGFRA*-Expression in spindelzelligen *KIT*-, *PDGFRA*- und Wildtyp-mutierten Tumoren.

Des Weiteren konnte ein signifikanter ( $p=0,036$ ) Unterschied bei den epitheloiden Tumoren festgestellt werden. Die *PDGFRA*-Expression der epitheloiden Wildtyp-mutierten GIST ( $25,44 [\pm 6,778]$ ) war deutlich höher als bei den epitheloiden *KIT*-mutierten GIST ( $10,73 [\pm 4,568]$ ).



**Abb. 3.3.5-4:** Box-Plot-Darstellung der *PDGFRA*-Expression in epitheloiden *KIT*-, *PDGFRA*- und Wildtyp-mutierten Tumoren.

Innerhalb der *KIT*-mutierten GIST zeigte die *phospho-PKC- $\alpha$* -Expression bei den gemischten Tumoren ( $9,398 [\pm 5,806]$ ) signifikant ( $p=0,019$ ) höhere Werte an als bei den spindelzelligen Tumoren ( $5,902 [\pm 5,676]$ ).



**Abb. 3.3.5-5:** Box-Plot-Darstellung der *phospho-PKC- $\alpha$* -Expression in *KIT*-mutierten GIST mit unterschiedlicher Morphologie.

### 3.3.6 Tumorgröße

Teilte man das untersuchte Kollektiv in eine Gruppe mit GIST größer bzw. kleiner 5 cm ein, ergab sich eine signifikante ( $p=0,023$ ) Korrelation für die *phospho-LYN*-Antikörper-Expression. Die Gruppe mit den Tumoren größer als 5 cm ( $4,896 [\pm 4,493]$ ) wies eine höhere Expression auf als die GIST, die kleiner als fünf cm waren ( $3,533 [\pm 2,590]$ ).

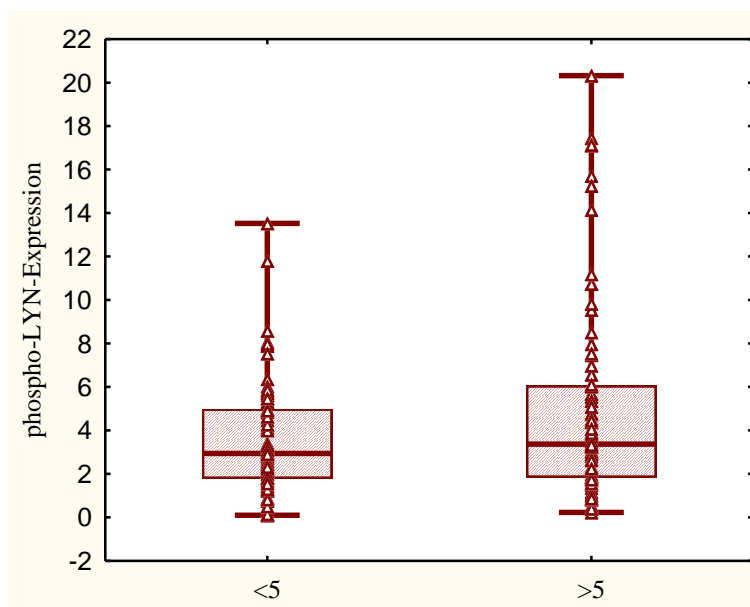


Abb. 3.3.6-1: Box-Plot-Darstellung der *phospho-LYN*-Expression in Tumoren kleiner und größer als 5 cm.

### 3.3.7 Mitosenanzahl

Bei einem Vergleich der Mitosenanzahl, eingeteilt in eine Gruppe mit mehr und weniger als 5 Mitosen/ 50 HPF, zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der *cyt-AKT-1*-Antikörper-Expression. In der Gruppe mit weniger als 5 Mitosen/ 50 HPF ( $7,961 [\pm 5,910]$ ) war die *cyt-AKT-1*-Expression signifikant ( $p=0,043$ ) höher als in der Gruppe von GIST mit mehr als 5 Mitosen/ 50 HPF ( $6,044 [\pm 3,754]$ ).

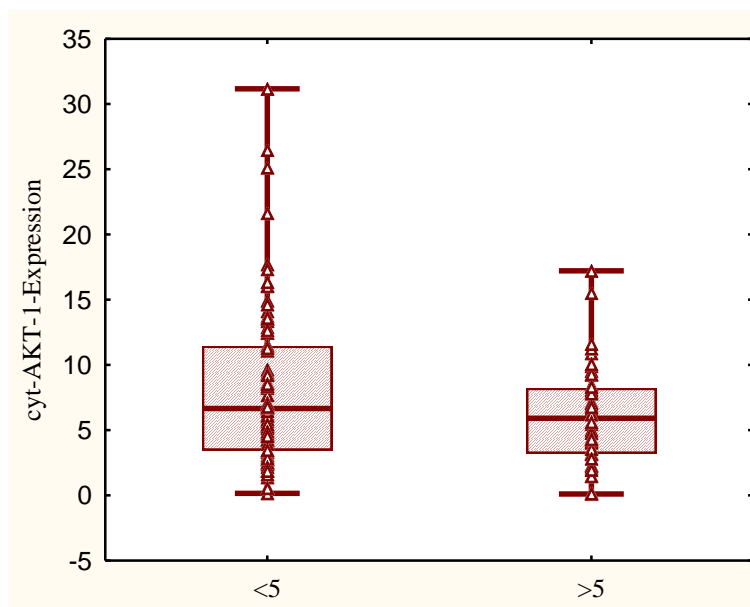


Abb. 3.3.7-1: Box-Plot-Darstellung der *cyt-AKT-1*-Expression in den Gruppen  $</> 5$  Mitosen / 50 HPF.

## 3.4 Klinischer Verlauf

### 3.4.1 Klinisch-pathologische Parameter

#### 3.4.1.1 Anatomische Lokalisation

Die anatomische Lokalisation des Tumors zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit der Patienten. GIST des Magens wiesen eine deutlich längere tumorfreie Überlebenszeit als GIST des Dünndarms (Log-Rang-Test:  $p=0,00098$ ) sowie des Extraintestiniums (Log-Rang-Test:  $p=0,00067$ ) auf. (Abbildung 3.4.1.1-1)



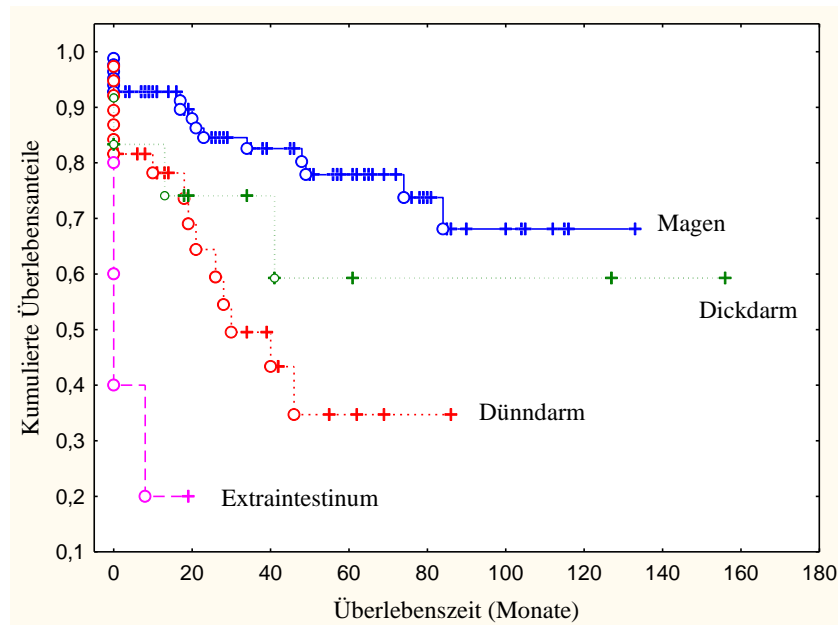


Abb. 3.4.1.1-1: Kaplan-Meier-Kurve der anatomisch unterschiedlich lokalisierten GIST.

### 3.4.1.2 Tumorgröße

Die Gesamtüberlebenszeit war signifikant mit der Tumorgröße assoziiert (Log-Rang-Test:  $p=0,0000$ ). GIST, die kleiner als fünf Zentimeter waren, zeigten hierbei ein deutlich längeres tumorfreies Überleben. (siehe Abbildung 3.4.1.2-1)

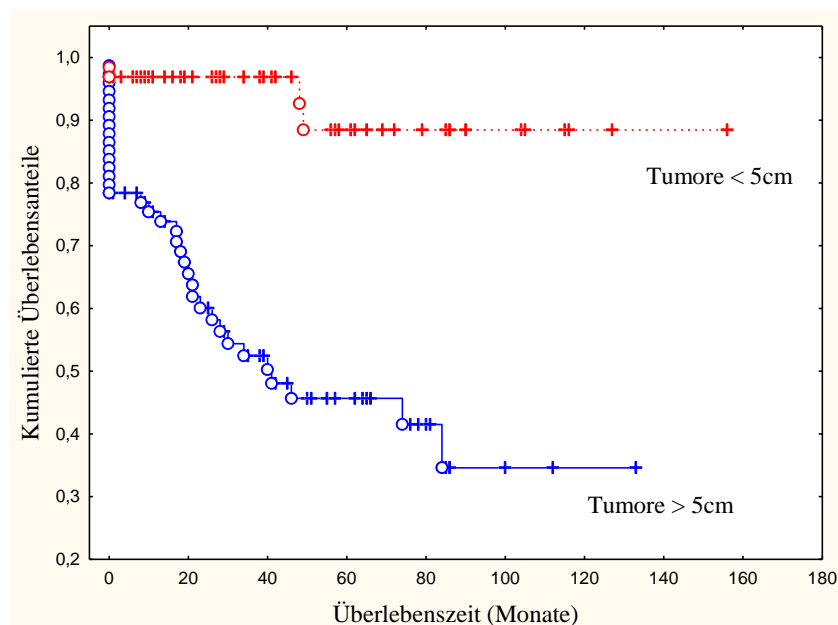


Abb. 3.4.1.2-1: Kaplan-Meier-Kurve der beiden Tumorgröße-Gruppen < / > 5 cm.

### 3.4.1.3 Mitosenanzahl

Die Mitosenanzahl/ 50 HPF hatte einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit (Log-Rang-Test,  $p=0,0000$ ). Die Patienten mit einem GIST mit weniger als 5 Mitosen/ 50 HPF, zeigten eine höhere kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit als die Patienten mit einem GIST mit mehr als 5 Mitosen/ 50 HPF. (Abbildung 3.4.4-1)

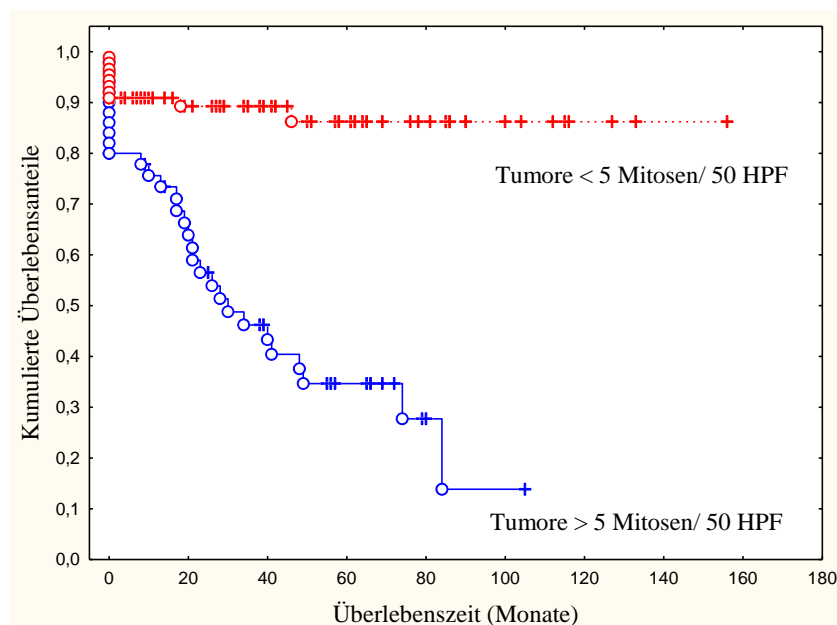


Abb. 3.4.1.3-1: Kaplan-Meier-Kurve der Mitosezahl-Gruppen  $< / > 5/ 50$  HPF.

