

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Hoher prognostischer Wert der hTERT-Expression in Gastrointestinalen  
Stromatumoren

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Anja Schaeper  
aus Frankfurt/Oder  
Magdeburg 2008

## Dokumentationsblatt

### Bibliographische Beschreibung:

Schaeper, Anja

Hoher prognostischer Wert der hTERT-Expression in Gastrointestinalen Stromatumoren. - 2008. - 55 Bl. : 28 Abb., 9 Tab., 2 Anl.

### *Kurzreferat*

Es ist oft schwierig, das prognostische Verhalten von GIST vorauszusagen und die Patienten einer zukünftigen adjuvanten Imatinib-Therapie zuzuordnen. Es gab Hinweise, dass in vielen Tumoren eine erhöhte Telomeraseaktivität und hTERT-Expression mit einem hohen malignen Potenzial verbunden sind. Um den prognostischen Wert der hTERT-Immunhistochemie zu testen, wurden 239 primäre GIST, welche als Proben auf Microarrays gesammelt wurden, untersucht. In dieser Arbeit konnte eine hTERT-Überexpression in 36,4% der GIST (über 20% der Zellkerne färbten sich an) nachgewiesen werden. Eine Korrelation zwischen hTERT-Expression und histologischem Typ konnte eruiert werden ( $p=0,004$ ). Die Überlebensanalyse wurde anhand von 115 Fällen in einem Beobachtungszeitraum von 2-192 Monaten, Median 48 Monate, untersucht. Patienten mit hTERT-positivem Tumor zeigten eine signifikant kürzere Überlebenszeit ( $p<0,001$ ) mit einem 1,9-fach höheren Risiko zu versterben. Die hTERT-Überexpression charakterisiert drei Subgruppen (keine Metastasen ( $p=0,0002$ ), epitheloide Morphologie ( $p=0,012$ ) und Lokalisation Magen ( $p=0,0008$ ) mit einer schlechteren Prognose. In der Konfigurationsfrequenzanalyse konnte ein Typ (hTERT-Überexpression/intermediäre/hohe Risikogruppe/Versterben mit  $p<0,001$ ) und ein Antityp (keine hTERT-Überexpression/keine Metastasen/Versterben mit  $p=0,009$ ) identifiziert werden. Es kann festgestellt werden, dass die hTERT-Überexpression in GIST ein hohes prognostisches Potenzial hat.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. GIST: Definition, Epidemiologie und Ätiologie .....	1
1.2. Symptome, Diagnostik und Therapie .....	3
1.3. Prognose von GIST .....	6
1.4. Telomerase: Aufbau und Funktion .....	8
1.5. Telomeraseaktivität in normalen Zellen und Tumorzellen, speziell GIST ...	9
2. Gewebeproben, Material und Methoden .....	11
2.1. Gewebeproben.....	11
2.2. Immunhistochemische Färbung .....	11
2.3. Auswertung mittels Mikroskop .....	13
2.4. Statistische Analyse .....	15
3. Ergebnisse.....	17
3.1. Patientengut.....	17
3.2. Expression von hTERT in 239 GIST .....	21
3.3. Chi-Quadrat-Test .....	21
3.3.1. Korrelation der klassischen Parameter .....	21
3.3.2. Korrelation der hTERT-Expression mit den klassischen Parametern .	22
3.4. Überlebensanalyse .....	23
3.4.1. Klassische Parameter in Abhängigkeit von der Überlebenszeit .....	23
3.4.2. hTERT-Expression für Überleben .....	26
3.4.3. hTERT-Expression für Überleben in Subgruppen .....	27
3.5. Cox-Regressionsanalyse .....	31
3.5.1. Univariate Analyse .....	31
3.5.2. Multivariate Analyse .....	31
3.6. Konfigurationsfrequenzanalyse .....	32
4. Diskussion .....	34
4.1. hTERT – ein prognostischer Marker für GIST .....	34
4.1.1. hTERT-Überexpression bedingt schlechtere Prognose in GIST .....	34
4.1.2. hTERT-Expression definiert Hochrisikogruppen .....	35
4.1.3. Korrelation: hTERT-Expression mit klinisch-pathologischen Faktoren	36
4.1.4. Cox-Regressionanalyse .....	37
4.2. hTERT als aussichtsreicher Marker .....	38
4.2.1. Anwendung mittels Microarrays und Immunhistochemie .....	38
4.2.2. Telomeraseaktivität in Tumorstadien und Resektionsgrenzen .....	39
4.2.3. Telomeraseaktivität in Körperflüssigkeiten .....	40
4.3. hTERT als mögliches Therapieziel .....	42
4.3.1. Immunotherapie – hTERT als Oberflächenantigen.....	42
4.3.2. Chemotherapie – Telomerase als Target .....	43
5. Zusammenfassung .....	45
6. Abbildungen .....	46
7. Tabellennachweis .....	48
8. Literaturverzeichnis.....	49

## Abkürzungen

AgNOR	argyrophile-Nucleolus-organisierenden-Regionen
ALT	alternativer Verlängerungsprozess der Telomere
BCL-2	Protein für die Regulation des programmierten Zelltods
CD117	Typ-III-Tyrosinkinase-Rezeptor, c-KIT
CD34	membranständiges Protein der Stammzellen
CSF-1R	colony-stimulating-factor-1 Rezeptor
DAB	Diaminobenzidin
E2F1	Transkriptionsfaktor
FCS	fetales Rinderserum
FDG	radioaktiv markiertes Glukoseanalogon
Flt-3	Fms-like-tyrosyl-kinase-3, Tyrosinkinase
GI	Gastrointestinaltrakt
GIST	Gastrointestinale Stromatumoren
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA	humanes Leukozytenantigen-System
HPF	high-power-field (Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung im Mikroskop)
hsp90	heat-shock-protein, molekulares Chaperon (Protein)
HSV-TK	Suizidgen für die Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase
hTERT	katalytische Untereinheit der Telomerase
hTR	RNA-Anteil der Telomerase
HTRT	Primärantikörper für hTERT
ICC	intestinal-cells-of-Cajal, Cajalzellen
Ki67	Proliferationsindex
KIT	Typ-III-Tyrosinkinase-Rezeptor
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
MVD	microvessel-density
p16	Tumorsuppressor-Gen
p23	co-chaperone des heat-shock-protein (Hsp) 90
p53	Tumorsuppressor-Gen
PCNA	proliferating-cell-nuclear-antigen, Proliferationsmarker
PDGFR $\alpha$	Platelet-derived-growth-factor-receptor-alpha, Tyrosinkinase
PET	positron-emission-tomography
PS-100	Antigen für Neuroproteine
RPMI	Zellkulturmedium
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SCF	stem-cell-factor, Stammzellefaktor
SMA	smooth-muscle-actin, glattmuskuläres Aktin
SU11248	Sunitinib, Chemotherapeutikum
TEP1	Telomerase-associated-Protein-1
TRAP	telomeric-repeat-amplification-protocol, Telomeraseaktivitätsbestimmung
VEGF	vascular-endothelial-cell-growth-factor

Benutzungshinweis: Die in der Arbeit kursiv geschriebenen Wörter bezeichnen Kategorien.

## 1. Einleitung

### 1.1. GIST: Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) gehören zu den mesenchymalen Tumoren des Gastrointestinaltrakts (GI) und werden seit 1998 als eigenständige Untergruppe durch den immunhistochemischen Nachweis von c-KIT (CD117) klassifiziert (1, 2). CD117 ist ein Typ-III-Tyrosinkinase-Rezeptor, der den Stammzellsfaktor (SCF) als Liganden benutzt (3). Dieser Transmembranrezeptor kann auf Knochenmarksstammzellen, Mastzellen, Melanozyten, Keimzellen und Cajalzellen (ICC) nachgewiesen werden. Darüber hinaus findet sich CD117 in unterschiedlicher Ausprägung auch auf Tumorzellen von GIST, kleinzelligen Bronchiolarkarzinomen, verschiedenen Sarkomen, Seminomen, Mastozytomen und Melanomen (1, 4, 5). Dagegen wird CD117 auf Leiomyomen, Leiomyosarkomen, Schwannomen und Fibromatosen nicht exprimiert (6). Zurzeit wird angenommen, dass sich GIST von mesenchymalen Stammzellen mit Differenzierungspotenzial in Cajalzellen und intestinales Muskelgewebe ableiten (7).

Betrachtet man alle Tumoren des GI oder alle sarkomatösen Weichteiltumoren, so sind GIST mit circa 2% bis 5,7% selten (8, 9). Von den nicht epithelialen Tumoren im gastrointestinalen Bereich sind jedoch GIST mit 80% sehr häufig und es ist wichtig, sie von Leiomyomen und Leiomyosarkomen (15%), Schwannomen (5%) und der Fibromatose diagnostisch abzugrenzen (6). Zur Häufigkeit von GIST liegen momentan drei Studien vor. Die jährliche Inzidenz in West-Schweden beträgt 14,5 pro 1 Million Einwohner und die Prävalenz 129 pro 1 Million Einwohner (10). In Island beträgt die Inzidenz 11 pro 1 Million Einwohner und in den USA 6,8 pro 1 Million Einwohner (11, 12). Für Deutschland wird eine Inzidenz von 20 pro 1 Million Einwohner geschätzt (circa 1500 Neuerkrankungen jährlich) (5).

GIST können in jedem Alter auftreten. Der Altersgipfel der Patienten liegt bei 50–60 Jahren. Nur 5%–20% der GIST sind bei unter 40-Jährigen vertreten und bei Kindern ist diese Tumorentität sehr selten. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen. Mit circa 60%–70% sind die meisten GIST im Magen zu finden, gefolgt von Dünndarm (25%–30%) und Rektum (5%). Im Kolon, Ösophagus, Omentum, Mesenterien und im Retroperitoneum sind sie nur selten lokalisiert (siehe Tabelle 1) (4, 11, 13, 14).

Lokalisation	geschätzter Prozentsatz von allen GIST	geschätzte Frequenz vom bösartigem Verhalten
Ösophagus	1-3%	die Mehrheit
Magen	60-70%	25%
Dünndarm	25-30%	50%
Duodenum	5%	30-40%
Kolon	1%	die Mehrheit
Rektum	5%	30-40%
Omentum und Mesenterien	<5%	50%
Metastasen im Abdomen	5%	-

Tabelle 1: Relative Frequenz der Häufigkeit der GIST an verschiedenen Lokalisationen und geschätzte Frequenz von malignen Tumoren an verschiedenen Lokalisationen

Die Ätiologie der GIST ist zurzeit noch unklar. Jedoch sind die Mutationen im c-KIT-Gen und im Platelet-derived-growth-factor-receptor-alpha (PDGFR $\alpha$ )-Gen, die zu einer Daueraktivierung der Tyrosinkinase führen, pathogenetisch relevant (siehe Abbildung 1) (15, 16). Auch eine Überexpression von E2F1 oder eine Inaktivierung von p16<sup>INK4A</sup> scheinen einen Einfluss zu haben (17, 18).

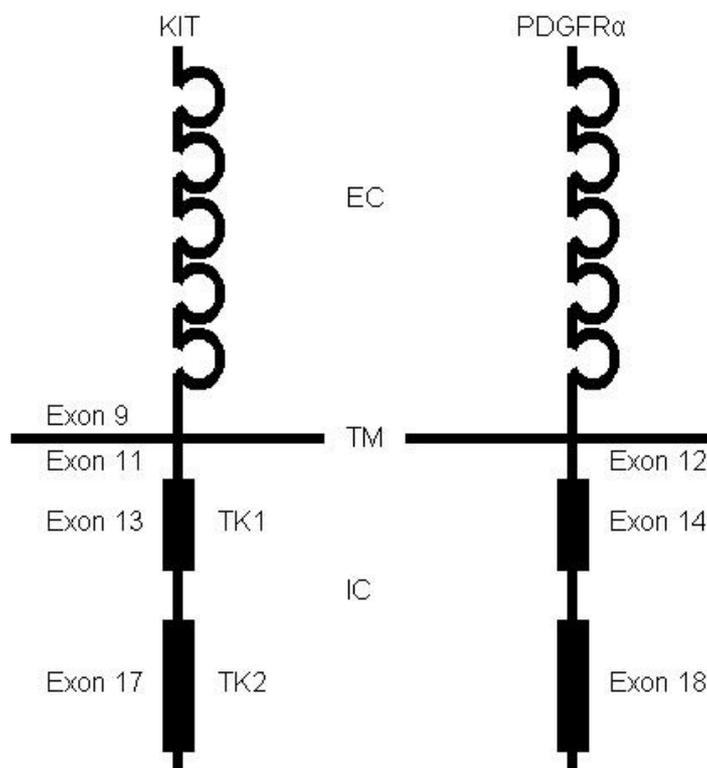


Abbildung 1: Schematische Präsentation von KIT- und PDGFR $\alpha$ -Molekülen und KIT- und PDGFR $\alpha$ -Mutationen in GIST. EC zeigt extrazelluläre Domäne, TM transmembrane Domäne, IC intrazelluläre Domäne, TK1 und 2 Tyrosin-Kinase-Domäne

## 1.2. Symptome, Diagnostik und Therapie

70% der GIST verursachen Symptome, 20% werden zufällig gefunden und 10% werden erst bei einer Autopsie entdeckt (10, 19). Größere GIST können eine Anämie, Völlegefühl, Schmerzen, tastbare Resistenzen, Obstipation oder Blutungen bei Durchbruch ins Darmlumen bewirken (4, 6). 46% der Patienten haben zum Diagnosezeitpunkt Metastasen. Davon treten 76% lokal auf. Zu 75% liegen Lebermetastasen und in 7% Peritonealmetastasen vor. Äußerst selten entstehen Metastasen extraabdominal (8%) oder in regionalen Lymphknoten (6%) (9).

Makroskopisch imponieren GIST als umschriebene Tumoren ohne Kapsel, die knotig auftreten. Die Schnittfläche variiert von grau-weiß bis rot-braun. Häufig sind Nekrosen und Hämorrhagien zu entdecken (siehe Abbildung 2) (13, 20). Mikroskopisch sind circa 70% spindelzellig, 20% epitheloidzellig und 10% gemischtzellig Tumoren zu finden. Die Größe zum Diagnosezeitpunkt variiert von einigen Millimetern bis 30cm (15, 21).

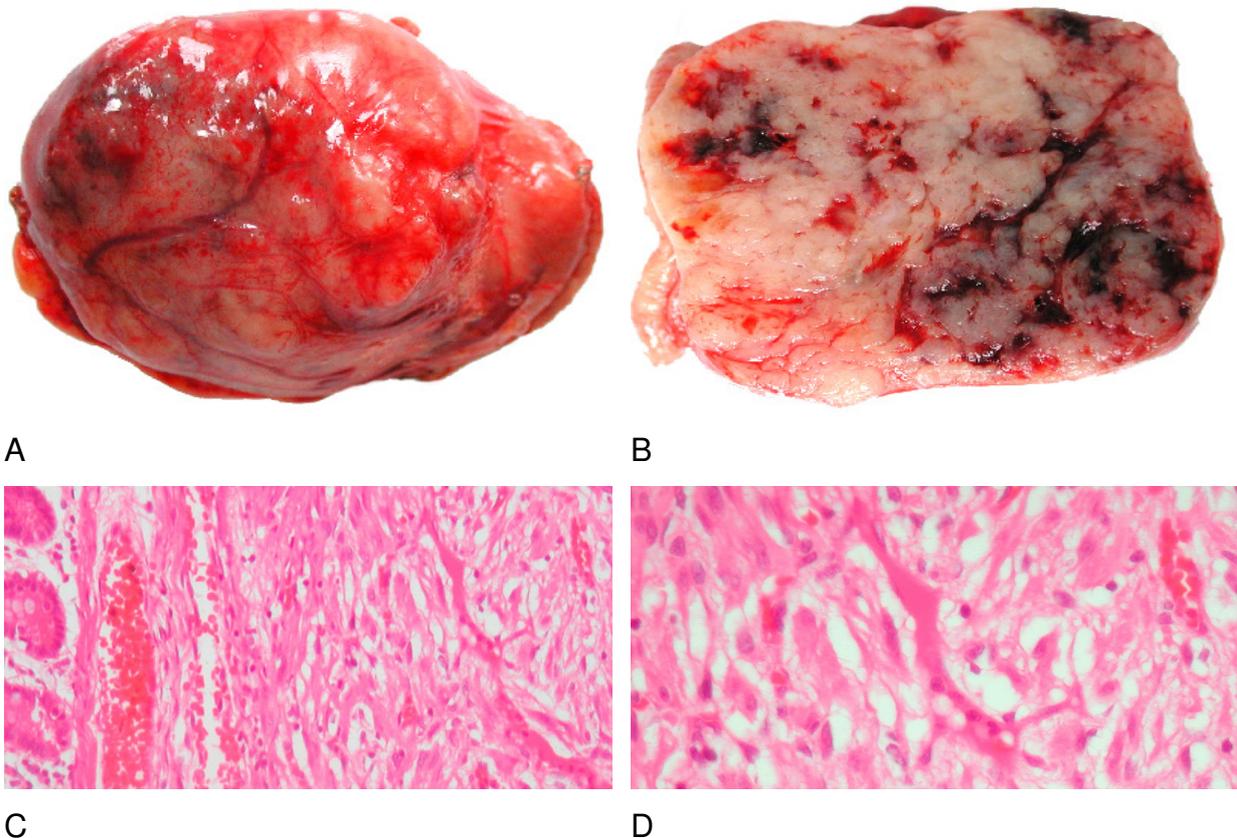


Abbildung 2: Makroskopische und mikroskopische Darstellung von GIST **A:** GIST, Ansicht von außen  
**B:** GIST, Schnittfläche mit Nekrosen und Einblutungen  
**C+D:** GIST, spindelzellig, HE, x 200, x 400

Primärtumoren, die kleiner als 3cm sind, stellen sich im CT/MRT als homogene, weichteildichte, noduläre Strukturen dar, die nur schwer von malignen Lymphomen abzugrenzen sind. Größere GIST haben einen zweischichtigen Aufbau mit zentraler Nekrose und einem variabel perfundierten Mantel (5). Ein fluorine-18-fluorodeoxyglucose- (FDG) positron-emission-tomography (PET) zeigt durch eine hypermetabolische Aufnahme des Tumors eine hohe Sensitivität bei der Erkennung und der frühen Tumorentwicklung nach Imatinibgabe an (22). Beispiele dafür sind in Abbildung 3 dargestellt.

