Der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität
eingereicht von Prof. Dr. med. L. Füzesi

**Die prognostische Bedeutung
von nukleärer und zytoplasmatischer p16^{INK4A}-Expression
sowie der Expression von E2F1
in gastrointestinalen Stromatumoren (GIST)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Manori Felgendreher, geborene Beyer
aus
Sulzbach-Rosenberg

Göttingen 2015

Die vorliegende Dissertation wurde in Göttingen in der Abteilung
Gastroenteropathologie unter der Betreuung von Prof. Dr. med. L. Füzesi erstellt.

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

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. L. Füzesi

II. Berichterstatterin: PD Dr. med. S. Cameron

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2016

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung	13
1.1 Der gastrointestinale Stromatumor	13
1.1.1 Entität	13
1.1.2 Epidemiologie	14
1.1.3 Pathologische Merkmale	15
1.1.4 Klinisches Verhalten und Risikoeinteilung	17
1.1.5 Therapiemöglichkeiten	20
1.2 Die prognostischen Marker c-KIT und PDGFRA	22
1.2.1 Die Überexpression und Mutation des KIT-Rezeptors	22
1.2.2 Die Aktivierungsmutation im PDGFRA-Gen und die Gemeinsamkeiten des KIT- und PDGFRA-Rezeptors	23
1.3 Betrachtung molekularer Veränderungen in Bezug auf alternative Marker	25
1.3.1 Expression und prognostische Rolle von p16 ^{INK4A}	26
1.3.2 Expression des Proteins E2F1	27
1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren	28
1.4.1 Kriterien für die Evaluierung prognostischer Faktoren	29
1.5 Fragestellung	30
1.6 Ziele dieser Arbeit	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Untersuchungsmaterial	32
2.1.1 Zusammenstellung des Tumorkollektivs	32
2.1.2 Klinisch-pathologische Beurteilung der Tumoren	32
2.2 Herstellung des Tissue Microarray (TMA)	33
2.2.1 Auswahl der Gewebeareale zur TMA-Herstellung	33

2.2.2	Design des TMA	34
2.2.3	Erstellung des TMA	35
2.2.4	Nachbehandlung und Schneiden des Array-Blocks	36
2.3	Immunhistochemie	37
2.3.1	Silanisierte Objektträger	37
2.3.2	Immunhistochemie	38
2.3.3	Gegenfärbung mit Hämalun	39
2.4	Auswertung der Färbung der TMA-Schnitte	40
2.4.1	Auswertung der Kernexpression von p16 ^{INK4A} und E2F1	40
2.4.2	Auswertung der zytoplasmatischen Färbung von p16 ^{INK4A}	44
2.5	Statistische Methoden	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Klinisch-pathologische Parameter	46
3.1.1	Altersverteilung und Geschlechterverhältnis der Patienten	46
3.1.2	Tumorgroße.....	46
3.1.3	Mitose.....	47
3.1.4	Tumorlokalisation	49
3.1.5	Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002).....	51
3.1.6	Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006)	52
3.2	Korrelation der untersuchten Proteine	53
3.2.1	Zytoplasmatische p16 ^{INK4A} -Expression.....	53
3.2.2	Nukleäre p16 ^{INK4A} -Expression	54
3.2.3	E2F1-Expression.....	55
3.2.4	Korrelation zwischen zytoplasmatischer und nukleärer p16 ^{INK4A} - Expression.....	56
3.2.5	Korrelation zwischen nukleärer p16 ^{INK4A} - und E2F1-Expression	59
3.2.6	Korrelation der zytoplasmatischen p16 ^{INK4A} - und E2F1-Expression	61
3.3	Korrelation der immunhistochemischen Marker mit den klinisch- pathologischen Parametern.....	62
3.3.1	Tumorgroße.....	62

3.3.2	Mitoserate.....	64
3.3.3	Lokalisation	65
3.3.4	Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002).....	67
3.3.5	Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006)	70
3.4	Klinischer Verlauf nach klinisch-pathologischen Parametern	74
3.4.1	TumorgroÙe.....	74
3.4.2	Mitoserate.....	75
3.4.3	Lokalisation	76
3.4.4	Klassifikationssystem nach Fletcher et al. (2002).....	77
3.4.5	Krankheitsfreies Überleben: das Klassifikationssystem nach Miettinen und Lasota (2006).....	78
3.5	Klinischer Verlauf nach Expression der untersuchten Proteine	79
3.5.1	Nukleäre p16 ^{INK4A} -Expression	79
3.5.2	Zytoplasmatische p16 ^{INK4A} -Expression.....	80
3.5.3	E2F1	82
3.6	Prognosefaktoren und Modelle zur Vorhersage der Rezidivfreiheit.....	83
3.6.1	Cox-Modell für zytoplasmatische Expression von p16 ^{INK4A} , Kernexpression von p16 ^{INK4A} und E2F1	83
3.6.2	Cox-Modell für zytoplasmatische Expression von p16 ^{INK4A} , Kern- expression von p16 ^{INK4A} und die Expression von E2F1 unter Ein- beziehung von Miettinen und Lasota (2006) beziehungsweise Fletcher et al. (2002)	85
3.6.3	Cox-Modell für zytoplasmatische Expression von p16 ^{INK4A} , Kernexpression von p16 ^{INK4A} , E2F1 und Risikoklassifikation von Fletcher et al. (2002) beziehungsweise Miettinen und Lasota (2006) als kontinuier- liche Parameter	88
4	Diskussion	91
4.1	Beurteilung der klinisch-pathologischen Daten.....	91
4.2	Expression der verschiedenen Proteine unter Berücksichtigung der klinisch-pathologischen Parameter.....	93
4.2.1	p16 ^{INK4A}	93

4.2.2	E2F1	93
4.3	Expression der verschiedenen Proteine unter Berücksichtigung des klinischen Verlaufs.....	94
4.4	Expression der verschiedenen Proteine unter Berücksichtigung der Korrelationen untereinander	95
4.5	Prognostische Bedeutung der verschiedenen Proteine	96
5	Zusammenfassung	97
	Literaturverzeichnis	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: spindelzellige und epitheloide Morphologie bei GIST	16
Abbildung 2: Rezeptortyrosinkinase KIT und PDGFRA: Schematische Darstellung der Lokalisation der gängigen Mutationen	24
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Signalwegs, mit dem die Kernexpression von p16 ^{INK4A} den Zellzyklus reguliert	26
Abbildung 4: Auswahl und Markierung der zu stanzenden Bereiche	34
Abbildung 5: Manueller Tissue Arrayer und Steuerinstrument	35
Abbildung 6: Der Stanzvorgang	36
Abbildung 7: TMA-Block: Vor und nach der in 2.2.4 beschriebenen Behandlung.....	37
Abbildung 8: HE-gefärbtes Schnittpräparat.....	40
Abbildung 9: Quantitative Auswertung der Kernexpression von p16 ^{INK4A} und E2F1	41
Abbildung 10: ROC-Kurve für die Kernexpression von p16 ^{INK4A}	43
Abbildung 11: Semiquantitative Auswertung der zytoplasmatischen Expression von p16 ^{INK4A}	45
Abbildung 12: Histogramm der Tumorgroße mit Normalverteilungskurve von 122 GIST- Patienten	47
Abbildung 13: Histogramm der Mitoserate mit Normalverteilungskurve bei 122 primären GIST	48
Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der Tumorgroße und Mitoserate von 122 primären GIST	49
Abbildung 15: Boxplots des Logarithmus der Tumorgroße in Abhängigkeit von den Lokalisationen proximal und distal bei 122 primären GIST.....	50
Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Mitoseraten in Abhängigkeit von der Tumorklassifikation von 122 primären GIST	50
Abbildung 17: Boxplots des Logarithmus der Mitoserate in Abhängigkeit von den Lokalisationen proximal und distal in 122 primären GIST.....	51
Abbildung 18: Prozentuale Verteilung der Risikogruppen nach Fletcher et al. (2002) bei 122 primären GIST	52
Abbildung 19: Prozentuale Verteilung der Risikogruppen nach Miettinen und Lasota (2006) bei 122 primären GIST	52

Abbildung 20: Histogramm der zytoplasmatischen p16 ^{INK4A} -Expression mit Normalverteilungskurve bei 121 GIST	54
Abbildung 21: Histogramm der nukleären p16 ^{INK4A} -Expression mit Normalverteilungskurve bei 100 GIST	55
Abbildung 22: Histogramm der Kernexpression von E2F1 mit Normalverteilungskurve bei 109 GIST	56
Abbildung 23: Streudiagramm der zytoplasmatischen und der Kernexpression von p16 ^{INK4A} bei 100 GIST	57
Abbildung 24: Die Verteilung der Kernexpression von p16 ^{INK4A} jeweils in der Gruppe mit niedriger beziehungsweise hoher zytoplasmatischer p16 ^{INK4A} -Expression	58
Abbildung 25: Streudiagramm der Kernexpression von p16 ^{INK4A} und E2F1	59
Abbildung 26: Die Verteilungen der Kernexpression von E2F1 in den beiden Kernexpressionsuntergruppen von p16 ^{INK4A}	60
Abbildung 27: Streudiagramm der zytoplasmatischen Expression von p16 ^{INK4A} und E2F1	61
Abbildung 28: Die Verteilung der Kernexpression von E2F1 jeweils in der Gruppe mit niedriger beziehungsweise hoher zytoplasmatischer p16 ^{INK4A} -Expression	62
Abbildung 29: Die Verteilung der zytoplasmatischen p16 ^{INK4A} -Expression für Patienten mit Tumorgröße ≤5cm beziehungsweise >5cm	63
Abbildung 30: Die Verteilung der Kernexpression von p16 ^{INK4A} für Patienten mit Tumorgröße ≤5cm beziehungsweise >5cm.....	63
Abbildung 31: Die Verteilung der Kernexpression von E2F1 für Patienten mit Tumorgröße ≤5cm beziehungsweise >5cm.....	64
Abbildung 32: Die Verteilung der p16 ^{INK4A} -Kernexpression für Patienten mit Mitoserate ≤5 beziehungsweise >5/50 HPF	65
Abbildung 33: Die Verteilung der Kernexpression von E2F1 für Patienten mit proximalen und distalen GIST	66
Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurve für krankheitsfreies Überleben	74
Abbildung 35: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben in Abhängigkeit von der Tumorgröße mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls.....	75

Abbildung 36: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben getrennt nach Mitoserate bei 122 GIST mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls.....	76
Abbildung 37: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben getrennt nach der Lokalisation bei 122 GIST mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls.....	77
Abbildung 38: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben von 122 Patienten mit GIST nach Risikokategorien nach Fletcher et al. (2002) mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls	78
Abbildung 39: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben von 122 Patienten mit GIST nach den Risikokategorien nach Miettinen und Lasota (2006) mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls ...	79
Abbildung 40: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben von 100 Patienten mit GIST, getrennt nach hoher und niedriger p16 ^{INK4A} -Kernexpression mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls	80
Abbildung 41: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben von 121 Patienten mit GIST, getrennt nach hoher und niedriger zytoplasmatischer p16 ^{INK4A} -Expression mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls.....	81
Abbildung 42: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben für E2F1 mit (optimalem) Cut-Off-Wert von 2,9 mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls.....	82
Abbildung 43: Kumuliertes krankheitsfreies Überleben stratifiziert nach Mitoserate und adjustiert nach zytoplasmatischer Expression von p16 ^{INK4A} , Kernexpression von p16 ^{INK4A} , E2F1, maximaler Tumorgroße und Lokalisation.....	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Risikokategorien bei GIST nach Fletcher et al. (2002)	18
Tabelle 2: Risikoeinschätzung bei GIST bezüglich der Lokalisation nach Miettinen und Lasota (2006).....	19
Tabelle 3: Angewendete immunhistochemische Marker zur Diagnosesicherung eines GIST	33
Tabelle 4: Analysierte prognostische Marker	39
Tabelle 5: Immunhistochemische Kernexpression von p16 ^{INK4A} bei 100 GIST: Relation Cut-Off-Wert und Sensitivität und Spezifität	42
Tabelle 6: ROC-Daten zur Berechnung des besten Cut-Off-Wertes für E2F1	43
Tabelle 7: Kreuztabelle zwischen Risikoklassifikationen von Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006)	53
Tabelle 8: Fallzahlen, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und die 2-seitige Signifikanz (Mann-Whitney-U-Test)	58
Tabelle 9: Fallzahlen, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und die 2-seitige Signifikanz (Mann-Whitney-U-Test)	60
Tabelle 10: Hypothesentestübersicht der immunhistochemischen Marker und den klinisch-pathologischen Parametern	67
Tabelle 11: Kreuztabelle zwischen den beiden Untergruppen der zytoplasmatischen p16 ^{INK4A} -Expression und der Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002)...	68
Tabelle 12: Kreuztabelle zwischen den beiden Untergruppen der Kernexpressionen von p16 ^{INK4A} und der Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002)	69
Tabelle 13: Kreuztabelle zwischen den beiden Untergruppen der Kernexpressionen von E2F1 und der Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002)	70
Tabelle 14: Kreuztabelle zwischen den beiden Untergruppen der zytoplasmatischen p16 ^{INK4A} -Expression und der Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006)	71
Tabelle 15: Kreuztabelle zwischen den beiden Untergruppen der Kernexpressionen von p16 ^{INK4A} und der Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006)	72
Tabelle 16: Kreuztabelle zwischen den beiden Untergruppen der Kernexpressionen von E2F1 und der Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006)	73
Tabelle 17: Kreuztabelle der Chi-Quadrat-Tests nach Pearson (2-seitige asymptotische Signifikanz) zwischen den Expressionen von p16 ^{INK4A} beziehungsweise E2F1 und den Risikoklassifikationen nach Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006).....	73

Tabelle 18: Vergleich der Ausprägung der zytoplasmatischen p16 ^{INK4A} -Expression bei 121 GIST mit dem Tumorezidiv	81
Tabelle 19: Univariate und multivariate Analyse der einzelnen Proteine als nominale Parameter bezüglich des krankheitsfreien Überlebens	84
Tabelle 20: Univariate und multivariate Analyse der einzelnen Proteine als kontinuierliche Parameter bezüglich des krankheitsfreien Überlebens	85
Tabelle 21: Cox-Modell mit Wald-Statistik für die nominalen Parameter Mitoserate, Tumorgroße, Lokalisation, zytoplasmatische Expression von p16 ^{INK4A} , Kernexpression von p16 ^{INK4A} und E2F1 Expression	86
Tabelle 22: Cox-Modell mit Wald-Statistik für die kontinuierlichen Parameter Tumorgroße, zytoplasmatische Expression von p16 ^{INK4A} , Kernexpression von p16 ^{INK4A} und E2F1 Expression sowie die nominalen Parameter Mitoserate und Lokalisation.....	87
Tabelle 23: Cox-Modelle stratifiziert nach Miettinen und Lasota (2006) (Modell A) und Fletcher et al. (2002) (Modell B) und adjustiert nach zytoplasmatischer Expression von p16 ^{INK4A} , Kernexpression von p16 ^{INK4A} und Kernexpression von E2F1 sowie der Lokalisation	89
Tabelle 24: Kreuztabelle zwischen der Lokalisation und der Klassifikation nach Miettinen und Lasota (2006)	90

Abkürzungsverzeichnis

ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter den Kurven/ <i>area under the curve</i>
B	Regressionskoeffizient
Bcl-2	<i>B-cell CLL/ lymphoma 2</i>
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CART	<i>classification and regression trees</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CDKN2A	Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor-2A
CI	<i>confidence interval</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
CSF1R	<i>macrophage colon- stimulating-factor 1 receptor</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
df	n-1 Freiheitsgrade
DOG1	<i>discovered on GIST-1</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>
ED	extrazelluläre Domäne
EtOH	Ethylalkohol
FLT3	<i>fms-like tyrosine kinase-3</i>
G-Phase	Lückenphase
GANT	gastrointestinale autonome neurogene Tumoren
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
H₀	Null-Hypothese
H₂O	Wasser
HE	Hämatoxilin-Eosin
HPF	<i>high-power-field</i>
HR	Hazard Ratio
HRP	Meerrettichperoxidase
ICC	interstitielle Cajal-Zellen
IgG	Immunglobulin G

JMD	juxtamembranäre Domäne
KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
LSAB	<i>labeled-streptavidin-biotin</i>
M-Phase	Mitose, Kernteilungsphase
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
N / n	Anzahl
NaIO₃	Natriumiodat
NaOH	Natriumhydroxid
p16^{INK4A}	<i>cyclin-dependent kinase 4 inhibitor</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)
PCNA	Proliferationsantigen/ <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>platelet-derived-growth-factor receptor</i>
PDGFRA	<i>platelet-derived-growth-factor receptor alpha</i>
PDGFRB	<i>platelet-derived-growth-factor receptor beta</i>
PKC theta	Protein Kinase C theta
RB	Retinoblastom-Protein
RFS	rezidivfreies Überleben
ROC	<i>receiver operating characteristics</i>
SE	Standardfehler
S-100	<i>S-100 calcium-binding protein</i>
SMA	<i>smooth muscle antigen</i>
S-Phase	Synthesephase
Std	<i>standard deviation</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline with tween</i>
TK 1	Tyrosin-Kinase-Domäne 1
TK 2	Tyrosin-Kinase-Domäne 2
TMA	Tissue Microarray
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

1 Einleitung

1.1 Der gastrointestinale Stromatumor

1.1.1 Entität

Mesenchymale Tumoren des Verdauungstraktes wurden erstmals 1941 von (Golden und Stout 1941) beschrieben. Lange Zeit nahm man an, dass der gastrointestinale Stromatumor (GIST) seinen Ursprung in der glatten Muskulatur hat und wurde meistens als gastrointestinales Leiomyom, Leiomyosarkom oder Leiomyoblastom interpretiert (Appelman 1986; Stout 1962). Durch die Nutzung der Elektronenmikroskopie in den späten 60er und frühen 70er Jahren konnte diese Tumorentität immer besser charakterisiert werden. Einige Tumoren wiesen neurogene Merkmale auf, welche bei Tumoren mit rein myogener Herkunft nicht auftraten (Kay und Still 1969; Welsh und Meyer 1969).

In den 80er Jahren wurden durch die Anwendung von immunhistochemischen Markern an GIST Unterschiede im Färbeverhalten zu Tumoren der glatten Muskulatur bestätigt. Die Expression von Aktin und Desmin, welche zur immunhistochemischen Darstellung glatter Muskelfasern genutzt wird, war seltener, aber dafür zeigte ein Teil der GIST-Positivität bei neurogenen Markern (S-100, Neuronenspezifische Enolase und PGP9.5). Neoplasien der glatten Muskulatur waren für diese Marker negativ (Coreless et al. 2004; Erlandson et al. 1996; Franquemont und Frierson 1992; Saul et al. 1987). 1983 wurde der Begriff GIST eingeführt (Mazur und Clark 1983), jedoch wurde diese Bezeichnung aufgrund des Fehlens eines spezifischen Markers kaum angenommen (Hirota und Isozaki 2006). Erst als festgestellt wurde, dass CD34 in einem großen Teil der GIST exprimiert wird (Miettinen et al. 1995; Monihan et al. 1994), wurde GIST als eine eigenständige Entität zunehmend akzeptiert. CD34 machte es leichter, GIST von anderen gastrointestinalen mesenchymalen Tumoren wie Leiomyome und Schwannome durch ihre Negativität für diesen Marker zu unterscheiden (Miettinen et al. 1995). Allerdings können einige fibroblastäre und endotheliale Tumoren CD34-positive Färbung aufweisen. Darüber variiert die Expression von CD34 je nach Lokalisation der GIST (Sarlomo-Rikala et al. 1998). Die Zuordnung der CD34-negativen, aber -ähnlichen Tumoren blieb unklar. Als 1998 herausgefunden wurde, dass fast alle

GIST-Zellen eine Expression von KIT, einer Rezeptor-Tyrosinkinase, zeigen und die meisten GIST-Mutationen im KIT-Gen (identisch CD117-Antigen) aufweisen, wurde GIST als eigenständige Entität akzeptiert (Hirota et al. 1998; Kindblom et al. 1998). Ein neuer sensitiver und spezifischer Marker war gefunden.

Die Hypothese, dass GIST entweder aus sogenannten interstitiellen Cajal-Zellen (ICC) oder aus gemeinsamen weniger differenzierten Stammzellen oder Vorläuferzellen entstehen, wurde durch die Feststellung bestärkt, dass GIST immunhistochemisch mit einem Antikörper für c-KIT darstellbar ist (Hirota et al. 1998; Kindblom et al. 1998). Die spindelförmigen Cajal-Zellen im Plexus myentericus bilden neuronale Netzwerke, denen eine Schrittmacherfunktion für die Motorik des Darmes zugeschrieben wird, da sie die Peristaltik koordinieren (Thomsen et al. 1998), und auch sie zeigen eine Positivität für CD34 (Hirota et al. 1998) auf. Unter dem Begriff Gastrointestinale Autonome Nerventumoren (GANT) wurden zunächst GIST zusammengefasst, die eine neurale Differenzierung aufwiesen.

Immunhistochemische und molekulare Untersuchungen deuteten jedoch daraufhin, dass sie eine Variante der GIST darstellen (Lee et al. 2001).

1.1.2 Epidemiologie

GIST ist mit 70% der häufigste mesenchymale Tumor des Gastrointestinaltraktes, dennoch ist nur 1% der gastrointestinalen Tumoren GIST zuzuordnen (Fletcher et al. 2002; Nilsson et al. 2005).

Es wird von einer Inzidenz zwischen 0,68 – 1,45 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr ausgegangen (Nilsson et al. 2005; Tran et al. 2005; Tryggvason et al. 2005).

Das Vorkommen von GIST weist keine eindeutigen Unterschiede in der Geschlechterverteilung auf, wobei in einigen Studien das Auftreten von malignen GIST häufiger bei Männern beschrieben wird (Miettinen und Lasota 2006).

GIST können ab dem Kindes- und Jugendalter in allen Altersklassen auftreten, jedoch liegt das mittlere Alter bei ca. 60 Jahren (Cassier et al. 2010; Corless et al. 2004; Corless et al. 2011).

Darüber hinaus wurde eine familiäre Häufung von GIST beobachtet mit Nachweis von Keimbahnmutationen von KIT, beziehungsweise *platelet-derived growth factor receptor alpha* (PDGFRA) (Antonescu 2006; Nishida et al. 1989). Zudem können multiple GIST bei der Neurofibromatose Typ I auftreten (Andersson et al. 2005; Miettinen et al. 2006a) oder im Rahmen der Carney-Trias (Carney 1979). Die meisten GIST-Fälle sind jedoch sporadisch.