### 3.4.1.4 Morphologie

Das tumorfreie Überleben in Abhängigkeit von der Morphologie zeigte bei epitheloiden Tumoren ein längeres tumorfreies Überleben als bei spindelzelligen und gemischten Tumoren. Zwischen spindelzelligen und gemischten Tumoren konnte eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden (Log-Rang-Test:  $p=0,039$ ).

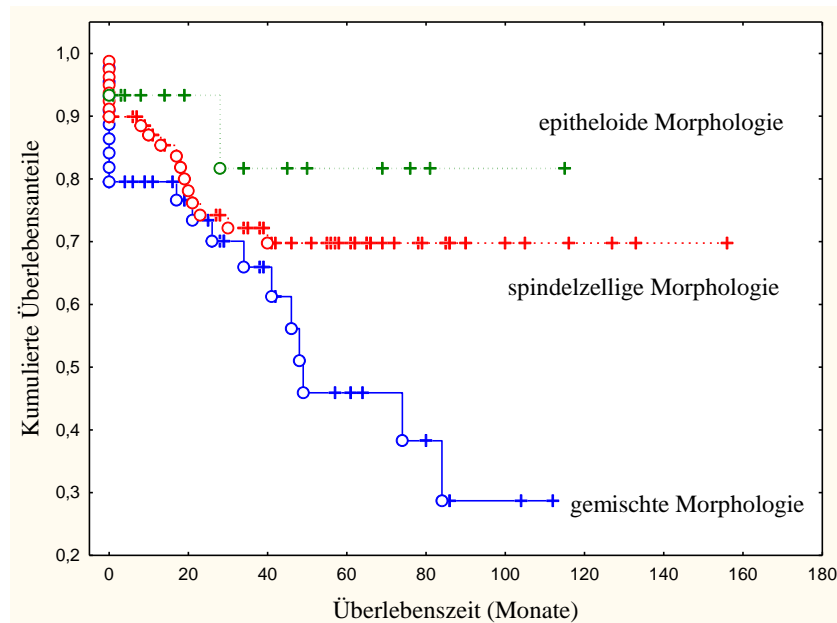


Abb. 3.4.1.4-1: Kaplan-Meier-Kurve der morphologisch-unterschiedlichen Tumoren.

### 3.4.1.5 Mutationsstatus

Bei Betrachtung des Mutationsstatus und der kumulierten Überlebenswahrscheinlichkeit ergab sich die Tendenz eines deutlich schlechteren Überlebens bei Patienten mit einer *KIT*-Mutation sowohl gegenüber den *PDGFRA*-mutierten (Log-Rang-Test:  $p=0,077$ ) als auch gegenüber den Wildtyp-mutierten GIST (Log-Rang-Test:  $p=0,084$ ).

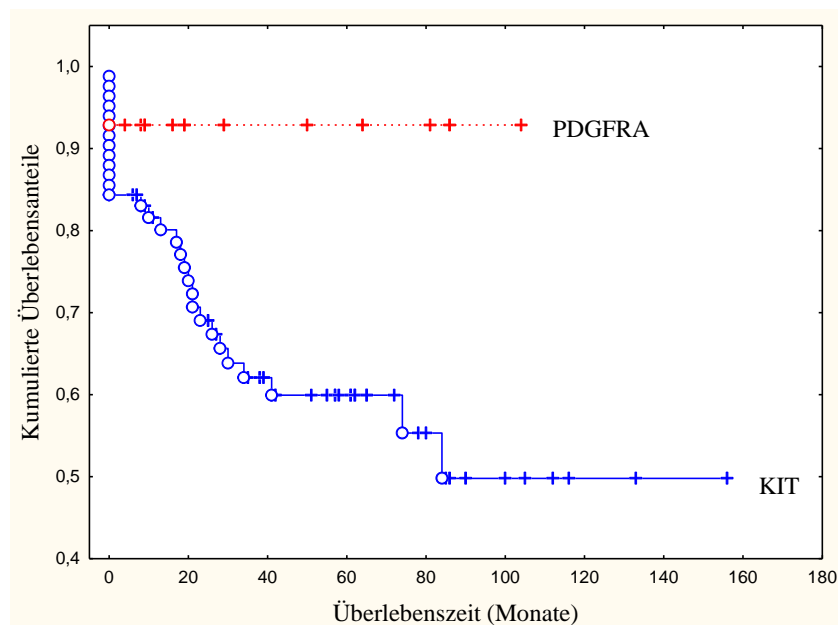


Abb. 3.4.1.5-1: Kaplan-Meier-Kurve der *KIT*- und *PDGFRA*-mutierten GIST.

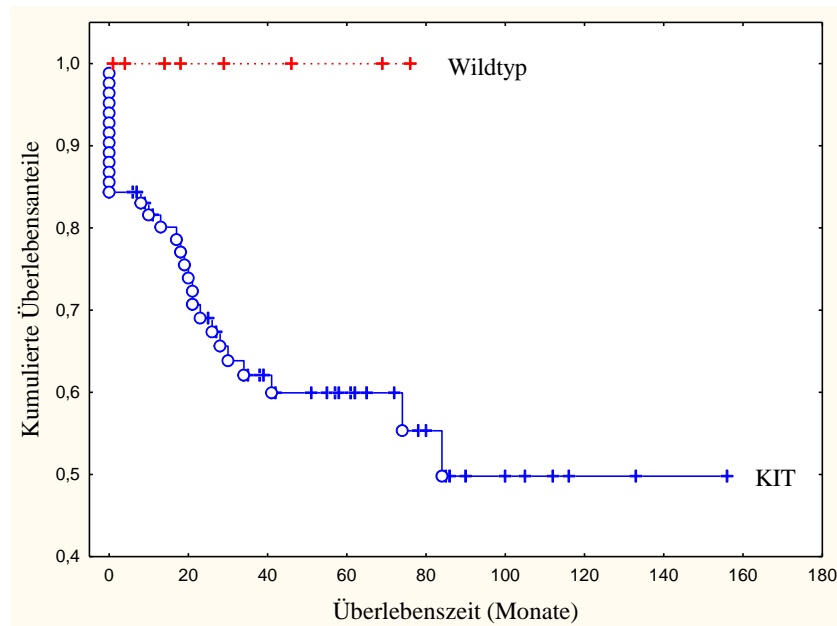


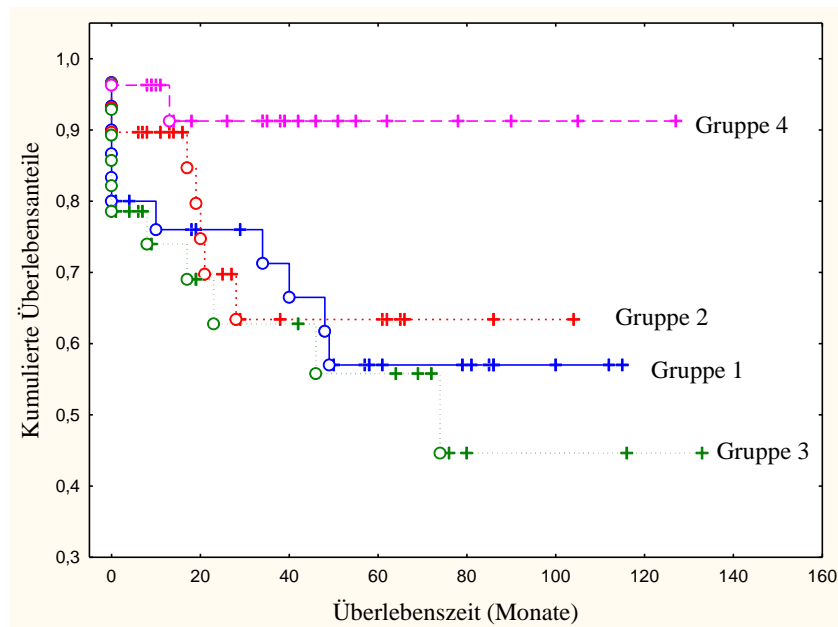
Abb. 3.4.1.5-2: Kaplan-Meier-Kurve der *KIT*- und Wildtyp-mutierten GIST.

### 3.4.2 Antikörperexpression

Im Folgenden wurden nur die signifikant-erscheinenden Ergebnisse des Vergleiches der Expression der untersuchten Signalproteine und dem tumorfreien Überleben dargestellt. Insgesamt wurden folgende Signalproteine untersucht: *KIT*, *PDGFRA*, *SCF*, *PKC-alpha*, *phospho-PKC-alpha*, *SRC*, *phospho-LYN*, *CRKL*, *AKT-1*, *phospho-AKT-1*, *ERK-2*, *FAK*, *PYK-2*, *cyt-PP2A*. Des Weiteren wurden die Expressionen eines jeden Proteins aufsteigend in vier gleich große Gruppen unterteilt, um so differenzierter den klinischen Verlauf darstellen zu können.

#### 3.4.2.1 AKT-1

Die *AKT-1*-Expression im Zusammenhang mit dem tumorfreien Überleben zeigte, dass die GIST mit einem hohen Expressionsanteil (Gruppe 4) ein signifikant längeres, tumorfreies Überleben gewährleisten als Tumore mit einem sehr kleinen Expressionsanteil (Gruppe 1) (Log-Rang-Test:  $p=0,026$ ) oder einem mittleren Expressionsanteil (Gruppe 3) (Log-Rang-Test:  $p=0,0076$ ). (siehe Abbildung 3.4.2.1-1)



3.4.2.1-1: Kaplan-Meier-Kurve der vier *AKT-1*-Gruppen.

### 3.4.2.2 phospho-AKT-1

Ein signifikant längeres Überleben war bei einem hohen *phospho-AKT-1*-Expressionsanteil der vierten Gruppe im Vergleich zu einem sehr kleinen (Gruppe 1) (Log-Rang-Test:  $p=0,042$ ) und einem mittleren (Gruppe 3) (Log-Rang-Test:  $p=0,031$ ) Expressionsanteil auszumachen. (Abbildung 3.4.2.4.)

