

Universitätsklinikum Ulm
Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
Prof. Dr. med. Doris Henne-Bruns

Expression und prognostische Bedeutung verschiedener Proteine bei Gastrointestinalen Stromatumoren

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm.

Michael Schmieder, Schwäbisch Gmünd
2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. biol. hum. Uwe Knippschild

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Barth

Tag der Promotion: 18.06.2009

Widmung

Diese Arbeit ist meinen Eltern und Großeltern gewidmet, die jederzeit für mich da waren und mich zu jeder Zeit unterstützt haben.

Vielen Dank Euch für alles!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		
1	Einleitung	- 1 -
1.1	Historisches.....	- 1 -
1.2	Epidemiologie.....	- 1 -
1.3	Einteilung	- 2 -
1.3.1	Histopathologische Einteilung.....	- 2 -
1.3.2	Einteilung nach Risikopotential.....	- 2 -
1.4	Molekulare Pathogenese.....	- 3 -
1.5	Immunhistochemische Marker	- 5 -
1.5.1	CD117 und Platelet-derived growth factor receptor α	- 5 -
1.5.2	CD34	- 5 -
1.5.3	Aktin, Desmin und andere Muskelzellmarker.....	- 6 -
1.5.4	S100	- 7 -
1.5.5	Epidermal growth factor receptor.....	- 7 -
1.5.6	P53	- 8 -
1.5.7	P16	- 8 -
1.5.8	Andere Marker.....	- 8 -
1.6	GIST-Syndrome	- 9 -
1.6.1	Familiäre GIST-Syndrome	- 9 -
1.6.2	Carney-Triad.....	- 9 -
1.6.3	GIST und Neurofibromatose Typ 1.....	- 10 -
1.6.4	Gastrointestinal autonomic nerve tumours	- 10 -
1.7	Therapie.....	- 10 -
1.8	Fragestellung	- 11 -
2	Material und Methodik	- 13 -
2.1	Materialien.....	- 13 -
2.1.1	Gerätschaften	- 13 -
2.1.2	Verbrauchsmaterial.....	- 13 -
2.1.3	Allgemeine Chemikalien	- 14 -
2.1.4	Antikörper und Detektions-Kits	- 15 -
2.1.5	Software	- 15 -
2.2	Methodik.....	- 16 -
2.2.1	Patientenkollektiv.....	- 16 -
2.2.2	Datenerfassung und Klassifikation.....	- 16 -
2.2.3	Gewinnung der Paraffinschnitte.....	- 18 -
2.2.4	Immunhistochemische Aufbereitung.....	- 19 -
2.2.5	Auswertungsmethodik und Statistik.....	- 21 -
2.2.6	Bemerkungen	- 25 -
3	Ergebnisse	- 26 -
3.1	Datenbank.....	- 26 -
3.2	Patientenkollektiv und Epidemiologie	- 27 -
3.3	Klinisches Erscheinungsbild.....	- 30 -
3.3.1	Lokalisierung und weitere Parameter des Primärtumors	- 30 -
3.3.2	Sekundärneoplasien	- 32 -
3.3.3	Rezidive und Metastasen	- 32 -
3.3.4	Allgemeine Überlebenszeitanalyse.....	- 34 -

3.4	Pathologie	- 35 -
3.4.1	Zellmorphologie	- 35 -
3.4.2	Risikostratifikation	- 36 -
3.4.3	Immunhistochemie	- 39 -
3.4.4	Prognostische Korrelationen	- 43 -
4	Diskussion	- 55 -
4.1	Epidemiologie	- 55 -
4.2	Klinisches Erscheinungsbild	- 56 -
4.3	Pathologie	- 58 -
4.3.1	Zellmorphologie	- 58 -
4.3.2	Risikoklassifikation	- 58 -
4.3.3	CD117 und Platelet-derived growth factor receptor α	- 61 -
4.3.4	Nebenbefundlich erhobene Parameter	- 61 -
4.3.5	Expression von Epidermal growth factor receptor	- 64 -
4.3.6	Expression von P53	- 66 -
4.3.7	Expression von P16	- 67 -
5	Zusammenfassung	- 71 -
6	Literaturverzeichnis	- 73 -

Abkürzungsverzeichnis

Σ	Summe
°C	Grad Celcius
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
a	Jahre
a.d.	aqua destilata
AP	Alkalische Phosphatase
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
CDK	cyclin-dependent-kinase
cm	Zentimeter
d	Durchmesser
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	District Columbia
DFS	disease-free-survival
DFSP	disease-free-survival-probability
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOG	discovered on GIST (entdeckt in GIST)
DSS	disease-specific-survival
DSSP	disease-specific-survival-probability
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
eGIST	extragastrointestinaler Stromatumor
GANT	gastrointestinal autonomic nerve tumours
GI	gastrointestinal
GIST	Gastrointestinale(r) Stromatumor(en)
HER	human epidermal growth factor receptor
HPF(s)	high power field(s)
HPV	Humanes Papillomavirus
ICC	Interstitial Cells of Cajal

ICLC	Interstitial Cajal-like cells
IgG	Immunglobulin G
INK	inhibitor of kinase
JAK	Januskinase
kDa	Kilo-Dalton
KI	Konfidenzintervall
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
mg	Milligramm
MiB	made in Borstel
mMol	Millimol
MR	Mitoserate
n	Anzahl
NF	Neurofibromatose
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OR	Odds Ratio
PBS	phosphate buffered saline
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
pH	Pondus hydrogenii
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pRb	Retinoblastomprotein
R/M	Rezidive/Metastasen
SMA	smooth-muscle-actin
s _{St}	Standardabweichung der Stichprobe
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBEL	tumorbedingter Exitus letalis
TBS	Tris-buffered-saline
TGF- α	transforming growth factor alpha
ÜLW	Überlebenswahrscheinlichkeit
USA	United States Of America
vs.	versus (gegenüber)

1 Einleitung

1.1 Historisches

Die Entität der Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) ist erst seit ungefähr 15 Jahren wissenschaftlich definiert. Aus heutiger Sicht wurden diese Tumoren früher als Leiomyome, Leiomyoblastome, Leiomyosarkome, Neurofibrome oder Schwannome fehldiagnostiziert. In Anknüpfung an Neoplasien im Mastzellsystem konnte Anfang der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts der entscheidende differenzialdiagnostische Parameter entdeckt werden, der es ab diesem Zeitpunkt möglich machte, Gastrointestinale Stromatumoren in über 90% der Fälle immunhistochemisch zu identifizieren und von den oben genannten, verwandten Tumoren abzugrenzen [39]. Seither sind GIST Gegenstand intensiver Forschung in der ganzen Welt.

1.2 Epidemiologie

Gastrointestinale Stromatumoren sind die häufigsten mesenchymalen Tumore des Gastrointestinaltraktes. Mit weniger als 1-3% aller Neoplasien im Magen-Darmbereich stellen sie jedoch nur eine relativ kleine Entität dar [16, 64, 73]. Die Inzidenz wird in verschiedenen Studien mit 1,1 - 1,45 /100.000 und Jahr angegeben [72, 110].

Hauptsächlich betroffen sind Erwachsene jenseits des 50. Lebensjahres mit einem medianen Erkrankungsalter um das 60. Lebensjahr, es erkranken jedoch auch in 5-20% aller Fälle Menschen vor der 5. Lebensdekade [69]. GIST können in seltenen Fällen (< 1%) auch bei Kindern gefunden werden.

Eine klare Geschlechtspräferenz besteht nicht, jedoch deuten einzelne Studien darauf hin, dass maligne GIST häufiger bei Männern auftreten [69].

1.3 Einteilung

1.3.1 Histopathologische Einteilung

Innerhalb der GIST lassen sich im Wesentlichen drei histologische Phänotypen unterscheiden. Am häufigsten findet sich der spindelzellige Typ mit zigarrenförmigen Kernen und „fischgrätenartigem“ Wachstumsmuster, seltener sind epitheloidzellige oder gemischtzellige Typen.

Einige Autoren unterscheiden weiterhin in gastralen GIST bis zu 8 histologische Subtypen: Sklerosierend-spindelzellige, palisadenartig-spindelzellige Typen mit Vakuolen, hyperzellulär-spindelzellige, sarkomatös-spindelzellige, sklerosierend-epitheloidzellige mit synzytiellem Muster, epitheloidzellige mit inkohäsivem Muster, hyperzellulär-epitheloidzellige und sarkomatös-epitheloidzelligen Formen. Diese weitergehende Differenzierung hat jedoch für die tägliche Routine keine Relevanz.

1.3.2 Einteilung nach Risikopotential

Die Beurteilung des Risikopotentials Gastrointestinaler Stromatumoren war in der Vergangenheit zunächst schwierig, da sich Klassifikationssysteme von Weichteilsarkomen als nicht übertragbar erwiesen.

Wichtigste Instrumente zur Einschätzung des Risikos einer fortschreitenden GIST-Erkrankung sind nach aktuellem Wissensstand die Bestimmung der Tumorgroße und der Mitoserate [67, 70]. Die Tumorgroße wird dabei durch den größten Diameter des Tumors bestimmt. Die Mitoserate wird durch Auszählen aller Mitosen bezogen auf 50 High-Power-Fields (HPF, bei 400facher Vergrößerung) entsprechend 5mm² Tumorfläche im mitosereichsten Areal des Tumors ermittelt. Proliferationsmarker wie MiB-1 sind in diesem Zusammenhang der Bestimmung der Mitoserate nicht überlegen [21, 92].

In der Beurteilung des Risikopotentials Gastrointestinaler Stromatumoren fand einzig die Klassifikation nach Fletcher et al. aus dem Jahre 2002 [26] Einzug in die Routinediagnostik. Fletcher unterscheidet GIST in Abhängigkeit von Tumorgroße und Mitoserate (s. Tabelle 1) in die Gruppen „Very Low“, „Low“, „Intermediate“ und

„High“ und schätzt auf diese Weise das Risiko malignen Verhaltens. Diese Einteilung hat sich in der Routine bewährt, zeigt jedoch auch Grenzen, da manche Kombinationen aus Größe und Mitoserate nicht definiert wurden.

In Studien von Miettinen et al. wurde ab 2003 eine alternative und genauere Klassifikation auch in großen Studien etabliert. Diese unterscheidet zunächst sechs Gruppen ebenfalls nach größtem Diameter und Mitoserate auf 50 HPF [65, 67, 70]. GIST des Dünndarms weisen im Vergleich zu solchen des Magens bei gleicher Größe und Mitoserate in der Regel ein höheres Malignitätspotential auf. Dies wird in der Klassifikation nach Miettinen berücksichtigt [69].

Weiterhin ist bekannt, dass GIST mit Koagulationsnekrosen, Ulzeration oder Invasion der Mukosa ebenfalls mit einem schlechteren Outcome assoziiert sind. [54, 67, 70].

1.4 Molekulare Pathogenese

Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass GIST aus den sogenannten Cajal- bzw. ihren Vorläuferzellen im Gastrointestinaltrakt entstehen [39]. Als eine Zwischenform zwischen einer Zelle des autonomen Nervensystems und einer glatten Muskelzelle ist die physiologische Aufgabe dieser Zellen die Steuerung der Motilität und der autonomen Nervenfunktion des GI-Traktes. Für die Entwicklung eines sporadischen GIST ist in circa 80% der Fälle eine aktivierende Punktmutation in c-kit, einem zentromernah lokalisiertem Gen auf Chromosom 4q12, verantwortlich [91]. c-kit codiert für ein Tyrosinkinase-Rezeptorprotein mit der Bezeichnung KIT, auch CD117 genannt. Dieses zeigt strukturelle Eigenschaften der Typ-III-Rezeptor-Tyrosinkinasefamilie [82]. Infolge der Mutation von c-kit, ist eine Überexpression von KIT mit ligandenunabhängiger Dimerisierung und daraus folgender konstitutioneller Aktivierung in Gastrointestinalen Stromatumoren zu konstatieren [12, 48]. Die daraus resultierende Aktivierung von PI3K, Induktion von JAK/STAT3 und Aktivierung des Ras/MAP-Kinase-Pathways führen konsekutiv zu gesteigerter Proliferation, verringerter Apoptose und schlussendlich zur Neoplasie [48, 91]. Im transgenen Mausmodell konnte dieser Zusammenhang demonstriert werden; Knock-in-Mäuse mit aktivierenden Mutationen in c-kit zeigten im Verlauf gesteigerte Zellproliferation und entwickelten schlussendlich einen

Gastrointestinalen Stromatumor [90, 104]. Häufigste Mutationen in c-kit sind hierbei in sinkender Häufigkeit in Exon 11 (juxtamembranäre Domäne [23, 50]), gefolgt von Exon 9, 13 und 17 zu finden [69].

Eine Minderheit von circa 5-8% aller GIST zeigt keine Mutation in c-kit sondern in PDGFRA [91], einem ebenfalls auf Chromosom 4q12 lokalisiertem Gen. Auch PDGFRA kodiert für ein Tyrosinkinase-Rezeptorprotein mit strukturellen Eigenschaften der Typ-III-Rezeptor-Tyrosinkinasefamilie, PDGFR- α . Es wird angenommen, dass beide Gene, also c-kit und PDGFRA, Duplikate eines gemeinsamen Ursprungsgens sind [22]. In PDGFRA sind drei Mutationsloki bekannt. In sinkender Häufigkeit sind dies Exon 18, 12 und 14 [13, 35, 52, 53, 60, 114, 115]

Die Folge der Mutationen ist auch bei PDGFR- α , wie bei c-kit, die ligandenunabhängige Dimerisierung [12, 48] mit Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase mit den beschriebenen proliferativen Konsequenzen.

Weiterhin sind Sonderformen der Pathogenese von GIST bekannt. Dabei findet sich in Mutationsanalysen in 12-15% aller Patienten in allen Exons der Wildtyp vorliegend [91]. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang GIST bei Patienten mit Neurofibromatose Typ I (Morbus Recklinghausen). Bei NF1-assoziierten GIST finden sich weder Mutationen in c-kit noch in PDGFRA [2, 47, 68], was eine differente Pathogenese nahelegt. So existieren Untersuchungen, die Mutationen in Neurofibromin 1 als ursächlich für die Entwicklung eines GIST bei Patienten mit Morbus Recklinghausen beschreiben [47, 57]. Von manchen Autoren wird jedoch auch von KIT-Mutationen in GIST bei NF1 berichtet [107, 122].

Eine *Überexpression* von KIT oder PDGFR- α ist allen GIST gemeinsam.

In vielen Organen sind Zellen zu finden, die in ihren Eigenschaften den Cajal-Zellen sehr ähnlich sind [43]. Diese werden als „interstitial Cajal-like cells“ (ICLC) bezeichnet. Diese ICLC finden sich unter anderem im Pankreas [84], im Uterus [11, 19], im Harntrakt [49, 103, 111], im Drüsengewebe der weiblichen Brust [28, 86], im Herz [37, 38, 85] und in Blutgefäßen [32, 33]. Ihre physiologische Funktion dort ist noch nicht geklärt.

Manche Autoren diskutieren dabei einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von ICLC und so genannten extragastrointestinalen Stromatumoren (eGIST) [7], da in vielen verschiedenen extragastrointestinalen Lokalisationen wie dem Omentum oder dem Mesenterium [62], der Harnblase [51], dem Retroperitoneum, im Pankreas [15, 81, 121] und anderen [78, 80, 120] GIST-identische spindelzellige Tumoren gefunden wurden. Solche eGIST sind weder zytomorphologisch noch in ihren genetischen Aberrationen von typischen GIST des Gastrointestinaltraktes zu unterscheiden.

1.5 Immunhistochemische Marker

1.5.1 CD117 und Platelet-derived growth factor receptor α

Das Genprodukt von c-kit , auch bekannt als KIT (CD117), ist das diagnostisch bedeutsamste Protein bei Gastrointestinalen Stromatumoren [97]. c-kit wird dabei von über 95% der GIST exprimiert [69].

Auch andere Gewebe und Tumorarten zeigen sich positiv für KIT. Beispielsweise exprimieren Mastzellen, Seminome und pulmonale kleinzellige Karzinome durchweg, andere, wie metastatische Melanome, Klarzell-, Ewing- und Angiosarkome sowie andere Karzinome fakultativ KIT [66]. Aktivierende Genmutationen sind jedoch nur in Gastrointestinalen Stromatumoren zu finden [6].

Ungefähr 3-5% aller GIST sind dagegen positiv für PDGFR- α [35]. Physiologischerweise spielt PDGFR- α bei Zellkommunikation, Signaltransduktion und der embryonalen Lungenentwicklung eine Rolle.

1.5.2 CD34

Bei CD34 handelt es sich um ein transmembranäres, sialyliertes Glykoprotein, welches in der Pathologie häufig als immunhistochemischer Marker für Stammzellen des Knochenmarks und Endothelzellen verwendet wird. Diagnostisch wichtig ist er bei Knochenmarkstransplantationen und akuten Leukämien. Auch über die physiologische Funktion von CD34 ist wenig bekannt,

jedoch scheint dem Protein eine Funktion in der Kontrolle der Hämatopoese zuzukommen [5].

In GIST wird häufig eine Überexpression von CD34 beobachtet. Dabei sind circa 95-100% aller GIST des Ösophagus und des Rektums, 80-85% aller gastralen GIST und 50% aller GIST des Dünndarms positiv für diesen Marker. Prognostische Bedeutung kommt ihm dabei nicht zu [67, 70].

1.5.3 Aktin, Desmin und andere Muskelzellmarker

Aktin ist die strukturgebende Komponente der dünnen Zellfilamente. Es handelt sich in der singulären Form um ein annähernd globuläres Protein mit einer Molekülmasse von 42 kDa, von dem mehrere Isoformen existieren. Die Wichtigste ist hierbei das α -smooth-muscle-actin (SMA), welches ein Marker für glatte Muskelzellen darstellt. Gastrointestinale Stromatumoren exprimieren SMA zu ungefähr 30%, dabei häufiger solche des Dünndarms als solche des Magens.

Prognostisch kommt der Expression von SMA Bedeutung zu. In großen Langzeitstudien zeigte sich statistisch signifikant eine bessere Prognose für Patienten mit GIST mit SMA-Nachweis im Magen und Dünndarm als für solche ohne [67, 70]. Vermutlich ist hierbei die Expression von SMA als Zeichen für geringere Entdifferenzierung zu werten.

Eine Expression von Desmin in GIST ist selten zu beobachten, wenn aber, dann besonders in solchen des Magens und des Ösophagus. Besonders in epitheloidzelligen Subtypen im Magen kann häufiger auch eine fokale Expression gefunden werden [67].

Das Intermediärfilament Vimentin wird von allen GIST regelhaft exprimiert [69].

Der Vollständigkeit halber seien noch embryonale Formen von smooth-muscle-myosin und schweres Caldesmon erwähnt, die als Marker für glatte Muskulatur ebenso häufig von GIST exprimiert werden [63, 95].

1.5.4 S100

S100 ist ein in der Pathologie verwendeter Marker für neuronales Gewebe. Immunhistochemische Färbungen gegen S100 markieren das Zytoplasma glialer Zellen, Schwann-Zellen, myoepithelialer Zellen, Melanozyten, Melanomzellen, Chondrozyten, dendritischer Retikulumzellen und anderer.

In GIST ist eine Expression relativ selten, jedoch häufiger in solchen des Dünndarms als in solchen des Magens [70].

Ob ein Einfluss von der Expression von S100 auf die Prognose besteht, ist nur anhand kleiner Fallzahlen untersucht. Einige Ergebnisse deuten jedoch auf einen negativ-prognostischen Wert der Expression von S100 in gastralen [67], nicht jedoch in GIST des Dünndarms [70], hin.

1.5.5 Epidermal growth factor receptor

Bei EGFR (epidermal growth factor receptor) handelt es sich um einen transmembranären Rezeptor (Molekulargewicht 170 kDa) welcher von dem Gen HER1 codiert wird. Das EGFR-Protein selbst besteht aus einer extrazellulären Bindungsdomäne, einer transmembranären Region und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität. Aktivierende Liganden für den Rezeptor sind der epidermal growth factor EGF und der transforming growth factor alpha TGF- α . EGFR ist hierdurch mitverantwortlich für die Kontrolle von Zellwachstum, Zelladhäsion und Apoptose [123]. Darüber hinaus existieren weitere, EGFR-homologe Rezeptoren (HER2, HER3 und HER4).

EGFR wird physiologischerweise von epithelialen Zelltypen, glatter Muskulatur, Fibroblasten, Nervengewebe sowie von vielen epithelialen Malignomen exprimiert [96, 116]. Betreffend GIST ist eine Überexpression von EGFR in über 95% der Fälle in unterschiedlicher Intensität vorbeschrieben, jedoch lässt sich auf genetischer Ebene kein pathophysiologisches Korrelat nachweisen [56]. Auch vermuten manche Autoren das Vorhandensein einer autokrinen Schleife aus TGF- α und EGFR, die für die Tumorgenese in zumindest einigen GIST mitverantwortlich sein soll [8], jedoch fehlen hier genauere Untersuchungen an größeren Fallzahlen.

1.5.6 P53

P53 ist das Genprodukt eines auf dem Chromosomenort 17p13 lokalisierten Tumorsuppressorgens p53. Es handelt sich um einen nukleären Transkriptionsfaktoren mit kurzer Halbwertszeit, der im Falle des Auftretens genetischer Schäden einer Zelle hochreguliert wird und eine Reihe von Zielgenen aktiviert. In Abhängigkeit vom Ausmaß des Schadens werden unter Arretierung des Zellzyklus (G_1 - oder G_2/M -Arrest) DNA-Reparaturmechanismen aktiviert oder die Apoptose der Zelle eingeleitet. Mutationen in P53, besonders solche der DNA-Bindungsdomäne, sind in Tumoren des Menschen häufig zu finden.

1.5.7 P16

P16 ist ein den Zellzyklus regulierendes Protein. Es gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die physiologischerweise selektiv Zyklin D/CDK4 und Zyklin D/CDK6 inhibieren und als so genannte INK-Proteine bezeichnet werden (INK4a). Durch diese Inhibierung wird im Falle gesteigerter proliferativer Prozesse die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins pRb unterbunden, eine Arretierung des Zellzyklus in der G_1 -Phase ist die Folge [75]. P16 fördert so die Negativregulation des Zellzyklus und kann somit im weitesten Sinne als Tumorsuppressorprotein aufgefasst werden. Ein Proteinverlust führt zu einer Aufhebung dieser Suppression und konsekutiv zu gesteigerter Proliferation. Der zugehörige Genlokus findet sich auf Chromosom 9p21.

Alterationen im Signalweg Zyklin D–CDK4/6/INK4/Rb/E2F sind in Neoplasien des Menschen in mehr als 80% der Fälle zu finden [77]. Weiterhin zeigte sich der Verlust von P16 in der Vergangenheit für viele andere Tumoren als Prädiktor für schlechtes Outcome [24, 27, 36, 58].

1.5.8 Andere Marker

GIST sind regelhaft positiv für Nestin, ein Intermediärfilamentprotein vom Typ VI. Dies ist jedoch nicht spezifisch für GIST sondern wird unter Anderem auch in Schwannomen exprimiert. Teilweise zeigen sich die Tumoren positiv für Keratin 18, seltener für Keratin 8, jedoch negativ für Keratin 7, 13, 14, 17, 19 und 20. GIST

sind immer negativ für saures Gliafaserprotein. Hier bietet sich ein differentialdiagnostisches Werkzeug zur Abgrenzung gegenüber Schwannomen des GI-Traktes, die dieses Protein typischerweise exprimieren [98].

Weiterhin existieren noch andere diagnostische Marker für GIST, deren Spezifität und Sensitivität in Studien jedoch noch nicht ausreichend belegt ist. Hier ist beispielsweise die Proteinkinase C θ zu nennen, die downstream im Signalweg von KIT zu finden ist. Sie soll sowohl einen weiteren molekularen Therapieansatz eröffnen [18] als auch diagnostische Bedeutung bei c-kit-negativen Tumoren haben [3]. Ähnliches gilt für DOG1, ein neu gefundenes Gen, welches für ein Protein unbekannter Funktion codiert. Es wird in GIST unabhängig von Mutationen exprimiert und fehlt in nicht-GIST-Tumoren [117]. Hier mangelt es jedoch an näheren Untersuchungen und verfügbaren Antikörpern.

1.6 GIST-Syndrome

Weniger als 5% aller GIST treten im Rahmen der drei bekannten GIST-Syndromen auf. Am häufigsten sind dabei GIST bei NF1, gefolgt von GIST im Rahmen des sogenannten Carney-Triads sowie innerhalb familiärer Formen.

1.6.1 Familiäre GIST-Syndrome

Weltweit sind mittlerweile 12 Familien mit familiärem GIST-Syndrom bekannt. Elf davon zeigen eine aktivierende Mutation in KIT, eine in PDGFRA. Es handelt sich dabei um autosomal-dominant vererbte Keimbahnmutationen, somit sind in diesen Fällen alle Zellen des Körpers betroffen.