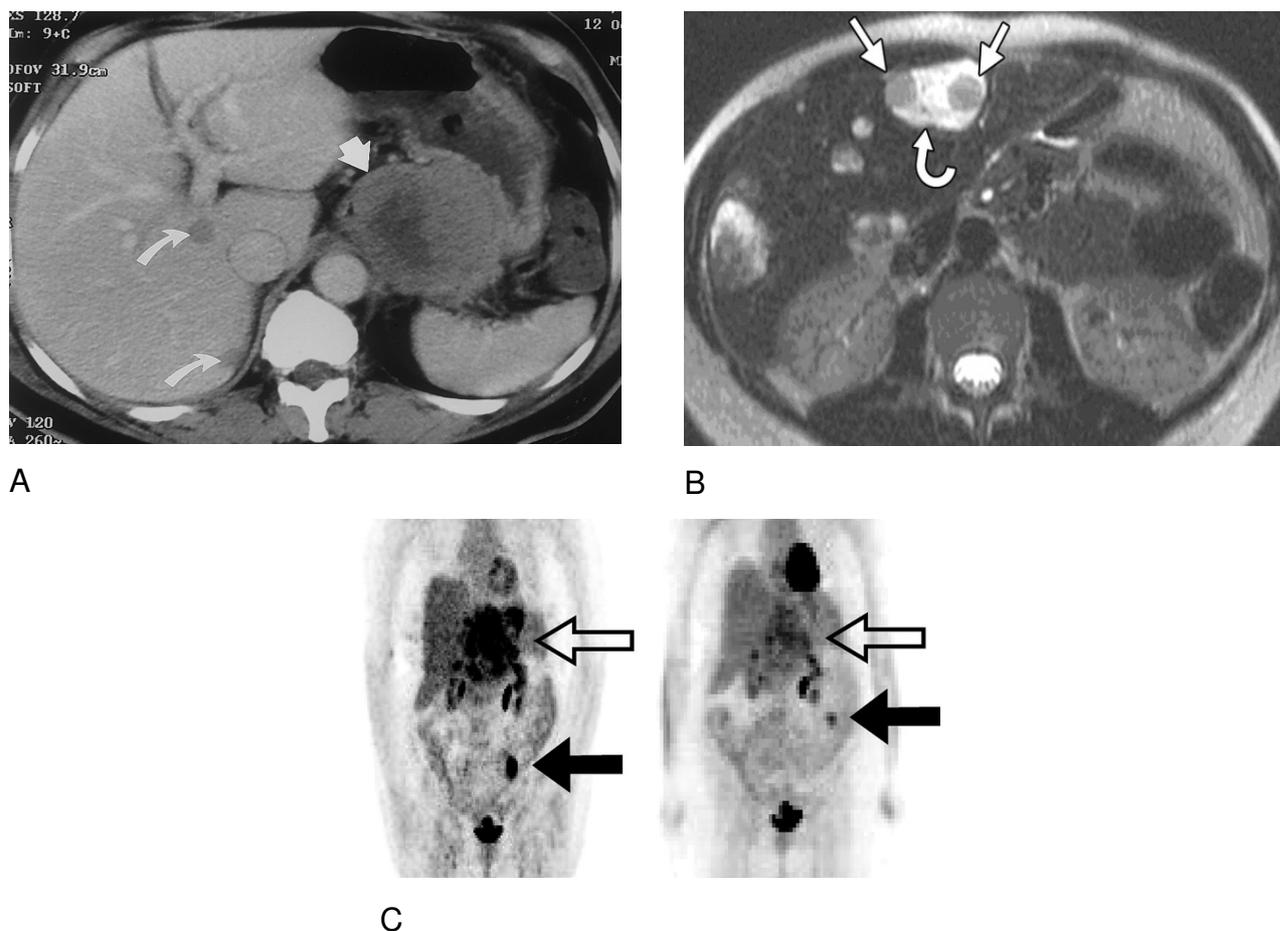


Abbildung 3: GIST im CT, MRT und der Verlauf im 18FDG-PET

**A:** Extraluminal-GIST (gerader Pfeil) mit zentraler Flüssigkeitsabschwächung, zwei kleine homogene Lebermetastasen (gebogene Pfeile), CT

**B:** zwei Knoten (gerade Pfeile) mit höherer Signalintensität als die Leber in einer größeren Raumforderung (gebogener Pfeil), MR, T2-gewichtet

**C:** der Verlauf von primären GIST (schwarzer Pfeil) im kleinen Becken und seiner Metastasen (heller Pfeil) in der Leber, vor (links) und nach (rechts) 3-wöchiger Imatinib-Therapie, 18FDG-PET

Immunhistochemisch sind 95% GIST positiv für CD117. Weiterhin sind die Tumoren in 80% für BCL-2, 60%-70% für CD34 und 30%-40% für smooth-muscle-actin (SMA) positiv. Desmin und PS-100 sind äußerst selten positiv in GIST. (6, 15, 22, 23). Nachweisen lassen sich auch Mutationen im c-KIT-Gen. Es handelt sich dabei um Veränderungen in den Exons, die in 80% der GIST zu finden ist. 71% der c-KIT-Mutationen befinden sich im Exon 11, 13% in Exon 9 und jeweils 4% in Exon 13 und 17. Diese Mutationen bewirken eine „gain-of-function“ der sie kodierenden Tyrosinkinase. Diese Daueraktivierung führt zu ungehemmtem Wachstum und Schutz vor Apoptose (11, 20). Bei 35% der c-KIT-negativen GIST konnten Mutationen im PDGFR $\alpha$ -Gen festgestellt werden. Es handelt sich hierbei um eine weitere Rezeptor-Tyrosinkinase. Die betroffenen Exone 12, 14 und 18 entsprechen funktionell den Exonen 11, 13 und 17 im c-KIT-Gen, jedoch lassen sich 82% der Mutationen in Exon 18, 14% in Exon 12 und 4% in Exon 14 nachweisen (siehe Abbildung 1 und Tabelle 2) (11, 14).

<b>Tyrosinkinase</b>	<b>Exon (Mutationshäufigkeit)</b>			
c-KIT-Gen	11 (71%)	9 (13%)	13 (4%)	17 (4%)
PDGFR $\alpha$ -Gen	12 (14%)	-	14 (4%)	18 (82%)

Tabelle 2: Mutationshäufigkeit in den Exonen des c-KIT-Gens und PDGFR $\alpha$ -Gens

Die Therapie der Wahl für GIST besteht in der chirurgischen Entfernung „en-bloc“ der Tumoren bei einem Sicherheitsabstand von circa 2-5cm in Abhängigkeit von der Lokalisation (5, 13). Eine Lymphknotenentfernung ist nur bei Verdacht auf Lymphknotenbefall durchzuführen. Im nicht-resektablen Stadium und bei Metastasen oder Rezidiven wird seit 2002 eine Therapie mit Imatinib (STI571), einem Hemmer des Tyrosinkinaserzeptors, durchgeführt (22). Die Ansprechrate bei dem Medikament ist abhängig von der Mutation. Liegt eine Veränderung im Exon 11 des c-KIT-Gens vor, so beträgt die Ansprechrate 72%. Ist keine Mutation nachweisbar, beträgt die Ansprechrate nur 12% (5, 24). Nach einer RO-Resektion liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei 50%. Im metastasierten Zustand liegt die mediane Überlebensrate ohne Imatinib bei 10-20 Monaten. Mit der Imatinib-Therapie ist die Drei-Jahres-Überlebensrate mit 60% deutlich verlängert (11). Jedoch sind circa 15% der GIST primär resistent gegen Imatinib. Nach zwei Jahren Imatinib-Therapie sind weitere 50% der Patienten resistent. Abbildung 3C zeigt einen Verlauf der GIST nach

Imatinib-Therapie im FDG-PET und Abbildung 4 im CT. Die neoadjuvante Therapie mit Imatinib ist momentan in Einzelfällen möglich, z. B. zur Tumorreduktion, um eine spätere günstigere Operationssituation zu schaffen. Derzeit wird eine adjuvante Therapie für das lokal begrenzte Stadium noch in Studien geprüft (25).

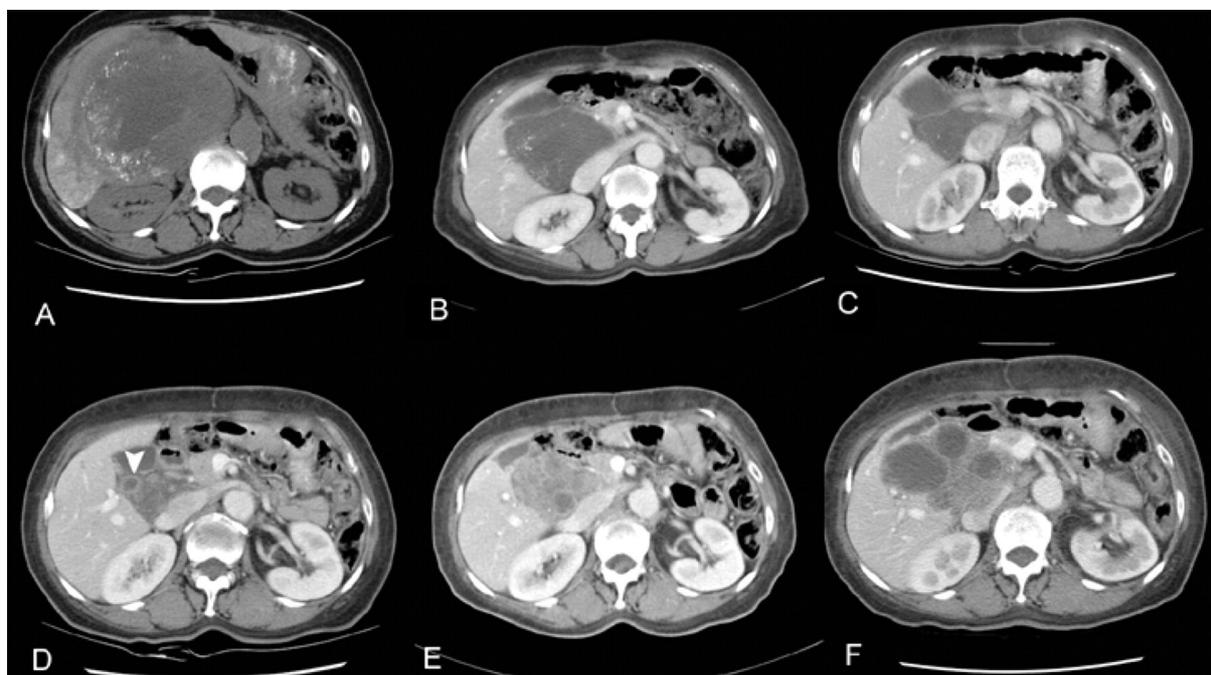


Abbildung 4: Verlauf von GIST nach Imatinib-Therapie im CT **A:** Zeitpunkt der Diagnose  
**B+C:** nach 2 und 11 Monaten Imatinib-Therapie zeigt sich eine Regression  
**D:** nach 15 Monaten Therapie zeigt sich ein stabiler Befund mit dem Auftreten von kleinen Knoten (weißer Pfeilkopf)  
**E+F:** nach 19 und 22 Monaten stellt sich eine Expansion der Knoten dar

Sunitinib (SU11248) ist ein weiterer Inhibitor von CD117, PDGFR $\alpha$ , vascular-endothelial-cell-growth-factor (VEGF), Fms-like-tyrosyl-kinase-3 (Flt-3) und colony-stimulating-factor-1-receptor (CSF-1R) (26). Die Ansprechrate der Therapie mit Sunitinib bei imatinib-resistenten GIST liegt bei 8%-15% und weitere 39%-58% der Patienten zeigen eine Stabilisierung der Erkrankung (19).

### 1.3. Prognose von GIST

Die weitaus beste Aussage über die Prognose eines an GIST erkrankten Patienten wird derzeit über die Tumorgöße, den Mitoseindex und die Lokalisation erreicht. Seit 2006 wird mit Hilfe dieser Parameter das Risiko der Aggressivität von GIST in vier Risikokategorien eingeteilt, was in Tabelle 3 dargestellt ist (27).

Gruppe	Risikokategorien		Tumorgröße (cm)	Mitosenanzahl/50HPF
	Magen-GIST	Dünndarm-GIST		
1	sehr niedriges Risiko	sehr niedriges Risiko	≤2	≤5
2	niedriges Risiko	niedriges Risiko	>2, ≤5	≤5
3a	niedriges Risiko	intermediäres Risiko	>5, ≤10	≤5
3b	intermediäres Risiko	hohes Risiko	>10	≤5
4	niedriges Risiko	hohes Risiko	≤2	>5
5	intermediäres Risiko	hohes Risiko	>2, ≤5	>5
6a	hohes Risiko	hohes Risiko	>5, ≤10	>5
6b	hohes Risiko	hohes Risiko	>10	>5

Tabelle 3: Vermutetes Auftreten des aggressiven Verhaltens von GIST anhand eines definierten Risikos

Weiterhin gibt es noch eine Reihe von Parametern, die mit einer schlechteren Prognose verbunden sind, z. B. das *Vorhandensein von Metastasen, Nekrosen, der gemischtzellige Typ* sowie das *Fehlen von p16* oder eine *hohe Expression von Ki67, E2F1, Bcl-2, p53, VEGF* (17, 20, 28). Auch die *Lokalisation* im Darmbereich gegenüber Magen-GIST hat eine schlechtere Prognose (12, 13). Der Mutationsstatus sollte gesondert betrachtet werden. Mutationen im c-KIT-Gen, Exon 11, haben eine schlechte Prognose. Therapiert man jedoch mit Imatinib, so ist die Ansprechrate deutlich besser gegenüber anderen Mutationsorten (11, 20, 29).

Allerdings gibt es zurzeit keinen einheitlichen, prognostischen Faktor, der ergänzend zu den Risikokategorien angewendet wird. Molekulare Marker sind immer mehr von Interesse, kann man doch mit einer einfachen Bestimmung schnell Hinweise dafür erhalten, ob ein Tumor besteht, um welchen Tumor es sich handelt und in welchem Stadium er sich befindet. Die klassischen Beispiele sind beim Prostatakarzinom die Bestimmung des PSA und beim medullärem Schilddrüsenkarzinom die Bestimmung des Calcitonin.

Auf Grund der neuen Therapie mit Imatinib und der Frage danach, welchem Patienten man diese Therapie zukommen lässt, untersuchten mehrere Arbeitsgruppen neue Marker, um eine genauere Aussage über das Malignitätsrisiko zu finden. Taniguchi et al. (1999) untersuchten c-KIT-Mutationen und Schneider-Stock et al. (2003) analysierten p16<sup>INKA</sup>-Alterationen auf deren prognostische Relevanz (16, 18). Jedoch ist die Prüfung auf der Ebene der mRNA und DNA sehr aufwändig und deren Aussage, aufgrund vieler posttranskriptionaler Modifikationen,

nur eingeschränkt beurteilbar. Daher sind diese Marker für die klinische und pathologische Routinediagnostik nur bedingt geeignet. Yu et al. (1992) untersuchten mit Hilfe der Immunhistochemie die Proliferationsmarker proliferating-cell-nuclear-antigen (PCNA), interphase-nucleolar-organizer-region-staining (AgNOR) und Mitosezahl. Diese Marker zeigten gute Korrelationen mit dem Überleben und könnten einer besseren Prognose dienen (30). Imamura et al. (2007) verifizierten die Angiogenese als möglichen prognostischen Faktor, in dem sie zeigten, dass die gemessene microvessel-density (MVD) eine hohe Signifikanz aufwies ( $p=0,0028$ ) (31). Jedoch wurden diese Investitionen noch nicht an einem größeren Kollektiv bestätigt.

Es gab Hinweise, dass das Enzym Telomerase ebenfalls in GIST exprimiert wird (32). In mehreren Arbeiten über epitheloide Tumoren wurde gezeigt, dass in Primärtumoren eine geringere Telomeraseaktivität zu verzeichnen ist, als in bereits metastasierten Tumoren oder Rezidiven (33, 34). Agoi et al. (2000) zeigten dies auch für Weichteiltumoren (35). Sakurai et al. (1998), Günther et al. (2000) und Kawai et al. (2005) zeigten, dass eine erhöhte Telomeraseaktivität in GIST verbunden ist mit einer schlechteren Prognose (32, 36, 37).

#### **1.4. Telomerase: Aufbau und Funktion**

Telomerase ist eine universelle, reverse Transkriptase und besteht aus einem Ribonukleinproteinkomplex mit zwei großen Untereinheiten. Der RNA-Anteil, hTR, dient als Matrize zur Vermehrung von neuen Telomer-Wiederholungen und kann in vielen somatischen Zellen nachgewiesen werden (38, 39). hTERT ist die katalytische Proteinuntereinheit, welche nur in Zellen exprimiert wird, die auch eine Aktivität von Telomerase zeigen, und kann daher als Marker genutzt werden (40, 41). Weitere Proteine stabilisieren und regulieren die Telomerase. In Abbildung 5 ist dies schematisch dargestellt.

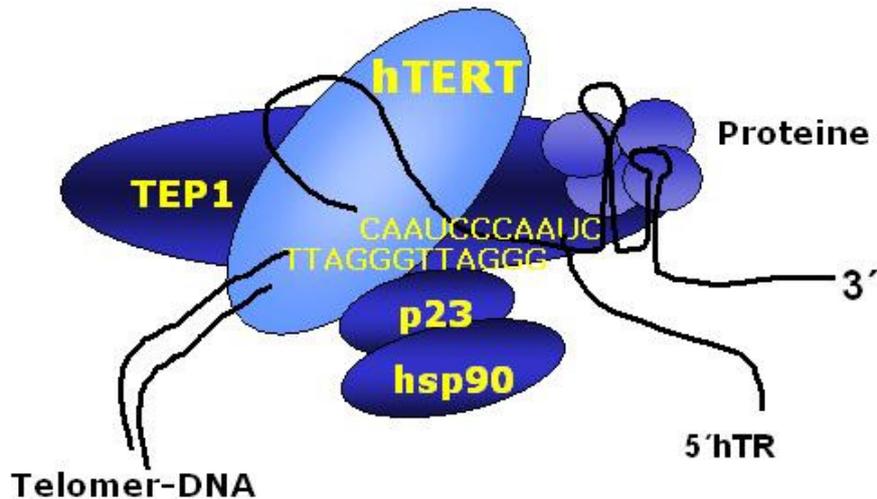


Abbildung 5: Schemazeichnung der Zusammensetzung der Telomerase

Telomerase erneuert und stabilisiert die Telomerlänge der unsterblichen Zellen, indem sie am 3'-Ende der DNA bindet und neue Desoxyribonukleotide synthetisiert (42). Dadurch wird die DNA am Chromosomende verlängert, die Anzahl der TTAGGG-Basensequenzen der Telomere erhöht und somit besteht weiterhin der Schutz des Chromosoms vor Instabilität und Abbau (43, 44). Daher haben einige Zellen eine unbegrenzte Replikationskapazität und umgehen das „end-replication-problem“, indem sie die Telomerase aktivieren (siehe Abbildung 6) (45, 46, 47, 48).

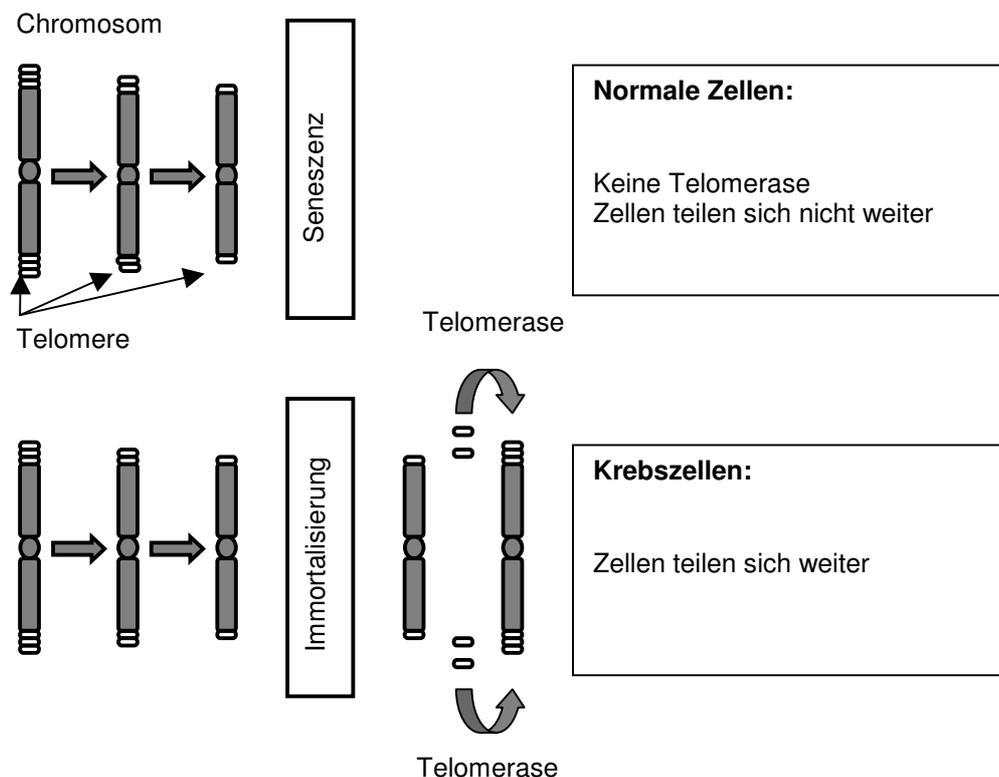


Abbildung 6: Regulation der Telomerlänge in normalen Zellen und Krebszellen durch Telomerase

### 1.5. Telomeraseaktivität in normalen Zellen und Tumorzellen, speziell GIST

Eine Telomeraseaktivität kann beim Menschen in Hoden, Ovarien, epithelialen Stammzellen, aktivierten Lymphozyten, embryonalen Zellen und in 90% der humanen Tumoren und 98% von unsterblichen Zelllinien nachgewiesen werden. In normalen Körperzellen und benignen Tumoren ist jedoch keine Telomeraseaktivität nachweisbar (45, 40, 49). Daher geht man davon aus, dass die Aktivierung von Telomerase ein wichtiger Schritt im Prozess der Tumorgenese ist, durch den Tumorzellen ihre Teilungsfähigkeit behalten. (50). Unterschiede der Telomeraseaktivität bestehen auch zwischen Primärtumoren und Tumoren mit lymphatischen Metastasen, sowie Tumoren in unterschiedlichen klinischen Stadien und unterschiedlichem histologischen Grad, wobei eine höhere Telomeraseaktivität mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (33, 35, 34, 50, 51). Für viele Tumoren wurde bereits nachgewiesen, dass eine erhöhte Telomeraseaktivität sich negativ auf die Prognose auswirkt (siehe Tabelle 4) (52).

<b>&gt;75% positiv</b>	<b>50-75% positiv</b>	<b>&lt;50% positiv</b>
CML	CLL (spät)	CLL (früh)
Grad-III-Lymphome	AML	Retinoblastom
Myelom	ALL	Osteosarkom
Mammakarzinom	Grad-I-Lymphome	Chondrosarkom
Lungenkarzinom	Nierentumoren	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
Prostatakarzinom	Glioblastom	Leiomyosarkom
Blasenkarzinom	Liposarkom	
Uretherkarzinom		
Kolonkarzinom		
Magenkarzinom		
Pankreaskarzinom		
Hepatozelluläres Karzinom		
Ovariakarzinom		
Zervixkarzinom		
Endometriumkarzinom		
Follikuläres Schilddrüsenkarzinom		
Kopf- und Halstumoren		
Neuroblastom		
Malignes Meningiom		
Melanom		
Gastrointestinaler Stromatumor		

Tabelle 4: Telomeraseaktivität in menschlichen malignen Tumoren

Einige Arbeiten zeigten ebenfalls, dass eine erhöhte Telomeraseaktivität mit einer schlechteren Prognose in GIST verbunden ist (32, 36, 37). Jedoch basierten diese auf kleinen Fallzahlen (29, 16 und 36 Fälle) und benötigten frisches Gewebe für die

telomeric-repeat-amplification-protocol (TRAP) -Analyse zur Bestimmung der Telomeraseaktivität. Neuere Methoden erlauben einen immunhistochemischen Nachweis von hTERT als Bestimmung der Telomeraseaktivität (33, 51, 53).