1.1.3 Pathologische Merkmale

Makromorphologisch zeigen sich GIST oft als runde, scharf abgrenzbare und kapsellose Tumoren. Obgleich auch Pseudokapseln auftreten können (Connolly et al. 2003). Ihre Schnittfläche erscheint fleischig und solide, zentral eventuell mit zystischer Degeneration oder Blutung (Rubin 2006). Sie sind meistens uninodulär, können aber auch multinodulär auftreten. Ihre intramurale Lage im Gastrointestinaltrakt ist mit ihrer Herkunft aus den interstitiellen Cajal-Zellen zu erklären. Mit steigender Größe wachsen sie oft in das Darmlumen vor oder nach außen, wobei sie die Serosa vor sich herschieben (Corless et al. 2004; Füzesi 2003; Miettinen und Lasota 2003). Die Schleimhaut bleibt dabei überwiegend erhalten, bei verstrichener Fältelung. Sekundär kann es an der Spitze des Tumors zu Ulzerationen kommen (Hillemanns und Hofler 2000; Sabah et al. 2004).

GIST zeigen histologisch meistens ein einheitlich spindelzelliges Bild (ca. 70%). Eine epithelioide (ca. 20%) (Abb. 1) oder eine gemischte Form (<10%) kommen seltener vor und sind häufiger im Magen zu finden (Miettinen et al. 2005; Wasag et al. 2004). Die Anordnung kann storiform (fischschwarmartig) mit prominenter Kernreihung oder faszikulär (in Bündeln) sein. Hyaline, eosinophile, zytoplasmatische Strukturen, sogenannte skeinoide Fasern, können vorkommen und befinden sich vorwiegend in kleinen intestinalen GIST (Fletcher et al. 2002; Min 1992; Rubin 2006).

Abbildung 1: spindelzellige und epitheloide Morphologie bei GIST

Es wurden wenige Fälle beschrieben mit myxoidem Stroma. GIST zeigt gelegentlich ein neuroendokrinartiges Zellbild, welches Paragangliomen oder Karzinoiden ähnelt (Fletcher et al. 2002). Lymphozytische Infiltration wurde selten beschrieben (Shek et al. 1996).

Die klassischen Malignitätskriterien bei Weichteiltumoren wie Kernpolymorphien sowie – hyperchromasien sind bei GIST selten zu finden (Füzesi 2003). GIST zeigen kein invasives Wachstum wie epitheliale Tumoren.

GIST weisen ein spezifisches immunhistochemisches Verhalten auf. Sie zeigen fast alle (ca. 95%) eine positive Färbung für c-KIT (CD117) (Franquemont 1995; Sarlomo-Rikala et al. 1998). Des Weiteren reagieren GIST in 80% positiv auf die Anfärbung mit Bcl-2 (Coreless et al. 2004). Bcl-2 ist ein Protein, welches bei der Apoptose eine Rolle spielt. Auf die Anfärbung des CD34-Antigen zeigen 60 bis 70% der GIST eine positive Reaktion (Miettinen et al. 2000; Mikhael et al. 1994). Das CD34-Antigen, ein membranständiges Protein, kann man bei unreifen hämatopoetischen Stammzellen und bei Endothelzellen finden (Sarlomo-Rikala et al. 1998). Die Expression von CD34 weist keine Unterschiede bei benignen und malignen GIST auf (Miettinen et al. 2000).

SMA, ein myogener Marker, ist in 30 bis 40% der GIST positiv (Duffaud und Blay 2003). Glattmuskuläre Zellen - sowohl normale als auch neoplastische - und einige Myofibroblasten, können SMA (*smooth muscle antigen*) exprimieren.

S-100, ein weiterer immunhistochemischer Marker, wird insbesondere von neurogenen Zellen gebildet. GIST sind meistens negativ für S-100 (positiv in 5 bis

10%) und können deshalb von neurogen differenzierten Tumoren unterschieden werden (Duffaud und Blay 2003; Füzesi 2003).

1 - 2% zeigen Positivität für Desmin oder Keratin (Rubin 2006). Desmin kommt in der quergestreiften Muskulatur vor und Keratin weist den epithelialen Ursprung nach. In den letzten Jahren wurde Protein Kinase C theta (PKC theta) als ein weiterer Marker für GIST erkannt, der auch von c-KIT negativen GIST exprimiert wird (Blay et al. 2004; Duensing et al. 2004; Motegi et al. 2005). PKC theta ist ein Signalmolekül, welches bei der T-Zell-Aktivierung, Skelettmuskel Signaltransduktion und der neuronalen Differenzierung eine Rolle spielt. Ein weiterer Marker für GIST ist DOG1 (*discovered on GIST-1*), ein Protein mit unklarer Funktion, welches durch eine Genexpressionsanalyse entdeckt wurde und ebenfalls c-KIT immunonegative GIST anfärbt (West et al. 2004). DOG1 weist allerdings Grenzen in der Sensitivität und Spezifität für GIST auf (Miettinen et al. 2009). Um die mitotische Aktivität der Tumorzellen zu ermitteln, kommen Zellzyklusmarker wie MIB-1 für Proteine wie *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) und Ki-67 in Frage (Amin et al. 1993; Singer et al. 2002).

1.1.4 Klinisches Verhalten und Risikoeinteilung

Der häufigste Entstehungsort für GIST ist der Magen (60%), im Dünndarm haben 35% und im Kolon und Rektum <5% ihren Ursprung. Selten tritt GIST im Ösophagus und Appendix auf (<1%) (Miettinen und Lasota 2003). Lokalisationen wie Pankreas, Mesenterium, Omentum, Retroperitoneum und die Gallenblase wurden selten beschrieben (Daum et al. 2005; Miettinen et al. 1999a; Ortiz-Hidalgo et al. 2000; Reith et al. 2000). Die extragastrointestinalen Lokalisationen sprechen dafür, dass die Cajal-Zellen weiter verbreitet sind als vermutet (Miettinen et al. 1999b; Reith et al. 2000; Sakurai et al. 2001).

GIST haben eine Größe zwischen wenigen Millimetern und 35cm (Demetri et al. 2004). Die mittlere Größe liegt bei fünf Zentimetern (Hasegawa et al. 2002).

Das klinische Erscheinungsbild variiert je nach Tumorgröße und Lokalisation, dabei sind die häufigsten Symptome bei der Erstdiagnose Bauchschmerzen, gastro-intestinale Blutungen und eine abdominelle Raumforderung (Miettinen und Lasota 2003). Oft werden kleine, asymptomatische GIST zufällig bei radiologischen

Bildgebungen, Endoskopien und bei chirurgischen Eingriffen als zusätzlicher Befund entdeckt (Agaimy et al. 2008a; Agaimy et al. 2008b; Casali und Blay 2010; Corless et al. 2002).

Obduktionsstudien berichten eine hohe Inzidenz von Mikro-GIST, die vermutlich nicht in ein symptomatisches Stadium fortschreiten (Agaimy et al. 2007; Kawanowa et al. 2006).

GIST metastasieren vorwiegend in die Leber und peritoneal. Lokalrezidive sind häufig und Lymphknotenmetastasierung selten. Extraabdominale Ausbreitung wird vor allem in fortgeschrittenen Fällen beobachtet (DeMatteo et al. 2000). Alle GIST weisen ein gewisses Malignitätspotential auf, und kein GIST wird als wirklich benigne betrachtet (Fletcher et al. 2002). So entstand eine Einteilung, die das Risiko eines malignen Verlaufs einschätzt. Es wurde von gering malignen GIST berichtet, die noch 20 Jahre nach chirurgischer Entfernung wieder auftreten können (Franquemont 1995). Übereinstimmende Leitlinien für die Prognose von GIST wurden bei einem vom Nationalen Institut für Gesundheit/Nationalen Krebsinstitut im April 2001 geförderten Workshop zusammengetragen (Tab. 1). Betont wurden die Bedeutung von Tumorgroße und mitotischem Index zur Stratifizierung des Risikos bei Primärtumoren (Fletcher et al. 2002).

Tabelle 1 : Risikokategorien bei GIST nach Fletcher et al. (2002), S.464

Risiko	Tumorgroße	Mitosenanzahl
sehr niedrig	<2cm	<5/50 HPFs
niedrig	2 bis 5cm	<5/50 HPFs
intermediär	<5cm	6 bis 10/50 HPFs
	5 bis 10cm	<5/50 HPFs
hoch	>5cm	>5/50 HPFs
	>10cm	jede Anzahl
	jede Größe	>10/50 HPFs

Auch andere Studien belegten die prognostische Aussagekraft der Tumorgroße und der Mitoserate als Prognosefaktor (Emory et al. 1999; Singer et al. 2002). In einer retrospektiven Analyse wurde das Fünf-Jahre-krankheitsspezifische Überleben nach

primärer Tumorresektion betrachtet. Bei Tumoren größer als 10cm betrug das Überleben ungefähr 20% und bei Tumoren kleiner als 5cm war es ungefähr 60% (DeMatteo et al. 2000). Die Proliferation eines Tumors wird durch die Anzahl der Mitosen pro mm² definiert und von einem Pathologen unter einem Lichtmikroskop als Anzahl der Mitosefiguren in 50 *high-power-fields* (HPFs) angegeben. Ein weiterer wichtiger Prognosefaktor ist die Tumorlokalisation. GIST des Magens haben eine bessere Prognose als Tumoren, die im Dünn- und Dickdarm entstehen (Dematteo et al. 2008; Miettinen et al. 2002; Miettinen et al. 2005).

Es wurde eine Risikoklassifikation erstellt, die die anatomische Lokalisation berücksichtigt (Miettinen et al. 2002), welche 2006 unter Einbeziehung der klinisch-pathologischen Daten von 1600 Patienten revidiert veröffentlicht wurde (Tab. 2) (Miettinen und Lasota 2006).

Tabelle 2: Risikoeinschätzung bei GIST bezüglich der Lokalisation nach Miettinen und Lasota (2006), S.1474

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

*Keine Fälle beobachtet

1.1.5 Therapiemöglichkeiten

Bis Anfang 2000 gab es an sich drei Therapieformen. Es bestanden die Optionen der Resektion, der Strahlentherapie und der Chemotherapie (Blanke und Corless 2005). Die chirurgische Therapie von primären GIST ist die wichtigste Behandlungsmethode. Bei Patienten mit niedrigem und intermediärem Risiko wurden damit gute Ergebnisse erzielt, jedoch bei Patienten mit hohem Risiko existierte keine wirksame Therapie (DeMatteo et al. 2000; Singer et al. 2002). Wiederholte Resektion oder Chemotherapie zeigten keine großen Erfolge. Mono- oder Polychemotherapien ergaben Ansprechraten unter 5% (Demetri 2002). Diese enttäuschenden Ergebnisse hängen möglicherweise mit der hohen Expression von Bcl-2 und mit der multiplen Medikamentenresistenz von Proteinen vieler GIST zusammen (Miettinen et al. 1998; Plaat et al. 2000). Es wurde eine neue Therapiemöglichkeit entdeckt. Durch das Medikament Imatinib (STI571, Glivec; Novartis Pharma, Basel, Schweiz) war es möglich, GIST durch einen molekularbiologischen Therapieansatz selektiv zu behandeln. Imatinib ist ein oral applizierbares 2-Phenylaminopyrimidin-Derivat. Es hat Wirkung auf spezifische Tyrosinkinasen, indem es die ATP-Bindungsstelle kompetitiv blockiert (Buchdunger et al. 2000; Druker und Lydon 2000). Die Tyrosinkinasen, auf die Imatinib eine inhibitorische Wirkung hat, sind: C-ABL, BCR-ABL, KIT, PDGFRA und PDGFRB. Imatinib wurde anfänglich als Inhibitor für PDGFR und das BCR-ABL-Fusionsgen bei chronisch myeloischer Leukämie (CML) entwickelt. BCR-ABL entsteht durch eine reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 (Philadelphia-Chromosom) (Böcker et al. 2004) und führt zu einer dauerhaften Aktivierung der Tyrosinkinasen. Durch die Inhibition der Tyrosinkinase konnten Patienten mit CML in der chronischen Phase der CML und auch in der Blastenkrise therapiert werden (Druker et al. 2001; O'Dwyer und Druker 2000). In präklinischen Studien konnte eine Wirkung von Imatinib ebenfalls bei GIST nachgewiesen werden. Es wurde die Hemmung der Tyrosinkinasenaktivität des KIT-Protoonkogens (Heinrich et al. 2000) und die Hemmung des Wachstums einer menschlichen GIST-Zelllinie *in vitro* beschrieben (Tuveson et al. 2001). Durch eine erfolgreiche Therapie konnte die Wirksamkeit von Imatinib bei GIST bekräftigt werden. Eine Patientin mit GIST, die bereits Lebermetastasen aufwies, zeigte nach einigen Wochen Therapie mit Imatinib eine bis zu 75-prozentige Schrumpfung der Metastasen und sechs der 28 Läsionen waren nach acht Monaten Therapie nicht mehr zu entdecken (Joensuu et al. 2001). In einigen Studien wurden von

Ansprechraten bis zu 85% bei fortgeschrittenen GIST berichtet (Demetri et al. 2002; Joensuu et al. 2001; Sanborn und Blanke 2005). Es schlossen sich zwei Multicenterstudien an, die neben der Verträglichkeit, Dosierung und Wirksamkeit auch den Zusammenhang zwischen klinischer Ansprechbarkeit und Mutationsstatus betrachteten. Die Ergebnisse der einen Studie zeigten bei der Mutationsanalyse, die bei 127 Patienten durchgeführt wurde, dass Patienten mit einer KIT-Mutation im Exon 11 signifikant bessere Ansprechbarkeit auf Imatinib hatten (83,5%, n = 85) als Patienten mit einer KIT-Mutation im Exon 9 (48,7%, n = 23) oder als Patienten ohne KIT- oder PDGFRA-Mutation (0%, n = 9). Keiner der drei Patienten mit einer Exon 18 Punktmutation D842V des PDGFRA-Gens zeigte Ansprechbarkeit (Heinrich et al. 2003a). Imatinib ist für die Behandlung fortgeschrittener oder metastasierter GIST indiziert und zeigt sich als hochwirksam und relativ nebenwirkungsarm (Casali et al. 2008; Demetri et al. 2002; Demetri et al. 2007; Heinrich et al. 2003b). Darüber hinaus wurde ermittelt, wie lange eine Therapie mit Imatinib angewendet werden soll und welche Dosierung am sinnvollsten ist. Die Standarddosierung ist 400 mg pro Tag, wobei Patienten mit einer KIT-Exon-9-Mutation eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens bei einer Dosierung von 800 mg pro Tag zeigten (Yoo et al. 2013). Bei Tumorprogress ist der Standardansatz eine Dosiserhöhung von Imatinib von 400 mg auf 800 mg pro Tag (Zalcberg et al. 2005). Eine Studie zur adjuvanten Gabe von Imatinib über drei Jahre konnte, im Vergleich zu einer Gabe über ein Jahr, eine geringere Rezidivrate bei Hochrisiko-Patienten aufweisen (Joensuu et al. 2012). Eine neoadjuvante Therapie wird bei Patienten mit kaum resezierbaren GIST empfohlen (Blesius et al. 2011; Fiore et al. 2009). Für das nicht Ansprechen auf Imatinib wird eine primäre Resistenz vor allem bei KIT- und PDGFRA-Wildtyp, KIT-Exon-9 - Mutationen und bei PDGFRA-D842V-Mutation beobachtet. Mit Sunitinib (SU11248, Sutent; Pfizer, New York, Vereinigte Staaten) hat sich bereits eine Zweitlinientherapie herauskristallisiert. Sunitinib ist ein potenter Inhibitor von KIT, PDGFR und VEGF (*vascular endothelial growth factor*), welcher kurzfristigen klinischen Nutzen bei Imatinib-refraktären Patienten zeigt (Demetri et al. 2006; Van Glabbeke et al. 2005). Regorafenib (BAY 73-4506, Stivarga; Bayer, Berlin, Deutschland) wird als Drittlinientherapie verwendet (Demetri et al. 2013).

1.2 Die prognostischen Marker c-KIT und PDGFRA

1.2.1 Die Überexpression und Mutation des KIT-Rezeptors

KIT entspricht einer Typ-III-Rezeptortyrosinkinase, die intrazelluläre, transmembranöse und extrazelluläre Bestandteile hat (Schlessinger 2000). Das KIT Protoonkogen wird in hämatopoetischen Stammzellen, Mastzellen, Keimzellen exprimiert und spielt bei der Differenzierung zu Cajal-Zellen eine funktionelle Rolle (de Silva und Reid 2003; Maeda et al. 1992). KIT ist eng mit dem Rezeptor für *platelet-derived growth factor* (PDGF) und mit den Liganden für *colony stimulating factor 1 receptor* (CSF1R) und *FMS-related receptor* (FLT3) verwandt (Rousset et al. 1995). Tyrosinkinasen haben eine Bedeutung bei der zellulären Wachstumsregulation (Schlessinger 2000). Normalerweise wird die Tyrosinkinase durch die Bindung mit den entsprechenden homodimeren Liganden, dem Stammzellfaktor, aktiviert. Dabei werden zwei benachbarte Rezeptoren zusammengeschlossen (Dimerisierung) und eine Signalkaskade induziert, bei der zahlreiche Substrate phosphoryliert werden (Blume-Jensen et al. 1991). Viele dieser Substrate sind selbst Kinasen, die Einfluss auf die intrazelluläre Signaltransduktion haben. Verschiedene Mechanismen für Proliferation, Apoptose und die Zelldifferenzierung werden induziert (D'Amato et al. 2005; Haller 2008).

In GIST liegt eine Aktivierungsmutation der Rezeptortyrosinkinase vor. Es kommt zu einer Liganden-unabhängigen Autophosphorylierung. Im physiologischen Fall wird eine Signaltransduktion bei Bindung des Stammzellfaktors ausgelöst. (Hirota et al. 1998). Zugrunde liegen dieser dauerhaften Aktivierung Mutationen in bestimmten Exons. Durch diese Mutationen werden eine dauerhafte Aktivierung der Zellproliferation und ein Rückgang der Apoptose hervorgerufen, welche die Entstehung von GIST verursacht (Hirota et al. 1998). Das KIT-Gen ist in der Chromosomenregion 4q11-q12 lokalisiert (d'Auriol et al. 1988) und besteht aus 21 Exons. Allerdings treten KIT-Mutationen nur im Exon 11 (etwa 60-70%) aller GIST (Corless et al. 2002; Corless et al. 2004; Rubin et al. 2001), oder selten im Exon 9 (5-10%) (Antonescu et al. 2003; Hirota et al. 2001), 13 (1%) (Kinoshita et al. 2003; Lasota et al. 2000; Lux et al. 2000) und 17 (<1%) auf (Rubin et al. 2001). Es wurde von einer Familie berichtet, bei der eine KIT-Mutation im Exon 8 auftrat (Hartmann et al. 2005). Die im Exon 11 gefundenen KIT-Mutationen können Deletionen, Punktmutationen oder Duplikationen sein (Corless et al. 2002; Corless et al. 2004).

Im Exon 9 treten überwiegend Duplikationen auf (Hirota et al. 2001; Lasota et al. 2003). Punktmutationen werden in Exon 13 und 17 gefunden (Lasota et al. 2008).

Es gibt unterschiedliche Domänen, an denen Mutationen stattfinden (Abb. 2). Exon 9 kodiert für die extrazelluläre Domäne und Exon 11 kodiert für die juxtamembranäre Domäne. Zu den Enzymdomänen zählen die Tyrosinkinase-Domänen 1 (Exon 13) und 2 (Exon 17) (Hirota et al. 1998; Lux et al. 2000; Wardelmann et al. 2007).

KIT-Mutationen mit anschließender Daueraktivierung können in 60-70% aller GIST beobachtet werden (Duensing et al. 2004; Lasota et al. 1999; Lasota und Miettinen 2008; Rubin et al. 2001).

Sogar GIST, die immunhistochemisch negativ oder nur schwach positiv für c-KIT sind, können trotzdem eine KIT-Mutation aufweisen (Rubin et al. 2001). Umgekehrt sind GIST mit KIT-Mutationen in 95% c-KIT positiv (Corless et al. 2004).

1.2.2 Die Aktivierungsmutation im PDGFRA-Gen und die Gemeinsamkeiten des KIT- und PDGFRA-Rezeptors

PDGFRA ist ein Protein, welches ein Mitglied der gleichen Familie ist, aus der auch das KIT-Protein stammt. PDGFRA und KIT sind Typ-III-Rezeptortyrosinkinasen und fallen somit in dieselbe Klasse von Rezeptortyrosinkinasen und haben damit einen ähnlichen Aufbau (Rousset et al. 1995). Beide sind Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, welche in normalem Gewebe nur in bestimmten Situationen, wie zum Beispiel Zellerneuerung aktiviert werden. Das PDGFRA-Gen ähnelt dem KIT-Gen und eine Mutation von PDGFRA löst auch ohne das Binden seines Liganden PDGF-AA eine vergleichbare Signalkaskade, wie eine Mutation von KIT aus (Duesing et al. 2004; Heinrich et al. 2003a).

8% der GIST, die keine KIT-Mutation haben, haben eine Mutation im PDGFRA-Gen (Heinrich et al. 2003a; Heinrich et al. 2003b; Hirota et al. 2003). Diese befinden sich in Exon 12, 14 und 18 (Abb. 2) (Corless et al. 2005). Exon 12 kodiert für die juxtamembranäre Domäne, Exon 14 für die Tyrosinkinase-Domäne 1 und Exon 18 für die Tyrosinkinase-Domäne 2 (Lasota et al. 2004).

PDGFRA-mutierte Tumoren exprimieren immunhistochemisch sowohl c-KIT als auch PDGFRA und genauso exprimieren KIT-mutierte GIST sowohl c-KIT als auch PDGFRA (Haller et al. 2007). Dennoch kann durch die Intensität der Expression eine

Korrelation zum Mutationstyp erkannt werden. So zeigen sich PDGFRA-mutierte GIST schwach positiv oder negativ für die Expression von c-KIT und KIT-mutierte GIST verhalten sich umgekehrt (Pauls et al. 2005; Penzel et al. 2005).

Die meisten GIST weisen nur eine Mutation auf. GIST, die eine KIT-Mutation haben, haben keine PDGFRA-Mutation und umgekehrt. Es wird aber auch von einigen wenigen Tumoren berichtet, bei denen multiple Mutationen im selben Gen eines Tumors auftreten (Emile et al. 2004; Kitamura und Hirota 2004; Vu et al. 2005).

In 5 bis 10% aller GIST findet man aber keine der beiden Mutationen, was möglicherweise auf die Aktivierung eines alternativen Onkoproteins oder eines Substrates der KIT/PDGFRA-Signalkaskade hindeuten kann.