1.6.2 Carney-Triad

Die Kombination aus GIST, einem Paragangliom und einem pulmonalen Chondrom wird nach dem Erstbeschreiber als Carney-Triad bezeichnet. Betroffen sind mit ca. 85% überwiegend Frauen jüngeren Alters. Der Gastrointestinale Stromatumor findet sich dabei ausschließlich gastral und zeigt epitheloidzellige Morphologie

1.6.3 GIST und Neurofibromatose Typ 1

Schon vor einigen Jahren wurde erkannt, dass Neurofibromatose Typ 1 von Recklinghausen überzufällig häufig mit GIST vergesellschaftet ist [2, 65, 107]. So wurde beispielsweise in einer Studie des Armed Forces Institute of Pathology (Washington DC, USA) von Miettinen et al. bei 6% aller untersuchten duodenalen GIST eine Koinzidenz mit NF1 festgestellt, was bereinigt einer 180fachen Steigerung der Inzidenz von NF1 in diesem Kollektiv von Patienten mit duodenalem GIST gegenüber der Normalbevölkerung entspricht [65].

GIST bei NF1-Patienten sind vor allem im Dünndarm lokalisiert, häufig multipel auftretend, in der Mehrzahl klein, mitotisch inaktiv und klinisch indolent.

1.6.4 Gastrointestinal autonomic nerve tumours

GANT (Gastrointestinal autonomic nerve tumours) repräsentieren eine Sonderform der Gastrointestinalen Stromatumoren. Sie entstehen aus Zellen des Meissner- oder Auerbach-Plexus und zeigen dabei, ebenso wie GIST, regelhaft eine Expression von CD117, CD34 und Vimentin. Auch wird von einer inkonstanten Positivität für NSE, S-100, Synaptophysin und Chromogranin A berichtet. Eine sichere Abgrenzung von GIST ist jedoch allein mittels Untersuchung der Ultrastruktur durch Elektronenmikroskopie möglich.

1.7 Therapie

Therapie der ersten Wahl ist die komplette chirurgische R₀-Resektion. Zusätzlich ist die (neo-)adjuvante Gabe von z.B. 400-800 mg Imatinib (Glivec®), einem Tyrosinkinase-Rezeptorinhibitor, möglich. Dieser fand zunächst Verwendung bei der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie [17, 46, 99]. Später erst wurde sein therapeutisches Potential für GIST deutlich [4, 44, 112]. Im Falle von Resistenzen stehen mittlerweile bereits mehrere Alternativpräparate zur Verfügung.

1.8 Fragestellung

Trotz einer Vielzahl an Untersuchungen zu prädiktorischen Faktoren bei GIST hat sich neben der Tumorgröße und Mitoserate bislang kein weiterer Parameter in der Routinediagnostik als Prädiktor etablieren können. Die meisten der vorliegenden Studien zu immunhistochemischen Faktoren wurden an Kollektiven von weniger als 30 Patienten durchgeführt. Der Zusammenhang der Expression eines Faktors mit der Malignität wird dabei meist nur in Bezug zu der etablierten Risikoklassifikation nach Fletcher [26] beschreibbar und nicht zum tatsächlichen Outcome, also dem konkreten klinischen Verlauf der jeweiligen Patienten.

Bis heute ist es trotz vielfältiger Bemühungen noch nicht möglich, das Malignitätspotential, insbesondere sogenannter Borderline-GIST mit hoher Vorhersagekraft zu bestimmen. So wird von Patienten berichtet, die bereits bei Diagnosestellung ein metastatisches Befall der Leber oder des Peritoneums aufweisen, obwohl der ursprüngliche Primärtumor mitosearm und nur wenige Zentimeter groß war. Ebenso finden sich Patienten mit kindskopfgroßen Gastrointestinalen Stromatumoren, die nach erfolgreicher Resektion Jahrzehnte krankheitsfreies Überleben zeigen.

Hier gilt es, Parameter zu finden, die zur weiteren prädiktorischen Differenzierung beitragen. Besonders die Differenzierung GIST der Hochrisikokategorie, welche sich im biologischen Verhalten sehr inhomogen zeigen, erscheint wichtig. Dies ist eine notwendige Voraussetzung, um eine Basis zu schaffen, die es ermöglicht, adjuvant zu behandelnde Tumoren mit sehr hohem Risiko für ein Rezidiv von solchen Tumoren zu unterscheiden, bei denen ein „watch and see“ Vorgehen ausreichend wäre.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, bestehende Ergebnisse der Literatur bezüglich des immunhistochemischen Profils und dessen Korrelation zum Outcome innerhalb des eigenen Patientenkollektivs mittels immunhistochemischer Untersuchungen zu reevaluieren. Besonderer Fokus soll dabei auf den Parametern P16, P53 und EGFR sowie der Klassifikation nach Fletcher liegen.

In der Routinediagnostik durchgeführte und in der Krankenakte dokumentierte, verfügbare Untersuchungen zur Expression von Aktin, CD34, MiB-1 werden, soweit verfügbar, mitanalysiert. Dazu werden die Überlebenszeitanalysen bezüglich tumorbedingtem Tod und dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen mit den aufgeführten Parametern statistisch analysiert und auf diesem Wege die prognostische Bedeutung der einzelnen Faktoren bestimmt.

2 Material und Methodik

2.1 Materialien

2.1.1 Gerätschaften

- Gefrierschnittmikrotom
 - o Leica RM 2255; Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland
- Kühlplatte
 - o Vogel PEC 3001, Firma nicht mehr existent
- Mikroskope
 - o Olympus BX41; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
 - o Zeiss Axiolab; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland
- Photodokumentation (Mikroskop / Kamera)
 - o Zeiss Axiophot / JVC Digital Camera KY-F750
- Pipetten
 - o Pipetman®, Gilson Inc., USA
 - o Eppendorf Research®, Eppendorf AG, Deutschland
- Trockenschrank
 - o Heraeus, Hanau, Deutschland
- Ultraschallwasserbad
 - o WB24, MEDAX Nagel GmbH Kiel, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

- Barrierestift, hydrophob
 - o Mini PAP Pen Plus, ZYTOMED Systems GmbH, Berlin, Deutschland
- Deckgläser
 - o Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
- Einmalwischtücher
 - o Kimtech Science, Kimberly-Clark Professional, USA

- Flächendesinfektion
 - o Iso-Septol (Isopropanol) Universitätsklinik Ulm – Apotheke
- Gefrierspray
 - o PSI Medizintechnik, Grünewald GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
- Handschuhe
 - o Nitra-Tex®, Ansell Ltd., USA
- Klingen für Gefrierschnittmikrotom
 - o Feather Microtome Blades A35, S35, R35, FEATHER Safety Razor Co. Ltd., Japan
- Objektträger für Immunhistochemie
 - o SuperFrost®-Plus, Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
- Paraffin-Entfernungslösung (Reinigung)
 - o Medite histotechnic GmbH, Burgdorf, Deutschland
- Pipettenspitzen
 - o Eppendorf 10µL, 200 µL, 1000 µL, Eppendorf AG, Deutschland

2.1.3 Allgemeine Chemikalien

- Haftmedium für Deckgläser
 - o Microscopy Aquatex®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Hämalaun-Lösung (nach Mayer)
 - o 0,1 % Hämatoxylin in 2 L a.d. lösen, 0,02 % Natriumiodat, 5% Kaliumaluminiumsulfat, 4% Chloralhydrat und 0,1% Zitronensäure
- PBS-Pufferlösung (pH 7,3-7,4)
 - o 6,48 mMol di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat, Riedel-de Haën, Deutschland
 - o 2,68 mMol Kaliumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
 - o 1,47 mMol Kaliumdihydrogenphosphat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
 - o 136,89 mMol Natriumchlorid, Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
 - o In 15L Aqua dest. gelöst

- TBS-Pufferlösung (pH 7,6), Dako North America, Inc., USA

2.1.4 Antikörper und Detektions-Kits

- Primärantikörper
 - o P16^{INK4}, ZYTOMED Systems GmbH, Berlin, Deutschland
 - o p53, Klon DO-7, Dako North America, Inc., USA
- Sekundärantikörper-Kit
 - o Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED Rabbit/Mouse, Dako North America, Inc., USA
- Spezielle Detektions-Kits
 - o EGFR pharmDx™, Dako North America, Inc., USA

2.1.5 Software

- Datenbank
 - o Microsoft® Office Access 2007, Microsoft Corporation, USA
- Statistische Auswertung und Grafiken
 - o Microsoft® Office Excel 2007, Microsoft Corporation, USA
 - o WinSTAT® für Microsoft Excel, Version 2007.1, R. Fitch Software, Bad Krotzingen, Deutschland
 - o SPSS 16.0.1, SPSS Inc., Chicago, USA

2.2 Methodik

2.2.1 Patientenkollektiv

Bis 1992 zurückgehend, wurden aus mehr als 25.000 Briefen und Berichten alle Patienten mit gesicherten oder fraglichen Gastrointestinalen Stromatumoren identifiziert und von Herrn Sebastian Wolf zur Verfügung gestellt. Gesucht wurden dabei sowohl in unserem klinikinternen EDV-System als auch in der Datenbank der universitätseigenen Pathologieabteilung nach Schlagwörtern wie „Leiomyom“, „Leiomyosarkom“, „Paragangliom“ und „Stromatumor“ in Verbindung mit Begriffen wie „mesenchymal“, „spindelzellig“ oder „submukös“.

Zur endgültigen Diagnosesicherung war bei 36 Patienten eine immunhistochemische Nachfärbung für das Protein CD117, bzw. in 11 Fällen bei Negativität für CD117 eine Färbung mit einem Antikörper gegen PDGFR- α notwendig. Diese Nachfärbungen wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie der Universität Ulm durchgeführt und uns zur Auswertung zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Datenerfassung und Klassifikation

Zu allen Patienten dieses Kollektivs wurden nun alle verfügbaren Daten in einer eigens dafür entwickelten Microsoft-Access-Datenbank teils retrospektiv, teils prospektiv dokumentiert.

Erfasst wurden dabei neben den Daten zur Person auch Angaben zum Hausarzt, zum Datum der Diagnosestellung, zur dabei aufgetretenen Initialsymptomatik, zur durchgeführten chirurgischen und chemotherapeutischen Therapie, zum Auftreten von Rezidiven, Metastasen und Zweitneoplasien, zur Resektionssituation sowie zu vielen weiteren Parametern.

Die Tumornachsorge erfolgte standardisiert entsprechend internationaler Empfehlungen, hauptsächlich durch die Spezialambulanz der Klinik für Allgemein-,

Viszeral- und Transplantationschirurgie, durch die Medizinisch Onkologische Tagesklinik der Universität Ulm oder durch weiterbehandelnde Ärzte.

Die Erfassung dieser klinischen Daten war nicht Gegenstand dieser Arbeit, diese wurden freundlicherweise von Herrn Sebastian Wolf zur Verfügung gestellt.

Die Datensätze wurden nun im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit durch Angaben zum Tumor betreffend Lokalisation, Größe, Mitoserate und - soweit im Voraus bestimmt - immunhistochemisches Profil unter Zuhilfenahme der internen Datenbank der Abteilung für Pathologie der Universität Ulm ergänzt.

Es erfolgte die Risikoklassifikation der Tumoren entsprechend der Konsensus-Kriterien nach Fletcher et al. [26] (Tabelle 1) in die Risikokategorien High, Intermediate, Low und Very Low. Hierzu war in mehr als 60 Fällen die Nachbestimmungen der Mitoserate auf 50 HPF nötig.

Tabelle 1: Klassifikation Gastrointestinaler Stromatumoren bezüglich des Risikos malignen Verhaltens (Risiko) nach dem maximalen Durchmesser (Größe in Zentimetern (cm)) und Mitoserate (MR) auf 50 high-power-fields nach Fletcher et al. [26]

Risiko	Größe (cm)	MR auf 50 HPF
Very Low	<2	<5
Low	2-5	<5
Intermediate	<5	6-10
	5-10	<5
High	>5	>5
	>10	jede Rate
	jede Größe	>10

Das Patientengut wurde anschließend dichotom in die Gruppen „High“ und „Non High“ differenziert. Die Klassifikation „High“ umfasste dabei alle als „High“, während die Klassifikation „Non High“ alle übrigen, d.h. alle als „Intermediate“, „Low“ und „Very Low“ eingestuft Tumoren, einschließt. Im Folgenden wird dies als „modifizierter Einteilung“ bezeichnet.

2.2.3 Gewinnung der Paraffinschnitte

Von den meisten Patienten konnten im Archiv der Abteilung für Pathologie der Universität Ulm repräsentative, in Paraffin eingebettete Tumoranteile gefunden werden. Nekrotische, kalzifizierte oder eingeblutete Abschnitte wurden dabei gemieden.

In einigen Fällen musste auf Biopsiepartikel zurückgegriffen oder Material von Rezidiven oder Metastasen für die immunhistochemischen Färbungen verwendet werden (n=5). Hierzu wurde angenommen, dass zwischen Primärtumor und Metastase bzw. Rezidiv keine weitere Entdifferenzierung stattgefunden hat und die primären Tumoren somit im immunhistochemischen Profil mit den gestreuten Metastasen bzw. Rezidiven übereinstimmen.

Selten war aufgrund der Überschreitungen der maximalen Lagerungsdauer von 10 Jahren oder bei fehlender Gewebeverfügbarkeit bei primär extern operierten Patienten keinerlei Material zu beschaffen. In Einzelfällen war vorhandenes Material, vor allem bei Zufallsbefunden, bereits durch die Routinebefundung aufgebraucht.

Nach Kühlung der Paraffinblöcke auf -9°C wurden am Mikrotom Schnitte mit einer Schichtdicke von 3 und 5 µm angefertigt. Nach Überführung in ein Ultraschallwasserbad konnten die Schnitte auf beschichtete Spezialobjektträger für Immunhistochemie aufgebracht werden. Diesem Vorgang schloss sich eine Trocknung im Trockenschrank bei Temperaturen unter 60°C für mindestens drei Stunden an.

Die so gewonnenen Paraffinschnitte wurden nun für die verschiedenen immunhistochemischen Färbungen unterschiedlichen Behandlungen unterzogen.

Die Durchführung der Untersuchungen stützt sich auf die Genehmigung der Ethikanträge (09 + 91/2006) durch die Ethikkommission der Universität Ulm. Die schriftliche Einwilligung der betroffenen Patienten wurde eingeholt.

2.2.4 Immunhistochemische Aufbereitung

2.2.4.1 Aufbereitung für P16 und P53

Bei allen immunhistochemischen Aufbereitungen wurde je ein Schnitt eines HPV-induzierten Cervix-Karzinoms als Positivkontrolle für P16 mitgeführt. Als Positivkontrolle für P53 dienten unveränderte Gewebestrukturen im Schnitt wie beispielsweise Darmepithelien. Verwendet wurden Schnitte mit einer Schichtdicke von 3µm.

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte in 3 x 5 Minuten aufsteigender Xylol-Reihe und anschließender, je fünfminütiger Behandlung in absteigender Ethanolreihe (100%/70%/40%). Nach kurzer Spülung in Leitungswasser wurden die Schnitte in Citratpuffer (pH 6) überführt und in diesem für insgesamt 20 Minuten in Abschnitten zu 3, 4, 4, 4 und 5 Minuten im Sinne einer hitzeinduzierten Epitopdemaskierung in der Mikrowelle gekocht. Dabei erfolgte nach jedem Abschnitt das Wiederauffüllen der Küvette mit demineralisiertem Wasser. Ein zehnminütiges Abkühlen in Eiswasser schloss sich an.

Nach Spülung in PBS-Puffer und Umfahrung der Gewebeproben mit einem hydrophoben Barrierestift erfolgte das Auftragen des Primärantikörpers und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Die Zielverdünnung des Primärantikörpers betrug dabei für den Antikörper gegen P16 1:400, für den Antikörper gegen P53 1:500 und wurde mit PBS als Verdünnungsmedium durchgeführt.

Nach einer weiteren Spülung in PBS-Puffer wurden je 100µL des Sekundärantikörpers (biotinylierte Ziege-Anti-Maus- und Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobuline) aufgetragen und für 15 Minuten in der feuchten Kammer auf den Schnitten belassen. Im Anschluss wurde, nach Spülung in PBS-Waschpuffer, das an alkalische Phosphatase konjugierte Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* auf die Schnitte aufgebracht und wiederum in der feuchten Kammer für weitere 15 Minuten inkubiert. Nach einer letzten Spülung in PBS-Puffer wurde die Substratreaktion (Neo-Fuchsin) durchgeführt.

Hierzu wurde die Substrat-Arbeitslösung mit 750µL Dako REAL™ AP-Substratpuffer und je 30µL von Chromogen Red 1, Chromogen Red 2 und

Chromogen Red 3 oder entsprechenden Volumenverhältnissen unter kontinuierlicher Durchmischung angesetzt. Diese Lösung wurde dann wiederum in Teilen zu 100µL auf die Gewebe aufgetragen und darauf für 16 Minuten in der feuchten Kammer belassen. Die Reaktion wurde schließlich mit Leitungswasser abgestoppt.

Zur besseren Übersicht wurden die Schnitte für drei Minuten mit Hämalau- Lösung gegengefärbt. Nach einer letzten Spülung mit Leitungswasser wurden die Schnitte unter Zuhilfenahme von Aquatex® mit Deckgläsern versehen.

2.2.4.2 Aufbereitung für EGFR

Für die immunhistochemische Färbung gegen EGFR fanden Schnitte mit einer Schichtdicke von 5µm Verwendung.

Nach Entparaffinierung in aufsteigender Xylol- und absteigender Ethanolreihe wie bereits in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben, erfolgte zunächst das Auftragen von 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung aus dem Detektionskit für EGFR in Teilen zu je 100 µL zur Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität. Diese wurde für exakt fünf Minuten auf den Schnitten belassen. Diesem Vorgang schloss sich die Spülung mit TBS-Puffer und Umfahrung der Gewebspartikel mit dem Fettstift an. Nun wurden wieder je 100 µL einer 0,1% Proteinase K-Lösung ebenfalls aus dem beschriebenen Kit auf das Gewebe aufgetragen und dort bis zur erneuten Spülung in TBS-Puffer für exakt fünf Minuten belassen. Die Schnitte wurden nun mit dem anschließend in Teilen zu 100 µL aufgetragenen Primärantikörper (IgG₁-Maus) 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Dieser Primärantikörper reagiert dabei spezifisch mit HER1. Kreuzreaktionen mit HER2, -3, oder -4 wurden in der Vergangenheit nicht beobachtet.

Der anschließenden Spülung in TBS-Waschpuffer folgte das Auftragen des Sekundärantikörpers (mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertes Ziege-Anti-Maus-Immunglobulin) aus dem Kit. Auch hierbei betrug die Inkubationszeit wiederum 30 Minuten. Die Substratreaktion wurde nach erneuter Spülung in TBS-Puffer mit DAB+ Chromogen (5% 3,3'-Diaminobenzidin) durchgeführt. Die Reaktionszeit hierfür betrug 10 Minuten, danach wurde die Reaktion mit Leitungswasser abgestoppt.

Auch bei dieser Färbung wurden die Schnitte zur besseren Übersicht für drei Minuten mit Hämalaun-Lösung gegengefärbt und mit Aquatex® mit Deckgläsern versehen.

2.2.5 Auswertungsmethodik und Statistik

2.2.5.1 Immunhistochemische Auswertungsmethodik

In Anlehnung an Untersuchungen von Schneider-Stock et al. wurde zunächst eine Positivität für P16 ab >20% geschätzter positiver Zellkerne in 10 HPFs mit oder ohne zytoplasmatische Reaktion definiert. [102]. Zusätzlich wurde in Abhängigkeit von dem Anteil positiv gefärbter Tumorzellen der Grad der Positivität in vier Stärkegrade nach Tabelle 2 differenziert.

Tabelle 2: Semiquantitative Gradeinteilung nach prozentualem Anteil positiver Tumorzellen in geschätzten 10 High-Power-Fields nach Schneider-Stock et al. [102] für immunhistochemische Färbungen gegen P16

Grad	Anteil der Zellen (%)
0 (no staining)	0 - 10
1 (weak)	11 - 20
2 (moderate)	21 - 50
3 (strong)	>50

Analysen bezüglich krankheitsfreiem und –spezifischem Überleben erfolgten zusätzlich mit anderen Cut-Off-Werten. Positivität wurde dabei ab >10% bzw. >50% geschätzter positiver Zellkerne in 10 HPFs mit oder ohne zytoplasmatische Reaktion definiert.

Für den Parameter P53 wurden zunächst solche Tumoren, die keinerlei positive Reaktion für den Parameter P53 zeigten („Negativ“), von jenen unterschieden, bei denen eine immunhistochemische Reaktion nachweisbar war („Positiv“).

Außerdem erfolgte eine Einteilung auf Grundlage der Definition von Sabah et al. [94]. Der Anteil positiver Tumorzellen wurde geschätzt und nunmehr jegliche Reaktion von mehr $\geq 10\%$ der Tumorzellen im stärksten reaktiven Areal als positiv gewertet. Entsprechend wurden Tumoren, die in weniger als 10% der Tumorzellen im stärksten reaktiven Areal eine Anfärbung zeigten als „Negativ“ klassifiziert.

Die Auswertung für die Färbung gegen EGFR erfolgte durch Einteilung nach Stärke der Reaktion in komplett negative, einfach, zweifach und dreifach positive Tumoren nach Goldstein et al. [29]. Zusätzlich wurde auch hier der Anteil der positiven Tumorzellen bestimmt.

Es erfolgte nun die Einteilung in die Gruppen „Positiv“ und „Negativ“ unter Annahme verschiedener Cut-Off-Werte.

Alle Färbungen wurden zusätzlich auch von einer Fachärztin für Pathologie (C.H.) verblindet befundet.

2.2.5.2 Bildung von Subkollektiven

Für die immunhistochemische Färbung gegen EGFR wurde ein Subkollektiv von 18 Patienten nach folgenden Kriterien ausgewählt und in zwei Gruppen eingeteilt: Für Gruppe 1 wurden hochaggressive Tumoren gewählt, die entweder bereits initial metastasiert waren ($n=2$) bzw. solche, die zwar primär unifokal waren, jedoch im Laufe der Nachbeobachtungszeit Metastasen oder große Rezidive entwickelten ($n=8$). Gruppe 2 wurden solche GIST-Patienten zugeteilt, die mindestens eine Nachbeobachtungszeit von fünf Jahren aufwiesen (arithmetisches Mittel: 8,0 Jahre, Median 8,4 Jahre) und im Rahmen der Nachbeobachtung keinerlei Anzeichen für Rezidive oder Metastasen zeigten ($n=8$).

Zum Zwecke der statistischen Auswertung für den Parameter MiB-1 wurden nur solche Färbungen berücksichtigt, die am Primärtumor durchgeführt wurden. Diese Fälle wurden nun in zwei Gruppen unterteilt. Als Gruppe 1 wurden diejenigen Tumoren mit einer Proliferationsrate $< 10\%$, als Gruppe 2 diejenigen mit einer Proliferationsrate $\geq 10\%$ definiert.

Da nun bereits im Rahmen der Klassifikation (s. Kapitel 2.2.2) Aussagen zur Mitoserate erhoben wurden, wurde diese noch einmal getrennt erfasst und zum Zwecke der Bestimmung der prognostischen Bedeutung in zwei Gruppen unterteilt. Gruppe 1 (Mitoserate „Low“) umfasste dabei alle Fälle mit einer Mitoserate von ≤ 5 , Gruppe 2 (Mitoserate „High“) solche Fälle mit Mitoseraten > 5 bezogen auf 50 High-Power-Fields. Diese wurde in Kreuztabellen und Survivaluntersuchungen näher betrachtet.

Ebenso wurden die noch messbaren Tumoren nach Größe in zwei Gruppen unterteilt, genauer in solche mit einer Größe von $< 5\text{cm}$ und solche mit einer Größe von $\geq 5\text{cm}$. Auch diese Gruppen wurden näheren Untersuchungen zugeführt.

2.2.5.3 Signifikanztests, Survivalanalysen und allgemeine Statistik

Die gewählte Studienform war eine kombiniert retro- und prospektive Kohortenstudie.

Unabhängigkeitstests wurden via Kreuztabelle mit dem χ^2 -Test durchgeführt. Waren die Voraussetzungen für diesen Test nicht erfüllt, wurde auf den exakten Test nach Fisher zurückgegriffen. Angenommen wurde dabei eine zweiseitige Fragestellung, da einseitiges Testen lediglich theoretischer Natur ist und keine praktische Relevanz aufweist. Statistische Signifikanz wurde dabei ab einem Wert von $p < 0,05$ angenommen (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Zur Bestimmung des Risikos wurde die Odds Ratio bestimmt. Der Odds Ratio wurde gegenüber dem relativen Risiko der Vorrang gegeben, da das relative Risiko bei retrospektiven Studien nicht sinnvoll berechnet werden kann.