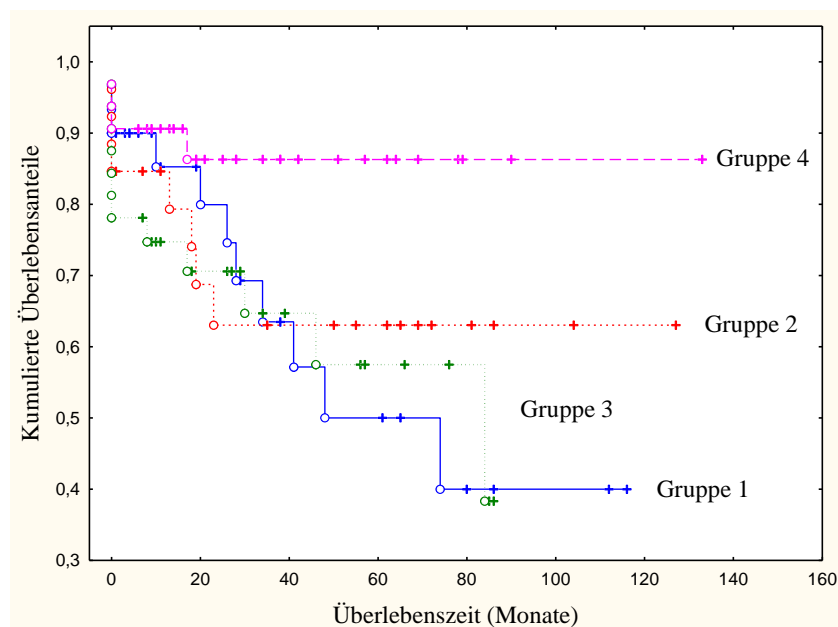


Abb. 3.4.2.2-1: Kaplan-Meier-Kurve der vier *phospho-AKT-1*-Gruppen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einordnung und Vergleich des untersuchten Tumorkollektivs

Das aus 167 GIST bestehende Göttinger Tumorkollektiv zeigte bei der Alters- und Geschlechtsverteilung zum Zeitpunkt der Operation ein mittleres Alter von 67,2 Jahren ( $\pm 12,8$  Jahre) bei Frauen und von 64,6 Jahren ( $\pm 11,5$  Jahre) bei männlichen Patienten. Anteilig waren 89 Patienten männlich (53%) und 78 Patienten weiblich (47%). Vergleicht man diese Werte mit weiteren Studien, im Folgenden am Beispiel von populationsbasierten Studien aus Westschweden (Nilsson et al. 2005), Island (Tryggvason et al. 2005) und Nordnorwegen (Steigen et al. 2007) geschehen (siehe Tabelle 4.1-1), ergaben sich im Hinblick auf das Durchschnittsalter keine besonderen Auffälligkeiten. Während das Patientenkollektiv aus Westschweden mit einem Durchschnittsalter von 69 Jahren relativ alt und das Kollektiv aus Nordnorwegen mit 64,8 Jahren relative jung erscheint, liegt das Göttinger Kollektiv mit 65,8 Jahren zusammen mit dem Isländischen Kollektiv mit ebenfalls 65,8 Jahren im mittleren Bereich. Bei der geschlechtsspezifischen Altersverteilung zeigten sich jedoch erste Unterschiede zur populationsbasierten Studie von Steigen et al. (2007) aus Nordnorwegen. Obgleich das Alter der weiblichen Patienten im Göttinger Patientenkollektiv deutlich über dem der männlichen liegt, sind in Nordnorwegen die männlichen Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sogar mit 64,9 Jahren geringfügig älter als die weiblichen Patienten mit 64,6 Jahren (Steigen et al. 2007) (siehe Tabelle 4.1-1).

Vergleicht man weiter die anatomische Lokalisation der GIST in den untersuchten 167 Tumoren, befanden sich 101 Tumore im Magen (60,5%), 47 Tumore im Dünndarm (28,1%), 13 Tumore im Dickdarm (7,8%) und 6 GIST im extraintestinalen Raum (3,6%). Es ergab sich auch trotz unterschiedlicher Fallzahlen eine sehr ähnliche relative Verteilung in den anderen GIST-Kollektiven. Bei der durchschnittlichen Tumorgröße, die im eigenen Kollektiv 6,78 cm ( $\pm 5,19$  cm) betrug, lag man hingegen im oberen Bereich verglichen mit der populationsbasierten Studie aus Island (Tryggvason et al. 2005) mit 4,6 cm und der norwegischen Studie (Steigen et al. 2007) mit 5,2 cm Durchschnittsgröße. Bei der Mitosenanzahl, die bei 109 Tumoren (65%)  $<5/50$  HPFs und bei 58 Tumoren  $>5/50$  HPFs war, zeigte sich ebenfalls ein Unterschied zum nordnorwegischen Kollektiv von Steigen et al.

(2007), das mit 80%igem relativen Anteil im Verhältnis deutlich mehr Fälle mit Mitosezahlen <5/50 HPFs vorwies.

Morphologisch präsentierten sich 98 GIST als spindelzellig (58,7%), 20 als epitheloid (12,0%) und 49 als gemischt spindelzellig-epitheloid (29,3%). Hierbei ließ sich ein deutlicher Unterschied zum isländischen Kollektiv von Tryggvason et al. (2005) darlegen, das eine spindelzellige Morphologie bei 84,2% der GIST veranschlagte. Diese Abweichung lässt sich vermutlich auch durch die relativ kleine Fallzahl der Studie (n= 57) begrifflich machen. Beim Mutationsstatus boten sich 96 GIST als *KIT*-Mutation (73,8%), 21 als *PDGFRA*-Mutation (16,2%) und 13 als Wildtyp-Mutation (10 %) dar. Hierbei ergaben sich erneut Unterschiede zum norwegischen GIST-Kollektiv von Steigen et al. (2007), das anteilig mehr Wildtyp-Mutationen [n= 13 (14,6%)] als *PDGFRA*-Mutationen [n=9 (10,1%)] vorwies.

Ordnet man die untersuchten Tumore in die Risikoklassifikation nach Fletcher (Fletcher et al. 2002) ein, fanden sich 20 Tumore mit sehr niedrigem (12,0%), 44 Tumore mit niedrigem (26,3%), 42 Tumore mit mittlerem (25,2%) und 61 GIST mit hohem Risiko (36,5%). Verglichen mit den Tumorkollektiven aus Westschweden und Island zeigt sich hierbei deutlich die Tendenz zu einem höheren Risiko im Göttinger Kollektiv (siehe Tabelle 4.1-1). Während bei der relativen Verteilung der größte Anteil der Patienten in Westschweden (33,5%) (Nilsson et al. 2005) und Island (31,6%) (Tryggvason et al. 2005) mit der Gruppe des niedrigen Risikos assoziiert ist, ist in dem Göttinger GIST-Kollektiv der größte Anteil in der Hochrisiko-Gruppe (36,5%) zu finden.

Von den 139 Patienten, bei denen Daten über einen eventuellen Progress und die tumorfreie Überlebenszeit vorlagen, kam bei 99 Patienten bisher kein Progress vor und die mittlere tumorfreie Überlebenszeit betrug 42,5 ( $\pm 36,1$ ) Monate. 40 Patienten erlitten einen Progress und die tumorfreie Überlebenszeit betrug im Mittel 17,2 ( $\pm 21,3$ ) Monate. Im isländischen Kollektiv erlitten nur 14% einen Progress und die mittlere tumorfreie Überlebenszeit machte bei diesem Anteil 26,4 Monate aus und war damit deutlich länger (Tryggvason et al. 2005). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in dieser Studie das Follow-up nur über einen Zeitraum von 3,4 Jahren dargestellt war. Das westschwedische Tumorkollektiv wurde hingegen über einen deutlich längeren Zeitraum beobachtet (129 Monate) und bestätigt auch zusätzlich mit seiner großen Fallzahl bei einem Progressanteil von nur 15% (Nilsson et al. 2005) die Annahme einer deutlich höheren Progressrate im Göttinger Patientenkollektiv.

Ursächlich für die hohe Anzahl an Hochrisiko-Patienten und der damit verbundenen hohen Progressrate im Göttinger Kollektiv lässt sich vermutlich der gewählte Vergleich mit populationsbasierten Studien anführen, die auch im Zuge der Inzidenzbestimmung ein größeres Profil an pathologisch gutartigen GIST aufnahmen.

Insgesamt zeigte sich jedoch das Göttinger Tumorkollektiv besonders im Hinblick auf die relative Verteilung der anatomischen Lokalisationen, der unterschiedlichen Mutationstypen, sowie einiger weiterer klinisch-pathologischer Parameter als ein mit weiteren Studien gut vergleichbares GIST-Patientenkollektiv. Dies stellt eine notwendige Bedingung für weiterführende Überlegungen und Untersuchungen unter Berücksichtigung einer möglichen allgemeingültigen Übertragung dar.

	<b>Göttingen (n=167)</b>	<b>Westschweden (Nilsson et al. 2005) (n= 288)</b>	<b>Island (Tryggvason et al. 2005) (n= 57)</b>	<b>Nordnorwegen (Steigen et al. 2007) (n= 89)</b>
Alter (in Jahren):	65,8 Jahre	69 Jahre	65,8 Jahre	64,8 Jahre
-Männlich	64,6 Jahre	k.A	k.A	64,9 Jahre
-Weiblich	67,2 Jahre	k.A	k.A	64,6 Jahre
<b>Geschlecht</b>				
-Männlich	n= 89 (53%)	n= 144 (50%)	n= 33 (57,9%)	n= 50 (56,2%)
-Weiblich	n= 78 (47%)	n= 144 (50%)	n= 24 (42,1%)	n= 39 (43,8%)
<b>Lokalisation</b>				
- Magen	n= 101 (60%)	n= 170 (59%)	n= 35 (61,4%)	n= 32 (59,5%)
-Dünndarm	n= 47 (28%)	n= 97 (34%)	n= 17 (29,8%)	n= 23 (25,8%)
-Dickdarm	n= 13 (8%)	n= 18 (6%)	n= 3 (5,3%)	k.A
-Extraintestinal	n= 6 (4%)	n= 3 (1%)	n= 2 (2,5%)	k.A
mittl. Tumorgroße in cm (Größenbereich)	6,8 (0,7 – 30)	7,0 (0,5 – 35)	4,6 (0,4 – 20)	5,2 (0,2 – 30)
<b>Mitosenanzahl</b>				
<5/50 HPF	n= 109 (65%)	k.A	k.A	n= 71 (80%)
>5/50 HPF	n= 58 (35%)	k.A	k.A	n= 18 (20%)
<b>Morphologie</b>				
-spindelzellig	n= 98 (58,7%)	k.A	n= 48 (84,2%)	k.A



<i>-epitheloid</i>	n= 20 (12,0%)	k.A	n= 5 (8,8%)	k.A
<i>-gemischt</i>	n= 49 (29,3%)	k.A	n= 4 (7%)	k.A
Mutationsstatus	*			
<i>-KIT</i>	n= 96 (73,8%)	k.A	k.A	n= 67 (75,3%)
<i>-PDGFRA</i>	n= 21 (16,2%)	k.A	k.A	n= 9 (10,1%)
<i>- Wildtyp</i>	n= 13 (10%)	k.A	k.A	n=13 (14,6%)
Risikoklassifikation				
nach Fletcher:				
<i>-sehr niedriges Risiko</i>	n= 20 (12,0%)	n=48 (16,5%)	n= 13 (22,8%)	k.A
<i>-niedriges Risiko</i>	n= 44 (26,3%)	n=96 (33,5%)	n= 18 (31,6%)	k.A
<i>-mittleres Risiko</i>	n= 42 (25,2%)	n=55 (19%)	n= 10 (17,5%)	k.A
<i>-hohes Risiko</i>	n= 61 (36,5%)	n=70 (31 %)	n= 16 (28,1%)	k.A
Progress	**	***		
<i>-kein Progress</i>	n= 99	n= 221	n= 49	k.A
<i>-mittlere tumorfrei</i>	42,5 Monate	k.A	42 Monate	k.A
Überlebenszeit				
<i>-Progress</i>	n= 40	n= 38	n= 8	k.A
<i>-mittlere tumorfrei</i>	17,2 Monate	k.A	26,4 Monate	k.A
Überlebenszeit				