Abbildung 2: Rezeptortyrosinkinase KIT und PDGFRA: Schematische Darstellung der Lokalisation der gängigen Mutationen (Schema der Abbildung teilweise übernommen aus Wardelmann et al. 2007, S.745)

Abkürzungen:

ED: extrazelluläre Domäne;
JMD: juxtamembranäre Domäne;
TK 1: Tyrosinkinase-Domäne 1;
TK 2: Tyrosinkinase-Domäne 2

KIT- und PDGFRA-Mutationen werden in 90% der GIST beobachtet, so dass das Vorhandensein einer dieser beiden Mutationen allein keine eindeutige Malignitätsbeurteilung ermöglicht (Corless et al. 2002; Heinrich et al. 2003a; Heinrich et al. 2003b; Rubin et al. 2001). Dennoch zeigt der Mutationsstatus Zusammenhänge mit dem klinischen Verlauf. KIT-mutierte GIST zeigen eine ungünstigere Prognose als GIST mit einer PDGFRA-Mutation (Lasota et al. 2004; Lasota et al. 2006; Wardelmann et al. 2004), wobei auch für die verschiedenen KIT-Mutationen Unterschiede bezüglich des klinischen Verlaufs beschrieben wurden. So weisen

GIST mit einer KIT-Exon-11-Duplikation einen günstigen Verlauf auf (Lasota et al. 2003) und GIST mit einer Deletion im Exon 11 eine ungünstigere Prognose als GIST, die eine Punktmutation im Exon 11 haben (Andersson et al. 2006; Wardelmann et al. 2003). GIST mit einer KIT-Exon-9-Mutation werden mit einem klinisch ungünstigen Verlauf assoziiert (Antonescu et al. 2003; Lasota et al. 2003).

Des Weiteren weisen GIST mit KIT-Mutation eine ungünstigere Prognose als GIST ohne KIT-Mutation auf (Lasota et al. 1999).

Es werden ebenfalls Assoziationen zwischen dem Mutationsstatus und den klinisch-pathologischen Parametern beobachtet. Jedoch sind die Ursachen für die Zusammenhänge ungewiss (Lasota und Miettinen 2008). GIST mit PDGFRA-Mutationen sind meistens im Magen lokalisiert (Corless et al. 2004; Lasota et al. 2006; Wardelmann et al. 2004; Wasag et al. 2004). Zudem werden GIST mit einer KIT-Exon-11-Duplikation häufiger im Magen gefunden (Lasota et al. 2003). GIST mit einer KIT-Exon-9- und KIT-Exon-13 sowie KIT-Exon-17-Mutation wurden häufiger im Dünndarm beschrieben (Antonescu et al. 2003; Hirota et al. 2001; Lasota et al. 2008).

Der Mutationsstatus spielt auch eine Rolle bezüglich der Auswahl der Medikation. Die Ansprechbarkeit auf Medikamente wie Glivec und Sunitinib variiert je nach spezifischer Mutation. Patienten mit KIT-Mutationen im Exon 11 haben eine bessere und längere Ansprechbarkeit auf Glivec als Patienten mit Exon-9-Mutationen und als KIT-negative Patienten. Die Ansprechbarkeit auf Sunitinib bei einer entwickelten Glivec-Resistenz war für Patienten mit einer Exon-9-Mutation besser (Demetri et al. 2006). Bei Patienten mit einer PDGFRA-Mutation wird ein Nutzen von Glivec in 35% der Fälle vorhergesagt, was von der jeweiligen Mutation abhängt (Corless et al. 2005).

1.3 Betrachtung molekularer Veränderungen in Bezug auf alternative Marker

Abweichungen in den Zellzyklusregulatoren werden mit Proliferation und Progression von Tumorzellen in Verbindung gebracht.

1.3.1 Expression und prognostische Rolle von p16^{INK4A}

Ein wichtiges Gen auf Chromosom 9p21 ist der Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor-2A (CDKN2A). Das CDKN2A-Gen ist ein wichtiges Tumorsuppressorgen mit einer zentralen Rolle in der Kontrolle von Zellproliferation und Apoptose (Sherr 2001).

Alterationen des CDKN2A-Genlokus spielen in zahlreichen unterschiedlichen Tumorentitäten durch die zentrale Tumorsuppressorfunktion eine Rolle. Eins der beiden Transkripte des CDKN2A-Gens ist p16^{INK4A} (Quelle et al. 1995).

P16^{INK4A} inhibiert den Zellzyklus, indem es Zellen in der G1-S-Phase des Zyklus anhält (Okamoto et al. 1994). P16^{INK4A} bindet die Cyclin-abhängige-Kinase 4 und 6 (CDK4/CDK6), wodurch CDK4/CDK6 gehemmt wird, das Retinoblastom-Protein (RB) zu phosphorylieren und eine Progression der Zellen in die S-Phase verhindert wird (Serrano et al. 1993) (Abb. 3).

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Signalwegs, mit dem die Kernexpression von p16^{INK4A} den Zellzyklus reguliert

P16^{INK4A} wurde in einer Vielzahl von Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen evaluiert. Schneider-Stock et al. waren die ersten, die von einer genetischen Veränderung von CDKN2A und einem Verlust der korrespondierenden p16^{INK4A}-Kernexpression berichteten (Schneider-Stock et al. 2003). Des Weiteren wurde in dieser Studie eine niedrige immunhistochemische Anfärbung der Kernexpression von p16^{INK4A} und ein kürzeres Gesamtüberleben beobachtet. Zusätzlich zeigten andere Studien eine Korrelation zwischen genetischem Verlust oder Inaktivierung des CDKN2A-Gens und geringerer Verfügbarkeit von p16^{INK4A}-mRNA und der Proteinexpression von p16^{INK4A} (Haller et al. 2008; Perrone et al. 2005; Sabah et al.

2004). Während eine relativ kleine Studie eine signifikante Korrelation zwischen immunhistochemisch feststellbarem Verlust der p16^{INK4A}-Kernexpression und klinisch malignem Verhalten beobachteten (Ricci et al. 2004), konnte eine spätere Studie mit 277 primären GISTs eine Korrelation zwischen hohen Risikokategorien feststellen, aber es wurde nur eine Tendenz für kürzeres krankheitsfreies Überleben erkannt (Huang et al. 2006). Dagegen konnten zwei weitere Studien keine Korrelation zwischen der immunhistochemischen Kernexpression von p16^{INK4A} und Risikokategorien oder klinischem Verhalten entdecken (Nakamura et al. 2005; Nemoto et al. 2006). Bemerkenswert ist, dass alle diese Studien verschiedene p16^{INK4A}-Antikörper benutzt haben und es wurden auch unterschiedliche Kategorien für p16^{INK4A}-Negativität festgelegt.

Im Gegensatz zu diesen früheren Studien zeigte eine aktuellere immunhistochemische Tissue Microarray (TMA)-Studie von 434 primären GISTs eine signifikante Korrelation zwischen zytoplasmatischer p16^{INK4A}-Überexpression und kürzerem Gesamtüberleben (Steigen et al. 2008). Zu dieser Beobachtung passend gab es ähnliche Studien anderer Tumorentitäten. Es wurde von einer signifikant ungünstigen prognostischen Auswirkung von zytoplasmatischer p16^{INK4A}-Überexpression in Hochrisiko-Astrozytomen (Arifin et al. 2006) und von einer signifikanten Korrelation von hoher Tumorphiliferation (Emig et al. 1998) oder einem maligneren Phänotyp (Milde-Langosch et al. 2001) bei Brustkrebs berichtet. Es gibt starke Hinweise, dass eine zytoplasmatische Lokalisation von p16^{INK4A} spezifisch ist (Evangelou et al. 2004), und es könnte sogar das Ergebnis posttranslationaler Proteinmodifikation sein, welches in einer zweiten p16^{INK4A}-Form resultiert, die spezifisch im Zytoplasma auftritt (Nilsson und Landberg 2006).

1.3.2 Expression des Proteins E2F1

Der Transkriptionsfaktor E2F1 ist ein Promotor der Zellproliferation. In GIST wird seine Hochregulation mit beschleunigtem Tumorprogress assoziiert (Haller et al. 2005; Sabah et al. 2006). Unphosphoryliertes Retinoblastom-Protein (RB) bindet E2F1 und blockiert die durch E2F1 veranlasste Transkription von Genen, die wesentlich für die späte G1/S-Phasen-Progression sind (Blagosklonny und Pardee 2002; Weintraub et al. 1992). Das RB-Protein reguliert somit die Aktivität von E2F1 (Abb. 3). Eine Zellzyklusphasen-spezifische Phosphorylierung des Retinoblastom-

Proteins (RB) macht es funktionell inaktiv, so dass sich freies E2F1 im Nukleus ansammelt (Lundberg und Weinberg 1998; Zarkowska und Mitnacht 1997). Freies E2F1 initiiert den Eintritt in die S-Phase durch die Transkription von Proteinen wie Cyclin E, CDK2 und E2F1 selber (Lukas et al. 1996; Müller et al. 2001). Es hat nicht nur die Fähigkeit, seine eigene mRNA-Expression über positives Feedback hochzuregulieren (Ishida et al. 2001), es kann sogar Promotoren der G2/M-Phase wie Cyclin B transkribieren (Müller et al. 2001). Daher leitet E2F1 den letzten Schritt der Zellproliferation und spielt eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Zellprogression vom Ruhezustand zur Proliferation (Haller et al. 2005).

1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren

Prognostische Faktoren benötigt man bekanntlich in der klinischen Praxis, um

- den Verlauf einer Krankheit zu verstehen
- das Behandlungsergebnis eines einzelnen Patienten vorauszusagen
- die geeigneten Behandlungsmodalitäten auszuwählen
- die Unterschiede in den Behandlungsergebnissen zu erklären
- spezielle therapeutische Interventionen zu planen
- Untergruppen für optimale Behandlungsstrategien zu identifizieren
- die Einwilligung nach erfolgter Aufklärung zwischen Arzt und Patient auf eine gesicherte Grundlage zu stellen

Die Bestimmung von prognostischen beziehungsweise prädiktiven Faktoren beim GIST hat kurzgefasst das Ziel, den Krankheitsverlauf für den individuellen Patienten prospektiv möglichst genau abzuschätzen und die entsprechenden geeigneten Therapien auszuwählen. Dabei werden verschiedene Kriterien zur Unterscheidung von benignen und malignen gastrointestinalen Stromatumoren seit Jahren diskutiert. Die prognostisch bedeutendsten sind zurzeit die Tumorgröße und die mitotische Aktivität. Diese erklären jedoch zum Beispiel nicht die hochsignifikant unterschiedlichen Ergebnisse in den verschiedenen Primärlokalisationen von GIST (proximal versus distal).

Generell ist bei Studien zu prognostischen Faktoren zu unterscheiden zwischen gesicherten "klassischen" Prognosefaktoren, deren Bedeutung in unabhängigen Studien auch mit multivariaten Analyseverfahren bereits belegt ist, und den sog-

nannten "neuen" Prognosefaktoren, deren Bedeutung im Hinblick auf einen Einfluss auf das rezidivfreie und / oder Gesamtüberleben der Patienten noch nicht mit gleicher Sorgfalt geklärt ist.

1.4.1 Kriterien für die Evaluierung prognostischer Faktoren

Die Anforderungen an einen neuen Prognosefaktor wie z.B. zytoplasmatische p16^{INK4A}-Expression, nukleäre p16^{INK4A}-Expression oder E2F1-Expression, der sinnvoll Eingang in die Routinediagnostik finden sollte, sind hoch, da die Berücksichtigung nicht relevanter Faktoren nur zu einer Verunsicherung der betroffenen Patienten und oft auch ihrer behandelnden Ärzte führt, nicht aber zu einer Verbesserung der Abschätzung der individuellen Prognose. Voraussetzung für die Anerkennung eines neuen Prognoseparameters ist, dass seine Relevanz statistisch einwandfrei und reproduzierbar in unabhängigen Studien belegt werden konnte. Dies beinhaltet auch, dass für den entsprechenden Prognosefaktor eine unabhängige Relevanz in multivariater Analyse gezeigt werden muss, das heißt er muss eine prognostische Aussagekraft haben, die bei alleiniger Berücksichtigung der bislang gesicherten Faktoren nicht erreicht wird. Entscheidend für die klinische Relevanz ist hierbei nicht nur die multivariate statistische Signifikanz, sondern vor allem auch die Größe des Effekts über einen entsprechenden Zeitraum.

Entsprechend internationalen Empfehlungen müssen neue Prognosefaktoren den in der nachfolgenden Tabelle genannten Anforderungen genügen, bevor sie in Therapieentscheidungen außerhalb von Studien eingehen.

Die Evaluierung prognostischer Faktoren muss sich, ungeachtet einzelner Aspekte, an folgenden globalen Kriterien orientieren:

- signifikant
- unabhängig
- klinisch wichtig

Eine Verfeinerung dieser globalen Anforderungen ergibt folgende Kriterien für die Evaluierung prognostischer Faktoren:

1. biologische Hypothese
2. einfacher Nachweis für den Faktor
3. biostatistische Planung der Durchführung

4. Korrelation mit etablierten Faktoren
5. optimierte Schwellenwerte zur Unterscheidung in Niedrig-und Hochrisikogruppe
6. univariate und multivariate Analyse (Unabhängigkeit und Gewichtung von Faktoren)
7. Validierung der Ergebnisse in einem anderen Patientenkollektiv durch andere Untersuchungspersonen
8. klinische Studie, Auswirkung auf die Therapie
9. Überführung in die klinische Praxis

Überraschenderweise findet man trotz der großen Literaturfülle zu prognostischen Faktoren für GIST-Tumore nur selten prospektive Studien, die prognostische oder prädiktive Parameter berücksichtigen oder gar auf ihnen basieren. Studien, die die Gewichtung von Indikatoren / Prognosefaktoren vornehmen, fehlen bis auf ganz wenige Ausnahmen - wie zum Beispiel die Ergebnisse von Fletcher et al. (2002) oder Miettinen und Lasota (2006) - völlig.

1.5 Fragestellung

Klinisch und pathologisch repräsentieren GIST ein Spektrum von Tumoren, die benigne, maligne und intermediäre Varianten beinhalten. Es ist oft schwierig, eine klare Linie zwischen malignen und benignen Läsionen zu ziehen und malignes Verhalten vorauszusagen. Prognostische Eigenschaften, die auf Malignität oder ein hohes Risiko für klinisch aggressives Verhalten hinweisen, sind steigende Tumorgroße und mitotische Aktivität zusammen mit Tumorlokalisation (Miettinen et al. 2005; Miettinen et al. 2006b). Kleine Tumoren mit niedriger mitotischer Aktivität haben eine gute Prognose, wohingegen große Tumoren mit einer hohen Mitoserate üblicherweise malignes Verhalten aufweisen. Jedoch kann ein Teil kleiner und mitotisch inaktiver GIST aggressives Verhalten zeigen (Fletcher et al. 2002; Miettinen et al. 2002; Miettinen et al. 2005). Es mangelt außerdem an prädiktiver Genauigkeit, welche die Medikation erschwert.

Verschiedene spezifische Proteine wurden immunhistochemisch gefärbt, um deren potenzielle zusätzliche Nützlichkeit als prognostische Marker für GIST zu analysieren.

p16^{INK4A} wird als ein vielversprechender Marker betrachtet und wurde in diversen Studien evaluiert. Es wurden unterschiedliche Ergebnisse erhoben und zwei unterschiedliche monoklonale Antikörper gegen p16^{INK4A} verwendet.

Nach Herstellerangaben richten sich beide Antikörper gegen die ganze Länge des p16^{INK4A}-Proteins. Allerdings zeigen sie nahezu gegensätzliche Färbemuster. Der erste Antikörper (Klon F-12, Santa Cruz Biotechnology) zeigt vorwiegend Kernfärbung. Der zweite Antikörper (Klon JC8, Santa Cruz Biotechnology) stellt eine zytoplasmatische Färbung dar.

1.6 Ziele dieser Arbeit

1. Darstellung des untersuchten Kollektivs hinsichtlich der Zusammenhänge mit den klinisch-pathologischen Parametern und den aktuellen Risikoklassifikationen und der untersuchten Proteine sowie Vergleich diesbezüglich mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen
2. Darstellung des klinischen Verlaufs unter Berücksichtigung der klinisch-pathologischen Parameter und den aktuellen Risikoklassifikationen sowie der untersuchten Proteine des GIST-Kollektivs
3. Korrelation beider Antikörper gegen das p16^{INK4A}-Protein mit E2F1 und untereinander
4. Vergleich der prognostischen Bedeutung dieser beider Antikörper gegen das p16^{INK4A}-Protein und E2F1 bei 122 primären GIST bei univariater und multivariater Betrachtung

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

2.1.1 Zusammenstellung des Tumorkollektivs

Untersuchungsgegenstand der Dissertation waren 122 primäre GIST von 122 Patienten aus dem Archiv des Zentrums für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen aus den Jahren 1999 bis 2006. Die Patienten wurden nach den folgenden Kriterien ausgewählt:

- vollständige Resektion des Primärtumors
- keine Metastasen zum Zeitpunkt der Operation
- keine adjuvante Therapie mit Imatinib

2.1.2 Klinisch-pathologische Beurteilung der Tumoren

Makroskopisch wurde die Größe und die Lokalisation der Tumore beurteilt. Die histologische Diagnose GIST wurde an den Hämatoxylin-Eosin-gefärbten (HE) Paraffinschnitten der Fälle gestellt und durch die immunhistochemischen Färbungen (c-KIT, PDGFRA, CD34, S-100, SMA, Desmin) (Tab. 3) bestätigt. Die Mutationsanalyse der Gene KIT und PDGFRA ergänzte die Diagnostik. Am HE-Schnitt wurden die Mitosen bei *high-power-field* (HPF) gezählt. Die Einschätzung des Risikos für aggressives Tumorverhalten erfolgte nach Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006).

Morphologisch wurde spindelzelliges, epithelioides und gemischtes Wachstum unterschieden, wobei diese Beurteilung am TMA durchgeführt wurde.

Tabelle 3: Angewendete immunhistochemische Marker zur Diagnosesicherung eines GIST

Antikörper	Verdünnung	Klon	Firma	Firmensitz
c-KIT/CD117	1:200	Hase, polyklonal	Dako	Hamburg Deutschland
S-100	1:20	Hase, polyklonal	Beckman Coulter	Fullerton Kalifornien USA
CD34	1:50	QBEnd10	Beckman Coulter	Fullerton Kalifornien USA
SMA	1:50	1A4	Beckman Coulter	Fullerton Kalifornien USA
Desmin	1:1	D33	Beckman Coulter	Fullerton Kalifornien USA
PDGFRA	1:200	Hase, polyklonal	LabVision Corporation	Fremont Kalifornien USA

2.2 Herstellung des Tissue Microarray (TMA)

TMA ist eine materialsparende Methode, mit der man multiple Gewebeproben verschiedener Patienten zeitgleich analysieren kann. Die simultane Färbung der zahlreichen formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeproben auf einem Objektträger, ermöglicht nicht nur eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse, ist kostengünstiger und spart Reagenzien und Arbeitszeit.

2.2.1 Auswahl der Gewebeareale zur TMA-Herstellung

Die rekrutierten Gewebe (Spenderblöcke) wurden mit Hilfe des zugehörigen HE-Schnittes noch einmal mikroskopiert. Pro Patient wurden ein bis drei formalinfixierte und paraffineingebetteten Gewebelöcke ausgewählt. Für die TMA-Herstellung wurden nur solche Gewebeareale ausgewählt, die lichtmikroskopisch einen guten Gewebeerhalt, d.h. eine gute Fixierung aufwiesen. Ausschlusskriterien waren nachweisbare Nekrosen, Einblutungen, Bindegewebe oder zu wenig Tumoranteile im Gewebe. Da diese Paraffinblöcke das Ausgangsmaterial für die TMAs darstellten,

war ihre Qualität entscheidend. Die Spenderblöcke durften eine Dicke von 2mm nicht unterschreiten. Die besten Ergebnisse wurden mit Blöcken erzielt, die nicht dünner als 3-4mm waren.

Eine oder mehrere der repräsentativen Areale auf den jeweiligen zum Spenderblock korrespondierenden HE-Schnitt wurden mit einem feinen Permanentmarker auf dem Objektträger gekennzeichnet (Abb. 4). Diese Markierungen dienten später als Schablone zur Identifizierung der Areale auf den Paraffinblöcken.

Abbildung 4: Auswahl und Markierung der zu stanzenden Bereiche
Beispiel eines HE-gefärbten Schnittpräparates.

Der schwarz umrandete Bereich war stanzbares Tumorgewebe

2.2.2 Design des TMA

Mit dem Programm Tissue Arrays Design Software TMA-Designer® Version 1.1 der Firma Aphelys (ALPHELYS, Plaisir, Frankreich) wurde eine Anordnung für den TMA entworfen. In einer Zeile befanden sich 13 Stanzen mit einem Durchmesser von 1mm und einem Abstand von jeweils 1,8mm von Mitte zu Mitte der Stanzen.

In den Spalten befanden sich jeweils 8 Stanzen ebenfalls mit einem Abstand von jeweils 1,8mm. Der Durchmesser einer Stanze betrug 1mm. Ein Paraffinblock hatte somit 104 Spots, wobei 96 Tumorproben und 8 Markierungsproben gestanzt wurden. Pro Fall wählte man je 6 Stanzen, wenn möglich aus 3 verschiedenen Spenderblöcken. Die erste Spalte wurde ausschließlich für Gewebe genutzt, das zur

Orientierung diene und zudem als Positivkontrolle für einige Antikörper genutzt werden konnte. In der Anordnung: 2 Lebergewebe-Stanzen, 2 Positiv-Kontrolle-Schleimhaut, gefolgt von 2 Stanzen glatter Muskulatur und 2 PDGFRA-positiven Proben. 4mm Platz wurde an den Rändern der Paraffinblöcke gelassen, um eine Rissbildung am Ansatz zu vermeiden. Insgesamt wurden 16 Fälle auf einem Block gestanzt.

2.2.3 Erstellung des TMA

Der TMA wurde mit Hilfe eines manuellen Tissue Arrayers der Firma AlphaMetrix (AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark, Deutschland) gefertigt (Abb. 5).

Dem Empfängerblock wurde mit Hilfe einer Hohlstanze ein Paraffinzylinder entnommen (Abb. 6 A), womit ein Loch entstand. Mit einer zweiten Hohlstanze wurde der Spenderblock mit Tumorgewebe gestanzt (Abb. 6 B und C). Diese Probe wurde dann in das vorgestanzte Loch des Empfängerblocks überführt (Abb. 6 D).

Abbildung 5: Manueller Tissue Arrayer und Steuerinstrument

Abbildung 6: Der Stanzvorgang (Quelle: AlphaMetrix Biotech GmbH)

2.2.4 Nachbehandlung und Schneiden des Array-Blocks

Zur Nachbehandlung wurde der TMA 30min in einem Brutschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) bei 40°C erwärmt, um anschließend die überstehenden Gewebestützen in den Paraffinblock drücken zu können und die Oberfläche zu ebenen. Dadurch konnte die Anzahl der Schnitte maximiert werden, die alle Gewebestützen des Arrays beinhalten. Um die Stützen mit dem umgebenen Paraffin optimal zu verbinden und somit das Herausbrechen der Stützen während des Schneidens zu verhindern, wurde der Array Block für 20min auf 60°C in einem Metallförmchen erhitzt. In dem Metallförmchen befand sich bereits eine dünne Schicht flüssiges Paraffin. Anschließend wurde die Metallform mit dem Block für 10min auf einer Kühlplatte (Meditate Tissue Cool Plate COP20, Burgdorf, Deutschland) abgekühlt. Aus dem entstandenen TMA (Abb. 7) wurden Paraffin-schnitte in der Pathologie angefertigt und auf silanisierte Objektträger aufgezogen (Abb. 8).