Sabah et al. (2004) wandten diese Technik an 23 GIST an und stellten fest, dass eine erhöhte hTERT-Expression während der klinischen Progression auftritt (53). Nach derzeitigem Wissen wurde die Telomeraseaktivität noch an keinem größeren GIST-Kollektiv untersucht. Aus diesen Gründen wurden in der nachfolgenden Arbeit 239 GIST mit langen Verlaufsbeobachtungen auf deren hTERT-Expression analysiert, um zu prüfen, ob sich die Telomeraseaktivität als neuer prognostischer Marker für GIST eignet.

## **2. Gewebeproben, Material und Methoden**

### **2.1. Gewebeproben**

239 primäre GIST wurden untersucht. Diese Gewebeproben stammten aus der Universität Federico II, Neapel (Italien), der Oregon-Health-and-Science-Universität, Portland, Oregon (USA), dem Armed-Forces-Institute-of-Pathology, Washington D.C. (USA), dem Institut für Pathologie, Universität Basel (Schweiz), dem Institut für Pathologie, Universität Regensburg (Deutschland) und dem Institut für Pathologie, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg (Deutschland). Die Gewebeproben standen in Form von Gewebe-Microarrays zur Verfügung.

### **2.2. Immunhistochemische Färbung**

In dem immunhistochemischen Labor der Pathologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, wurden die Microarrays für die Auswertung am Mikroskop eingefärbt. Als Positivkontrolle wurde ein Dickdarmkarzinomschnitt mitgefärbt.

Die 2-3µm dicken Paraffin-Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und über Nacht bei 60°C getrocknet. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte je drei Mal fünf Minuten in Xylol eingestellt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 75%) rehydriert. Eine Spülung mit destilliertem Wasser folgte.

Daraufhin wurden die Schnitte zur Antigendemaskierung in 0,01M Citratpuffer (pH= 6,0, Natriumcitrat und Zitronensäure) drei Mal zehn Minuten in der Mikrowelle bei 600W vorbehandelt. Zwischendurch wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt, um ein Austrocknen zu vermeiden. Anschließend kühlten die Schnitte bei Raumtemperatur 20 Minuten ab und der Citratpuffer wurde mit fließendem Leitungswasser abgespült.

Um die endogene Peroxidase zu hemmen, wurden die Schnitte mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) betropft, nach 30 Minuten mit fließendem Wasser gespült und in destilliertem Wasser eingestellt. Zunächst wurden die Schnitte in Tris-Puffer (1:10 Verdünnung von 87,8g NaCl, 9g Tris und 68,5g TrisHCL auf 1L destilliertes Wasser) getaucht und dann je 15 Minuten mit Avidin- und Biotin-Blocker (Vector) inkubiert, um die spezifischen Bindungsstellen zu besetzen. Zwischendurch wurde mit Tris-Puffer gespült. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen wirkte anschließend der Protein-

Blocker (Immunotech) 20 Minuten auf die Schnitte ein. Hiernach wurde der überschüssige Blocker von den Schnitten abgeschüttelt.

Der Primärantikörper HTERT (Santa Cruz) wurde mit RPMI (5ml RPMI (Invitrogen), 5ml FCS (Invitrogen), 50ml destilliertes Wasser, 50mg Na-acid, pH 7,4-7,6) in einer Verdünnung von 1:80 bei 37°C eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Daraufhin folgte eine fraktionierte Abspülung mit Tris-Puffer. Als Sekundärantikörper wurde biotinyliertes Anti-Goat (Vector) verwendet. Dieser wirkte 30 Minuten bei Raumtemperatur bei einer Verdünnung von 1:200 mit RPMI ein. Ein mehrmaliges Spülen mit Tris-Puffer folgte. Als Tertiärantikörper wurde Streptavidin „Elite“ (Vektor), der mit Peroxidase konjugiert ist, benutzt. Je ein Tropfen A+B in 2,5ml RPMI wirkte 30 Minuten auf die Schnitte bei Raumtemperatur ein. Ein erneutes, fraktioniertes Abspülen mit Tris-Puffer wurde durchgeführt.

Um das Antigen visuell erkennen zu können, wurde fünf Minuten Diaminobenzidin (DAB, Labvision) auf die Schnitte gegeben und diese danach fünf Minuten in destilliertes Wasser eingestellt. Die Gegenfärbung wurde mit Hämalaun eine Minute durchgeführt und es wurde mit Leitungswasser gebläut. Daraufhin wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (75%, zweimal 96%, 100%) entwässert und zweimal in Xylol eingestellt. Zuletzt wurden die Schnitte mit Balsam eingedeckt. Die Färbung zeigt Zellkerne, Kalk und sauren Schleim in blau, das Antigen erscheint durch die DAB-Reaktion hellbraun. Die Abbildung 7 zeigt einen gefärbten Microarray.

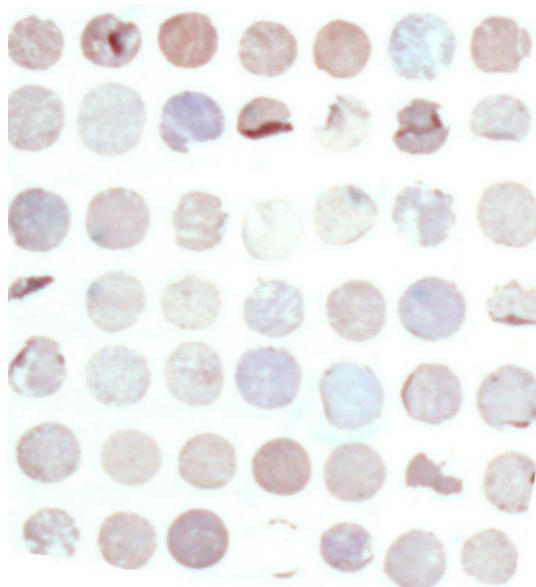


Abbildung 7: Mircoarray, GIST gefärbt mit hTERT

### 2.3. Auswertung mittels Mikroskop

Die semiquantitative Bestimmung des Ausmaßes der Immunexpression von hTERT erfolgte durch Beurteilung mit Hilfe des Lichtmikroskopes BH 2 (Olympus) bei 10-40-facher Vergrößerung. Ein „Cut off“ von 20% wurde veranschlagt, um zwei prognostische Gruppen zu unterscheiden:

- *Gruppe I:* Das Anfärbeverhalten der Zellkerne lag bei unter/gleich 20%
- *Gruppe II:* Über 20% der Zellkerne färbten sich an (hTERT-Überexpression)

Die Färbeintensität wurde vernachlässigt, da auch ein schwach angefärbter Zellkern als absolut positiv zu bewerten ist, weil die Telomerase in normalen Zellen nicht exprimiert wird. Die Abbildungen 8-11 zeigen die hTERT-Färbung jeweils bis 20% und über 20% in epitheloider und spindelzelliger Morphologie.

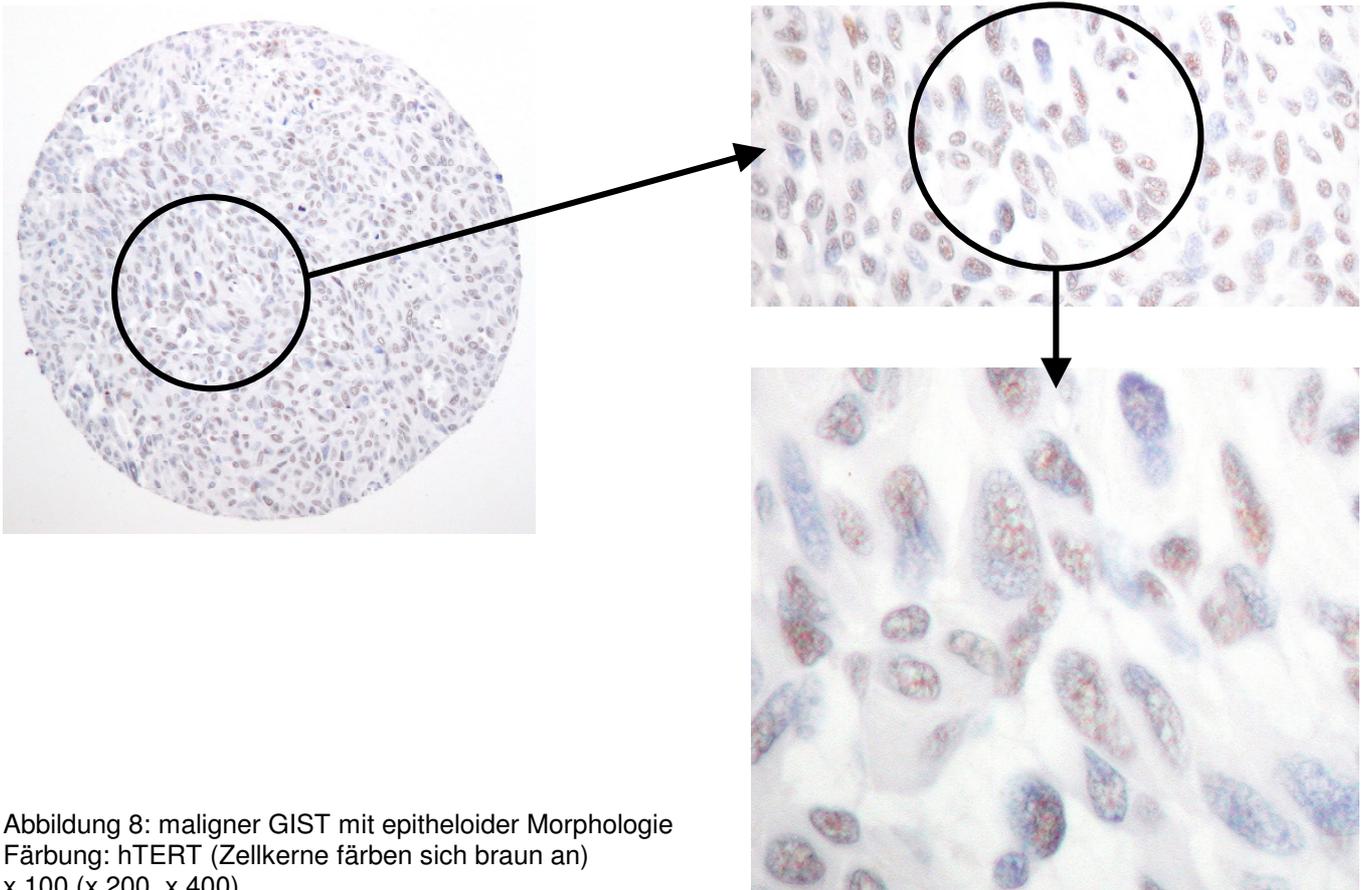
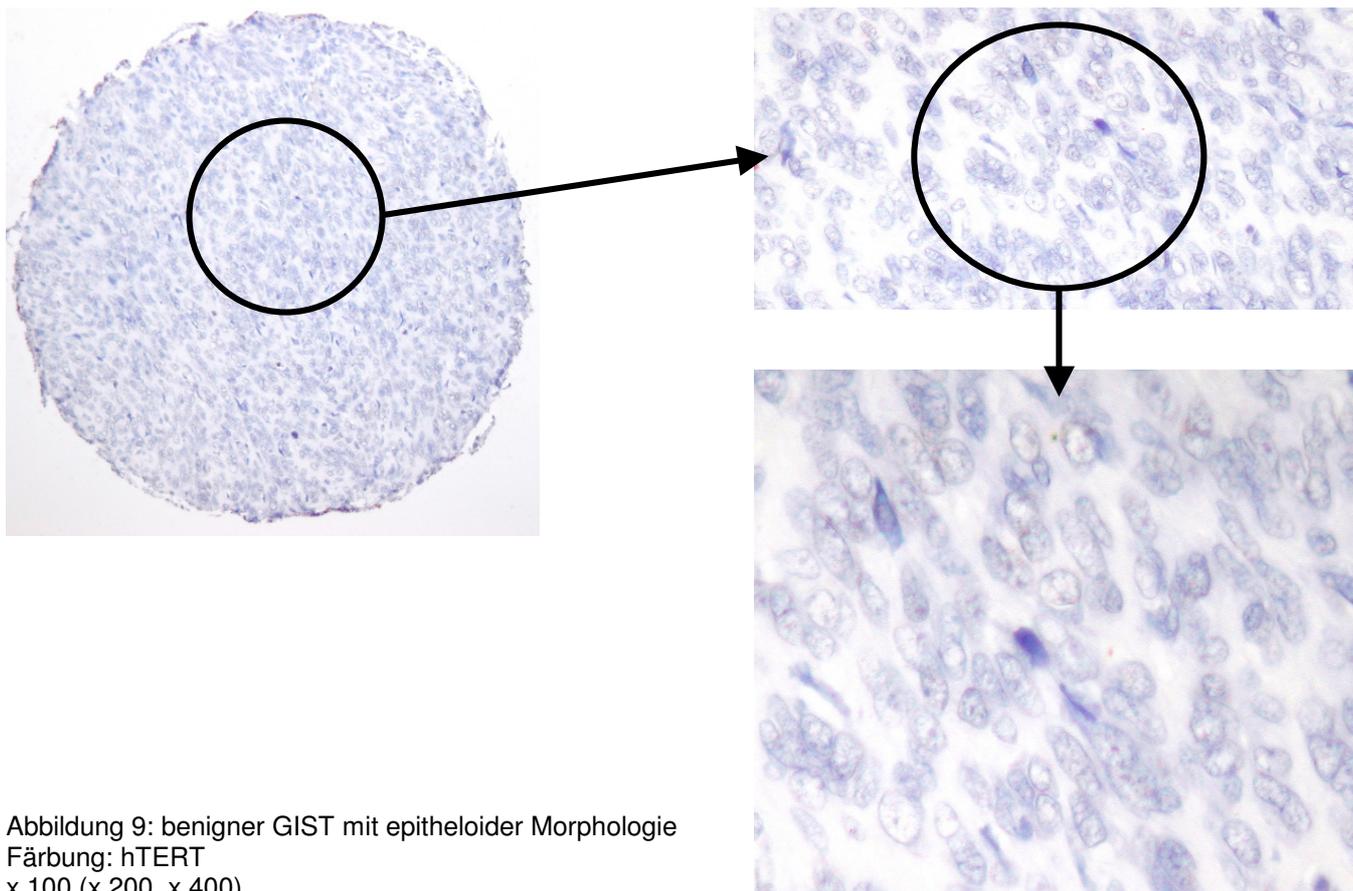


Abbildung 8: maligner GIST mit epitheloider Morphologie  
Färbung: hTERT (Zellkerne färben sich braun an)  
x 100 (x 200, x 400)



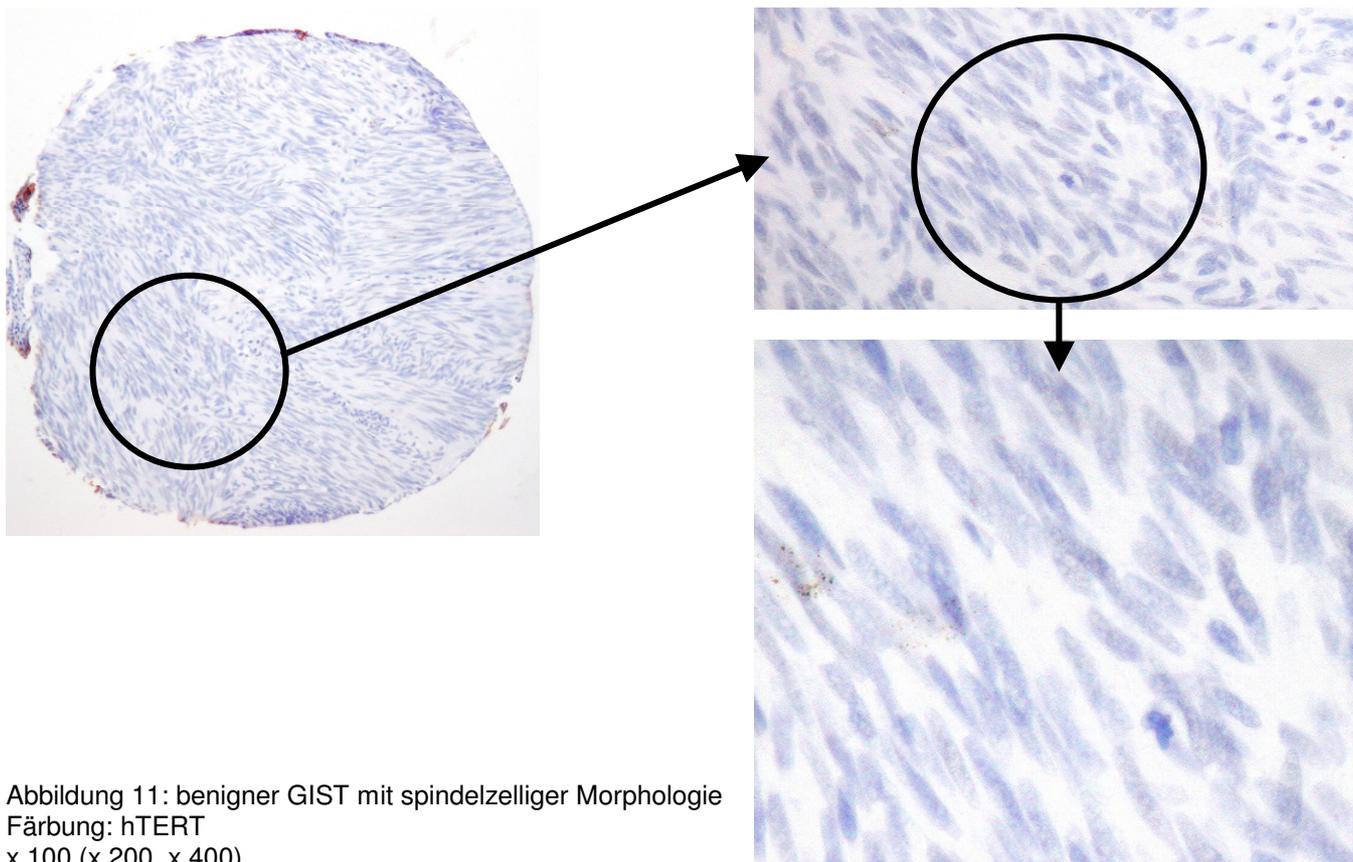


Abbildung 11: benigner GIST mit spindelzelliger Morphologie  
Färbung: hTERT  
x 100 (x 200, x 400)

## 2.4. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Analyseprogramm SPSS, Version 13.1. (Chicago, Il.). Zuerst wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson mit den klassischen prognostischen Parametern wie *TumorgroÙe*, *Mitoserate*, *Nekrosen*, *Lokalisation*, *Metastasen* und *histologischer Typ* in Abhängigkeit zur Anzahl der verstorbenen Patienten durchgeführt. Es folgte eine Korrelation der *hTERT-Expression* mit den klassischen prognostischen Parametern mittels des Chi-Quadrat-Test nach Pearson. Konnten die Voraussetzungen für den Chi-Quadrat-Tests nicht erfüllt werden, so wurden die Daten mit dem exakten Test nach Fisher analysiert.

Zur Erfassung der prognostischen Relevanz wurde die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse zuerst mit den klassischen prognostischen Parametern und danach mit der hTERT-Expression durchgeführt. Die Signifikanz der Zeitverläufe wurde mit dem Log-Rank-Test geprüft. Danach wurden einzelne Subgruppen auf die Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Expression von hTERT nach Kaplan und Meier untersucht und mit dem Log-Rank-Test auf Signifikanz überprüft.

Um die Nützlichkeit der prognostischen Parameter zu untersuchen, wurde das statistische Verfahren der Cox-Regression durchgeführt. Zunächst wurden die einzelnen Parameter univariat auf Signifikanz geprüft. Die Parameter, die sich in der univariaten Analyse signifikant ( $p \leq 0,05$ ) zeigten, wurden für die multivariate Überlebensanalyse berücksichtigt. Es wurde die Rückwärts-Technik (backwards elimination) der Cox-Regressionsanalyse angewandt.