**Tab. 4.1-1: Vergleich des untersuchten GIST-Kollektivs mit populationsbasierten Studien aus Westschweden, Island und Nordnorwegen. k.A. (keine Angabe); \*(Mutationsstatus bei 137 Patienten bestimmt); \*\* (klinisches Follow-up bei 139 Patienten beobachtet); \*\*\* (klinisches Follow-up bei 259 Patienten beobachtet)**

## 4.2 Bedeutung der klinisch-pathologischen Parameter

### 4.2.1 Mutationsstatus

Es zeigten sich unter Berücksichtigung der anatomischen Lokalisation signifikante Korrelationen hinsichtlich des Mutationsstatus. Es waren signifikant mehr *KIT*-mutierte Tumore im Magen (53,1%) als im Dünndarm (33,3%) sowie signifikant mehr *PDGFRA*-mutierte GIST im Magen (95,2%) als im Dünndarm (0%) vorzuweisen. Gleiches präsentierte sich bei der Verteilung zwischen *PDGFRA*- und Wildtypmutationen hinsichtlich einer Magen- oder Dünndarmlokalisation, wobei im Dünndarm signifikant seltener eine Wildtypvariante (38,5%) oder eine *PDGFRA*-Mutation (0%) vorzufinden war als im Magen,

in dem ein Großteil der Wildtypmutationen (61,5%) und bis auf einen extraintestinalen Fall sämtliche *PDGFRA*-mutierten GIST (95,2%) vorkamen. Diese Beobachtungen besitzen eine große Übereinstimmung mit den bisher publizierten Verteilungsmustern großer Studien. In einer der größten Studien über GIST mit einer Dünndarmlokalisation (Miettinen et al. 2006) konnte bei einem Kollektiv von 145 intestinalen GISTs keine gängige *PDGFRA*-Mutation in den Exonen 18 und 12 nachgewiesen werden. Es sind zwar einige seltene Fälle von intestinalen *PDGFRA*-Mutationen beschrieben (Corless et al. 2005), stellen diese dennoch eine Rarität dar und es lässt sich auch mit den selbst erhobenen Ergebnissen eine eindeutige Zuordnung von *PDGFRA*-mutierten Tumoren und einer gastralen Lokalisation herstellen. *KIT*-mutierte Tumore zeigten in weiteren Studien ebenfalls ein zu den eigenen Ergebnissen ähnlich beschriebenes Verteilungsmuster (Haller et al. 2007; Miettinen et al. 2006; Miettinen et al. 2005). Die nachgewiesenen signifikanten Korrelationen bezüglich eines Auftretens im extraintestinalen Raums und einer Dünndarmlokalisation wurden aufgrund der geringen Fallzahl im Extraintestinum (n= 5) als nicht aussagekräftig eingestuft.

Im Hinblick auf die Tumorgöße ließ sich keine signifikante Korrelation zwischen den unterschiedlichen Mutationstypen errechnen. Es war jedoch ein eindeutiger Zusammenhang von im Mittel größeren Tumoren und einem *KIT*-Mutationsstatus nachvollziehbar. Die Mittelwerte betragen für die *KIT*-mutierten GIST 7,50 ( $\pm$  5,62) cm, für die *PDGFRA*-mutierten Tumore 5,87 ( $\pm$  3,59) cm und für die Wildtyp-mutierten GIST 5,14 ( $\pm$  2,99) cm. Bei der Mitosenanzahl wurde ebenfalls statistisch keine Signifikanz erkennbar. Es zeigte sich jedoch eine deutliche Tendenz zu einer im Mittelwert ansteigenden Mitosenanzahl bei *KIT*-mutierten (20,77 ( $\pm$  34,92) / 50 HPF) Tumoren im Gegensatz zu den *PDGFRA*-mutierten (7,10 ( $\pm$  16,85) / 50 HPFs) und Wildtyp-mutierten (3,92 ( $\pm$  10,29) / 50 HPF) GIST. Diese Ergebnisse einer größeren mittleren Mitosenanzahl und Tumorgöße bei *KIT*-mutierten Tumoren finden sich auch in anderen Studien wieder (Lasota et al. 2004; Miettinen et al. 2006; Miettinen et al. 2005; Steigen et al. 2007).

Vergleicht man den Mutationsstatus mit den morphologischen Kriterien, so wiesen *KIT*-mutierte GIST signifikant häufiger eine spindelzellige Morphologie (68,8%) auf, wohingegen *PDGFRA*-mutierte GIST signifikant mit einer epitheloiden (42,9%) oder gemischten (42,9%) Morphologie assoziiert waren. Wildtyp-mutierte Tumoren zeigten eine Tendenz zur spindelzelligen Morphologie (46,2%), waren jedoch auch relativ häufig von epitheloider (23,0%) oder gemischter (30,8%) Morphologie. Verglichen mit weiteren Studien ergaben sich

viele Gemeinsamkeiten vor allem bezüglich der klaren Zuordnung der *KIT*-mutierten GIST zu einer spindelzelligen Morphologie (Steigen et al. 2007; Tryggvason et al. 2005). Es wurde jedoch auch eine selbige Zuordnung von *PDGFRA*-mutierten Tumoren zu einer epitheloiden Morphologie in früheren Studien postuliert (Miettinen und Lasota 2006; Steigen et al. 2007; Tryggvason et al. 2005), die sich jedoch aufgrund der hohen Zahl an Tumoren mit gemischter Morphologie im untersuchten Kollektiv nicht eindeutig darstellen ließ.

Betrachtet man den klinischen Verlauf der einzelnen Mutationstypen, wurde die Tendenz einer eindeutig besseren Prognose für die *PDGFRA*- und Wildtyp-mutierte GIST im Gegensatz zu den *KIT*-mutierten Tumoren deutlich. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse ergibt sich zusammenfassend die Schlussfolgerung, dass die *KIT*-mutierten, vorrangig von spindelzelliger Morphologie, mit höheren Mitosezahlen und größerer Tumorausdehnung ausgestatteten Tumoren einen deutlich schlechteren klinischen Verlauf nehmen als die *PDGFRA*-mutierte GIST, mit ihrer epitheloid-gemischten Morphologie, den kleineren Werten für Mitosenanzahl und Tumorgröße sowie einer ausschließlich Magen-assoziierten anatomischen Lokalisation. Schwierig gestaltet es sich hingegen Aussagen über die GIST mit einer Wildtypmutation zu treffen, da sich unter anderem keine Angaben in der Literatur über die klassischen Prognosefaktoren Tumorgröße und Mitosenanzahl fanden. Diesbezüglich können nur die eigens ermittelten Werte herangezogen werden, die durch ihre niedrigen Werte gekennzeichnet waren und somit die gezeigte gute klinische Prognose untermauern. Hinsichtlich ihrer uneinheitlichen morphologischen Charakteristika und anatomischen Lokalisationen, mit einem relativ hohen Anteil von im Dünndarm vorkommenden Tumoren, erschließt sich hierbei aber eine eher kritische Betrachtungsweise.

#### 4.2.2 Lokalisation

Bei dem Vergleich der anatomischen Lokalisation in Zusammenhang mit der durchschnittlichen Tumorgröße von 6,18 ( $\pm$  4,60) cm im Magen, 7,29 ( $\pm$  5,02) cm im Dünndarm, 5,55 ( $\pm$  4,18) cm im Dickdarm und 16,17 ( $\pm$  8,75) cm im Extraintestinum zeigte sich eine signifikante Korrelation hinsichtlich der deutlich größeren extraintestinal befindlichen Tumoren. Wenngleich dies die einzig statistisch signifikante Korrelation war, ließ sich tendenziell eine aufsteigende Tumorgröße in der Reihenfolge Dickdarm, Magen und Dünndarm festhalten. Diese Reihenfolge spiegelt sich im klinischen Verlauf beziehungsweise einem möglichen Progress und der tumorfreien Überlebenszeit wieder. Das Gesamtüberleben

war hochsignifikant mit der Tumorgöße (Log-Rang-Test,  $p < 0,00001$ ) assoziiert und auch bei den einzelnen anatomischen Lokalisationen entsprach ein Vorkommen im Dünndarm oder im Extraintestinum, das mit einer großen Tumorausdehnung verbunden war, einer deutlich schlechteren Prognose. Während die Tumorgöße also einerseits als lokalisationsunabhängiger Prognoseparameter (Miettinen und Lasota 2006) bestätigt werden kann, lässt sich auch der bereits beschriebene lokalisationsabhängige Zusammenhang mit der Tumorgöße ableiten, der für GIST  $> 5\text{cm}$  aus dem Dünndarm eine schlechtere Prognose einräumt als für ebenso große Tumore des Magens (Emory et al. 1999). Es bleiben jedoch auch insbesondere für eine Lokalisation im Dickdarm fragliche Überlegungen im Hinblick auf den tendenziell besseren klinischen Verlauf gegenüber eines GIST des Dünndarms offen. Die eigenen Ergebnisse lassen eine sowohl lokalisationsabhängige als auch eine lokalisationsunabhängige Ursache vermuten. Die Tumoren zeigten sich durchschnittlich deutlich kleiner als Tumoren aus dem Magen, waren aber mit einem klinisch schlechteren Verlauf assoziiert.

Die Untersuchung der mittleren Mitosenanzahl ergab beim Magen  $12,01 (\pm 24,72) / 50$  HPF, beim Dünndarm  $17,30 (\pm 31,94) / 50$  HPF, beim Dickdarm  $34,23 (\pm 54,06) / 50$  HPF und beim Extraintestinum  $24,83 (\pm 27,58) / 50$  HPF. Aufgrund einiger sehr hoher Einzelwerte ergaben sich die hohen Durchschnittswerte und Standardabweichungen und es lassen sich infolgedessen kaum Rückschlüsse auf einen sinnvollen Zusammenhang zwischen der Mitosenanzahl und einer bestimmten anatomischen Lokalisation in dem untersuchten Kollektiv herstellen. Unter Betrachtung des klinischen Verlaufs konnte aber zumindest die lokalisationsunabhängige hochsignifikante Korrelation (Log-Rang-Test,  $p < 0,00001$ ) zwischen der kumulierten Überlebenswahrscheinlichkeit und GIST mit mehr als 5 Mitosen/ 50 HPFs nachgewiesen werden.

Bei der morphologischen Verteilung in Bezug zur anatomischen Lokalisation zeigte sich eine spindelzellige Morphologie jeweils anteilig zu 54,5% im Magen, zu 68,1% im Dünndarm, zu 69,2% im Dickdarm und zu 33,3% im Extraintestinum. Die epitheloide Morphologie war mit 14,9% im Magen, mit 6,4% im Dünndarm und mit 33,3% im extraintestinalen Raum vertreten. Im Dickdarm zeigte sich keine epitheloide Morphologie. Eine gemischt spindelzellig-epitheloide Morphologie ließ sich bei 30,7% der Magenfälle, bei 25,5% der Dünndarmfälle, bei 30,8% der Dickdarmfälle und bei 33,3% der extraintestinal vorkommenden Tumoren nachweisen. Es war weder eine statistisch signifikante Korrelation

noch eine bestimmte Tendenz beim Vergleich von Morphologie und anatomischem Vorkommen ersichtlich. Dennoch zeigte sich bei epitheloiden Tumoren ein längeres tumorfreies Überleben als bei spindelzelligen und gemischten Tumoren. Spindelzellige Tumoren bewiesen wiederum eine sogar signifikant (Log-Rang-Test:  $p=0,039$ ) bessere klinische Prognose als GIST mit gemischter Morphologie. In der Literatur finden sich dazu ungleiche Angaben. Während in einigen Studien kein Zusammenhang zwischen der Morphologie und dem statistischen Überleben gefunden wurde (Nilsson et al. 2005), präsentierte man in anderen Studien ein geringeres Malignitätsverhalten bei epitheloiden GIST (Fletcher et al. 2002; Singer et al. 2002). Dies wiederum wurde von Miettinen im Magen bestätigt (Miettinen et al. 2005), zeigte er jedoch wenige Zeit später den umgekehrten Fall im Dünndarm auf (Miettinen et al. 2006). In dieser Studie war eine epitheloide Morphologie im Dünndarm signifikant mit einem malignen Verhalten assoziiert und unterschied sich klinisch deutlich von den epitheloiden Tumoren des Magens. Es besteht der Verdacht, dass es sich bei epitheloiden und gemischten Tumoren des Dünndarms nicht um eigenständige morphologische Subtypen, sondern vielmehr um eine morphologische Manifestation einer Form der Tumorprogression handelt (Miettinen und Lasota 2006). Es wurden viele Fälle beobachtet, in denen innerhalb eines Tumors Anteile mit niedriger Zelldichte von spindelzelliger Morphologie und Anteile mit hoher Zelldichte sowie großer Mitosenanzahl von epitheloider Morphologie geprägt waren (Miettinen et al. 2006). Im Dünndarm scheint die epitheloide Morphologie somit eine maligne Transformation spindelzelliger Tumore darzustellen.

Etwa 20 - 25% aller GIST im Magen und 40 – 50 % aller GIST aus dem Dünndarm manifestieren sich im Laufe der Zeit mit einem klinisch malignen Verhalten (Miettinen und Lasota 2006). Es konnte zwar die prognostische Bedeutung der Mitosenanzahl, der Tumorgröße und auch der Morphologie nachgewiesen werden, muss dabei jedoch noch genauer differenziert werden, ob es sich in Bezug zur Lokalisation um klar lokalisationsabhängige oder lokalisationsunabhängige Parameter handelt. Zudem bedarf der intestinale Subtyp einer weiteren Differenzierung besonders in Bezug auf die deutlich unterschiedliche Prognose zwischen GIST im Dünndarm und im Dickdarm.

### 4.3 Bedeutung der Expression der untersuchten Signalproteine in Bezug auf die klinisch-pathologischen Parameter

Es hat sich gezeigt, dass für die Prognoseaussagen von GIST insbesondere die Parameter der anatomischen Lokalisation, der Mitosenanzahl und der Tumorgröße ausschlaggebend erscheinen. Bisher konnten jedoch noch nicht ausreichend die molekularbiologischen Hintergründe dieser unterschiedlichen Verhaltensweisen geklärt werden. Vor allem die neuen Zusammenhänge zwischen den Rezeptormutationstypen und der unterschiedlichen Prognose lenken den Blick auf die nachgeschalteten Signaltransduktionswege und Proteinexpressionen.

#### 4.3.1 KIT

Die quantitative *KIT*-Expression zeigte sich den Erwartungen und der Literatur (Kang et al. 2005; Subramanian et al. 2004) entsprechend signifikant ( $p < 10^{-6}$ ) erhöht in GIST mit einer *KIT*-Mutation gegenüber den *PDGFRA*- und Wildtyp-mutierten Tumoren. Des Weiteren war die *KIT*-Expression ebenfalls in Dünndarm- und Dickdarm-lokalisierten GIST im Vergleich zu einer Lokalisation im Magen ( $p=0,0041$ ) oder im Extraintestinum ( $p=0,0022$ ) gesteigert. Diese neben der mutationsabhängigen auch lokalisationsabhängigen *KIT*-Expression wurde bereits von Haller et al. beschrieben (Haller et al. 2007) und ergibt weitere Hinweise zum Verständnis der lokalisationsabhängigen klinischen Prognose von GIST, demnach die intestinal erhöhte *KIT*-Expression mit der eher klinisch malignen Prognose dieser Tumoren assoziiert ist.

Unter Berücksichtigung morphologischer Kriterien zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen einer erhöhten *KIT*-Expression und einer spindelzelligen Morphologie. Die quantitative *KIT*-Expression war in spindelzelligen Tumoren (31,72 [ $\pm 16,26$ ]) signifikant ( $p=0,036$ ) größer als in gemischten Tumoren (25,51 [ $\pm 17,30$ ]) und ebenfalls signifikant ( $p=0,00$ ) größer als in epitheloiden Tumoren (8,583 [ $\pm 12,71$ ]). Zudem wiesen die gemischten Tumoren wiederum gegenüber den epitheloiden Tumoren eine signifikant ( $p=0,00035$ ) höhere *KIT*-Expression auf. Diese Ergebnisse zeugen von großer Übereinstimmung mit den bisherigen Untersuchungen anderer Autoren (Wardelmann et al. 2002; Wasag et al. 2004) und der Zusammenhang zwischen *KIT*-Mutationen und einer spindelzelligen Morphologie kann somit auch auf Proteinebene quantitativ bestätigt werden.

### 4.3.2 PDGFRA

Die quantitative *PDGFRA*-Expression war, den Vermutungen und Literaturangaben (Haller et al. 2007; Kang et al. 2005; Subramanian et al. 2004) entsprechend, bei den *PDGFRA*-mutierten GIST signifikant gegenüber den *KIT*- ( $p=0,000076$ ) und Wildtyp- ( $p=0,00016$ ) mutierten Tumoren deutlich erhöht. Die lokalisationsabhängige, quantitative *PDGFRA*-Expression zeigte ebenfalls übereinstimmend mit den eigenen und in der Literatur beschriebenen Angaben hoher Anteile *PDGFRA*-mutierter Tumore im Magen (Corless et al. 2004; Lasota et al. 2004; Miettinen und Lasota 2006) eine signifikante Korrelation hinsichtlich dieser anatomischen Lokalisation gegenüber einer *PDGFRA*-Expression im Dünndarm ( $p=0,000003$ ) oder im Dickdarm ( $p=0,026$ ) (Haller et al. 2007). Diese vom Magen lokalisationsabhängige und mutationsunabhängige Protein-Expression wird unterstrichen von signifikant erhöhten Werten der *PDGFRA*-Expression im Magen innerhalb der Gruppe der alleinig *KIT*-mutierten ( $p=,00053$ ) oder Wildtyp-mutierten GIST ( $p=0,010$ ) gegenüber intestinalen Tumoren.

Als weitere signifikante Korrelation ergab sich der ebenfalls schon beschriebene Zusammenhang (Wardelmann et al. 2004; Wasag et al. 2004) zwischen einer *PDGFRA*-Mutation und einer epitheloiden Morphologie auch auf quantitativer Expressionsebene. Die *PDGFRA*-Expression in epitheloidzelligen GIST war gegenüber den spindelzelligen Tumoren signifikant ( $p=0,013$ ) erhöht.

### 4.3.3 CRKL

Die quantitative *CRKL*-Expression zeigte in Abhängigkeit zur anatomischen Lokalisation eine signifikante Korrelation ( $p=0,033$ ) bezüglich eines GIST-Auftretens im Dün- und Dickdarm. Die Tumoren des Dickdarms ( $5,901 [\pm 5,408]$ ) wiesen auf deutlich höhere Werte als die aus dem Dünndarm ( $3,131 [\pm 2,742]$ ) stammenden Tumoren hin. Zusätzliche ließ sich innerhalb der *KIT*-mutierten Tumoren eine quantitative Erhöhung der *CRKL*-Expression im Magen ( $5,115 [\pm 3,622]$ ) gegenüber dem Dünndarm ( $3,128 [\pm 2,960]$ ) signifikant ( $p=0,033$ ) festhalten. Dies könnte ein auf unterschiedliche Gewichtung bestimmter Signaltransduktionswege beruhender Hinweis bezüglich der lokalisationsabhängigen potenziellen Prognosen sein.

*CRKL* stellt ein regulierendes Adapterprotein dar, das gemeinsam mit dem Komplex aus Rezeptortyrosinkinase und *PI3K* einen großen Einfluss auf die nachfolgenden Signaltransduktionswege im *PI3K/AKT*-Signaltransduktionsweg hat (Birge et al. 2009; Feller 2001; Sattler et al. 1997). Bisher sind eine große Anzahl von biologischen Prozessen, von Zellproliferation, Zelladhäsion bis hin zu Apoptoseprozessen bekannt, in denen *CRKL* eine Rolle zu spielen scheint (Feller 2001). Da die quantitative *CRKL*-Expression einerseits im Dickdarm und andererseits in der Gruppe der *KIT*-mutierten GIST im Magen signifikant erhöht war, liegt die Schlussfolgerung einer auf die Prognose positiv einflussnehmenden Wirkung nahe. Es bedarf weiterer Untersuchungen, insbesondere unter Berücksichtigung der immensen Vielzahl von Wechselwirkungen von *CRKL*, um genauere Aussagen über die Wirkweise einer verstärkten *CRKL*-Expression zu treffen.

#### 4.3.4 AKT-1 und phospho-AKT-1

Die *AKT-1*-Expression stellte sich hinsichtlich der Morphologie bei den spindelzelligen (8,325 [ $\pm$ 6,052]) GIST signifikant ( $p=0,020$ ) erhöht gegenüber den prognostisch ungünstigeren, gemischten (5,932 [ $\pm$ 3,759]) GIST dar. Zudem zeigte sich bei dem Vergleich der Proteinexpression und des klassischen Prognoseparameters der Mitosenanzahl eine signifikante Korrelation bezüglich der *AKT-1*-Expression und der Gruppe der Tumoren mit weniger als 5 Mitosen/ 50 HPF (7,961 [ $\pm$ 5,910]) gegenüber den GIST mit einer Mitosenanzahl von mehr als 5 Mitosen/ 50 HPF (6,044 [ $\pm$ 3,754]). Diese Ergebnisse passen zu dem ebenfalls ermittelten Zusammenhang zwischen einer sehr hohen *AKT-1*-Expression und einem signifikant längeren tumorfreien Überleben. GIST mit einem sehr hohen Expressionsanteil (Gruppe 4) gewährleisteten ein signifikant längeres, tumorfreies Überleben als Tumore mit einem sehr kleinen Expressionsanteil (Gruppe 1) (Log-Rang-Test:  $p=0,026$ ) oder einem mittleren Expressionsanteil (Gruppe 3) (Log-Rang-Test:  $p=0,0076$ ) in dem untersuchten Tumorkollektiv.

*AKT-1* spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellproliferation und beeinflusst u.a. die Translation von Cyclin D1, einem starken Wachstums- und Proliferationssignal (Ruggero und Sonenberg 2005) und wirkt inhibierend auf das pro-apoptotisch wirkende Protein *Bad* (Blume-Jensen et al. 1998). Bisher ist *AKT-1* im Zusammenhang mit GIST in der Literatur vor allem bei Imatinib-resistenten Tumoren durch eine erhöhte Expression als Hauptziel im



*PI3K*-Signaltransduktionsweg auffällig gewesen (Bauer et al. 2007; Maleddu et al. 2009; Tarn et al. 2006). Es erscheint widersprüchlich, dass das Protoonkogen *AKT-1* bei hoher Expression zu einer signifikant besseren kumulierten Überlebenswahrscheinlichkeit führt und es muss die Vermutung weiterer bisher nicht berücksichtigter Interaktionen zwischen *AKT-1* und nachgeschalteter Proteine oder die Beeinflussung anderer Signaltransduktionswege bei sehr hoher Expression postuliert werden. Gestützt wird diese Vermutung durch die gleichwohl ermittelte sehr hohe Expression der phosphorylierten Form von *AKT-1*, die ebenfalls bei GIST mit sehr hoher *phospho-AKT-1*-Expression (Gruppe 4) signifikant mit einer höheren kumulierten Überlebenswahrscheinlichkeit gegenüber den Gruppen mit sehr kleinem (Gruppe 1) (Log-Rang-Test:  $p=0,042$ ) oder mittlerem (Gruppe 3) (Log-Rang-Test:  $p=0,031$ ) Expressionsanteil korreliert war.