Abbildung 7: TMA-Block: Vor und nach der in 2.2.4 beschriebenen Behandlung

2.3 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie werden Proteine *in situ*, also in der Zelle, mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Durch diese Methode ist es möglich, die Lokalisation der untersuchten Proteine innerhalb des Gewebeverbandes zu bestimmen und festzustellen, welche Zellen oder Zellkompartimente das gesuchte Antigen enthalten.

2.3.1 Silanisierte Objektträger

Objektträger der Firma Knittel (Knittel Glasbearbeitungs-GmbH, Braunschweig, Deutschland) wurden in einem Automaten der Firma Vogel (Vogel, Gießen, Deutschland) silanisiert, um bessere Haftung des Gewebes am Objektträger zu gewährleisten.

Die Objektträger wurden jeweils für eine Minute mit folgenden Komponenten behandelt:

- einmal Aceton
- zweimal 3-Aminopropyltriethoxysilane in Aceton (1:40)
- fünfmal Aceton zum Trocknen

Anschließend wurden die Objektträger für 20min bei 180°C sterilisiert.

Die 1 μ m dicken Paraffinschnitte wurden auf die silanisierten Objektträger nach Anweisung des Herstellers der Detektionsreagenzien (Dako, Glostrup, Dänemark) aufgezogen.

2.3.2 Immunhistochemie

Bei der *labeled-streptavidin-biotin-method* (LSAB) handelt es sich um eine Methode zur Detektion von Antigenen, die auf der hohen Affinität von Streptavidin (*streptomyces avidinii*) für Biotin basiert. Der Ablauf der LSAB-Methode sieht eine Inkubation mit Primärantikörper aus Maus oder Kaninchen, die darauf folgende Inkubation mit einem biotinylierten Immunglobulin (Sekundär- oder Brückenantikörper) gegen Maus oder Kaninchen und die abschließende Behandlung mit einem enzymmarkierten Streptavidin-Konjugat vor. Der Farbnachweis des Antigens erfolgt mittels Substrat-Chromogenlösung, die mit dem an Streptavidin-gekoppelten Enzym reagiert.

Bei der Fixierung und Einbettung des Gewebes in Paraffin kann es zum Verlust der Antigendeterminanten kommen, die durch enzymatische Behandlung oder Hitzevorbehandlung wieder rückgängig gemacht werden kann. Die Schnitte wurden 20min in Xylen entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (3x 100%, 1x 96%, 1x 75% EtOH jeweils eine Minute und fünf Minuten in destillierten H₂O) rehydriert. Zur Antigendemaskierung folgte eine 45-minütige Inkubation in 10mM Citratpuffer in einem Dampfgerät ("MultiGourmet" Braun, Deutschland). Für 10mM Citratpuffer (pH 6,0) wurde 10mM Citronensäuremonohydrat mit 2N NaOH auf pH 6,0 eingestellt.

Nach dieser Vorbehandlung erfolgte die weitere Versuchsdurchführung mit dem Dako Cytomation ChemMate Detection Kit Alkaline Phosphatase/Red Rabbit/Mouse (Dako, Glostrup, Dänemark) nach Angaben des Herstellers. Die Blockierung endogenen Biotins erfolgte mit 2% BSA in TBS-T für 10min. Der primäre Antikörper wurden in Zymed Diluent (Zymed Laboratories Invitrogen immunodetection, San Francisco, CA, USA) auf 1,5µg/mL verdünnt. Die Inkubationszeit betrug 30min bei Raumtemperatur.

Es folgte ein Waschschriff mit TBS pH 7,4. Anschließend wurden 150µl eines biotinylierten Sekundär-Antikörpers (Anti-Maus, Kaninchen-IgG) für 20 Minuten bei Raumtemperatur aufgebracht. Erneut folgte ein Waschschriff mit TBS pH 7,4. Als Tertiärreagenz wurden 150µl eines mit HRP konjugierten Streptavidin verwendet. Die Probe wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur damit inkubiert. Ein weiterer Waschschriff mit TBS pH 7,4 folgte. Die 20-minütige Farbreaktion erfolgte mit einer Substrat-Chromogenlösung (DAB=3,3'-Diaminobenzidin).

Nach diesem Protokoll wurden die unter Tabelle 3 aufgeführten und die folgenden primären Antikörper gefärbt (Tab. 4):

Tabelle 4: Analyisierte prognostische Marker

Antikörper	Verdünnung	Klon	Firma	Firmensitz
p16 ^{INK4A} (Kernexpression)	1:100	F-12 (Herkunft: Maus)	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz USA
p16 ^{INK4A} (zytoplasmatische Expression)	1:100	JC8 (Herkunft: Human)	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz USA
E2F1	1:200	KH95 (Herkunft: Maus)	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz USA

2.3.3 Gegenfärbung mit Hämalan

Um auch das übrige Gewebe, das keine Reaktion zeigte, im Mikroskop begutachten und die positiven Zellen besser einordnen zu können, wurden die Schnitte mit Hämalan gegengefärbt (Abb. 8).

Hämalan nach Mayer:

- 3g Hämatoxilin
- 0,2g Natriumiodat (NaIO₃)
- 50g Kaliumaluminiumsulfat
- in 1L ddH₂O lösen (über Nacht rühren)
- 50g Chloralhydrat
- 1g Zitronensäure
- über Nacht rühren, filtrieren

Die Schnitte wurden 1 Minute mit Mayers Hämalan ohne Eosin gegengefärbt und 3 – 5min mit heißem Leitungswasser gebläut. Zur dauerhaften Lagerung der Gewebsschnitte schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung

und die Überführung in Xylen an. Als letzter Schritt erfolgte das Eindecken der Schnitte am Gerät "Coveraid" Sakura (Finetechnical Co Ltd Nagano, Tokyo, Japan, Modell SCA-5600 Serial NR 95010385).

Abbildung 8: HE-gefärbtes Schnittpräparat

2.4 Auswertung der Färbung der TMA-Schnitte

2.4.1 Auswertung der Kernexpression von p16^{INK4A} und E2F1

Um die Auswertung der Kernexpression von p16^{INK4a} und E2F1 anhand eines von Dr. rer. nat. Robert Cameron geschriebenen Computerprogramms (Cameron et al. 2008) zu erstellen, wurde zunächst von jeder Stanze auf dem Objektträger mit einer 200-fachen Vergrößerung ein digitales Foto angefertigt (Olympus Camedia Digital Camera C-5050 Zoom, Olympus, Japan) (Abb. 9 A). Das Computerprogramm markierte und zählte im ersten Schritt alle Zellkerne (Abb. 9 B) und im zweiten Schritt nur die positiv gefärbten Kerne (Abb. 9 C) und errechnete somit den Anteil der Kernexpression an der Gesamtzahl der Kerne aus. So ließ sich ermitteln, wie viele Tumorzellen ein bestimmtes Protein exprimieren.

Abbildung 9: Quantitative Auswertung der Kernexpression von p16^{INK4A} und E2F1

Um die Sensitivität und Spezifität von p16^{INK4A} für das krankheitsfreie Überleben zu berechnen, wurde zunächst das beste Cut-Off gesucht. Nach dem Bland Kriterium muss der Cut-Off-Wert jedoch an einem von dem Auswertungsdatensatz unabhängigen Kollektiv berechnet werden. Ferner ist das krankheitsfreie Überleben zensiert, so dass an sich Algorithmen verwendet werden müssen, die den Cut-Off für zensierte Daten berechnen. Leider lag kein unabhängiger Datensatz vor, so dass wir zur Orientierung klassische *receiver operator characteristics curves* (ROC-Kurven) für einen approximativ besten Cut-Off-Wert der Kernexpression von p16^{INK4A} verwendet haben. Dies sind Limitierungen der Arbeit, die sich aus den Cut-Offs ergeben. In Teil 3 wurden zusätzlich Cox-Modelle mit den betreffenden Markern als kontinuierliche Werte berechnet. Hierfür gelten die hier gemachten Einschränkungen nicht.

Als approximativ besten Cut-Off-Wert erhielten wir gerundet 9% p16^{INK4A}-Kernexpression mit einer Sensitivität von 0,68 und einer Spezifität von 0,64 (Tab. 5). Der beste Cut-Off-Wert für die Vorhersage eines Rezidivs ist hierbei derjenige Wert, der gleichzeitig die höchste Sensitivität (=Verhältnis der richtig vorausgesagten Rezidive zu allen Rezidiven) und Spezifität (=Verhältnis der richtig vorausgesagten Nicht-Rezidive zu allen Nicht-Rezidiven) hat. Da sich dieser Wert nur geringfügig von dem in der Literatur verwendeten Wert von 10% unterscheidet, wurde ein Cut-Off-Wert von 10% für die weiteren Berechnungen verwendet.

Tabelle 5: Immunhistochemische Kernexpression von p16^{INK4A} bei 100 GIST: Relation Cut-Off-Wert und Sensitivität und Spezifität

Mittelwert Kernexpression von p16 ^{INK4A} (%)	Anzahl				Sensitivität	falsch negativ	falsch positiv	Spezifität
Cut-Off- Wert	A	B	C	D	A/(A+C)	C/(A+C)	B/(B+D)	D/(B+D)*
5,31	12	27	7	54	0,63	0,37	0,33	0,67
8,25	12	28	7	53	0,63	0,37	0,35	0,65
8,51	12	29	7	52	0,63	0,37	0,36	0,64
8,58	13	29	6	52	0,68	0,32	0,36	0,64
8,72	13	30	6	51	0,68	0,32	0,37	0,63
10,07	13	31	6	50	0,68	0,32	0,38	0,62
10,31	13	32	6	49	0,68	0,32	0,40	0,60

A = Anzahl der richtig vorausgesagten Rezidive,
D = Anzahl der richtig vorausgesagten Nicht-Rezidive
B = Anzahl der falsch vorausgesagten Rezidive,
C = Anzahl der falsch vorausgesagten Nicht-Rezidive

A+C = Anzahl aller Rezidive
B+D = Anzahl aller Nicht-Rezidive

Die Fläche AUC für die Kernexpression von p16^{INK4A} betrug 0,69 (95%-Konfidenzintervall: 0,56 – 0,83). Die Fläche AUC (*area under the curve*) unter der ROC-Kurve ist allgemein ein Kriterium für die Qualität des Parameters, wobei die Werte zwischen 0,5 (schlechtester möglicher Wert) und 1 (bestmöglichster Wert) liegen. 0,5 besagt, dass 50% der Werte falsch vorhergesagt werden (entspricht Würfeln), während der Wert 1 besagt, dass alle Fälle richtig klassifiziert werden. Mit Hilfe von ROC-Kurven erhielten wir 2,9 als besten Cut-Off-Wert für E2F1, um Patienten mit und ohne Rezidiv zu unterscheiden (Sensitivität: 0,62 und Spezifität: 0,65). Die Tabelle 6 gibt für verschiedene Cut-Off-Werte jeweils die zugehörige Sensitivität und Spezifität an.

Tabelle 6: ROC-Daten zur Berechnung des besten Cut-Off-Wertes für E2F1

E2F1 Mittelwert	Anzahl				Sensitivität	falsch negativ	falsch positiv	Spezifität
Cut-Off- Wert	A	B	C	D	$A/(A+C)$	$C/(A+C)$	$B/(B+D)$	$D/(B+D)^*$
2,62	55	6	37	11	0,60	0,40	0,35	0,65
2,85	56	6	36	11	0,61	0,39	0,35	0,65
2,88	57	6	35	11	0,62	0,38	0,35	0,65
2,88	57	7	35	10	0,62	0,38	0,41	0,59
3,1	58	7	34	10	0,63	0,37	0,41	0,59

A=Anzahl der richtig vorausgesagten Rezidive,
D=Anzahl der richtig vorausgesagten Nicht-Rezidive
A+C = Anzahl aller Rezidive
B+D = Anzahl aller Nicht-Rezidive

A+C = Anzahl aller Rezidive
B+D = Anzahl aller Nicht-Rezidive

Die Fläche AUC (*area under the curve*) unter der ROC-Kurve betrug 0,61, ist somit schlechter als der Wert für die Kernexpression von p16^{INK4A} (Abb. 10).

Abbildung 10: ROC-Kurve für die Kernexpression von p16^{INK4A}

Anmerkung: Fläche unter der ROC-Kurve (AUC)

Receiver operating characteristics (ROC) geben einen Überblick über Sensitivität und Spezifität eines diagnostischen Tests. In ihnen werden für verschiedene Cut-Off-Werte Sensitivität und Spezifität gegeneinander aufgetragen. Dies ergibt die ROC-Kurve. Der diagnostische Test weist Trennschärfe auf, wenn sich die Kurve signifikant von der Diagonalen (rote Linie) unterscheidet. Im Idealfall (100%ige Trennschärfe) liegt die Kurve auf der linken beziehungsweise oberen Begrenzungsseite des umschließenden Quadrates. Ein Maß für die Güte des Tests ist die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC: *area under curve*). Die Fläche kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen, wobei ein höherer Wert die bessere Güte anzeigt. AUC berechnet man am einfachsten mit der Trapezmethode, die im Allgemeinen die Fläche gut abschätzt. Die Fläche unter den ROC-Kurven folgt derselben Statistik wie nichtparametrische, vergleichende Rang-Tests (Wilcoxon-Statistik). Die Signifikanz einer AUC gegenüber der Fläche unterhalb der Diagonalen (Fläche unter der Diagonalen entspricht Raten) ist also einfach mit den üblichen Tests (Mann-Whitney-U-Test) auszurechnen.

2.4.2 Auswertung der zytoplasmatischen Färbung von p16^{INK4A}

Die Auswertung der zytoplasmatischen Färbung wurde semiquantitativ und unabhängig durch zwei Pathologen vorgenommen, welche bei jedem Tumor die am stärksten angefärbte Stanze betrachteten ohne vorherige Kenntnisse der klinisch-pathologischen Daten (Abbas Agaimy, Florian Haller).

Zunächst wurde eine Einteilung in drei Gruppen vorgenommen: 1, keine zytoplasmatische Färbung; 2, schwach positiv (-/+ in nur vereinzelten Tumorzellen) und 3, stark positiv (+++ in nahezu allen Tumorzellen). Die Auswertung wurde unter Betrachtung zweier Gruppen gemacht: niedrig <50% (1, 2) versus hoch >50% (3) der gefärbten Tumorzellen (Abb. 11).

Abbildung 11: Semiquantitative Auswertung der zytoplasmatischen Expression von p16^{INK4A}

2.5 Statistische Methoden

Der primäre Endpunkt ist das krankheitsfreie Überleben. Qualitative d.h. nominale und ordinale Daten wurden in Kontingenztabellen dargestellt und auf Unterschiede in den Häufigkeiten getestet (χ^2 -Test). Für kontinuierliche Parameter wurden Lageparameter und Streuungen berechnet und auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Bei nicht normalverteilten Daten wurden nichtparametrische Verfahren wie der Wilcoxon-Vorzeichen-Rank-Test verwendet. Vergleiche zwischen zwei unabhängigen nicht normal verteilten Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen als Kruskal-Wallis-Test. Korrelationen wurden als Rangkorrelation nach Spearman analysiert. Für alle Vergleiche wurde als Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ (Fehler erster Art) gesetzt. Die zensierten krankheitsfreien Überlebenszeiten, Mittelwerte und Mediane wurden mit Hilfe von Kaplan-Meier berechnet.

Mit Hilfe des Cox-Modells wurde der Einfluss von erklärenden Variablen auf die krankheitsfreien Überlebenszeiten untersucht. Ferner wurden die adjustierten Hazard Ratios und die 95%-Konfidenzintervalle als Maß für die Stärke des Zusammenhangs berechnet.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen SPSS© für Windows (SPSS, Version 20.0) und NCSS (2007).

3 Ergebnisse

3.1 Klinisch-pathologische Parameter

3.1.1 Altersverteilung und Geschlechterverhältnis der Patienten

Das mittlere Erkrankungsalter der 122 Patienten lag geschlechtsunabhängig bei 65,5 Jahren mit einer Standardabweichung von 12,4 Jahren. Der jüngste Patient war 33 Jahre, der Älteste war 90 Jahre und der Median lag bei 67 Jahren. 61,2% der Patienten waren Männer und 38,8% waren Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei Männern bei 64,4 ($\pm 11,8$) Jahren und bei Frauen im Mittel bei 67,1($\pm 13,4$) Jahren. Der Altersunterschied zwischen Männern und Frauen war nicht signifikant ($p=0,236$).

3.1.2 Tumorgroße

Der Mittelwert der Tumorgroße betrug 6,2 ($\pm 4,7$) cm. Der Median war 5cm, das Minimum 1cm und das Maximum 30cm. 52,5% der Patienten hatten eine Tumorgroße ≤ 5 cm und 47,5% eine Tumorgroße > 5 cm. Die Tumorgroße ist links-gipflig verteilt (Abb. 12). Der Kolmogorov-Smirnov-Test zur Überprüfung der Verteilungsform liefert eine (2-seitige) asymptotische Signifikanz ($p=0,006$). Damit besteht für die Tumorgroße eine hochsignifikante Abweichung von der Normalverteilung.

Abbildung 12: Histogramm der Tumorgroße mit Normalverteilungskurve von 122 GIST-Patienten

3.1.3 Mitose

67,2% der Patienten hatten eine Mitoserate $\leq 5/50$ HPF, 9,8% 6-10/50 HPF und 23% der Patienten eine Mitoserate $>10/50$ HPF. Der Mittelwert der Mitosenanzahl betrug 16,5 ($\pm 50,7$)/50 HPFs. Der hohe Mittelwert ergab sich durch einige Ausreißer (das Maximum lag bei 500/50 HPFs). Der Median war 3/50 HPFs. Die Mitosenanzahl ist linksgipflig verteilt (Abb. 13) und damit nicht oder nur gering normalverteilt. Dies wird durch den Kolmogorov-Smirnov-Test bestätigt (2-seitige asymptotische Signifikanz $p=0,08$).

Abbildung 13: Histogramm der Mitoserate mit Normalverteilungskurve bei 122 primären GIST

Die Verteilung der Mitosenanzahl unterscheidet sich signifikant (Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$) in den Tumorgrößengruppen TG-1= „ $\leq 5\text{cm}$ “ und TG-2= „ $5\text{-}10\text{cm}$ “ und TG-3 = „ $>10\text{cm}$ “ (Abb. 14). Der Mittelwert der logarithmierten Mitosenanzahl beträgt für TG-1 $1,2 (\pm 1,2)$, für TG-2 $2,0 (\pm 1,5)$ und für TG-3 $2,8 (\pm 1,2)$. 47 (81,0%) der GIST-Patienten mit Tumorgröße $\leq 5\text{cm}$ hatten eine Mitoserate $\leq 5/50$ HPF. Dagegen hatten nur 4 (26,7%) der Patienten mit einer Tumorgröße $>10\text{cm}$ eine Mitoserate $\leq 5/50$ HPF (Abb. 14). Die Mitoserate ist wie die Tumorgröße selbst nicht normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov: $p < 0,001$), jedoch der Logarithmus der Mitoserate.

Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der Tumorgröße und Mitoserate von 122 primären GIST

3.1.4 Tumorlokalisation

Von den 122 primären GIST hatten 66% ihren Ursprung im Magen (proximal) und 34% waren im Dün- und Dickdarm (distal) lokalisiert. Für die proximalen GIST betrug der Mittelwert der Tumorgröße bei 6,2 ($\pm 4,6$) cm und für die 42 distalen GIST 6,3 ($\pm 4,8$) cm (Abb. 15). Die Verteilung der Tumorgröße unterscheidet sich nicht signifikant in den beiden Tumorlokalisationen (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,895$).

Abbildung 15: Boxplots des Logarithmus der Tumorgroße in Abhängigkeit von den Lokalisationen proximal und distal bei 122 primären GIST

Das Ergebnis des Mann-Whitney-U-Tests zeigte keinen signifikanten Unterschied in den Verteilungen der Mitoseraten zwischen distal und proximal lokalisierten primären GIST (Abb. 16). Der Pearson- χ^2 -Test bestätigt noch einmal, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Mitoseraten in den beiden Lokalisationen gibt (asymptotische 2-seitige Signifikanz $p=0,827$, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: $p=0,225$).

Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Mitoseraten in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation von 122 primären GIST

Proximale GIST wiesen im Mittel 16,8 ($\pm 58,0$) Mitosen auf und distale GIST 16,1 ($\pm 33,1$) auf (Abb. 17).

Abbildung 17: Boxplots des Logarithmus der Mitoserate in Abhängigkeit von den Lokalisationen proximal und distal in 122 primären GIST

3.1.5 Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002)

Die Risikoklassifikation nach Fletcher (2002), welche die Tumorgroße und Mitoserate berücksichtigt, ergab bei 122 primären GIST ein hohes Risiko in 34,4% der Fälle, ein intermediäres Risiko in 23,0%, ein niedriges Risiko in 30,3% und ein sehr niedriges Risiko in 12,3% Fällen (Abb. 18).

Abbildung 18: Prozentuale Verteilung der Risikogruppen nach Fletcher et al. (2002) bei 122 primären GIST

3.1.6 Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006)

Die Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006), welche Tumorgroße, Mitoserate und Tumorlokalisation berücksichtigt, ergab ein hohes Risiko bei 28%, ein intermediäres Risiko bei 11%, ein niedriges Risiko bei 49% und ein sehr niedriges Risiko bei 12% Tumoren (Abb. 19).

Abbildung 19: Prozentuale Verteilung der Risikogruppen nach Miettinen und Lasota (2006) bei 122 primären GIST

Aus der Kreuztabelle zwischen Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006) erkennt man, dass die Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002) in sehr niedrig und niedrig mit der Klassifikation nach Miettinen und Lasota (2006) übereinstimmt (Tab. 7). Erhebliche Abweichungen gibt es dagegen für Patienten mit intermediärem beziehungsweise hohem Risiko festzustellen. So sind 19% der Patienten mit hohem Risiko nach Fletcher et al. (2002) in der Klassifikation nach Miettinen und Lasota 2006 in der Gruppe der Patienten mit intermediärem Risiko. Insgesamt unterscheiden sich die Klassifikationen nach Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006) hochsignifikant (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$).

Tabelle 7: Kreuztabelle zwischen Risikoklassifikationen von Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006)

Risikoklassifikation		Miettinen und Lasota (2006)			
		hoch	intermediär	niedrig	sehr niedrig
Fletcher et al. (2002)	hoch	81,0%	19,0%		
	intermediär		17,9%	82,1%	
	niedrig			100,0%	
	sehr niedrig				100,0%

3.2 Korrelation der untersuchten Proteine

Im Folgenden werden die Korrelationen zwischen zytoplasmatischer p16^{INK4A} – Expression, nukleärer p16^{INK4A}-Expression und E2F1-Expression ausgewertet. Diese drei Expressionen waren nicht normal verteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test: 2-seitige asymptotische Signifikanz: $p < 0,01$).