Zum Schluss wurde eine Konfigurationsfrequenzanalyse durchgeführt, um alle statistisch möglichen Markerkombinationen mit der wirklich beobachteten Frequenz dieser Kombinationen zu vergleichen. Man kann dadurch Typen definieren, bei denen die beobachtete Häufigkeit signifikant über der errechneten Häufigkeit liegt. Ebenso kann man Antitypen definieren, bei denen die beobachtete Häufigkeit unter der erwarteten Häufigkeit liegt. Alle Untersuchungen erfolgten unter der Annahme einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Patientengut

Insgesamt wurden GIST-Gewebeproben von 239 Patienten untersucht. Darunter waren 131 Männer (54,8%) und 108 Frauen (45,2%), welches einem Verhältnis Mann zu Frau von rund 1,2 : 1 entspricht (siehe Abbildung 8).

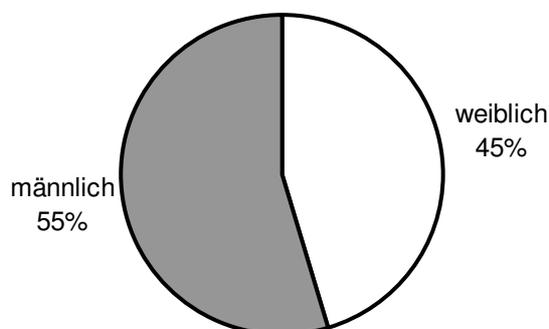


Abbildung 8: Geschlechtsverteilung im Kollektiv

Der Altersgipfel der Patienten lag bei 60-70 Jahren mit einem Median von 62 Jahren. Der Mittelwert betrug 60,7 Jahre mit einer Standardabweichung von  $\pm 14,3$  Jahren. Der jüngste Patient war 9 Jahre, der älteste Patient 91 Jahre alt. Daraus ergab sich eine Spannweite von 82 Jahren. In Abbildung 9 ist die Altersstruktur des Kollektivs dargestellt.

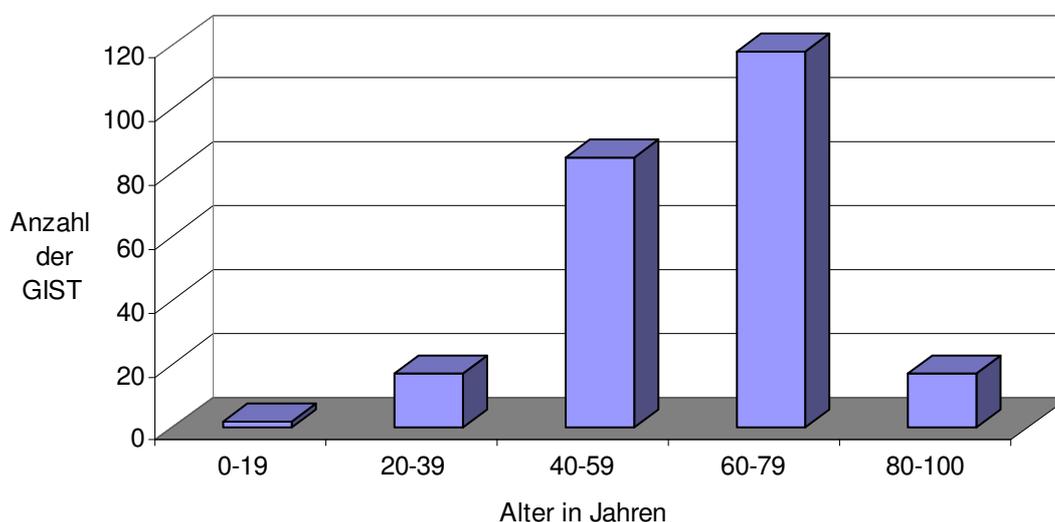


Abbildung 9: Altersstruktur des Kollektivs

Von 217 Gewebeprobe waren die Daten zur Lokalisation bekannt. Die Verteilung der Lokalisation der GIST ist in Abbildung 10 dargestellt. 127 GIST (58,5%) entstanden im Magen, 68 Tumoren (31,3%) fanden sich im Dünndarm, 7 GIST (3,2%) im Rektum, 6 Tumoren (2,8%) im Ösophagus, 4 Neoplasien (1,8%) jeweils im

Dickdarm und im Mesenterium und 1 GIST (0,5%) war im Retroperitoneum nachzuweisen.

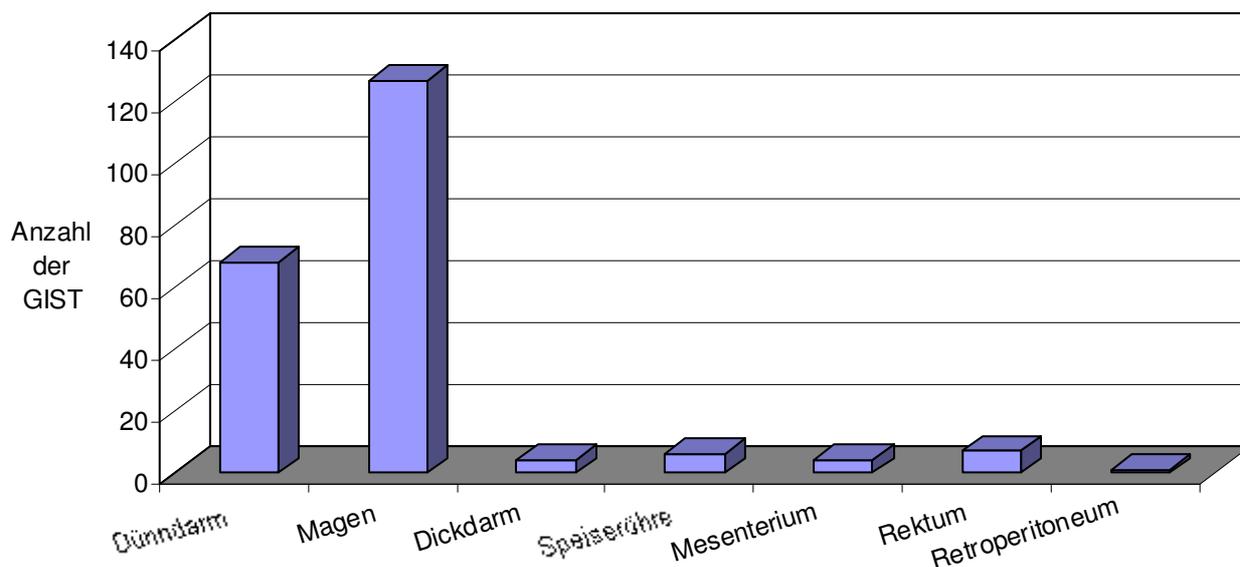


Abbildung 10: Verteilung der Lokalisation

Aus dem Kollektiv waren 145 Angaben zum histologischen Tumortyp vorhanden. Es hatten 56 eine rein spindelzellige (38,6%), 34 eine rein epitheloide (23,4%) und 55 eine gemischt spindelzellig-epitheloide Morphologie (37,9%). In Abbildung 11 ist dies grafisch dargestellt.

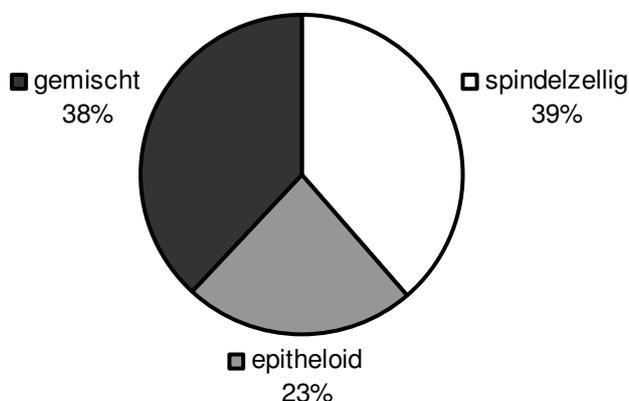


Abbildung 11: Verteilung des histologischen Typs

Unter den 94 vorhandenen Daten über das Auftreten von Nekrosen hatten 56 keine Nekrosen (59,6%), jedoch konnten bei 38 Gewebeproben (40,4%) Nekrosen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12).

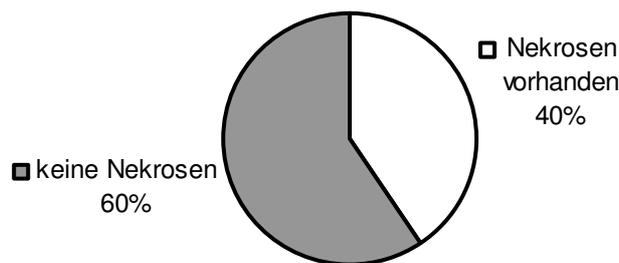


Abbildung 12: Auftreten von Nekrosen

Von 151 Patienten waren die Daten zum Auftreten von Metastasen bekannt. Davon traten bei 114 Patienten (75,5%) keine Metastasen auf. Bei 37 Patienten (24,5%) konnten jedoch schon Tochtergeschwülste nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13).

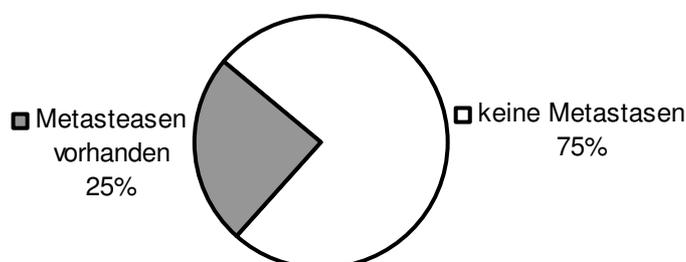


Abbildung 13: Auftreten von Metastasen

204 Angaben standen zur Analyse der Tumorgröße zur Verfügung. Der Mittelwert betrug 82,6mm mit einer Standardabweichung von  $\pm 70,7$ mm. Der Median lag bei 60mm. Der kleinste Tumor hatte eine Größe von 5mm und der größte Tumor wies eine Größe von 450mm auf. Dies ergibt eine Spannweite von 445mm. In Abbildung 14 ist die Verteilung der Tumorgrößen dargestellt.

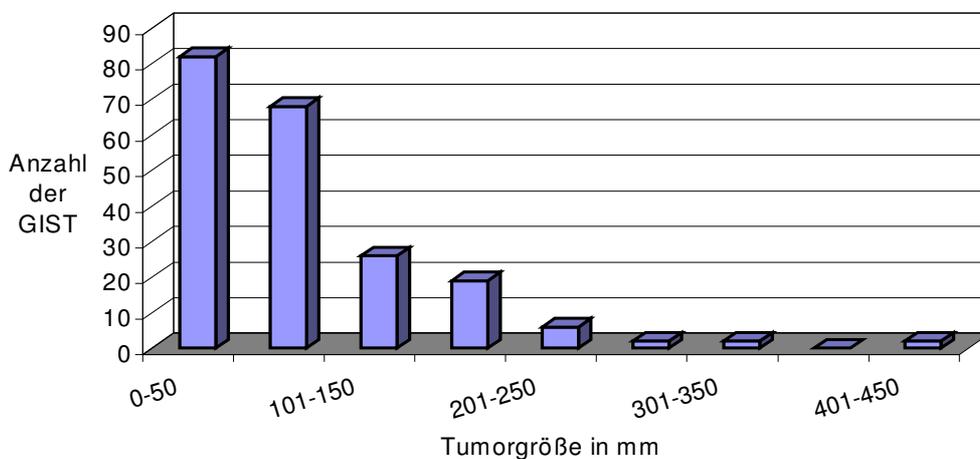


Abbildung 14: Verteilung der Tumorgröße

Im Kollektiv wurden 146 Fälle für den Mitoseindex analysiert. In Abbildung 15 ist die Verteilung der Mitoserate dargestellt. Die Spannweite reichte von 0 Mitosen/50HPF bis 412 Mitosen/50HPF. Der Mittelwert betrug 14,2/50HPF mit einer Standardabweichung von  $\pm 42,2/50HPF$ . Der Median lag bei 4/50HPF.

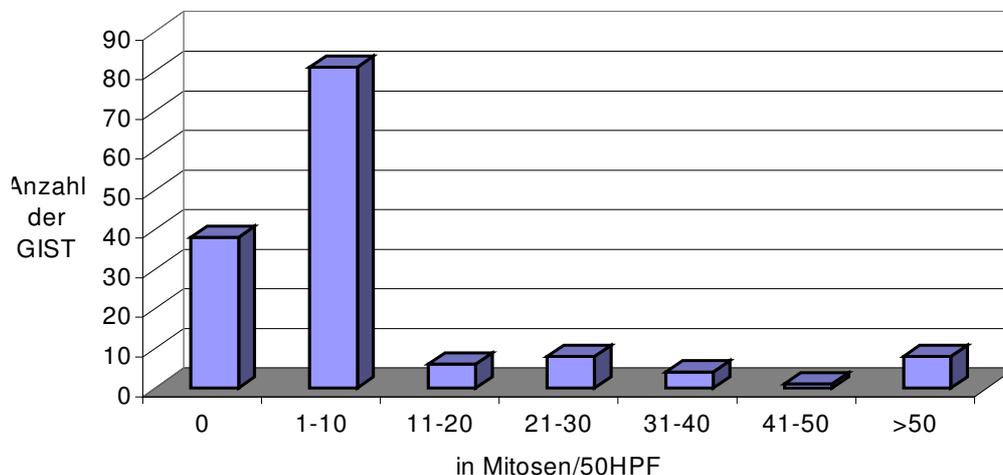


Abbildung 15: Verteilung der Mitoserate

Obwohl durch die beteiligten Zentren nicht komplette Daten zur Größe und zum Mitoseindex gelistet waren, wurden dennoch alle Tumoren nach den Risikokategorien klassifiziert. Es können vier Risikokategorien unterschieden werden: 19 Proben (7,9%) wiesen ein sehr niedriges Risiko auf, 49 hatten ein niedriges Risiko (20,5%), 36 ein intermediäres Risiko (15,1%) und 135 der Gewebeproben (56,5%) konnte man zur Hochrisikogruppe zählen (siehe Abbildung 16).

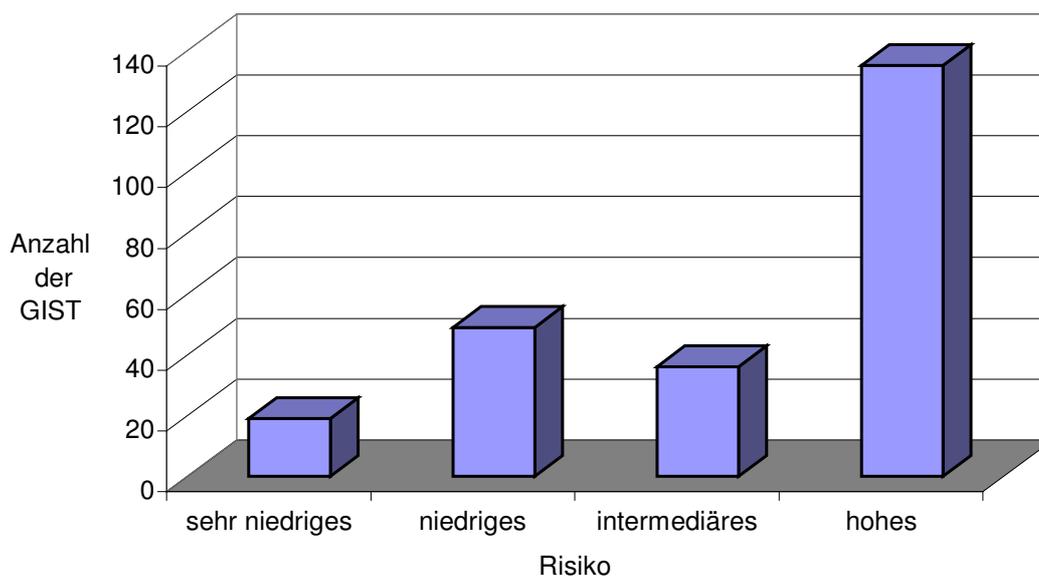


Abbildung 16: Verteilung nach den Risikokategorien

Das ermittelte Kollektiv ist im Vergleich mit der Literatur als repräsentativ anzusehen. Eine leichte Abweichung besteht in der Verteilung der Morphologie. Dort zeigten sich GIST mit 39% rein spindelzellige, 23% rein epitheloide und 38% spindelzellig-epitheloide Morphologie. In der Literatur ist die Verteilung mit 70% spindelzellige, 20% epitheloidzellige und 10% gemischtzellige Morphologie angegeben.

### 3.2. Expression von hTERT in 239 GIST

Von den 239 GIST zeigten in 151 Fällen (63,6%) weniger als 20% der Zellkerne eine Expression von hTERT (*Gruppe I*). 88 Fälle (36,4%) hatten eine Expression über 20% (*Gruppe II*) (siehe Abbildung 17).

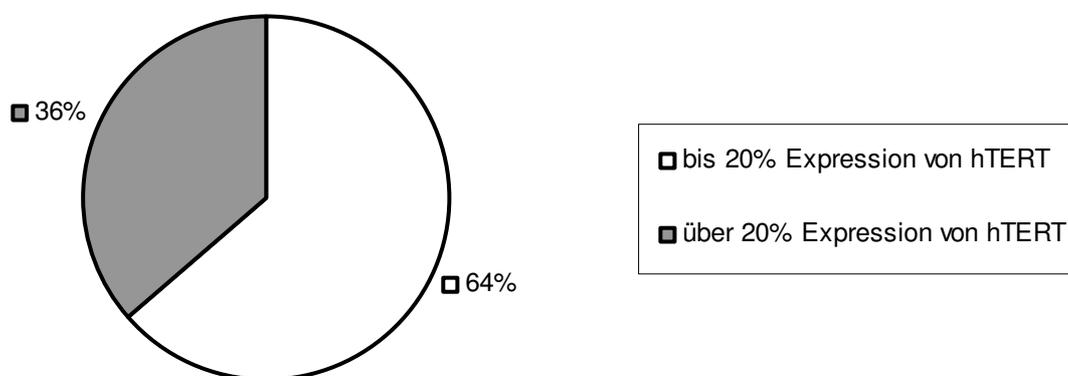


Abbildung 17: Expression von hTERT in GIST

### 3.3. Chi-Quadrat-Test

Um Zusammenhänge im Kollektiv zwischen den klassischen Parameter und der hTERT-Expression zu eruieren, wurden die Daten mit dem Chi-Quadrat-Test analysiert. Der exakte Test nach Fisher wurde verwendet, wenn die Voraussetzungen für den Chi-Quadrat-Test nicht erfüllt werden konnten.

#### 3.3.1. Korrelation der klassischen Parameter

Bei der untersuchten Datenmenge von  $n=115$  zeigte sich, dass der *histologische Typ* eine prognostische Signifikanz von  $p=0,004$  aufwies. Spindelzellige Tumoren hatten ein signifikant geringeres Versterben zur Folge als erwartet.

Die *Risikokategorien* wurden mit dem exakten Test nach Fisher analysiert. Sie korrelierten hochsignifikant mit  $p<0,0001$  bei 116 analysierten Fällen. Dabei verstarben in der *hohen Risikogruppe* signifikant mehr Patienten. Auch das *Auftreten von Nekrosen* wurde mit dem exakten Test nach Fischer untersucht. Die Signifikanz

betrug  $p=0,006$  bei 67 analysierten Daten. Es zeigte sich, dass Patienten *mit Nekrosen* signifikant häufiger verstarben.

*Metastasen* und *Nekrosen* waren hochsignifikant mit einander korreliert  $p<0,001$ . Sind keine Nekrosen vorhanden, zeigt die Analyse ein signifikant geringeres Auftreten von Metastasen. Sind jedoch Nekrosen vorhanden, kann ein höheres Auftreten als erwartet von Metastasen gefunden werden. Hier wurden 94 Fälle analysiert.

Mittels des exakten Tests nach Fisher ließ sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen den *Risikokategorien* und dem Auftreten von *Nekrosen* bei  $p<0,0001$  nachweisen. Es wurden 94 Fälle untersucht. Es war ein deutlich, vermehrtes Versterben von Patienten der hohen Risikogruppe, die zusätzlich Nekrosen aufwiesen, zu verzeichnen. Ebenso wurde eine hohe Signifikanz zwischen den *Risikokategorien* und dem Auftreten von *Metastasen* eruiert mit  $p=0,013$  bei 151 analysierten Fällen. Hier zeigte sich ein häufigeres Versterben der Patienten in der hohen Risikogruppe mit gleichzeitigem Auftreten von Metastasen.

### **3.3.2. Korrelation der hTERT-Expression mit den klassischen Parametern**

Bei der Suche nach Zusammenhängen zwischen der hTERT-Expression und den klassischen Parametern wurden 145 Daten mittels des Chi-Quadrat-Tests analysiert. Eine Korrelation konnte zwischen der *hTERT-Expression* und dem *histologischen Typ* festgestellt werden ( $p=0,016$ ). Es zeigte sich, dass Tumoren mit epitheloider Komponente häufiger eine hTERT-Überexpression (*Gruppe II*) aufwiesen.

Weiterhin konnte eine signifikante Korrelation ( $p=0,001$ ) zwischen der *hTERT-Expression* und dem *Überleben* nachgewiesen werden. In *Gruppe I* (bis 20% hTERT-Expression) starben weniger Patienten als in *Gruppe II* (über 20% hTERT-Expression) bei einer analysierten Datenanzahl von 116 Fällen.