Die Angabe des Konfidenzintervalls für die Odds Ratio (OR) bezieht sich dabei auf ein Konfidenzintervall (KI) von 95% in folgender Schreibweise:

$$\text{OR} = x \text{ [KI untere Grenze; KI obere Grenze]}$$

Überlebenszeitanalysen wurden mit der Methode nach Kaplan und Meier durchgeführt. Existierten mehreren Subgruppen, wurde zusätzlich der Log-Rank-Test zur Bestimmung eines statistisch signifikanten Unterschiedes durchgeführt. Für Stichprobengrößen wie in der hier vorliegenden Arbeit ist die Kaplan-Meier-Analyse dabei das Mittel der Wahl.

Als Überlebenszeit wurde dabei die Zeitspanne zwischen Datum der Erstdiagnose und dem Exitus letalis bzw. bis zum letzten bekannten Follow-Up definiert. Unterschieden wurde hierbei zwischen dem Overall-Survival und dem krankheitsspezifischen Survival:

Das Overall-Survival beschreibt dabei das Überleben aller Patienten des Kollektivs und Todesereignis jedweder Ursache.

Im krankheitsspezifischen Survival wurden dagegen alle Patienten, deren Tod nicht in direkten Zusammenhang mit dem GIST gebracht werden konnte, zwar nicht aus der Analyse genommen, Ihr Versterben jedoch als Beobachtungsende und nicht als statistisches Ereignis im Sinne von Todeseintritt definiert.

Auch zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit von krankheitsfreiem Überleben (disease-free-survival) fand die Methode nach Kaplan-Meier Anwendung. Als krankheitsfreie Überlebenszeit wurde dabei diejenige Zeitspanne zwischen der Erstdiagnose und dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen bzw. bis zum letzten bekannte Follow-Up oder Tod definiert.

Zwar lagen bezüglich der durchgeführten Überlebenszeitanalysen bei insgesamt vier Patienten Nachbeobachtungszeiten von weniger als drei Monaten vor, da diese Patienten jedoch teils tumorbedingt teils nicht tumorbedingt verstarben, wurden sie nicht aus der Analyse genommen. Lediglich diejenige Patientin, bei der die Diagnose erst während der Obduktion gestellt wurde und ihre Nachbeobachtungszeit per definitionem 0 Jahre beträgt, wurde aus allen Analysen bezüglich Outcome und Überleben ausgeschlossen.

Für die in Kapitel 2.2.2 beschriebene dichotome Modifikation der Risikoeinteilung nach Fletcher et al. [26] wurde zur Bestimmung der Vorhersagekraft die Sensitivität für ein Zeitintervall von fünf Jahren berechnet. Berücksichtigt wurden dabei nur solche Patienten, die entweder in beschriebenem Zeitraum tumorbedingt verstarben bzw. Rezidive oder Metastasen entwickelten (Ereignisse)

oder respektive länger nachbeobachtet wurden. Ereignisse, die nach mehr als fünf Jahren auftraten wurden nicht mehr berücksichtigt.

Alle Kalkulationen erfolgten durch die Statistiksoftwares WinSTAT® und SPSS®.

2.2.6 Bemerkungen

Bei Prozentangaben erfolgte konsequent die Rundung auf eine Stelle nach dem Komma. Weiterhin wurde bei Zeitangaben in Monaten auf eine, bei Zeitangaben in Jahren auf zwei und bei Angabe von p-Werten auf drei Nachkommastellen gerundet.

Aufgrund des Rundungsfehlers ergibt die Summe prozentualer Anteile nicht immer exakt 100%.

Wird im Folgenden von Aktin gesprochen, ist immer SMA gemeint.

3 Ergebnisse

3.1 Datenbank

Im Laufe der Zeit gelang es, eine mittlerweile mehr als 400 Datensätze umfassende Datenbank vorrangig mit GIST-Patienten im Rahmen der multizentrischen Kooperation zu erstellen.

Die Datenbank selbst besteht aus einer zentralen Tabelle, die alle verfügbaren Informationen verbindet, mehreren Abfragemodulen und Eingabemasken die durch ihr Design einerseits eine schnelle Eingabe und Abfrage von Daten ermöglichen, andererseits selbstständig Berechnungen, wie z.B. das Erkrankungsalter, das Sterbealter, verschiedene Nachbeobachtungszeiten oder Intervalle zwischen dem Auftreten von Rezidiven bzw. Metastasen, durchführen. Getrennt voneinander können die pathologischen und immunhistochemischen Profile von bis zu drei Rezidiven oder Metastasen in der Datenbank erfasst und direkt miteinander verglichen werden. Somit ist die Übersicht über den Krankheitsverlauf jedes einzelnen Patienten gegeben.

Nach Export der Daten in eine Microsoft Excel-Tabelle ist unter Verwendung des Plug-Ins WinSTAT® eine statistische Auswertung inklusive Survivalanalysen durchführbar. Ebenso ist die Datenbank in der Lage, eingegebene Variable automatisch numerisch zu kodieren und auszugeben, sodass die Auswertung mit Statistikprogrammen wie SPSS®, die solch eine Kodierung fordern, möglich wird. Ergänzend sind Module zum Druck von Deckblättern mit jeweils aktuellen Patientendaten oder Übersichten über Blocknummern implementiert. Eine beliebige Erweiterbarkeit für zukünftige Projekte ist gegeben.

So wurde ein System etabliert, das jedem Patienten eine eindeutige Identifikationsnummer zuweist. Diese bildet sich aus Daten des Patienten wie Geschlecht, Initialen und Geburtsdatum. Eine Doppelteingabe ist dadurch nahezu ausgeschlossen. Nach Umwandlung dieser Nummer in einen zweidimensionalen Barcode vom Typ „Quick Response Code“ können Dokumente oder Proben mit

diesem gekennzeichnet werden. Eine Verwechslung wird dann praktisch unmöglich. Auf Deckblättern werden diese Barcodes bereits automatisch mit ausgedruckt. Auch im Zuge einer anonymisierten Auswertung von Patientendaten nach den Maßgaben des Datenschutzes findet dieses System Verwendung.



Abbildung 1: Quick Response Code, verschlüsselt ist hier „Gastrointestinaler Stromatumor“

Ein Auslesen der Barcodes ist dabei sowohl via Webcam oder Mobiltelefon mit integrierter Kamera möglich.

Weiterhin wurde ein System geschaffen, das aus der Datenbank heraus den schnellen Zugriff auf Dokumente des aktuellen Patienten erlaubt. Dieses System befindet sich momentan jedoch noch in der Testphase.

3.2 Patientenkollektiv und Epidemiologie

Insgesamt konnten für diese Studie 101 Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren identifiziert werden. Von 97 Patienten lag dabei ein Follow-Up von mehr als 3 Monaten vor.

Die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit dieser Patienten betrug in dieser Studie 53,6 Monate entsprechend 4,47 Jahren, die mediane 3,85 Jahre entsprechend 46,2 Monaten. Die Range erstreckte sich dabei von 0,25 Jahren bis 19,06 Jahren. Von 4 Patienten lag bis zum Abschluss der Datenaufnahme kein Follow-Up von mehr als 3 Monaten vor. Dies lag darin begründet, dass diese vier Patienten bereits kurz nach Diagnosestellung teils tumorbedingt, teils nicht

tumorbedingt verstarben bzw. die Diagnose erst in der durchgeführten Obduktion gestellt wurde.

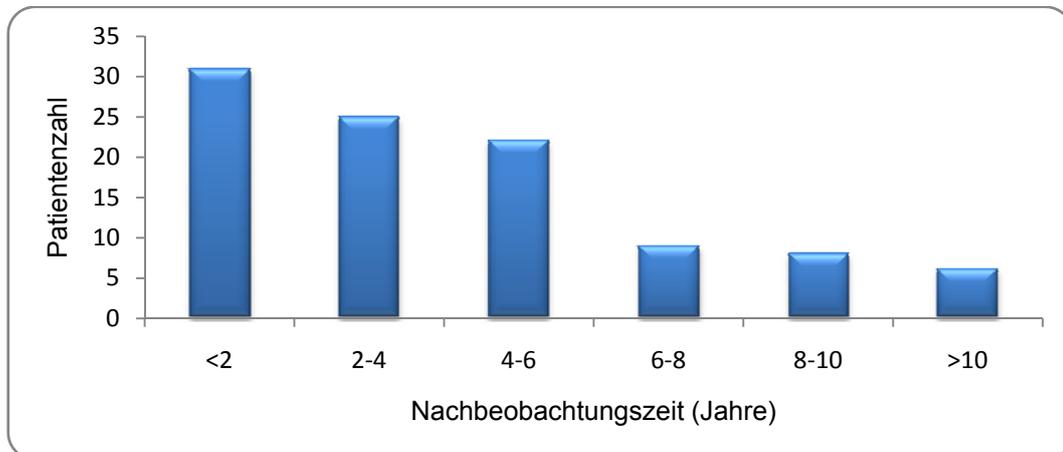


Abbildung 2: Histogramm der Nachbeobachtungszeiten der Patienten, dargestellt in Abschnitten zu zwei Jahren mit absoluten Werten der Patientenzahl.

In der Gruppe der Überlebenden ergab sich für die mittlere Nachbeobachtungszeit ein Wert von 5,06 Jahren entsprechend 60,7 Monaten, für die mediane Nachbeobachtungszeit ein Wert von 49,6 Monaten entsprechend 4,13 Jahren. Hierbei lag die Range zwischen 0,62 und 19,06 Jahren.

In der Geschlechterverteilung zeigte sich im Kollektiv eine leichte Präferenz für das weibliche Geschlecht. Diese war mit 53,5% (n=54) gegenüber 46,5% (n=47) beim männlichen Geschlecht zu konstatieren.

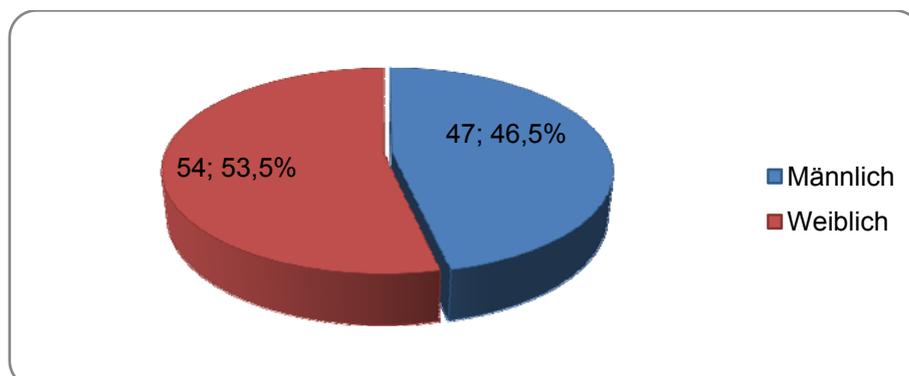


Abbildung 3: Geschlechterverteilung im Patientenkollektiv, die Anteile mit absoluten und prozentualen Werten beschriftet

In der Analyse des Erkrankungsalters ergab sich eine rechtsschiefe Verteilung. Das durchschnittliche Erkrankungsalter der Patienten unseres Kollektivs betrug dabei 64,11 Jahre, der Median 66,28 Jahre, die zugehörige Standardabweichung der Stichprobe $s_{st}=13,38$ Jahre. Die jüngste Patientin war dabei bei Diagnosestellung 17,46 Jahre alt, die Älteste 94,09 Jahre.

Insgesamt waren 13,9% (n=14) der Patienten bei Diagnosestellung jünger als 50 Jahre, 4 % (n=4) jünger als 40 Jahre. Diese Verteilung ist, aufgeschlüsselt nach Lebensdekade in Abbildung 4, und als Box & Whiskers-Plot in Abbildung 5, graphisch dargestellt.

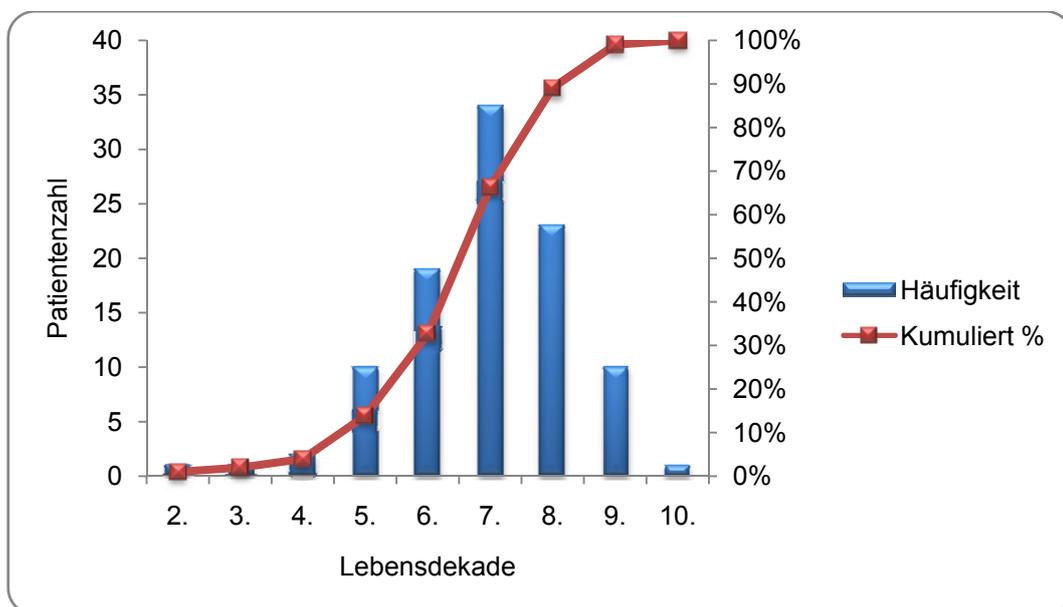


Abbildung 4: Abbildung des Erkrankungsalters der Patienten im Histogramm, aufgeschlüsselt nach Lebensdekade mit absoluten Werten, die prozentual kumulierten Werte als geglättete Kurve darüberegelegt

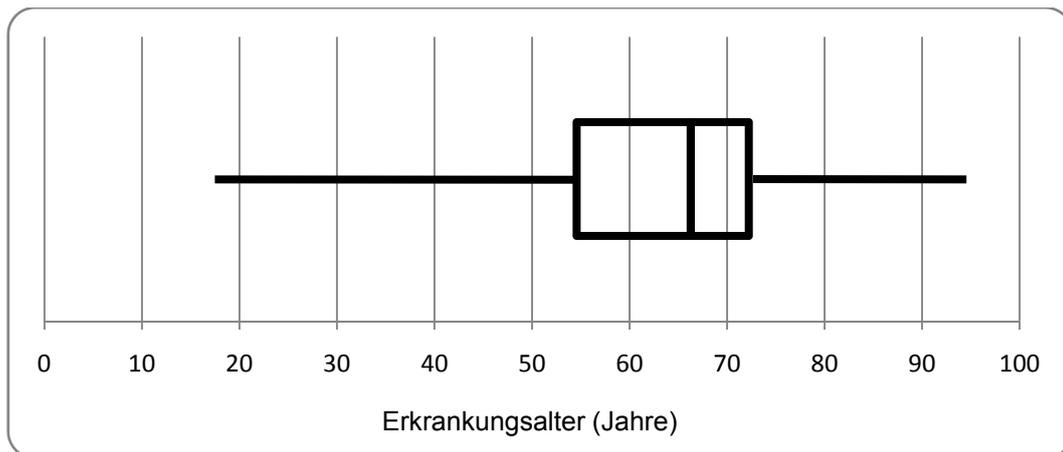


Abbildung 5: Graphische Abbildung des Erkrankungsalters der Patienten in Jahren als Box & Whiskers-Plot

3.3 Klinisches Erscheinungsbild

3.3.1 Lokalisierung und weitere Parameter des Primärtumors

Bezüglich der Lokalisation von 99 Gastrointestinalen Stromatumoren befanden sich 60,6% (n=60) der Tumoren im Magen und 33,3% (n=33) im Dünndarm, davon 54,5% (n=18) im Ileum, 30,3% (n=10) im Jejunum und 15,2% (n=5) im Duodenum. Bezüglich der Gesamtzahl waren somit 5,1% dem Duodenum, 10,1% dem Jejunum und 18,2% dem Ileum zuzuordnen.

Im Weiteren konnten 2% (n=2) der GIST dem Ösophagus sowie 1% (n=1) dem Colon sigmoideum zugeordnet werden. Bemerkenswerter Weise fand sich in drei Fällen (3%) der Tumor retroduodenal, in der Bursa omentalis oder vom Ligamentum falciforme hepatis ausgehend, ohne dabei Kontakt zum GI-Trakt zu zeigen, sodass es sich hierbei am ehesten um sogenannte eGIST handelt.

Bei zwei Patienten konnte der Ursprung des Primarius nicht sicher definiert werden. Bei diesen war bereits eine multiple, diffuse Metastasierung zu konstatieren.

Werden die zwei Fälle, bei denen keine Zuordnung mehr möglich war, außer Acht gelassen, zeigt sich die in Tabelle 3 dargestellte Verteilung.

Tabelle 3: Verteilung der Lokalisation der Tumoren in dieser Studie (eGIST = extragastrintestinale Stromatumoren)

Lokalisation	Anzahl	Anteil (%)
Magen	60	60,6%
Dünndarm	33	33,3%
Ösophagus	2	2,0%
Colon	1	1,0%
eGIST	3	3,0%

Die unten stehende grafische Darstellung (Abbildung 6) ergibt sich daraus:

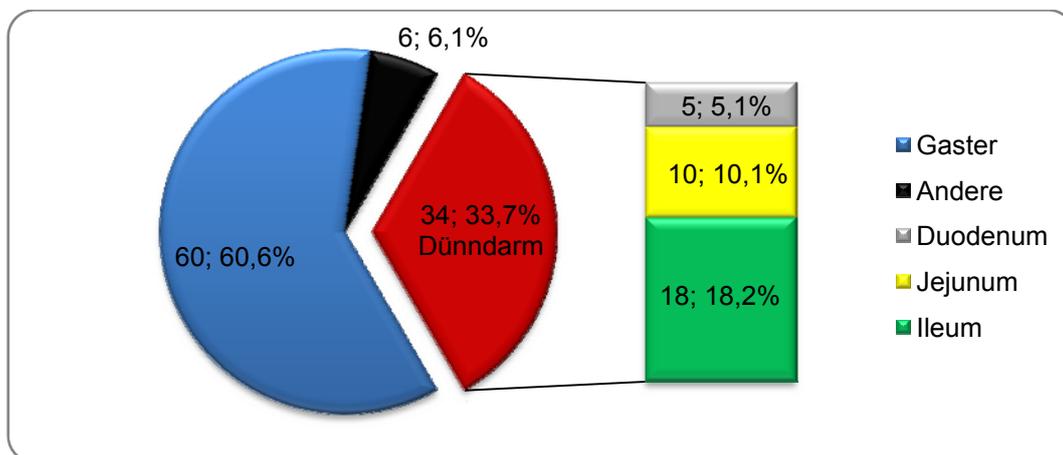


Abbildung 6: Lokalisation Gastrointestinaler Stromatumoren in dieser Studie mit absoluten Werten und prozentualen Anteilen. Die rot gefärbte Fläche stellt dabei die Gesamtheit aller Tumoren im Dünndarm dar und ist in rechts stehender Teilgrafik weiter aufgeschlüsselt.

Im arithmetischen Mittel betrug der maximale Durchmesser der noch messbaren Tumoren bei Diagnosestellung $d=7\text{cm}$, der zugehörige Median 5cm , die Standardabweichung der Stichprobe $s_{St}=5,9\text{cm}$. Patienten mit diffuser Metastasierung wurden dabei nicht in die Berechnung miteinbezogen.

46,8% ($n=44$) waren einer Größe von $<5\text{cm}$ zuzuordnen, 53,2% ($n=50$) zeigten eine Größe von $\geq 5\text{cm}$. Hierbei konnte sowohl in der Kreuztabelle als auch in den Survivaluntersuchungen, wie in Tabelle 4 dargestellt, signifikant der negativ-prädiktorische Wert der Tumorgöße gezeigt werden.

Tabelle 4: Ergebnisse der Survivaluntersuchungen und Kreuztabellen der Gruppen Tumorgroße ≥ 5 cm gegenüber Tumorgroße < 5 cm bezüglich tumorbedingtem Tod (links) bzw. dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen als Ereignis (rechts) mit Angabe der Ergebnisse des Fisher's Exakt-Tests, der Odds Ratio (mit Angabe des 95%-Konfidenzintervalls (KI)), der krankheitsspezifischen (DSSP, links) und krankheitsfreien (DFSP, rechts) Überlebenswahrscheinlichkeiten für 1, 3 und 5 Jahre (a) sowie der Ergebnisse der vergleichenden Log-Rank-Tests.

Ereignis	Tumorbedingter Tod		Rezidive/Metastasen	
	≥ 5 cm	< 5 cm	≥ 5 cm	< 5 cm
Fisher's Exakt	p=0,005		p<0,001	
Odds Ratio [KI]	12,1 [1,5; 98,3]		14,0 [3,0; 64,5]	
1-a-DSSP/DFSP	93,8%	100,0%	69,5%	97,7%
3-a-DSSP/DFSP	86,8%	96,8%	64,7%	97,7%
5-a-DSSP/DFSP	77,9%	96,8%	59,3%	97,7%
Log-Rank-Test	p=0,008		p<0,001	

3.3.2 Sekundärneoplasien

Bemerkenswert erschien die große Anzahl an Zweit- oder sogar Drittneoplasien. Bei n=8 (7,9%) Patienten musste zusätzlich zum GIST eine gutartige Neubildung, bei n=26 Patienten (25,7%) ein bösartiger Tumor konstatiert werden. Zwei bösartige Tumoren fanden sich bei n=3 (3%) Patienten, n=6 (5,9%) Patienten wiesen sowohl eine benigne als auch eine maligne Neoplasie auf. Eine Patientin (1%) schließlich zeigte einen gutartigen und zwei bösartige Tumoren.

Der Anteil der GIST-Patienten mit zusätzlichen Malignomen betrug 35,6% (n=36), der Prozentsatz derer mit einer Zweitneoplasie jedweder Dignität 43,6% (n=44).

3.3.3 Rezidive und Metastasen

Insgesamt wurden bei n=28 (28%) Patienten bereits initial oder im Verlauf der Nachbeobachtungszeit Rezidive oder Metastasen festgestellt. Die Hälfte dieser Patienten (n=14) (14%) wiesen bereits initial Metastasen auf. Bei n=4 Patienten war dabei der Tumor bereits bei Diagnosestellung peritoneal und hepatisch, bei n=9 Patienten rein peritoneal und bei n=1 Patient rein hepatisch metastasiert. Nach durchschnittlich 2,94a (Median=1,93a, $s_{St}=2,73a$) entwickelten die Patienten

aus jener Gruppe, die bei Diagnosestellung lediglich unifokalen Befall zeigten, Rezidive oder Metastasen (n=14).

Die Wahrscheinlichkeit von krankheitsfreiem Überleben bezüglich aller Patienten dieser Studie (n=100) wurde wie folgt berechnet: Die 1-Jahres-DFSP betrug 80,8%, die 3-Jahres-DFSP 77,1% und die 5-Jahres-DFSP 72,2%. Diese Ergebnisse sind auch Abbildung 7 zu entnehmen.

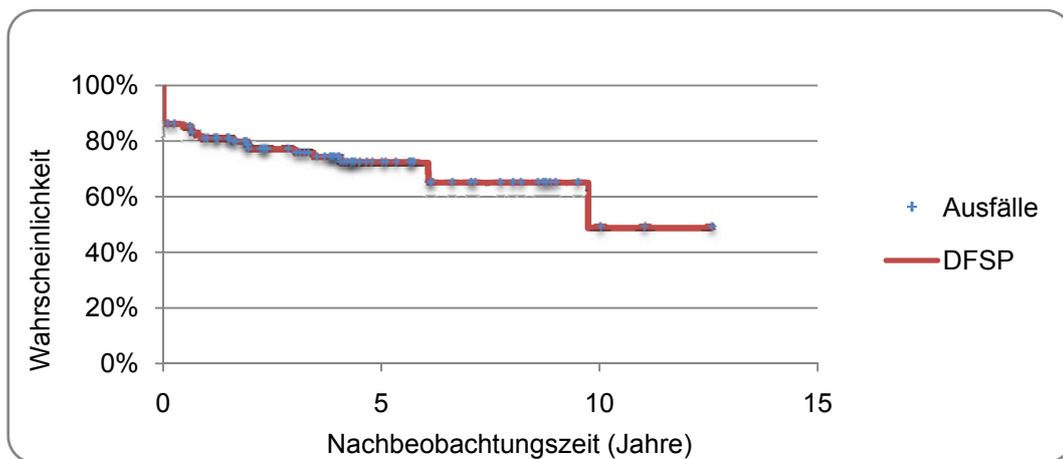


Abbildung 7: Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens (DFSP) aller Patienten als Kaplan-Meier-Kurve, zensierte Fälle sind dabei als Kreuze dargestellt

Nimmt man zusätzlich Patienten, die bereits initial metastasiert waren (n=14), aus der Wertung, ergeben sich für n=86 Patienten folgende Werte: Die 1-Jahres-DFSP betrug dann 94%, die 3-Jahres-DFSP 89,6% und die 5-Jahres-DFSP 83,9%. Diese Ergebnisse sind als Zusammenschau in Abbildung 8 dargestellt.