3.2.1 Zytoplasmatische p16^{INK4A}-Expression

121 (99,2%) der 122 Tumoren waren auf dem TMA auswertbar. Der Median der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression lag bei 1 und der Mittelwert bei 1,2 ($\pm 1,1$).

Das Minimum lag bei 0, das Maximum bei 3. Von diesen 121 Tumoren hatten 60,3% eine niedrige (= positive Zellen $\leq 50\%$) und 39,7% eine hohe (= positive Zellen $>50\%$) zytoplasmatische p16^{INK4A}-Expression. Die zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression weicht stark von der Normalverteilung ab (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p=0,004$) (Abb. 20).

Abbildung 20: Histogramm der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression mit Normalverteilungskurve bei 121 GIST

3.2.2 Nukleäre p16^{INK4A}-Expression

Für die Kernexpression von p16^{INK4A} erhielt man als besten Cut-Off-Wert 10%.

100 (82%) der 122 primären GIST waren auswertbar (Abb. 21). 43 (43%) Tumoren hatten eine nukleäre p16^{INK4A}-Expression ≤ 10 und 57 (57%) eine nukleäre p16^{INK4A}-Expression >10 . Der Median der nukleären p16^{INK4A}-Expression lag bei 14,4 und der Mittelwert bei 17,7 ($\pm 16,2$). Das Minimum lag bei 0,02 und das Maximum bei 65,7. Die nukleäre p16^{INK4A}-Expression weicht stark von der Normalverteilung ab (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p=0,007$).

Abbildung 21: Histogramm der nukleären p16^{INK4A}-Expression mit Normalverteilungskurve bei 100 GIST

3.2.3 E2F1-Expression

Von den 122 GIST waren 109 Tumoren (89,3%) bezüglich der E2F1-Expression auswertbar. Die immunhistochemische Auswertung von E2F1 erfolgte quantitativ durch das in 2.4 beschriebene Computerprogramm (Abb. 22). Der Median der E2F1-Expression lag bei 1,8 und der Mittelwert bei 3,4 ($\pm 3,8$). Das Minimum lag bei 0,05 und das Maximum bei 17,9. Ein optimaler Cut-Off-Wert für rezidivfreies Überleben lag bei 2,9. 56,9% Tumoren hatten eine E2F1-Expression $\leq 2,9$ und 43,1% eine E2F1-Expression $> 2,9$. Die E2F1-Expression ist ebenfalls nicht normal verteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p=0,001$).

Abbildung 22: Histogramm der Kernexpression von E2F1 mit Normalverteilungskurve bei 109 GIST

3.2.4 Korrelation zwischen zytoplasmatischer und nukleärer p16^{INK4A}-Expression

Die Auswertung der zytoplasmatischen in Abhängigkeit von der Kernexpression von p16^{INK4A} zeigte nur eine geringe beziehungsweise keine Korrelation. Der Spearman-Korrelationskoeffizient zwischen der zytoplasmatischen und der Kernexpression von p16^{INK4A} betrug 0,051-Wert (2-seitige Signifikanz: $p=0,617$). Dieses Ergebnis kann auch unmittelbar aus dem Streudiagramm abgelesen werden (Abb. 23). Es wird zusätzlich unterstützt durch das Ergebnis eines Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests als weiterer nichtparametrischer statistischer Test. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests zeigt, dass die Null-Hypothese H_0 = „Der Median der Differenzen zwischen der zytoplasmatischen und der Kernexpression von p16^{INK4A} ist Null“ abgelehnt werden muss ($p<0,001$).

Abbildung 23: Streudiagramm der zytoplasmatischen und der Kernexpression von p16^{INK4A} bei 100 GIST

Die nächste Frage ist, ob sich die Verteilungen der p16^{INK4A}-Kernexpression zwischen der niedrigen und der hohen zytoplasmatischen Expressionsuntergruppe unterscheiden. Der Mann-Whitney-U-Test zeigt, dass die Verteilungen der p16^{INK4A} - Kernexpression in diesen beiden zytoplasmatischen Expressionsuntergruppen nicht signifikant unterschiedlich sind (asymptotische 2-setige Signifikanz; Kernexpression von p16^{INK4A}: $p=0,736$) (Abb. 24).

Abbildung 24: Die Verteilung der Kernexpression von p16^{INK4A} jeweils in der Gruppe mit niedriger beziehungsweise hoher zytoplasmatischer p16^{INK4A}-Expression

Die Tatsache, dass es keine signifikanten Unterschiede der Verteilungsformen in den beiden Untergruppen gibt, impliziert, dass es auch keine signifikanten Unterschiede in den anderen Kenngrößen wie z.B. dem Mittelwert gibt (Tab. 8).

Tabelle 8: Fallzahlen, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und die 2-seitige Signifikanz (Mann-Whitney-U-Test)

Kernexpression von p16	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Standard-fehler	Mann-Whitney-U-Test
niedrige zytoplasmatische Expression von p16	60	18,2	16,7	2,3	p = 0,643
hohe zytoplasmatische Expression von p16	40	17,1	15,7	2,6	

3.2.5 Korrelation zwischen nukleärer p16^{INK4A}- und E2F1-Expression

Die Rangkorrelation nach Spearman zeigte eine geringe bis mittlere inverse Relation zwischen der Kernexpression von p16^{INK4A} und E2F1, die jedoch hochsignifikant ist (Abb. 25). Der Spearman-Korrelationskoeffizient zwischen der Kernexpression von p16^{INK4A} und der Kernexpression von E2F1 beträgt -0,415-Wert (2-seitige Signifikanz: $p < 0,001$).

Abbildung 25: Streudiagramm der Kernexpression von p16^{INK4A} und E2F1

Der negative Wert -0,415 ($p < 0,001$) der Rangkorrelation nach Spearman besagt, dass niedrige Werte der Kernexpression von p16^{INK4A} mit einer Hochregulierung von E2F1 verbunden sind und umgekehrt. Dies lässt sich auch unmittelbar aus dem Streudiagramm ablesen.

Ein Vergleich der Kernexpression von E2F1 in Abhängigkeit von der Kernexpression von p16^{INK4A} zeigte einen hochsignifikanten Unterschied in der Verteilung der Häufigkeiten (Mann-Whitney-U-Test und Kolmogorov-Smirnov-Test: $p < 0,0001$) (Abb. 26).

Abbildung 26: Die Verteilungen der Kernexpression von E2F1 in den beiden Kernexpressionsuntergruppen von p16^{INK4A}

Die Unterschiede in der Verteilung führen zu signifikanten Unterschieden zum Beispiel in den Mittelwerten (Tab. 9).

Tabelle 9: Fallzahlen, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und die 2-seitige Signifikanz (Mann-Whitney-U-Test)

Kernexpression von E2F1	n	Mittelwert	Standard-Abweichung	Standard-Fehler	Mann-Whitney-U-Test
Kernexpression von p16 ≤10	40	4,7	4,2	0,7	p<0,001
Kernexpression von p16 >10	50	2,3	3,0	0,4	

3.2.6 Korrelation der zytoplasmatischen p16^{INK4A}- und E2F1-Expression

Wie in 3.2.5 gezeigt wurde, hatte die Rangkorrelation nach Spearman eine geringe bis mittlere inverse Relation zwischen der Kernexpression von p16^{INK4A} und E2F1. Da es aber nach 3.2.4 zwischen der Kernexpression von p16^{INK4A} und der zytoplasmatischen Expression von p16^{INK4A} keine Korrelation gibt, kann es folglich auch keine Korrelation zwischen der zytoplasmatischen p16^{INK4A} und der E2F1-Expression geben. Dies wird wieder durch die Rangkorrelation nach Spearman bestätigt. Der Spearman-Korrelationskoeffizient zwischen der zytoplasmatischen Expression von p16^{INK4A} und der Kernexpression von E2F1 beträgt 0,09 (2-seitige Signifikanz: $p=0,352$). Dieses Ergebnis kann auch unmittelbar aus dem Streudiagramm (Abb. 27) abgelesen werden.

Abbildung 27: Streudiagramm der zytoplasmatischen Expression von p16^{INK4A} und E2F1

Ein Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Kernexpression von E2F1 in Abhängigkeit von niedriger oder hoher zytoplasmatischer Expression von p16^{INK4A} zeigte

keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,148$ und Kolmogorov-Smirnov-Test: $p=0,331$) (Abb. 28).

Abbildung 28: Die Verteilung der Kernexpression von E2F1 jeweils in der Gruppe mit niedriger beziehungsweise hoher zytoplasmatischer $p16^{INK4A}$ -Expression

3.3 Korrelation der immunhistochemischen Marker mit den klinisch-pathologischen Parametern

3.3.1 Tumorgroße

Die Verteilungen der zytoplasmatischen $p16^{INK4A}$ -Expression sind in den beiden Patientenuntergruppen mit der Tumorgroße $\leq 5\text{cm}$ und Tumorgroße $> 5\text{cm}$ nicht signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,197$) (Abb. 29). Als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung erhielt man 1,1 ($\pm 1,1$) für Patienten mit Tumorgroße $\leq 5\text{cm}$ und 1,4 ($\pm 1,1$) für Patienten mit Tumorgroße $> 5\text{cm}$. Ebenso sind die Verteilungen der $p16^{INK4A}$ -Kernexpression in den beiden Patientenuntergruppen mit Tumorgroße $\leq 5\text{cm}$ und Tumorgroße $> 5\text{cm}$ nicht signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,292$) (Abb. 30). Für eine Tumorgroße $\leq 5\text{cm}$ erhielt man einen Mittelwert von 19,6 ($\pm 16,2$) für die $p16^{INK4A}$ -Kernexpression und für eine Tumorgroße $> 5\text{cm}$ einen Mittelwert von 15,9 ($\pm 15,6$). Dagegen sind die Verteilungen der E2F1-Expression in den beiden Patientenuntergruppen mit Tumorgroße $\leq 5\text{cm}$ und Tumorgroße $> 5\text{cm}$

hochsignifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-U-Test oder Kolmogorov-Smirnov-Test: $p=0,001$) (Abb. 31).

Abbildung 29: Die Verteilung der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression für Patienten mit Tumorgröße ≤5cm beziehungsweise >5cm

Abbildung 30: Die Verteilung der Kernexpression von p16^{INK4A} für Patienten mit Tumorgröße ≤5cm beziehungsweise >5cm

Abbildung 31: Die Verteilung der Kernexpression von E2F1 für Patienten mit Tumorgroße ≤ 5 cm beziehungsweise > 5 cm

Als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung für die Kernexpression von E2F1 erhielt man 2,6 ($\pm 3,7$) für Patienten mit Tumorgroße ≤ 5 cm und 4,3 ($\pm 3,7$) für Patienten mit Tumorgroße > 5 cm. E2F1 ist in den beiden Untergruppen nicht normalverteilt.

3.3.2 Mitoserate

Die Nullhypothese, nach der H_0 = „Die Verteilungen der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression in den beiden Patientenuntergruppen mit Mitoserate ≤ 5 und $> 5/50$ HPF identisch“ ist, ist mit dem Mann-Whitney-U-Test nicht abzulehnen ($p=0,051$). Als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung für die zytoplasmatische p16^{INK4A}-Expression erhielt man 1,1 ($\pm 1,1$) für Patienten mit einer Mitoserate $\leq 5/50$ HPF und 1,5 ($\pm 1,2$) für Patienten mit Mitoserate $> 5/50$ HPF. Dagegen sind die Verteilungen der Häufigkeiten der p16^{INK4A}-Kernexpression in den beiden Patientenuntergruppen mit Mitoserate $\leq 5/50$ und $> 5/50$ HPF hochsignifikant verschieden (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,006$) (Abb. 32).

Abbildung 32: Die Verteilung der p16^{INK4A}-Kernexpression für Patienten mit Mitoserate ≤5 beziehungsweise >5/50 HPF

Für Patienten eine Mitoserate ≤5/50 HPF erhielt man einen Mittelwert von 21,1 ($\pm 16,8$) für die p16^{INK4A}-Kernexpression und für eine Mitoserate >5/50 HPF einen Mittelwert von 11,6 ($\pm 13,2$).

Ebenso ist die Nullhypothese „Die Verteilungen der E2F1-Expression sind in den beiden Patientenuntergruppen mit Mitoserate ≤5 und >5/50 HPF identisch“ abzulehnen (Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$). Als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung für die E2F1-Expressionen erhielt man 2,6 ($\pm 3,3$)/50 HPF mit Mitoserate ≤5 und 5,2 ($\pm 4,2$)/50 HPF für Patienten mit Mitoserate >5.

3.3.3 Lokalisation

Die Nullhypothese „Die Verteilungen der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression sind in den beiden Patientenuntergruppen mit proximalen und distalen GIST identisch“ ist nicht abzulehnen (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,108$).

Proximale GIST wiesen im Mittel eine zytoplasmatische p16^{INK4A}-Expression von 1,1 ($\pm 1,1$)% auf, während distale GIST im Mittel eine Expression von 1,4 ($\pm 1,1$)%.

Ebenso ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Verteilungen der p16^{INK4A}-Kernexpression in den beiden Patientenuntergruppen mit proximalen GIST

und distalen GIST (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,516$). Proximale GIST wiesen im Mittel eine p16^{INK4A}-Kernexpression von 1,1 ($\pm 1,1$)% auf, während distale GIST im Mittel eine Expression von 1,4 ($\pm 1,1$)%. Proximale GIST wiesen im Mittel eine p16^{INK4A}-Kernexpression von 16,8 ($\pm 15,8$)% auf, während distale GIST im Mittel eine Expression von 19,7 ($\pm 17,1$)%.

Dagegen ist wiederum die Nullhypothese „Die Verteilungen der E2F1-Expression sind in den beiden Patientenuntergruppen mit proximalen GIST beziehungsweise distalen GIST identisch“ abzulehnen (Mann-Whitney-U-Test: $p<0,001$) (Abb. 33).

Abbildung 33: Die Verteilung der Kernexpression von E2F1 für Patienten mit proximalen und distalen GIST

Als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung für die E2F1-Expressionen erhielt man 4,5 ($\pm 4,2$) für Patienten mit distalen GIST und 1,6 ($\pm 1,8$) für Patienten mit proximalen GIST.

Tabelle 10: Hypothesentestübersicht der immunhistochemischen Marker und den klinisch-pathologischen Parametern (Die Nullhypothese ist beizubehalten, wenn $p > 0,05$ ist)

Nullhypothese	Lokalisation (proximal / distal)	Tumorgröße ($\leq 5\text{cm}$ / $> 5\text{cm}$)	Mitoserate (≤ 5 / > 5)
die Verteilungen der zytoplasmatischen Expressionen von p16^{INK4A} sind in den beiden Untergruppen identisch	0,108	0,197	0,051
die Verteilungen der Kernexpressionen von p16^{INK4A} sind in den beiden Untergruppen identisch	0,516	0,292	0,006
die Verteilungen der Kernexpressionen von E2F1 sind in den beiden Untergruppen identisch	$< 0,001$	0,001	$< 0,001$

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Verteilungen der Kernexpressionen von E2F1 in den verschiedenen Untergruppen für Lokalisation, Tumorgröße und Mitoserate hochsignifikant unterschiedlich sind (Tab. 10). Dagegen sind die Verteilungen der zytoplasmatischen Expressionen von p16^{INK4A} in keiner der klinisch-pathologischen Parameter signifikant unterschiedlich. Die Verteilungen der Kernexpressionen von p16^{INK4A} sind nur für die Untergruppen der Mitoserate signifikant unterschiedlich. Hiermit erklären sich die Unterschiede in den weiteren Charakteristika (Mittelwerte, Mediane usw.) der oben definierten Untergruppen.

3.3.4 Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002)

Von den 48 GIST Patienten mit einer zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression $> 50\%$ hatten 35,4% ein niedriges und ein sehr niedriges Risiko, 14,6% ein intermediäres Risiko und 50,0% ein hohes Risiko. Von den 73 Patienten mit einer zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression $\leq 50\%$ hatten 46,6% ein niedriges und ein sehr niedriges Risiko, 28,8% ein intermediäres Risiko und 24,7% ein hohes Risiko.

Tabelle 11: Kreuztabelle zwischen den beiden Untergruppen der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression und der Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002)

			Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002)			gesamt
			hoch	intermediär	niedrig/ sehr niedrig	
zytoplasmatische p16 ^{INK4A} -Expression	≤50	Anzahl	18	21	34	73
		% innerhalb der zytoplasmatischen p16 ^{INK4A} -Expression	24,7%	28,8%	46,6%	100,0%
	>50	Anzahl	24	7	17	48
		% innerhalb der zytoplasmatischen p16 ^{INK4A} -Expression	50,0%	14,6%	35,4%	100,0%
gesamt		Anzahl	42	28	51	121
		% innerhalb der zytoplasmatischen p16 ^{INK4A} -Expression	34,7%	23,1%	42,1%	100,0%

Die Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002) in den beiden zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expressionsuntergruppen unterschieden sich signifikant (Chi-Quadrat-Test nach Pearson: 2-seitige asymptotische Signifikanz $p=0,013$) (Tab. 11).

Analog erhalten wir die entsprechenden Werte für die Kernexpressionen von p16^{INK4A} (Tab. 12) und der Kernexpressionen von E2F1 (Tab. 13).

Tabelle 12: Kreuztabelle zwischen den beiden Untergruppen der Kernexpressionen von p16^{INK4A} und der Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002) (n=100; p=0,153)

			Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002)			gesamt
			hoch	inter-mediär	niedrig/sehr niedrig	
Kern-expression von p16^{INK4A}	≤10	Anzahl	20	10	13	43
		% innerhalb der Kernexpression von p16 ^{INK4A}	46,5%	23,3%	30,2%	100,0%
	>10	Anzahl	18	11	28	57
		% innerhalb der Kernexpression von p16 ^{INK4A}	31,6%	19,3%	49,1%	100%
		Anzahl	38	21	41	100
	gesamt	% innerhalb der Kernexpression von p16 ^{INK4A}	38,0%	21,0%	41,0%	100%

Die Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002) in den beiden Kernexpressionsuntergruppen von p16^{INK4A} unterschieden sich nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test nach Pearson: 2-seitige asymptotische Signifikanz p=0,153).

Tabelle 13: Kreuztabelle zwischen den beiden Untergruppen der Kernexpressionen von E2F1 und der Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002) (n=109, p<0,001)

			Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002)			gesamt
			hoch	intermediär	niedrig/ sehr niedrig	
Kern- expression von E2F1	E2F1 ≤2,9	Anzahl	14	10	38	62
		% innerhalb von E2F1	22,6 %	16,1%	61,3%	100,0%
	E2F1 >2,9	Anzahl	23	16	8	47
		% innerhalb von E2F1	48,9 %	34,0%	17,0%	100,0%
gesamt		Anzahl	37	26	46	109
		% innerhalb von E2F1	33,9 %	23,9%	42,2%	100,0%

Die Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002) in den beiden Kernexpressionsuntergruppen von E2F1 unterschieden sich signifikant (Chi-Quadrat-Test nach Pearson: 2-seitige asymptotische Signifikanz p<0,001). 2,9 ist der beste Cut-Off-Wert als Ergebnis einer ROC-Analyse für zensierte Parameter.

3.3.5 Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006)

Die Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006) korrelierte hoch signifikant (p=0,002) mit der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression. Von den 48 GIST Patienten mit einer zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression >50% hatten 45,8% ein niedriges und ein sehr niedriges Risiko, 8,3% ein intermediäres Risiko und 45,8% ein hohes Risiko.

Von den 73 Patienten mit einer zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression ≤50% hatten 71,2% ein niedriges und ein sehr niedriges Risiko, 12,3% ein intermediäres Risiko und 16,4% ein hohes Risiko. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den Risikountergruppen nach Miettinen und Lasota (2006) und den beiden Untergruppen

der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression (Chi-Quadrat-Test nach Pearson: 2-seitige asymptotische Signifikanz $p=0,002$) (Tab. 14).

Tabelle 14: Kreuztabelle zwischen den beiden Untergruppen der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression und der Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006) (n=121, $p=0,002$)

			Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006)			gesamt
			hoch	intermediär	niedrig/ sehr niedrig	
zytoplasmatische p16 ^{INK4A} Expression	≤50	Anzahl	12	9	52	73
		% innerhalb der zytoplasmatischen p16 ^{INK4A} -Expression	16,4%	12,3%	71,2%	100,0%
	>50	Anzahl	22	4	22	48
		% innerhalb der zytoplasmatischen p16 ^{INK4A} -Expression	45,8%	8,3%	45,8%	100,0%
gesamt		Anzahl	34	13	74	121
		% innerhalb der zytoplasmatischen p16 ^{INK4A} -Expression	28,1%	10,7%	61,2%	100,0%

Von den 57 GIST Patienten mit einer Kernexpression von p16^{INK4A} >10% hatten 63,2% ein niedriges und ein sehr niedriges Risiko, 10,5% ein intermediäres Risiko und 26,3% ein hohes Risiko.

Von den 43 Patienten mit einer Kernexpression von p16^{INK4A} ≤10% hatten 53,5% ein niedriges und ein sehr niedriges Risiko, 9,3% ein intermediäres Risiko und 37,2% ein hohes Risiko. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Risikountergruppen nach Miettinen und Lasota (2006) und den beiden Untergruppen der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression (Chi-Quadrat-Test nach Pearson: 2-seitige asymptotische Signifikanz $p=0,506$) (Tab. 15).

Tabelle 15: Kreuztabelle zwischen den beiden Untergruppen der Kernexpressionen von p16^{INK4A} und der Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006) (n=100, p=0,506)

			Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006)			gesamt
			hoch	intermediär	niedrig / sehr niedrig	
p16 ^{INK4A} Kern-expression	≤10	Anzahl	16	4	23	43
		% innerhalb von p16 ^{INK4A}	37,2%	9,3%	53,5%	100,0%
	>10	Anzahl	15	6	36	57
		% innerhalb von p16 ^{INK4A}	26,3%	10,5%	63,2%	100,0%
gesamt		Anzahl	31	10	59	100
		% innerhalb von p16 ^{INK4A}	31,0%	10,0%	59,0%	100,0%

Von den 47 GIST Patienten mit einer Kernexpression von E2F1 >2,9 hatten 46,8% ein niedriges und ein sehr niedriges Risiko, 12,8% ein intermediäres Risiko und 40,4% ein hohes Risiko.

Von den 62 Patienten mit einer Kernexpression von E2F1 ≤2,9 hatten 72,6% ein niedriges und ein sehr niedriges Risiko, 11,3% ein intermediäres Risiko und 16,1% ein hohes Risiko. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den Risiko- untergruppen nach Miettinen und Lasota (2006) und den beiden Untergruppen der Kernexpression von E2F1 (Chi-Quadrat-Test nach Pearson: 2-seitige asymptotische Signifikanz p=0,012) (Tab. 16). 2,9 ist der beste Cut-Off-Wert als Ergebnis einer ROC-Analyse für zensierte kontinuierliche Parameter.