Keine Korrelation konnte zwischen *hTERT-Expression* und dem *Geschlecht*, dem *Alter*, der *Lokalisation*, dem *Metastasen-* und *Nekrosenstatus* sowie den *Risikokategorien* eruiert werden.

### 3.4. Überlebensanalyse

Zur Erfassung der prognostischen Relevanz wurde die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse zuerst mit den klassischen prognostischen Parametern und danach mit der *hTERT-Expression* durchgeführt. Die Signifikanz wurde mit dem Log-Rank-Test geprüft. Bei 116 Proben waren Daten über den Beobachtungszeitraum vorhanden. Dieser betrug im Mittel 48 Monate (Minimum 2, Maximum 192 Monate). Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtkollektivs ist in Abbildung 18 dargestellt. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate des Gesamtkollektivs betrug 75,5% (20 von 116 Patienten gestorben).

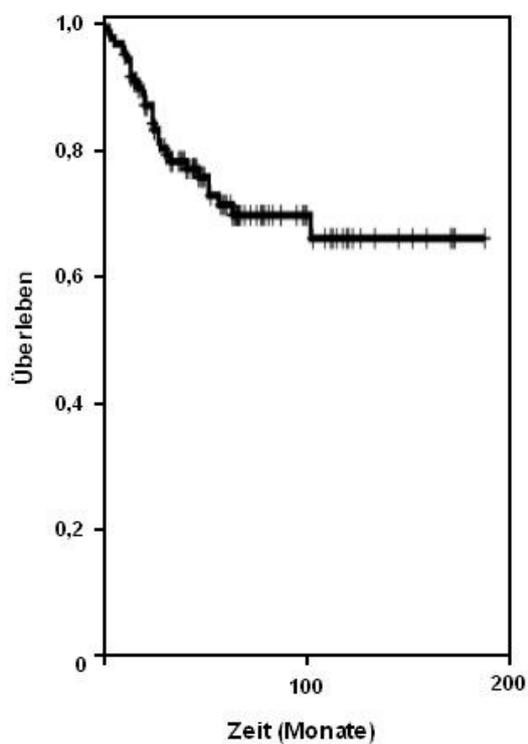


Abbildung 18: Überlebenskurve des Gesamtkollektivs

### 3.4.1. Klassische Parameter in Abhängigkeit von der Überlebenszeit

Die gängigen Malignitätskriterien, Tumorgröße und Mitosenanzahl/50HPF, sind zusammengefasst in den Risikokategorien. In der durchgeführten Überlebenszeitanalyse war diese prognostisch signifikant ( $p < 0,0001$ ) bei 115 analysierten Fällen. Die Fünf-Jahres-Überlebensraten sind in der Tabelle 5 und die Kaplan-Meier-Überlebenskurve ist in Abbildung 19 dargestellt.

Risikokategorien	Fünf-Jahres-Überlebensrate	gestorben
sehr niedriges Risiko	100,0%	0/9
niedriges Risiko	95,2%	1/20
intermediäres Risiko	88,8%	2/25
hohes Risiko	50,7%	26/61

Tabelle 5: Fünf-Jahres-Überlebensraten der Risikokategorien des Kollektivs

Die Fünf-Jahres-Überlebensrate der GIST mit Metastasen betrug 52,4% (11 von 27 gestorben). Die Patienten ohne Metastasen hatten eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 76,4% (18 von 89 gestorben). Die Signifikanz betrug  $p = 0,032$  (siehe Abbildung 20).

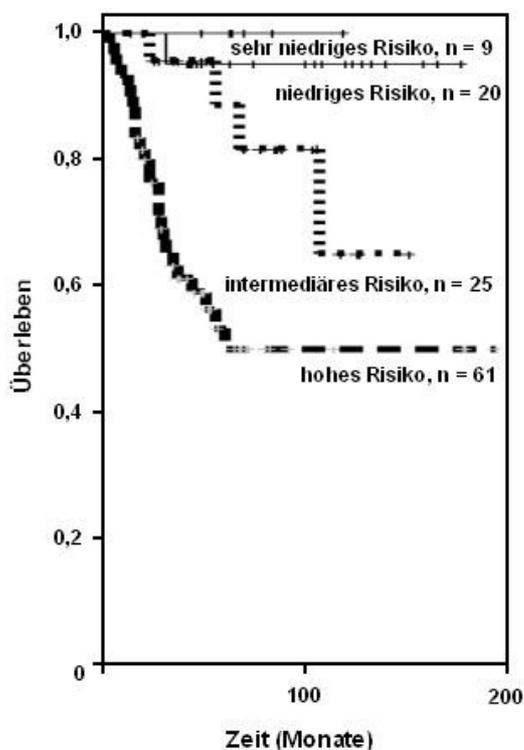


Abbildung 19: Überlebenskurve für die Risikokategorien

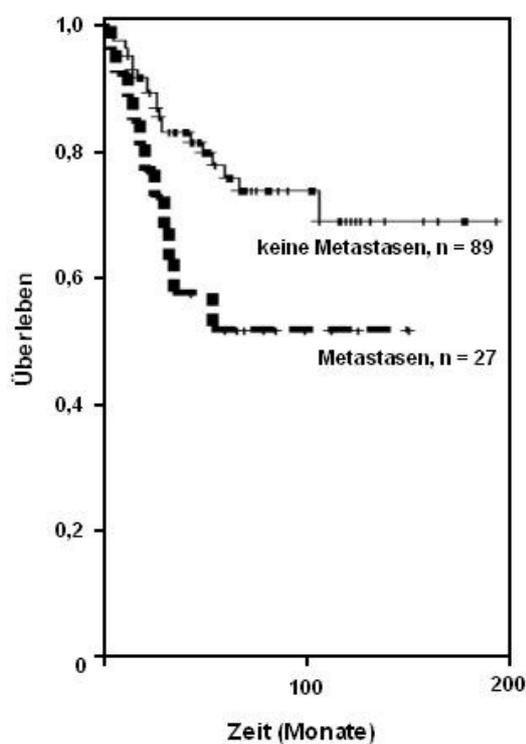


Abbildung 20: Überlebenskurve für den Metastasenstatus

Der *Nekrosenstatus* war von 67 Fällen bekannt. Patienten mit Nekrosen zeigten eine schlechtere Prognose als Patienten ohne Nekrosen. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate der Patienten, die Nekrosen aufwiesen, ergab 64,8% (9 von 28 gestorben). Für Patienten, die keine Nekrosen im Tumorbereich hatten, ergab die Fünf-Jahres-Überlebensrate 94,4% (2 von 39 gestorben) bei  $p=0,0015$  (siehe Abbildung 21).

Bezogen auf dem *histologischen Typ* waren nur in 115 Fällen Daten zum Überleben vorhanden. Patienten mit epitheloider Morphologie oder mit Mischmorphologie zeigten eine signifikant verkürzte Überlebenszeit im Gegensatz zu Patienten mit rein spindelzelliger Morphologie. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate betrug 58,2% (10 von 29 gestorben) für Patienten mit rein epitheloidzelligem Tumoren und 61% (13 von 43 gestorben) für Patienten mit gemischt spindelzellig-epitheloider Morphologie. Dies steht im Gegensatz zu 89,8% (4 von 43 gestorben) für Patienten mit rein spindelzelligen Tumoren. Die Signifikanz betrug  $p=0,0069$  (siehe Abbildung 22).

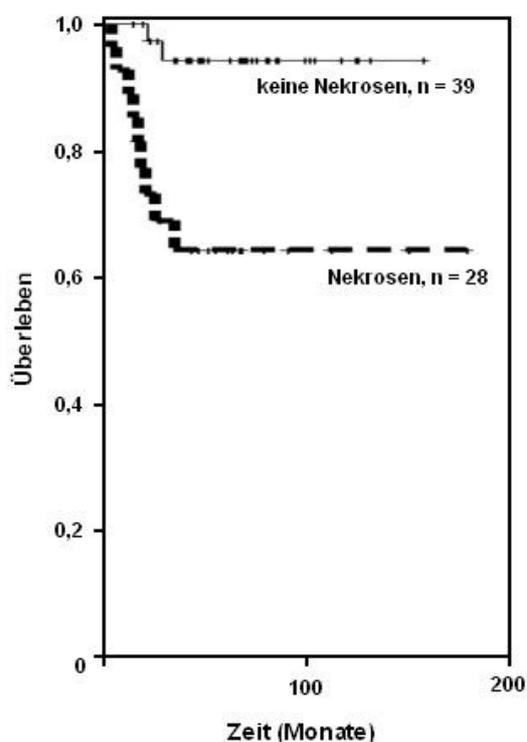


Abbildung 21: Überlebenskurve für den Nekrosenstatus

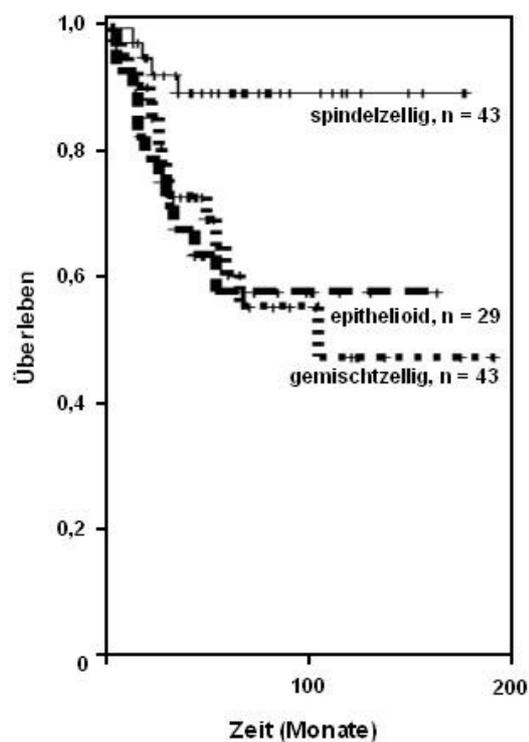


Abbildung 22: Überlebenskurve für die Morphologie

Prognostisch nicht signifikant waren die *Lokalisation*, das *Geschlecht* und das *Alter*.

### 3.4.2. hTERT-Expression für Überleben

Um die prognostische Relevanz der *hTERT-Expression* zu eruieren, wurde die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse durchgeführt. Dabei ergab sich eine hohe Signifikanz von  $p=0,0013$  bei 116 analysierten Fällen. Patienten mit hTERT-Überexpression (*Gruppe II*) zeigten ein signifikant kürzeres Überleben als Patienten mit einer hTERT-Expression bis 20% (*Gruppe I*). Dies spiegelt sich auch in der Fünf-Jahres-Überlebensrate von 86,2% (7 von 59 gestorben) in der *Gruppe I* im Gegensatz zu 56,1% (22 von 57 gestorben) in der *Gruppe II* wieder (siehe Abbildung 23).

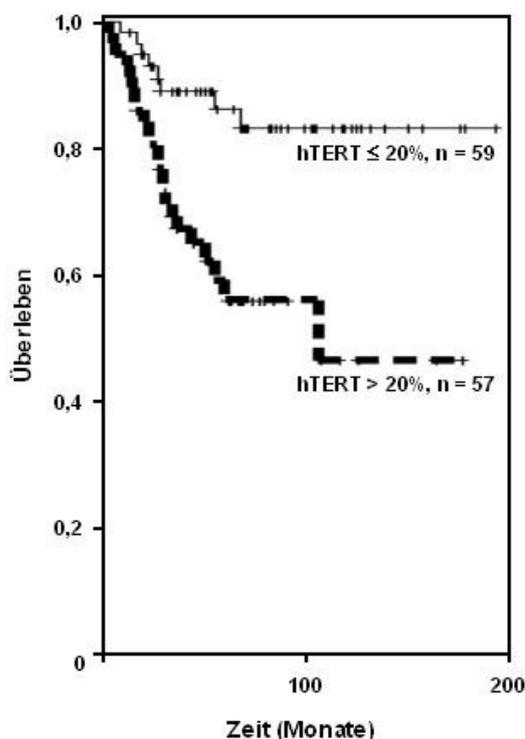


Abbildung 23: Überlebenskurve für die hTERT-Expression

### 3.4.3. hTERT-Expression für Überleben in Subgruppen

Da die *hTERT-Expression* eine prognostische Relevanz besonders für bestimmte Gruppen aufweisen könnte, wurden die Überlebensanalysen mit einzelnen Untergruppen auf Signifikanz geprüft.

In der Frauengruppe mit 48 analysierten Fällen sowie in der Männergruppe mit 68 Fällen war die hTERT-Expression mit  $p=0,014$  und  $p=0,029$  signifikant. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate war bei den *Frauen* in *Gruppe I* 91,4% (2 von 25 gestorben) und in *Gruppe II* 58,7% (7 von 23 gestorben). Bei den *Männern* betrug die Fünf-

Jahres-Überlebensrate in *Gruppe I* 81,9% (5 von 34 gestorben) und in *Gruppe II* 54,2% (14 von 34 gestorben) (siehe Abbildung 24 und 25).

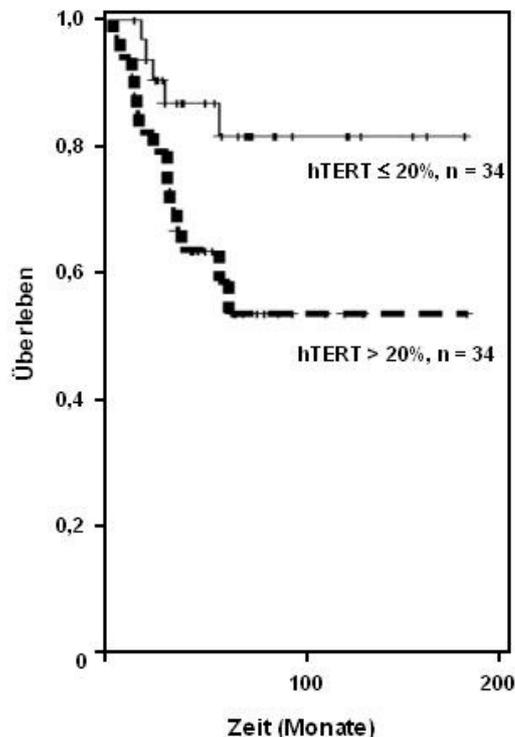
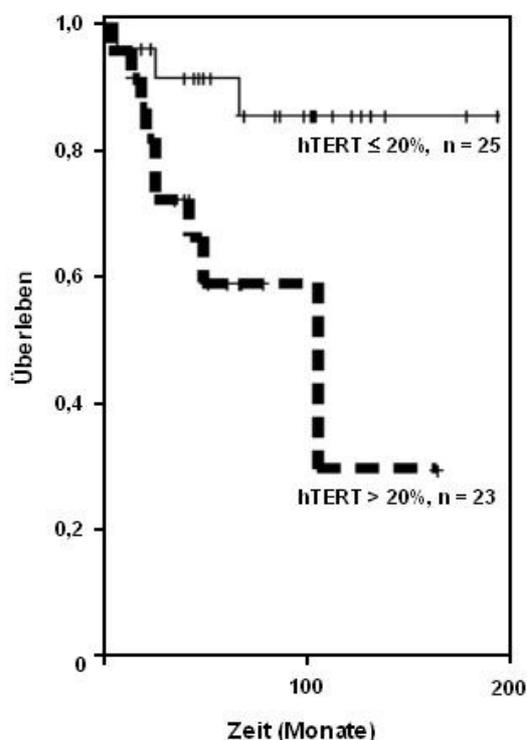


Abbildung 24: Überlebenskurve der Frauen und hTERT

Abbildung 25: Überlebenskurve der Männer und hTERT

In der Gruppe mit den im Magen lokalisierten GIST, wurden 65 Fälle analysiert. Die Signifikanz war mit  $p=0,0008$  sehr hoch. Es zeigte sich, dass eine hTERT-Überexpression in der Magengruppe ein signifikant verkürztes Überleben bedeutet. 93,6% (2 von 34 gestorben) betrug die Fünf-Jahres-Überlebensrate in der *Gruppe I* der hTERT-Expression und 54,1% (13 von 31 gestorben) in der *Gruppe II*. In den anderen Subgruppen der *Lokalisation* ergab die Analyse von der hTERT-Expression keinen weiteren prognostischen Wert (siehe Abbildung 26).

Es konnte eine Risikogruppe in der Gruppe der nicht-metastasierten GIST identifiziert werden, die hTERT überexprimierten. In der Gruppe der GIST ohne Metastasen ergab die Fünf-Jahres-Überlebensrate in der *Gruppe I* 95,2% (2 von 45 gestorben). In der *Gruppe II* betrug sie 57,3% (16 von 44 gestorben). Hier wurden 89 Fälle untersucht bei einer Signifikanz von  $p=0,0002$  (siehe Abbildung 27).

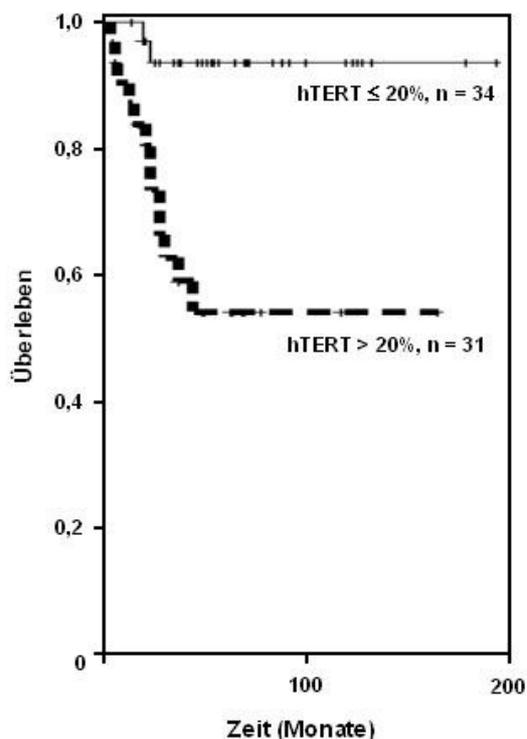


Abbildung 26: Überlebenskurve der Magen-GIST-Subgruppe und hTERT

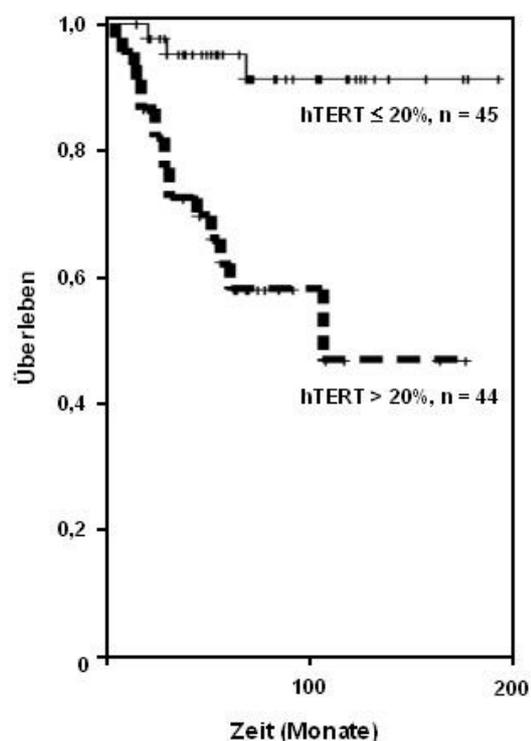


Abbildung 27: Überlebenskurve der nicht-metastasierten-GIST-Subgruppe und hTERT

Bezüglich des *histologischen Typs* konnte auch eine Subgruppe über die hTERT-Expression definiert werden. In der Subgruppe, die eine reine epitheloide Morphologie oder Anteile einer epitheloiden Morphologie besaßen, konnte ein kürzeres Überleben nachgewiesen werden bei einer Signifikanz von  $p=0,012$  und 72 untersuchten Fällen. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate der *Gruppe I* betrug 78,3% (6 von 33 gestorben) und der *Gruppe II* 45,1% (16 von 39 gestorben) (siehe Abbildung 28). In der Subgruppe der rein spindelzelligen Morphologie ergab die hTERT-Expression keinen zusätzlichen prognostischen Wert.