#### 4.3.5 FAK

Bei GIST wies die quantitative *FAK*-Expression in GIST mit gemischter Morphologie (6,300 [ $\pm 4,843$ ]) signifikant ( $p=0,030$ ) höhere Werte auf als in GIST mit spindelzelliger Morphologie (4,601 [ $\pm 3,526$ ]). Da das morphologische Kriterium der gemischtzelligen Morphologie im untersuchten Kollektiv mit einer deutlich schlechteren kumulierten Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert war, wird das Selbige auch bezüglich der *FAK*-Expression angenommen.

*FAK* wird in der Literatur als eine oft hochregulierte Non-Receptor-Tyrosin-Kinase in einer Vielzahl maligner Geschehen angegeben und seine Überexpression geht sowohl mit einer erhöhten Progressionsrate als auch mit einer schlechteren Prognose einher (Sakurama et al. 2009). In malignen GIST konnte eine erhöhte Genexpression bereits nachgewiesen werden (Koon et al. 2004) und es wurden erste potentiell-therapeutische Strategien einer Hemmung von *FAK* in Imatinib-resistenten GIST vorgeschlagen (Sakurama et al. 2009). Es konnte aufgezeigt werden, dass das Tumorwachstum in GIST unterdrückt und die Apoptoserate der Zellen erhöht wurde, in denen die *FAK*-Aktivität mittels eines speziellen Inhibitors (TAE226), ungeachtet des Mutationstypes oder einer etwaigen Imatinib-Resistenz, supprimiert wurde (Sakurama et al. 2009). *FAK* stellt sich ebenso wie *AKT-1* in Imatinib-resistenten Tumoren als hochexprimiert dar (Sakurama et al. 2009), jedoch lässt sich aufgrund der großen Bandbreite an direkten und indirekten Interaktionen von *FAK*, u.a. mit Vertretern der *Src*-Familie, dem *PI3K/Akt*- und dem *Ras/Erk*-Signaltransduktionsweg (Schlaepfer et al.

1999; Xing et al. 1994), keine eindeutige Zuordnung bezüglich eines bestimmten Signaltransduktionswegs vornehmen. Es zeigt sich vielmehr wiederholt der Umstand eines vermutlich hochkomplexen Interaktionsmusters von Kombinationsmöglichkeiten zwischen und innerhalb der verschiedenen Signaltransduktionswege.

#### 4.3.6 PKC- $\alpha$ und phospho-PKC- $\alpha$

Die quantitative PKC- $\alpha$ -Expression ergab innerhalb des Dünndarms signifikant ( $p=0,029$ ) erhöhte Werte für die Wildtyp-mutierten GIST (10,37 [ $\pm 7,801$ ]) gegenüber den KIT-mutierten GIST des Dünndarms (4,496 [ $\pm 3,790$ ]). Die phosphorylierte Form von PKC- $\alpha$  wies ebenfalls mutationsabhängig signifikant ( $p=0,046$ ) erhöhte Werte bei den PDGFRA-mutierten Tumoren (10,52 [ $\pm 5,879$ ]) im Gegensatz zu den KIT-mutierten GIST (6,939 [ $\pm 5,869$ ]) auf. Letztendlich zeigte sich auch die quantitative phospho-PKC- $\alpha$ -Expression innerhalb der KIT-mutierten GIST hinsichtlich einer gemischtzelligen Morphologie (9,398 [ $\pm 5,806$ ]) signifikant erhöht ( $p=0,019$ ) gegenüber den spindelzelligen Tumoren (5,902 [ $\pm 5,676$ ]).

Die Heterogenität dieser Ergebnisse macht eine Zuordnung im Hinblick auf bestimmte klinisch-pathologischen Faktoren sowie bezüglich Aussagen über eine potentielle Prognose nur schwer möglich. Wenngleich PKC- $\alpha$  im PLC $\gamma$ -Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle am Ende der Signalkaskade einnimmt und eine Vielzahl mitogener Transkriptionsfaktoren positiv beeinflusst (Roskoski 2005a), ist ebenfalls eine negative Rückkopplung mittels direkter Phosphorylierung der beiden Serinreste Ser741 und Ser746 in der Kinase-Insert-Domäne des KIT/ SCF-Komplexes und eine folglich Hemmung dieses Signalweges möglich (Blume-Jensen et al. 1993; Blume-Jensen et al. 1995). Diese Ergebnisse legen den Schluss einer modulierenden Funktion von PKC- $\alpha$  im Hinblick auf die Zellantwort einer SCF-induzierten Kinase-Aktivität nahe. Dementsprechend könnte die signifikant erhöhte Expression in PDGFRA-mutierten Tumoren mittels negativer Rückkoppelung die bessere Prognose und im Gegenzug die signifikant erhöhte Expression in gemischtzelligen, KIT-mutierten GIST durch eine vermehrte Beeinflussung und Initiierung zellproliferatorischer Vorgänge die schlechtere Prognose dieser Tumoren erklären. Es bedarf dringend weiterer Untersuchungen für das Verständnis der modulierenden Funktionen von PKC- $\alpha$  und möglicher beeinflussender Faktoren.

### 4.3.7 phospho-Lyn

Die quantitativ-ermittelte, phosphorylierte *Lyn*-Expression wies eine signifikante Korrelation zu dem klassischen Prognosefaktor der Tumorgröße auf. Die Gruppe mit den Tumoren größer als 5 cm (4,896 [ $\pm$ 4,493]) zeigte eine signifikant ( $p=0,023$ ) höhere Expression auf als die GIST, die kleiner als fünf cm waren (3,533 [ $\pm$ 2,590]).

*Lyn* und seine phosphorylierte Form stellen wichtige Vertreter der *SFK*-Familie dar, die durch ihre Bindung an regulierende Rezeptorregionen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Lennartsson et al. 1999; Timokhina et al. 1998) sowie ihre Wechselwirkungen mit anderen Signaltransduktionswegen (Lennartsson et al. 1999; Lennartsson et al. 2005; Roskoski 2005a; Timokhina et al. 1998), eine entscheidende Bedeutung in dem *SCF/ KIT*-Signaltransduktionweg zugute kommt. Aufgrund der hohen Expression in größeren Tumoren muss von einem prognostisch negativen Einfluss ausgegangen werden.

## 5 Zusammenfassung

GIST stellen die häufigsten mesenchymalen Tumoren des Gastrointestinaltraktes dar, wobei 20 - 25% der GIST aus dem Magen und 40 – 50 % der GIST aus dem Dünndarm im Verlauf mit einem klinisch malignen Verhalten assoziiert sind. Ihre Besonderheit liegt dabei einerseits biologisch in der besonderen Pathophysiologie der Tumorentstehung und andererseits klinisch in der nur schwer zu ermittelnden Dignitätsabschätzung. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst klinisch-pathologische Parameter eines GIST-Kollektivs von 167 Patienten miteinander verglichen, um anschließend mittels der neuen Aufbereitungsmethodik der Tissue-Microarray-Technologie, folgender immunhistochemischer Färbung und computergestützter Auszählung, bestimmte quantitative Proteinexpressionen zu ermitteln, um mögliche Hinweise auf den molekularbiologischen Hintergrund zu gewinnen.

Im untersuchten Tumorkollektiv ergab sich im Hinblick auf die klinisch-pathologischen Parameter die signifikante Assoziation von *KIT*-mutierten Tumoren mit einer spindelzelligen Morphologie, einer größeren Tumorausdehnung, einer höheren Mitosezahl sowie einem deutlich schlechteren klinischen Verlauf, während sich die *PDGFRA*-mutierten GIST mit einer epitheloid-gemischten Morphologie, kleineren Werten für Mitosezahl und Tumorgöße, einer ausschließlich Magen-assoziierten anatomischen Lokalisation sowie einer klinisch guten Prognose darboten. Die Wildtyp-mutierten GIST wiesen ein als kritisch zu hinterfragendes Bild mit vergleichsweise geringen Werten für Tumorgöße und Mitosenanzahl sowie einem dazu passenden, relativ guten klinischen Verlauf auf, bei jedoch sehr uneinheitlichen morphologischen und die anatomische Lokalisation betreffenden Charakteristika.

Im Folgenden wurden Anhaltspunkte in den nachgeschalteten Signaltransduktionswegen gesucht. Dabei zeigten zunächst die quantitativen *KIT*- und *PDGFRA*-Proteinexpressionsanalysen eine dem bisherigen Wissensstand experimentell bestätigende Gegebenheit. Die *KIT*-Expression wies mutationsabhängig in *KIT*-mutierten Tumoren sowie lokalisationsabhängig im Intestinum eine signifikant erhöhte Korrelation auf, während eine gesteigerte *PDGFRA*-Expression mit einer Lokalisation im Magen und einer nachgewiesenen *PDGFRA*-Mutation vergesellschaftet war. Einen ersten auf unterschiedliche Gewichtung bestimmter Signaltransduktionswege beruhenden Hinweis ergab die lokalisationsabhängige

*CRKL*-Expression. *CRKL* stellt ein regulierendes Adapterprotein im *PI3K/AKT*-Signaltransduktionsweg dar und ist an einer Vielzahl zytobiologischer Prozesse beteiligt. Da die quantitative *CRKL*-Expression einerseits im Dickdarm und andererseits in der Gruppe der *KIT*-mutierten GIST im Magen signifikant erhöht war, liegt die Schlussfolgerung einer auf die Prognose positiv einflussnehmenden Wirkweise nahe.

Als weiteres Ergebnis ließ sich der ermittelte Zusammenhang einer sehr hohen *AKT-1*-Expression und einem signifikant längerem tumorfreien Überleben festhalten. Es erscheint widersprüchlich, dass das Protoonkogen *AKT-1* bei hoher Expression zu einer signifikant besseren kumulierten Überlebenswahrscheinlichkeit führt und es muss die Vermutung weiterer bisher nicht berücksichtigter Interaktionen zwischen *AKT-1* und nachgeschalteter Proteine oder die Beeinflussung anderer Signaltransduktionswege bei sehr hoher Expression postuliert werden. Gestützt wird diese Vermutung durch die gleichwohl ermittelte sehr hohe Expression der phosphorylierten Form von *AKT-1*, die ebenfalls bei GIST mit sehr hoher *phospho-AKT-1*-Expression signifikant mit einer höheren kumulierten Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert war.

Zudem wurde eine signifikant erhöhte quantitative *phospho-Lyn*-Expression in der Gruppe großer Tumoren nachgewiesen. *Phospho-Lyn* stellt einen wichtigen Vertreter der *SFK*-Familie dar und es wird insgesamt von einem prognostisch negativen Einfluss dieses Signaltransduktionswegs ausgegangen. Die quantitative *PKC- $\alpha$* - und *phospho-PKC- $\alpha$* -Expression lieferte hingegen äußerst inhomogene Ergebnisse, die eindeutige Aussagen bezüglich einer potentiellen Wirkweise nur schwer möglich machen und vielmehr den Schluss einer modulierenden Funktion im Hinblick auf die Zellantwort einer *SCF*-induzierten Kinase-Aktivität nahe legen.

Wenngleich sich keine eindeutige Zuordnung bezüglich eines bestimmten Signaltransduktionswegs vornehmen lässt, so zeigte sich auch bei der *FAK*-Expression die Assoziation hinsichtlich einer negativ kumulierten Überlebenswahrscheinlichkeit. Es verdeutlicht sich hierbei der allgemeingültige Umstand eines vermutlich hochkomplexen Interaktionsmusters innerhalb der unterschiedlichen Signaltransduktionswege, die im Einzelnen und in ihrer wechselseitigen Beeinflussung dringend weiterer Aufklärung bedürfen.

## 6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1.2.1-1	3
Abbildung 1.3-1	8
Abbildung 1.4.2-1	11
Abbildung 1.4.3-1	12
Abbildung 1.4.4-1	14
Abbildung 2.2.1-1	16
Abbildung 2.2.1-2	16
Abbildung 2.3.1-1	21
Abbildung 3.1.1-1	24
Abbildung 3.1.2-1	25
Abbildung 3.2.2.1-1	30
Abbildung 3.2.2.2-1	31
Abbildung 3.2.2.3-1	32
Abbildung 3.3.1-1	33
Abbildung 3.3.1-2	33
Abbildung 3.3.1-3	34
Abbildung 3.3.2-1	35
Abbildung 3.3.2-2	35
Abbildung 3.3.2-3	36
Abbildung 3.3.3-1	37
Abbildung 3.3.3-2	37
Abbildung 3.3.3-3	38
Abbildung 3.3.3-4	38
Abbildung 3.3.3-5	39

Abbildung 3.3.3-6	40
Abbildung 3.3.3-7	40
Abbildung 3.3.3-8	41
Abbildung 3.3.4-1	42
Abbildung 3.3.4-2	42
Abbildung 3.3.4-3	43
Abbildung 3.3.4-4	43
Abbildung 3.3.5-1	44
Abbildung 3.3.5-2	45
Abbildung 3.3.5-3	45
Abbildung 3.3.5-4	46
Abbildung 3.3.5-5	46
Abbildung 3.3.6-1	47
Abbildung 3.3.7-1	48
Abbildung 3.4.1.1-1	49
Abbildung 3.4.1.2-1	49
Abbildung 3.4.1.3-1	50
Abbildung 3.4.1.4-1	51
Abbildung 3.4.1.5-1	51
Abbildung 3.4.1.5-2	52
Abbildung 3.4.2.1-1	53
Abbildung 3.4.2.2-1	53

## 6.2 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1.2.6-1	6
Tabelle 1.2.6-2	6
Tabelle 1.3-1	8-9
Tabelle 2.2.1-1	17
Tabelle 2.2.2.1-1	18-19
Tabelle 2.4-1	22-23
Tabelle 3.2.1.1-1	28
Tabelle 3.2.1.1-2	28
Tabelle 3.2.1.4-1	29
Tabelle 3.2.1.4-2	29
Tabelle 3.2.2.3-1	32
Tabelle 4.1-1	56-57



## 7 Literaturverzeichnis

- Abram CL, Courtneidge SA (2000): "Src family tyrosine kinases and growth factor signaling." *Exp Cell Res* 254: 1-13.
- AlphaMetrix Biotech GmbH: Einführung in: Bedienungsanleitung Manueller Tissue Arrayer MTA-1, hrsg. von AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark, 2005(a), 3
- AlphaMetrix Biotech GmbH: Herstellung des Arrays in: Bedienungsanleitung Manueller Tissue Arrayer MTA-1, hrsg. von AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark, 2005(b), 10-12
- Andersson J, Bümbling P, Meis-Kindblom JM, Sihto H, Nupponen N, Joensuu H, Oden A, Gustavsson B, Kindblom LG, Nilsson B (2006): "Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 11 deletions are associated with poor prognosis." *Gastroenterology* 130: 1573-1581.
- Antonescu CR, Sommer G, Sarran L, Tschernyavsky SJ, Riedel E, Woodruff JM, Robson M, Maki R, Brennan MF, Ladanyi M et al. (2003): "Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors." *Clin Cancer Res* 9: 3329-3337.
- Bauer S, Duensing A, Demetri GD, Fletcher JA (2007): "KIT oncogenic signaling mechanisms in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor: PI3-kinase/AKT is a crucial survival pathway." *Oncogene* 26: 7560-7568.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003): "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 517-529.
- Birge RB, Kalodimos C, Inagaki F, Tanaka S (2009): "Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling." *Cell Commun Signal* 7: 13.
- Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Zsebo KM, Westermarck B, Heldin CH (1991): "Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis." *EMBO J* 10: 4121-4128.
- Blume-Jensen P, Siegbahn A, Stabel S, Heldin CH, Rönstrand L (1993): "Increased Kit/SCF receptor induced mitogenicity but abolished cell motility after inhibition of protein kinase C." *EMBO J* 12: 4199-4209.
- Blume-Jensen P, Wernstedt C, Heldin CH, Rönstrand L (1995): "Identification of the major phosphorylation sites for protein kinase C in kit/stem cell factor receptor in vitro and in intact cells." *J Biol Chem* 270: 14192-14200.
- Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T (1998): "The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136." *Curr Biol* 8: 779-782.
- Cameron S, Haller F, Dudas J, Moriconi F, Gunawan B, Armbrust T, Langer C, Füzesi L, Ramadori G (2008): Immune cells in primary gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20, 327-334.
- Carney JA (1979): "The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma, and pulmonary chondroma." *Cancer* 43: 374-382.

- Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M, Yoakim M, Schaffhausen B, Shoelson, S Cantley LC (1993): "Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit." *J Biol Chem* 268: 9478-9483.
- Carpenter G, Ji Q (1999): "Phospholipase C-gamma as a signal-transducing element." *Exp Cell Res* 253: 15-24.
- Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC (2004): "Biology of gastrointestinal stromal tumors." *J Clin Oncol* 22: 3813-3825.
- Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, Shiraga S, Bainbridge T, Morich J, Heinrich MC (2005): "PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib." *J Clin Oncol* 23: 5357-5364.
- Crews CM, Erikson RL (1992): "Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byr1 gene product." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8205-8209.
- Dei Tos AP (2003): "The reappraisal of gastrointestinal stromal tumors: from Stout to the KIT revolution." *Virchows Arch* 442: 421-428.
- DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF (2000): "Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival." *Ann Surg* 231: 51-58.
- DeMatteo RP, Gold JS, Saran L, Gonen M, Liau KH, Maki RG, Singer S, Besmer P, Brennan MF, Antonescu CR (2008): "Tumor mitotic rate, size, and location independently predict recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor (GIST)." *Cancer* 112: 608-615.
- Duensing A, Medeiros F, McConarty B, Joseph NE, Panigrahy D, Singer S, Fletcher CD, Demetri GD, Fletcher JA (2004): "Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs)." *Oncogene* 23: 3999-4006.
- 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* 23: 82-87.
- Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT (1993): "Signalling by receptor tyrosine kinases." *Annu Rev Biochem* 62: 453-481.
- Faussone-Pellegrini, MS Thuneberg L (1999): "Guide to the identification of interstitial cells of Cajal." *Microsc Res Tech* 47: 248-266.
- Feller SM (2001): "Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles." *Oncogene* 20: 6348-6371.
- 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* 33: 459-465.
- Foster FM, Traer CJ, Abraham SM, Fry MJ (2003): "The phosphoinositide (PI) 3-kinase family." *J Cell Sci* 116: 3037-3040.
- Gommerman JL, Sittaro D, Klebasz NZ, Williams DA, Berger SA (2000): "Differential stimulation of c-Kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential." *Blood* 96: 3734-3742.
- Haller F: Molekularbiologische Evaluation prognostischer Parameter in Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST). Med. Habil.-Schr. Göttingen 2008
- Haller F, Happel N, Schulten HJ, von Heydebreck A, Schwager S, Armbrust T, Langer C, Gunawan B, Doenecke D, Füzesi L (2007): "Site-dependent differential KIT and

- PDGFRA expression in gastric and intestinal gastrointestinal stromal tumors." *Mod Pathol* 20: 1103-1111.
- Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A et al. (2003a): "PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors." *Science* 299: 708-710.
- 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. (2003b): "Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor." *J Clin Oncol* 21: 4342-4349.
- Herbst R, Shearman MS, Jallal B, Schlessinger J, Ullrich A (1995): "Formation of signal transfer complexes between stem cell and platelet-derived growth factor receptors and SH2 domain proteins in vitro." *Biochemistry* 34: 5971-5979.
- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M et al. (1998): "Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors." *Science* 279: 577-580.
- Hirota S, Nishida T, Isozaki K, Taniguchi M, Nakamura J, Okazaki T, Kitamura Y (2001): "Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours." *J Pathol* 193: 505-510.
- Hjermstad BM, Sobin LH, Helwig EB (1987): "Stromal tumors of the gastrointestinal tract: myogenic or neurogenic?" *Am J Surg Pathol* 11: 383-386.
- Kang HJ, Nam SW, Kim H, Rhee H, Kim NG, Hyung WJ, Noh SH, Kim JH, Yun CO, Liu ET (2005): "Correlation of KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gene activation and expression profiles in gastrointestinal stromal tumors." *Oncogene* 24: 1066-1074.
- Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM (1998): "Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal." *Am J Pathol* 152: 1259-1269.
- Koike T, Mizutani T, Hirai K, Morita Y, Nozawa Y (1993): "SCF/c-kit receptor-mediated arachidonic acid liberation in rat mast cells. Involvement of PLD activation associated tyrosine phosphorylation." *Biochem Biophys Res Commun* 197: 1570-1577.
- Koon N, Schneider-Stock R, Sarlomo-Rikala M, Lasota J, Smolkin M, Petroni G, Zaika A, Boltze C, Meyer F, Andersson L et al. (2004): "Molecular targets for tumour progression in gastrointestinal stromal tumours." *Gut* 53: 235-240.
- Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J (1992): "Raf-1 activates MAP kinase-kinase." *Nature* 358: 417-421.
- Lasota J, Miettinen M (2008): "Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours." *Histopathology* 53: 245-266.
- Lasota J, Kopczynski J, Sarlomo-Rikala M, Schneider-Stock R, Stachura T, Kordek R, Michal M, Boltze C, Roessner A, Stachura J et al. (2003a): "KIT 1530ins6 mutation defines a subset of predominantly malignant gastrointestinal stromal tumors of intestinal origin." *Hum Pathol* 34: 1306-1312.
- Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Stachura T, Schneider-Stock R, Kallajoki M, Steigen SE, Sarlomo-Rikala M, Boltze C, Kordek R, Roessner A et al. (2003b): "Gastrointestinal stromal tumors with internal tandem duplications in 3' end of KIT juxtamembrane domain occur predominantly in stomach and generally seem to have a favorable course." *Mod Pathol* 16: 1257-1264.

- Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, Miettinen M (2004): "A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential." *Lab Invest* 84: 874-883.
- Lasota J, Stachura J, Miettinen M (2006): "GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumors with epithelioid morphology." *Lab Invest* 86: 94-100.
- Lennartsson J, Blume-Jensen P, Hermanson M, Pontén E, Carlberg M, Rönstrand L (1999): "Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction." *Oncogene* 18: 5546-5553.
- Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R (2005): "Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit." *Stem Cells* 23: 16-43.
- Lev S, Givol D, Yarden Y (1992): "Interkinase domain of kit contains the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase." *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 678-682.
- Linnekin D, DeBerry CS, Mou S (1997): "Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells." *J Biol Chem* 272: 27450-27455.
- Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y (2001): "Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy." *Leuk Res* 25: 571-576.
- Ma Y, Cunningham ME, Wang X, Ghosh I, Regan L, Longley BJ (1999): "Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region." *J Biol Chem* 274: 13399-13402.
- Maddens S, Charruyer A, Plo I, Dubreuil P, Berger S, Salles B, Laurent G, Jaffrézou JP (2002): "Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect." *Blood* 100: 1294-1301.
- Maleddu A, Pantaleo MA, Nannini M, Di Battista M, Saponara M, Lolli C, Biasco G (2009): "Mechanisms of secondary resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumours (Review)." *Oncol Rep* 21: 1359-1366.
- Mazur MT, Clark HB (1983): "Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis." *Am J Surg Pathol* 7: 507-519.
- Mechtersheimer G, Lehnert T, Penzel R, Joos S, Egerer G, Otto HF (2003): "[Gastrointestinal stromal tumors. A morphologic and molecular genetic independent tumor entity with new therapeutic perspectives]." *Pathologe* 24: 182-191.
- Miettinen M, Lasota J (2001): "Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis." *Virchows Arch* 438: 1-12.
- Miettinen M, Lasota J (2003): "Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): definition, occurrence, pathology, differential diagnosis and molecular genetics." *Pol J Pathol* 54: 3-24.
- Miettinen M, Lasota J (2006): "Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis." *Arch Pathol Lab Med* 130: 1466-1478.
- Miettinen M, Virolainen M, Sarlomo-Rikala M (1995): "Gastrointestinal stromal tumors--value of CD34 antigen in their identification and separation from true leiomyomas and schwannomas." *Am J Surg Pathol* 19: 207-216.

- Miettinen M, Sobin LH, Sarlomo-Rikala M (2000): "Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT)." *Mod Pathol* 13: 1134-1142.
- Miettinen M, El-Rifai W, Sobin LH, Lasota J (2002): "Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review." *Hum Pathol* 33: 478-483.
- Miettinen M, Sobin LH, Lasota J (2005): "Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up." *Am J Surg Pathol* 29: 52-68.
- Miettinen M, Makhlof H, Sobin LH, Lasota J (2006): "Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up." *Am J Surg Pathol* 30: 477-489.
- Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, Skene RJ, Kraus ML, Scheibe DN, Snell GP, Zou H, Sang BC, Wilson KP (2004): "Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase." *J Biol Chem* 279: 31655-31663.
- Monihan JM, Carr NJ, Sobin LH (1994): "CD34 immunoexpression in stromal tumours of the gastrointestinal tract and in mesenteric fibromatoses." *Histopathology* 25: 469-473.
- Nilsson B, Bümbling P, Meis-Kindblom JM, Odén A, Dortok A, Gustavsson B, Sablinska K, Kindblom LG (2005): "Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era--a population-based study in western Sweden." *Cancer* 103: 821-829.
- Nishida T, Hirota S, Taniguchi M, Hashimoto K, Isozaki K, Nakamura H, Kanakura Y, Tanaka T, Takabayashi A, Matsuda H et al. (1998): "Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene." *Nat Genet* 19: 323-324.
- Pawson T (2002): "Regulation and targets of receptor tyrosine kinases." *Eur J Cancer* 38: 3-10.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001): "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* 22: 153-183.
- Plo I, Lautier D, Casteran N, Dubreuil P, Arock M, Laurent G (2001): "Kit signaling and negative regulation of daunorubicin-induced apoptosis: role of phospholipase Cgamma." *Oncogene* 20: 6752-6763.
- Robinson TL, Sircar K, Hewlett BR, Chorneyko K, Riddell RH, Huizinga JD (2000): "Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD34-positive interstitial cells of Cajal." *Am J Pathol* 156: 1157-1163.
- Rönstrand L (2004): "Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit." *Cell Mol Life Sci* 61: 2535-2548.
- Roskoski R (2005a): "Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 337: 1-13.
- Roskoski R (2005b): "Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 338: 1307-1315.
- Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA et al. (2001): "KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors." *Cancer Res* 61: 8118-8121.
- Rudolph P, Gloeckner K, Parwaresch R, Harms D, Schmidt D (1998): "Immunophenotype, proliferation, DNA ploidy, and biological behavior of gastrointestinal stromal tumors: a multivariate clinicopathologic study." *Hum Pathol* 29: 791-800.

- Ruggero D, Sonenberg N (2005): "The Akt of translational control." *Oncogene* 24: 7426-7434.
- Rutkowski P, Nowecki ZI, Michej W, Debięc-Rychter M, Woźniak A, Limon J, Siedlecki J, Grzesiakowska U, Kąkol M, Osuch C et al. (2007): "Risk criteria and prognostic factors for predicting recurrences after resection of primary gastrointestinal stromal tumor." *Ann Surg Oncol* 14: 2018-2027.
- Sakurama K, Noma K, Takaoka M, Tomono Y, Watanabe N, Hatakeyama S, Ohmori O, Hirota S, Motoki T, Shirakawa Y et al. (2009): "Inhibition of focal adhesion kinase as a potential therapeutic strategy for imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor." *Mol Cancer Ther* 8: 127-134.
- Sattler M, Salgia R, Shrikhande G, Verma S, Pisick E, Prasad KV, Griffin JD (1997): "Steel factor induces tyrosine phosphorylation of CRKL and binding of CRKL to a complex containing c-kit, phosphatidylinositol 3-kinase, and p120(CBL)." *J Biol Chem* 272: 10248-10253.
- Saul SH, Rast ML, Brooks JJ (1987): "The immunohistochemistry of gastrointestinal stromal tumors. Evidence supporting an origin from smooth muscle." *Am J Surg Pathol* 11: 464-473.
- Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ (1999): "Signaling through focal adhesion kinase." *Prog Biophys Mol Biol* 71: 435-478.
- Singer S, Rubin BP, Lux ML, Chen CJ, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA (2002): "Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors." *J Clin Oncol* 20: 3898-3905.
- Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA (2004): "JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis." *Leukemia* 18: 189-218.
- Steigen SE, Eide TJ, Wasag B, Lasota J, Miettinen M (2007): "Mutations in gastrointestinal stromal tumors--a population-based study from Northern Norway." *APMIS* 115: 289-298.
- Stout AP (1962): "Bizarre smooth muscle tumors of the stomach." *Cancer* 15: 400-409.
- Subramanian S, West RB, Corless CL, Ou W, Rubin BP, Chu KM, Leung SY, Yuen ST, Zhu S, Hernandez-Boussard T et al. (2004): "Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with KIT and PDGFRA mutations have distinct gene expression profiles." *Oncogene* 23: 7780-7790.
- Tarn C, Skorobogatko YV, Taguchi T, Eisenberg B, von Mehren M, Godwin AK (2006): "Therapeutic effect of imatinib in gastrointestinal stromal tumors: AKT signaling dependent and independent mechanisms." *Cancer Res* 66: 5477-5486.
- Thomas SM, Brugge JS (1997): "Cellular functions regulated by Src family kinases." *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 513-609.
- Thömmes K, Lennartsson J, Carlberg M, Rönstrand L (1999): "Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor." *Biochem J* 341: 211-216.
- Timokhina I, Kissel H, Stella G, Besmer P (1998): "Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation." *EMBO J* 17: 6250-6262.
- Torihashi S, Horisawa M, Watanabe Y (1999): "c-Kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract." *J Auton Nerv Syst* 75: 38-50.

- Tran T, Davila JA, El-Serag HB (2005): "The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 1,458 cases from 1992 to 2000." *Am J Gastroenterol* 100: 162-168.
- Trieselmann NZ, Soboloff J, Berger SA (2003): "Mast cells stimulated by membrane-bound, but not soluble, steel factor are dependent on phospholipase C activation." *Cell Mol Life Sci* 60: 759-766.
- Tryggvason G, Gislason HG, Magnusson MK, Jonasson JG (2005): "Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: the icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study." *Int J Cancer* 117: 289-293.
- Ueki K, Fruman DA, Brachmann SM, Tseng YH, Cantley LC, Kahn CR (2002): "Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival." *Mol Cell Biol* 22: 965-977.
- van de Rijn M, Hendrickson MR, Rouse RV (1994): "CD34 expression by gastrointestinal tract stromal tumors." *Hum Pathol* 25: 766-771.
- Wardelmann E, Neidt I, Bierhoff E, Speidel N, Manegold C, Fischer HP, Pfeifer U, Pietsch T (2002): "c-kit mutations in gastrointestinal stromal tumors occur preferentially in the spindle rather than in the epithelioid cell variant." *Mod Pathol* 15: 125-136.
- Wardelmann E, Hrychuk A, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Goldstein J, Hohenberger P, Losen I, Manegold C, Buttner R, Pietsch T (2004): "Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors." *J Mol Diagn* 6: 197-204.
- Wasag B, Debiec-Rychter M, Pauwels P, Stul M, Vranckx H, van Oosterom A, Hagemeyer A, Sciot R (2004): "Differential expression of KIT/PDGFR mutant isoforms in epithelioid and mixed variants of gastrointestinal stromal tumors depends predominantly on the tumor site." *Mod Pathol* 17: 889-894.
- Welsh RA, Meyer AT (1969): "Ultrastructure of gastric leiomyoma." *Arch Pathol* 87: 71-81.
- Wilde JI, Watson SP (2001): "Regulation of phospholipase C gamma isoforms in haematopoietic cells: why one, not the other?" *Cell Signal* 13: 691-701.
- Xing Z, Chen HC, Nowlen JK, Taylor SJ, Shalloway D, Guan JL (1994): "Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain." *Mol Biol Cell* 5: 413-421.
- Yamaguchi U, Hasegawa T, Masuda T, Sekine S, Kawai A, Chuman H, Shimoda T (2004): "Differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumor and other spindle cell tumors in the gastrointestinal tract based on immunohistochemical analysis." *Virchows Arch* 445: 142-150.
- Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A (1987): "Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand." *EMBO J* 6: 3341-3351.
- Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J, Kong XP (2000): "Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation." *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7732-7737.

### **Danksagung:**

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle PD Dr. med. Florian Haller, der zunächst als Betreuer und schließlich auch als Doktorvater diese Arbeit über den gesamten Zeitraum großartig betreut und unterstützt hat und bei der Laborarbeit sowie während des Verfassens der Dissertationsschrift jederzeit für Fragen offen ansprechbar gewesen ist. Weiterer besonderer Dank gebührt dem Abteilungsleiter der Gastroenteropathologie der Universitätsmedizin Göttingen Prof. Dr. med. László Füzési, der ebenfalls zum Fortschritt der Arbeit wesentlich beigetragen hat.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. med. Silke Cameron und Herrn Dr. rer. nat. Robert Cameron herzlich bedanken, ohne deren persönliche und technische Mithilfe die Auswertung der experimentellen Daten in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Ebenfalls großer Dank gilt Frau Melanie Gebhardt, Frau Judith Wolf-Sálgó, Frau Stefanie Schwager und Frau Christina Enders für ihre freundliche Hilfe und ihre unterstützende Arbeit im Labor. Besondere Aufmerksamkeit betrifft die Doktorandin cand. med. Judith Cortis, die mit ihrer stets freundlichen, liebevollen und motivierenden Art und Weise letztendlich unersetzlich war.

Zuletzt möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern der Abteilung der Gastroenteropathologie herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den stets freundlichen Umgang bedanken.