Tabelle 16: Kreuztabelle zwischen den beiden Untergruppen der Kernexpressionen von E2F1 und der Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006) (n=109, p=0,012)

			Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006)			gesamt
			hoch	intermediär	niedrig / sehr niedrig	
Kern-expression von E2F1	E2F1 ≤2,9	Anzahl	10	7	45	62
		% innerhalb von E2F1	16,1%	11,3%	72,6%	100,0%
	E2F1 >2,9	Anzahl	19	6	22	47
		% innerhalb von E2F1	40,4%	12,8%	46,8%	100,0%
gesamt		Anzahl	29	13	67	109
		% innerhalb von E2F1	26,6%	11,9%	61,5%	100,0%

Zusammenfassend erhalten wir folgende Ergebnisse (Tab. 17).

Tabelle 17: Kreuztabelle der Chi-Quadrat-Tests nach Pearson (2-seitige asymptotische Signifikanz) zwischen den Expressionen von p16^{INK4A} beziehungsweise E2F1 und den Risikoklassifikationen nach Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006)

	Risikoklassifikation nach	
	Fletcher et al. (2002)	Miettinen und Lasota (2006)
zytoplasmatische p16 ^{INK4A} -Expression	0,013	0,002
Kernexpression von p16 ^{INK4A}	0,153	0,506
Kernexpression von E2F1	<0,001	0,012

Die Risikountergruppen nach Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006) sind signifikant verschieden in den beiden Untergruppen der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression und der Kernexpression von E2F1, dagegen nicht signifikant unterschiedlich in den beiden Untergruppen der Kernexpression von p16^{INK4A}.

3.4 Klinischer Verlauf nach klinisch-pathologischen Parametern

Bei 21 (17,2%) der 122 Patienten traten im Mittel nach 32 (± 19) Monaten (10-84 Monate) Fernmetastasen oder ein lokales Tumorrezidiv auf. Die weiteren 101 (82,8%) zensierten Patienten blieben auch nach einer längeren Beobachtungszeit von im Mittel 45 (± 37) Monaten (1-156 Monate) tumorfrei. Das kumulative 5-Jahre krankheitsfreie Überleben lag bei 75,3% (95% CI: 65,4%-85,2%). Der Mittelwert für das krankheitsfreie Überleben lag bei 119,6 Monate (95% CI: 106,0-133,1 Monate) (Abb. 34).

Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurve für krankheitsfreies Überleben

Der klinische Verlauf nach klinisch-pathologischen Parametern wird im Folgenden mit Hilfe von Cox-Regressionsanalysen durchgeführt.

3.4.1 Tumorgröße

Das kumulative, 5-Jahre-krankheitsfreie Überleben lag bei GIST-Patienten mit einer Tumorgröße von <5cm bei 95,8% (95% CI: 88,3%-100%), mit einer Tumorgröße von

5-10cm bei 73,9% (95% CI: 58,1%-89,7%) und bei Patienten mit einer Tumorgröße >10cm bei 44,4% (95% CI: 18,1%-70,8%). Fasst man die Patienten mit einer Tumorgröße >5cm zusammen, so beträgt das 5-Jahre-krankheitsfreie Überleben 61,2% (95% CI: 46,4%-75,9%). Die Unterschiede in den Überlebenskurven sind hochsignifikant ($p=0,002$) (Abb. 35).

Abbildung 35: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben in Abhängigkeit von der Tumorgröße mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls

3.4.2 Mitoserate

Das kumulative, 5-Jahre-krankheitsfreie Überleben lag bei den 82 (67,2%) GIST-Patienten mit einer Mitoserate $\leq 5/50$ HPF bei 98,2% (95% CI: 94,8%-100%) und bei den 40 (32,8%) GIST-Patienten mit einer Mitoserate $>5/50$ HPF bei 46,4% (95% CI: 28,7%-64,1%) (Abb. 36). Die Unterschiede in den Überlebenskurven sind hochsignifikant ($p=0,001$).

Abbildung 36: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben getrennt nach Mitoserate bei 122 GIST mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls

3.4.3 Lokalisation

Die Lokalisation des Tumors hatte einen signifikanten Einfluss auf die krankheitsfreie Überlebenszeit. Distale GIST hatten ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Überleben ($p=0,009$; HR=3,17; 95% CI: 1,34-7,53). Das 5-Jahre-krankheitsfreie Überleben lag bei distalen GIST bei 65,2% (95% CI: 46,3%-84,1%) und bei proximalen GIST bei 84,9% (95% CI: 75,1%-94,7%) (Abb. 37).

Abbildung 37: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben getrennt nach der Lokalisation bei 122 GIST mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls

3.4.4 Klassifikationssystem nach Fletcher et al. (2002)

42 (34,4%) der GIST hatten nach Fletcher et al. (2002) ein hohes Risiko. Teilt man die Patienten auf in Patienten mit hohem beziehungsweise nicht hohem Risiko nach Fletcher, so erhält man folgende Kurven für das krankheitsfreie Überleben (Abb. 38). Der Mittelwert für das krankheitsfreie Überleben lag bei Patienten mit niedrigem oder intermediärem Risiko nach Fletcher et al. (2002) bei 152,7 Monaten und bei Patienten mit hohem Risiko nach Fletcher bei 58,8 Monaten (Log Rank (Mantel-Cox) p-Wert: $p < 0,001$). Die Eingruppierung nach Fletcher hatte einen hochsignifikanten Einfluss auf die krankheitsfreie Überlebenszeit. ($p < 0,001$; HR=40,6; 95% CI: 5,4-303,4).

Abbildung 38: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben von 122 Patienten mit GIST nach Risikokategorien nach Fletcher et al. (2002) mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls

3.4.5 Krankheitsfreies Überleben: das Klassifikationssystem nach Miettinen und Lasota (2006)

34 (27,9%) der GIST hatten nach Miettinen und Lasota (2006) ein hohes Risiko. Teilt man die Patienten wieder auf in Patienten mit hohem beziehungsweise nicht hohem Risiko nach Miettinen und Lasota (2006), so erhält man folgende Kurven für das krankheitsfreie Überleben (Abb. 39). Die Eingruppierung nach Miettinen und Lasota (2006) hatte einen hoch signifikanten Einfluss auf die krankheitsfreie Überlebenszeit ($p < 0,001$; $HR = 31,44$; 95% CI: 7,29-135,59) (Abb. 39).

Abbildung 39: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben von 122 Patienten mit GIST nach den Risikokategorien nach Miettinen und Lasota (2006) mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls

3.5 Klinischer Verlauf nach Expression der untersuchten Proteine

3.5.1 Nukleäre p16^{INK4A}-Expression

Die Hazard Ratio des krankheitsfreien Überlebens stratifiziert nach den beiden Kernexpressionsuntergruppen von p16^{INK4A} ist mit 2,36 relativ hoch, aber aufgrund der niedrigen Eventrate nicht signifikant ($p=0,082$; $HR=2,36$; 95% CI: 0,90-6,11) (Abb. 40). Tendenziell wiesen Patienten mit einer niedrigen Kernexpression ein höheres Risiko für einen Tumorprogress auf. Von den Patienten, die eine niedrige p16^{INK4A}-Kernexpression hatten, wiesen 13 (30,2%) ein Rezidiv auf. Von den Patienten, die eine hohe p16^{INK4A}-Kernexpression hatten, wiesen 6 (10,5%) ein Rezidiv auf.

Abbildung 40: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben von 100 Patienten mit GIST, getrennt nach hoher und niedriger p16^{INK4A}-Kernexpression mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls

Nimmt man die p16^{INK4A}-Kernexpression als kontinuierlichen Parameter, so erhalten wir univariat für das krankheitsfreie Überleben ebenfalls ein nicht signifikantes Ergebnis für die Hazard Ratio: HR=0,97; 95% CI: 0,94-1,01; p=0,101.

3.5.2 Zytoplasmatische p16^{INK4A}-Expression

Von den Patienten, die eine niedrige zytoplasmatische p16^{INK4A}-Expression hatten, wiesen 5 (6,8%) ein Rezidiv auf. Von den Patienten, die eine hohe zytoplasmatische p16^{INK4A}-Expression hatten, wiesen 16 (21,9%) ein Rezidiv auf. Dementsprechend zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied in den krankheitsfreien Überlebenszeiten zwischen Patienten mit niedriger und hoher zytoplasmatischer p16^{INK4A}-Expression (p<0,001; HR=6,19; 95% CI: 2,27-16,93) (Abb. 41 beziehungsweise Tab. 18)

Tabelle 18: Vergleich der Ausprägung der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression bei 121 GIST mit dem Tumorezidiv

zytoplasmatische Expression von p16 ^{INK4A}	Gesamtanzahl der Fälle	Anzahl der Rezidive	zensiert (rezidivfrei)	Prozent
niedrig	73	5	68	93,2
hoch	48	16	32	66,7
gesamt	121	21	100	82,6

Abbildung 41: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben von 121 Patienten mit GIST, getrennt nach hoher und niedriger zytoplasmatischer p16^{INK4A}-Expression mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls

Nimmt man die zytoplasmatischer p16^{INK4A}-Expression als kontinuierlicher Parameter, so erhalten wir univariat für das krankheitsfreie Überleben ebenfalls ein hochsignifikantes Ergebnis für die Hazard Ratio: HR=1,84; 95% CI: 1,25-2,72; p=0,002.

3.5.3 E2F1

Die Hazard Ratio des krankheitsfreien Überlebens, stratifiziert nach Patienten mit einer Expression von E2F1 $\leq 2,9$ und einer Expression von E2F1 $> 2,9$, ist mit 2,24 relativ hoch, aber aufgrund der niedrigen Eventrate ebenfalls nicht signifikant ($p=0,112$; HR=2,24; 95% CI: 0,83-6,07) (Abb. 42). Tendenziell wiesen Patienten mit einer niedrigen Expression ein niedrigeres Risiko für einen Tumorprogress auf. 90,3% der Patienten mit E2F1 $\leq 2,9$ waren rezidivfrei. Dagegen waren 76,6% der Patienten mit E2F1 $> 2,9$ rezidivfrei.

Abbildung 42: Kaplan-Meier Kurven für das krankheitsfreie Überleben für E2F1 mit (optimalem) Cut-Off-Wert von 2,9 mit Angabe des p-Wertes, der Hazard Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls

Nimmt man die E2F1 Expression als kontinuierlicher Parameter, so erhalten wir univariat für das krankheitsfreie Überleben ebenfalls ein nicht signifikantes Ergebnis für die Hazard Ratio: HR=1,03; 95% CI: 0,92-1,16; $p=0,585$.

3.6 Prognosefaktoren und Modelle zur Vorhersage der Rezidivfreiheit

Generell bedingt eine Untersuchung möglicher prognostischer Parameter

1. Eine univariate Analyse der einzelnen Parameter (siehe Abschnitt 3.4)
2. Eine multivariate Analyse aller in Frage kommenden Parameter (behalten diese einzelnen Parameter ihre Signifikanz auch unter Einbeziehung weiterer relevanter Parameter oder im Vergleich untereinander)
3. Einen multivariaten Vergleich mit den wichtigsten bisherigen Prognoseparametern beziehungsweise Modellen (liefern die „neuen“ Parameter eine Zusatzinformation zu bisherigen Prognosemodellen wie zum Beispiel Fletcher et al. (2002) oder Miettinen und Lasota (2006))

Die hieraus generierten Modelle müssen in einer Phase III-Studie prospektiv validiert werden. Da die hier vorliegende Studie retrospektiv ist, kann prinzipiell keine Kausalität, sondern nur entsprechende Assoziationen nachgewiesen werden.

3.6.1 Cox-Modell für zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A}, Kernexpression von p16^{INK4A} und E2F1

Bei der univariaten und multivariaten Betrachtung des Einflusses jeweils von niedriger oder hoher zytoplasmatischer Expression von p16^{INK4A}, Kernexpression von p16^{INK4A} und Expression von E2F1 untereinander, scheinen nur die zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A} univariat ($p < 0,001$; HR=6,19; 95% CI: 2,27-16,93) und multivariat ($p = 0,001$; HR= 8,30; 95% CI: 2,28-14,29) einen signifikanten Effekt auf das krankheitsfreie Überleben zu haben.

Die Kernexpression von p16^{INK4A} und die Expression von E2F1 liefern sowohl univariat als auch multivariat keinen signifikanten Effekt auf das krankheitsfreie Überleben (Tab. 19).

Tabelle 19: Univariate und multivariate Analyse der einzelnen Proteine als nominale Parameter bezüglich des krankheitsfreien Überlebens

Faktor	univariat	multivariat
zytoplasmatische Expression von p16 ^{INK4A}	p<0,001; HR=6,19; 95% CI: 2,27 - 16,93	p=0,001; HR=8,30; 95% CI: 2,28 - 14,29
Kernexpression von p16 ^{INK4A}	p=0,082 HR=2,36; 95% CI: 0,90 - 6,11	p=0,086 HR=3,46 95% CI: 0,84 - 14,29
E2F1	p=0,112; HR=2,24 ; 95% CI: 0,83 - 6,07	p=0,529 HR=1,52 95% CI: 0,42 - 5,55

Integriert man die obigen 3 Proteine als kontinuierliche Parameter in ein Cox-Modell, so erhalten wir das gleiche Ergebnis, außer dass die Hazard Ratio für die zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A} deutlich niedriger ist als für die zytoplasmatische Expression als nominaler Parameter. Die zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A} bleibt auch multivariat unter diesen 3 Proteinen der einzig signifikante Parameter mit HR=1,9; 95% CI: 1,2-3,0; p=0,006 (Methode = Vorwärts schrittweise (Likelihood-Quotient)). Die Signifikanz für Kernexpression von p16^{INK4A} beträgt p=0,100 und für E2F1 p=0,562 (Tab. 20). Daher sind diese beiden Proteine nicht in dem Cox-Modell enthalten. Adjustiert man zusätzlich nach Alter und Geschlecht, ist die zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A} weiterhin der einzig signifikante Parameter für das krankheitsfreie Überleben mit HR=1,9; 95% CI: 1,2-3,0; p=0,007. Alter und Geschlecht sind ebenfalls nicht signifikant (Alter: p=0,775, Geschlecht: p=0,104). In diesem Modell ist die Signifikanz der Kernexpression von p16^{INK4A}: p=0,116 und der E2F1-Expression p=0,853.

Tabelle 20: Univariate und multivariate Analyse der einzelnen Proteine als kontinuierliche Parameter bezüglich des krankheitsfreien Überlebens

Faktor	univariat	multivariat
zytoplasmatische Expression von p16 ^{INK4A}	p=0,002; HR=1,84; 95% CI: 1,25 - 2,72	p=0,006; HR=1,90; 95% CI: 1,21 - 3,00
Kernexpression von p16 ^{INK4A}	p=0,101 HR=0,97; 95% CI: 0,94 - 1,01	p=0,100 HR=0,97 95% CI: 0,93 - 1,01
E2F1	p=0,585; HR=1,03 ; 95% CI: 0,92 - 1,16	p=0,562 HR=0,96 95% CI: 0,82 - 1,11

3.6.2 Cox-Modell für zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A}, Kernexpression von p16^{INK4A} und die Expression von E2F1 unter Einbeziehung von Miettinen und Lasota (2006) beziehungsweise Fletcher et al. (2002)

Im Folgenden sollte unter anderem die Frage untersucht werden, ob die drei hier untersuchten Proteine zusätzliche Informationen für die beiden klassischen Prognosemodelle von Miettinen und Lasota (2006) oder Fletcher et al. (2002) liefern. Die Prognosemodelle von Miettinen und Lasota (2006) und Fletcher et al. (2002) berücksichtigen bekanntlich die Prognosefaktoren Tumorgröße und mitotische Aktivität (gemessen in 50 HPF). Beide Parameter waren univariat prognostisch hochsignifikant (siehe Ergebnisse in 3.4.4 und 3.4.5) für das krankheitsfreie Überleben.

Danach wurden im ersten Schritt die beiden Parameter Tumorgröße und Mitoserate erweitert um die Parameter zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A}, Kernexpression von p16^{INK4A}, Kernexpression von E2F1 und Lokalisation und multivariat auf ihren Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben untersucht. Da es für die Modellberechnungen und die daraus resultierenden Ergebnisse wichtig war, ob diese Parameter als kontinuierliche (quantitative) Werte oder nominale (qualitative) Werte

(definiert durch die jeweiligen Cut-Off-Werte) vorlagen, wurden beide Darstellungen berücksichtigt.

- **Nominal**

Ein Cox-Modell mit Wald-Statistik zeigte, dass multivariat nur die Parameter Mitoserate, zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A} und Lokalisation signifikant waren (Tab. 21). Tumorgröße mit Cut-Off-Wert 5cm ($p=0,092$), Kernexpression von p16^{INK4A} mit Cut-Off-Wert 10 ($p=0,181$) und E2F1 mit Cut-Off-Wert 2,9 ($p=0,933$) waren in diesem Modell nicht signifikant. Der wichtigste Parameter war die Mitoserate (HR=9,27), gefolgt von der zytoplasmatischen Expression von p16^{INK4A} (HR=4,14) und der Lokalisation (HR=4,10).

Tabelle 21: Cox-Modell mit Wald-Statistik für die nominalen Parameter Mitoserate, Tumorgröße, Lokalisation, zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A}, Kernexpression von p16^{INK4A} und E2F1 Expression

	B	SE	Wald	df	Signifikanz	HR	95,0% CI für HR	
							untere Grenze	obere Grenze
Mitoserate	2,23	0,8	9,92	1	0,009	9,27	1,95	44,06
zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A}	1,42	0,68	4,32	1	0,038	4,14	1,08	15,76
Lokalisation	1,41	0,56	6,32	1	0,012	4,10	1,36	12,29

Ersetzte man in diesem Modell die Tumorgröße mit Cut-Off-Wert 5cm jedoch durch die maximale Tumorgröße als kontinuierlichen Parameter, so war die Tumorgröße ein weiterer unabhängiger signifikanter Parameter ($p=0,004$, HR=1,11; 95% CI: 1,03-1,19). Dies zeigt wiederum, dass durch die Umwandlung kontinuierlicher Werte (hier maximale Tumorgröße) in nominale Werte (hier Tumorgröße ≤ 5 cm oder Tumorgröße > 5 cm) wichtige Informationen verloren gehen.

- **Kontinuierlich**

Nimmt man Tumorgröße, zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A}, Kernexpression von p16^{INK4A} und E2F1 als kontinuierliche Parameter, so erhält man folgendes Ergebnis (Tab. 22).

Tabelle 22: Cox-Modell mit Wald-Statistik für die kontinuierlichen Parameter Tumorgroße, zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A}, Kernexpression von p16^{INK4A} und E2F1 Expression sowie die nominalen Parameter Mitoserate und Lokalisation

	B	SE	Wald	df	Signifikanz	HR	95,0% CI für HR	
							untere Grenze	obere Grenze
Mitoserate	2,61	0,80	10,75	1	0,001	13,55	2,85	64,37
Lokalisation	1,64	0,55	9,02	1	0,003	5,16	1,77	15,07
maximale Tumorgroße	0,09	0,04	5,22	1	0,022	1,09	1,09	1,18

In diesem Modell sind die zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A} (p=0,393), die Kernexpression von p16^{INK4A} (p=0,126) und E2F1 (p=0,484) als kontinuierliche Werte nicht mehr signifikant. Es sind nur die klassischen Parameter Mitoserate als wichtigster Parameter, die Lokalisation und die maximale Tumorgroße signifikant. Die Mitoserate war wiederum der mit Abstand wichtigste Parameter. Die Mitoserate selbst ging in das Modell binär mit Cut-Off von 5/50 HPF ein (Abb. 43).

Abbildung 43: Kumuliertes krankheitsfreies Überleben stratifiziert nach Mitoserate und adjustiert nach zytoplasmatischer Expression von p16^{INK4A}, Kernexpression von p16^{INK4A}, E2F1, maximaler Tumorgroße und Lokalisation

3.6.3 Cox-Modell für zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A}, Kernexpression von p16^{INK4A}, E2F1 und Risikoklassifikation von Fletcher et al. (2002) beziehungsweise Miettinen und Lasota (2006) als kontinuierliche Parameter

In Anlehnung an 3.6.2 wurde im Folgenden die Frage untersucht, ob die Parameter zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A}, Kernexpression von p16^{INK4A} und Kernexpression von E2F1 zusätzliche Informationen liefern, wenn man die beiden klassischen Prognosemodelle von Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006) in das Modell integriert. Die Prognosemodelle von Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006) berücksichtigen bekanntlich die Prognosefaktoren Tumorgroße und mitotische Aktivität (gemessen in 50 HPF). Beide Prognosemodelle waren univariat prognostisch hochsignifikant (Abschnitte 3.4.4 und 3.4.5) für das

krankheitsfreie Überleben. Aufgrund der Ergebnisse in 3.6.2 kann man ein negatives Ergebnis erwarten.

In die folgenden Cox-Modelle wurden die Proteine zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A}, Kernexpression von p16^{INK4A} und Kernexpression von E2F1 als kontinuierliche Parameter genommen. Hinzu kommen die Lokalisation und in Modell A die Klassifikation nach Miettinen und Lasota (2006) und in Modell B die Klassifikation nach Fletcher et al. (2002) (Tab. 23).

Tabelle 23: Cox-Modelle stratifiziert nach Miettinen und Lasota (2006) (Modell A) und Fletcher et al. (2002) (Modell B) und adjustiert nach zytoplasmatischer Expression von p16^{INK4A}, Kernexpression von p16^{INK4A} und Kernexpression von E2F1 sowie der Lokalisation

Faktor	Modell A	Modell B
Fletcher et al. (2002)	-	p=0,013 HR=0,058; 95% CI: 0,006 - 0,552
Miettinen und Lasota (2006)	p=0,004; HR=0,081; 95% CI: 0,015 - 0,441	-
Lokalisation	P=0,548	p=0,119
zytoplasmatische Expression von p16 ^{INK4A}	p=0,551	p=0,139
Kernexpression von p16 ^{INK4A}	p=0,056	p=0,170
E2F1	p=0,753	p=0,675

Diese Ergebnisse zeigen: Stratifiziert man in einem Cox-Modell nach Miettinen und Lasota (2006) (Modell A) und Fletcher et al. (2002) (Modell B) und adjustiert nach zytoplasmatischer Expression von p16^{INK4A}, Kernexpression von p16^{INK4A} und Kernexpression von E2F1 sowie der Lokalisation, so scheinen jeweils nur die Klassifikationen nach Miettinen und Lasota (2006) und Fletcher et al. (2002) signifikant zu sein. In diesem Datensatz für Patienten mit sehr niedrigem beziehungsweise niedrigem Risiko nach Miettinen und Lasota (2006) oder Fletcher et al. (2002) hatte kein Patient innerhalb der Beobachtungszeit einen Progress. Bei Patienten mit intermediärem Risiko nach Fletcher et al. (Miettinen und Lasota)

hatte(n) 1(2) Patient(en) einen Progress. In diesen Modellen ist die Lokalisation kein signifikanter Parameter für das krankheitsfreie Überleben. In der Tat liefert das entsprechende Cox-Modell mit Miettinen und Lasota (2006) für die Lokalisation einen p-Wert von 0,551 und für das Modell mit Fletcher et al. (2002) einen p-Wert von 0,139. Hieraus folgt weiter, dass die Unterschiede in den Lokalisationen im Wesentlichen von hochsignifikanten Unterschieden in der Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota (2006) resultieren müssen. Dies wird durch Tabelle 24 bestätigt.