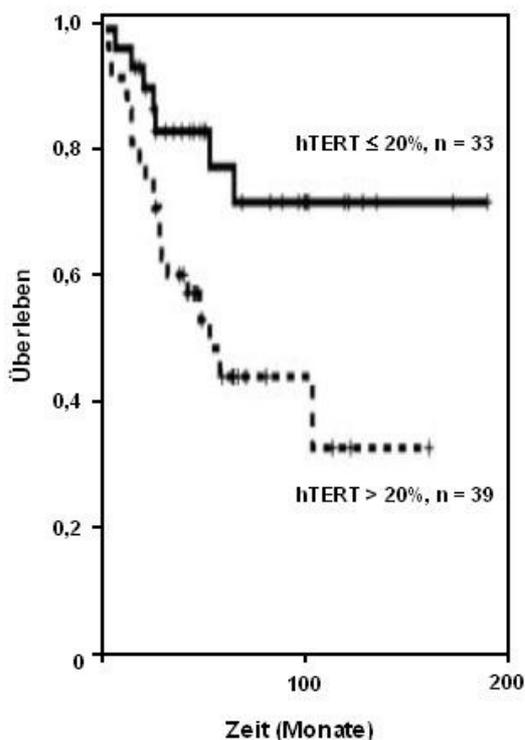


Abbildung 28: Überlebenskurve der epitheloiden GIST-Subgruppe und hTERT

In der Subgruppe, in der keine Nekrosen existierten, wurden nur 39 Daten untersucht. hTERT kann keine prognostisch günstigere Subgruppe herausfiltern,  $p=0,0889$ . Allerdings war auffällig, dass es in der *Gruppe II* der hTERT-Expression zwei Patienten gab, die sehr früh nach 29 Monaten verstorben waren. In der *Gruppe I* gab es keine Sterbefälle.

In der Niedrigrisikogruppe (sehr niedriges und niedriges Risiko) war ein Patient verstorben. Dieser Patient zeigte eine hTERT-Überexpression. Eine Kaplan-Meier-Überlebensanalyse zeigte sich als nicht signifikant bei 55 Fällen. Allerdings waren die langen Überlebenszeiten von durchschnittlich 169 Monaten auffällig. In der *intermediären Risikosubgruppe* zeigte sich ein ähnliches Bild bei einer Fallzahl von 25. Zwei Patienten starben in der *Gruppe I* (bis 20% hTERT-Expression) und ebenfalls zwei in der *Gruppe II* (über 20% hTERT-Expression) bei durchschnittlichen Überlebenszeiten von 136 Monaten.

### 3.5. Cox-Regressionsanalyse

Um den Beitrag einzelner Parameter für das Risiko, am Tumor zu versterben, zu untersuchen, wurde das statistische Verfahren der Cox-Regression durchgeführt.

#### 3.5.1. Univariate Analyse

Die klassischen Parameter und die *hTERT-Expression* wurden zunächst univariat, mittels der Cox-Regressionsanalyse auf ihr Risikopotenzial hin untersucht. Das Ergebnis war signifikant bei  $p \leq 0,05$ . In Tabelle 6 sind die signifikanten Parameter dargestellt.

Parameter	Anzahl der Daten	Risiko	Signifikanz
<i>Nekrosen</i>	67	8,087	0,008
<i>Risikokategorie</i>	116	3,806	<0,001
<i>Metastasen</i>	116	2,187	0,038
<i>hTERT-Überexpression</i>	116	1,862	0,003
<i>histologischer Typ</i>	115	1,813	0,008
<i>Alter</i>	116	1,031	0,037

Tabelle 6: Univariate Analyse

Das höchste Risiko an der Krankheit zu versterben besitzen demnach Patienten, die Nekrosen aufweisen, gefolgt von den *Risikokategorien* und dem Vorhandensein von *Metastasen*. Patienten mit einer *hTERT-Überexpression* wiesen ein 1,9-fach erhöhtes Risiko auf, am Tumor zu versterben, gefolgt von dem *histologischen Typ* und dem *Alter*.

#### 3.5.2. Multivariate Analyse

Für die multivariate Überlebensanalyse wurden alle Parameter berücksichtigt, die sich zuvor in der univariaten Analyse als signifikant ( $p \leq 0,05$ ) gezeigt hatten. Diese Parameter waren: das Vorhandensein von *Metastasen* und *Nekrosen*, der *histologische Typ*, das *Alter*, die *Risikokategorien* und die *Expression von hTERT*. Diese Parameter wurden multivariat mit Bezug auf das Überleben analysiert. In Tabelle 7 sind die nach dem letzten Schritt der Regression übrig gebliebenen Parameter aufgelistet ( $p \leq 0,1$ ). Die *hTERT-Expression* ist demnach kein unabhängiger prognostischer Faktor für GIST.

Parameter	Anzahl der Daten	Risiko	Signifikanz
<i>Nekrosen</i>	66	5,150	0,053
<i>Metastasen</i>	66	3,958	0,065
<i>histologischer Typ</i>	66	1,788	0,086

Tabelle 7: Multivariate Analyse

### 3.6. Konfigurationsfrequenzanalyse

In der Konfigurationsfrequenzanalyse werden alle statistisch möglichen Markerkombinationen mit der wirklich beobachteten Frequenz verglichen. Die Analyse zeigte signifikante Ergebnisse zwischen der *hTERT-Expression* und dem Vorhandensein von *Metastasen*, der *Lokalisation*, den *Risikokategorien* und dem *Überleben*. In der Analyse wurden jeweils die Parameter *hTERT-Expression*, *Versterben* und einer der drei folgenden Marker geprüft: *Metastasen*, *Lokalisation Magen*, *Risikokategorien*. In der Tabelle 8 sind die Typen und Antitypen mit den in der Spalte 1 aufgelisteten zugehörigen Parametern dargestellt.

Es konnten 3 Typen definiert werden, bei denen die beobachtete Häufigkeit signifikant über der statistisch errechneten Häufigkeit lag. Diese waren:

- *hTERT-Überexpression/Lokalisation Magen/Versterben*
- *keine hTERT-Überexpression/sehr niedrige/niedrige Risikogruppe/Überleben*
- *hTERT-Überexpression/intermediäre/hohe Risikogruppe/Versterben*

Des Weiteren konnten drei Antitypen definiert werden, bei denen die beobachtete Häufigkeit unter der statistisch erwarteten Häufigkeit lag. Diese lauten:

- *keine hTERT-Überexpression/keine Metastasen/Versterben*
- *keine hTERT-Überexpression/Lokalisation Magen/Versterben*
- *keine hTERT-Überexpression/sehr niedrige/niedrige Risikogruppe/Versterben*

<b>Typen</b>	<b>Antityp</b>	<b>Antityp</b>	<b>Antityp</b>	<b>Typ</b>	<b>Typ</b>	<b>Typ</b>
<i>hTERT-Expression</i>	≤20%	≤20%	≤20%	>20%	>20%	≤20%
<i>Metastasen</i>	keine					
<i>Lokalisation</i>		<i>Magen</i>		<i>Magen</i>		
<i>Risikokategorie</i>			<i>sehr niedrig/ niedrig</i>		<i>intermediär/ hoch</i>	<i>sehr niedrig/ niedrig</i>
<i>gestorben</i>	ja	ja	ja	ja	ja	nein
<i>beobachtete Fälle</i>	3	2	0	13	22	18
<i>erwartete Fälle</i>	12,1	7,758	4,078	7,138	11,293	11,181
<i>Signifikanz</i>	0,009	0,039	0,04	0,028	<0,001	0,04

Tabelle 8: Konfigurationsfrequenzanalyse

## 4. Diskussion

### 4.1. hTERT - ein prognostischer Marker für GIST

Eine gute Prognoseaussage kann in den meisten GIST-Fällen mittels der Risikokategorien getroffen werden (siehe Tabelle 3) (27). Auf Grund der neuen Therapie mit Imatinib und der zu treffenden Entscheidung, welchem Patienten man diese Therapie zuführt, untersuchten mehrere Arbeitsgruppen potenzielle Marker, um eine verbesserte Aussage über das Malignitätsrisiko zu finden.

Hinweise dafür zeigten sich in den Arbeiten von Sakurai et al. (1998), Günther et al. (2000) und Kawai et al. (2005), die eine erhöhte Telomeraseaktivität in GIST verbunden mit einer schlechteren Prognose feststellten (32, 36, 37). Allerdings beruhten die Ergebnisse auf sehr geringen Fallzahlen (29, 16 und 36 Fälle) aufgrund der aufwändigen TRAP-Analyse. Dabei wird frisches Tumorgewebe homogenisiert und die Telomeraseaktivität auf der Basis der mRNA mittels einer RT-PCR ermittelt. Jedoch ist eine direkte morphologische Zuordnung der Telomeraseaktivität im Gewebe nicht möglich. Auch der Einfluss von eventuell posttranskriptionellem Splicing kann nicht berücksichtigt werden (53).

Ein immunhistochemischer Nachweis von hTERT, der katalytischen Einheit der Telomerase, mittels Antikörper wird als neue, effektivere Methode zur Messung der Telomeraseaktivität verwendet (33, 51, 53). Sabah et al. (2004) wandten diese Technik an 23 GIST an und konnten die genaue Lokalisation und Stärke der hTERT-Expression im Gewebe detektieren. Sie stellten fest, dass eine erhöhte hTERT-Expression während der klinischen Progression der GIST auftrat (53).

#### 4.1.1. hTERT-Überexpression bedingt schlechtere Prognose in GIST

In dieser Arbeit über 239 GIST bestätigte sich die Aussage, dass in GIST eine erhöhte hTERT-Expression und damit eine erhöhte Telomeraseaktivität mit einer schlechteren Prognose verbunden ist ( $p=0,0013$ ). In der *Gruppe I* (bis 20% hTERT-Expression) verstarben 8 von 59 (13,6%) Patienten und in der *Gruppe II* (über 20% hTERT-Expression) verstarben 23 von 57 (40,4%). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer hTERT-Expression von über 20% ein um 1,9-fach erhöhtes Risiko haben, am Tumor zu versterben. In diesem Kollektiv exprimierten hTERT etwa 36,4% aller primären GIST. Sakurai et al. (1998) und Kawai et al. (2005) konnten 29% bzw. 39% der Telomeraseaktivität in GIST feststellen (32, 37). Allerdings sind

diese Angaben nicht direkt vergleichbar, aufgrund der unterschiedlichen Bewertungen bezüglich der als positiv für eine Telomeraseaktivität anzusehenden GIST. So wurde in dieser Arbeit GIST-Proben als positiv gewertet, deren immunhistochemisch angefärbten Zellkerne über 20% aller Zellkerne aufwiesen. Sakurai et al. (1998) und Kawai et al. (2005) benutzten den TRAP-Assay zur Bestimmung der Telomeraseaktivität.

#### 4.1.2. hTERT-Expression definiert Hochrisikogruppen

Es konnten relevante Subgruppen definiert werden, in denen eine hTERT-Überexpression verbunden mit einer deutlich schlechteren Prognose hochsignifikant war. Diese waren: *keine Metastasen* ( $p=0,0002$ ), *epitheloide Morphologie* ( $p=0,012$ ) und *Lokalisation Magen* ( $p=0,0008$ ). Das bedeutet, dass in diesen Subgruppen, die eher für einen harmloseren Verlauf sprechen, die hTERT-Expression eine zusätzliche Aussage über die weitere Prognose des Patienten liefert.

In der Konfigurationsfrequenzanalyse konnte der Zusammenhang zwischen der *hTERT-Expression*, der *Lokalisation Magen* sowie dem *Vorhandensein von Metastasen* weiter erhärtet werden. Für die Konstellation *hTERT-Überexpression/Lokalisation Magen/Versterben* konnte ein Typ definiert werden, da die beobachtete Häufigkeit dieser Konstellation signifikant über der statistisch errechneten Häufigkeit lag. Des Weiteren konnte ein Antityp für die Konstellation *keine hTERT-Überexpression/keine Metastasen/Versterben* definiert werden. Hier lag die beobachtete Häufigkeit signifikant unter der errechneten Häufigkeit. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass über die hTERT-Expression folgende Hochrisikogruppen definiert werden können: *keine Metastasen*, *epitheloide Morphologie* und *Lokalisation Magen*, die z. B. von einer adjuvanten Therapie mit Imatinib am ehesten profitieren könnten.

In der Subgruppe *keine Nekrosen* konnte auf Grund der geringen Fallzahl (39 Fälle) kein eindeutiger Zusammenhang mit einer hTERT-Überexpression nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich, dass in der *Gruppe I* (bis 20% hTERT-Expression) keiner und in der *Gruppe II* (über 20% hTERT-Expression) zwei Patienten jeweils schon nach 29 Monaten verstarben. Es wird angenommen, dass GIST ohne Nekrosen, jedoch mit erhöhter hTERT-Expression, ein deutlich erhöhtes Risiko zur schlechteren Prognose haben. Genauere Aussagen lassen sich erst nach einer

Prüfung mit wesentlich größeren Fallzahlen treffen. Ein ähnliches Bild zeigte sich in den Subgruppen *sehr niedriges/niedriges Risikogruppe* und *intermediäre Risikogruppe*. Allerdings konnten in der Konfigurationsfrequenzanalyse Antitypen identifiziert werden mit der Konstellation: *keine hTERT-Überexpression/sehr niedrig/niedrige Risikogruppe/Versterben*. Weiterhin konnte ein Typ abgrenzt werden, der sich über das Zusammentreffen von *hTERT-Überexpression/intermediäre/hohe Risikogruppe/Versterben* definiert. Es kann angenommen werden, dass über die hTERT-Expression weitere Hochrisikogruppen insbesondere in der Fraktion *niedrige Risikokategorie* identifiziert werden können. An einem Kollektiv mit größeren Fallzahlen in diesen Subgruppen sollten diese Zusammenhänge genauer überprüft werden.

#### **4.1.3. Korrelation: hTERT-Expression mit klinisch-pathologischen Faktoren**

Eine Korrelation der *hTERT-Expression* konnte mit dem *histologischen Typ* eruiert werden ( $p=0,016$ ). Es zeigten deutlich mehr GIST mit *epitheloider Morphologie* als mit *spindelzelliger Morphologie* eine hTERT-Überexpression auf. Keine Korrelation konnte zwischen der *hTERT-Expression* und den *Risikokategorien* bewiesen werden, was im Kontrast zu Sakurai et al. (1998), Sabah et al. (2004) und Kawai et al. (2005) steht. Sie berichteten über einer Korrelation zwischen *erhöhter Telomeraseaktivität* und der *Tumorgroße* sowie *ki67*, dem Proliferationsindex (32, 37, 53). Sakurai et al. (1998) sowie Günther et al. (2000) beschrieben, dass eine *erhöhte Telomeraseaktivität* in den Tumorkollektiven nicht mit dem *Geschlecht* korreliere (32). Auch in dieser Studie fand sich keine Korrelation der *hTERT-Expression* mit dem *Geschlecht*.

Des Weiteren berichteten Sakurai et al. (1998), keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der *hTERT-Expression* und dem *Alter* eruiert zu haben, was auch in dieser Untersuchung bestätigt werden kann. Gertler et al. (2004) beschrieben dieses Phänomen ebenso für kolorektale Karzinome, jedoch konnten sie zeigen, dass im anliegenden Nicht-Karzinomgewebe mit steigendem Alter eine hTERT-Expressionsabnahme stattfand (54). Iwama et al. (1998) konnten an peripheren gesunden Blutzellen zeigen, dass die Telomeraseaktivität in zwei Phasen verläuft. Bis zum 39. Lebensjahr nimmt die Telomeraseaktivität zu, danach fällt sie auf null ab. Im Gegensatz dazu steht die Telomerlänge, die fast kontinuierlich abnimmt (55).

Hakin-Smith et al. (2003) zeigten an Glioblastoma multiforme Gewebe keine Assoziation zwischen dem Alter im Tumorgewebe und der Telomeraseaktivität (56). Die hTERT-Expression scheint somit für Tumorgewebe nicht abhängig vom Alter des Patienten zu sein. Ferner konnte mit dem *Nekrosenstatus*, der *Lokalisation* und dem *Vorhandensein von Metastasen* keine signifikante Korrelation aufgezeigt werden.

#### 4.1.4. Cox-Regressionanalyse

Es wurde die Nützlichkeit von hTERT als möglichen prognostischen Marker für GIST mittels der Cox-Regressionsanalyse zunächst univariat geprüft. Dabei konnte festgestellt werden, dass unter anderem die *hTERT-Expression*, sowie auch die *Risikokategorien* sich als signifikant darstellten. Dies konnten Sakurai et al. (1998) ebenso zeigen (32).

In der multivariaten Prüfung konnten als unabhängige prognostische Faktoren *Nekrosen*, *Metastasen* sowie der *histologischen Typ* festgestellt werden. Sakurai et al. (1998) sowie Wong et al. (2003) ermittelten *Ki67*, als unabhängigen Faktor (57). In dem Kollektiv dieser Arbeit waren der Proliferationsindex und die hTERT-Expression nicht miteinander korreliert. Dabei prüften Sakurai et al. (1998) an 23 Fällen zusätzlich *p53*, *Vimentin*, *CD34*,  *$\alpha$ -SMA*, *Durchschnittsgröße* und *Ki67* auf einen möglichen prognostischen Wert und Wong et al. (2003) an 108 Fällen *Tumorgroße*, *Nekrosen*, *Mitoseindex*, *Ki67* und *p53*. Jedoch äußerten sie sich nicht zu dem Vorhandensein von Metastasen (32). Schneider-Stock et al. (2005) konnten den *Verlust von p16* in GIST als einen prognostischen Faktor definieren (28).

Sakurai et al. (1998), DeMatteo et al. (2000) und diese Arbeit konnten das *Alter* als nicht signifikant herausstellen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass dieser Parameter keinem Einfluss als prognostischer Faktor besitzt (9). Bei dem *Geschlecht* konnte ebenso kein Einfluss nachwiesen werden. Dies berichteten Sakurai et al. (1998) und Schneider-Stock et al. (2005) auch. Jedoch konnten DeMatteo et al. (2000) und Rutkowski et al. (2006) das *männliche Geschlecht* als prognostisch schlechten Faktor ausmachen (58). Es bleibt abzuwarten, ob sich das *männliche Geschlecht* als ein negativer prognostischer Faktor bestätigt.

Zusammenfassend scheinen das *Vorhandensein von Nekrosen* und *Metastasen* sowie *ki67* valide, unabhängige, prognostische Faktoren für GIST zu sein. Jedoch

zeigen diese Größen einen späten Tumorzeitpunkt an und können keine weitere Aussage über die Prognose in Nekrosen- und Metastasenfreien GIST treffen. In diesen Fällen ist die hTERT-Expression nützlich, da sie dort das Potenzial hat, Hochrisikogruppen zu definieren. In mehreren anderen Tumorentitäten konnte die Telomeraseaktivität bereits als unabhängiger Faktor aufgezeigt werden. So wiesen Bautista et al. (2007) dies für rektale Karzinome nach (59) und Poremba et al. (2002) zeigten diesen Fakt auch für Brustkrebs (60). Tabori et al. (2006) konnten die Telomeraseaktivität als prognostischen Faktor bei kindlichen intrakraniellen Ependyomen identifizieren. (51, 61). Hakin-Smith et al. (2003) zeigten an Glioblastoma multiforme Tumoren eine deutlich schlechtere Prognose für Tumoren mit Telomeraseaktivität als Tumoren, die den alternativen Verlängerungsprozess der Telomere (ALT) ohne Telomerase benutzen (56).

## **4.2. hTERT als aussichtsreicher Marker**

### **4.2.1. Anwendung mittels Microarrays und Immunhistochemie**

Obwohl der Gold-Standard in der Tumordiagnostik die morphologische Beurteilung ist, erwartet man von molekularen Markern, dass sie weniger subjektiv sind und stellt hohe Anforderungen. Zum einen soll der prognostische Wert eindeutig nachgewiesen sein, zum anderen wird erwartet, dass die Nachweismethode einfach, eindeutig, standardisiert, kostengünstig und wenig zeitintensiv ist. Das Herstellen der Gewebemicroarrays bedeutet eine starke Vereinfachung der pathologischen Auswertung von Kollektiven für die Forschung, jedoch auch zur Überprüfung von Laborstandards und Ringversuche. Als Nachteil ist hier zu beachten, dass die Lokalisation der Stanze im Tumorgewebe nicht mehr nachzuvollziehen ist. Auch muss das angrenzende Gewebe aus einem repräsentativen Bereich des Tumors stammen. Um vergleichbare Microarrays herstellen zu können, ist es notwendig ein standardisiertes Verfahren über die Institutsgrenzen hinaus festzulegen.

Des Weiteren revolutionierte das Verfahren der Immunhistochemie die pathologische Routinediagnostik. Es ist möglich, innerhalb von sehr kurzer Zeit ein spezifisches Antigen mittels Antikörper im Gewebe zu detektieren. Der Aufwand gegenüber der TRAP-Analyse ist um ein Vielfaches reduziert und mit Hilfe spezieller noch zu entwickelnder Kits könnte ein standardisierter Test für die Routinediagnostik angewendet werden. Hiyama et al. (2001) zeigten, dass mit Hilfe der

Immunhistochemie ein gutes Verfahren vorliegt, die Telomeraseaktivität mittels der hTERT-Expression schnell und sicher nachzuweisen (62). Tabori et al. (2006) und Liu et al. (2006) konnten dies in ihren Kollektiven bestätigen (33, 61).

#### 4.2.2. Telomeraseaktivität in Tumorstadien und Resektionsgrenzen

Bei einigen Tumorarten unterscheidet die Telomeraseaktivität verschiedene Tumorstadien. So konnten Yashima et al. (1998) eine Zunahme der Telomeraseaktivität von leicht verändertem Brustgewebe bis zu malignem Brustkrebs feststellen (34). Sommerfeld (1996) konnte bei der Prostata zeigen, dass durch die Telomeraseaktivität zwischen benigner Hyperplasie und Prostatakarzinom unterschieden werden kann und diese mit dem Gleason Score korreliert (63). Yao et al. (2006) zeigten an Ratten, dass die Telomeraseaktivität von der Hepatozytendegeneration über die Präkanzerose bis zum Leberkarzinom signifikant ansteigt (64). Weitere Beispiele sind in der Tabelle 9 dargestellt.

Gewebe	Probenart	Gewebe	positive Telomerase /Gesamtanzahl		
Kopf/Nacken	Mundflüssigkeit	Squamous Karzinom	14/44		
		Normal	1/22		
Lunge	Bronchiallavage	Lungenkarzinom gutartig	29/37 6/21		
		Pleuraerguss	Lungenkarzinom Benigne	64/70 3/52	
	Pankreas	Pankreassaft	Duktalkarzinom Adenom Pankreatitis	9/12 0/12 0/10	
Kolon	Kolonendoluminallavage	Kolonkarzinom entzündliche Darmerkrankung	9/15 0/9		
Mammae	Feinnadelaspiration	Invasives Karzinom Fibroadenom Fibrozystische Erkrankung	52/71 1/15 0/17		
		Normal	0/6		
		Prostata	Biopsie	Prostatakarzinom Benigne Prostatahyperplasie	17/19 0/44
Blase	Urin	Blasenkarzinom Karzinoma in situ Zystitis Normal	88/104 5/5 16/47 0/35		
		Ovar	Peritonealflüssigkeit	Ovarkarzinom Benigner Aszites	37/42 2/43
		Cervix	PAP-Abstrich	Cervixkarzinom intraepitheliale Läsion Normal	15/17 19/32 3/33

Tabelle 9: Telomerase in minimal-invasiver klinischer Diagnostik

Wichtig für die Patienten ist unter anderem eine zügige, genaue Diagnostik eines Primärtumors. Kommt es zur Operation, ist es von großer Bedeutung für die Stadieneinteilung und die folgende Therapie, ob man im Gesunden rezidiert hat und einen R0-Status erreicht hat. Straub et al. (2001) konnten in 10,4% Telomerase nachweisen aus außerhalb des Resektionsgebietes gewonnenen Biopsien bei Patienten nach einer radikalen Prostataektomie bei Prostatakarzinom im pT2-Stadium. Die Autoren schlossen daraus, dass die Telomerase ein potenzieller Parameter für das molekulare Staging von Resektionsgrenzen ist (65). Jedoch war die Fallzahl mit 48 nicht sehr hoch und Verlaufsdaten zum Überleben der Patienten sind nicht vorhanden. Fabricius et al. (2003) untersuchten Basalzellkarzinome und deren Resektionsgrenzen. Die Gruppe stellte fest, dass Patienten mit einem Telomerase-positiven und histologisch tumorfreien Resektionsrand eine signifikant kürzere rückfallfreie Periode aufzeigten als Patienten mit Telomerase-negativen und histologisch tumorfreiem Resektionsrand (66). In diesem Forschungsfeld ist somit noch viel Engagement notwendig, um den Nachweis der Telomerase als molekularen Marker für Resektionsränder zu etablieren.

#### **4.2.3. Telomeraseaktivität in Körperflüssigkeiten**

Der Nachweis der Telomeraseaktivität ist nicht auf einen Gewebeverband beschränkt. Yao et al. (2006) konnten nachweisen, dass bei Hepatozellulärem Karzinom eine deutlich erhöhte Telomeraseaktivität im Serum der Patienten zu verzeichnen war (64). Dies erweitert das diagnostische Feld um ein Vielfaches. Da auch GIST eine sehr gut durchblutete Tumorentität darstellen und der Metastasierungsweg bevorzugt lokal oder hämatogen erfolgt, kann die Untersuchung des Serums von Patienten mit GIST auf die Telomeraseaktivität von großer Bedeutung sein.

Kinoshita et al. (1997) konnten im Urin bezogen auf Blasenkrebs für die Telomeraseaktivität eine Sensitivität von 89% im Gegensatz zur Zytologie mit einer Sensitivität von 42% eruieren. Viel wichtiger erscheint jedoch der Fakt, dass im Tumorstadium 1 die Telomeraseaktivität in 75% positiv detektiert wurde und die Zytologie nur in 8% (67, 68). Die Arbeitsgruppe um Botchkina (2005) konnte an 56 Patienten nach einer Prostatamassage in Form einer rektalen digitalen Untersuchung, anhand des Urins Prostatazellen auffindig machen. Es konnte für

diesen Test für die Telomeraseaktivität eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 88,6% im Gegensatz zum Serum-PSA von 88,9% und 76,7% nachgewiesen werden. Sehr interessant ist, dass 12% der benignen Prostatahyperplasie eine deutliche Überexpression der Telomeraseaktivität aufwiesen. Die Autoren hegen den Verdacht, dass anhand der erhöhten Telomeraseaktivität ein neuer prognostischer Marker für ein sehr frühes Prostatakarzinom noch im benignen Prostatahyperplasie-Stadium gefunden wurde (69).

Die Gruppe um Tangkijvanich et al. (1999) untersuchten Aszitespunktate von Peritonealkarzinomatose-Präparaten und dem Hepatozellulärem Karzinom. Es konnte festgestellt werden, dass die Telomeraseaktivität im Gegensatz zur Zytologie eine Sensitivität von 76% zu 40% und eine Spezifität von 95,7% zu 100% aufwiesen. Die Autoren schlossen daraus, dass die Telomeraseaktivität ein nützlicher Detektor für frühe intraperitoneale Metastasen ist (70). Ein ebenso aussagekräftiges Ergebnis bei Pleurapunktaten erzielte die Gruppe um Yang (1998) (71).

Ein weiteres Untersuchungsmedium ist die Bronchiallavage. Yahata et al. (1998) konnten dabei eine Sensitivität für die Telomeraseaktivität von 82% im Gegensatz zur Zytologie von nur 41% feststellen (72). In einer Studie der Gruppe um Dejmek et al. (2000) konnte für die Telomeraseaktivität eine hohe Sensitivität bei Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom, großzelligem Lungenkarzinom und Kolonkarzinometastasen, nicht jedoch mit dem kleinzelligen Lungenkarzinom feststellen (73). Eine Routinediagnostik aller Bronchiallavagen insbesondere bei Hochrisikogruppen z. B. bei langjährigen Rauchern könnte eine frühzeitige Detektion eines Lungenkarzinoms bewirken.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich das diagnostische Feld für die Anwendung der Telomeraseaktivität nicht nur auf Gewebeverbände beschränkt, sondern auf normale sowie pathologische Körperflüssigkeiten erweitert werden kann. Auch weitere Körperflüssigkeiten oder Sekrete wie z. B. Liquor, Galle, Sputum, Abstriche, Sperma, Vaginalsekret oder Stuhlproben sollten auf Telomeraseaktivität hin analysiert werden.

### **4.3. hTERT als mögliches Therapieziel**

Bis 2002 blieb als einzige Therapieform die chirurgische Resektion. Mit der neuen Möglichkeit, Tyrosinkinaseinhibitoren (Imatinib) als Chemotherapeutikum zu verwenden, wurde die Überlebenszeit metastasierter GIST von 10-20 Monaten auf eine Drei-Jahres-Überlebensrate von 60% deutlich verlängert (11). Die katalytische Untereinheit der Telomerase, hTERT, ist in circa 90% aller Tumoren nachweisbar, jedoch auch auf Keimzellen, Stammzellen und aktivierten Lymphozyten. Uziel et al. (2005) konnten in c-kit-exprimierenden Zellen sowie nicht-exprimierenden Zellen eine Inhibition der Telomeraseaktivität mittels Imatinib zeigen. Es erfolgte eine 50%ige Proliferationshemmung. Die Inhibition der Telomeraseaktivität entstand durch post-translationale Modifikation und durch die frühe Herunterregulation von hTERT (74). Somit könnten additive Effekte der Telomeraseinhibition in der Tumorbekämpfung ausgenutzt werden.

#### **4.3.1. Immunotherapie – hTERT als Oberflächenantigen**

Die Expression des hTERT als Antigen erfolgt auf der Oberfläche der Zellen, welche auf Tumorzellen deutlich höher ist als auf normalen Zellen (75). Aus diesem Grund ist hTERT ein gutes Ziel für eine Tumorthherapie. Die Gefahr des Antigenverlusts durch Veränderung der Tumorzelle ist sehr gering einzuschätzen, da die Tumorzelle hTERT für ihr eigenes Überleben benötigt. Die Immunotherapie ist eine Möglichkeit, die Telomerase als Therapieziel zu nutzen, indem eine Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten gegen Telomerase-exprimierende Zellen erfolgt. Die T-Zellen lassen sich in Verbindung mit den MHC-Klasse-Molekülen und kurzen Peptiden, die an der Zelloberfläche präsentiert sind und aus der Zelle stammen, aktivieren und zerstören darauf hin die Zelle (75).

Die Gruppe um Vonderheide (1999) konnte zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mittels des Peptids I540 bei HLA-A2<sup>+</sup>-Status aktivieren und verschiedene Karzinomzellen lysieren. Da Stammzellen ebenfalls positiv für Telomerase sind, wurden diese auch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass CD34<sup>+</sup> Zellen nicht lysiert wurden. Die Arbeitsgruppe vermutete, dass hTERT das am weitesten exprimierte Tumor-assoziierte Antigen ist (76). Die Arbeitsgruppe um Bernhardt (2006) zeigte in einer Phase I/II Studie eine Immunantwort bei 24 von 38 Patienten. Die Patienten mit einem nicht-resektablen Pankreastumor wurden mit GV1001 geimpft, welches sie gut

vertragen. Die mediane Überlebenszeit in der intermediären Dosisgruppe betrug 8,6 Monate, ohne Therapie liegt die Überlebenszeit bei 3-6 Monaten. Die Ein-Jahres-Überlebensrate betrug 25% (77, 78). Jedoch handelte es sich um eine nicht-randomisierte Studie mit geringer Fallzahl. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese Ergebnisse zu verifizieren.

Weitere Peptide mit höherer Effizienz konnten identifiziert werden, die nicht nur CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei HLA-A2<sup>+</sup>-Status aktivieren können, sondern auch andere HLA-Varianten akzeptierten und auch CD4<sup>+</sup> Zellen aktivieren. Eine Polypeptid-Impfung gegen verschiedene Epitope ist sinnvoll, da jeder Patient einen spezifischen HLA-Status aufweist und nicht jedes Peptid exprimiert. Des Weiteren wird hTERT nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von Stammzellen, aktivierten Lymphozyten und Keimzellen exprimiert. Eine Therapie könnte zu Nebenwirkungen oder Autoimmunität führen. Jedoch gibt es bis jetzt in der Literatur keine Hinweise auf Beeinträchtigungen von normalen Zellen oder von Autoimmunität. Somit scheint ein fähiges Immuntherapeutikum in naher Zukunft möglich (75).

#### **4.3.2. Chemotherapie – Telomerase als Target**

Eine weitere Möglichkeit eine Anti-Tumorthherapie über die Telomerase zu bewirken, besteht in der Entwicklung und Verwendung von spezifischen Chemotherapeutika. Hier sind eine Reihe unterschiedlicher Ansatzpunkte vorhanden. Inhibiert man die Telomerase spezifisch, kann man nicht nur die Vermehrungskapazität der Tumorzellen einschränken, sondern eventuell auch den Tod der Tumorzelle veranlassen (46). Mittels Ribozymen kann man die RNA in der Zelle zerschneiden, die somit funktionslos ist. Die Gruppe um Saretzki (2001) verwendete ein hTERT-spezifisches Ribozym in Ovar tumorszellen. Es konnte gezeigt werden, dass es nach drei Tagen zu einer deutlichen Reduktion der Telomeraseaktivität und zum massiven Zellverlust kam (79). Die erfolgreiche Hemmung der Telomeraseexpression auf der Ebene der Transkription hat die Arbeitsgruppe um Pendino (2001) belegt. Sie verwendeten Retinsäure und bewirkten in Leukämiezellen eine Verkürzung der Telomere und den Zelltod (80).

Song et al. (2003) benutzten die hTERT-spezifische Tumorgentherapie bei Ovar tumorszellen und normalen Fibrozyten. Sie verwendeten dabei den hTERT-Promotor als Identifikator für Tumorzellen. Gebraucht eine Tumorzelle diesen

Promotor, wird gleichzeitig das mit eingeschleuste HSV-TK, ein Suizidgen, exprimiert und die Zelle geht in die Apoptose. Diesen Effekt konnte die Arbeitsgruppe nachweisen. Die normalen Fibrozyten gingen nicht in Apoptose, jedoch 55% der Ovarumorzellen (81).

Die Hauptschwierigkeit der Chemotherapie ist, wie man das therapeutische Agens bei Patienten in die Zelle einschleust und diese Technik für die klinische Routine tauglich gestalten kann. Diese Punkte stellen hohe Anforderungen an die zukünftige Forschung. Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Toxizität der Chemotherapeutika. Selbst wenn sie sehr spezifisch nur auf Telomerase-positive-Zellen wirken, könnten sie auch das Telomerase-positive-Knochenmark, die Keimzellen oder aktivierte Lymphozyten treffen. Die eventuellen Nebenwirkungen sind bisher noch nicht untersucht.

Zusammenfassend kann zu dem Ergebnis gekommen werden, dass hTERT ein neuer prognostischer Marker für GIST ist, insbesondere in den Subgruppen *keine Metastasen*, *Magentumoren* und *epitheloide Morphologie*. Des Weiteren ist hTERT ein sehr geeigneter Marker, der nicht nur im Gewebeverband nachweisbar ist, sondern sich auch in Körperflüssigkeiten. Mit Hilfe der Immunhistochemie und Microarrays ist er für die klinische Routinediagnostik sehr gut verwendbar. Auch bei der Resektionsgrenzenbestimmung kann hTERT als Marker eine große Rolle spielen. Aufgrund seiner fast spezifischen Tumorexpression ist hTERT ein gutes Ziel für die Antitumortherapie. Insbesondere die Immunotherapie kann sehr große Fortschritte aufweisen. Jedoch auch die Therapie mittels Chemotherapeutika ist ein Bereich der zukünftigen Antitumortherapie.

## 5. Zusammenfassung

**Hintergrund:** Es ist oft schwierig, das prognostische Verhalten von GIST vorauszusagen und die Patienten einer zukünftigen adjuvanten Imatinib-Therapie zuzuordnen. Es gab Hinweise, dass eine hTERT-Expression mit einem hohen malignen Potenzial in vielen Tumoren verbunden ist.

**Methoden:** Um den prognostischen Wert der hTERT-Immunhistochemie zu testen, wurden 239 primäre GIST, welche als Proben auf Microarrays gesammelt wurden, untersucht.

**Ergebnisse:** In dieser Arbeit konnte eine hTERT-Überexpression in 36,4% der GIST (über 20% der Zellkerne färbten sich an) nachweisen werden. Eine Korrelation zwischen hTERT-Expression und histologischem Typ konnte eruiert werden ( $p=0,004$ ), jedoch keine Korrelation mit Geschlecht, Alter, Lokalisation, Nekrosen, Metastasen und den Risikokategorien. Die Überlebensanalyse wurde anhand von 116 Fällen in einem Beobachtungszeitraum von 2-192 Monaten, Median 48 Monate untersucht. Patienten mit hTERT-positivem Tumor zeigten eine signifikant kürzere Überlebenszeit ( $p<0,001$ ) mit einem 1,9-fach höheren Risiko zu versterben. Die hTERT-Überexpression charakterisiert drei Subgruppen (keine Metastasen ( $p=0,0002$ ), epitheloide Morphologie ( $p=0,012$ ) und Lokalisation Magen ( $p=0,0008$ ) mit einer schlechteren Prognose. In der Konfigurationsfrequenzanalyse konnte unter anderem ein Typ (hTERT-Überexpression/intermediäre/hohe Risikogruppe/Versterben mit  $p<0,001$ ) und ein Antityp (keine hTERT-Überexpression/keine Metastasen/Versterben mit  $p=0,009$ ) identifizieren werden. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigten sich die Parameter Nekrosen, Metastasen und der histologische Typ als unabhängige prognostische Faktoren.

**Fazit:** Es kann festgestellt werden, dass die hTERT-Überexpression in GIST ein hohes prognostisches Potenzial hat, besonders bei epitheloider Morphologie, bei Magen-GIST und metastasenfrem GIST.

## 6. Abbildungen

1. Schematische Repräsentation von KIT- und PDGFR $\alpha$ -Molekülen und KIT- und PDGFR $\alpha$ -Mutationen in GIST.

In Anlehnung an:

Miettinen, M., J. Lasota: Gastrointestinal Stromal Tumors. Review on Morphology, Molecular Pathology, Prognosis, and Differential Diagnosis. Arch Pathol Lab Med. 130. 1466–1478 (2006)

2. Makroskopische und mikroskopische Darstellung von GIST

Institut für Pathologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

3. GIST im CT, MRT und der Verlauf im 18FDG-PET

A: Burkill, G.J.C., M. Badran, O. Al-Muderis, J.M. Thomas, I.R. Judson, C. Fisher, E.C. Moskovic: Malignant Gastrointestinal Stromal Tumor: Distribution, Imaging Features, and Pattern of Metastatic Spread. Radiology. 226. 527-532 (2003)

B: Shankar, S., E. van Sonnenberg, J. Desai, P.J. DiPiro, A. Van Den Abbeele, G.D. Demetri: Gastrointestinal Stromal Tumor: New Nodule-within-a-Mass Pattern of Recurrence after Partial Response to Imatinib Mesylate. Radiology. 235. 892-898 (2005)

C: Gold, J.S., R.P. DeMatteo: Combined Surgical and Molecular Therapy, The Gastrointestinal Stromal Tumor Model. Ann Surg. 244. 176–184 (2006)

4. Verlauf von GIST nach Imatinibtherapie im CT

Ryu, M-H., J-L. Lee, H.M. Chang, T.W. Kim, H.J. Kang, H.J. Sohn, J.S. Lee, Y-K. Kang: Patterns of Progression in Gastrointestinal Stromal Tumor Treated with Imatinib Mesylate. Japanese Journal of Clinical Oncology. 36.17-24; (2006)

5. Schemazeichnung der Zusammensetzung der Telomerase

In Anlehnung an:

Vortrag, Schneider-Stock, Regine  
Institut für Pathologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

6. Regulation der Telomerlänge in normalen Zellen und Krebszellen durch Telomerase

In Anlehnung an:

Keith, W.N., T.J. Evans, R.M. Glasspool: Telomerase and cancer: time to move from a promising target to a clinical reality. Journal of pathology. 195. 404-414 (2001)

7. Microarray, GIST gefärbt mit hTERT  
Institut für Pathologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
8. Geschlechtsverteilung im Kollektiv
9. Altersstruktur des Kollektivs
10. Verteilung der Lokalisation
11. Verteilung des histologischen Typs
12. Auftreten von Nekrosen
13. Auftreten von Metastasen
14. Verteilung der Tumorgroße
15. Verteilung der Mitoserate
16. Verteilung nach den Risikokategorien
17. Expression von hTERT in GIST
18. Überlebenskurve des Gesamtkollektivs
19. Überlebenskurve für die Risikokategorien
20. Überlebenskurve für den Metastasenstatus
21. Überlebenskurve für den Nekrosenstatus
22. Überlebenskurve für die Morphologie
23. Überlebenskurve für die hTERT-Expression
24. Überlebenskurve der Frauen und hTERT
25. Überlebenskurve der Männer und hTERT
26. Überlebenskurve der Magen-GIST-Subgruppe und hTERT
27. Überlebenskurve der nicht-metastasierten-GIST-Subgruppe und hTERT
28. Überlebenskurve der epitheloiden GIST-Subgruppe und hTERT

## 7. Tabellennachweis

1. Relative Frequenz der Häufigkeit der GIST an verschiedenen Lokalisationen und geschätzte Frequenz von malignen Tumoren an verschiedenen Lokalisationen.

Miettinen, M., J. Lasota: Gastrointestinal Stromal Tumors (GISTs): Definition, Occurrence, Pathology, Differential Diagnosis and Molecular Genetics. *Pol J Pathol.* 54. 3-24 (2003)

2. Mutationshäufigkeit in den Exonen des c-KIT-Gens und PDGFR $\alpha$ -Gens
3. Vermutetes Auftreten des aggressiven Verhaltens von GIST anhand eines definierten Risikos

Fletcher, C.D.M., J.J. Berman, C. Corless, F.Gorstein, J. Lasota, B.J. Longley, M. Miettinen, T.J. O'Leary, H. Remotti, B.P.Rubin, B. Shmookler, L.H. Sobin, S.W. Weiss: Diagnosis fo Gastrointestinal Stromal Tumors: A Consensus Approach. *Human Pathology.* 33. 459-465 (2002)

4. Telomeraseaktivität in menschlichen malignen Tumoren

Schneider-Stock, R., C. Boltze, A. Roessner: Telomerase und neue Aspekte in der Tumorbilogie. *Der Pathologe.* 3. 177-182 (2002)

5. Fünf-Jahres-Überlebensraten der Risikokategorien des Kollektives
6. Univariate Analyse
7. Multivariate Analyse
8. Konfigurationsfrequenzanalyse
9. Telomerase in minimal-invasiver klinischer Diagnostik

In Anlehung an:

McKenzie, K.E.: Application of telomerase research in the fight against cancer. *Molecular medicine today.* 3.114-122 (1999)

## 8. Literaturverzeichnis

- 1 Sarlomo-Rikala, M., A.J.Kovatich, A. Barusevicius, M. Miettinen: CD117: A Sensitive Marker for Gastrointestinal Stromal Tumors That Is More Specific Than CD34. *Modern Pathology*. 11. 728-734 (1998)
- 2 Hirota, S., K. Isozaki, Y. Moriyama, K. Hashimoto, T. Nishida, S. Ishiguro, K. Kawano, M. Hanada, A. Kurata, M. Takeda, G.M. Tunio, Y. Matsuzawa, Y. Kanakura, Y. Shinomura, Y. Kitamura: Gain-of-Function Mutations of c-kit in Human Gastrointestinal Stromal Tumors. *Science*. 279. 577-580 (1998)
- 3 Kindblom, L.G., H.E. Remotti, F. Aldenborg and J.M. Meis-Kindblom: Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT) Gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *American Journal of Pathology*. 152. 1259–1269 (1998)
- 4 Miettinen, M., J. Lasota: Gastrointestinal stromal tumors – definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch*. 438. 1-12 (2001)
- 5 Hohenberger, P., P. Reichardt, C. Stroszczyński, U. Schneider, D.K. Hossfeld: Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) - Tumorentität und Therapie mit Imatinib. *Deutsches Ärzteblatt* 100. 23. A-1612 (2003)
- 6 Joensuu, H., C. Fletcher, S. Dimitrijevic, S. Silberman, P. Roberts, G. Demetri: Management of malignant gastrointestinal stromal tumours. *The Lancet Oncology*. 3. 655-664 (2002)
- 7 Min, K.W., M. Leabu: Interstitial Cells of Cajal (ICC) and Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): facts, speculations, and myths. *J. Cell. Mol. Med*. 10. 995-1013 (2006)
- 8 Burkill, G. J.C., M. Badran, O. Al-Muderis, J.M. Thomas, I.R. Judson, C. Fisher, E.C. Moskovic: Malignant Gastrointestinal Stromal Tumor: Distribution, Imaging Features, and Pattern of Metastatic Spread. *Radiology*. 226. 527-532 (2003)
- 9 DeMatteo, R.P., J.J. Lewis, D. Leung, S.S. Mudan, J.M. Woodruff, M.F. Brennan: Two hundred gastrointestinal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg*. 231. 51-58 (2000)
- 10 Nilsson, B., P. Bümming, J.M. Meis-Kindblom, A. Odén, A. Dortok, B. Gustavsson, K. Sablinska, L-G. Kindblom: Gastrointestinal stromal tumors: The incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era. *Cancer*. 103. 821-829 (2005)
- 11 Reichardt, P., p. Hohenberger: Gastrointestinale Stromatumoren (GIST). UNI-MED Verlag AG. 1. Auflage. 2006. S. 16. ISBN 389599894X Bremen
- 12 Miettinen, M., J. Lasota: Gastrointestinal Stromal Tumors. Review on Morphology, Molecular Pathology, Prognosis, and Differential Diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*. 130. 1466–1478 (2006)

- 13 Mechttersheimer, G., T. Lehnert, R. Penzel, S. Joos, G. Egerer, H.F. Otto: Gastrointestinale Stromatumoren Eine morphologisch und molekular eigenständige Tumorentität mit neuer therapeutischer Perspektive. *Der Pathologe*. 24. 182–191 (2003)
- 14 Miettinen, M., J. Lasota: Gastrointestinal Stromal Tumors (GISTs): Definition, Occurrence, Pathology, Differential Diagnosis and Molecular Genetics. *Pol J Pathol*. 54. 3-24 (2003)
- 15 Corless, C.L., J.A. Fletcher, M.C. Heinrich: Biology of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 22. 3813-3825 (2004)
- 16 Taniguchi, M., T. Nishida, S. Hirota, K. Isozaki, T. Ito, T. Nomura, H. Matsuda, Y. Kitamura: Effect of c-kit Mutation on Prognosis of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Research*. 59. 4297-4300 (1999)
- 17 Haller, F., B. Gunawan, A. von Heydebreck, S. Schwager, H.-J. Schulten, J. Wolf-Salgó, C. Langer, G. Ramadori, H. Sültmann, L. Füzesi: Prognostic Role of E2F1 and Members of the CDKN2A Network in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clinical Cancer Research*. 11. 6589-6597 (2005)
- 18 Schneider-Stock, R., C. Boltze, J. Lasota, M. Miettinen, B. Peters, M. Pross, A. Roessner, T. Günther: High Prognostic Value of p16INK4 Alterations in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 21. 1688-1697 (2003)
- 19 Gold, J.S., R.P. DeMatteo: Combined Surgical and Molecular Therapy The Gastrointestinal Stromal Tumor Model. *Ann Surg*. 244. 176–184 (2006)
- 20 D'Amato, G., D.M. Steinert, J.C. McAuliffe, J. C. Trent: Update on the Biology and Therapy of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Control*. 12. 44-56 (2005)
- 21 van Roggen, J.F.G., M.L.F. van Velthuysen, P.C.W. Hogendoorn: The histopathological differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol*. 54. 96–103 (2001)
- 22 Blay, J.-Y., S. Bonvalot, P. Casali, H. Choi, M. Debiec-Richter, A. P. Dei Tos, J.-F. Emile, A. Gronchi, P. C. W. Hogendoorn, H. Joensuu, A. Le Cesne, J. Mac Clure, J. Maurel, N. Nupponen, I. Ray-Coquard, P. Reichardt, R. Sciot, S. Stroobants, M. van Glabbeke, A. van Oosterom, G. D. Demetri: Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors Report of the GIST Consensus Conference of 20–21 March 2004, under the auspices of ESMO. *Annals of Oncology*. 16. 566–578 (2005)
- 23 Fletcher, C.D.M., J.J. Berman, C. Corless, F. Gorstein, J. Lasota, B.J. Longley, M. Miettinen, T.J. O'Leary, H. Remotti, B.P. Rubin, B. Shmookler, L.H. Sobin, S.W. Weiss: Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumors: A Consensus Approach. *Human Pathology*. 33. 459-465 (2002)

- 24 Schäfer, H., P.M. Schneider, S.E. Baldus, E. Wolfgarten, A.H. Hölscher: Kombiniert laparoskopisch-endoskopische Resektion von Stromatumoren des Magens. *Zentralbl Chir.* 131. 206-209 (2006)
- 25 Casali, P.G., L. Jost, P. Reichardt, M. Schlemmer, J.-Y. Blay: Gastrointestinal stromal tumors: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 18. 27–29 (2007)
- 26 Roskoski, R. Jr.: Sunitinib: A VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 356. 323–328 (2007)
- 27 Miettinen, M., J. Lasota: Gastrointestinal Stromal Tumors: Review on Morphology, Molecular Pathology, Prognosis, and Differential Diagnosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* 130. 1466–1478 (2006)
- 28 Schneider-Stock, R., C. Boltze, J. Lasota, B. Peters, C.L. Coreless, P. Ruemmele, L. Terracciano, M. Pross, L. Insabato, D. Di Vizio, I. Iesalnieks, S. Dirnhofer, A. Hartmann, M. Heinrich, M. Miettinen, A. Roessner, L. Tornillo: Loss of p16 Protein Defines High-Risk Patients with Gastrointestinal Stromal Tumors: A Tissue Microarray Study. *Clinical Cancer Research.* 11. 638-645 (2005)
- 29 Pross, M., T. Günther, H. Lippert: *Gastroisntestinale Stromatumoren. Diagnostik und klinisches Management.* Druckerei Schlüter GmbH & Co. KG. S. 63 ISBN 3000154450
- 30 Yu, C., C. Fletcher, P. Newman, J. Goodlad, J. Burton, D. Levison: A comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar organizer region (AgNOR) staining, and histological grading in gastrointestinal tumors. *J Pathol.* 166. 147-152 (1992)
- 31 Imamura, M., H. Yamamoto, N. Nakamura, Y. Oda, T. Yao, Y. Kakeji, H. Baba, Y. Maehara, M. Tsuneyoshi: Prognostic significance of angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Modern Pathology.* 20. 529–537 (2007)
- 32 Sakurai, S., M. Fukayama, Y. Kaizaki, K. Saito, K. Kanazawa, M. Kitamura, Y. Iwasaki, T. Hishima, Y. Hayashi, M. Koike: Telomerase Activity in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer.* 83. 2060-2066 (1998)
- 33 Liu, J-L., L-Y. Ge, G-N. Zhang: Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase expression in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 21. 465-467 (2006)
- 34 Yashima, K., S. Milchgrub, L.S. Gollahon, A. Maitra, M.H. Saboorian, J.W. Shay, A.F. Gazdar: Telomerase Enzyme Activity and RNA Expression during the Multistage Pathogenesis of Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research.* 4. 229-234 (1998)

- 35 Aogi, K., A. Woodman, V. Urquidi, D.C. Mangham, D. Tarin, S. Goodison: Telomerase Activity in Soft-Tissue and Bone Sarcomas. *Clinical Cancer Research*. 6. 4776-4781 (2000)
- 36 Günther, T., R. Schneider-Stock, C. Häckel, M. Pross, H.-U. Schulz, H. Lippert, A. Roessner: Telomerase Activity and Expression of hTRT and hTR in Gastrointestinal Stromal Tumors in Comparison with Extragastrintestinal Sarcomas. *Clinical Cancer Research*. 6. 1811-1818 (2000)
- 37 Kawai, J., Y. Kodera, M. Fujiwara, Y. Kasai, T. Nagasaka, M. Koike, K. Hibi, K. Ito, S. Akiyama, A. Nakao: Telomerase activity as prognostic factor in gastrointestinal stromal tumors of the stomach. *Hepatogastroenterology*. 52. 959-964 (2005)
- 38 Feng, L., W.D. Funk, S-S. Wang: The RNA component of human telomerase. *Science*. 269. 1236-1241 (1995)
- 39 Yu, G-L., J.D. Bradley, L.D. Attardi, E.H. Blackburn: In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature*. 344. 126-132 (1990)
- 40 Kim, N.W., M.A. Piatyszek: Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Celles and Cancer. *Science*. 266. 2011-2015 (1994)
- 41 Chang, J. T-, Y-L. Chen, H-T. Yang, C-Y. Chen, A-J. Cheng: Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits. *Eur. J. Biochem*. 269. 3442–3450 (2002)
- 42 Blackburn, E.H.: Structure and function of telomeres. *Nature*. 350. 569-573 (1991)
- 43 Zakian, V.A.:Telomeres: Beginning to Understand the End. *Science*. 270. 1601-1607 (1995)
- 44 Rhyu, M.S.:Telomeres, Telomerase, and Immortality. *Journal of the National Cancer Institute*. 87. 884-894 (1995)
- 45 Keith, W.N., T.J. Evans, R.M. Glasspool: Telomerase and cancer: Time to move from a promising target to a clinical reality. *Journal of Pathology*. 195. 404-414 (2001)
- 46 Hsu, Y., J. Lin: Telomere and telomerase as Targets for anti-cancer and regeneration therapies. *Acta Pharmacologica Sinica*. 26. 513-518 (2005)
- 47 Bodnar, A.G., M. Ouellette, M. Frolkis: Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 279. 349-52 (1998)
- 48 Watson, J.D.: Origin of concatemeric DNA. *Nature*. 239. 197-201 (1972)

- 49 Zhang, A., C. Zheng, C. Lindvall: Frequent Amplification of the Telomerase Reverse Transcriptase Gene in Human Tumors. *Cancer Research*. 60. 6230-6235 (2000)
- 50 Hahn, W.C., S.A. Stewart, M.W. Brooks: Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature Medicine*. 5. 1164-1170 (1999)
- 51 Shin, J-S., A. Hong, M.J. Solomon, C.S. Lee: The role of telomeres and telomerase in the pathology of human cancer and aging. *Pathology*. 38. 103–113 (2006)
- 52 Schneider-Stock, R., C. Boltze, A. Roessner: Telomerase und neue Aspekte in der Tumorbologie. *Der Pathologe*. 3. 177-182 (2002)
- 53 Sabah, M., R. Cummins, M. Leader, E. Kay: Expression of Human Telomerase Reverse Transcriptase in Gastrointestinal Stromal Tumors Occurs Preferentially in Malignant Neoplasms. *Hum Pathol*. 35. 1231-1235 (2004)
- 54 Gertler, R., R. Rosenberg, D. Stricker, J. Friederichs, A. Hoos, M. Werner, K. Ulm, B. Holzmann, H. Nekarda, J.R. Siewert: Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. *J Clin Oncol*. 10. 1807-1814 (2004)
- 55 Iwama, H., K. Ohyashiki, H. Ohyashiki, S. Hayashi, N. Yahatan, K. Ando, K. Toyama, A. Hoshika, M. Takasaki, M. Mori, J.W. Shay: Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Human genetics*. 102. 397-402 (1998)
- 56 Hakin-Smith, V., D.A. Jellinek, D. Levy, T. Carroll, M. Teo, W.R. Timperley, M.J. McKay, R.R. Reddel, J.A. Royds: Alternative lengthening of telomeres and survival in patients with glioblastoma multiforme. *Lancet*. 361. 836-838 (2003)
- 57 Wong, N.A.C.S., R. Young, R.D.G. Malcomson, A.G. Nayar, L.A. Jamieson, V.E. Save, F.A. Carey, D.H. Brewster, C. Han, A. Al-Nafussi: Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumors: A clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology*. 43. 118-126 (2003)
- 58 Rutkowski, P., Z.I. Nowecki, W. Michej, M. Debiec-Rychter, A. Woz´niak, J. Limon, J. Siedlecki, U. Grzesiakowska, M. Kakol, C. Osuch, M. Polkowski, S. Głuszek, Z. Zurawski, W. Ruka: Criteria and Prognostic Factors for Predicting Recurrences After Resection of Primary Gastrointestinal Stromal Tumor. *Ann. Surg. Oncol*. 14(7). 2018-27 (2007)
- 59 Baustina, C.V., C.P. Felis, J.M.R. Espinet, J.B. García, J.V. Salas: Telomerase Activity is a Prognostic Factor for Recurrence and Survival in Rectal Cancer. *Dis Colon Rectum*. 50. 1-10 (2007)

- 60 Poremba, C., B. Heine, R. Diallo, A. Heinecke, D. Wai, K.L. Schaefer, Y. Braun, A. Schuck, C. Lanvers, A. Bãnkfalvi, S. Kneif, J. Torhorst, M. Zuber, O.R. Kõchli, F. Mross, H. Dieterich, G. Sauter, H. Stein, F. Fogt, W. Boecker: Telomerase as a prognostic marker in breast cancer: high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR. *J Pathol.* 198. 181–189 (2002)
- 61 Tabori, U., J. Ma, M. Carter, M. Zielenska, J. Rutka, E. Bouffet, U. Bartels, D. Malkin, C. Hawkins: Human Telomere Reverse Transcriptase Expression Predicts Progression and Survival in Pediatric Intracranial Ependymoma. *Journal of Clinical Oncology.* 24. 1522-1528 (2006)
- 62 Hiyama, E., K. Hiyama, T. Yokoyama, J.W. Shay: Immunohistochemical Detection of Telomerase (hTERT) Protein in Human Cancer Tissues and a Subset of Cells in Normal Tissues. *Neoplasia.* 3. 17-26 (2001)
- 63 Sommerfeld, H-J., A.K. Meeker, M.A. Piatyszek, G.S. Bova, J.W. Shay, D.S. Coffey: Telomerase Activity: A prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res.* 56. 218-222 (1996)
- 64 Yao, D-F., W. Wu, M. Yao, L-W. Qiu, X-H. Wu, X-Q. Su, L. Zou, D-B. Yao, X-Y. Meng: Dynamic alteration of telomerase expression and its diagnostic significance in liver or peripheral blood for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 12. 4966-4972 (2006)
- 65 Straub, B., M. Müller, H. Krause, C. Goessl, M. Schrader, R. Heicappell, K. Miller: Molecular staging of surgical margins after radical prostatectomy by detection of telomerase activity. *Prostate.* 49. 140-144 (2001)
- 66 Fabricius, E.M., A. Bezeluk, U. Kruse-Boitschenko, G.P. Wildner, M. Klein: Clinical significance of telomerase activity in basal cell carcinomas and in tumour-free surgical margins. *Int J Oncol.* 23. 1389-1399 (2003)
- 67 Müller, M., H. Krause, R. Heicappell, J. Tischendorf, J.W. Shay, K. Miller: Comparison of Human Telomerase RNA and Telomerase Activity in Urine for Diagnosis of Bladder Cancer. *Clinical Cancer Research.* 4. 1949-1954 (1998)
- 68 Kinoshita, H., O. Osamu, Y. Kakehi, M. Mishina, K. Mitsumori, N. Itoh, H. Yamada, T. Terachi, O. Yoshida: Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 89. 724-730 (1997)
- 69 Botchkina, G.I., R.H. Kim, I.L. Botchkina, A. Kirshenbaum, Z. Frischer, H.L. Adler: Noninvasive Detection of Prostate Cancer by Quantitative Analysis of Telomerase Activity. *Clinical Cancer Research.* 11. 3243-3249 (2005)
- 70 Tangkijvanich, P., D. Tresukosol, P. Sampatanukul, S. Sakdikul, N. Voravud, V. Mahachai, A. Mutirangura: Telomerase assay for differentiating between malignancy-related and nonmalignant ascites. *Clin Cancer Res.* 5. 2470-2475 (1999)
- 71 Yang, C.T., M.H. Lee, R.S. Lan, J.K. Chen: Telomerase activity in pleural effusions: diagnostic significance. *J Clin Oncol.* 16. 567-573 (1998)

- 72 Yahata, N.Y., K. Ohyashiki, J.H. Ohyashiki, H. Iwama, S. Hayashi, K. Ando, T.Hirano, T. Tsuchida, H. Kato, J.W. Shay, K. Toyama: Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washings. *J Natl Cancer Inst.* 90. 684-690 (1998)
- 73 Dejmeek, A., N. Yahata, K. Ohyashiki, M. Kakihana, T. Hirano, N. Kawate, H. Kato, Y. Eblhara: Correlation between morphology and telomerase activity in cells from exfoliative lung cytologic specimens. *Cancer Cytopathol.* 90. 117-125 (2000)
- 74 Uziel, O., E. Fenig, J. Nordenberg, E. Beery, H. Reshef, J. Sandbank, M. Birenbaum, M. Bakhanashvili, R. Yerushalmi, D. Luria, M. Lahav: Imatinib mesylate (Gleevec) downregulates telomerase activity and inhibits proliferation in telomerase-expressing cell lines. *British Journal of Cancer.* 92. 1881-1891 (2005)
- 75 Huo, L., J.W.S. Tang, J. Huang, P. Huang, C. Huang, H-F. Kung, M.C. Lin: Cancer Immunotherapy Targeting the Telomerase Reverse Transcriptase. *Cellular & Molecular Immunology.* 3. 1-9 (2006)
- 76 Vonderheide, R.H., W.C. Hahn, J.L. Schultze, L.M. Nadler: The Telomerase Catalytic Subunit Is a Widely Expressed Tumor-Associated Antigen Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes. *Immunity.* 10. 673–679 (1999)
- 77 Vonderheide, R.H., S.M. Domchek, J.L. Schultze, D.J. George, K.M. Hoar, D-Y. Chen, K.F. Stephans, K. Masutomi, M. Loda, Z. Xia, K.S. Anderson, W.C. Hahn, L.M. Nadler: Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Clin Cancer Res.* 10. 828-839 (2004)
- 78 Bernhardt, S.L., M.K. Gjertsen, S. Trachsel, M. Møller, J.A. Eriksen, M. Meo, T. Buanes, G. Gaudernack: Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: A dose escalating phase I/II study. *British Journal of Cancer.* 95. 1474 – 1482 (2006)
- 79 Saretzki, G., A. Ludwig, T. von Zglinicki, I.B. Runnebaum: Ribozyme-mediated telomerase inhibition induces immediate cell loss but not telomere shortening in ovarian cancer cells. *Cancer Gene Therapy.* 8. 827–834 (2001)
- 80 Pendino, F., M. Flexor, F. Delhommeau, D. Buet, M. Lanotte, E.Ségal-Bendirdjian: Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98. 6662-6667 (2001)
- 81 Song, J.S., H.P. Kim, W.S. Yoon, K.W. Lee, M.H. Kim, K.T. Kim, H-S. Kim, Y.T. Kim: Adenovirus-mediated suicide gene therapy using the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter induced apoptosis of ovarian cancer cell line. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67. 2344-2350 (2003)