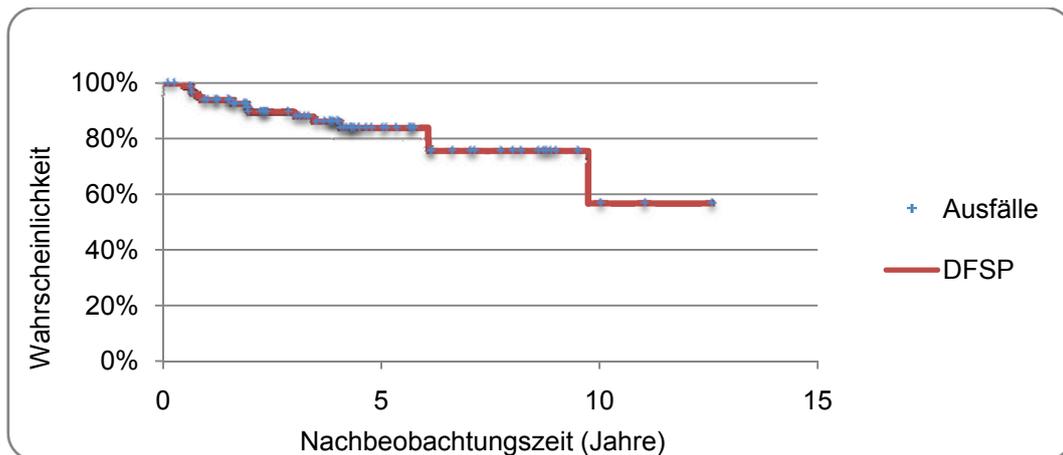


Abbildung 8: Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens (DFSP) initial nicht metastasierter Patienten als Kaplan-Meier-Kurve, zensierte Fälle sind dabei als Kreuze dargestellt

3.3.4 Allgemeine Überlebenszeitanalyse

Nach Abschluss der Datenaufnahme waren n=30 Patienten verstorben, davon n=14 Patienten GIST-bedingt und n=16 Patienten aufgrund anderer Ursachen. Alle tumorbedingt verstorbenen Patienten hatten dabei zuvor Rezidive oder Metastasen entwickelt.

Für das Overall-Survival betrug die 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 91,9%, die 3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 80,8% und die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 69,5%.

Berücksichtigt man nur GIST-bedingte Todesfälle, so betrug, wie in Abbildung 9 dargestellt, die krankheitsspezifische 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit für n=100 Patienten 95,9%, die 3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 89,7% und die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 84,9%.

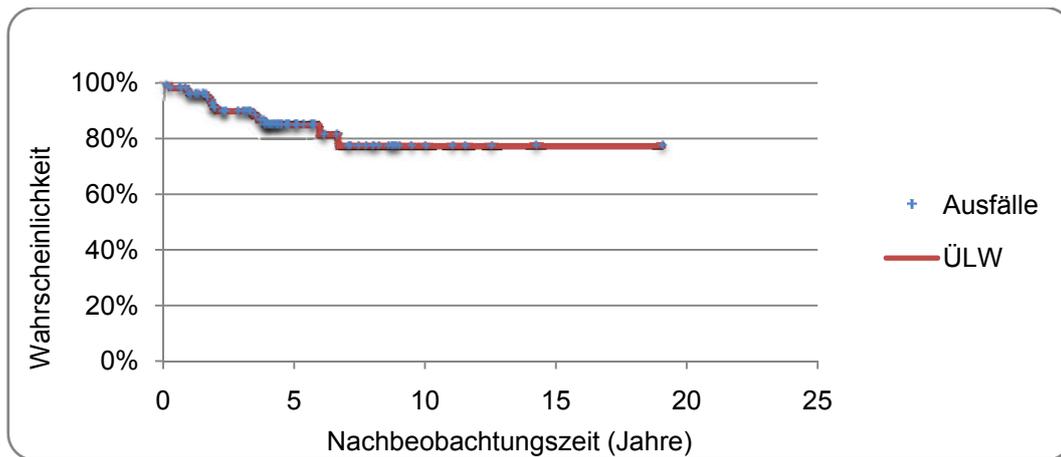


Abbildung 9: Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen Überlebens (ÜLW) als Kaplan-Meier-Kurve, zensierte Fälle sind dabei als Kreuze dargestellt

3.4 Pathologie

3.4.1 Zellmorphologie

Der Großteil der in dieser Studie untersuchten Tumoren wies einen spindelzelligen Typus auf (n=84, 84,6%). Deutlich seltener waren gemischtzellige Typen zu finden (n=12, 12,4%), ein rein epitheloidzelliges Wachstumsmuster konnte nur in einem Fall ausgemacht werden (1,0%). In vier Fällen konnte aufgrund nicht mehr zugänglichen Gewebematerials bzw. fehlenden näheren Informationen zum Primärtumor keine Zuordnung getroffen werden.

Im durchgeführten exakten Test nach Fisher bzw. im χ^2 -Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppen der Patienten mit spindelzelligen Tumoren und der Gruppe mit Tumoren mit epitheloidzellartiger Komponente bezüglich tumorbedingten Tod oder dem allgemeinen Auftreten von Rezidiven oder Metastasen hergestellt werden (p=0,596 bzw. p=0,071) Ebenso zeigten die durchgeführten Survivalanalysen bezüglich krankheitsspezifischem oder krankheitsfreiem Überleben keine signifikanten Unterschiede (p=0,915 bzw. p=0,102, Log-Rank-Test)

3.4.2 Risikostratifikation

3.4.2.1 Klassifikation nach Fletcher et al.

Bei der Bestimmung des Malignitätspotentials nach Fletcher et al. [26] fand sich folgende Verteilung:

Bei 38,9% (n=37) wurde das Risiko für eine malignes Verhalten des Primärtumors als „High“, bei 21,1% (n=20) als „Intermediate“, bei 23,2% (n=22) als „Low“ und bei 16,8% (n=16) als „Very Low“ bezogen auf n=95 Patienten definiert. Aufgrund nicht erhebbarer Befunde zur Mitoserate war in zwei, beziehungsweise aufgrund unbekannter Größe in vier Fällen keine Bestimmung des Risikos nach Fletcher et al. [26] möglich.

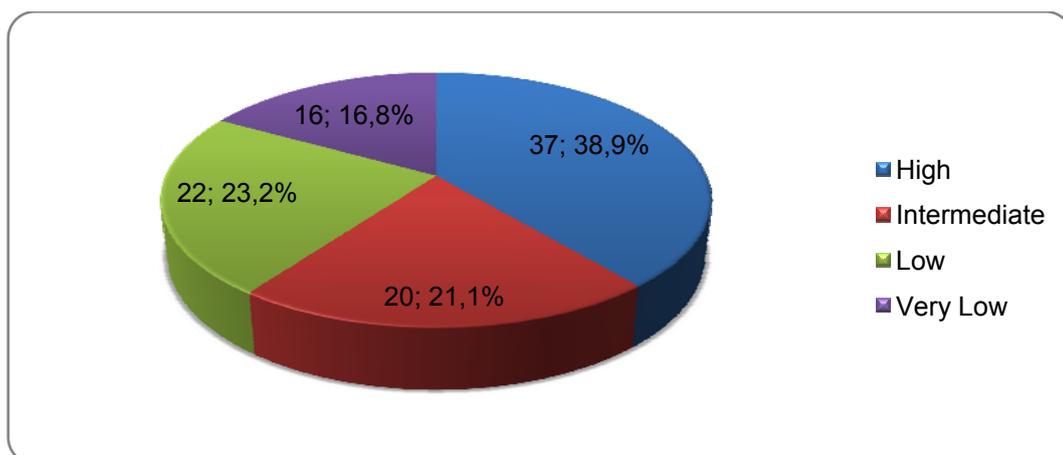


Abbildung 10: Risikoklassifikation Gastrointestinaler Stromatumoren in dieser Studie nach Fletcher et al. [26] mit absoluten Werten und prozentualen Anteilen

In der beschriebenen dichotomen Aufteilung waren somit n=37 Patienten der Gruppe „High“ und n=58 Patienten der Gruppe „Non-High“ zugeordnet. In der Kreuztabelle konnte ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen bezüglich tumorbedingtem Tod ($p < 0,001$) sowie dem allgemeinen Auftreten von Rezidiven oder Metastasen gefunden werden ($p < 0,001$). Die Odds Ratio betragen für die Gruppe „High“ gegenüber der Gruppe „Non-High“ $OR = 30,9$ [3,8; 249,4] für tumorbedingten Tod und $OR = 93,6$ [11,6; 753,9] für das allgemeine Auftreten von Rezidiven oder Metastasen.

92,9% aller tumorbedingt Verstorbenen und 95,8% aller der Patienten, die im Verlauf Rezidive oder Metastasen entwickelten, waren dabei der Kategorie „High-Risk“ nach Fletcher et al. [26] zuzuordnen.

In der Survivalanalyse bezüglich des *Overall-Survivals* zeigten n=37 Patienten mit einem High-Risk-GIST nach Fletcher et al. [26] eine 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 86,1%, eine 3-Jahres-ÜLW von 73,4% und eine 5-Jahres-ÜLW von 59,2%.

Patienten mit einem Non-High-Risk-GIST (n=57) hatten dagegen eine 1-Jahres-ÜLW von 94,7%, eine 3-Jahres-ÜLW von 83,4% und eine 5-Jahres-ÜLW von 73,4%.

Betrachtet man nur das krankheitsspezifische Survival von n=94 Patienten so ergibt sich in der Gruppe der High-Risk-GIST eine 1-Jahres-ÜLW von 88,7%, eine 3-Jahres-ÜLW von 75,5% und eine 5-Jahres-ÜLW von 64,5%. In der Gruppe der Non-High-Risk-GIST betrug dagegen die 1-Jahres-ÜLW 100%, die 3- und 5-Jahres-ÜLW je 97,7%. Der mitgeführte Log-Rank-Test zeigte dabei einen hoch signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe mit High-Risk-Tumoren und deren mit Non-High-Risk-Tumoren von $p < 0,001$.

Auch die Wahrscheinlichkeit krankheitsfreien Überlebens DFSP der Gruppen „High“ und „Non-High“ betreffend, ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen im Log-Rank-Test feststellen ($p < 0,001$).

Werte für 1-, 3- und 5-a-DFSP betrugen hierbei 50,2%, 43,9% und 37,7% in der High-Gruppe, und je 98,2% in der Non-High-Gruppe.

Tabelle 5: Ergebnisse der Survivaluntersuchungen und Kreuztabellen der Gruppen „High-Risk“ gegenüber der Gruppe „Non-High-Risk“, modifiziert nach Fletcher et al. [26] bezüglich tumorbedingtem Tod (links) bzw. dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen als Ereignis (rechts) mit Angabe der Ergebnisse des Fisher's Exakt-Tests, der Odds Ratio (mit Angabe des 95%-Konfidenzintervalls (KI)), der krankheitsspezifischen (DSSP, links) und krankheitsfreien (DFSP, rechts) Überlebenswahrscheinlichkeiten für 1, 3 und 5 Jahre (a) sowie der Ergebnisse der vergleichenden Log-Rank-Tests.

Ereignis	Tumorbedingter Tod		Rezidive/Metastasen	
	High-Risk	Non-High-Risk	High-Risk	Non-High-Risk
Fisher's Exakt	p<0,001		p<0,001	
Odds Ratio [KI]	30,9 [3,8; 249,4]		93,6 [11,6; 753,9]	
1-a-DSSP/DFSP	88,7%	100,0%	50,2%	98,2%
3-a-DSSP/DFSP	75,5%	97,7%	43,9%	98,2%
5-a-DSSP/DFSP	64,5%	97,7%	37,7%	98,2%
Log-Rank-Test	p<0,001		p<0,001	

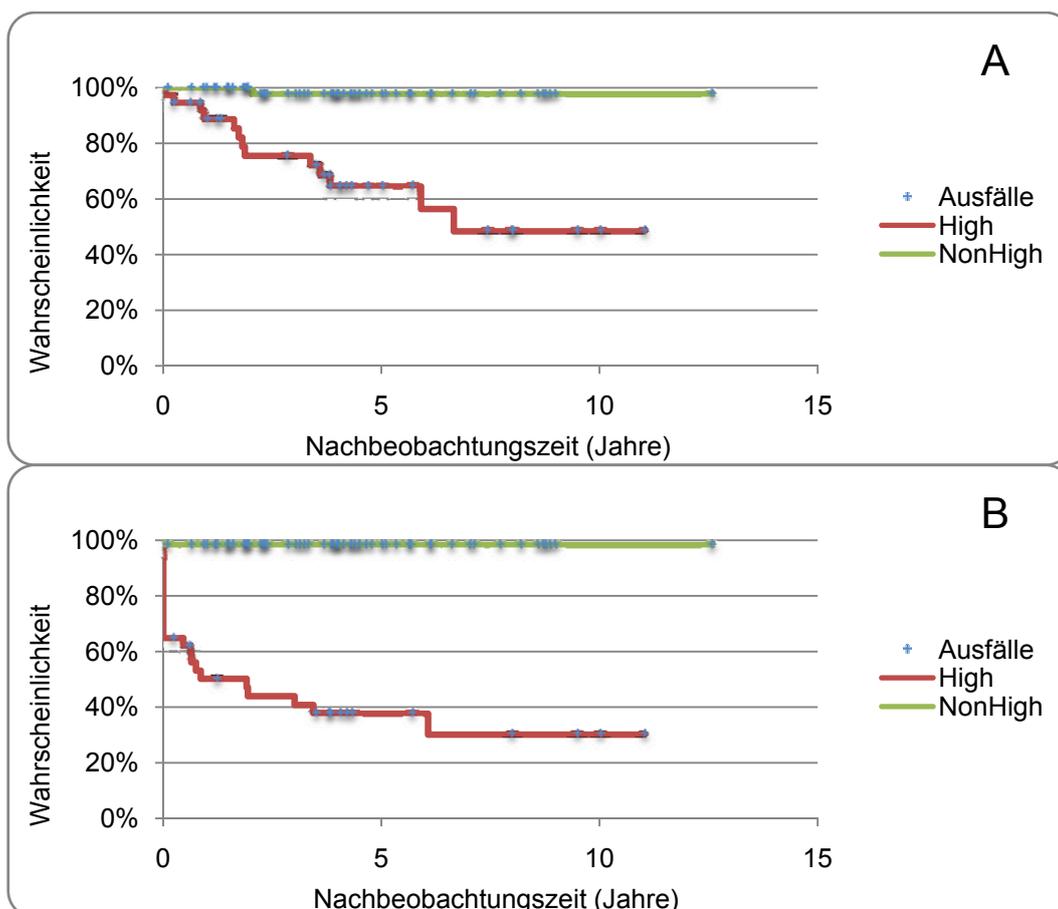


Abbildung 11: Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen (Teilgrafik A) und krankheitsfreien Überlebens (Teilgrafik B) der Gruppen „High“ und „Non-High“, modifiziert nach Fletcher et al. [26] als Kaplan-Meier-Kurve, zensierte Fälle sind dabei als Kreuze dargestellt

Zur Bestimmung der Vorhersagekraft wurde die diagnostische Sensitivität und Spezifität sowie der positive und negative Vorhersagewert der Klassifikation „High-Risk“ (gegenüber „Non-High-Risk“) berechnet. Für einen 5-Jahres-Zeitraum ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 6: Berechnete Maßzahlen zur Zuverlässigkeit des modifizierten Klassifikationssystems nach Fletcher et al. [26] („High“ gegenüber „Non-High“), bezüglich tumorbedingtem Tod (TBEL) und dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen (R/M)

	TBEL	R/M
Sensitivität	91,7%	100,0%
Positiver Vorhersagewert	52,4%	60,0%
Spezifität	64,3%	75,0%
Negativer Vorhersagewert	94,7%	100,0%

3.4.3 Immunhistochemie

3.4.3.1 CD117 und PDGFR- α

In dem beschriebenen Patientenkollektiv von n=101 Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren waren bezüglich n=100 Patienten n=97 Patienten (97,0%) positiv für CD117, n=3 Patienten entsprechend (3,0%) zeigten dagegen Positivität für PDGFR- α . Lediglich für eine Patientin war nicht abschließend zu klären, ob der bei ihr vorbeschriebene GIST diagnostisch nun auf Expression von CD117 oder PDGFR- α zurückzuführen war.

3.4.3.2 Nebenbefundlich erhobene Parameter

In der vorliegenden Studie fanden sich für die nebenbefundlich erhobenen immunhistochemischen Parameter folgende Konstellation: CD34 exprimierten 84,6% (n=66), 15,4% (n=12) waren dafür negativ ($\Sigma=78$). Positiv für Aktin zeigten sich 20,6% (n=14) der GIST gegenüber 79,4% (n=54) die negativ für diesen

Marker waren ($\Sigma=68$). Für Desmin ergab sich eine Positivität in 8,3% (n=4) der Fälle gegenüber 91,7% (n=44) die sich negativ zeigten ($\Sigma=48$).

Vimentin wurde erwartungsgemäß von allen untersuchten GIST exprimiert (n=32).

Nahezu alle, genauer 98,2% (n=56), erschienen negativ für S100, allein ein singulärer Fall (1,8%) war positiv für diesen Parameter ($\Sigma=57$).

Für NSE fand sich eine Positivität in 58,3% (n=7) der Fälle gegenüber 41,7% (n=5) die sich negativ zeigten ($\Sigma=12$). Zusammengefasst sind die Ergebnisse auch Abbildung 12 zu entnehmen.

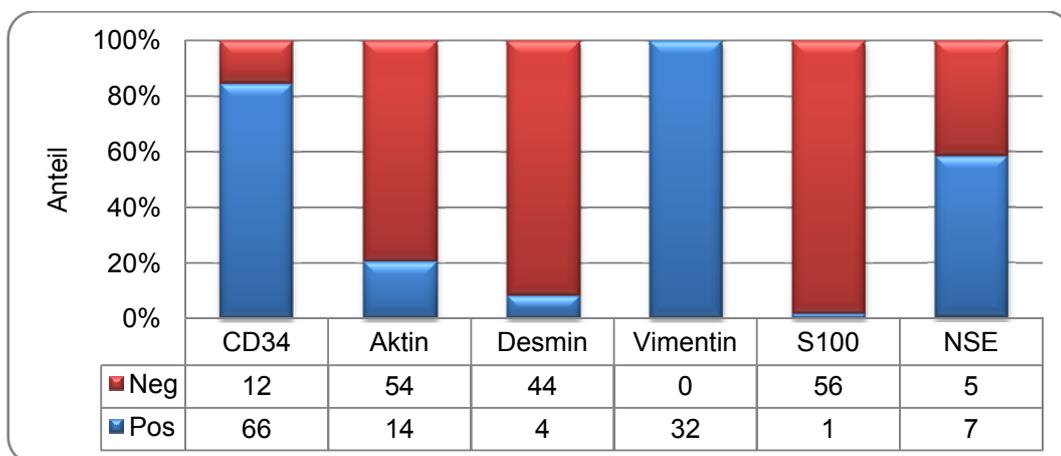


Abbildung 12: Zusammenschau der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der nebenbefundlich erhobenen Parameter mit prozentualen Anteilen der Positivität bzw. Negativität, darunter die absoluten Zahlen in Tabellenform (CD=cluster of differentiation, NSE = Neuronenspezifische Enolase, Neg = Negativ, Pos = Positiv,)

Vom eigentlichen Primärtumor konnten in 70 Fällen Aussagen zum Proliferationsmarker MiB-1 gefunden werden. Gruppe 1 (Proliferationsraten <10%, siehe Kapitel 2.2.5.2) war dabei mit 84,3% (n=59) gegenüber Gruppe 2 (Proliferationsraten $\geq 10\%$) mit 15,7% (n=11) stärker vertreten.

Bezüglich der erhobenen Mitoserate auf 50 High-Power-Fields und der in Kapitel 2.2.5.2 beschriebenen Gruppeneinteilung ergaben sich folgende Ergebnisse: Der Gruppe 1 (Mitoserate „Low“, <5/50HPF) waren n= 55 (59,8%) zuzuordnen, der Gruppe 2 (Mitoserate „High“, $\geq 5/50HPF$) n= 37 (40,2%).

3.4.3.3 Expression von Epidermal growth factor receptor

Für das im Kapitel 2.2.5.2 beschriebene Subkollektiv ergaben sich folgende Ergebnisse: 44,4% der Proben (n=8) waren negativ für EGFR, 55,6% (n=10) zeigten positive Reaktion.

Bezüglich der beiden vorausgewählten Gruppen zeigte sich eine sehr heterogene Verteilung der Färbereaktionen. Aufgrund der geringen Anzahl der Fälle seien hier alle Färbungen in tabellarischer Form aufgeführt:

Tabelle 7: Tabellarische Aufstellung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung gegen EGFR (Epidermal growth factor receptor). Aufgetragen sind die Identifikationsnummer der Patienten (ID-Nr.), der Prozentsatz positiver Tumorzellen (pTZ %), die Beurteilung der Stärke der Reaktion nach Goldstein et al. [29] (Grading), Tumorbedingter Tod (Exitus), die Nachbeobachtungszeit bis zum letzten Follow-Up bzw. bis zum Tod (DSS) in Jahren (a), das Auftreten von Rezidiven oder Metastasen (R/M) und diejenige Zeit bis zum Auftreten von Rezidiven oder Metastasen bzw. bis zum letzten Follow-Up oder tumorbedingtem Tod (DFS) angegeben in Jahren (a)

ID-Nr.	pTZ %	Grading	Exitus	DSS (a)	R/M	DFS (a)
UIm079	0	0	Nein	1,32	Ja	0
UIm025	50	++	Ja	0,85	Ja	0
UIm035	70	+++	Nein	3,69	Ja	0,46
UIm030	50	+	Ja	3,82	Ja	0,63
UIm077	40	++	Nein	1,02	Ja	0,64
UIm020	0	0	Nein	5,04	Ja	0,75
UIm038	0	0	Nein	4,70	Ja	1,91
UIm092	0	0	Ja	3,37	Ja	1,94
UIm031	0	0	Ja	3,58	Ja	3,01
UIm004	0	0	Nein	7,99	Ja	6,07
UIm018	10	+	Nein	5,34	Nein	-
UIm022	20	+	Nein	5,74	Nein	-
UIm074	100	+++	Nein	7,73	Nein	-
UIm068	0	0	Nein	8,20	Nein	-
UIm027	5	+	Nein	8,59	Nein	-
UIm088	40	+++	Nein	8,99	Nein	-
UIm037	50	++	Nein	9,49	Nein	-
UIm073	0	0	Nein	10,03	Nein	-

Bei Tumoren mit positiver Reaktion war hauptsächlich eine zytoplasmatische Anfärbung zu konstatieren, lediglich in einem Fall war die Markierung definitiv nur auf die Zellmembran beschränkt. Es wurden zwischen 10% und 100% der

Tumorzellen positiv markiert, alle drei Stärkegrade konnten beobachtet werden. Genauer zeigten sich in der Hälfte der positiven Fälle weniger als 50%, in der anderen Hälfte $\geq 50\%$ der Tumorzellen markiert

3.4.3.4 Expression von P53

Von n=87 Patienten konnten Proben zum Parameter P53 immunhistochemisch gefärbt werden. Davon zeigten n=57 (65,5%) Proben positive Tumorzellen, in den restlichen n=30 (34,5%) Proben war keinerlei Reaktion zu erkennen. Nach Bestimmung des Anteils angefärbter Tumorzellen und Einteilung nach Sabah et al. [94] ergaben sich folgende Befunde: Negativ für P53 waren n=59 (67,8%) gegenüber n=28 (32,2%) die als positiv ($\geq 10\%$ positive Tumorzellen) definiert wurden.

3.4.3.5 Expression von P16

Insgesamt liegen für n=95 Patienten Daten zur immunhistochemischen Färbungen gegen P16 vor.

In der Klassifikation nach Schneider-Stock et al. [102] ergaben sich in Abhängigkeit vom Prozentsatz positiv markierter Tumorzellen die in Tabelle 8 gefundenen Ergebnisse.