Tabelle 24: Kreuztabelle zwischen der Lokalisation und der Klassifikation nach Miettinen und Lasota (2006) (Chi-Quadrat-Test nach Pearson: $p=0,007$)

		Miettinen und Lasota (2006)		total
		hoch	niedrig / intermediär	
Lokalisation	Dünn-und Dickdarm (distal)	18	24	42
		42,9%	57,1%	100,0%
	Magen (proximal)	16	64	80
		20,0%	80,0%	100,0%
total		34	88	122
		27,9%	72,1%	100,0%

Die Ergebnisse dieser Kreuztabelle bestätigten die aus dem Cox-Modell resultierenden Unterschiede der Klassifikation nach Miettinen und Lasota (2006) in den beiden Lokalisationen.

Ähnliches gilt für die Lokalisation und Klassifikation nach Fletcher et al. (2002).

4 Diskussion

4.1 Beurteilung der klinisch-pathologischen Daten

In dieser Arbeit wurden zunächst die klassischen Prognosefaktoren wie Tumorgroße, Mitoserate und Tumorlokalisation bei GIST untersucht und ihr Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf dargestellt. Aus diesen Faktoren werden bekanntlich die gängigen Risikoklassifikationen nach Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006) berechnet.

Der Mittelwert der Tumorgroße lag bei 6,2cm, ein Wert, der etwas höher liegt als bei vergleichbaren Arbeiten. So berechneten z.B. Hasegawa et al. (2002) einen Mittelwert für die Tumorgroße von 5cm und Steigen et al. (2007) einen Mittelwert von 5,2cm.

Die in der Literatur beschriebene direkte Korrelation der Mitoserate und der Tumorgroße konnte am vorliegenden Tumorkollektiv nachvollzogen werden (Miettinen et al. 2002). 81% der Patienten mit einer Tumorgroße ≤ 5 cm hatten eine Mitoserate $\leq 5/50$ HPF. Dagegen hatten nur 26,7% der Patienten mit einer Tumorgroße > 10 cm eine Mitoserate $\leq 5/50$ HPF. Die Mitoserate stellt dennoch einen von der Tumorgroße unabhängigen, hochsignifikanten Prognosefaktor dar (Miettinen et al. 2006b). Tumoren mit einer kleinen Größe (≤ 5 cm) und einer niedrigen Mitoserate ($\leq 5/50$ HPF) müssen jedoch nicht notwendig einen benignen Verlauf zeigen, denn auch solche Tumoren können bereits metastasieren (Rubin 2006). 67,2% der Patienten hatten eine Mitoserate $\leq 5/50$ HPF, 9,8% 6-10/50 HPF und 23% der Patienten eine Mitoserate $> 10/50$ HPF. Der Median war 3/50 HPFs. In einer norwegischen GIST-Studie hatten 80% der Tumoren eine Mitosezahl $\leq 5/50$ HPF (Steigen et al. 2007).

GIST kommt im gesamten gastrointestinalen Trakt, jedoch mit unterschiedlicher Häufigkeit in den einzelnen anatomischen Abschnitten vor, wobei die Lokalisation auch einen Einfluss auf die Prognose hat. Im untersuchten GIST-Kollektiv befanden sich von den 122 Tumoren 66% proximal und 34% distal. Die relative Verteilung deckt sich mit zahlreichen anderen Studien (Emroy et al. 1999). Die Prognosefaktoren Tumorgroße, Mitoserate und Tumorlokalisation zeigten eine hoch signifikante Assoziation mit dem klinischen Verlauf. Patienten mit einer Tumorgroße > 5 cm, einer Mitoserate $> 5/50$ HPF und einer distalen Tumorlokalisation wiesen

jeweils ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Überleben auf. Diese Beobachtungen entsprechen der bereits beschriebenen hohen prognostischen Bedeutung der klinisch-pathologischen Daten bei GIST (DeMatteo et al. 2000; DeMatteo et al. 2008). Das Interessante in diesem Zusammenhang ist, dass es keine signifikanten Unterschiede in den Verteilungen der Mitoseraten und Tumorgröße in den beiden Lokalisationen gibt. Daher implizieren diese Ergebnisse die Vermutung, dass andere biologischen Faktoren in den unterschiedlichen Lokalisationen eine prognose-relevante Rolle spielen könnten.

Die Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002) wurde in mehreren nachfolgenden Studien untersucht. Nilsson et al. (2005) stellten Daten von jedem c-KIT-positiven GIST-Patienten in einer Region in Schweden von 1983 bis 2000 zusammen. In der Gruppe mit sehr niedrigem Risiko nach Fletcher et al. (2002) gab es 0% Rezidive, in der Gruppe mit niedrigem Risiko 2,4%, in der intermediären Gruppe 1,9% und in der Hochrisikogruppe 62,5% Rezidive. Eine ähnliche Studie führten Tryggvason et al. (2005) in Island für GIST-Patienten durch, die in den Jahren 1990-2003 diagnostiziert wurden. In der Gruppe mit sehr niedrigem und niedrigem Risiko nach Fletcher et al. (2002) gab es 0% Rezidive, in der intermediären Gruppe 20% und in der Hochrisikogruppe 46% Rezidive. In unserem Kollektiv stimmte die Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002) in sehr niedrig und niedrig mit der Klassifikation nach Miettinen und Lasota (2006) überein. Erhebliche Abweichungen gibt es dagegen für Patienten mit intermediärem beziehungsweise hohem Risiko. Nach der Klassifikation nach Fletcher et al. (2002) fallen 19% der Patienten mit hohem Risiko in der Klassifikation nach Miettinen und Lasota (2006) in die Gruppe der Patienten mit intermediärem Risiko. Insgesamt unterscheiden sich die Klassifikationen nach Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006) hochsignifikant (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$; Tab. 7).

Tumoren, die nach den Risikoklassifikation nach Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006) jeweils in der Gruppe mit einem hohen Risiko eingeordnet wurden, hatten erwartungsgemäß eine signifikant kürzere krankheitsfreie Überlebenszeit (Fletcher et al. 2002; Miettinen und Lasota 2006). Es traten bei 17,2% der 122 Patienten im Mittel nach 32 (± 19) Monaten Fernmetastasen oder ein lokales Tumorrezidiv auf. In der Studie von Nilsson et al. (2005) mit 288 GIST-Patienten wiesen 15% einen Progress auf.

4.2 Expression der verschiedenen Proteine unter Berücksichtigung der klinisch-pathologischen Parameter

4.2.1 p16^{INK4A}

Von den 121 auswertbaren Tumoren hatten 60,3% eine niedrige und 39,7% eine hohe zytoplasmatische p16^{INK4A}-Expression. Bei der nukleären p16^{INK4A}-Expression konnten 100 Tumoren ausgewertet werden. Davon hatten 43% der Tumoren eine nukleäre p16^{INK4A}-Expression ≤ 10 und 57% eine nukleäre p16^{INK4A}-Expression > 10 . GIST mit einer hohen Mitoserate $> 5/50$ HPF hatten eine signifikant niedrigere Kernexpression von p16 mit einem Mittelwert von 11,6 ($\pm 13,2$) im Vergleich zu GIST mit einer niedrigen Mitoserate $\leq 5/50$ HPF. Hier lag der Mittelwert bei 21,1 ($\pm 16,8$).

Als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung für die zytoplasmatische p16^{INK4A}-Expression erhielten wir 1,1 ($\pm 1,1$) für Patienten mit Mitoserate $\leq 5/50$ HPF und 1,5 ($\pm 1,2$) für Patienten mit Mitoserate $> 5/50$ HPF. Wir konnten nur einen schwach signifikanten Unterschied ($p=0,051$) in den Verteilungen der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression in den beiden Patientenuntergruppen mit Mitoserate ≤ 5 und $> 5/50$ HPF feststellen. Ferner konnte weder eine Korrelation der Kernexpression von p16^{INK4A} oder der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression mit der Tumorgroße noch der Tumorlokalisation gezeigt werden. Vergleicht man die Kernexpression von p16^{INK4A} mit den Risikoklassifikationen nach Miettinen und Lasota (2006) oder Fletcher et al. (2002), zeigten sich keine Unterschiede in den beiden Untergruppen.

4.2.2 E2F1

Von den 109 bezüglich der E2F1-Expression auswertbaren Tumoren hatten 62 (56,9%) eine E2F1-Expression $\leq 2,9$ und 47 (43,1%) eine E2F1-Expression $> 2,9$. E2F1 als ein Schlüsselregulator für Zellproliferation hatte eine höhere Expression in proximalen GIST, in Tumoren größer als $> 5\text{cm}$ und mit einer Mitoserate $> 5/50$ HPF. In einer Studie von Haller et al. konnte dieses Ergebnis bezüglich der Mitoserate gezeigt werden (Haller et al. 2005).

Ordnet man die drei Proteine E2F1, das zytoplasmatische p16^{INK4A} und das nukleäre p16^{INK4A} in die Risikoklassifikationen nach Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006) ein, präsentiert sich folgendes Bild: Sowohl die zytoplasmatische

p16^{INK4A}-Expression als auch die Kernexpression von E2F1 zeigen jeweils in den beiden Untergruppen signifikante Unterschiede.

4.3 Expression der verschiedenen Proteine unter Berücksichtigung des klinischen Verlaufs

Aus den eigenen Untersuchungen ging hervor, dass eine starke zytoplasmatische p16^{INK4A}-Expression eine hochsignifikante Korrelation mit einer kürzeren krankheitsfreien Überlebenszeit aufwies. In einer von Steigen et al. durchgeführten Studie wurde eine Überexpression von zytoplasmatischem p16^{INK4A} mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert (Steigen et al. 2008).

Die p16^{INK4A}-Kernexpression hatte in unserem Kollektiv weder univariat noch multivariat sowohl als nominaler als auch als kontinuierlicher Parameter einen signifikanten Einfluss auf die krankheitsfreie Überlebenszeit. In der Literatur fanden sich diesbezüglich gegensätzliche Angaben. Huang et al. bestätigten einen Zusammenhang mit einer niedrigen Kernexpression von p16^{INK4A} in Tumoren mit hohem malignen Potential und nur einer Tendenz bezüglich einer kürzeren krankheitsfreien Überlebenszeit (Huang et al. 2006), wohingegen Sabah et al. eine Assoziation mit einem ungünstigen klinischen Verlauf beobachteten (Sabah et al. 2004). Diese Feststellung wurde später von Schneider-Stock et al. in einer TMA-Studie von 284 GISTs bestätigt (Schneider-Stock et al. 2005). Es gab jedoch Studien, die diese Schlussfolgerung nicht teilten und weder eine Korrelation zwischen dem klinischen Verlauf noch den Risikokategorien sahen (Nakamura et al. 2005; Nemoto et al. 2006). Die Gründe hierfür könnten sein, dass alle diese Studien verschiedene p16^{INK4A}-Antikörper mit unterschiedlichen Verdünnungen benutzt haben, und es wurden auch unterschiedliche Kategorien für p16^{INK4A}-Negativität festgelegt mit sehr abweichenden Grenzwerten.

Es wurde eine Herunterregulation der p16^{INK4A}-Kernexpression in GIST mit einem Chromosomenverlust auf 9p21 festgestellt, was mit einer starken Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins und somit zu einer Tumorphosphorylierung führt (Haller et al. 2008).

Ein signifikanter Zusammenhang mit der krankheitsfreien Überlebenszeit und einer niedrigen oder hohen Expression von E2F1 konnte nicht nachgewiesen werden. Dennoch wurde ein Trend deutlich. Mehr Patienten mit einer niedrigen E2F1-Expression hatten keinen Tumorprogress. Auch in der Literatur ist beschrieben, dass GIST mit einem klinisch schlechten Verlauf eine Überexpression von E2F1 aufweisen (Haller et al. 2005). Die Beobachtung konnte in einer Studie 2006 nachvollzogen werden (Sabah et al. 2006). GIST mit einer schlechten Prognose zeigten in 92,9% eine Expression von E2F1, während GIST mit einer guten Prognose nur in 33,3% E2F1 exprimierten.

4.4 Expression der verschiedenen Proteine unter Berücksichtigung der Korrelationen untereinander

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten eine geringe bis mittlere inverse Relation zwischen der Kernexpression von p16^{INK4A} und E2F1, die jedoch hochsignifikant ist. Die inverse Relation (Rangkorrelation nach Spearman: (-0,415; $p < 0,001$)) impliziert, dass niedrige Werte der Kernexpression von p16^{INK4A} mit einer Hochregulierung von E2F1 und somit mit einer erhöhten Zellproliferation einhergehen. Umgekehrt korrelieren hohe Werte der Kernexpression von p16^{INK4A} mit einer Herabregulierung von E2F1. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung von Haller et al. überein (Haller et al. 2008).

Bei einer hohen zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression fand sich, wie bereits in 4.2 beschrieben, eine Assoziation mit einer höheren Mitoserate, dennoch nicht mit einer erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors E2F1. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass E2F1 nicht in Beziehung zu dem biologischen Mechanismus steht, der eine Hochregulation der zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression veranlasst.

Zwischen den beiden p16^{INK4A}-Formen konnte keine direkte Korrelation nachgewiesen werden, wenngleich die unterschiedlichen Formen unabhängig voneinander mit Tumorprogression in Verbindung gebracht werden können. Das nukleäre p16^{INK4A} hatte eine geringere Expression in malignen GIST, wohingegen die zytoplasmatische p16^{INK4A}-Expression eine hohe Expression in malignen GIST zeigte, was wiederum darauf hindeutet, dass dieser Beobachtung zwei verschiedene unabhängige Mechanismen zugrunde liegen. Bei dem nukleären p16^{INK4A} ermöglicht eine niedrige Expression eine Hochregulation des Transkriptionsfaktors E2F1 und

somit eine erhöhte Zellproliferation. Im Vergleich dazu stellt eine starke zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A} vermutlich eine negativen Feedback-Reaktion auf andere, noch unbekannte molekulargenetische Ereignisse dar. In der Cervix uteri zeigt sich eine Korrelation zwischen einer starken zytoplasmatischen Expression von p16^{INK4A} und einer Infektion mit Hochrisiko-Humanen Papillomaviren (Klaes et al. 2001). Die viralen Onkogene führen zu einer übermäßigen RB1-Phosphorylierung in den Epithelzellen, und die damit induzierte Überexpression von p16^{INK4A} reflektiert wahrscheinlich eine negative Rückkopplungsschleife.

4.5 Prognostische Bedeutung der verschiedenen Proteine

Sowohl bei der univariaten als auch multivariaten Analyse des RFS, stratifiziert nach den drei Proteinen als nominale oder kontinuierliche Parameter, war nur die zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A} signifikant. Bei der wichtigen Fragestellung, ob die zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A}, die Kernexpression von p16^{INK4A} oder die Kernexpression von E2F1 zusätzliche Informationen zu den aktuell bestehenden Risikoklassifikationen von Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006) liefern, war die Expression keiner der drei Marker signifikant. Auch in keiner der Untergruppen niedriges, intermediäres oder hohes Risiko nach Miettinen und Lasota (2006) oder Fletcher et al. (2002) liefern diese drei Proteine signifikante Zusatzinformationen.

5 Zusammenfassung

Im Gastrointestinaltrakt sind GIST die häufigsten mesenchymalen Tumoren. Grundsätzlich sind alle GIST potenziell maligne, das heißt, auch kleine, als benigne klassifizierte GIST-Tumoren können metastasieren. Als Ziel dieser Dissertation ergibt sich in diesem Zusammenhang die Frage, inwieweit die untersuchten Proteine Prognosefaktoren bei univariater Betrachtung sind und ob sie eine zusätzliche Information zur Abschätzung der Dignität zu den bestehenden Prognosefaktoren liefern. Es wurde zum einen p16^{INK4A} als ein Produkt eines Tumorsuppressorgens betrachtet, welches eine zentrale Rolle beim G1/S-Phasen-Übergang des Zellzyklus spielt und zum anderen E2F1, welches die Zellzyklusprogression fördert. Die Tumorzellproliferation steht in engem Zusammenhang mit der DNS-Syntheserate. Somit könnten diese Proteine mögliche prognostische Marker zur Einschätzung der Aggressivität und des klinischen Verlaufs bei GIST sein. Es existieren zwei verschiedene p16^{INK4A}-Formen, die in mehreren Studien mit abweichenden Ergebnissen beurteilt wurden. Am Tumorkollektiv wurde sowohl die immunhistochemische Kernexpression von p16^{INK4A} als auch die zytoplasmatische p16^{INK4A}-Expression untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein GIST-Kollektiv von 122 Patienten mittels Tissue Microarray-Technologie und immunhistochemischer Untersuchungsverfahren analysiert und die quantitative Proteinexpression von E2F1 und die Kernexpression von p16^{INK4A} sowie die semiquantitative Proteinexpression der zytoplasmatischen Expression von p16^{INK4A} bestimmt. Im Weiteren wurden diese Proteine im Vergleich zu den klinisch-pathologischen Parametern Tumorgroße, Mitoserate und Tumorklassifikation sowie den zwei Risikoklassifikationen nach Fletcher et al. (2002) und Miettinen und Lasota (2006) betrachtet, die sich in der Berücksichtigung der anatomischen Lokalisation unterscheiden. Die klinisch-pathologischen Parameter, die Risikoklassifikationen und die Proteine wurden auch mit- und untereinander verglichen und es wurde ein klinischer Verlauf dargestellt.

Im untersuchten Tumorkollektiv konnte eine signifikante Assoziation zwischen einer starken zytoplasmatischen p16^{INK4A}-Expression und einem ungünstigen klinischen Verlauf sowohl uni- als multivariat nachgewiesen werden. Dagegen hatte die p16^{INK4A}-Kernexpression weder uni- noch multivariat sowohl als nominaler als auch

als kontinuierlicher Parameter einen signifikanten Einfluss auf die krankheitsfreie Überlebenszeit. Ebenso konnte kein signifikanter Zusammenhang mit der krankheitsfreien Überlebenszeit und einer niedrigen oder hohen Expression von E2F1 nachgewiesen werden, wenngleich der Trend in unserem Tumorkollektiv die Ergebnisse in der Literatur bestätigt, dass eine Überexpression von E2F1 mit klinisch aggressiverem Verhalten assoziiert wird.

Zusammenfassend ergab sich in unserem Kollektiv, dass sowohl bei einer univariaten als auch multivariaten Analyse des rezidivfreien Überlebens, stratifiziert nach den drei Proteinen als nominale oder kontinuierliche Parameter, nur die zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A} signifikant war.

Nimmt man zu den drei Proteinen zusätzlich die Risikoklassifikationen von Fletcher et al. (2002) beziehungsweise Miettinen und Lasota (2006) und die Tumorlokalisierung, so sind in einem Cox-Prognosemodell jeweils nur die Risikoklassifikationen von Fletcher et al. (2002) beziehungsweise Miettinen und Lasota (2006) signifikant. Die zytoplasmatische Expression von p16^{INK4A}, die Kernexpression von p16^{INK4A} und die Kernexpression von E2F1 liefern keine signifikanten Zusatzinformationen zu den beiden bekannten Risikoklassifikationen für das rezidivfreie Überleben. Diese sind zudem einfacher und kostengünstiger zu erheben. Untersucht man die Einzelparameter, so ist die Mitoserate der mit Abstand wichtigste Parameter, gefolgt von Lokalisation und der Tumorgroße.