Tabelle 8: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen gegen P16 (Antikörper P16^{INK4}, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland, Verdünnung 1:400, Detektion Alkaline Phosphatase/RED (Dako)), unterteilt nach dem Anteil positiv markierter Tumorzellen (pTZ %) im stärksten reaktiven Areal nach Schneider-Stock et al. [102]

Grad	pTZ %	Anzahl	Anteil
0 (no staining)	0 - 10	54	56,8%
1 (weak)	11 - 20	3	3,2%
2 (moderate)	21 - 50	23	24,2%
3 (strong)	>50	15	15,8%

Nach der Definition von Positivität nach Schneider-Stock et al. [102] (Cut-Off 20%) sind n=57 (60,0%) als negativ, n=38 (40,0%) als positiv zu werten.

Nimmt man einen Cut-Off von 10% an, findet sich Positivität in n=41 (43,2%) und Negativität in n=54 (56,8%) Tumoren. Bei einem Cut-Off von 50% waren entsprechend n=80 (84,2%) GIST als negativ und n=15 (15,8%) Fälle als positiv zu werten.

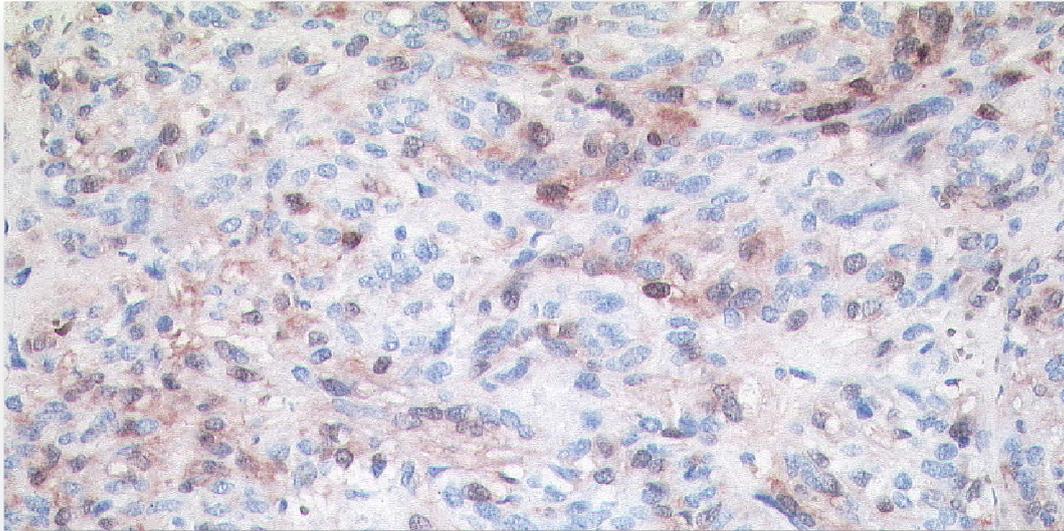


Abbildung 13: Repräsentativer Anteil eines Gastrointestinalen Stromatumors in immunhistochemischer Färbung gegen P16 (positiver Befund) in 400facher Vergrößerung mit teilweiser Anfärbung der Zellkerne und des Zytoplasmas, Primärantikörper P16^{INK4} (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland, Verdünnung 1:400), Detektion Alkaline Phosphatase/RED (Dako)

3.4.4 Prognostische Korrelationen

3.4.4.1 Nebenfundlich erhobene Parameter

Für den Parameter Aktin konnte in Kreuztabellen keinerlei signifikante Korrelation zwischen Negativität für Aktin und tumorbedingtem Tod ($p=1,0$) oder dem allgemeinen Auftreten von Metastasen oder Rezidiven ($p=0,319$) gefunden werden. Die dennoch durchgeführten Überlebensanalyse zeigten keinen signifikanten Unterschied der Gruppen Aktin positiv vs. Aktin negativ, weder

bezüglich des krankheitsspezifischen ($p=0,611$, Log-Rank-Test) noch des krankheitsfreien Überlebens ($p=0,236$, Log-Rank-Test).

Ebenso verhielt es sich mit dem Parameter CD34: In den durchgeführten Kreuztabellen ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede der Gruppen CD34-positiv und CD34-negativ bezüglich tumorbedingtem Tod oder dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen (jeweils $p=1,0$). Ebenso erbrachte die durchgeführten Überlebensanalysen keine signifikanten Unterschiede bezüglich krankheitsspezifischen ($p=0,670$, Log-Rank-Test) oder krankheitsfreien Überlebens ($p=0,590$, Log-Rank-Test).

Auf die Untersuchung von Desmin, Vimentin, S100 und NSE hinsichtlich Ihrer prognostischen Bedeutung wurde entweder aufgrund der zu geringen Fallzahl oder der absoluten Homogenität der Gruppe verzichtet.

Für den Proliferationsmarker MiB-1 ließ sich für $n=70$ Patienten bei Durchführung der Survivalanalyse konstatieren, dass Patienten der Gruppe 2, also solche mit Proliferationsraten $\geq 10\%$, signifikant häufiger tumorbedingt verstarben als solche der Gruppe 1 (Proliferationsraten $< 10\%$) ($p < 0,001$, Log-Rank-Test).

Im krankheitsspezifische Survival ergab sich in Gruppe 1 eine 1- Jahres-ÜLW von 98,3%, eine 3-Jahres-ÜLW von 96,1 und eine 5-Jahres-ÜLW von 93,5%, wohingegen in Gruppe 2 lediglich eine 1-Jahres-ÜLW von 90,9% und eine 3-Jahres-ÜLW von 56,8% erreicht wurde Die 5-Jahres-ÜLW war dabei nicht bestimmbar.

Auch in der Betrachtung des krankheitsfreien Überlebens ergaben sich signifikante Ergebnisse. So hatten Patienten der Gruppe 1 deutlich höhere Chancen auf krankheitsfreies Überleben als solche der Gruppe 2 ($p < 0,001$, Log-Rank-Test).

Es ergaben sich Werte für 1-, 3- und 5-a-DFSP von 88,0%, 85,9% und 85,9% in Gruppe 1, bzw. 36,4% und 24,2% in Gruppe 2. Dabei war die 5-a-DFSP in Gruppe 2 nicht bestimmbar.

Tabelle 9: Ergebnisse der Survivaluntersuchungen und Kreuztabellen der Gruppen 1 und 2, eingeteilt nach Proliferationsindex MiB-1 in Gruppe 1 (<10% der Tumorzellen) und Gruppe 2 (≥10% der Tumorzellen) bezüglich tumorbedingtem Tod (links) bzw. dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen als Ereignis (rechts) mit Angabe der Ergebnisse des Fisher's Exakt-Tests, der Odds Ratio (mit Angabe des 95%-Konfidenzintervalls (KI)), der krankheitsspezifischen (DSSP, links) und krankheitsfreien (DFSP, rechts) Überlebenswahrscheinlichkeiten für 1, 3 und 5 Jahre (a) sowie der Ergebnisse der vergleichenden Log-Rank-Tests (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$).

Ereignis	Tumorbedingter Tod		Rezidive/Metastasen	
	≥10%	<10	≥10%	<10%
Fisher's Exakt	p<0,001		p<0,001	
Odds Ratio [KI]	22,4 [4,3; 117,9]		22,1 [4,1; 117,9]	
1-a-DSSP/DFSP	90,9%	98,3%	36,4%	88,0%
3-a-DSSP/DFSP	56,8%	96,1%	24,2%	85,9%
5-a-DSSP/DFSP	-	93,5%	-	85,9%
Log-Rank-Test	p<0,001		p<0,001	

Auch die Überlebensanalysen die Mitoserate betreffend erreichten Signifikanzniveau. So verstarben Patientin mit einer Mitoserate $\geq 5/50$ HPF (Mitoserate „High“) im Vergleich mit Patienten mit Mitoseraten $< 5/50$ HPF (Mitoserate „Low“) signifikant häufiger krankheitsbedingt ($p=0,005$, Fisher's exakter Test). Werte für 1-, 3- und 5-a-ÜLW betragen hierbei 91,6%, 78,9% und 72,2% in der Mitoserate-High-Gruppe, und 98,1%, 95,6% und 92,1% in der Mitoserate-Low-Gruppe. Der Log-Rank-Test ergab dabei eine Wert von $p=0,007$.

Ebenso signifikant war der Unterschied der beiden Gruppen in der Betrachtung des krankheitsfreien Überlebens: Werte für 1-, 3- und 5-a-DFSP betragen 56,4%, 50,5% und 47,5% in der High-Gruppe und je 94,4% in der Low-Gruppe. Der Log-Rank-Test und Fisher's exakter Test waren signifikant (je $p<0,001$)

Tabelle 10: Ergebnisse der Survivaluntersuchungen und Kreuztabellen der Gruppen High und Low, eingeteilt nach Mitoserate auf 50 High-Power-Fields in Gruppe Low (<5) und High (≥5) bezüglich tumorbedingtem Tod (links) bzw. dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen als Ereignis (rechts) mit Angabe der Ergebnisse des Fisher's Exakt-Tests, der Odds Ratio (mit Angabe des 95%-Konfidenzintervalls (KI)), der krankheitsspezifischen (DSSP, links) und krankheitsfreien (DFSP, rechts) Überlebenswahrscheinlichkeiten für 1, 3 und 5 Jahre (a) sowie der Ergebnisse der vergleichenden Log-Rank-Tests (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$).

Ereignis	Tumorbedingter Tod		Rezidive/Metastasen	
	≥5 / 50 HPF	<5 / 50 HPF	≥5 / 50 HPF	<5 / 50 HPF
Fisher's Exakt	p=0,005		p<0,001	
Odds Ratio [KI]	6,4 [1,6; 25,3]		20,4 [5,4; 77,2]	
1-a-DSSP/DFSP	91,6%	98,1%	56,4%	94,4%
3-a-DSSP/DFSP	78,9%	95,6%	50,5%	94,4%
5-a-DSSP/DFSP	72,2%	92,1%	47,5%	94,4%
Log-Rank-Test	p=0,007		p<0,001	

3.4.4.2 Expression von EGFR

Für den Parameter EGFR konnte keinerlei signifikante Korrelation betreffend die Prognose hergestellt werden. Hierzu wurden die GIST-Patienten, unter Annahme von Cut-Off-Wert von 5%, 10%, 20% und 50%, in der Kreuztabelle und in Survivaluntersuchungen bezüglich tumorbedingtem Tod und dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen untersucht. Die Ergebnisse sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 11: Ergebnisse der Kreuztabellen zum Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR) (tumorbedingter Tod (TBEL) bzw. Auftreten von Rezidiven oder Metastasen (R/M)) gegen die Gruppen EGFR-Positiv und EGFR-Negativ unter Annahme verschiedener Cut-Off-Werte bezüglich positiver Tumorzellen in der immunhistochemischen Färbung gegen EGFR) sowie die der Log-Rank-Tests bezüglich krankheitsspezifischem (DSSP) und krankheitsfreiem Überleben (DFSP) der beiden Gruppen (p-Werte) (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$).

Cut-Off	χ^2 -/Fisher's-Exakt-Test		Log-Rank-Test	
	TBEL	R/M	DSSP	DFSP
5%	p=1,000	p=0,188	p=0,806	p=0,375
10%	p=1,000	p=0,637	p=0,973	p=0,710
20%	p=1,000	p=1,000	p=0,753	p=0,957
50%	p=0,533	p=1,000	p=0,300	p=0,499

Es könnte somit bezüglich der prognostischen Bedeutung von EGFR allenfalls eine Tendenz angegeben werden: Der Expression von EGFR im Allgemeinen erscheint in unserer Untersuchung eher als protektiver Faktor. Dies ist jedoch nicht signifikant zu zeigen.

3.4.4.3 Expression von P53

Zunächst erfolgt nun die Betrachtung der Gruppe, die komplett negativ war gegenüber der Gruppe, die positive Reaktionen zeigte:

Die durchgeführten Korrelationsversuche via Kreuztabelle führten zu folgenden Ergebnissen: Der Test auf Korrelation zwischen Positivität für P53 und tumorbedingtem Tod erreichte Signifikanzniveau ($p=0,029$). Ebenso verhielt es sich mit der Korrelation mit dem allgemeinem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen ($p= 0,043$).

Nach Durchführung der Survivalanalysen zeigten sich folgende Ergebnisse:

Patienten mit solchen Tumoren, die Reaktionen mit dem Antikörper gegen P53 aufwiesen, verstarben signifikant häufiger bzw. früher krankheitsbedingt. Der vergleichende Log-Rank-Test ergab dabei einen Wert von $p=0,050$. So betragen Werte für 1-, 3- und 5-a-DSSP 92,9%, 84,5% und 76,9% in der Gruppe P53-positiv und je 95,7% in der Gruppe P53-negativ

Die das krankheitsfreie Überleben betreffende Kaplan-Meier-Analyse erbrachten folgende Befunde: Der vergleichender Log-Rank-Test zwischen der Gruppe ohne jegliche Reaktion mit der Gruppe mit immunhistochemischem Nachweis von P53 verfehlte nur knapp Signifikanzniveau ($p=0,068$). Werte für 1-, 3- und 5-a-DFSP betragen hierbei 73,6%, 69,3% und 64,6% in der Positiv-Gruppe, und je 89,4% in der Negativ-Gruppe.

Tabelle 12: Ergebnisse der Survivaluntersuchungen und Kreuztabellen der Gruppen P53-positiv und P53-negativ (jegliche positive Reaktion gegenüber keinerlei Reaktion) bezüglich tumorbedingtem Tod (links) bzw. dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen als Ereignis (rechts) mit Angabe der Ergebnisse des χ^2 -Tests, der Odds Ratio (mit Angabe des 95%-Konfidenzintervalls (KI)), der krankheitsspezifischen (DSSP, links) und krankheitsfreien (DFSP, rechts) Überlebenswahrscheinlichkeiten für 1, 3 und 5 Jahre (a) sowie der Ergebnisse der vergleichenden Log-Rank-Tests (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$).

Ereignis	Tumorbedingter Tod		Rezidive/Metastasen	
	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Fisher's Exakt	p=0,029		p=0,043	
Odds Ratio [KI]	8,6 [1,1; 69,1]		3,5 [1,1; 11,5]	
1-a-DSSP/DFSP	92,9%	95,7%	73,6%	89,4%
3-a-DSSP/DFSP	84,5%	95,7%	69,3%	89,4%
5-a-DSSP/DFSP	76,9%	95,7%	64,6%	89,4%
Log-Rank-Test	p=0,050		p=0,068	

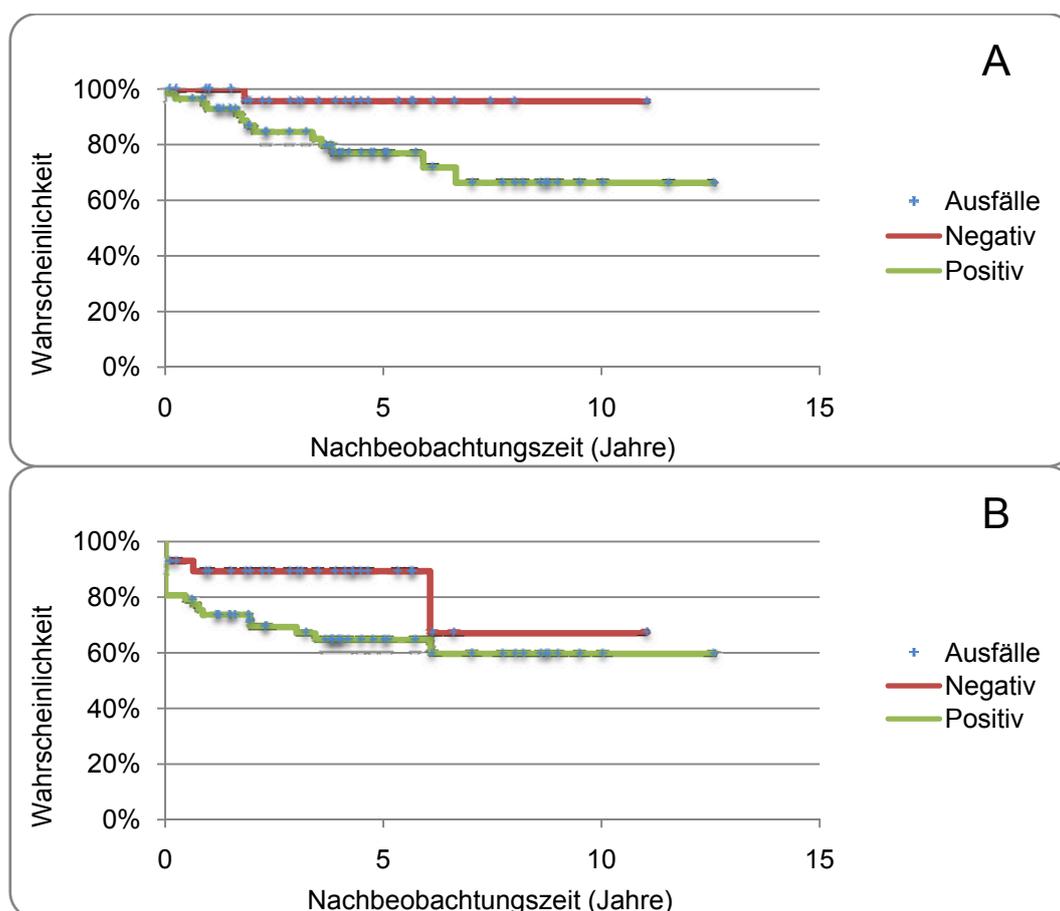


Abbildung 14: Wahrscheinlichkeiten des krankheitsspezifischen (Teilgrafik A) und des krankheitsfreien Überlebens (Teilgrafik B) als Kaplan-Meier-Kurve, aufgetragen sind die Gruppen P53-positiv und P53-negativ (jegliche positive Reaktion gegenüber keinerlei Reaktion), zensierte Fälle sind dabei als Kreuze dargestellt

Definiert man, wie in Kapitel 2.2.5.1 dargestellt, Positivität mit einem angenommenen Cut-Off von 10%, ergab sich ein anderes Ergebnis: Positivität für P53 korrelierte in der Kreuztabelle mit dem gehäuftem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen, nicht jedoch mit dem Auftreten tumorbedingten Todes ($p=0,028$ bzw. $p=0,351$). Bezüglich dem krankheitsspezifischen Überleben konnte kein signifikanter Unterschied der jetzt Cut-Off-bedingt anders aufgeteilten Gruppen mehr erkannt werden ($p=0,451$, Log-Rank-Test).

Anders bei der Betrachtung des krankheitsfreien Überlebens. Hier wurde das Signifikanzniveau bezüglich des vergleichenden Log-Rank-Tests knapp erreicht ($p=0,050$). Werte für 1-, 3- und 5-a-DFSP betragen hierbei 67,9%, 59,4% und 59,4% in der Positiv-Gruppe, und 84,2%, 84,2% und 78,8% in der Negativ-Gruppe.

Somit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass die immunhistochemische Expression von P53, einen Cut-Off von $<0\%$ positiver Zellen annehmend, eine Subgruppe von GIST-Patienten mit verkürztem krankheitsfreiem und krankheitsspezifischem Überleben markiert. Die Einbeziehung der Expression von P16 in bisherige Klassifikationssysteme könnte deren Vorhersagewerte verbessern.

3.4.4.4 Expression von P16

Bezüglich der Färbungen ergaben sich folgende Erkenntnisse: In den Kreuztabellen bezüglich der Korrelation von Positivität oder Negativität (nach Schneider-Stock et al. [102]) mit dem allgemeinen Auftreten von Rezidiven oder Metastasen wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p=0,926$). Selbiges galt für die Korrelation mit tumorbedingtem Tod ($p=0,813$).

In der Survivalanalyse nach Kaplan und Meier (krankheitsspezifisches Survival) zeigte sich folgendes: Die 1-Jahres-ÜLW betrug in der Gruppe der P16-positiven 94,4%, in der der P16-negativen 96,4%, die 3-Jahres-ÜLW 83,8% gegenüber 92,4%, die 5-Jahres-ÜLW 79,1% gegenüber 87,4%.

Im mitgeführten Log-Rank-Test ergab sich keinerlei signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,596$).

Nach Durchführung der Survival-Analyse bezüglich dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen konnten folgende Ergebnisse gefunden werden: Die DFSP betrug für die Gruppe der P16-Positiven für das erste und dritte Jahr je 78,9%, für das fünfte Jahr 70,1%.

In der Gruppe der P16-Negativen betrug die 1-a-DFSP 80,1%, die 3-a-DFSP 76,0% und die 5-a-DFSP 73,5%. Auch hier konnte der Log-Rank-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen zeigen ($p=0,745$).

Tabelle 13: Ergebnisse der Survivaluntersuchungen und Kreuztabellen der Gruppen „P16-positiv und P16-negativ“ nach Definition von Schneider-Stock et al. [102] (Positivität ab >20% positiver Tumorzellen in geschätzten 10 High-Power-Fields mit oder ohne zytoplasmatische Reaktion, darunter Negativität) bezüglich tumorbedingtem Tod (links) bzw. dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen als Ereignis (rechts) mit Angabe der Ergebnisse des χ^2 -Tests, der Odds Ratio (mit Angabe des 95%-Konfidenzintervalls (KI)), der krankheitsspezifischen (DSSP, links) und krankheitsfreien (DFSP, rechts) Überlebenswahrscheinlichkeiten für 1, 3 und 5 Jahre (a) sowie der Ergebnisse der vergleichenden Log-Rank-Tests (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$).

Ereignis	Tumorbedingter Tod		Rezidive/Metastasen	
	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
χ^2 -Test	p=0,813		p=0,926	
Odds Ratio [KI]	1,1 [0,4; 3,6]		1,2 [0,4; 2,6]	
1-a-DSSP/DFSP	94,4%	96,4%	78,9%	80,1%
3-a-DSSP/DFSP	83,8%	92,4%	78,9%	76,0%
5-a-DSSP/DFSP	79,1%	87,4%	70,1%	73,5%
Log-Rank-Test	p=0,596		p=0,745	

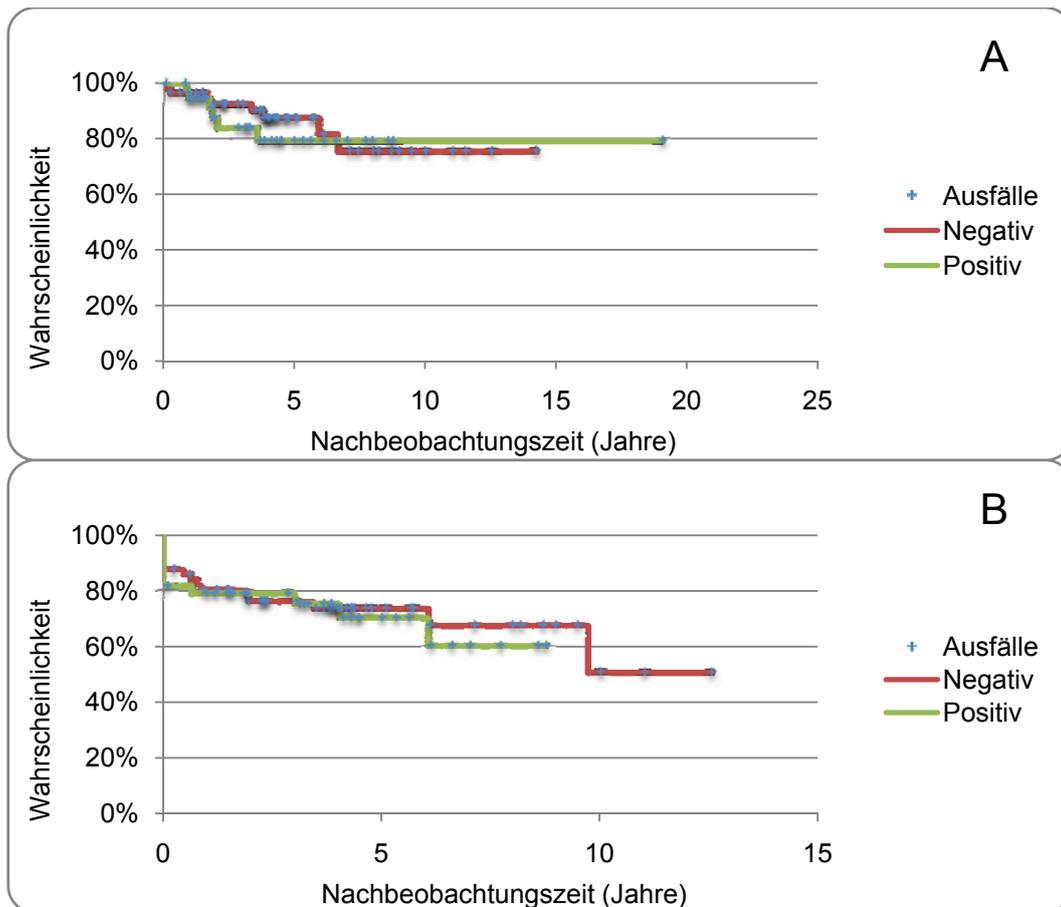


Abbildung 15: Wahrscheinlichkeiten des krankheitsspezifischen (Teilgrafik A) und krankheitsfreien Überlebens (Teilgrafik B) als Kaplan-Meier-Kurve, aufgetragen sind die Gruppen P16-positiv und P16-negativ nach Definition von Schneider-Stock et al. [102] (Positivität ab >20% positiver Tumorzellen in geschätzten 10 High-Power-Fields mit oder ohne zytoplasmatische Reaktion, darunter Negativität), zensierte Fälle sind dabei als Kreuze dargestellt

Weiterhin sollte nun untersucht werden, ob die Patienten mit P16-Positivität sich von jenen mit Negativität für P16 (nach Schneider-Stock et al. [102]) hinsichtlich des zeitlichen Auftretens von Rezidiven oder Metastasen unterscheiden. Hierzu wurde lediglich solche Patienten mit Rezidiven oder Metastasen der Survivalanalyse zugeführt. Auch hierbei konnte zunächst kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden ($p=0,586$, Log-Rank-Test).

In Abhängigkeit von weiteren Cut-Off-Werten zeigten sich dann jedoch die in Tabelle 14 dargestellten Ergebnisse in der Zusammenschau.

Tabelle 14: Ergebnisse der vergleichenden Log-Rank-Tests (p-Werte) in der Kaplan-Meier-Analyse des krankheitsspezifischen (DSSP) und des krankheitsfreien Überlebens (DFSP) mit verschiedenen Cut-Off-Werten bezüglich des Prozentsatzes angefärbter Tumorzellen (Parameter P16). Weiterhin untergliedert nach Gesamtkollektiv (alle) und der Subgruppe derer mit Rezidiven oder Metastasen (R/M) (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$).

	Cut-Off	p (DSS)	p (DFS)
alle	>10%	0,818	0,897
	>20%	0,596	0,745
	>50%	0,080	0,207
R/M	>10%	0,325	0,586
	>20%	0,325	0,586
	>50%	0,041	0,239

Die Ergebnisse der durchgeführten Log-Rank-Tests im Subkollektiv der „High-Risk“-GIST nach Fletcher et al. [26] bezüglich unterschiedlichen Cut-Offs sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 15: Ergebnisse der vergleichenden Log-Rank-Tests (p-Werte) in der Kaplan-Meier-Analyse des krankheitsspezifischen (DSSP) und des krankheitsfreien Überlebens (DFSP) mit verschiedenen Cut-Off-Werten bezüglich dem Prozentsatz angefärbter Tumorzellen (Parameter P16) im Subkollektiv der Gruppe „High-Risk“ nach Fletcher et al. [26] (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$).

Cut-Off	Log-Rank-Test	
	TBEL	R/M
10%	p=0,118	p=0,058
20%	p=0,022	p=0,006
50%	p=0,004	p=0,012

Bei einem Cut-Off von 10% P16-positiver Zellen findet sich in der Gruppe der High-Risk Patienten allein ein Trend zur Signifikanz bezüglich des Auftretens von Rezidiven oder Metastasen. Ab einem Cut-Off von 20% und mehr finden sich klar signifikante p-Werte, d.h. Patienten mit positiver P16-Expression zeigen ein signifikant schlechteres Outcome und zwar sowohl für das krankheitsspezifische Überleben ebenso wie für das Auftreten von Rezidiven oder Metastasen. Stellvertretend seien Kaplan-Meier-Kurven bezüglich einem Cut-Off von 20%

(nach Definition von Schneider-Stock et al. [102] (Positivität ab >20% positiver Tumorzellen in geschätzten 10 High-Power-Fields) dargestellt.

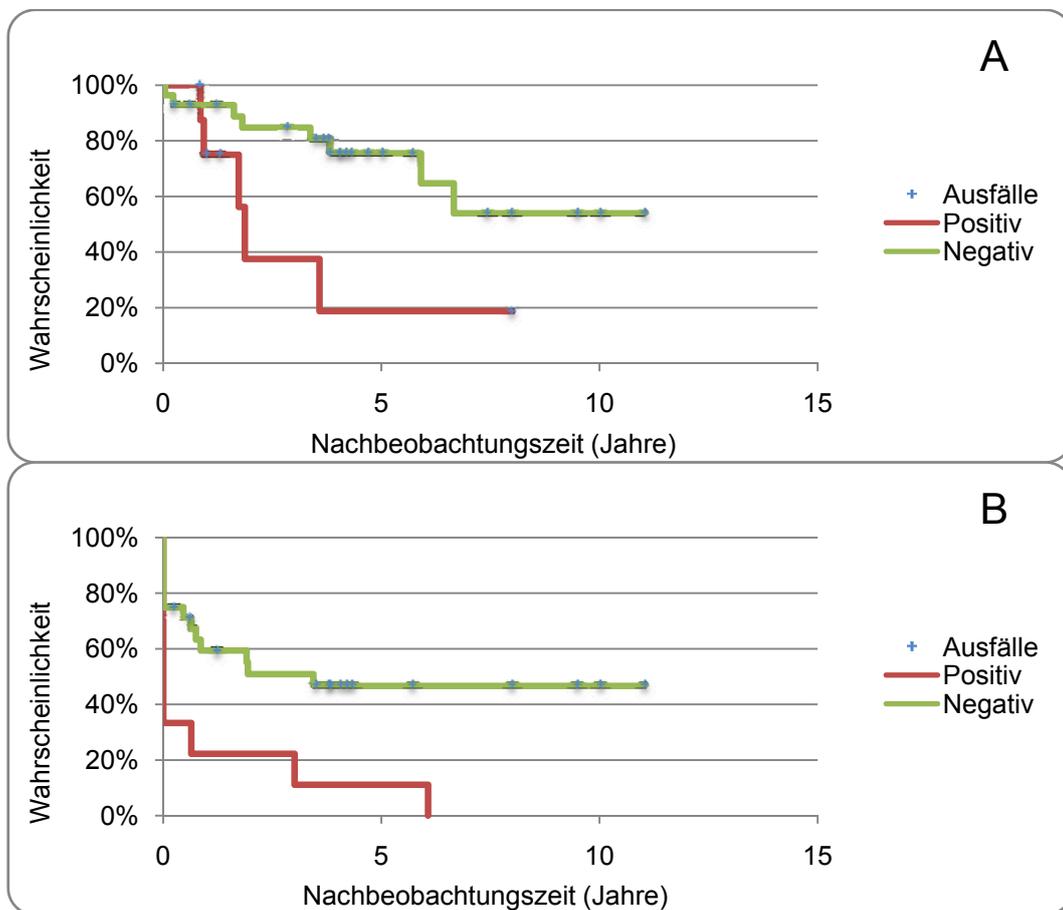


Abbildung 16: Wahrscheinlichkeiten des krankheitsspezifischen (Teilgrafik A) und krankheitsfreien Überlebens (Teilgrafik B) als Kaplan-Meier-Kurve, aufgetragen sind die Gruppen P16-positiv und P16-negativ nach Definition von Schneider-Stock et al. [102] (Positivität ab >20% positiver Tumorzellen in geschätzten 10 High-Power-Fields mit oder ohne zytoplasmatische Reaktion, darunter Negativität) im Subkollektiv der High-Risk-GIST nach Fletcher et al. [26], zensierte Fälle sind dabei als Kreuze dargestellt

Weiterhin wurden mittels Kaplan-Meier-Analyse die zwei folgenden Subkollektive verglichen:

- Gesamtheit der Patienten mit P16-positiven High-Risk-Tumoren
- Gesamtheit der Patienten mit P16-negativen High-Risk-Tumoren und derjenigen mit Non-High-Risk-Tumoren unabhängig vom P16-Status (entsprechend dem restlichen Kollektiv)

Hier ergaben sich unabhängig vom gewählten Cut-Off (10%, 20%, 50%) im Log-Rank-Test jeweils hochsignifikante Ergebnisse (jeweils $p < 0,001$).

Es konnte somit gezeigt werden, dass mittels der Expression von P16 ein Differenzierungsinstrument innerhalb der GIST-Patienten mit „High-Risk“-Tumoren zur Verfügung steht, welches in der Lage ist diejenigen Patienten mit „Very-High-Risk“-GIST zu identifizieren.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war es, die prognostische Bedeutung der Expression verschiedener Proteine bei Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren zu untersuchen. Besonderer Fokus lag dabei auf der Expression von P16, P53 und EGFR sowie der Risikoklassifikation nach Fletcher et al. [26]. Tumoren von insgesamt 101 Patienten wurden zu diesem Zwecke immunhistochemisch gefärbt und die gefundenen Ergebnisse in Relation zu den gewonnenen klinischen Daten zum krankheitsfreien und krankheitsspezifischen Überleben gesetzt. Die in der Routinediagnostik durchgeführten und über die Krankenakte verfügbaren Daten zur Expression von Aktin, Desmin, Vimentin, S100, NSE und MiB-1 wurden nach Verfügbarkeit nebenbefundlich ebenso mit ausgewertet. Daraus ergaben sich die folgenden Erkenntnisse:

4.1 Epidemiologie

In der vorliegenden Studie fand sich bei 101 Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren ein Geschlechterverhältnis von 53,5% Frauen zu 46,5% Männern. Bezüglich der Geschlechterverteilung findet sich auch in der verfügbaren Literatur bei der Mehrzahl der Untersuchungen keine signifikante Präferenz für ein Geschlecht [67, 69, 70]. Lediglich einzelne Autoren finden, dass Männer doppelt so häufig erkranken [40]. Die gefundenen Ergebnisse stehen somit nicht im Widerspruch zu den Referenzstudien. Die geringfügigen Abweichungen könnten durch die geringere Fallzahl hinreichend erklärt sein.

Weiterhin wird davon berichtet, dass maligne GIST etwas häufiger bei Männer als bei Frauen zu finden seien [69]. In unserem Patientenkollektiv fanden jedoch sich keine signifikanten Unterschiede zu den Überlebenswahrscheinlichkeiten beider Geschlechter.

Der Median des Erkrankungsalters lag bei 66,28 Jahren, der Mittelwert bei 64,11 Jahren. Es zeigte sich somit die typische, in der Literatur beschriebene, rechtsschiefe Verteilung eines GIST-Kollektivs mit einem medianen Erkrankungsalter um das 60. Lebensjahr [69].

Die deutliche Differenz zwischen arithmetischem Mittel und Median von 2,17 Jahren, die sich auch im Streuungsmaß der Standardabweichung mit $s_{St}=13,38$ Jahren zeigte, ist dabei auf Ausreißer in den Stichproben nach oben und somit auf relative Heterogenität der Gruppe zurückzuführen.

In 4% der Fälle waren Patienten vor dem 40. Lebensjahr betroffen, was nicht ungewöhnlich ist. So beschreiben Mietinen et al. Anteile von 5-20% von Patienten jünger als vierzig Jahre [69].

4.2 Klinisches Erscheinungsbild

Die in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Ergebnisse zur GIST-Tumorlokalisation mit prozentualen Anteilen von 60,6% für GIST des Magens, 33,3% für solche des Dünndarms, 2% für solche des Ösophagus und 1% für solche des Colons erscheinen ebenso nicht ungewöhnlich.

Auch in der Literatur wird beschrieben, dass sich ca. 40-60% der GIST im Magen und 30-40% im Dünndarm manifestieren [45]. In einer großen Studie der Jahre 1992 bis 2000 wurden beispielsweise 51% der Tumoren dem Magen, 36% dem Dünndarm, 7% dem Colon, 5% dem Rektum und 1% dem Ösophagus zugeordnet [109]. Die geringfügig abweichenden Daten unserer Studie sind dabei möglicherweise der geringeren Fallzahl gegenüber den Referenzstudien zuzuschreiben oder durch eine zentrumsbedingt differierende Selektion erklärbar.

Bemerkenswert sind in diesem Kollektiv die drei Patienten (3%) mit extragastrointestinalen Erscheinungsformen: Bei diesen Patienten fanden sich die Tumoren in der Bursa omentalis, retroduodenal und vom Ligamentum falciforme hepatis ausgehend ohne dass dabei Kontakt zum oder die Herkunft vom Gastrointestinaltrakt nachweisbar gewesen wäre. Auch solche extragastrointestinalen Manifestationen sind in der bestehenden Literatur bereits vorbeschrieben [15, 51, 62, 78, 80, 81, 120, 121].

In dieser Studie waren Patienten mit Tumoren ≥ 5 cm mit 53,2% stärker vertreten als solche mit Tumoren <5 cm. Mit Blick auf die Tumorgöße, zeigen unsere Ergebnisse einen hochsignifikanten negativ-prädiktorischen Zusammenhang,

ähnlich wie er auch in der Literatur beschrieben ist. Patienten mit einem GIST einer Größe von $\geq 5\text{cm}$ starben signifikant häufiger und früher krankheitsbedingt, ebenso entwickelten diese häufiger und früher Rezidive oder Metastasen ($p=0,008$, $p<0,001$, Log-Rank-Test) Entsprechend wurde bei der Berechnung der Odds Ratio eine 12,1fache Chance für tumorbedingten Tod und sogar eine 14fache Chance für das Auftreten von Rezidiven oder Metastasen für Patienten mit GIST einer Tumorgöße von mehr als 5cm gegenüber der Gruppe mit kleineren Tumoren gefunden. Da die maximale Tumorgöße neben der Mitoserate Teil der gängigsten Risikoklassifikationen ist [26, 65, 67, 70], erwies sie sich wie erwartet als wichtiger Parameter zur Vorhersage für ein ungünstiges klinisches Outcome.

Die in dieser Studie untersuchten Tumoren präsentierten sich als im Vergleich mit anderen Studien deutlich gutartiger. 28% aller Patienten entwickelten im Laufe der Nachbeobachtungszeit nach durchschnittlich 2,94 Jahren Rezidive oder Metastasen. 14% aller Tumoren waren dabei bereits initial metastasiert. Dies erscheint angesichts von 2004 von Eisenberg et. al [20] publizierten Metastasierungsraten von 50% bei Diagnosestellung gering, jedoch ist zu bemerken, dass eben selber Autor häufig als Befürworter der Imatinib-Therapie in Erscheinung tritt.

In der Untersuchung des Overall-Survivals ergab sich eine 5-Jahres-ÜLW von 69,5%. Dies ist darauf zurückzuführen, dass ein großer Anteil maligner Sekundärneoplasien zu konstatieren war, die in fast der Hälfte der Fälle zum Tod der Patienten führte. Im krankheitsspezifischen Überleben konnte hingegen eine 5-Jahres-ÜLW von 84,9% erreicht werden.

Es bleibt zu untersuchen, ob die Koinzidenz von Gastrointestinalen Stromatumoren mit anderen malignen Neoplasien einem pathogenetischen Zusammenhang unterliegt oder eher ein zufälliges Zustandekommen aufgrund z.B. des relativ hohen Alters des Patientengutes darstellt.

Weitere Untersuchungen zu den gehäuft gefundenen Sekundärneoplasien, dem klinischen Erscheinungsbild sowie der Art der Rezidive oder Metastasen sind nicht

Teil dieser Arbeit sondern Gegenstand der Promotionsarbeit von Herrn Sebastian Wolf, und sollen daher im Diskussionsteil auch nicht weiter verfolgt werden.

4.3 Pathologie

4.3.1 Zellmorphologie

Morphologisch fand sich in der vorliegenden Studie hauptsächlich der spindelzellige Typus (n=84, 84,6%). Seltener waren gemischtzellige (n=12, 12,4%) oder rein epitheloidzellige Typen (n=1, 1,0%). Diese Daten decken sich weitgehend mit den in der Literatur vorbeschriebenen. So beschreiben beispielsweise Rossi et al. einen Anteil von 71,2% spindelzelliger, 17,6% epitheloidzelliger und 11,2% gemischtzelliger Tumoren [89]. Auch Huang et al. fanden bezüglich n=276 Patienten vergleichbare Ergebnisse. Sie berichten von Anteilen von 78% spindelzelliger Tumoren und 22% Tumoren mit zumindest epitheloidzelliger Komponente [42].

Der Zusammenhang zwischen der GIST-Zellmorphologie (spindelzellig vs. epitheloidzellig) und dem klinischen Outcome unserer GIST-Patienten zeigte sich wie folgt: Tendenziell schienen Tumoren mit epitheloidzelliger Komponente mit schlechterer Prognose bezüglich krankheitsfreiem Überleben assoziiert, was jedoch nicht signifikant zu zeigen war ($p=0,102$, Log-Rank-Test). Bezüglich des krankheitsspezifischen Überlebens konnte hingegen kein Unterschied ausgemacht werden ($p=0,915$, Log-Rank-Test)

Zwar wird in der Literatur beschrieben, dass epitheloidzellige Morphologie in GIST mit Malignität assoziiert sein soll, jedoch nur in solchen des Dünndarms [69]. Aufgrund zu geringer Fallzahl konnte diese These in dieser Studie nicht weiter verfolgt werden.

4.3.2 Risikoklassifikation

In der Klassifikation nach Fletcher et al. [26] fand sich in der hier vorliegenden Studie folgende Verteilung: Bei 38,9% (n=37) wurde das Risiko malignen

Verhaltens des Primärtumors als „High“, bei 21,1% (n=20) als „Intermediate“, bei 23,2% (n=22) als „Low“ und bei 16,8% (n=16) als „Very Low“ eingestuft.

Daten zur Verteilung der Risikoklassifikation bei GIST variieren in der Literatur stark. So berichten beispielsweise Orosz et al. von einem Anteil von 80% High-Risk-GIST in einem Kollektiv von n=136 Patienten [76]. Demgegenüber finden sich in einer großen, populationsbasierten, skandinavischen Studie folgende Inzidenzen angegeben: 22,2 / 10⁶ für Very Low Risk, 51,9 / 10⁶ für Low Risk, 24,2 / 10⁶ für Intermediate Risk und 22,2 / 10⁶ für High Risk [72] nach Fletcher et al. [26]. Dies entspricht prozentualen Anteilen von 18,4% für Very Low Risk, 43,1% für Low Risk, 20,1% für Intermediate Risk und 18,4% für High Risk.

Tabelle 16: Gegenüberstellung der gewonnenen Ergebnisse dieser Studie (Ergebnisse) mit den Referenzwerten der Literatur [72] (Referenz)

Risk	Referenz	eigene Ergebnisse
Very Low Risk	18,4%	16,8%
Low Risk	43,1%	23,2%
Intermediate Risk	20,1%	21,1%
High Risk	18,4%	38,9%

Da die Klassifikation vom Stadium der Tumorerkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose abhängig ist, trägt das Kollektiv die Spuren der Selektion einer Universitätsklinik. Dies könnte eine Erklärung für den gesteigerten Anteil von High-Risk-GIST sein.

Der in der Literatur bereits mehrfach vorbeschriebene, hochsignifikante negativ-prädiktorische Wert für die Risikoklassifikation „High-Risk“ gegenüber den Klassen „Intermediate-, Low-, und Very-Low-Risk“ bezüglich krankheitsfreien- und krankheitsspezifischen Überlebens konnte auch in der vorliegenden Studie dargestellt werden. Die grundsätzliche Tauglichkeit der dabei angewendeten Risikoklassifikations-Kriterien wird damit erneut bestätigt. Da 92,9% aller tumorbedingt Verstorbenen und 95,8% aller der Patienten, die im Verlauf Rezidive

oder Metastasen entwickelten, der Gruppe „High-Risk“ zuzuordnen waren, erwies sich die modifizierte, in Kapitel 2.2.2 beschriebene dichotome Einteilung als gerechtfertigt und sinnvoll. In der Betrachtung der Chancenverhältnisse der Gruppe „High“ gegenüber der Gruppe „Non-High“ nach Fletcher et al. [26] ergaben sich Werte von OR=30,9 für tumorbedingten Tod und OR=93,6 für das Auftreten von Rezidiven oder Metastasen. Die bei der Berechnung der Odds Ratio gefundenen extremen Werte sind dabei typisch für dieses statistische Modell.

Jedoch ist festzustellen, dass die modifizierte Einteilung (High vs. Non-High) zwar hohe Werte für Sensitivität und negativen Vorhersagewert (jeweils >90%), jedoch gleichzeitig geringe Werte für Spezifität und positiven Vorhersagewert zeigte (s. Tabelle 6). Zum Verständnis seien noch einmal kurz die Definitionen hier aufgeführt:

Tabelle 17: Definitionen der Maßzahlen zur Zuverlässigkeit diagnostischer Tests

Sensitivität	Wahrscheinlichkeit, Kranke korrekt krank zu erkennen
Positiver Vorhersagewert	Wahrscheinlichkeit, bei positivem Test krank zu sein
Spezifität	Wahrscheinlichkeit, Gesunde korrekt gesund zu erkennen
Negativer Vorhersagewert	Wahrscheinlichkeit, bei negativem Test gesund zu sein

Es ist daher zu bemerken, dass im 5-Jahres-Intervall eine diagnostische Lücke bleibt: Ein Großteil der eigentlich der Hochrisikogruppe zugeordneten Patienten überlebte beschwerdefrei im Intervall von fünf Jahren. Offenbar schien somit innerhalb der Subgruppe „High-Risk“ eine weitere Unterteilung möglich. An dieser Stelle könnten sich immunhistochemische Untersuchungen bezüglich des Parameters P16, wie in den Kapiteln 3.4.3.5 und 3.4.4.4 beschrieben, als nützlich erweisen.

Abschließend bleibt zu konstatieren, dass die bestehenden, viergliedrigen Risikoeinteilungen sicher nicht in der Lage sind, alle Probleme bezüglich der Einschätzung des Malignitätsrisikos zu lösen. Ideal hingegen wäre eine einfache, dichotome Einteilung, die zudem eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweist.

4.3.3 CD117 und Platelet-derived growth factor receptor α

In dieser Studie erwiesen sich 97% der untersuchten Tumoren immunhistochemisch positiv für CD117 und 3% positiv für PDGFR- α . Dies steht in Übereinstimmung mit den Daten aus der Literatur. Hier werden 95% aller Gastrointestinalen Stromatumoren positiv für CD117 und 3%-5% positiv für PDGFR- α beschrieben [69].

4.3.4 Nebenbefundlich erhobene Parameter

20,6% der untersuchten Tumoren exprimierten Aktin, 79,4% waren für diesen Parameter negativ. Dies deckt sich mit den Daten der Literatur: So beschreiben Miettinen et al. einen Anteil von 25% SMA-positiver Tumoren [69]

Wie im Ergebnisteil erläutert, konnte der in den großen Referenzstudien beschriebene positive Einfluss einer Expression von Aktin in Gastrointestinalen Stromatumoren des Magens und des Dünndarms auf die Prognose [67, 70] weder in Bezug auf krankheitsfreies noch auf krankheitsspezifisches Überleben nachvollzogen werden ($p=0,236$ bzw. $p=0,611$, Log-Rank-Test). Weiterhin konnte in der Kreuztabelle entsprechend keinerlei signifikante Korrelation zwischen Negativität für Aktin und dem allgemeinen Auftreten von Metastasen oder Rezidiven ($p=0,319$) oder zwischen Negativität und tumorbedingtem Tod hergestellt werden ($p=1,0$). Möglicherweise sind diese Unterschiede in den Ergebnissen ebenfalls auf Unterschiede in der Patientenselektion, der Stichprobengröße oder der unterschiedlichen Nachbeobachtungsdauer, welche in den Daten der Literatur selten drei Jahre übersteigen und in der vorliegenden Studie knapp fünf Jahre erreicht, zurückzuführen.

In den immunhistochemisch untersuchten GIST dieser Studie konnte in 84,6% der Tumoren ein Expression von CD34 gefunden werden, 15,4% hingegen waren negativ für diesen Parameter. Die aktuelle Literatur gibt zu diesem Parameter Werte für Positivität um ~70% an [69]. Der in dieser Erhebung gefundene Wert liegt somit nur geringfügig höher als vorbeschrieben.

Die prognostische Bedeutung von CD34 betreffend, konnte in Kreuztabellen und Survivalanalysen kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Expression von CD34 und solchen ohne bezüglich dem Auftreten von tumorbedingtem Tod oder Rezidiven oder Metastasen festgestellt werden (jeweils $p=1,0$, Fisher-Exakt bzw. $p=0,670$ / $p=0,590$, Log-Rank-Test)

In der Literatur geben lediglich einzelne Autoren an, dass der Verlust der Expression von CD34 negativ-prädiktorische Bedeutung habe. So schreiben Rossi et al.: „ [...] *CD34 was significantly correlated with pathological prognostic parameters in our series of GIST, with CD34 immunostaining being more frequent in tumours with a lower mitotic index ($p=0.02$) and belonging to a lower risk group ($p=0.047$).*“ [89] und bestätigen damit frühere Ergebnisse anderer Autoren [97]. In großen Untersuchungen an insgesamt über 2000 Patienten mit GIST ergaben sich später aber keine Hinweise mehr auf einen prognostischen Wert [67, 70]. Somit entsprechen die hier gefundenen Ergebnisse den in der Literatur beschriebenen.

Die Expression von Desmin, Vimentin, S100 und NSE betreffend, zeigte sich das typische immunhistochemische Profil Gastrointestinaler Stromatumoren. So zeigte sich in Einklang mit der bestehenden Literatur beispielsweise nur in 8,3% ($n=4$) der Fälle eine Expression von Desmin [67, 69], alle untersuchten Tumoren exprimierten dagegen Vimentin ($n=32$) [69]. Auch bezüglich des prädiktorischen Wertes dieser Parameter fand sich innerhalb unserer Kollektivs kein neuer Aspekt. Ein in der Literatur erwähnter negativ-prognostischen Wert der immunhistochemischen Expression von S100 in gastralen [67], nicht jedoch in GIST des Dünndarms [70], konnte aufgrund zu geringer Fallzahl nicht weiter untersucht werden. Da sich Vimentin in allen untersuchten GIST homogen nachweisen ließ, erübrigten sich auch hier weitergehende Untersuchungen.

In den erhobenen Daten zur MiB-1-Färbung zeigte der Großteil der Tumoren einen Anteil proliferationsaktiver Zellen von weniger als 10% der Tumorzellen (83,8%), eine Minderheit (16,2%) wies einen Anteil von $\geq 10\%$ auf.

Für diesen Proliferationsmarker konnte, wie in Kapitel 3.4.4.1 dargestellt, in der Survivalanalyse ein hochsignifikanter Unterschied der Gruppen 1 und 2 bezüglich krankheitsspezifischen bzw. krankheitsfreien Überlebens beschrieben werden (jeweils $p < 0,001$, Log-Rank-Test). Patienten mit Tumoren, die Proliferationsraten von $\geq 10\%$ in der MiB-1-Färbung aufwiesen, entwickelten somit früher und häufiger Rezidive oder Metastasen und verstarben früher und häufiger tumorbedingt. Eine je um mehr als 22fache erhöhte Chance (Odds Ratio) für tumorbedingten Tod oder das Auftreten von Rezidiven oder Metastasen untermauert diese Ergebnisse.

Der prognostische Wert von MiB-1 bei GIST ist seit langem bekannt [9, 34, 71, 92], jedoch auch, dass er hierbei der Bestimmung der Mitoserate nicht überlegen ist [21, 92]. In der Zusammenschau der Daten dieser Studie zeigten sich diese beiden Parameter jedoch zumindest gleichwertig.

Es bleibt anzumerken, dass die Bestimmung der Proliferationsrate kein absolut zu quantifizierendes Merkmal ist, sondern im Wesentlichen eine Einschätzung, aber keine absolute Zählung durch den Beurteilenden darstellt. Zudem sind den hier vorliegenden Daten zufolge bereits wenige Prozentpunkte Abweichung entscheidend für die Einordnung des Risikos. In einer Untersuchung von Ozcan et al. wurden vier Pathologen GIST-Präparate zur Beurteilung immunhistochemischer Faktoren vorgelegt. Die größte Variabilität gegenüber der absoluten EDV-gestützten Zählung zeigte sich in dieser Studie in der Beurteilung der MiB-1-Rate [79].

Hier erscheint die Zählung der Mitoserate eindeutig überlegen, da auch Sie zwar untersucherabhängig ist, jedoch bei wiederholten Zählungen zumindest zu ähnlichen, *absoluten* quantitativen Aussagen und somit zu ähnlichen Schlussfolgerungen bezüglich der Einschätzung des Malignitätspotentials führt. Der relativ hohe Zeitaufwand zur vollständigen Auszählung von 50 HPFs gegenüber der weitaus schnelleren Bestimmung der Proliferationsrate mittels MiB-

1-Färbung ist aber sicherlich für die alltägliche Praxis relevant und soll deshalb hier nicht unerwähnt bleiben.

Da nun wie erwähnt mittlerweile EDV-gestützte Auswertungsmethoden existieren, die auch für solche Marker, die eine prozentuale Angabe der Zellzahl fordern, echte quantitative Aussagen treffen können, bleibt zu untersuchen, inwieweit sich die hier gefundenen Ergebnisse mit solchen Methoden reproduzieren lassen.

Die Untersuchung der Mitoserate auf Ihren prognostischen Wert erbrachte folgende Erkenntnisse: Tumoren der Gruppe Mitoserate „Low“ (<5/50HPF) waren mit 59,8% stärker vertreten als solche der Gruppe Mitoserate „High“ (≥ 5/50HPF) mit 40,2%.

Patientin mit Tumoren der Gruppe Mitoserate „High“ verstarben dabei signifikant häufiger und früher krankheitsbedingt als solche mit GIST der Gruppe Mitoserate „Low“ (p=0,007, Log-Rank-Test). Auch in der Betrachtung des krankheitsfreien Überlebens zeigten sich Patienten mit GIST der Gruppe Mitoserate „Low“ im Vorteil. Sie entwickelten seltener und später Rezidive oder Metastasen (p<0,001, Log-Rank-Test). Erhöhte Chancen für tumorbedingten Tod und das Auftreten von Rezidiven oder Metastasen von OR=6,4 respektive OR=20,4 bestätigten diese Daten.

Auch die prognostische Bedeutung der der Mitoserate ist in der Literatur hinlänglich beschrieben und bewiesen. Nicht zuletzt ist sie, wie die Tumorgroße, essentielles Kriterium der beiden gebräuchlichsten Klassifikationssysteme [26, 65, 67, 70] zur Bestimmung des Malignitätsrisikos bzw. des Fortschreitens der Erkrankung.

4.3.5 Expression von Epidermal growth factor receptor

Physiologischerweise ist EGFR mitverantwortlich für die Kontrolle von Zellwachstum, Zelladhäsion und Apoptose [123] und wird von vielen epithelialen Malignomen exprimiert [96, 116].

Bezüglich der immunhistochemischen Expression fanden sich folgende Ergebnisse: 55,6% (n=10) der Proben zeigten positive Reaktion mit dem Antikörper gegen EGFR (Cut-Off >0%). Eine prognostische Bedeutung war in der hier durchgeführten Studie nicht offensichtlich zu erkennen. Gleichwelcher Cut-Off

auch verwendet wurde, es konnten keinerlei signifikante Ergebnisse erzielt werden (Tabelle 11, Kapitel 3.4.4.2). Tendenziell erscheint die Expression von EGFR im Allgemeinen eher als protektiver Faktor. Dies war jedoch nicht signifikant zu zeigen.

Publikationen zur Expression von EGFR in Gastrointestinalen Stromatumoren sind rar. 1999 berichteten Cai et al. von einer Expression von HER1 in GIST [8]. Sie fanden dabei Raten von 33% Positivität mit vorwiegend zytoplasmatischer Anfärbung. Eine Korrelation zwischen Expression und Tumorgroße bzw. Proliferationsrate, die nachgewiesenermaßen wichtige Prädiktoren für das klinische Outcome darstellen, konnte dabei nicht gefunden werden: „*There was no correlation between HER-1 expression and the tumour size or proliferative rate.*“ [8].

Lopes et al. fanden eine immunhistochemische Überexpression von EGFR in 96% der Fälle, konnten dies jedoch in einer zusätzliche durchgeführten Fluoreszenz in situ Hybridisierung auf genetischer Ebene nicht nachvollziehen: „*These results show that there is no correlation between epidermal growth factor receptor gene amplification by fluorescence in situ hybridization.*“ [56]. Untersuchungen zum Outcome der Patienten sind dieser Arbeit jedoch nicht zu entnehmen.

Da *in vitro* Studien in der Vergangenheit jedoch zeigten, dass eine Suppression von EGFR zum Wachstumsstillstand von Tumorzellen andere Neoplasien führte [22, 88, 106], erscheint der hier angedeutete protektive Effekt der Expression von EGFR umso fragwürdiger.

Da die Arbeitsgruppe von Cai [8] ihre Studie lediglich an n=15 GIST durchführte und in der hier geführten Untersuchungen ein ähnlich kleines (n=18) und zusätzlich stark vorselektiertes Kollektiv untersucht wurde, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend beurteilt werden, ob nicht doch eine prognostische Bedeutung der Expression von EGFR existiert. Die Klärung dieser Frage bleibt weiteren Untersuchungen an größeren Fallzahlen vorbehalten.

4.3.6 Expression von P53

Eine Überexpression von P53 konnte bereits in der Vergangenheit in vielen Tumoren des Menschen beobachtet werden. So existieren auch für GIST Studien, die die immunhistochemische Expression von P53 untersuchen und in Korrelationen zum klinischen Outcome setzten.

In der hier durchgeführten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass solche Patienten mit Tumoren, die Reaktionen mit dem Antikörper gegen P53 aufwiesen (Cut-Off >0%), signifikant häufiger bzw. früher krankheitsbedingt verstarben ($p=0,050$, Log-Rank-Test). Der durchgeführte Log-Rank-Test bezüglich krankheitsfreien Überlebens verfehlte nur knapp das Signifikanzniveau ($p=0,068$, Log-Rank-Test). Auch in der Kreuztabelle zeigten sich signifikante Ergebnisse. Bezüglich tumorbedingtem Tod ergab sich im exakten Test nach Fisher ein Wert von $p=0,029$, bezüglich dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen ein Wert von $p=0,043$. Dies spiegelte sich auch in einer erhöhten Odds Ratio wieder (OR=8,6 [1,1; 69,1] (tumorbedingter Tod), OR=3,5 [1,1; 11,5] (Rezidive/Metastasen)).

Bei verändertem Cut-Off (>10% positive Tumorzellen) verfehlte die Korrelation von Positivität für P53 mit tumorbedingtem Tod in der Kreuztabelle das Signifikanzniveau ($p=0,351$, χ^2 -Test) deutlich. Die Korrelation mit dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen betreffend, wurde Signifikanzniveau hingegen erreicht ($p=0,028$, χ^2 -Test). In der Betrachtung des krankheitsspezifischen und krankheitsfreien Überlebens konnte kein bzw. nur ein knapp nicht signifikanter Unterschied erkannt werden ($p=0,451$ bzw. $p=0,050$, Log-Rank-Test).

In der Zusammenschau der Literatur lässt sich erkennen, dass die Mehrzahl der publizierten Studien einen negativ prognostischen Wert der Expression von P53 belegt. Während Cunningham et al. 2001 an 55 untersuchten Fällen [14], Lopes et al. [55] bei 33 Fällen sowie Wong et al. [118] keinen Zusammenhang zwischen immunhistochemischer Expression von P53 und dem Survival nachweisen und Noguchi et al. [74] gar keinerlei immunhistochemischer Nachweis von P53 in 20 Fällen führen konnte, gelang dies einer ganzen Reihe anderer Autoren. So fanden Feakins et al. [25] bei 105 Fällen, dass die Expression von P53 zum einen mit der

Risikoklassifikation korrelierte, zum anderen mit schlechtem Outcome assoziiert war. Bei GIST des Magens konnte hierbei die Expression sogar als unabhängiger Prädiktor etabliert werden. Auch viele kleinere Studien konnten zeigen, dass die Expression von P53, wenn auch mit unterschiedlichen Cut-Offs bezüglich positiver Tumorzellen, entweder mit hoher Risikoklassifikation assoziiert war und/oder ein Prädiktor für schlechtes Outcome darstellte [1, 10, 30, 59, 61, 94, 108, 113, 119].

Es kann somit abschließend festgestellt werden, dass in dieser Studie der allgemeine immunhistochemische Nachweis von P53, in Übereinstimmung mit der bestehenden Literatur, in der univariaten Überlebenszeitanalyse sowohl bezüglich krankheitsfreiem als auch krankheitsspezifischem Überleben, einen Prädiktor für schlechtes Outcome darstellt. Das Wählen höherer Cut-Off-Werte führt weiterhin nicht zur gewünschten Differenzierung des Patientengutes.

4.3.7 Expression von P16

P16 ist ein den Zellzyklus regulierendes Protein. Über die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins pRb erfolgt eine Arretierung des Zellzyklus in der G₁-Phase [75]. P16 wirkt so antiproliferativ und im weitesten Sinne tumorsuppressiv.

Alterationen im Signalweg Zyklin D–CDK4/6/INK4/Rb/E2F sind in Neoplasien des Menschen in mehr als 80% der Fälle zu finden [77]. Weiterhin zeigte sich der Verlust von P16 in der Vergangenheit für viele andere Tumoren als Prädiktor für schlechtes Outcome [24, 27, 36, 58].

Gemäß der Definition von Positivität nach Schneider-Stock et al. (Cut-Off 20%) [102] waren in dieser Studie n=57 (60%) als negativ, n=38 (40%) als positiv zu werten. Einen Cut-Off von 10% annehmend, fand sich Negativität in n=54 (56,8%) und Positivität in n=41 (43,2%) Fällen. Bei einem Cut-Off von 50% waren n=80 (84,2%) Fälle als negativ und n=15 (15,8%) Fälle als positiv zu werten.

In den sich daran anschließenden Survivalanalysen zeigten sich zwischen P16-Expression oder P16-Verlust zunächst keine signifikanten Unterschiede bezüglich krankheitsfreiem und krankheitsspezifischem Überleben, gleichwelcher Cut-Off auch angewendet wurde (Tabelle 14, Kapitel 3.4.4.4).

In der Untersuchung des Subkollektivs derjenigen Patienten mit Rezidiven oder Metastasen fand sich jedoch ein signifikantes Ergebnis: Nimmt man einen Cut-Off-Wert von 50% positiver Tumorzellen an, kann gezeigt werden, dass solche Patienten mit P16-positiven GIST, signifikant häufiger bzw. früher tumorbedingt verstorben sind. Dabei ist auffällig, dass in diesem Subkollektiv fast alle Patienten der Klassifikation High-Risk nach Fletcher et al. [26] zuzuordnen waren. Obgleich diese Klassifikation eine hohe Sensitivität aufweist, ist - wie in Kapitel 3.4.2.1 dargestellt - der positive Vorhersagewert relativ gering. Daraus ergab sich die Frage, ob auch in dem Subkollektiv der High-Risk Patienten P16 einen prädiktorischen Wert haben würde. Somit wurde auch dieses Subkollektiv getrennt bezüglich DSSP und DFSP untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von P16 (einen Cut-Off von 20% oder 50% annehmend) innerhalb der High-Risk-GIST Patienten solche markierte, welche ein signifikant ungünstigeres Outcome aufwiesen. Diese Patienten starben signifikant häufiger und früher krankheitsbedingt bzw. entwickelten häufiger und früher Rezidive oder Metastasen. Dies konnte, sowohl einen Cut-Off von 20% ($p=0,022$ bzw. $p=0,006$, Log-Rank-Test) oder 50% ($p=0,004$ bzw. $p=0,012$, Log-Rank-Test) positive Tumorzellen annehmend, gezeigt werden.

Ein Vergleich der hier gefundenen Ergebnisse mit der aktuellen Literatur muss sehr differenziert betrachtet werden. In den vergangenen fünf Jahren konnte in mehreren Studien demonstriert werden, dass Alterationen im Gen von P16^{INK4} wie Methylierung der Promotorregion, Punktmutationen im Gen oder der Verlust der Heterozygotie in Tumorzellen Gastrointestinaler Stromatumoren häufig zu finden sind [41, 83, 101]. Dies führe dabei zum Verlust der Proteinexpression des Tumorsuppressorproteins P16 [83, 87, 101]. Mehrere Studien belegen, dass der Verlust der immunhistochemischen Expression von P16 negativ prädiktorischen Wert habe [87, 101, 102]. Gleichzeitig finden sich auch Studien anderer Autoren die diesen Zusammenhang nicht nachvollziehen können [42, 71].

Es ist dabei wichtig zu bemerken, dass bezüglich der zu vergleichenden Ausgangsparameter (Einflussgrößen) zwischen den einzelnen Studien gravierende Unterschiede bestehen, was die Vergleichbarkeit der veröffentlichten Daten in Frage stellt. So wurden verschiedene Klassifikationssysteme zur Bestimmung des Malignitätsrisikos den Auswertungen zugrunde gelegt, teils wurden nur gastrale GIST [41] oder Fallzahlen <40 [31, 41, 83, 87, 93, 101] untersucht. Verschiedene Antikörper und Cut-Offs, reichend von 0% über 20%, 50% und 80%, wurden angenommen, Micro Tissue Array-Studien [42, 102, 105] standen Untersuchungen an Vollgewebsschnitten gegenüber [87, 93, 101], Survivaluntersuchungen wurden teils gar nicht durchgeführt [83], teils wurde die Expression von P16 nur mit der Risikoklassifikation korreliert [93]. In anderen Fällen wurden die genetischen Alterationen mit dem Outcome korreliert, die folgende immunhistochemische Expression von P16 aber nur mit Genalterationen und nicht direkt mit dem Outcome der betroffenen Patienten.

In der vorliegenden Studie wurden alle Survivalanalysen P16 betreffend mit verschiedenen Cut-Off-Werten durchgeführt. Bezüglich der dabei gefundenen Ergebnisse können die Schlussfolgerungen insbesondere von Schneider-Stock et. al (2003 und 2005) [101, 102], die zahlenmäßig mit eine der ersten und größten Untersuchung führte, nicht nachvollzogen werden. Ihre Arbeitsgruppe schlussfolgert, dass der (immunhistochemische) Verlust von P16 (Cut-Off: >20%) ein unabhängiger, verlässlicher Prädiktor für schlechtes Outcome im speziellen für GIST des Magens sei [102]. Bei der Durchführung der Überlebenszeituntersuchungen an unserem Kollektiv konnte diese Position nicht bestätigt werden, weder bezüglich des Gesamtkollektivs noch in der Subgruppe der Patienten mit GIST des Magens. Wie oben aufgeführt, fand sich unabhängig von dem angewendeten Cut-Off-Wert kein signifikanter Unterschied im Outcome von GIST-Patienten im Vergleich von P16-Expression und P16-Verlust (Log-Rank-Test). Hierbei ist jedoch auch zu bemerken, dass die Nachbeobachtungszeit der Studien von Schneider-Stock et al. lediglich 34 [101] bzw. 45 Monate [102] betrug, wohingegen Patienten in unserer Untersuchung wesentlich länger nachbeobachtet wurden. So ergab sich eine mittlere Nachbeobachtungszeit von 53,6 Monaten, in der Gruppe der Überlebenden gar von 60,7 Monaten. Wir gehen davon aus, dass

durch diese Tatsachen von einer höheren Gewichtigkeit unsere Daten ausgegangen werden darf.

Dies findet sich auch in einer erst kürzlich veröffentlichten Micro Tissue Array Studie mit einer Fallzahl n=434 von Steigen et al. [105] bestätigt. Auch hier konnte der in der vorliegenden Studie beobachtete negativ prädiktorische Effekt einer Proteinexpression von P16 gefunden werden: „*In our series, 180 (42%) of the defined GIST cases stained for p16, and these patients had a significantly worse overall survival ($p=0,013$) than patients not expressing p16.*“ [105]. Die uns bestätigenden Daten von Steigen et al. [105] sind überzeugend, jedoch ist zu bemerken, dass im Vergleich zu unserer single-center-Studie, die Studie von Steigen multizentrisch konstruiert wurde (20 Zentren), was die Vergleichbarkeit einschränkt.

In der Zusammenschau aller gewonnenen Erkenntnisse schließe ich mich den Schlussfolgerungen der Arbeitsgruppe von Steigen et al. [105] an, die in ihren durchgeführten Micro Tissue Array Studien zum prognostischen Wert von P16 einen gegenteiligen, negativ prädiktorischen Effekt des Verlustes der Proteinexpression gegenüber Schneider-Stock et. al (2003 und 2005) [101, 102] postulieren. Die hier gefundenen Ergebnisse deuten weiterhin an, dass die Expression von P16 ein Mittel zur weiteren, genaueren Differenzierung des biologischen Verhaltens von GIST der Hochrisikokategorien sein könnte. In der Literatur zu diesem Thema konnte dieser Effekt nicht vorbeschrieben gefunden werden und ist daher hier erstmals erwähnt. Diese Erkenntnisse wurden von unsere Arbeitsgruppe 2008 in Neoplasia publiziert [100].

Weitere Untersuchungen mit standardisierter Methodik an größeren Fallzahlen werden nötig sein, um den prognostischen Wert von P16 in Zukunft abschließend zu klären. Welche Rolle P16 in der Onkogenese von Gastrointestinalen Stromatumoren spielt, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Bis heute ist es trotz vielfältiger Bemühungen noch nicht möglich, das Malignitätspotential von Gastrointestinalen Stromatumoren mit hoher diagnostischer Sensitivität und Spezifität vorauszusagen. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, bestehende Ergebnisse der Literatur bezüglich des immunhistochemischen Profils und dessen Korrelation zum Outcome zu bestätigen oder zu ergänzen.

Insbesondere sollte der prognostisch-prädiktive Wert der Expression von Aktin, CD34 (CD = Cluster of differentiation), MiB-1 (MiB = made in Borstel), P16, P53, EGFR (EGFR = epidermal growth factor receptor) und der Mitoserate untersucht werden. Hierzu wurde ein Kollektiv von 101 Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren, vornehmlich der Universitätsklinik Ulm, untersucht. Aus den Archiven zusammengetragenes, in Paraffin eingebettetes Tumormaterial wurde immunhistochemisch bezüglich P16, P53 und EGFR aufgearbeitet und Daten zu Aktin, CD34, MiB-1 und der Mitoserate retrospektiv ergänzt. In einer eigens dafür selbst entworfenen Datenbank wurden dabei alle Ergebnisse zusammengetragen. Die klinisch erhobenen Daten wurden anschließend in Korrelation zu den gefundenen Proteinexpressionsmustern gesetzt. Hierzu wurden vornehmlich Überlebenszeitanalysen bezüglich krankheitsfreiem oder krankheitsspezifischem Überleben ausgeführt und mit Erkenntnissen aktueller Publikationen verglichen.

Im Vergleich mit aktueller Literatur ergab sich das vorbeschriebene Bild eines Kollektivs von Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren sowohl bezüglich der Geschlechterverteilung, der Erkrankungsalters, der Zellmorphologie, der Verteilung der Risikogruppen, der immunhistochemischen Expression von Aktin, CD34, Desmin, Vimentin und S100, dem klinischen Erscheinungsbild sowie allgemeinem Überleben.

Ein in der Literatur vorbeschriebener prädiktorischer Wert für die Expression von Aktin und dem Expressionsverlust von P16 konnte dabei in dieser Studie nicht nachvollzogen werden. Für P16 ergab sich gar eine gegenteilige Aussage. Die

Expression von P16 war in einigen Subkollektiven signifikant mit schlechterem Outcome der Patienten assoziiert.

Zum Parameter EGFR konnte in dieser Untersuchung keinerlei prognostische Bedeutung gefunden werden.

Bezüglich MiB-1, der Mitoserate und besonders P53 ergaben sich dagegen eindeutige Tendenzen. Eine Proliferationsrate von $\geq 10\%$, eine Mitoserate von ≥ 5 Mitosen auf 50 High-Power-Fields, eine Größe von $\geq 5\text{cm}$ und die immunhistochemische Expression von P53 zeigten sich dabei als starke prädiktorische Parameter für verkürztes krankheitsfreies und krankheitsspezifisches Überleben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Risikoklassifikation nach Fletcher et al. nur einen geringen positiven Vorhersagewert sowohl für tumorbedingten Tod als auch für das Auftreten von Rezidiven oder Metastasen aufwies. Es gelang jedoch, unter Zuhilfenahme der immunhistochemischen Expression von P16 das Kollektiv der High-Risk-GIST (GIST = Gastrointestinale Stromatumoren) nach Fletcher et al. weiter zu unterteilen. Signifikant konnte gezeigt werden, dass solche Patienten mit High-Risk-Tumoren und einer Expression von P16 bezüglich einem angenommenen Cut-Off von 20% oder 50% häufiger bzw. früher tumorbedingt verstarben oder Rezidive oder Metastasen entwickelten als das verbleibende Kollektiv.

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass bestehende Risikoklassifikationssysteme und weitere in der Vergangenheit untersuchte Parameter zum klinischen Outcome für sich alleine genommen noch keine ausreichenden positiven Vorhersagewerte besitzen. Möglicherweise könnte in der Zukunft eine Kombination von bestehenden Risikoklassifikationssystemen und immunhistochemischen Untersuchungen hier Abhilfe schaffen. Besondere Bedeutung könnte dabei der Klassifikation nach Fletcher in Kombination mit der immunhistochemischen Expression von P16 zukommen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Al-Bozom IA: p53 expression in gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int* 51: 519-523 (2001)
- [2] Andersson J, Sihto H, Meis-Kindblom JM, Joensuu H, Nupponen N, Kindblom L-G: NF1-associated gastrointestinal stromal tumors have unique clinical, phenotypic, and genotypic characteristics. *Am J Surg Pathol* 29: 1170-1176 (2005)
- [3] Blay P, Astudillo A, Buesa JM, Campo E, Abad M, García-García J, Miquel R, Marco V, Sierra M, Losa R, Lacave A, Braña A, Balbín M, Freije JMP: Protein kinase C theta is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias. *Clin Cancer Res* 10: 4089-4095 (2004)
- [4] Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, Lydon NB: Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 139-145 (2000)
- [5] Bullock TE, Wen B, Marley SB, Gordon MY: Potential of CD34 in the regulation of symmetrical and asymmetrical divisions by hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 25: 844-851 (2007)
- [6] Burger H, den Bakker MA, Kros JM, van Tol H, de Bruin AM, Oosterhuis W, van den Ingh HFGM, van der Harst E, de Schipper HP, Wiemer EAC, Nooter K: Activating mutations in c-KIT and PDGFRalpha are exclusively found in gastrointestinal stromal tumors and not in other tumors overexpressing these imatinib mesylate target genes. *Cancer Biol Ther* 4: 1270-1274 (2005)
- [7] Bussolati G: Of GISTs and EGISTs, ICCs and ICs. *Virchows Arch* 447: 907-908 (2005)
- [8] Cai YC, Jiang Z, Vittimberga F, Xu X, Savas L, Woda B, Callery M, Banner B: Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in gastrointestinal stromal tumours. *Virchows Arch* 435: 112-115 (1999)
- [9] Carrillo R, Candia A, Rodriguez-Peralto JL, Caz V: Prognostic significance of DNA ploidy and proliferative index (MIB-1 index) in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 28: 160-165 (1997)
- [10] Chang MS, Choe G, Kim WH, Kim YI: Small intestinal stromal tumors: a clinicopathologic study of 31 tumors. *Pathol Int* 48: 341-347 (1998)
- [11] Ciontea SM, Radu E, Regalia T, Ceafalan L, Cretoiu D, Gherghiceanu M, Braga RI, Malincenco M, Zagrean L, Hinescu ME, Popescu LM: C-kit immunopositive interstitial cells (Cajal-type) in human myometrium. *J Cell Mol Med* 9: 407-420 (2005)
- [12] Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC: Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 22: 3813-3825 (2004)
- [13] Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, Shiraga S, Bainbridge T, Morich J, Heinrich MC: PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* 23: 5357-5364 (2005)
- [14] Cunningham RE, Abbondanzo SL, Chu WS, Emory TS, Sobin LH, O'Leary TJ: Apoptosis, bcl-2 expression, and p53 expression in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9: 19-23 (2001)
- [15] Daum O, Klecka J, Ferda J, Treska V, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Michal M: Gastrointestinal stromal tumor of the pancreas: case report with documentation of KIT gene mutation. *Virchows Arch* 446: 470-472 (2005)

- [16] Diamond T, Danton MH, Parks TG: Smooth muscle tumours of the alimentary tract. *Ann R Coll Surg Engl* 72: 316-320 (1990)
- [17] Druker BJ, Lydon NB: Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 105: 3-7 (2000)
- [18] Duensing A, Joseph NE, Medeiros F, Smith F, Hornick JL, Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Fletcher CDM, Fletcher JA: Protein Kinase C theta (PKCtheta) expression and constitutive activation in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Cancer Res* 64: 5127-5131 (2004)
- [19] Duquette RA, Shmygol A, Vaillant C, Mobasher A, Pope M, Burdyga T, Wray S: Vimentin-positive, c-kit-negative interstitial cells in human and rat uterus: a role in pacemaking? *Biol Reprod* 72: 276-283 (2005)
- [20] Eisenberg BL, Judson I: Surgery and imatinib in the management of GIST: emerging approaches to adjuvant and neoadjuvant therapy. *Ann Surg Oncol* 11: 465-475 (2004)
- [21] Emory TS, GA D, Sobin LH, O'Leary TJ: Ki67 (MIB-1) immunohistochemistry as a prognostic factor in gastrointestinal smooth muscle tumors. *J Surg Pathol* 2: 239-242 (1997)
- [22] Ennis B, Valverius E, Bates S, Lippman M, Bellot F, Kris R, Schlessinger J, Masui H, Goldenberg A, Mendelsohn J, Dickson R: Anti-epidermal growth factor receptor antibodies inhibit the autocrine-stimulated growth of MDA-468 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 3: 1830-1838 (1989)
- [23] Ernst SI, Hubbs AE, Przygodzki RM, Emory TS, Sobin LH, O'Leary TJ: KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab Invest* 78: 1633-1636 (1998)
- [24] Esteller M, González S, Risques RA, Marcuello E, Mangués R, Germà JR, Herman JG, Capellà G, Peinado MA: K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 19: 299-304 (2001)
- [25] Feakins RM: The expression of p53 and bcl-2 in gastrointestinal stromal tumours is associated with anatomical site, and p53 expression is associated with grade and clinical outcome. *Histopathology* 46: 270-279 (2005)
- [26] Fletcher CDM, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW: Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 33: 459-465 (2002)
- [27] Gessner C, Liebers U, Kuhn H, Stiehl P, Witt C, Schauer J, Wolff G: BAX and p16INK4A are independent positive prognostic markers for advanced tumour stage of nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 19: 134-140 (2002)
- [28] Gherghiceanu M, Popescu LM: Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in human resting mammary gland stroma. Transmission electron microscope (TEM) identification. *J Cell Mol Med* 9: 893-910 (2005)
- [29] Goldstein NS, Armin M: Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 92: 1331-1346 (2001)
- [30] Gumurdulu D, Erdogan S, Kayaselcuk F, Seydaoglu G, Parsak C-K, Demircan O, Tuncer I: Expression of COX-2, PCNA, Ki-67 and p53 in gastrointestinal stromal tumors and its relationship with histopathological parameters. *World J Gastroenterol* 13: 426-431 (2007)

- [31] Haller F, Gunawan B, von Heydebreck A, Schwager S, Schulten H-J, Wolf-Salgó J, Langer C, Ramadori G, Sültmann H, Füzesi L: Prognostic role of E2F1 and members of the CDKN2A network in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 11: 6589-6597 (2005)
- [32] Harhun M, Gordienko D, Kryshchal D, Pucovský V, Bolton T: Role of intracellular stores in the regulation of rhythmic $[Ca^{2+}]_i$ changes in interstitial cells of Cajal from rabbit portal vein. *Cell Calcium* 40: 287-298 (2006)
- [33] Harhun MI, Pucovský V, Povstyan OV, Gordienko DV, Bolton TB: Interstitial cells in the vasculature. *J Cell Mol Med* 9: 232-243 (2005)
- [34] Hasegawa T, Matsuno Y, Shimoda T, Hirohashi S: Gastrointestinal stromal tumor: consistent CD117 immunostaining for diagnosis, and prognostic classification based on tumor size and MIB-1 grade. *Hum Pathol* 33: 669-676 (2002)
- [35] Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen C-J, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CDM, Fletcher JA: PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299: 708-710 (2003)
- [36] Hilton DA, Penney M, Evans B, Sanders H, Love S: Evaluation of molecular markers in low-grade diffuse astrocytomas: loss of p16 and retinoblastoma protein expression is associated with short survival. *Am J Surg Pathol* 26: 472-478 (2002)
- [37] Hinescu ME, Popescu LM: Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in human atrial myocardium. *J Cell Mol Med* 9: 972-975 (2005)
- [38] Hinescu ME, Gherghiceanu M, Mandache E, Ciontea SM, Popescu LM: Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization. *J Cell Mol Med* 10: 243-257 (2006)
- [39] Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Tunio GM, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y: Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279: 577-580 (1998)
- [40] Hohenberger P, Reichardt P, Stroszczyński C, U S, KD H: Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) - Tumorentität und Therapie mit Imatinib mesylat. *Dtsch Arztebl* 100 10: 1612-1618 (2003)
- [41] House MG, Guo M, Efron DT, Lillemoe KD, Cameron JL, Syphard JE, Hooker CM, Abraham SC, Montgomery EA, Herman JG, Brock MV: Tumor suppressor gene hypermethylation as a predictor of gastric stromal tumor behavior. *J Gastrointest Surg* 7: 1004-1014; discussion 1014 (2003)
- [42] Huang H-Y, Huang W-W, Lin C-N, Eng H-L, Li S-H, Li C-F, Lu D, Yu S-C, Hsiung C-Y: 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 (2006)
- [43] Huizinga JD, Faussone-Pellegrini M-S: About the presence of interstitial cells of Cajal outside the musculature of the gastrointestinal tract. *J Cell Mol Med* 9: 468-473 (2005)
- [44] Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, Silberman S, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B, Demetri GD: Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 344: 1052-1056 (2001)
- [45] Joensuu H: Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann Oncol* 17 Suppl 10: x280-x286 (2006)

- [46] Kasper B, Fruehauf S, Schiedlmeier B, Buchdunger E, Ho AD, Zeller WJ: Favorable therapeutic index of a p210(BCR-ABL)-specific tyrosine kinase inhibitor; activity on lineage-committed and primitive chronic myelogenous leukemia progenitors. *Cancer Chemother Pharmacol* 44: 433-438 (1999)
- [47] Kinoshita K, Hirota S, Isozaki K, Ohashi A, Nishida T, Kitamura Y, Shinomura Y, Matsuzawa Y: Absence of c-kit gene mutations in gastrointestinal stromal tumours from neurofibromatosis type 1 patients. *J Pathol* 202: 80-85 (2004)
- [48] Kitamura Y, Hirota S: Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci* 61: 2924-2931 (2004)
- [49] Lang RJ, Klemm MF: Interstitial cell of Cajal-like cells in the upper urinary tract. *J Cell Mol Med* 9: 543-556 (2005)
- [50] Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M: 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 (1999)
- [51] Lasota J, Carlson JA, Miettinen M: Spindle cell tumor of urinary bladder serosa with phenotypic and genotypic features of gastrointestinal stromal tumor. *Arch Pathol Lab Med* 124: 894-897 (2000)
- [52] Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, Miettinen M: A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest* 84: 874-883 (2004)
- [53] Lasota J, Stachura J, Miettinen M: GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumors with epithelioid morphology. *Lab Invest* 86: 94-100 (2006)
- [54] Lerma E, Oliva E, Tugués D, Prat J: Stromal tumours of the gastrointestinal tract: a clinicopathological and ploidy analysis of 33 cases. *Virchows Arch* 424: 19-24 (1994)
- [55] Lopes JM, Silva P, Seixas M, Cirnes L, Seruca R: Microsatellite instability is not associated with degree of malignancy and p53 expression of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 33: 579-581 (1998)
- [56] Lopes LF, Bacchi CE: EGFR and gastrointestinal stromal tumor: an immunohistochemical and FISH study of 82 cases. *Mod Pathol* 20: 990-994 (2007)
- [57] Maertens O, Prenen H, Debiec-Rychter M, Wozniak A, Sciort R, Pauwels P, De Wever I, Vermeesch J, de Raedt T, De Paepe A, Speleman F, van Oosterom A, Messiaen L, Legius E: Molecular pathogenesis of multiple gastrointestinal stromal tumors in NF1 patients. *Hum Mol Genet* 15: 1015-1023 (2006)
- [58] Mäkitie AA, MacMillan C, Ho J, Shi W, Lee A, O'Sullivan B, Payne D, Pintilie M, Cummings B, Waldron J, Warde P, Irish J, Brown D, Gilbert R, Gullane P, Liu F-F, Kamel-Reid S: Loss of p16 expression has prognostic significance in human nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 9: 2177-2184 (2003)
- [59] Martínez-Consuegra N, Baquera-Heredia J, de León-Bojorge B, Padilla-Rodríguez A, Hidalgo CO: [Expression of p53 and BCL-2 as prognostic markers and for anatomical location in gastrointestinal stromal tumors (GIST). Clinico-pathological and immunohistochemistry study of 19 cases]. *Rev Gastroenterol Mex* 71: 269-278 (2006)
- [60] Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL, Oliveira AM, Heinrich MC, Fletcher JA, Fletcher CDM: KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 28: 889-894 (2004)

- [61] Medina-Franco H, la Medina AR-D, Cortes-Gonzalez R, Baquera J, Angeles-Angeles A, Urist MM, Eltoum IE, Heslin MJ: Expression of p53 and proliferation index as prognostic factors in gastrointestinal sarcomas. *Ann Surg Oncol* 10: 190-195 (2003)
- [62] Miettinen M, Monihan JM, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Carr NJ, Emory TS, Sobin LH: 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 (1999)
- [63] Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Lasota J: Calponin and h-caldesmon in soft tissue tumors: consistent h-caldesmon immunoreactivity in gastrointestinal stromal tumors indicates traits of smooth muscle differentiation. *Mod Pathol* 12: 756-762 (1999)
- [64] Miettinen M, Lasota J: Gastrointestinal stromal tumors-definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 438: 1-12 (2001)
- [65] Miettinen M, Kopczynski J, Makhlof HR, Sarlomo-Rikala M, Gyorffy H, Burke A, Sobin LH, Lasota J: Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases. *Am J Surg Pathol* 27: 625-641 (2003)
- [66] Miettinen M, Lasota J: KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13: 205-220 (2005)
- [67] Miettinen M, Sobin LH, Lasota J: 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 (2005)
- [68] Miettinen M, Fetsch JF, Sobin LH, Lasota J: Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. *Am J Surg Pathol* 30: 90-96 (2006)
- [69] Miettinen M, Lasota J: Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 130: 1466-1478 (2006)
- [70] Miettinen M, Makhlof H, Sobin LH, Lasota J: 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 (2006)
- [71] Nakamura N, Yamamoto H, Yao T, Oda Y, Nishiyama K-i, Imamura M, Yamada T, Nawata H, Tsuneyoshi M: 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 (2005)
- [72] Nilsson B, Bümbling P, Meis-Kindblom JM, Odén A, Dortok A, Gustavsson B, Sablinska K, Kindblom L-G: 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 (2005)
- [73] Nishida T, Hirota S: Biological and clinical review of stromal tumors in the gastrointestinal tract. *Histol Histopathol* 15: 1293-1301 (2000)
- [74] Noguchi T, Sato T, Takeno S, Uchida Y, Kashima K, Yokoyama S, Müller W: Biological analysis of gastrointestinal stromal tumors. *Oncol Rep* 9: 1277-1282 (2002)
- [75] Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett WP, Forrester K, Gerwin B, Serrano M, Beach DH: Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11045-11049 (1994)

- [76] Orosz Z, Tornóczy T, Sági Z: Gastrointestinal stromal tumors: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 136 cases. *Pathol Oncol Res* 11: 11-21 (2005)
- [77] Ortega S, Malumbres M, Barbacid M: Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1602: 73-87 (2002)
- [78] Ortiz-Hidalgo C, de Leon Bojorge B, Albores-Saavedra J: Stromal tumor of the gallbladder with phenotype of interstitial cells of Cajal: a previously unrecognized neoplasm. *Am J Surg Pathol* 24: 1420-1423 (2000)
- [79] Ozcan A, Karslioglu Y, Kurt B, Onguru O, Gunhan O: Quantitative evaluation of immunohistochemical staining in gastrointestinal stromal tumors. *Anal Quant Cytol Histol* 29: 159-165 (2007)
- [80] Park JK, Choi SH, Lee S, Min KO, Yun SS, Jeon HM: Malignant gastrointestinal stromal tumor of the gallbladder. *J Korean Med Sci* 19: 763-767 (2004)
- [81] Pauser U, da Silva MTS, Placke J, Klimstra DS, Klöppel G: Cellular hamartoma resembling gastrointestinal stromal tumor: a solid tumor of the pancreas expressing c-kit (CD117). *Mod Pathol* 18: 1211-1216 (2005)
- [82] Pawson T: Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer* 38 Suppl 5: S3-10 (2002)
- [83] Perrone F, Tamborini E, Dagrada GP, Colombo F, Bonadiman L, Albertini V, Lagonigro MS, Gabanti E, Caramuta S, Greco A, Torre GD, Gronchi A, Pierotti MA, Pilotti S: 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 (2005)
- [84] Popescu LM, Hinescu ME, Ionescu N, Ciontea SM, Cretoiu D, Ardelean C: Interstitial cells of Cajal in pancreas. *J Cell Mol Med* 9: 169-190 (2005)
- [85] Popescu LM, Gherghiceanu M, Hinescu ME, Cretoiu D, Ceafalan L, Regalia T, Popescu AC, Ardeleanu C, Mandache E: Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). *J Cell Mol Med* 10: 429-458 (2006)
- [86] Radu E, Regalia T, Ceafalan L, Andrei F, Cretoiu D, Popescu LM: Cajal-type cells from human mammary gland stroma: phenotype characteristics in cell culture. *J Cell Mol Med* 9: 748-752 (2005)
- [87] Ricci R, Arena V, Castri F, Martini M, Maggiano N, Murazio M, Pacelli F, Potenza AE, Vecchio FM, Larocca LM: Role of p16/INK4a in gastrointestinal stromal tumor progression. *Am J Clin Pathol* 122: 35-43 (2004)
- [88] Rodeck U, Noel W, Murthy U, Herlyn M: Monoclonal antibody 425 inhibits growth stimulation of carcinoma cells by exogenous EGF and tumour-derived EGF/TGF-alpha. *J Cell Biochem* 4: 69-79 (1990)
- [89] Rossi G, Valli R, Bertolini F, Marchioni A, Cavazza A, Mucciarini C, Migaldi M, Federico M, Trentini GP, Sgambato A: PDGFR expression in differential diagnosis between KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and other primary soft-tissue tumours of the gastrointestinal tract. *Histopathology* 46: 522-531 (2005)
- [90] Rubin BP, Antonescu CR, Scott-Browne JP, Comstock ML, Gu Y, Tanas MR, Ware CB, Woodell J: A knock-in mouse model of gastrointestinal stromal tumor harboring kit K641E. *Cancer Res* 65: 6631-6639 (2005)
- [91] Rubin BP, Heinrich MC, Corless CL: Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet* 369: 1731-1741 (2007)

- [92] Rudolph P, Gloeckner K, Parwaresch R, Harms D, Schmidt D: Immunophenotype, proliferation, DNA ploidy, and biological behavior of gastrointestinal stromal tumors: a multivariate clinicopathologic study. *Hum Pathol* 29: 791-800 (1998)
- [93] Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E: Loss of heterozygosity of chromosome 9p and loss of p16INK4A expression are associated with malignant gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 17: 1364-1371 (2004)
- [94] Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E: Altered expression of cell cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumors: markers with potential prognostic implications. *Hum Pathol* 37: 648-655 (2006)
- [95] Sakurai S, Fukasawa T, Chong JM, Tanaka A, Fukayama M: Embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb/MHC-B) in gastrointestinal stromal tumor and interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 154: 23-28 (1999)
- [96] Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19: 183-232 (1995)
- [97] Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M: CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 11: 728-734 (1998)
- [98] Sarlomo-Rikala M, Tsujimura T, Lendahl U, Miettinen M: Patterns of nestin and other intermediate filament expression distinguish between gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and schwannomas. *APMIS* 110: 499-507 (2002)
- [99] Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J: Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289: 1938-1942 (2000)
- [100] Schmieder M, Wolf S, Danner B, Stoehr S, Juchems M, Wuerl P, Henne-Bruns D, Knippschild U, Hasel C, Kramer K: p16 expression differentiates high-risk GIST and predicts poor outcome. *Neoplasia* 10: 1154-1162 (2008)
- [101] Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Miettinen M, Peters B, Pross M, Roessner A, Günther T: High prognostic value of p16INK4 alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 21: 1688-1697 (2003)
- [102] Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Peters B, Corless CL, Ruettemeier P, Terracciano L, Pross M, Insabato L, Vizio DD, Ilesalnieks I, Dirnhofer S, Hartmann A, Heinrich M, Miettinen M, Roessner A, Tornillo L: Loss of p16 protein defines high-risk patients with gastrointestinal stromal tumors: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res* 11: 638-645 (2005)
- [103] Sergeant GP, Thornbury KD, McHale NG, Hollywood MA: Interstitial cells of Cajal in the urethra. *J Cell Mol Med* 10: 280-291 (2006)
- [104] Sommer G, Agosti V, Ehlers I, Rossi F, Corbacioglu S, Farkas J, Moore M, Manova K, Antonescu CR, Besmer P: Gastrointestinal stromal tumors in a mouse model by targeted mutation of the Kit receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6706-6711 (2003)
- [105] Steigen SE, Bjerkehagen B, Haugland HK, Nordrum IS, Løberg EM, Isaksen V, Eide TJ, Nielsen TO: Diagnostic and prognostic markers for gastrointestinal stromal tumors in Norway. *Mod Pathol* 21: 46-53 (2008)
- [106] Szepeshazi K, Schally A, Halmos G, Lamharzi N, Groot K, Horvath J: A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10913-10918 (1997)

- [107] Takazawa Y, Sakurai S, Sakuma Y, Ikeda T, Yamaguchi J, Hashizume Y, Yokoyama S, Motegi A, Fukayama M: Gastrointestinal stromal tumors of neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease). *Am J Surg Pathol* 29: 755-763 (2005)
- [108] Takeyama H, Funahashi H, Sawai H, Takahashi H, Yamamoto M, Akamo Y, Manabe T: Expression of alpha6 integrin subunit is associated with malignancy in gastric gastrointestinal stromal tumors. *Med Sci Monit* 13: 51-56 (2007)
- [109] Tran T, Davila JA, El-Serag HB: The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 1,458 cases from 1992 to 2000. *Am J Gastroenterol* 100: 162-168 (2005)
- [110] Tryggvason G, Gíslason HG, Magnússon MK, Jónasson JG: 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 (2005)
- [111] van der Aa F, Roskams T, Blyweert W, Ost D, Bogaert G, Ridder DD: Identification of kit positive cells in the human urinary tract. *J Urol* 171: 2492-2496 (2004)
- [112] van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, di Paola ED, Dimitrijevic S, Martens M, Webb A, Sciot R, Glabbeke MV, Silberman S, Nielsen OS, for Research EO, of Cancer Soft Tissue T, Group BS: Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 358: 1421-1423 (2001)
- [113] Wang X, Mori I, Tang W, Utsunomiya H, Nakamura M, Nakamura Y, Zhou G, Kennichi K: Helpful parameter for malignant potential of gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Jpn J Clin Oncol* 32: 347-351 (2002)
- [114] Wardelmann E, Hrychuk A, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Goldstein J, Hohenberger P, Losen I, Manegold C, Büttner R, Pietsch T: 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 (2004)
- [115] Wasag B, Debiec-Rychter M, Pauwels P, Stul M, Vranckx H, Oosterom AV, Hagemeijer A, Sciot R: Differential expression of KIT/PDGFR mutant isoforms in epithelioid and mixed variants of gastrointestinal stromal tumors depends predominantly on the tumor site. *Mod Pathol* 17: 889-894 (2004)
- [116] Werner MH, Nanney LB, Stoscheck CM, King LE: Localization of immunoreactive epidermal growth factor receptors in human nervous system. *J Histochem Cytochem* 36: 81-86 (1988)
- [117] West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zhu S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, Goldblum JR, Brown PO, Heinrich MC, van de Rijn M: The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol* 165: 107-113 (2004)
- [118] Wong NACS, Young R, Malcomson RDG, Nayar AG, Jamieson LA, Save VE, Carey FA, Brewster DH, Han C, Al-Nafussi A: Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology* 43: 118-126 (2003)
- [119] Yalcinkaya U, Yerci O, Koc EU: Significance of p53 expression in gastrointestinal stromal tumors. *Hepatogastroenterology* 54: 140-143 (2007)
- [120] Yamamoto H, Oda Y, Kawaguchi K-i, Nakamura N, Takahira T, Tamiya S, Saito T, Oshiro Y, Ohta M, Yao T, Tsuneyoshi M: c-kit and PDGFRA mutations in extragastrointestinal stromal tumor (gastrointestinal stromal tumor of the soft tissue). *Am J Surg Pathol* 28: 479-488 (2004)

- [121] Yamaura K, Kato K, Miyazawa M, Haba Y, Muramatsu A, Miyata K, Koide N: Stromal tumor of the pancreas with expression of c-kit protein: report of a case. *J Gastroenterol Hepatol* 19: 467-470 (2004)
- [122] Yantiss RK, Rosenberg AE, Sarran L, Besmer P, Antonescu CR: Multiple gastrointestinal stromal tumors in type I neurofibromatosis: a pathologic and molecular study. *Mod Pathol* 18: 475-484 (2005)
- [123] Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-137 (2001)

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst allen medizinisch technischen Assistentinnen der Abteilung für Pathologie der Universität Ulm, allen voran Frau Beate Rimmel, für die Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, sowie Frau Dr. Cornelia Hasel für die umfangreiche und zeitaufwändige Hilfe bei deren Befundung. Weiterhin sei gedankt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Knippschild, für die Übernahme der Betreuung und die freundliche Durchsicht dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt schließlich meinen Freunden Herrn Sebastian Wolf, für die wichtige und fruchtbare Zusammenarbeit in der Sammlung der klinischen Daten und meinem Betreuer, Herrn Dr. Klaus Kramer, der jederzeit für meine Fragen zur Verfügung stand und meine Tätigkeit in vielerlei Hinsicht unterstützte. Ohne diese beiden wäre diese Aufgabe nicht zu bewältigen gewesen.

Vielen Dank für alles!