Literaturverzeichnis

Agaimy A, Wunsch PH, Hofstaedter F, Blaszyk H, Rummele P, Gaumann A, Dietmaier W, Hartmann A (2007): "Minute gastric sclerosing stromal tumors (GIST tumorlets) are common in adults and frequently show c-KIT mutations." *Am J Surg Pathol* 31, 113-120

Agaimy A, Dirnhofer S, Wünsch PH, Terracciano LM, Tornillo L, Bihl MP (2008a): Multiple sporadic gastrointestinal stromal tumors (GISTs) of the proximal stomach are caused by different somatic KIT mutations suggesting a field effect. *Am J Surg Pathol* 32, 1553-1559

Agaimy A, Wünsch PH, Dirnhofer S, Bihl MP, Terracciano LM, Tornillo L (2008b): "Microscopic gastrointestinal stromal tumors in esophageal and intestinal surgical resection specimens: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular study of 19 lesions." *Am J Surg Pathol* 32, 867-873

Amin MB, Ma CK, Linden MD, Kubus JJ, Zarbo RJ (1993): "Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen index in gastric stromal tumors. Correlation with mitotic count and clinical outcome." *Am J Clin Pathol* 100, 428-432

Andersson J, Sihto H, Meis-Kindblom JM, Joensuu H, Nupponen N, Kindblom LG (2005): "NF1-associated gastrointestinal stromal tumors have unique clinical, phenotypic, and genotypic characteristics." *Am J Surg Pathol* 29, 1170-1176

Andersson J, Bumming 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 (2006): "Gastrointestinal stromal tumor (GIST) pathogenesis, familial GIST, and animal models." *Semin Diagn Pathol* 23, 63-69

Antonescu CR, Sommer G, Sarraf 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

Appelman HD (1986): "Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract. What we know now that Stout didn't know." *Am J Surg Pathol* 10 Suppl 1, 83-99

Arifin MT, Hama S, Kajiwaru Y, Sugiyama K, Saito T, Matsuura S, Yamasaki F, Arita K, Kurisu K (2006): "Cytoplasmic, but not nuclear, p16 expression may signal poor prognosis in high-grade astrocytomas." *J Neurooncol* 77, 273-277

Blagosklonny MV, Pardee AB (2002): "The restriction point of the cell cycle." *Cell Cycle* 1, 103-110

Blanke CD, Corless CL (2005): "State-of-the art therapy for gastrointestinal stromal tumors." *Cancer Invest* 23, 274-280

Blay P, Astudillo A, Buesa JM, Campo E, Abad M, Garcia-Garcia J, Miquel R, Marco V, Sierra M, Losa R et al. (2004): "Protein kinase C theta is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias." *Clin Cancer Res* 10, 4089-4095

Blesius A, Cassier PA, Bertucci F, Fayette J, Ray-Coquard I, Bui B, Adenis A, Rios M, Cupissol D, Perol D et al. (2011): "Neoadjuvant imatinib in patients with locally advanced non metastatic GIST in the prospective BFR14 trial." *BMC Cancer* 11, 72

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

Böcker W, Denk H, Heitz Ph U in: *Pathologie*, 3. Auflage, hrsg. von Elsevier, München 2004, 525-526

Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, Lydon NB (2000): "Abl protein-tyrosine kinase inhibitor ST1571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 295, 139-145

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

Casali PG, Blay JY: "Gastrointestinal stromal tumours (2010): "ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." *Ann Oncol* 21, v98-102

Casali PG, Jost L, Reichardt P, Schlemmer M, Blay JY (2008): "Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up." *Ann Oncol* 19, ii35-38

Cassier PA, Ducimetiere F, Lurkin A, Ranchere-Vince D, Scoazec JY, Bringuier PP, Decouvelaere AV, Meeus P, Cellier D, Blay JY et al. (2010): "A prospective epidemiological study of new incident GISTs during two consecutive years in Rhone Alpes region: incidence and molecular distribution of GIST in a European region." *Br J Cancer* 103, 165-170

Connolly EM, Gaffney E, Reynolds JV (2003): "Gastrointestinal stromal tumours." *Br J Surg* 90, 1178-1186

Corless CL, McGreevey L, Haley A, Town A, Heinrich MC (2002): "KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size." *Am J Pathol* 160, 1567-1572

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, Bain-bridge T, Morich J, Heinrich MC (2005): "PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib." *J Clin On-col* 23, 5357-5364

Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC (2011): "Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology." *Nat Rev Cancer* 11, 865-878

D'Amato G, Steinert DM, McAuliffe JC, Trent JC (2005): "Update on the biology and therapy of gastrointestinal stromal tumors." *Cancer Control* 12, 44-56

d'Auriol L, Mattei MG, Andre C, Galibert F (1988): "Localization of the human c-kit protooncogene on the q11-q12 region of chromosome 4." *Hum Genet* 78, 374-376

Daum O, Klecka J, Ferda J, Treska V, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Michal M (2005): "Gastrointestinal stromal tumor of the pancreas: case report with documentation of KIT gene mutation." *Virchows Arch* 446, 470-472

de Silva CM, Reid R (2003): "Gastrointestinal stromal tumors (GIST): C-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with Imatinib." *Pathol Oncol Res* 9, 13-19

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, Liao 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

Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M et al. (2002): "Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors." *N Engl J Med* 347, 472-480

Demetri GD, Benjamin R, Blanke CD, Choi H, Corless C, DeMatteo RP, Eisenberg BL, Fletcher CD, Maki RG, Rubin BP et al. (2004): "NCCN Task Force report: optimal management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST)--expansion and update of NCCN clinical practice guidelines." *J Natl Compr Canc Netw* 2, 1-26

Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA et al. (2006): "Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial." *Lancet* 368, 1329-1338

Demetri GD, Benjamin RS, Blanke CD, Blay JY, Casali P, Choi H, Corless CL, Debiec-Rychter M, DeMatteo RP, Ettinger DS et al. (2007): "NCCN Task Force report: management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST)--update of the NCCN clinical practice guidelines." *J Natl Compr Canc Netw* 5, 1-29

Demetri GD, Reichardt P, Kang YK, Blay JY, Rutkowski P, Gelderblom H, Hohenberger P, Leahy M, von Mehren M, Joensuu H et al. (2013): "Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial." *Lancet* 381, 295-302

Druker BJ, Lydon NB (2000): "Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia." *J Clin Invest* 105, 3-7

Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S et al. (2001): "Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia." *N Engl J Med* 344, 1031-1037

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

Duffaud F, Blay JY (2003): "Gastrointestinal stromal tumors: biology and treatment." *Oncology* 65, 187-97

Emig R, Magener A, Ehemann V, Meyer A, Stilgenbauer F, Volkmann M, Wallwiener D, Sinn HP (1998): "Aberrant cytoplasmic expression of the p16 protein in breast cancer is associated with accelerated tumour proliferation." *Br J Cancer* 78, 1661-1668

Emile JF, Theou N, Tabone S, Cortez A, Terrier P, Chaumette MT, et al. (2004): "Clinicopathologic, phenotypic, and genotypic characteristics of gastrointestinal mesenchymal tumors." *Clin Gastroenterol Hepatol* 2, 597-605

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

Erlandson RA, Klimstra DS, Woodruff JM (1996): "Subclassification of gastrointestinal stromal tumors based on evaluation by electron microscopy and immunohistochemistry." *Ultrastruct Pathol* 20, 373-393

Evangelou K, Bramis J, Peros I, Zacharatos P, Dasiou-Plakida D, Kalogeropoulos N, Asimacopoulos PJ, Kittas C, Marinos E, Gorgoulis VG (2004): "Electron microscopy evidence that cytoplasmic localization of the p16(INK4A) "nuclear" cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) in tumor cells is specific and not an artifact. A study in non-small cell lung carcinomas." *Biotech Histochem* 79, 5-10

Fiore M, Palassini E, Fumagalli E, Pilotti S, Tamborini E, Stacchiotti S, Pennacchioli E, Casali PG, Gronchi A (2009): "Preoperative imatinib mesylate for unresectable or locally advanced primary gastrointestinal stromal tumors (GIST)." *Eur J Surg Oncol* 35, 739-745

Fletcher CDM, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP et al. (2002): "Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach." *Hum Pathol* 33, 459-465

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

Franquemont DW, Frierson HF Jr. (1992): "Muscle differentiation and clinicopathologic features of gastrointestinal stromal tumors." *Am J Surg Pathol* 16, 947-954

Füzesi L (2003): "Gastrointestinal Stromal Tumour (GIST): Review of Pathology." *Viszeralchirurgie* 38, 358-362

Golden T, Stout AP (1941): "Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract and retroperitoneal tissues." *Surg Gynecol Obstet* 73, 784-810

Haller F: Molekularbiologische Evaluation prognostischer Parameter in Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST). Med. Habil.-Schr. Göttingen 2008

Haller F, Gunawan B, von Heydebreck A, Schwager S, Schulten HJ, Wolf-Salgó J, Langer C, Ramadori G, Sülthmann H, Füzesi L (2005): "Prognostic role of E2F1 and members of the CDKN2A network in gastrointestinal stromal tumors." *Clin Cancer Res* 11, 6589-6597

Haller F, Happel N, Schulten HJ, von Heydebreck A, Schwager S, Armbrust T, Langer C, Gunawan B, Doenecke D, Füzesi L (2007): "Site-dependent differential KIT and PDGFRA expression in gastric and intestinal gastrointestinal stromal tumors." *Mod Pathol* 20, 1103-1111

Haller F, Lobke C, Ruschhaupt M, Cameron S, Schulten HJ, Schwager S, von Heydebreck A, Gunawan B, Langer C, Ramadori G et al. (2008): "Loss of 9p leads to p16INK4A down-regulation and enables RB/E2F1-dependent cell cycle promotion in gastrointestinal stromal tumours (GISTs)." *J Pathol* 215, 253-262

Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, Merkelbach-Bruse S, Preussner LM, Woolery C, Baldus SE, Heinicke T, Thiele J, Buettner R et al. (2005): "Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis." *Gastroenterology* 129, 1042-1046

Hasegawa T, Matsuno Y, Shimoda T, Hirohashi S (2002): "Gastrointestinal stromal tumor: consistent CD117 immunostaining for diagnosis, and prognostic classification based on tumor size and MIB-1 grade." *Hum Pathol* 33, 669-676

Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ (2000): "Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor." *Blood* 96, 925-932

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. (2003a): "Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor." *J Clin Oncol* 21, 4342-4349

Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA (2003b): "PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors." *Science* 299, 708-710

Hillemanns M, Hofler H (2000): "Current classification of gastrointestinal stromal tumors." *Chirurg* 71, 1327-1334

Hirota S, Isozaki K (2006): "Pathology of gastrointestinal stromal tumors." *Pathol Int* 56, 1-9

Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M et al. (1998): "Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors." *Science* 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

Hirota S, Ohashi A, Nishida T, Isozaki K, Kinoshita K, Shinomura Y, Kitamura Y (2003): "Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors." *Gastroenterology* 125, 660-667

Huang HY, Huang WW, Lin CN, Eng HL, Li SH, Li CF, Lu D, Yu SC, Hsiung CY (2006): "Immunohistochemical expression of p16INK4A, Ki-67, and Mcm2 proteins in gastrointestinal stromal tumors: prognostic implications and correlations with risk stratification of NIH consensus criteria." *Ann Surg Oncol* 13, 1633-1644

Ishida S, Huang E, Zuzan H, Spang R, Leone G, West M, Nevins JR (2001): "Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis." *Mol Cell Biol* 21, 4684-4699

Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, Silberman S, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B et al. (2001): "Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor." *N Engl J Med* 344, 1052-1056

Joensuu H, Eriksson M, Sundby Hall K, Hartmann JT, Pink D, Schutte J, Ramadori G, Hohenberger P, Duyster J, Al-Batran SE et al. (2012): "One vs three years of adjuvant imatinib for operable gastrointestinal stromal tumor: a randomized trial." *JAMA* 307, 1265-1272

Kawanowa K, Sakuma Y, Sakurai S, Hishima T, Iwasaki Y, Saito K, Hosoya Y, Nakajima T, Funata N (2006): "High incidence of microscopic gastrointestinal stromal tumors in the stomach." *Hum Pathol* 37, 1527-1535

Kay S, Still WJS (1969): "A comparative electron microscopy study of a leiomyosarcoma and bizarre leiomyoma (leiomyoblastoma) of the stomach." *Am J Clin Pathol* 52, 403-413

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

Kinoshita K, Isozaki K, Hirota S, Nishida T, Chen H, Nakahara M, Nagasawa Y, Ohashi A, Shinomura Y, Kitamura Y et al. (2003): "c-kit gene mutation at exon 17 or 13 is very rare in sporadic gastrointestinal stromal tumors." *J Gastroenterol Hepatol* 18, 147-151

Kitamura Y, Hirota S (2004): "Kit as a human oncogenic tyrosine kinase." *Cell Mol Life Sci* 61, 2924-2931

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M (2001): "Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri." *Int J Cancer* 92, 276-284

Lasota J, Miettinen M (2008): "Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours." *Histopathology* 53, 245-266

Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M (1999): "Mutations in exon 11 of c-Kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas." *Am J Pathol* 154, 53-60

Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Kordek R, Nassar A, Sobin LH, Miettinen M (2000): "Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases." *Am J Pathol* 157, 1091-1095

Lasota J, Kopczynski J, Sarlomo-Rikala M, Schneider-Stock R, Stachura T, Kordek R, Michal M, Boltze C, Roessner A, Stachura J et al. (2003): "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, 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

Lasota J, Corless CL, Heinrich MC, Debiec-Rychter M, Sciort R, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Schildhaus HU, Steigen SE, Stachura J et al. (2008): "Clinicopathologic profile of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with primary KIT exon 13 or exon 17 mutations: a multicenter study on 54 cases." *Mod Pathol* 21, 476-484

Lee JR, Joshi V, Griffin JW, Jr., Lasota J, Miettinen M (2001): "Gastrointestinal autonomic nerve tumor: immunohistochemical and molecular identity with gastrointestinal stromal tumor." *Am J Surg Pathol*. 25, 979-987

Lukas J, Petersen BO, Holm K, Bartek J, Helin K (1996): "Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression." *Mol Cell Biol* 16, 1047-1057

Lundberg AS, Weinberg RA (1998): "Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes." *Mol Cell Biol* 18, 753-761

Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, Xiao S, Singer S, Fletcher CDM, Fletcher JA (2000): "KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors." *Am J Pathol* 156, 791-795

Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K (1992): "Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system." *Development* 116, 369-375

Mazur MT, Clark HB (1983): "Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis." *Am J Surg Pathol* 7, 507-519

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, Maarit Sarlomo R (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, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ (1998): "Cell-type- and tumour-type-related patterns of bcl-2 reactivity in mesenchymal cells and soft tissue tumours." *Virchows Arch* 433, 255-260

Miettinen M, Monihan JM, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Carr NJ, Emory TS, Sobin LH (1999a): "Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery: clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases." *Am J Surg Pathol* 23, 1109-1118

Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J (1999b): "Gastrointestinal stromal tumors recent advances in understanding of their biology." *Hum Pathol* 30, 1213-1220

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, Fetsch JF, Sobin LH, Lasota J (2006a): "Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases." *Am J Surg Pathol* 30, 90-96

Miettinen M, Makhoul H, Sobin LH, Lasota J (2006b): "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

Miettinen M, Wang ZF, Lasota J (2009): "DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases." *Am J Surg Pathol* 33: 1401-1408.

Mikhael AL, Bacchi CE, Zarbo RJ, Ma CK, Gown AM (1994): "CD 34 expression in stromal tumors of the gastrointestinal tract." *Appl Immunohistochem* 2, 89-93

Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, Kelp B, Loning T (2001): "Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype." *Breast Cancer Res Treat* 67, 61-70

Min KW (1992): "Small intestinal stromal tumors with skeinoid fibers. Clinicopathological, immunohistochemical, and ultrastructural investigations." *Am J Surg Pathol* 16, 145-155

Monihan JM, Carr NJ, Sobin LH (1994): "CD34 immunoexpression in stromal tumours of the gastrointestinal tract and in mesenteric fibromatoses." *Histopathology* 25, 469-473

Motegi A, Sakurai S, Nakayama H, Sano T, Oyama T, Nakajima T (2005): "PKC theta, a novel immunohistochemical marker for gastrointestinal stromal tumors (GIST), especially useful for identifying KIT-negative tumors." *Pathol Int* 55, 106-112

Müller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E, Prosperini E, Vigo E, Oliner JD, Helin K (2001): "E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis." *Genes Dev* 15, 267-285

Nakamura N, Yamamoto H, Yao T, Oda Y, Nishiyama K, Imamura M, Yamada T, Nawata H, Tsuneyoshi M (2005): "Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade." *Hum Pathol* 36, 828-837

Nemoto Y, Mikami T, Hana K, Kikuchi S, Kobayashi N, Watanabe M, Okayasu I (2006): "Correlation of enhanced cell turnover with prognosis of gastrointestinal stromal tumors of the stomach: relevance of cellularity and p27kip1." *Pathol Int* 56, 724-731

Nilsson B, Bumming P, Meis-Kindblom JM, Oden 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

Nilsson K, Landberg G (2006): "Subcellular localization, modification and protein complex formation of the cdk-inhibitor p16 in Rb-functional and Rb-inactivated tumor cells." *Int J Cancer* 118, 1120-1125

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

O'Dwyer ME, Druker BJ (2000): "STI571: an inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase for the treatment of chronic myelogenous leukaemia." *Lancet Oncol* 1, 207-211

Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett WP, Forrester K, Gerwin B, Serrano M, Beach DH et al. (1994): "Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11045-11049

Ortiz-Hidalgo C, de Leon Bojorge B, Albores-Saavedra J (2000): "Stromal tumor of the gallbladder with phenotype of interstitial cells of Cajal: a previously unrecognized neoplasm." *Am J Surg Pathol* 24, 1420-1423

Pauls K, Merkelbach-Bruse S, Thal D, Buttner R, Wardelmann E (2005): "PDGFRalpha- and c-kit-mutated gastrointestinal stromal tumours (GISTs) are characterized by distinctive histological and immunohistochemical features." *Histopathology* 46, 166-175

Penzel R, Aulmann S, Moock M, Schwarzbach M, Rieker RJ, Mechtersheimer G (2005): "The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated." *J Clin Pathol* 58, 634-639

Perrone F, Tamborini E, Dagrada GP, Colombo F, Bonadiman L, Albertini V, Lagonigro MS, Gabanti E, Caramuta S, Greco A et al. (2005): "9p21 locus analysis in high-risk gastrointestinal stromal tumors characterized for c-kit and platelet-derived growth factor receptor alpha gene alterations." *Cancer* 104, 159-169

Plaat BE, Hollema H, Molenaar WM, Torn Broers GH, Pijpe J, Mastik MF, Hoekstra HJ, van den Berg E, Scheper RJ, van der Graaf WT (2000): "Soft tissue leiomyosarcomas and malignant gastrointestinal stromal tumors: differences in clinical outcome and expression of multidrug resistance proteins." *J Clin Oncol* 18, 3211-3220

Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ (1995): "Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest." *Cell* 83, 993-1000

Reith JD, Goldblum JR, Lyles RH, Weiss SW (2000): "Extragastrointestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome." *Mod Pathol* 13, 577-585

Ricci R, Arena V, Castri F, Martini M, Maggiano N, Murazio M, Pacelli F, Potenza AE, Vecchio FM, Larocca LM (2004): "Role of p16/INK4a in gastrointestinal stromal tumor progression." *Am J Clin Pathol* 122, 35-43

Rousset D, Agnes F, Lachaume P, Andre C, Galibert F (1995): "Molecular evolution of the genes encoding receptor tyrosine kinase with immunoglobulinlike domains." *J Mol Evol* 41, 421-429

Rubin BP (2006): "Gastrointestinal stromal tumours: an update." *Histopathology* 48, 83-96

Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA et al. (2001): "KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors." *Cancer Res* 61, 8118-8121

Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E (2004): "Loss of heterozygosity of chromosome 9p and loss of p16INK4A expression are associated with malignant gastrointestinal stromal tumors." *Mod Pathol* 17, 1364-1371

Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E (2006): "Altered expression of cell cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumors: markers with potential prognostic implications." *Hum Pathol* 37, 648-655

Sakurai S, Hishima T, Takazawa Y, Sano T, Nakajima T, Saito K, Morinaga S, Fukayama M (2001): "Gastrointestinal stromal tumors and KIT-positive mesenchymal cells in the omentum." *Pathol Int* 51, 524-531

Sanborn RE, Blanke CD (2005): "Gastrointestinal stromal tumors and the evolution of targeted therapy." *Clin Adv Hematol Oncol* 3, 647-657

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

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

Schlessinger J (2000): "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." *Cell* 103, 211-25

Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Miettinen M, Peters B, Pross M, Roessner A, Gunther T (2003): "High prognostic value of p16INK4 alterations in gastrointestinal stromal tumors." *J Clin Oncol* 21, 1688-1697

Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Peters B, Corless CL, Ruemmele P, Terracciano L, Pross M, Insausti L, Di Vizio D et al. (2005): "Loss of p16 protein defines high-risk patients with gastrointestinal stromal tumors: a tissue microarray study." *Clin Cancer Res* 11, 638-645

Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993): "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4." *Nature* 366, 704-707

Shek TW, Luk IS, Loong F, Ip P, Ma L (1996): "Inflammatory cell-rich gastrointestinal autonomic nerve tumor. An expansion of its histologic spectrum." *Am J Surg Pathol* 20, 325-331

Sherr CJ (2001): "The INK4a/ARF network in tumour suppression." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 731-737

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

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

Steigen SE, Bjerkehagen B, Haugland HK, Nordrum IS, Loberg EM, Isaksen V, Eide TJ, Nielsen TO (2008): "Diagnostic and prognostic markers for gastrointestinal stromal tumors in Norway." *Mod Pathol* 21, 46-53

Stout AP (1962): "Bizarre smooth muscle tumors of the stomach." *Cancer* 15, 400-409

Thomsen L, Robinson TL, Lee JC, Faraway LA, Hughes MJ, Andrews DW, Huizinga JD (1998): "Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current." *Nat Med.* 4, 848-851

Tran T, Davila JA, El-Serag HB (2005): "The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 1,458 cases from 1992 to 2000." *Am J Gastroenterol* 100, 162-168

Tryggvason G, Gislason HG, Magnusson MK, Jonasson JG (2005): "Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: the icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study." *Int J Cancer* 117, 289-293

Tuveson DA, Willis NA, Jacks T, Griffin JD, Singer S, Fletcher CD, Fletcher JA, Demetri GD (2001): "STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications." *Oncogene* 20, 5054-5058

Van Glabbeke M, Verweij J, Casali PG, Le Cesne A, Hohenberger P, Ray-Coquard I, Schlemmer M, van Oosterom AT, Goldstein D, Sciot R et al. (2005): "Initial and late resistance to imatinib in advanced gastrointestinal stromal tumors are predicted by different prognostic factors: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Italian Sarcoma Group-Australasian Gastrointestinal Trials Group study." *J Clin Oncol* 23, 5795-5804

Vu HA, Xinh PT, Kikushima M, Zhu Y, Tokuhara M, Tani M, Shimizu T, Saito K, Tokunaga K, Sato Y (2005): "A recurrent duodenal gastrointestinal stromal tumor with a frameshift mutation resulting in a stop codon in KIT exon 13." *Genes Chromosomes Cancer* 42, 179-183

Wardelmann E, Losen I, Hans V, Neidt I, Speidel N, Bierhoff E, Heinicke T, Pietsch T, Buttner R, Merkelbach-Bruse S (2003): "Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors." *Int J Cancer* 106, 887-895

Wardelmann E, Hrychyk 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

Wardelmann E, Buttner R, Merkelbach-Bruse S, Schildhaus HU (2007): "Mutation analysis of gastrointestinal stromal tumors: increasing significance for risk assessment and effective targeted therapy." *Virchows Arch* 451, 743-749

Wasag B, Debiec-Rychter M, Pauwels P, Stul M, Vranckx H, van Oosterom A, Hagemeijer A, Sciot R (2004): "Differential expression of KIT/PDGFRA mutant isoforms in epithelioid and mixed variants of gastrointestinal stromal tumors depends predominantly on the tumor site." *Mod Pathol* 17, 889-894

Weintraub SJ, Prater CA, Dean DC (1992): "Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element." *Nature* 358, 259-261

Welsh RA, Meyer AT (1969): "Ultrastructure of gastric leiomyoma." *Arch Pathol* 87, 71-81

West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zhu S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R et al. (2004): "The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status." *Am J Pathol* 165, 107-113

Yoo C, Ryu MH, Ryoo BY, Beck MY, Kang YK (2013): "Efficacy, safety, and pharmacokinetics of imatinib dose escalation to 800 mg/day in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors." *Invest New Drugs* 31, 1367-1374

Zalcberg JR, Verweij J, Casali PG, Le Cesne A, Reichardt P, Blay JY, Schlemmer M, Van Glabbeke M, Brown M, Judson IR (2005): "Outcome of patients with advanced gastrointestinal stromal tumours crossing over to a daily imatinib dose of 800 mg after progression on 400 mg." *Eur J Cancer* 41, 1751-1757

Zarkowska T, Mitnacht S (1997): "Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases." *J Biol Chem* 272, 12738-1246

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. László Füzesi bedanke ich mich ganz herzlich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die intensive, engagierte und hervorragende Betreuung während der Arbeit. Insbesondere bedanke ich mich für seine immerwährende Erreichbarkeit und seine Mühen, die diese Dissertation ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. med. Florian Haller danke ich für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und Anleitung, in der er mich stets sorgfältig und geduldig beraten sowie motiviert hat.

Mein persönlicher Dank gilt Prof. Dr. Manfred Wischnewski für die innovativen Anregungen und Hilfestellungen bei der statistischen Auswertung und für die produktiven Ratschläge sowie qualifizierten Anmerkungen bei der Durchsicht meiner Dissertation.

Ebenfalls danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung für Gastroenteropathologie für das freundliche Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft.