

Aus dem Institut für Pathologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Universität Hamburg

Direktor Prof. Dr. med. G. SAUTER

**Häufigkeit und prognostische Bedeutung
von p53 und bcl-2 Alterationen
bei menschlichen Weichgewebstumoren**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

von
Elisa-Gabriele Friederike Margarethe von Friderici Steinman genannt von Mellentin
aus Bremen

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:
10.11.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. G. Sauter

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Trepel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Pantel

Meinen lieben Eltern
Friedrich Karl und Christa-Elisabeth von Friderici

1 EINLEITUNG	5
2 MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 Patienten und Tumorproben	10
2.2 Tissue Microarray- Herstellung	12
2.3 Immunhistochemie	15
2.4 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	16
2.5 Statistik	17
3 RESULTATE	18
3.1 Patientendaten und pathologisch-anatomische Befunde	18
3.2 Gastrointestinale Stromatumoren (GIST)	21
3.2.1 Pathologisch-anatomische Befunde und Prognose bei GIST	23
3.3 Immunhistochemie	26
3.3.1 p53- Alterationen in Weichgewebstumoren	26
3.3.2 p53-Alterationen in Gastrointestinalen Stromatumoren und Prognose	30
3.3.3 bcl-2- Expression in Weichgewebstumoren	32
3.3.4 Coexpression von p53 und bcl-2	36
3.3.5 bcl-2- Expression in Gastrointestinalen Stromatumoren und Prognose	36
3.4 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	37
3.4.1 bcl-2- Genkopienzahl	37
3.4.2 bcl-2- Genkopienzahl und bcl-2- Expression	38
4 DISKUSSION	43
5 ZUSAMMENFASSUNG	50
6 LITERATUR	52
7 DANKSAGUNG	66
8 LEBENSLAUF.....	67
9 ERKLÄRUNG	68

1. Einleitung

Bei Tumoren der Weichgewebe handelt es sich um eine heterogene Gruppe von gutartigen und bösartigen Neubildungen mesenchymaler und neuroektodermaler Herkunft [35].

Der Anteil der malignen Weichgewebstumoren an der Gesamtzahl aller Malignome bei Erwachsenen beträgt ca. 1% [32,94]. Bei Kindern und jungen Erwachsenen bis zum 20. Lebensjahr bilden Sarkome einen Anteil von ca. 7%-10% aller malignen Krebserkrankungen. Benigne Weichteiltumoren übertreffen die malignen zahlenmäßig bei weitem, etwa um den Faktor 100:1 [103, 105].

Die jährliche Inzidenz gutartiger Weichgewebstumoren beträgt ca. 300/100.000 Einwohner, die der malignen wird mit 1-3/ 100.000 über alle Altersgruppen angegeben [32, 94]. Die altersspezifische Inzidenz steigt in der Altersgruppe der über vierzig jährigen exponentiell, die meisten Sarkom-Patienten sind älter als sechzig Jahre.

Generell können sich Weichgewebstumoren in jedem Teil des Körpers entwickeln. Die häufigste Lokalisation bilden die Extremitäten mit 60%, davon zwei drittel in der unteren Extremität, ein drittel in der oberen. Am Stamm inklusive des Retroperitonealraumes entstehen etwa 30%, im Bereich des Kopfes und Halses 10% [6].

Die Nomenklatur der Tumoren beschreibt den durch Differenzierung bzw. Dedifferenzierung mesenchymaler (Stamm-) Zellen vorherrschenden Phänotyp. Die Gesamtzahl aller Entitäten ist durch die Weiterentwicklungen der diagnostischen Möglichkeiten der vergangenen Jahre und den daraus resultierenden Reklassifizierungen bereits existierender Entitäten sowie Identifizierungen neuer Entitäten in ständigem Wachstum begriffen. Als Standardklassifikationen sind die WHO Classification of Tumors oder die nach Enzinger/Weiss zu nennen [32,94].

Die chirurgische Entfernung mit mikroskopisch tumorfreien Rändern (R0-Resektion) bildet die wichtigste Therapiemaßnahme in der Behandlung von Weichteilsarkomen, häufig kombiniert mit Radiotherapie. Die Rolle der Chemotherapie ist bis auf einige Ausnahmen (Rhabdomyosarkom, Ewingsarkom/PNET des Weichgewebes) unklar, da Weichteilsarkome gegenüber

konventionellen Chemotherapeutika oft eine ausgesprochene Resistenz zeigen [15,29].

Die Prognose maligner Weichgewebstumoren ist vergleichsweise schlecht. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit Weichteilsarkomen beträgt 50-60%. Die meisten Patienten sterben durch Metastasierung, welche in 80% der Fälle innerhalb von zwei bis drei Jahren nach der Erstdiagnose auftritt [21].

Verbesserungen der Kenntnisse über die molekularbiologischen Zusammenhänge bei Sarkomen könnten in der Diagnostik hilfreich sein und damit zu verbesserten Prognoseparametern und zu spezifischeren Therapiekonzepten führen. Dies bestätigte sich bereits in jüngerer Vergangenheit.

Es ist beispielsweise gelungen, eine Reihe von Weichgewebssarkomen zu identifizieren, die für die jeweiligen Entitäten spezifische zytogenetische Anomalien aufweisen.

Hierzu zählen solche mit Fusionsgenen infolge chromosomaler Translokationen (z.B. PAX3-FKHR in alveolären Rhabdomyosarkomen) und solche mit spezifischen Mutationen (z.B. KIT-Mutationen bei gastrointestinalen Stromatumoren).

Für die Gruppe von Weichteilsarkomen mit spezifischen genetischen Alterationen gilt, dass beispielsweise durch Translokationen entstehende Fusionsgene als nützliche diagnostische Marker dienen können. Darüber hinaus kodieren solche Fusionsgene für chimäre Proteine, die für die Biologie dieser Tumoren wichtig sind, indem sie beispielsweise als Transkriptionsfaktoren fungieren. Sie deregulieren so die Transkription zahlreicher Gene und damit den Ablauf zellulärer Informationswege [15].

Es wäre denkbar, dass diese chimären Proteine, aber auch die Gene, die durch sie dereguliert werden als potentielle therapeutische Ziele dienen und damit von prädiktivem Wert sein könnten.

Die Charakterisierung und die gezielte Blockade von KIT (CD117) durch Imatinib (Glivec®) sind ein Modell für eine solche molekulare Intervention bei Patienten mit Weichteilsarkomen [87].

Die Möglichkeit für Tumorzellen zu zahlenmäßig expansivem Wachstum ist zum einen durch die Proliferationsrate determiniert, ist aber auch abhängig von der Zelluntergangsrate. Der programmierte Zelltod (Apoptose) stellt hierbei einen wichtigen Faktor dar.

Das in gesunden Geweben fein regulierte Gleichgewicht zwischen Zellwachstum, Zellvermehrung und Zelldifferenzierung einerseits und der Apoptose andererseits, ist in Krebszellen in Richtung Zellvermehrung und Zellwachstum verschoben. Grundlage der Mechanismen, die zu maligner Zelldifferenzierung führen können, bilden eine Vielzahl genetischer Veränderungen und die daraus resultierenden qualitativen und/oder quantitativen Veränderungen der zellulären Proteinexpression. Von besonderer Bedeutung sind hierbei Gene und deren Produkte, die durch Mutationen mit dominantem Funktionsgewinn ausgestattet sind, welche die Zelle in Richtung Proliferation treiben, sogenannte Onkogene, sowie Gene und deren Produkte, die das Zellwachstum hemmen, sogenannte Tumorsuppressorgene. Letztere können häufig durch mutationsbedingten rezessiven Funktionsverlust ihre zelluläre Wirkung nur noch eingeschränkt oder nicht mehr ausüben [38]. Zwei solcher Gene und deren Produkte, die eine zentrale Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptoseregulation und somit der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität spielen, sind das Tumorsuppressorgen p53 und das Onkogen bcl-2.

Das p53-Tumorsuppressorgen (lokalisiert auf Chromosom 17p) kodiert für ein aus 393 Aminosäuren bestehendes 53 kDa Protein [55]. P53 liegt in einem hohen Anteil der menschlichen Tumoren in mutierter Form vor [43]. P53 ist durch eine relativ kurze Halbwertszeit von ca. 20 Minuten nur in geringer Konzentration in der Zelle vorhanden und ist vor allem im Zellkern lokalisiert. Seine Expression, Stabilisierung und nukleäre Akkumulation wird als Antwort auf eine Vielzahl von Stressoren wie beispielsweise DNA-Schädigung (durch ionisierende Strahlung, UV-Strahlung und karzinogene Substanzen), Hypoxie oder Onkogenexpression gesteigert. P53 funktioniert als Transkriptionsfaktor. Die Aktivierung von p53 führt über die Hochregulation der Transkription bestimmter Zielgene zum Arrest am G1/S-Phasen-Checkpoint des Zellzyklus (Expression von p21) und zur Induktion von DNA-Reparatursystemen (Expression von GADD45). Kann die DNA-Reparatur nicht erfolgreich durchgeführt werden, so führt die (durch p53 gesteigerte) Expression von bax, über die Antagonisierung der Wirkung von bcl-2, zur Einleitung der Apoptose [57].

Die Entdeckung des bcl-2 Onkogens (Lokalisiert auf Chromosom 18q) und seines Genproduktes, welches durch Chromosomentranslokation hochreguliert und überexprimiert in nahezu 80% der folliculären B-Zell-Lymphome vorliegt [88],

sowie die Entdeckung seiner antiapoptotischen Funktion [90], haben die Untersuchung der Bedeutung der Apoptose auf molekularer Ebene in malignen Tumoren eröffnet.

Bcl-2 ist als integrales Membranprotein in gesunden Zellen in der äußeren mitochondrialen Membran, in der Kernmembran und in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und schützt deren Integrität [49]. Es kann die Auslösung der Apoptose als Antwort auf eine große Zahl von Todessignalen wie DNA-Schäden, γ -Strahlen, Glucocorticoide oder Chemotherapeutika verhindern [102], indem es die proapoptotische Wirkung seines Gegenspielers bax antagonisiert.

Viele Studien haben gezeigt, dass p53 und bcl-2 in Tumoren des Weichgewebes mindestens in einem Teil der Fälle alteriert sind.

Das Studium der Literatur ergibt jedoch ein diskrepantes Bild. Die Angaben zur Häufigkeit von bcl-2 oder p53 Alterationen variieren zwischen verschiedenen Studien stark (p53 Alterationen in 9-90% [41, 84], bcl-2 Alterationen in 16-77% [29, 62] der untersuchten Fälle). Ursache hierfür dürfte die Verwendung unterschiedlicher Untersuchungsmethoden und Auswertungskriterien sein. Die Daten der Literatur sind somit nur schwer zu interpretieren. Studien, die große Kollektive verschiedener Weichteilsarkome untersuchen fehlen weitgehend.

Die Tissue Microarray (TMA)-Technik könnte hier von besonderem Wert sein. Bei diesem Verfahren können hunderte 0,6 mm durchmessende Gewebeproben aus archiviertem Paraffinmaterial entnommen und in einen Paraffin-Empfängerblock eingebracht werden. An den hiervon angefertigten Schnitten kann nun die gleichzeitige in-situ Untersuchung (z.B. Immunhistochemie oder Fluoreszenz in-situ Hybridisierung) an hunderten verschiedener Gewebeproben durchgeführt werden. Die TMA-Technik erlaubt die maximal standardisierte Untersuchung sämtlicher Gewebeproben unter Verwendung eines einzigen Protokolls und des selben Antikörpers. Daraus resultiert eine optimale Vergleichbarkeit der erhaltenen Daten [54, 78].

Die repräsentative Aussagekraft der TMA-Technik wurde in zahlreichen Studien, unter anderem auch an Weichgewebstumoren gezeigt [28, 40, 46, 47].

In der Vorliegenden Studie wurde die Häufigkeit sowie die prognostische Bedeutung von p53- Alterationen und bcl-2-Überexpression sowie die Häufigkeit von bcl-2-Genkopienzahlveränderungen an einem Tissue Microarray aus 602 Weichgewebstumoren analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Tumorproben

Für die Untersuchung standen 602 Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Weichgewebstumoren von insgesamt 515 Patienten zur Verfügung.

Die Tumorpräparate waren in den Jahren 1992 bis 2005 im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf untersucht und archiviert worden.

Die pathologisch-anatomischen Daten zu den Tumorproben wurden aus den entsprechenden Pathologieberichten des Institutes entnommen: Diagnose, Tumorlokalisation, Tumorgröße und histologischer Grad, sowie das Vorhandensein von Metastasen und/oder Rezidiven und deren Lokalisation.

Von allen Paraffinpräparaten wurden 4 µm Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt. Diese wurden von einem Pathologen (Dr. med. A. Quaas, Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) mikroskopiert, um den histologischen Tumortyp zu überprüfen, sowie den Tumoranteil des Präparates zu lokalisieren („histologisches Review“).

Des weiteren wurde eine vollständige Reklassifizierung der im Institut für Pathologie archivierten Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) mittels histologischer und immunhistochemischer Untersuchung durchgeführt (Prof. Dr. med. H. Schäfer, Dr. med. U. Reichelt, Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf), deren Ergebnisse für diese Studie zur Verfügung standen.

Für 65 der untersuchten Patienten mit GIST wurden Verlaufsdaten freundlicher Weise aus der Abteilung für Allgemein-, Visceral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Diese enthielten Angaben zum Zeitpunkt des Auftretens von Metastasen und/oder Rezidiven sowie zum krankheitsspezifischen Überleben der Patienten. Das tumorspezifische Überleben der Patienten wurde aus dem Datum der Exzision des Primärtumors und dem Datum des Todes oder des letzten Follow-up berechnet. Patienten, die aus anderen Gründen als am GIST starben, wurden zum Zeitpunkt des Todes zensiert. Nur Patienten, bei denen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen GIST und Todesursache dokumentiert war, wurden als an ihrer Tumorerkrankung verstorben gewertet.

Das rezidivfreie und metastasenfreie Überleben wurde aus dem Datum der Operation des Primarius und dem Datum der Operation des Rezidivs, der Metastase oder dem letzten Follow-up errechnet.

Die Verwendung der Daten wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt. Außerdem lagen schriftliche Einverständniserklärungen aller Patienten über die Verwendung der Gewebeproben zu Forschungszwecken vor [51].

2.2 Tissue Microarray- Herstellung

Die Tissue Microarray (TMA) Methode ermöglicht das Einbringen von hunderten Gewebszylindern (Durchmesser 0,6 mm) aus histologisch definierten Regionen verschiedener Tumoren („donor“) in einen einzigen Paraffinblock („recipient“). Die nachstehende schematische Darstellung der TMA-Technik wurde der Dissertation „Epidemiologie der EGFR-Expression beim Kolon-Karzinom: Eine “Gewebe-Chip“-Untersuchung an 1417 Tumoren“ von Mark Fahmüller, Medizinische Fakultät der Universität Basel mit Erlaubnis entnommen (Abb. 2.2.a).

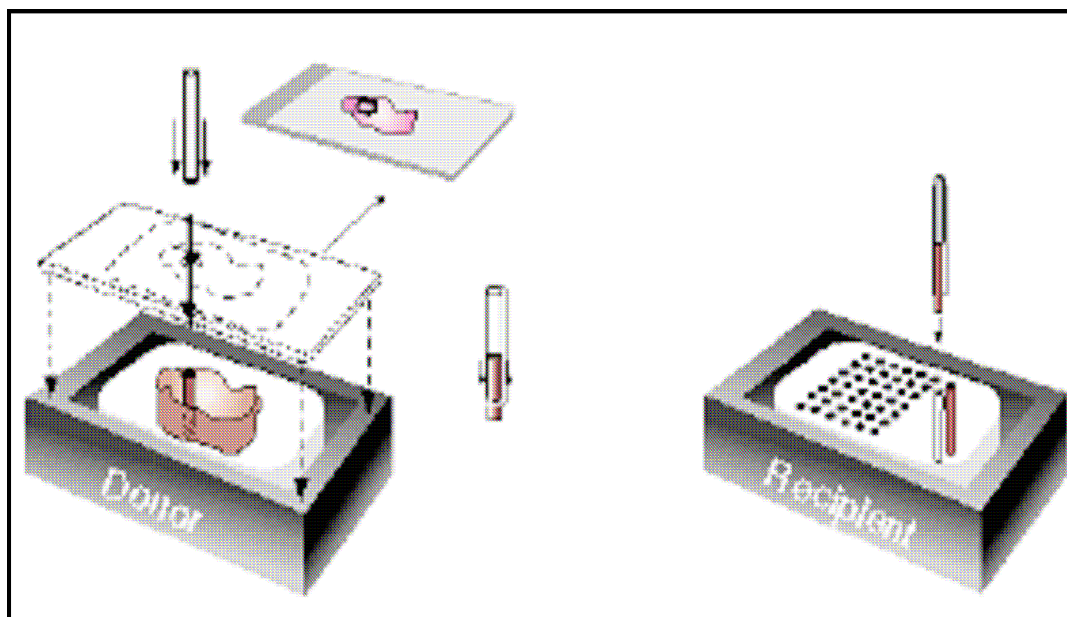


Abb. 2.2.a: Schematische Darstellung der Gewebearray-Herstellung

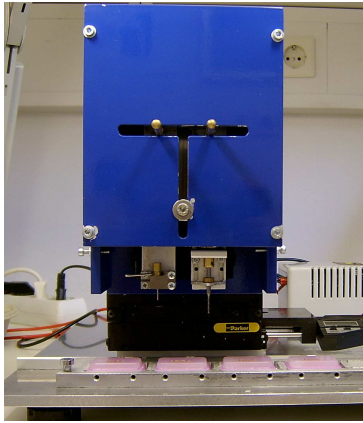


Abb. 2.2.b: Gewebearray-Stanzgerät

Zur Entnahme der Gewebeproben dient ein an der Spitze geschärfter Hohlzylinder mit einem inneren Durchmesser von 0,6 mm. Mittels eines 0,6 mm durchmessenden Bohrers werden zunächst Löcher in dem Empfängerblock vorgefertigt, in welche dann die entnommenen Stanzzylinder eingebracht werden. Zum Ausstoßen der Gewebeproben aus dem Hohlzylinder dient ein Stahldraht mit einem äußeren Durchmesser von ebenfalls 0,6 mm. Hohlzylinder und Bohrer werden in einem X-Y-Achsen-Präzisionsgerät (Gewebe-Array-Stanzgerät) gehalten. Ein einstellbarer „Eindring-Stopper“ gewährleistet die gleichbleibende Länge von Gewebeproben und vorgefertigten Bohrlöchern.

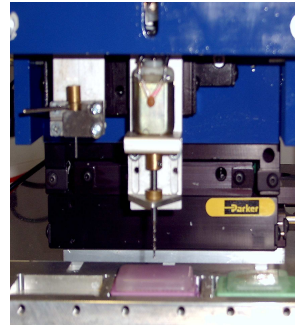


Abb. 2.2.c: Vorfertigen eines Bohrkanals im Empfängerblock



Abb. 2.2. d: Lokalisieren des zu stanzenden Areals mittels markiertem HE-Präparat

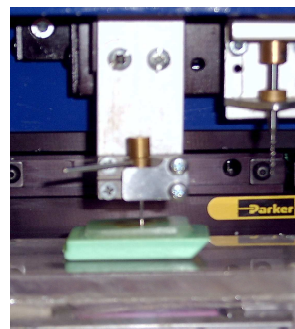


Abb.2.2.e: Entnahme einer Stanze aus der Tumorprobe

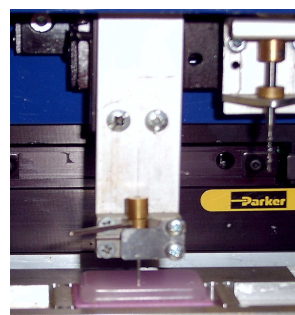


Abb.2.2.f: Einbringen der Stanze in den Empfängerblock

Durch erwärmen werden die Stanzen in den Bohrkanälen mit dem Empfängerparaffin fest verbunden. Mittels regulärer Mikrotome können nun Schnitte von dem Tissue Microarray angefertigt werden. An den TMA- Schnitten sind alle Arten von in-situ-Analysen durchführbar, ohne spezielle Modifikation bereits existierender Protokolle.

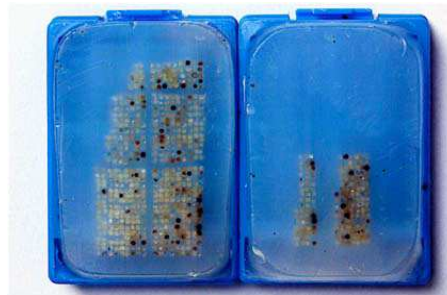


Abb.2.2.g: Sarkom-TMA-602

Die praktische Erstellung des Sarkom-TMA erfolgte in Gemeinschaftsarbeit mit Herrn Marcel Hochreiter (Dissertation an der Universität Hamburg zum Thema „Veränderungen des Epidermal Growth Factor Rezeptors (EGFR) in Sarkomen“).

2.3 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Untersuchung des TMA wurden die am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verwendeten Standard-Immunperoxidase-Verfahren zur Detektion von p53 und bcl-2 durchgeführt (DAKO, Glostrup, Dänemark). Verwendete Antikörper, ihre Verdünnung, sowie Inkubationsdetails sind in Tabelle 2.3.1 aufgelistet. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin (Liquid DAB DAKO K3468) verwendet. Der Antikörper wurde für negative Kontrollen weggelassen. Als positive Kontrolle wurden Gewebe mit bekannter p53 Alteration beziehungsweise bcl-2 Expression verwendet (Standardkontrollgewebe: p53: Colon-Ca mit bekannter p53 Alteration, bcl-2: Lymphknoten).

Tabelle 2.3.1: Antikörper und Inkubationsbedingungen

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung, Inkubationsbedingungen</u>
p53 DO-1	DAKO, Glostrup Dänemark	1/3600, 30°C, 120 min
bcl-2 clone 124	DAKO, Glostrup Dänemark	1/150, 30°C, 120 min

Für beide Antikörper wurde bei jedem Tumor die Färbeintensität (auf einer Skala von 0-3), sowie der prozentuale Anteil der positiven Zellen von einem Pathologen (Dr. med. A. Quaas) geschätzt. Anhand der Ergebnisse wurden die Tumoren nach festgelegten Kriterien kategorisiert (Tabelle 2.3.2). Die verwendeten Grenzwerte basieren auf früheren Arbeiten zu p53 und bcl-2 an Sarkomen [11, 26, 29].

Tabelle 2.3.2: Scoring-Kriterien für p53 und bcl-2

<u>IHC-Resultat</u>	<u>Färbeintensität</u>	<u>Anteil positiver Tumorzellen (%)</u>
Negativ	0	keine Anfärbung
Schwach positiv	1+	≥ 10% (bcl-2) / ≥ 20% (p53)
	2+	< 80%
	3+	< 30%
stark positiv	2+	≥ 80%
	3+	≥ 30%

2.4 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH-Untersuchung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt [78].

Die TMA-Schnitte wurden zunächst mit dem Paraffin pretreatment kit der Firma Abbott vorbehandelt.

Für die FISH-Untersuchung wurde die Vysis LSI® BCL2 (18q21) Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Abbott Molecular Inc.) verwendet. Dieser Probenmix enthält eine Spektrum Orange markierte und 600 kb große bcl-2-Sonde, die einen Teil des bcl-2 Gens mit angrenzenden telomerischen DNA-Abschnitten auf Chromosom 18 abdeckt.

Die Hybridisierung und die nachfolgenden Waschungen der Schnitte wurden entsprechend der Herstellerempfehlungen durchgeführt.

6 µm dicke TMA-Schnitte wurden auf Objektträger übertragen (Paraffin Tape-Transfer System adhesive coated Slides CAT# PSA-CS1x, Instrumentics), 45 Sekunden UV-bestrahlt, luftgetrocknet und über Nacht mit Xylol entparaffiniert.

Anschließend wurden die Schnitte in 96% Ethanol dehydriert und mit der „pretreatment“-Lösung (Abbott, 15 Minuten bei 80°C) und der Proteaselösung (Pepsin, 150 Minuten bei 37°C) vorbehandelt, mit Wasser gespült, in aufsteigender Reihe mit Ethanol erneut dehydriert und luftgetrocknet. Nach Aufbringen der FISH-Sonde wurde die Probe für 5 Minuten bei 72°C denaturiert und über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer hybridisiert. Nachfolgende Waschungen wurden mit 2 x SSC Waschpuffer (0,3% NP40, pH 7-7,5) bei 72°C durchgeführt. Nach Lufttrocknung der Schnitte wurde mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, 1000 ng/ml, Abbott) gegengefärbt.

2.4.1 Auswertung der FISH-Signale

Für jede Gewebeprobe wurde die absolute Anzahl der orange fluoreszierenden bcl-2 Gensignale pro Tumorzellkern geschätzt. Bei Schwankungen der pro Tumorzellkern sichtbaren Gensignale innerhalb einer Gewebeprobe, wurde der in der jeweiligen Tumorzellpopulation am häufigsten vertretene Wert ermittelt.

2.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde SPSS für Windows (Version 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet.

Die Beziehungen zwischen den verschiedenen pathologisch-anatomischen Daten und den immunhistochemischen Untersuchungsergebnissen, sowie den Ergebnissen der FISH, wurden mittels Kreuztabellen unter Verwendung von Fisher`s exact test berechnet.

Die Darstellung der kumulierten Überlebenskurven erfolgte nach der Methode von Kaplan-Meier, die Analyse mittels log rank test.

3. Resultate

3.1 Patientendaten und pathologisch-anatomische Befunde

Untersucht wurden 602 Weichgewebstumoren von 515 Patienten. Davon waren 272 (52,8%) Frauen und 243 (47,2%) Männer. Das durchschnittliche Patientenalter betrug 55,93 Jahre (1-98). Die Diagnosen der 515 Patienten wurden den ursprünglichen Pathologieberichten entnommen und sind in Tabelle 3.1.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1.1: untersuchte Patienten und ihre Diagnosen

Diagnose	n
Leiomyom	78
Leiomyosarkom	73
Gastrointestinaler Stromatumor	71
Liposarkom	64
Malignes Fibröses Histiozytom	61
Maligner peripherer Nervenscheidentumor (malignes Schwannom)	35
Desmoid	22
Granularzelltumor	21
Hämangioperizytom	14
Angiosarkom	12
Chondrosarkom	10
Sarkom NOS (not otherwise specified)	9
Dermatofibrosarcoma protuberans	8
Osteosarkom	7
Rhabdomyosarkom	7
Ewing Sarkom	6
Peripherer Neuroektodermaler Tumor	6
Fibrosarkom	3
Synovialsarkom	3
Rhabdomyom	1
spindelzelliges Lipom der Orbita	1
rundzelliger desmoplastischer Tumor	1
klarzelliges Sarkom	1
maligner extraintestinaler Stromatumor	1
Total	515

Von den insgesamt 602 untersuchten Tumorproben handelte es sich um 408 Primärtumoren, 81 hämatogene Metastasen, 15 Lymphknotenmetastasen und 98 Rezidive.

26 Primärtumoren waren als pM1 klassifiziert, wovon in 19 Fällen Primärtumor und die zugehörige Fernmetastase zur Untersuchung vorlagen.

8 Primärtumoren waren als pN1 klassifiziert. Zu diesen lagen in 7 Fällen die jeweiligen Lymphknotenmetastasen zur Untersuchung vor.

Bei 44 Primärtumoren waren Rezidive aufgetreten, wovon in 35 Fällen Primärtumor und Rezidiv zur Untersuchung vorlagen.

Zu 107 Patienten standen nur Rezidive oder Metastasen als Untersuchungsmaterial zur Verfügung.

Die Tumorlokalisation konnte bei 377 von 408 Primärtumoren aus den ursprünglichen Pathologieberichten entnommen werden.

Tabelle 3.1.2: Lokalisation der Primarii aller untersuchter Entitäten

Lokalisation	n
obere Extremität	13
untere Extremität	51
Rumpfwand	39
Kopf/Hals	32
Retroperitoneum	19
Intraabdominal ONA ¹	52
Gastrointestinal	113
Leber	2
Peritoneum	5
Intrathorakal ONA	16
Mediastinal	2
Lunge	5
Keine Angabe	59
Total	408

¹ Ohne nähere Angabe der Lokalisation

Die Größe der Primärtumoren war in 392 Fällen (für benigne und maligne) angegeben. 215 Primärtumoren waren kleiner als 5 cm, 177 größer als 5 cm im jeweils größten Durchmesser (0,5-50 cm). Gemäß der Definition des American Joint Committee on Cancer (AJCC) [12] des T-Stadiums (T1<5cm, T2≥5cm) wurden 109 primäre Weichteilsarkome als pT1 klassifiziert, 153 als pT2.

Das histologische Grading ging nur bei 210 Primärtumoren aus dem Pathologiebericht hervor. 40 wurden als G1, 72 als G2 und 98 als G3 klassifiziert.

Auch die Lokalisation der Metastasen wurde den Pathologieberichten entnommen und ist in Tabelle 3.1.3 dargestellt.

Tabelle 3.1.3: Lokalisation der Fernmetastasen

Lokalisation	n
Rumpfwand	7
Kopf/Hals	1
Intraabdominal ONA ²	4
Gastrointestinal	1
Leber	21
Peritoneum	4
Lunge	39
Keine Angabe	4
Total	81

² Ohne nähere Angabe der Lokalisation

3.2 Gastrointestinale Stromatumoren (GIST)

Die Gastrointestinalen Stromatumoren waren für diese Studie von besonderem Interesse, da von einem großen Teil dieser Patienten Verlaufsdaten vorhanden waren.

Von unseren 71 Patienten mit GIST waren 31 Frauen (43,7%) und 40 Männer (56,3%). Das mittlere Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns 60,92 Jahre (23-83 Jahre).

Von den insgesamt 78 untersuchten Tumorproben Gastrointestinaler Stromatumoren waren 63 Primärtumoren, 12 hämatogene Metastasen, 2 Lymphknotenmetastasen und ein Rezidiv. Bei 11 Primärtumoren waren laut klinischen Angaben hämatogene Metastasen aufgetreten, bei 2 Lymphknotenmetastasen und bei 9 Rezidive. Für 5 Patienten lagen der Primärtumor und eine Fernmetastase, für 2 Patienten der Primärtumor und eine Lymphknotenmetastase zur gleichzeitigen Untersuchung vor. Die Lokalisation der Primärtumoren konnte aus den ursprünglichen Pathologieberichten entnommen werden: 45 Tumoren befanden sich im Magen, 10 im Dünndarm, 2 im Ösophagus, 2 im Rektum, 2 im Oberbauch ohne nähere Angabe, und jeweils einer im Colon und im Peritoneum. So konnten also 45 im Magen lokalisierte GIST 18 intestinal lokalisierte gegenübergestellt werden.

Die durchschnittliche Tumorgöße betrug 6,33 cm (1-35 cm).

Das histologische Grading war bei 12 Patienten bekannt: 4 waren als G1, 3 als G2 und 5 als G3 klassifiziert worden.

Nach der Klassifikation von Miettinen et al. [61] wurden die hier untersuchten GIST in drei Risikogruppen eingeteilt: 19 benigne, 38 maligne und 14 unsicher bzw. niedrig maligne.

Zu 65 unserer 71 Patienten lagen Angaben zum krankheitsspezifischen Überleben vor. Zum Endpunkt der Studie lebten 38 Patienten, weitere 5 lebten mit Tumor bzw. Rezidiv, 17 starben an der Tumorerkrankung und 5 starben an anderen Todesursachen.

Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug bei 59 Patienten für das krankheitsspezifische Überleben 39,2 Monate (1- 147 Monate). Die mittlere Nachbeobachtungszeit für das metastasenfreie Überleben betrug bei 60 Patienten 35,98 Monate (1-147 Monate) und für das rezidivfreie Überleben bei 59 Patienten 37,8 Monate (1-147 Monate).

In die Berechnung der Überlebenskurven konnten nur die Patienten einbezogen werden, für die zur Beantwortung der jeweiligen Fragestellung vollständige klinikopathologische Daten vorlagen. Daher addieren sich die in den nachfolgenden Überlebenskurven untersuchten Patientenzahlen nicht zu den tatsächlich auf dem Array untersuchten Patientenzahlen auf.

3.2.1 Pathologisch-anatomische Befunde und Prognose bei Gastrointestinalen Stromatumoren

Wie zu erwarten, war die Prognose der Patienten stark mit dem Vorhandensein von Metastasen oder einer Rezidiverkrankung assoziiert (in beiden Fällen $p < 0.0001$)

Abb. 3.2.1.a: Vorliegen von Metastasen und krankheitsspezifisches Überleben

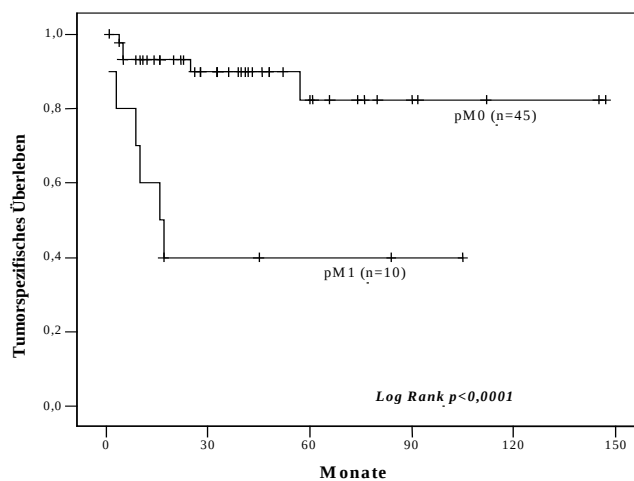
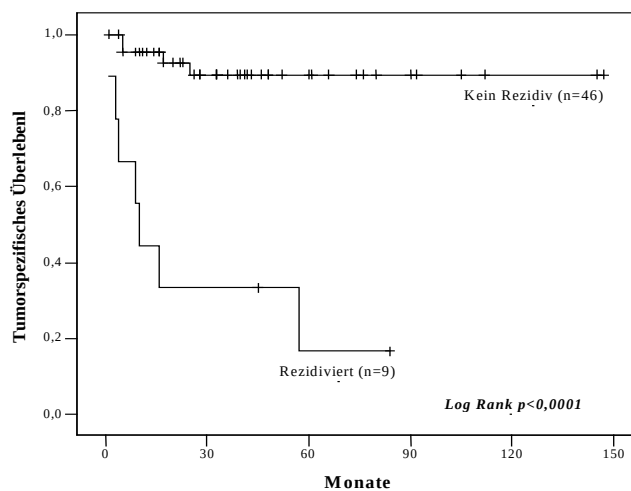


Abb. 3.2.1.b: Vorliegen eines Rezidivs und krankheitsspezifisches Überleben



Weiterhin fand sich eine enge Assoziation zwischen der Tumorlokalisation und dem Patientenüberleben. Patienten mit intestinalen GIST starben signifikant früher als Patienten mit gastralen GIST ($p=0,014$).

Abb.3.2.1.c: Tumorlokalisation gastral vs. intestinal und krankheitsspezifisches Überleben

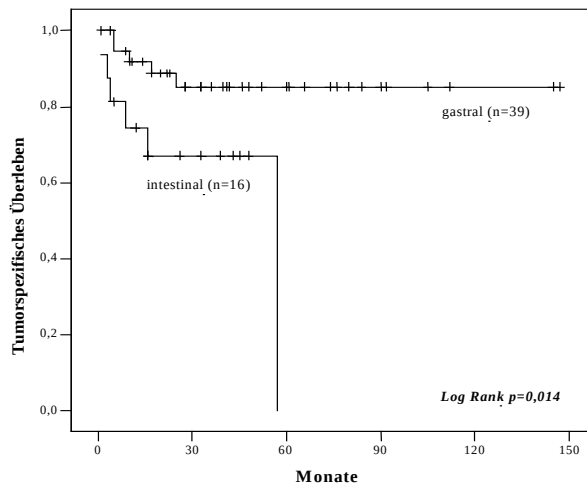
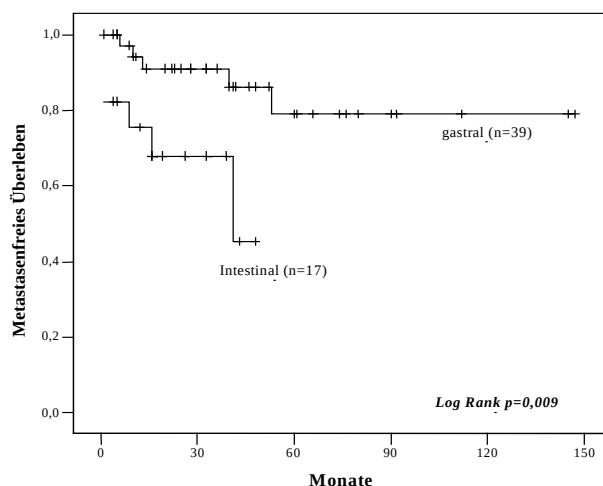
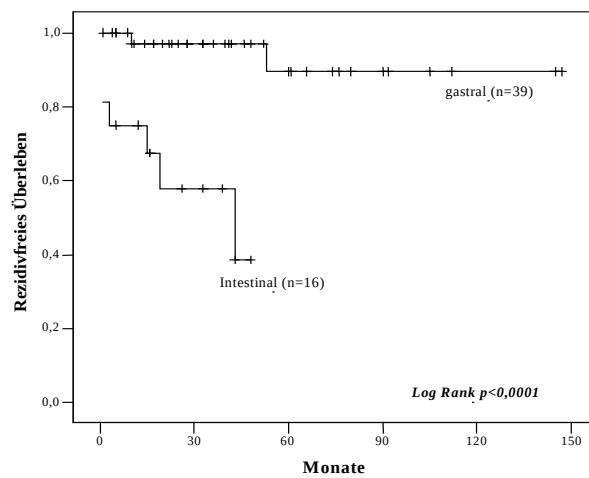


Abb.3.2.1.d: Tumorlokalisation gastral vs. intestinal und metastasenfreies Überleben



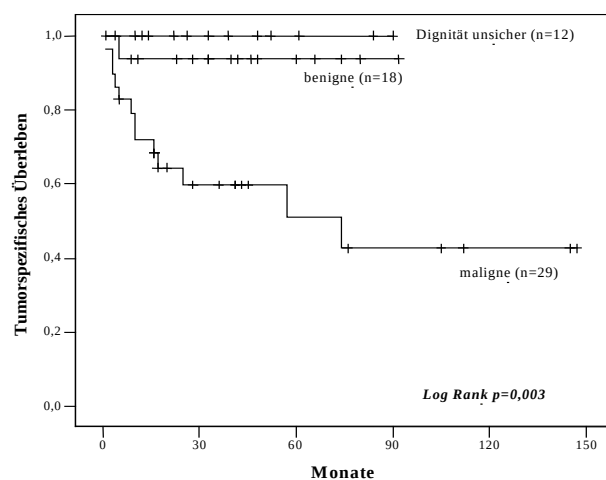
Das Auftreten von Metastasen und Rezidiven war eng mit der Tumorlokalisation assoziiert. Bei intestinalen GIST traten Metastasen ($p=0,009$) und Rezidive ($p<0.0001$) signifikant früher auf als bei solchen, die im Magen lokalisiert waren.

Abb. 3.2.1.e: Tumorlokalisation gastral vs. intestinal und rezidivfreies Überleben



Die Einteilung der Patienten in Risikokategorien nach Miettinen et al. [61] bestätigte deren signifikanten Zusammenhang zum krankheitsspezifischen Überleben ($p=0,003$) im hier untersuchten Patientenkollektiv.

Abb. 3.2.1.f: Dignität nach Miettinen et al und krankheitsspezifisches Überleben



3.3 Immunhistochemie

3.3.1 P53- Alterationen in Weichgewebstumoren

Bei der Auswertung der p53-Immunhistochemie wurden nur nukleäre Anfärbungen berücksichtigt. Die Anfärbung war in den meisten Fällen nur schwach oder mäßig ausgeprägt, betraf aber in einigen Fällen 80-100% der Tumorzellen. In 46 von 554 auswertbaren Tumorproben (8,3%) war eine eindeutig starke, nukleäre p53-Positivität nachweisbar.

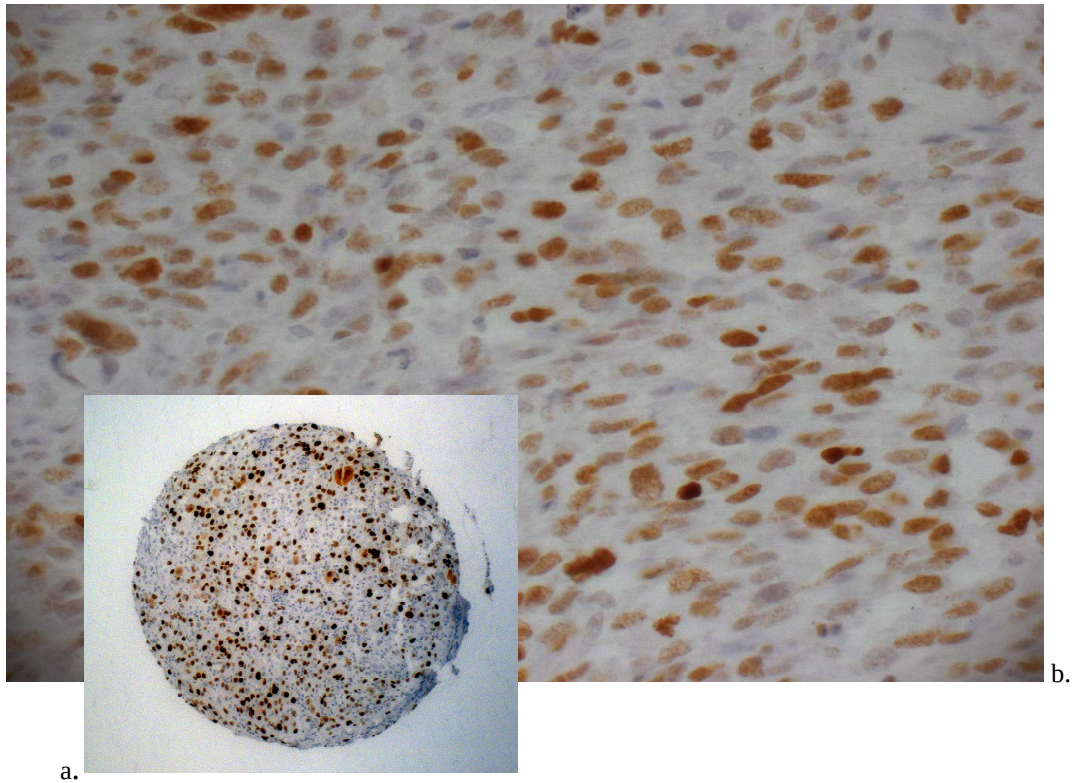
Beispiele eines positiven und negativen immunhistochemischen Befundes sind in Abb. 3.3.1. a-c gezeigt.

Die Befunde der p53-Immunhistochemie bei Primärtumoren der verschiedenen Weichteiltumoren sind in Tabelle 3.3.1.1 dargestellt, klinikopathologische Parameter und entsprechende Befunde der p53-Immunhistochemie in Tabelle 3.3.1.2.

Die verschiedenen Tumorarten zeigten deutliche Unterschiede in der Häufigkeit von p53 Alterationen. Ebenso zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen p53 Alterationen und Tumordignität: stark p53-positive Primärtumoren fanden sich ausschließlich in der Gruppe der malignen Weichgewebstumoren (Fisher's $p < 0,0001$). Weiterhin fand sich für unser gemischtes Kollektiv von Weichteiltumoren ein signifikanter Zusammenhang zwischen p53-Alterationen und niedrigem Differenzierungsgrad (Fisher's $p < 0,0001$) und zwischen p53-Alterationen und positivem Metastasenstatus (Fisher's $p = 0,014$). Es fand sich jedoch kein Zusammenhang zwischen p53-Alterationen und AJCC-T-Stadium, Nodal- und Rezidivstatus.

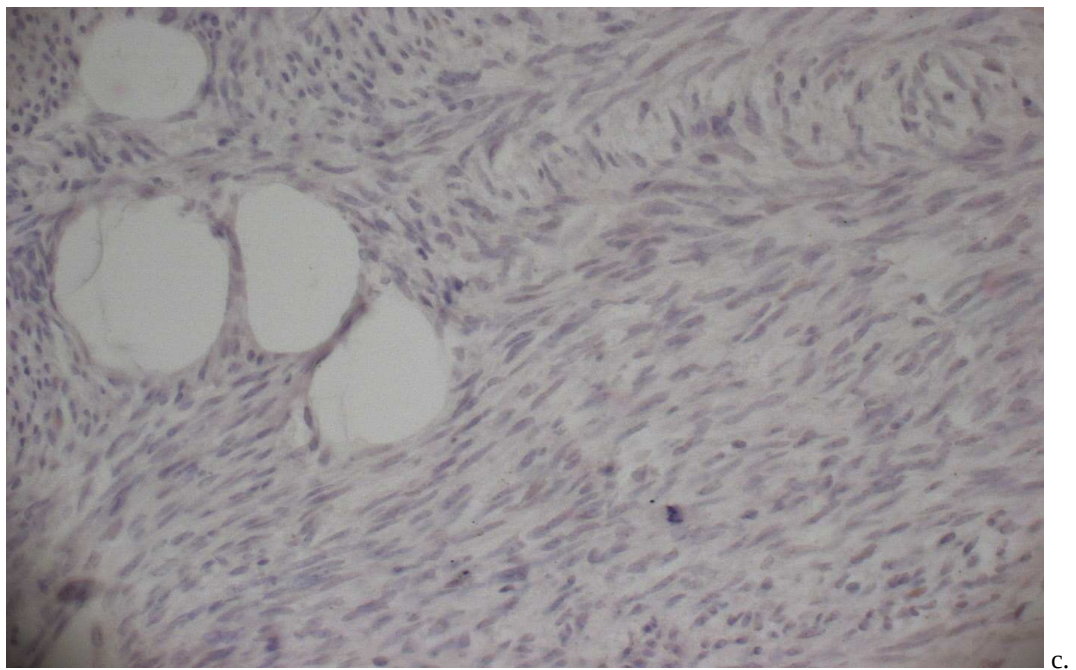
Der p53-Befund der Rezidive und Lymphknotenmetastasen war mit demjenigen der zugehörigen Primärtumoren weitgehend identisch. Hämatogene Metastasen waren etwas häufiger p53 positiv als ihre Primärtumoren.

Abb. 3.3.1.a-c: p53 Immunhistochemie



a.: Gewebespot eines stark p53-IHC-positiven Liposarkom (starke, nukleäre Anfärbung)

b.: Ausschnittvergrößerung mit starker, nukleärer p53-positivität in einem Gastrointestinalen Stromatumor



c.: Ausschnittvergrößerung eines p53-IHC-negativen Gewebespot (GIST)

Tabelle 3.3.1.1: p53-Immunhistochemie

Array Zusammensetzung		p53-Expression (%)			
	n	auswertbar	negativ	schwach	stark
Alle Tumorproben	602	554	440(79,4)	67(12,1)	46(8,3)
Primärtumoren					
<i>Weichteilsarkome</i>					
Angiosarkom	9	9	6(66,7)	2(22,2)	1(11,1)
Chondrosarkom	6	5	5(100,0)	0,00	0,00
DFSP ³	6	6	6(100,0)	0,00	0,00
Ewing Sarkom	5	5	5(100,0)	0,00	0,00
Fibrosarkom	1	0			
GIST	44	41	33(80,5)	7(17,1)	1(2,4)
Hämangioperizytom	9	9	9(100,0)	0,00	0,00
Klarzelliges Sarkom	1	1	0,00	0,00	1(100,0)
Leiomyosarkom	49	47	36(76,6)	5(10,6)	6(12,8)
Liposarkom	54	50	44(88,0)	1(2,0)	5(10,0)
MPNST ⁴	20	20	15(75,0)	3(15,0)	2(10,0)
Maligner extraintestinaler					
Stromatumor	1	1	1(100,0)	0,00	0,00
MFH ⁵	43	36	25(69,4)	3(8,3)	8(22,2)
Osteosarkom	4	4	3(75,0)	1(25,0)	0,00
PNET ⁶	3	2	0,00	1(50,0)	1(50,0)
Rhabdomyosarkom	4	4	3(75,0)	1(25,0)	0,00
Synovialsarkom	1	1	0,00	1(100,0)	0,00
Sarkom (NOS) ⁷	8	8	5(62,5)	2(25,0)	1(12,5)
Alle	268	249	196(78,7)	27(10,8)	26(10,5)
<i>Benigne Weichteiltumoren</i>					
Desmoid	20	20	20(100,0)	0,00	0,00
GIST	19	16	12(75,0)	4(25,0)	0,00
Granularzelltumor	21	20	9(45,0)	11(55,0)	0,00
Leiomyom	78	66	65(98,5)	1(1,5)	0,00
Rhabdomyom	1	0			
Spindelzelliges Lipom der Orbita	1	1	1(100,0)	0,00	0,00
Alle	140	123	107(87,0)	16(13,0)	0,00
Metastasen					
Hämatogene Metastasen	81	76	55(72,4)	13(17,1)	8(10,5)
Lymphknotenmetastasen	15	15	9(60,0)	2(13,3)	4(26,7)
Rezidive	98	91	73(80,2)	10(11,0)	8(8,8)

³ Dermatofibrosarkoma Protuberans

⁴ Maligner peripherer Nervenscheidentumor

⁵ Malignes fibröses Histiozytom

⁶ Peripherer neuroektodermaler Tumor

⁷ Not otherwise specified

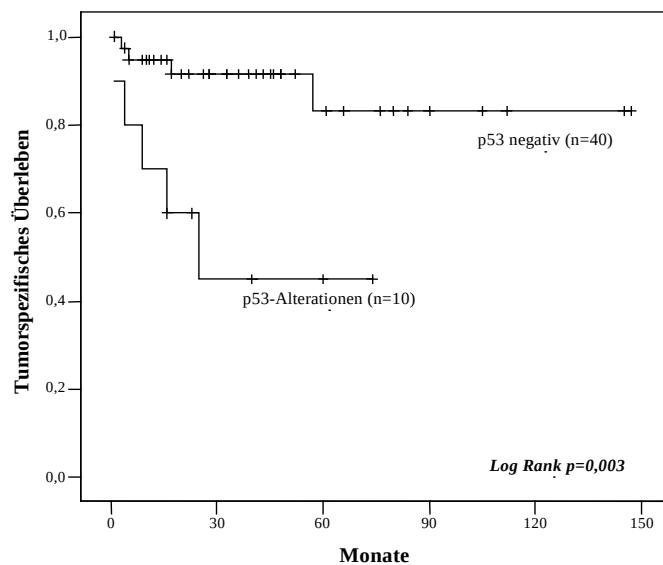
Tabelle 3.3.1.2: p53-Expression und klinikopathologische Parameter

Array Zusammensetzung			p53-Expression (%)			
	n	auswertbar	negativ	schwach	stark	p-Wert
Dignität						
Benigne	140	123	107(86,9)	16(13,0)	0,00	p<0,0001
Maligne	268	249	196(78,8)	27(10,8)	26(10,4)	
Histologischer Grad						
G1	40	34	33(97,1)	1(2,9)	0,00	p<0,0001
G2	72	69	55(79,7)	12(17,4)	2(2,9)	
G3	98	91	62(68,1)	8(8,8)	21(23,1)	
AJCC-T-Stadium						
pT1 < 5cm	109	103	78(75,7)	15(14,6)	10(9,7)	n.s. (p=0,25)
pT2 ≥ 5cm	153	140	114(81,4)	11(7,9)	15(10,7)	
Metastasen-Status						
PM0	242	225	180(80,0)	20(8,9)	25(11,1)	p=0,014
PM1	26	24	16(66,7)	7(29,2)	1(4,2)	
Nodalstatus						
pN0	260	242	190(78,5)	27(11,2)	25(10,3)	n.s. (p=0,64)
pN1	8	7	6(85,7)	0,00	1(14,3)	
Rezidiv-Status						
kein Rezidiv	229	212	169(79,7)	22(10,4)	21(9,9)	n.s.(p=0,59)
rezidiert	39	37	27(73,0)	5(13,5)	5(13,5)	

3.3.2 P53-Alterationen in Gastrointestinalen Stromatumoren und Prognose

In der Gruppe der p53-negativen Patienten (n=40) starben 4 (10%) an der Tumorerkrankung. In der Gruppe der p53-positiven Patienten (n=10) starben 5 (50%) am Tumor. Die statistische Analyse mittels Log-Rank Test ergab einen signifikanten Unterschied für das krankheitsspezifische Überleben von Patienten mit und ohne p53-Alterationen ($p=0,003$).

Abb. 3.3.2.a: p53-Alterationen und Krankheitsspezifisches Überleben bei GIST



Auch Rezidive traten signifikant früher in der Gruppe der Patienten mit p53-Alterationen auf (Log Rank $p=0,014$).

Abb. 3.3.2.b: p53-Alterationen und Rezidivfreies Überleben der Patienten mit GIST

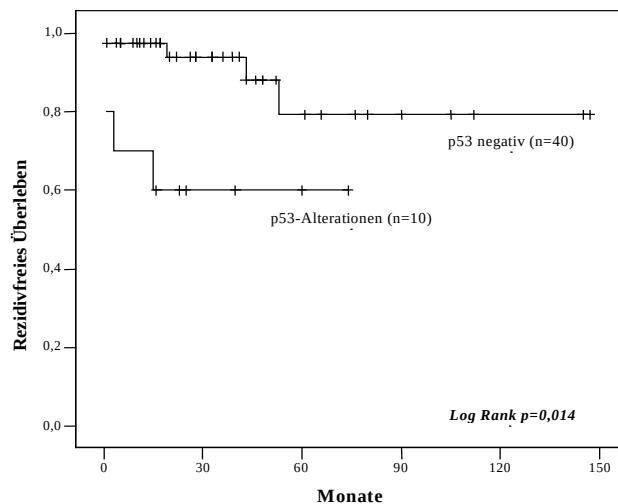
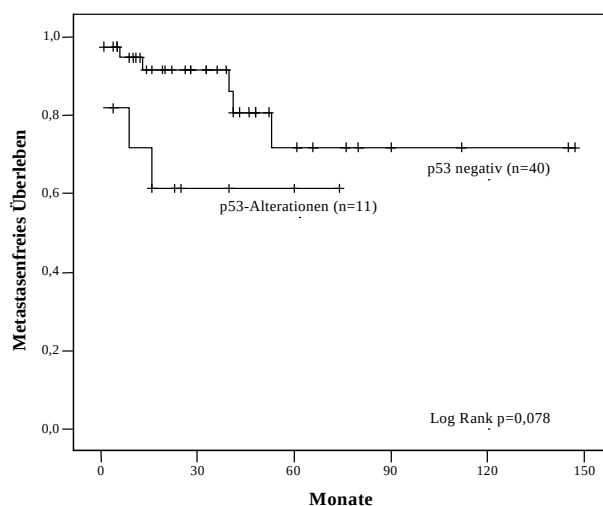


Abb. 3.3.2.c: p53-Alterationen und Metastasenfreies Überleben der Patienten mit GIST



Metastasen traten tendenziell früher in der Gruppe der Patienten mit p53-Alterationen auf. In der Analyse ergab sich jedoch kein Unterschied von statistischer Signifikanz (Log Rank $p=0,078$).

3.3.3 Bcl-2- Expression in Weichgewebstumoren

Bei der Auswertung der bcl-2-Immunhistochemie wurden nur zytoplasmatische Anfärbungen berücksichtigt. Die bcl-2-Anfärbung fiel in 406 (76,3%) von 532 auswertbaren Tumorproben negativ aus. Bcl-2 war schwach positiv in 23 (4,3%) und stark positiv in 103 (19,4%) der Tumorproben. In etwa einem Viertel der positiven Fälle fand sich eine Anfärbung von 80-100% der Tumorzellen.

Beispiele von positiven und negativen immunhistochemischen Befunden sind in Abb. 3.3.3.a-e gezeigt.

Die Häufigkeiten der bcl-2-Expression bei den Primärtumoren der verschiedenen Weichteiltumoren sind in Tabelle 3.3.3.1 dargestellt, klinikopathologische Parameter und entsprechende Befunde der bcl-2 Immunhistochemie in Tabelle 3.3.3.2.

Verschiedene Tumorarten zeigten deutliche Unterschiede in ihrer bcl-2 Expression. Jedoch ergab sich kein Zusammenhang zwischen bcl-2-Expression und Tumordignität. Sowohl in der Gruppe der malignen als auch in der Gruppe der benignen Weichteiltumoren fanden sich Entitäten mit starker bcl-2 Expression. Besonders auffällig war die starke bcl-2 Positivität bei 19 (100%) der untersuchten Granularzelltumoren. Maligne GIST zeigten in 21 (52,5%), benigne GIST in 7(38,9%), Leiomyosarkome in 11 (22,9%) der Fälle eine starke bcl-2 Expression. Alle 33 untersuchten MFH waren bcl-2 negativ.

Bezüglich der klinikopathologischen Parameter fand sich für unser gemischtes Kollektiv von Weichteiltumoren kein Zusammenhang zwischen bcl-2-Expression und histologischem Grading, TNM-Stadium und dem Rezidivstatus.

Die bcl-2 Expression der hämatogenen Metastasen, Lymphknotenmetastasen und der Rezidive war mit derjenigen der zugehörigen Primärtumoren weitgehend identisch. Nur in wenigen Fällen fanden sich bcl-2 positive hämatogene Metastasen bei bcl-2 negativem zugehörigem Primärtumor.

Abb.3.3.3.a-e:

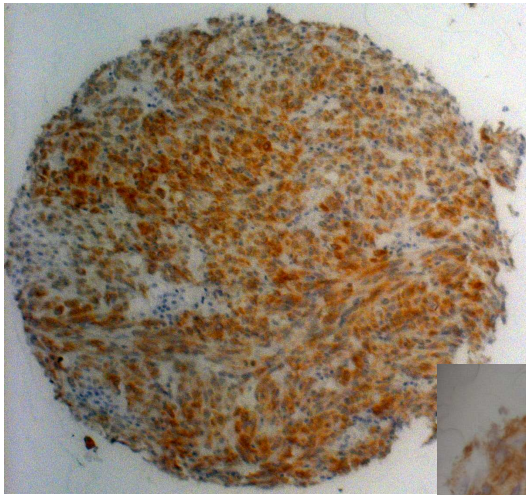
bcl-2 Immunhistochemie,

Beispiele positiver und negativer

Befunde für zytoplasmatische

bcl-2 Expression

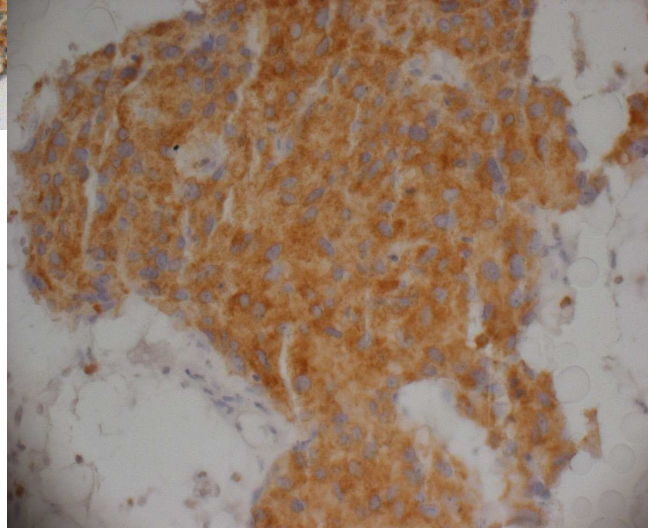
a.



a.: Gewebespot eines GIST mit starker zytoplasmatischer bcl-2 Expression

b.: vergrößerter Ausschnitt, stark bcl-2-IHC positiv

b.



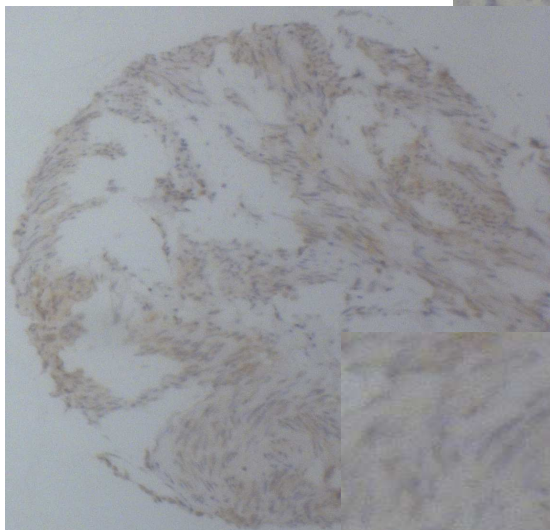
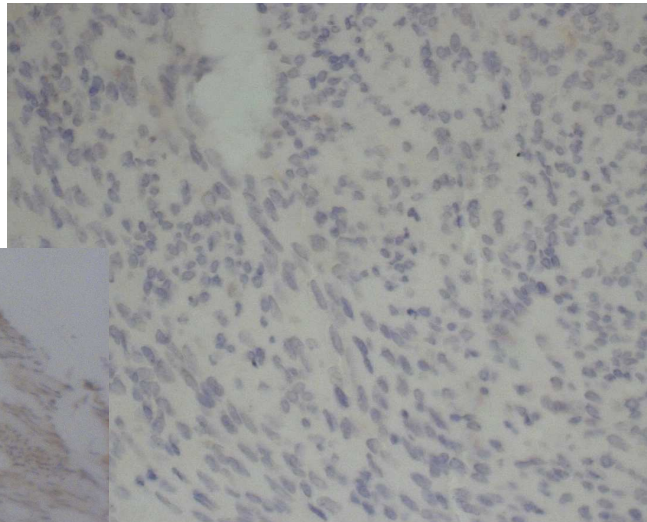
c.: bcl-2 -IHC negativer Gewebespot eines GIST

d.: bcl-2-IHC schwach positiver Gewebespot eines GIST

e.: Ausschnittvergrößerung

d.

c.



e.

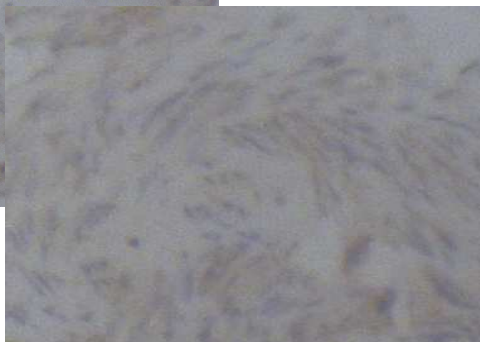


Tabelle 3.3.3.1: bcl-2-Immunhistochemie

Array Zusammensetzung	bcl-2-Expression (%)				
	n	auswertbar	negativ	schwach	stark
Alle Tumorproben	602	532	406(76,3)	23(4,3)	103(19,4)
Primärtumoren					
<i>Weichteilsarkome</i>					
Angiosarkom	9	8	5(62,5)	3(37,5)	0,00
Chondrosarkom	6	4	3(75,0)	1(25,0)	0,00
DFSP ⁸	6	5	5(100,0)	0,00	0,00
Ewing Sarkom	5	4	3(75,0)	0,00	1(25,0)
Fibrosarkom	1	1	1(100,0)	0,00	0,00
GIST	44	42	18(42,9)	3(7,1)	21(50,0)
Hämangioperizytom	9	9	4(44,4)	0,00	5(55,6)
Klarzelliges Sarkom	1	1	1(100,0)	0,00	0,00
Leiomyosarkom	49	48	37(77,1)	0,00	11(22,9)
Liposarkom	54	44	42(95,4)	1(2,3)	1(2,3)
MPNST ⁹	20	20	16(80,0)	1(5,0)	3(15,0)
Maligner extraintestinaler Stromatumor	1	1	0,00	0,00	1(100,0)
MFH ¹⁰	43	33	33(100,0)	0,00	0,00
Osteosarkom	4	3	3(100,0)	0,00	0,00
PNET ¹¹	3	2	2(100,0)	0,00	0,00
Rhabdomyosarkom	4	4	3(75,0)	1(25,0)	0,00
Synovialsarkom	1	1	0,00	0,00	1(100,0)
Sarkom (NOS) ¹²	8	8	4(50,0)	0,00	4(50,0)
Alle	268	238	180(75,6)	10(4,2)	48(20,2)
<i>Benigne Weichteiltumoren</i>					
Desmoid	20	16	16(100,0)	0,00	0,00
GIST	19	16	7(43,8)	2(12,4)	7(43,8)
Granularzelltumor	21	19	0,00	0,00	19(100,0)
Leiomyom	78	69	66(95,7)	2(2,9)	1(1,4)
Rhabdomyom	1	1	1(100,0)	0,00	0,00
Spindelzelliges Lipom der Orbita	1	1	1(100,0)	0,00	0,00
Alle	140	122	91(74,6)	4(3,3)	27(22,1)
Hämatogene Metastasen	81	74	46(62,2)	9(12,2)	19(25,6)
Lymphknotenmetastasen	15	14	12(85,7)	0,00	2(14,3)
Rezidive	98	85	77(90,6)	1(1,2)	7(8,2)

⁸ Dermatofibrosarkoma protuberans

⁹ Maligner peripherer Nervenscheidentumor

¹⁰ Malignes fibröses Histiozytom

¹¹ Peripherer neuroektodermaler Tumor

¹² Not otherwise specified

Tabelle 3.3.3.2: bcl-2-Expression bei gemischten Weichteiltumoren und klinikopathologische Parameter

Array Zusammensetzung			bcl-2-Expression (%)			p-Wert
	n	auswertbar	negativ	schwach	stark	
Dignität						
Benigne	140	122	91(74,6)	4(3,3)	27(22,1)	n.s. p=0,840
Maligne	268	238	180(75,6)	10(4,2)	48(20,2)	
Histologischer Grad						
G1	40	31	22(71,0)	0,00	9(29,0)	n.s. p=0,083
G2	72	69	54(78,3)	2(2,9)	13(18,8)	
G3	98	85	73(85,9)	4(4,7)	8(9,4)	
AJCC-T-Stadium						
pT < 5cm	109	99	70(70,7)	5(5,1)	24(24,2)	n.s. p=0,417
pT ≥ 5cm	153	133	104(78,2)	5(3,8)	24(18,0)	
Metastasen-Status						
pM0	242	214	163(76,2)	9(4,2)	42(19,6)	n.s. p=0,767
pM1	26	24	17(70,8)	1(4,2)	6(25,0)	
Nodalstatus						
pN0	260	232	175(75,4)	10(4,3)	47(20,3)	n.s. p=1,0
pN1	8	6	5(83,3)	0,00	1(16,7)	
Rezidiv-Status						
kein Rezidiv	229	203	151(74,4)	9(4,4)	43(21,2)	n.s. p=0,653
rezidiert	39	35	29(82,9)	1(2,9)	5(14,3)	

3.3.4 Coexpression von p53 und bcl-2

Die p53- und bcl-2 Immunfärbungen unseres Kollektives waren eng miteinander assoziiert ($p < 0,0001$) (Tabelle 3.3.3.1). Dies aber offenbar wegen der hohen Zahl von p53/bcl-2 negativen Tumoren.

Tabelle 3.3.4.1: Coexpression von p53 und bcl-2

		p53		
bcl-2		negativ	schwach positiv	stark positiv
	negativ	218	17	22
	schwach positiv	10	2	2
	stark positiv	47	24	2

Auswertbar: 344 von 408 Fällen

3.3.5 bcl-2-Expression in GIST und Prognose

Für die hier untersuchten Patienten ergab sich kein Unterschied zwischen bcl-2 positiven und bcl-2-negativen GIST hinsichtlich des krankheitsspezifischen Überlebens (Log Rank $p=0,491$), sowie des rezidivfreien (Log Rank $p=0,924$) und des metastasenfreien Überlebens (Log Rank $p=0,818$).

3.4 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH-Untersuchung konnte bei 442 (73,4%) von 602 Tumorproben erfolgreich für bcl-2 durchgeführt werden. FISH-assoziierte Probleme (schwache Hybridisierung, Hintergrund, Gewebeschäden) sowie Probleme der TMA-Technik (z.B. fehlende Gewebeprobe oder zu wenige Tumorzellen in der Gewebeprobe) waren für die nicht auswertbaren Fälle verantwortlich.

Die Ergebnisse der FISH bei den verschiedenen Primärtumoren des Weichgewebes sind in Tabelle 3.4.1 dargestellt, ihre Beziehung zu klinikopathologischen Parametern in Tabelle 3.4.2.

3.4.1 bcl-2 Genkopienzahl

Die normale Anzahl von bcl-2 Signalen fand sich in 379 (85,7%) der 442 auswertbaren Tumorproben. 33 (7,4%) Tumoren hatten 2-3, 14 (3,2%) Tumoren hatten 3-4, 4 (0,9%) Tumoren hatten 4-5 und 6 (1,4%) Tumoren > 5 Signale pro Tumorzellkern.

Mehr als 4 bcl-2 Signale pro Zellkern fanden sich insbesondere bei GIST, Leiomyosarkomen, Liposarkomen, MFH und Osteosarkomen. Insgesamt fand sich nur in einem Fall eine bcl-2 Signalvermehrung in einer benignen Tumorprobe, die übrigen betrafen ausschließlich maligne Tumoren ($p=0,034$). Bei der Untersuchung der Beziehung der bcl-2 Genkopienzahl bei gemischten Weichteilsarkomen und histologischem Grad fiel auf, dass Tumoren mit mehr als 4 bcl-2 Genkopien pro Tumorzellkern ausschließlich in der Gruppe der schlecht differenzierten Tumoren vorkamen. In der Analyse ergab sich jedoch kein Zusammenhang von statistischer Signifikanz. Es fand sich weiterhin keine Beziehung zwischen der bcl-2 Genkopienzahl und dem TNM- und Rezidivstatus.

3.4.2 Bcl-2 Genkopienzahl und bcl-2 Expression

Bei 412 (68,4%) der 602 Gewebeproben lagen gleichzeitig Befunde aus der bcl-2 Immunhistochemie und der bcl-2 FISH-Untersuchung vor. Die Beziehung zwischen bcl-2 Genkopienzahl und bcl-2 Expression bei primären Weichgewebstumoren ist in Abbildung 3.4.b und Tabelle 3.4.3 dargestellt, die Beziehung zwischen bcl-2 Genkopienzahl und bcl-2 Expression bei allen auswertbaren Tumorproben in Tabelle 3.4.4.

Es fand sich in unserem gemischten Kollektiv von Weichteiltumoren kein Zusammenhang zwischen bcl-2 Genkopienzahl und bcl-2 Expression. Insbesondere fand sich keine Zu- oder Abnahme der bcl-2 Expression in Abhängigkeit von der Gendosis.

Tabelle 3.4.1: bcl-2 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Array Zusammensetzung			bcl-2 Genkopienzahl pro Tumorzellkern (%)					
	n	auswertbar	<2	2	>2-3	>3-4	>4-5	>5
Alle Tumorproben	602	442	6(1,4)	379(85,7)	33(7,4)	14(3,2)	4(0,9)	6(1,4)
Primärtumoren								
<i>Weichteilsarkome</i>								
Angiosarkom	9	8	0,00	6(75,0)	0,00	2(25,0)	0,00	0,00
Chondrosarkom	6	4	0,00	3(75,0)	0,00	1(25,0)	0,00	0,00
DFSP ¹³	6	5	0,00	5(100)	0,00	0,00	0,00	0,00
Ewing Sarkom	5	4	0,00	4(100)	0,00	0,00	0,00	0,00
Fibrosarkom	1	0						
GIST	44	39	4(10,3)	29(74,4)	4(10,3)	1(2,6)	1(2,6)	0,00
Hämangioperizytom	9	6	0,00	6(100)	0,00	0,00	0,00	0,00
Klarzelliges Sarkom	1	0						
Leiomyosarkom	49	40	0,00	35(87,5)	3(7,5)	1(2,5)	0,00	1(2,5)
Liposarkom	54	40	0,00	31(77,5)	5(12,5)	2(5,0)	1(2,5)	1(2,5)
MPNST ¹⁴	20	19	0,00	17(89,5)	2(10,5)	0,00	0,00	0,00
<i>Maligner extraintestinaler</i>								
Stromatumor	1	1	0,00	1(100)	0,00	0,00	0,00	0,00
MFH ¹⁵	43	30	0,00	22(73,3)	4(13,3)	3(10,0)	0,00	1(3,3)
Osteosarkom	4	2	0,00	1(50,0)	0,00	0,00	0,00	1(50,0)
PNET ¹⁶	3	1	0,00	1(100)	0,00	0,00	0,00	0,00
Rhabdomyosarkom	4	3	0,00	3(100)	0,00	0,00	0,00	0,00
Synovialsarkom	1	1	0,00	1(100)	0,00	0,00	0,00	0,00
Sarkom (NOS) ¹⁷	8	6	0,00	5(83,3)	0,00	1(16,7)	0,00	0,00
Alle	268	209	4(1,9)	170(81,3)	19(9,1)	10(4,8)	2(1,0)	4(1,9)
<i>Benigne Weichteiltumoren</i>								
Desmoid	20	14	0,00	14(100)	0,00	0,00	0,00	0,00
GIST	19	12	0,00	12(100)	0,00	0,00	0,00	0,00
Granularzelltumor	21	15	0,00	14(93,3)	1(6,7)	0,00	0,00	0,00
Leiomyom	78	39	1(2,6)	37(94,8)	1(2,6)	0,00	0,00	0,00
Rhabdomyom	1	0						
Spindelzelliges Lipom der Orbita	1	1	0,00	1(100)	0,00	0,00	0,00	0,00
Alle	140	81	1(1,2)	78(96,3)	2(2,5)	0,00	0,00	0,00
Hämatoogene Metastasen	81	62	0,00	56(90,4)	2(3,2)	2(3,2)	1(1,6)	1(1,6)
Lymphknotenmetastasen	15	14	0,00	11(78,6)	3(21,4)	0,00	0,00	0,00
Rezidive	98	76	1(1,3)	64(84,2)	7(9,2)	2(2,6)	1(1,3)	1(1,3)

¹³ Dermatofibrosarkoma protuberans

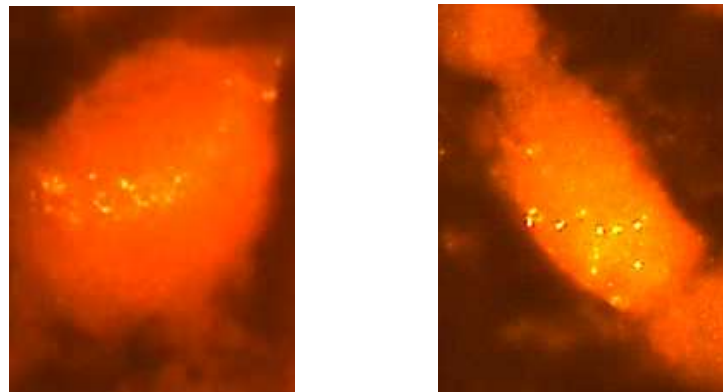
¹⁴ Maligner peripherer Nervenscheidentumor

¹⁵ Malignes fibröses Histiozytom

¹⁶ Peripherer neuroektodermaler Tumor

¹⁷ Not otherwise specified

Abb. 3.4.a: FISH-Befund eines primären Liposarkoms mit Zugewinn an bcl-2 Genkopien



Zellkerne mit hochgradigem Zugewinn an bcl-2 Genkopien (orange fluoreszierende Signale).

Normal 2 Genkopien pro Zellkern.

Tabelle 3.4.2: bcl-2 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) und klinikopathologische

Parameter

Klinikopathologische Parameter			bcl-2 Genkopienzahl pro Tumorzellkern (%)						
	n	auswertbar	<2	2	>2-3	>3-4	>4-5	>5	p-Wert
Dignität									
Benigne	140	81	1(1,2)	78(96,3)	2(2,5)	0,00	0,00	0,00	p=0,034
Maligne	268	209	4(1,9)	170(81,3)	19(9,1)	10(4,8)	2(1,0)	4(1,9)	
Histologischer Grad									
G1	40	26	1(3,8)	23(88,5)	1(3,8)	1(3,8)	0,00	0,00	p=0,060
G2	72	60	0,00	54(90,0)	3(5,0)	3(5,0)	0,00	0,00	
G3	98	79	0,00	55(69,6)	12(15,2)	6(7,6)	2(2,5)	4(5,1)	
AJCC-T-Stadium									
pT < 5cm	109	82	1(1,2)	70(85,4)	6(7,3)	4(4,9)	0,00	1(1,2)	p=0,837
pT ≥ 5cm	153	125	3(2,4)	98(78,4)	13(10,4)	6(4,8)	2(1,6)	3(2,4)	
Metastasen-Status									
pM0	242	186	3(1,6)	152(81,7)	16(8,6)	10(5,4)	2(1,1)	3(1,6)	p=0,409
pM1	26	23	1(4,3)	18(78,3)	3(13,0)	0,00	0,00	1(4,3)	
Nodalstatus									
pN0	260	202	3(1,5)	166(82,2)	17(8,4)	10(5,0)	2(1,0)	4(2,0)	p=0,091
pN1	8	7	1(14,3)	4(57,1)	2(28,6)	0,00	0,00	0,00	
Rezidiv-Status									
kein Rezidiv	229	174	2(1,1)	145(83,3)	13(7,5)	9(5,2)	2(1,1)	3(1,7)	p=0,142
rezidiert	39	35	2(5,7)	25(71,4)	6(17,1)	1(2,9)	0,00	1(2,9)	

Abbildung 3.4.b: bcl-2-Expression und FISH-Befund bei gemischten primären Weichteiltumoren

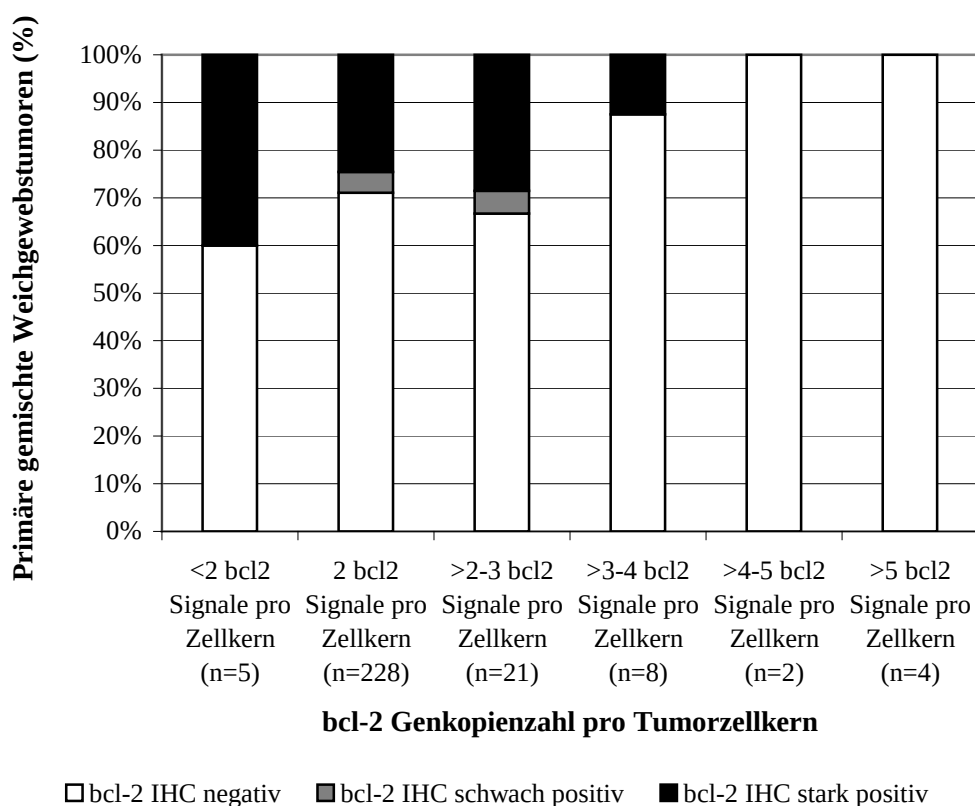


Tabelle 3.4.3: bcl-2-Expression und FISH-Befund bei gemischten primären Weichteiltumoren

		Bcl-2-Expression		
Bcl-2-Gensignale Pro Tumorzellkern		Negativ	Schwach Positiv	Stark positiv
	<2	3	0	2
	2	162	10	56
	>2-3	14	1	6
	>3-4	7	0	1
	>4-5	2	0	0
	>5	4	0	0

Auswertbar: 268 von 408 Primärtumoren

Tabelle 3.4.4: bcl-2-Expression und FISH-Befund bei gemischten Weichteiltumoren

		Bcl-2-Expression		
Bcl-2-Gensignale Pro Tumorzellkern		Negativ	Schwach Positiv	Stark positiv
	<2	4	0	2
	2	257	17	78
	>2-3	22	2	8
	>3-4	10	1	1
	>4-5	3	1	0
	>5	5	0	1

Auswertbar: 412 von 602 Tumorproben inklusive aller Primärtumoren, Metastasen und Rezidive

4. Diskussion

Die wichtige Rolle von p53-Alterationen bei Sarkomen ist seit langem bekannt. Mindestens in Einzelfällen wurden p53 Veränderungen bei praktisch allen Sarkomarten beschrieben. Eine Inaktivierung von p53 führt zu einer vermehrten genetischen Instabilität in Tumoren. Es ist deshalb nicht erstaunlich, dass verschiedene p53 Studien bei Sarkomen Assoziationen mit Malignitätsparametern, beziehungsweise einer ungünstigen Prognose beschrieben. Beispielsweise fanden Sabah et al. bei 152 gemischten Weichteilsarkomen eine deutliche Vermehrung von p53-Alterationen in Tumoren mit ansteigendem Malignitätsgrad [75]. Ähnliche Befunde fanden Yoo et al., Stefanou et al., Jensen et al. und Schneider-Stock et al. bei gemischten Kollektiven von Weichteilsarkomen [100, 80, 50, 76], Nawa et al. bei Chondrosarkomen [66], Taubert et al. bei Liposarkomen [85] und Hoos et al. bei Fibrosarkomen [45].

Auch Assoziationen mit ungünstiger Prognose wurden beschrieben. Taubert et al. [84], Cordon-Cardo et al. [20] und Drobnjak et al. [26] fanden bei gemischten Weichteilsarkomen, Barbashina et al. bei Synovialsarkomen [11], Abudu et al. [1] und de Alava et al. [24] bei Ewing Sarkomen, Antonescu et al. bei Liposarkomen [10] und Uozaki et al. bei Osteosarkomen [89] ein signifikant ungünstigeres Überleben bei p53 positiven Tumoren. Würfl et al. fanden eine signifikante Assoziation mit der Rezidivwahrscheinlichkeit bei gemischten Weichteilsarkomen [97], beziehungsweise Amir et al. bei Ewing Sarkomen [7].

Diese Ergebnisse blieben allerdings nicht unwidersprochen. Andere Autoren vermochten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen p53 Veränderungen und Malignitätsparametern oder der Prognose zu finden. Beispielsweise fanden Dan`ura et al. bei gemischten Weichteilsarkomen keinen Zusammenhang mit der Prognose, obwohl mehr als 100 Tumoren untersucht worden waren [23]. Eine andere große Studie mit negativen Resultaten ist von Engellau et al., der bei 140 Weichteilsarkomen keinen Zusammenhang zwischen p53-Status und Prognose fand [29]. Ebenfalls keinen Zusammenhang mit der Prognose fanden Ahlen et al., Hasegawa et al. und Stefanou et al. bei gemischten Weichteilsarkomen [2, 39, 80], Schneider-Stock et al. bei Liposarkomen [77], Takahashi et al. bei

Rhabdomyosarkomen [83], Park et al. bei Osteosarkomen [69], Mittal et al. bei Leiomyosarkomen [63] und Meis-Kindblom et al. bei Angiosarkomen [60].

Diese divergenten Resultate sind wahrscheinlich im wesentlichen auf zwei Gründe zurückzuführen. Erstens sind auch die größten untersuchten Patientenkollektive verhältnismäßig klein. Nur in wenigen Studien wurden mehr als hundert beziehungsweise mehr als zweihundert Tumoren untersucht. Dieses Problem liegt in der Natur der Sache, da Sarkome zu den seltenen Tumorarten zählen und es schwer fällt, große Patientenkollektive mit Verlaufsdaten zu sammeln. Zum Beispiel beträgt die Inzidenz für Sarkome in Deutschland jährlich etwa 2-3/ 100.000 [103], hochgerechnet auf die Einwohnerzahl der Bundesrepublik Deutschland beträgt die absolute Zahl der Neuerkrankungen somit etwa 2400 pro Jahr. Das ist 25 mal weniger als beispielsweise die etwa 60.000 pro Jahr neu diagnostizierten Prostatakarzinome [104]. Zweitens bestehen offenbar Variabilitäten in der Durchführung und Auswertung der Immunhistochemie. Es ist bemerkenswert, dass eine diagnostisch so häufig angewendete Technik wie die Immunhistochemie nicht größeren Standardisierungsbemühungen unterliegt. Die 25 in Tabelle 4.1 zusammengefassten Studien verwendeten insgesamt 6 verschiedene Antikörper und unterschiedliche Protokolle zum p53 Nachweis. Zu dem wurden meistens auch unterschiedliche Kriterien für die Definition der p53 Positivität festgelegt. Die Kriterien reichen von eindeutig positiven Tumorzellkernen bis zu mindestens 20% positiven Tumorzellkernen mit mindestens mäßig starker Intensität. Einige Definitionen für p53 Positivität sind exemplarisch in Tabelle 4.1 dargestellt.

Auch in unserer Studie ist die Zahl der untersuchten Fälle naturgemäß nicht sehr gross. Stärke unserer Studie ist allerdings die maximale Standardisierung der immunhistochemischen Untersuchungen. Die Tissue Microarray Technik macht es möglich, sämtliche Tumoren auf einem einzigen Objektträger an einem einzigen Tag unter komplett standardisierten Bedingungen zu untersuchen. Alle Gewebeproben auf dem Objektträger sind gleich dick geschnitten, gleich lang bei gleichen Temperaturen und anderen äußeren Bedingungen gelagert und alle Inkubationszeiten und -temperaturen sind absolut identisch. Weiterhin legt die Auswertung sämtlicher Tumoren an einem Tag innerhalb von wenigen Stunden den Schluss nahe, dass ungewöhnlich einheitliche Bewertungsmaßstäbe angewendet worden sein dürften. Tatsächlich ergeben die Resultate unserer hochstandardisierten Studie Anhaltspunkte

für eine relevante prognostische Bedeutung der p53 Veränderungen in Sarkomen. Die Zusammenfassung aller Tumoren ergibt deutliche Zusammenhänge zwischen dem p53 Status und verschiedenen Parametern der Malignität. Signifikante Zusammenhänge bestanden insbesondere mit der Fernmetastasierung und dem Differenzierungsgrad.

Verlaufsdaten standen in unserem Patientenkollektiv nur von der Untergruppe der Gastrointestinalen Stromatumoren zur Verfügung. In diesem Unterkollektiv fand sich tatsächlich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der p53 Positivität und einem ungünstigen Überleben, beziehungsweise einem frühzeitigen Tumorrezidiv. Diese Ergebnisse passen zu Daten von Feakins et al., der beim GIST ebenfalls eine Prognoserelevanz der p53 Immunhistochemie gezeigt hatte [30]. Andere hatten in ihren Kollektiven keine derartigen Zusammenhänge gefunden [65, 22].

Tabelle 4.1: Studien zur p53-Expression bei gemischten Weichteilsarkomen

Autor	Jahr	Ref.	n	Antikörper	Definition positiv *	positiv %
Sabah et al.	2007	[75]	152	P53 DO-7	>10%	32,2%
Åhlén et al.	2005	[2]	101	P53 DO-1	>1%	86%
Engellau et al.	2005	[29]	140	P53 DO-7	> 20 %	20%
Egellau et al.	2004	[27]	218	P53 DO-7	> 20 %	24%
Yoo et al.	2002	[100]	67	P53	>10%	37%
Dan`nura et al.	2002	[23]	102	P53 DO-7	20%	
Yoo et al.	2002	[99]	91	P53 DO-7	nukleäre Anfärbung in der Mehrzahl der malignen Zellen	33%
Folpe et al.	2000	[33]	89	P53 DO-7	>20%	44%
Hasegawa et al.	2000	[39]	95	P53 DO-7	>20%	20%
Würl et al.	1999	[96]	198	P53 DO-1	> 10%	58,2%
Taubert et al.	1998	[84]	146	P53 DO-1	> 10%	63,7%
Stefanou et al.	1998	[80]	40	P53 DO-7	jede nukleäre Anfärbung	20%
Pindzola et al.	1998	[70]	66	P53 Pab 1801	eindeutige nukleäre Anfärbung	26%
Heslin et al.	1998	[41]	121	P53 Pab 1801	≥20%	9%
Jensen et al.	1998	[50]	216	P53	>10%	24%
Schneider-						
Stock et al.	1997	[76]	67	P53 DO-1	eindeutige nukleäre Anfärbung	34%
Yoo et al.	1997	[98]	31	P53 DO-7	nukleäre Anfärbung	55%
Soini et al.	1996	[79]	63	P53 CM-1	nukleäre Anfärbung	19%
Cordon et al.	1994	[20]	211	P53 PAb 1801	>20%	26%
Toffoli et al.	1994	[86]	61	Pab 1801	>51%	
Kawai et al.	1994	[53]	96	P53 RSP-p53	>10%	32%
Drobnjak et al.	1994	[26]	174	P53 PAb 1801	> 20%	25%
Latres et al.	1994	[56]	73	P53 PAb 1801	> 20%	34%
Dei Tos et al.	1993	[25]	145	P53 PAb 1801	Referenz : kleinzelliges Bronchial Ca, Larynxkarzinom mit bekannter p53- Expression	65%
Wadayama et al.	1993	[93]	113	P53 PAb 421	nukleäre Anfärbung	25,7%

* Prozentangaben beziehen sich auf den jeweils definierten Prozentsatz IHC- positiver Tumorzellkerne als Grenzwert für die Definition eines positiven Falls.

Bcl-2 ist ein anderes für die Tumorbilogie relevantes Protein. Bcl-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose. Eine Hochregulierung von bcl-2 inhibiert die Apoptosefähigkeit einer Zelle [90]. Bcl-2 Überexpressionen wurden in verschiedenen Tumorarten beschrieben und gelten – wegen ihrer Hemmung der Apoptose – als Zeichen erhöhter Malignität. Eine bcl-2 Überexpression wurde bei zahlreichen verschiedenen Tumorarten beschrieben, unter anderem beim Prostata Karzinom [52], Malignen Melanom [92] und beim Kolonkarzinom [58].

Eine Assoziation der bcl-2 Überexpression mit ungünstiger Prognose fand sich bei verschiedenen Tumorarten, beispielsweise beim Hodkin Lymphom [82], B-Zell Lymphom [34], nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom [48], Kolonkarzinom [36] und beim Neuroblastom [18]. Bei anderen Tumorarten fand sich erstaunlicher Weise ein Zusammenhang zwischen verminderter bcl-2 Expression und ungünstiger Prognose, so zum Beispiel beim Mammakarzinom [74]. Bei Sarkomen wurde die Prognoserelevanz von bcl-2 bisher weniger oft überprüft als für p53. Einige der zu diesem Thema an gemischten Kollektiven von Weichteilsarkomen durchgeführten Studien sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Diese Studien hatten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen bcl-2 Expression und Prognose gefunden.

Tabelle 4.2: Studien zur bcl-2-Expression bei gemischten Weichteilsarkomen

Autor	Jahr	Ref.	n	Antikörper	Definition positiv *	positiv %
Sabah et al.	2007	[75]	152	Bcl-2 clone 124	>10%	38,8%
Åhlén et al.	2005	[2]	101	Bcl-2 Dakopatt	>1%	91%
Engellau et al.	2005	[29]	140	Bcl2 M0887	>10%	16%
Egellau et al.	2004	[27]	218 (MFH)	Bcl2 M0887	>10%	8%
Dan`nura et al.	2002	[23]	102	Bcl2 clone 124		32%
Miettinen et al.	1998	[62]	205	Bcl2 clone 124		77,1%
Jensen et al.	1998	[50]	216	Bcl2 DAKO	moderate oder starke Anfärbung in der Mehrzahl der Tumorzellen	33%
Soini et al.	1996	[79]	63	Bcl2 clone 124	zytoplasmatische Anfärbung als positiv oder negativ	42,8%

* Prozentangaben beziehen sich auf den jeweils definierten Prozentsatz IHC- positiver Tumorzellkerne als Grenzwert für die Definition eines positiven Falls.

Alle Studien hatten aber übereinstimmend gezeigt, dass bcl-2 bei Sarkomen verschiedenster Arten immer wieder nachgewiesen werden kann. Eine bcl-2 Positivität wurde unter anderem für Gastrointestinale Stromatumoren [19, 22, 30, 67, 81, 95], Chondrosarkome [8, 16, 37, 73], Synovialsarkome [9, 11, 13, 42, 59, 91], Osteosarkome [31, 71], Leiomyosarkome [14, 101], sogenannte Maligne Fibröse Histiozytome [3, 64], Hämangioperizytome [13], Fibrosarkome [45], Maligne periphere Nervenscheidentumoren, Liposarkome, Rhabdomyosarkome, Angiosarkome [50, 75], Dermatofibrosarkoma Protuberans und uterine Leiomyome [62] zumindest in Einzelfällen beschrieben.

Assoziationen von bcl-2 und Malignitätsparametern sowie der Patientenprognose wurden in einigen wenigen Studien gefunden. So fanden beispielsweise Jensen et al. bei gemischten Weichteilsarkomen einen Zusammenhang zwischen schlechtem Differenzierungsgrad und bcl-2 Expression [50], sowie Rozemann et al. und Bovee et al. bei Chondrosarkomen [73, 16].

Eine Assoziation mit ungünstiger Prognose fand Changchien et al. bei Gastrointestinalen Stromatumoren [19], während Zhai et al. bei uterinen Leiomyosarkomen eine Assoziation zwischen bcl-2 Expression und günstiger Prognose fanden [101].

Die Ergebnisse unserer Untersuchung ergeben keine Anhaltspunkte auf einen Zusammenhang zwischen bcl-2 Expression und dem biologischen Malignitätspotential von Tumoren. Obwohl eingestanden werden muss, dass die Kombination verschiedenster Sarkomarten, wie in unserem Patientenkollektiv, für derartige Untersuchungen nicht optimal geeignet ist, kann immerhin festgestellt werden, dass die erhaltbaren Daten keine Anhaltspunkte für ein besonders aggressives Verhalten bcl-2 positiver Sarkome geben. Insbesondere fanden sich keine Zusammenhänge zwischen einer bcl-2 Expression und einer vermehrten Metastasierung oder einem ungünstigen Differenzierungsgrad. Interessanter Weise fand sich in ganz bestimmten, teilweise seltenen Tumorarten stark gehäuft eine bcl-2 Expression. Dazu gehört der Granularzelltumor, welcher in 100% der Fälle eine starke bcl-2 Positivität aufwies. Bei dieser Tumorart könnte der bcl-2 Nachweis auch diagnostisch genutzt werden.

Die Mechanismen, die in malignen Tumoren zu einer bcl-2 Überexpression führen können, sind bisher wenig bekannt. In einzelnen Tumorarten konnte kürzlich gezeigt

werden, dass eine Vermehrung der Genkopienzahl (DNA-Amplifikation) eine Ursache für die Überexpression von bcl-2 darstellt. Bcl-2 Amplifikationen waren Beispielsweise bei diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen gefunden worden [72]. Amplifikationen sind von besonderem Interesse, weil dieser Mechanismus für Überexpression gehäuft bei therapeutisch relevanten Genen vorzukommen scheint. Bekannte durch Amplifikation überexprimierte Therapieziele sind Her2, Östrogenrezeptor und EGFR [4, 5, 44]. Für den Androgenrezeptor ist die Amplifikation ein wesentlicher Mechanismus für die Entstehung einer Resistenz gegen antiandrogene Therapien [17]. Amplifikationen von bcl-2 sind auch in dieser Hinsicht von Interesse, da Medikamente gegen bcl-2 existieren, die gerade beim Bronchialkarzinom in Erprobung sind, wo amplifizierte Fälle zumindest in einem Teil der bcl-2 exprimierenden Karzinome vorkommen [68]. Amplifikationen von bcl-2 finden sich in unserem Tumorkollektiv allerdings nur ausnahmsweise. Es kann davon ausgegangen werden, dass klassische Amplifikationen für die Expression von bcl-2 in Sarkomen keine Rolle spielen. Insbesondere finden sich keine deutlichen bcl-2 Vermehrungen, die zur Anordnung von bcl-2 Signalen in sogenannten „Clustern“ führen, welche charakteristisch für intrachromosomale Amplifikationen (sogenannte homogenously staining regions) sind. Allerdings fanden sich einige Fälle mit einer geringgradigen aber eindeutigen Vermehrung der bcl-2 Kopienzahl. 12,9 % der Tumoren zeigten mehr als zwei bcl-2 Signale pro Tumorzelle, 2,3% der Tumoren wiesen sogar mehr als 4 bcl-2 Signale pro Tumorzelle auf. Bemerkenswerter Weise war die bcl-2 Kopienzahl jedoch nicht mit der bcl-2 Expression assoziiert. Dies deutet darauf hin, dass andere, in der Nachbarschaft von bcl-2 liegende Gene die Ziele der 18q21 Amplifikation bei Sarkomen darstellen dürften.

Zusammengefasst zeigen die Resultate der vorliegenden Untersuchung, dass sowohl p53 wie auch bcl-2 bei verschiedensten Sarkomen überexprimiert, beziehungsweise alteriert sein können. Für p53 deuten unsere Resultate auf eine signifikante Beziehung dieser Veränderungen mit malignem Phänotyp und aggressivem biologischen Verhalten hin. Für bcl-2 fehlen Anhaltspunkte auf eine besondere Malignität überexprimierender Tumoren. Da auch Amplifikationen von bcl-2 bei diesen Tumortypen selten zu sein scheinen, ergeben sich aus dieser Hinsicht keine zusätzlichen Anhaltspunkte darauf, dass bcl-2 bei Sarkomen ein relevantes Therapieziel darstellen könnte.

5. Zusammenfassung

Tumoren des Weichgewebes bilden eine heterogen Gruppe von gutartigen und bösartigen Neubildungen mesenchymaler und Neuroektodermaler Herkunft. Maligne Weichgewebstumoren sind dabei vergleichsweise selten. Ihr Anteil beträgt nur etwa 1% der Gesamtzahl aller Malignome des Erwachsenen. Nahezu 50% der Patienten mit Weichteilsarkom sterben jedoch innerhalb von fünf Jahren an ihrem Tumor. Verbesserungen der Kenntnisse über die molekularbiologischen Zusammenhänge bei Sarkomen könnten in der Diagnostik hilfreich sein und damit zu verbesserten Prognoseparametern und zu spezifischeren Therapiekonzepten führen. Die Tissue Microarray (TMA) - Technik ist eine effektive Methode für molekularepidemiologische Untersuchungen zu potentiellen Therapiezielen, außerdem ist sie geeignet, Zusammenhänge zwischen molekularen Parametern und der Patientenprognose zu finden.

Wir untersuchten in der vorliegenden Studie die Häufigkeit sowie die prognostische Bedeutung von p53- und bcl-2-Expressionen sowie die Häufigkeit von bcl-2-Genkopienzahlveränderungen mittels Immunhistochemie beziehungsweise Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) an einem Tissue Microarray aus 602 Weichgewebstumoren.

Von den 554 in der p53-Immunhistochemie auswertbaren Tumorproben waren 12,3% schwach p53 positiv und 8,3% stark p53 positiv. Der Unterschied der p53-Expression zwischen benignen und malignen Weichteiltumoren war hoch signifikant ($p < 0,0001$). Bei unserem Kollektiv von gemischten Weichteilsarkomen fand sich eine Assoziation zwischen p53-Expression und histologischem Grad ($p < 0,0001$) und der Metastasierungswahrscheinlichkeit ($p = 0,014$). Zu unseren Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren waren klinische Verlaufsdaten vorhanden. In der univariaten Analyse fand sich für dieses Patientenkollektiv ein signifikanter Zusammenhang zwischen p53 Positivität und ungünstigem Überleben ($p = 0,003$) beziehungsweise einem frühzeitigen Tumorrezidiv ($p = 0,014$). Von den 532 in der bcl-2-Immunhistochemie auswertbaren Tumorproben waren 4,3% schwach bcl-2 positiv und 19,4% stark bcl-2 positiv. Für unser Kollektiv von gemischten Weichteiltumoren ergaben sich keine Anhaltspunkte auf einen Zusammenhang zwischen bcl-2 Expression und dem biologischen Malignitätspotential. In der Fluoreszenz in situ Hybridisierung fanden sich einige Fälle mit einer geringgradigen

aber eindeutigen Vermehrung der bcl-2 Genkopienzahl. 12,9 % der Tumoren zeigten mehr als zwei bcl-2 Signale pro Tumorzellkern, 2,3% der Tumoren wiesen sogar mehr als 4 bcl-2 Signale pro Tumorzellkern auf. Es fand sich keine Assoziation der bcl-2 Kopienzahl mit der bcl-2 Expression.

Auch aus methodischer Sicht sind unsere Daten interessant. Für p53-Alterationen ließ sich die erwartete Beziehung zu malignem Phänotyp und aggressivem biologischen Verhalten von Tumoren an einem Tissue Microarray aus lediglich je einer nur 0,6 mm durchmessenden Gewebeprobe pro Tumor reproduzieren. Die Resultate unterstreichen die Relevanz der Tissue Microarray- Technik zur Analyse von molekularer Epidemiologie und prognostischer Bedeutung von molekularen Befunden. Die TMA-Technik ermöglicht eine rasche Überführung von Erkenntnissen der Grundlagenforschung in die klinische Praxis.

6. Literatur

1. Abudu, A, Mangham, DC, Reynolds, G.M, Pynsent, PB, Tillman, RM, Carter, SR, Grimer, RJ (1999) Overexpression of p53 protein in primary Ewing's sarcoma of bone: relationship to tumour stage, response and prognosis. *Br J Cancer* 79(7-8): 1185-9
2. Åhlén, J, Wejde, J, Brosjö, O, von Rosen, A, Weng, WH, Girnita, L, Larsson, O, Larsson, C (2005) Insulin-like growth factor type 1 receptor expression correlates to good prognosis in highly malignant soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 11(1): 206-16
3. Åhlén, J, Weng, WW, Brosjö, O, von Rosen, A, Larsson, O, Larsson, C (2003) Evaluation of immunohistochemical parameters as prognostic markers in malignant fibrous histiocytoma. *Oncol Rep* 10(5): 1641-5
4. Al-Kuraya, K, Novotny, H, Bavi, P, Siraj, AK, Uddin, S, Ezzat, A, Sanea, N, Al-Dayel, F, Al-Mana, H, Sheikh, SS, Mirlacher, M, Tapia, C, Simon, R, Sauter, G, Terracciano, L, Tornillo, L (2007) HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 60: 768-772
5. Al-Kuraya, K, Schraml, P, Torhorst, J, Tapia, C, Zaharieva, B, Novotny, H, Spichtin, H, Maurer, R, Mirlacher, M, Köchli, O, Zuber, M, Dieterich, H, Mross, F, Wilber, K, Simon, R, Sauter, G (2004) Prognostic Relevance of Gene Amplifications and Coamplifications in Breast Cancer. *Cancer Res* 64: 8534-8540
6. Alvegard, T (1996) Soft tissue sarcomas. *Acta Oncol* 35 Suppl 7: 117-22
7. Amir, G, Issakov, J, Meller, I, Sucher, E, Peyser, A, Cohen, IJ, Yaniv, I, Ben Arush, MW, Tavori, U, Kollender, Y, Ron, N, Peylan-Ramu, N (2002) Expression of p53 gene product and cell proliferation marker Ki-67 in Ewing's sarcoma: correlation with clinical outcome. *Hum Pathol* 33(2): 170-4

8. Amling, M, Posl, M, Hentz, MW, Priemel, M, Delling, G (1998) PTHrP and Bcl-2: essential regulatory molecules in chondrocyte differentiation and chondrogenic tumors. *Verh Dtsch Ges Pathol* 82: 160-9
9. Antonescu, CR, Kawai, A, Leung, DH, Lonardo, F, Woodruff, JM, Healey, JH, Ladanyi, M (2000) Strong association of SYT-SSX fusion type and morphologic epithelial differentiation in synovial sarcoma. *Diagn Mol Pathol* 9(1): 1-8
10. Antonescu, CR, Tschernyavsky, SJ, Decuseara, R, Leung, DH, Woodruff, JM, Brennan, MF, Bridge, JA, Neff, JR, Goldblum, JR, Ladanyi, M (2001) Prognostic impact of P53 status, TLS-CHOP fusion transcript structure, and histological grade in myxoid liposarcoma: a molecular and clinicopathologic study of 82 cases. *Clin Cancer Res* 7(12): 3977-87
11. Barbashina, V, Benevenia, J, Aviv, H, Tsai, J, Patterson, F, Aisner, S, Cohen, S, Fernandes, H, Skurnick, J, Hameed, M (2002) Oncoproteins and proliferation markers in synovial sarcomas: a clinicopathologic study of 19 cases. *J Cancer Res Clin Oncol* 128(11): 610-6
12. Beahrs, OH, Henson, DE, Hutter, RVP et al. (1992) In: *Manual for staging of cancer*. Third Edition. Philadelphia, ed 3, J. B. Lippincot Company
13. Bhargava, R, Shia, J, Hummer, AJ, Thaler, HT, Tornos, C, Soslow, RA (2005) Distinction of endometrial stromal sarcomas from 'hemangiopericytomatous' tumors using a panel of immunohistochemical stains *Mod Pathol* 18(1): 40-7
14. Bodner, K, Bodner-Adler, B, Kimberger, O, Czerwenka, K, Mayerhofer, K (2004) Bcl-2 expression and other clinicopathologic parameters in uterine leiomyosarcoma. *Wien Klin Wochenschr* 116(4): 135-9
15. Borden, EC, Baker, LH, Bell, RS, Bramwell, V, Demetri, GD, Eisenberg, BL, Fletcher, CD, Fletcher, JA, Ladanyi, M, Meltzer, P, O'Sullivan, B, Parkinson, DR, Pisters, PW, Saxman, S, Singer, S, Sundaram, M, van Oosterom, AT, Verweij, J, Waalen, J, Weiss, SW, Brennan, MF (2003) Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. *Clin Cancer Res* 9(6): 1941-56

16. Bovee, JV, van den Broek, LJ, Cleton-Jansen, AM, Hogendoorn, PC (2000) Up-regulation of PTHrP and Bcl-2 expression characterizes the progression of osteochondroma towards peripheral chondrosarcoma and is a late event in central chondrosarcoma. *Lab Invest* 80(12): 1925-34
17. Bubendorf, L, Kononen, J, Koivisto, P, Schraml, P, Moch, H., Gasser, TC, Willi, N, Mihatsch, MJ, Sauter, G, Kallioniemi, O (1999) Survey of Gene Amplifications during Prostate Cancer Progression by High-Throughput Fluorescence in Situ Hybridization on Tissue Microarrays. *Cancer Res* 59: 803-806
18. Castle, VP, Heidelberger, KP, Bromberg, J, Ou, X, Dole, M, Nunez, G (1993) Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2, in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *Am J Pathol* 143(6): 1543-50
19. Changchien, CR, Wu, MC, Tasi, WS, Tang, R, Chiang, JM, Chen, JS, Huang, SF, Wang, JY, Yeh, CY (2004) Evaluation of prognosis for malignant rectal gastrointestinal stromal tumor by clinical parameters and immunohistochemical staining. *Dis Colon Rectum* 47(11): 1922-9
20. Cordon-Cardo, C, Latres, E, Drobnjak, M, Oliva, MR, Pollack, D, Woodruff, JM, Marechal, V, Chen, J, Brennan, MF, Levine, AJ (1994) Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 54(3): 794-9
21. Cormier, JN and RE Pollock (2004) Soft tissue sarcomas. *CA Cancer J Clin* 54(2): 94-109
22. Cunningham, RE, Abbondanzo, SL, Chu, WS, Emory, TS, Sobin, LH, O'Leary, TJ (2001) Apoptosis, bcl-2 expression, and p53 expression in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9(1): 19-23
23. Dan'ura, T, Kawai, A, Morimoto, Y, Naito, N, Yoshida, A, Inoue, H (2002) Apoptosis and expression of its regulatory proteins in soft tissue sarcomas. *Cancer Lett* 178(2): 167-74

24. de Alava, E, Antonescu, CR, Panizo, A, Leung, D, Meyers, PA, Huvos, AG, Pardo-Mindan, FJ, Healey, JH, Ladanyi, M (2000) Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer* 89(4): 783-92
25. Dei Tos, AP, Doglioni, C, Laurino, L, Barbareschi, M, Fletcher, CD (1993) p53 protein expression in non-neoplastic lesions and benign and malignant neoplasms of soft tissue. *Histopathology* 22(1): 45-50
26. Drobnjak, M, Latres, E, Pollack, D, Karpeh, M, Dudas, M, Woodruff, JM, Brennan, MF, Cordon-Cardo, C (1994) Prognostic implications of p53 nuclear overexpression and high proliferation index of Ki-67 in adult soft-tissue sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 86(7): 549-54
27. Engellau, J (2004) Prognostic factors in soft tissue sarcoma. Tissue microarray for immunostaining, the importance of whole-tumor sections and time-dependence. *Acta Orthop Scand Suppl* 75(314): 2 p preceding table of contents-52, backcover.
28. Engellau, J, Akerman, M, Anderson, H, Domanski, HA, Rambech, E, Alvegard, TA, Nilbert, M (2001) Tissue microarray technique in soft tissue sarcoma: immunohistochemical Ki-67 expression in malignant fibrous histiocytoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9(4): 358-63
29. Engellau, J, Bendahl, PO, Persson, A, Domanski, HA, Akerman, M, Gustafson, P, Alvegard, TA, Nilbert, M, Rydholm, A (2005) Improved prognostication in soft tissue sarcoma: independent information from vascular invasion, necrosis, growth pattern, and immunostaining using whole-tumor sections and tissue microarrays. *Hum Pathol* 36(9): 994-1002
30. Feakins, RM (2005) The expression of p53 and bcl-2 in gastrointestinal stromal tumours is associated with anatomical site, and p53 expression is associated with grade and clinical outcome. *Histopathology* 46(3): 270-9
31. Ferrari, S, Bertoni, F, Zanella, L, Setola, E, Bacchini, P, Alberghini, M, Versari, M, Bacci, G (2004) Evaluation of P-glycoprotein, HER-2/ErbB-2, p53, and Bcl-2 in

primary tumor and metachronous lung metastases in patients with high-grade osteosarcoma. *Cancer* 100(9): 1936-42

32. Fletcher, CDM, Unni, KK, Mertens, F (2002) In: World Health Organisation Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Soft Tissue and Bone. IARC Press: Lyon
33. Folpe, AL, Lyles, RH, Sprouse, JT, Conrad, EU, 3rd, Eary, JF (2000) (F-18) fluorodeoxyglucose positron emission tomography as a predictor of pathologic grade and other prognostic variables in bone and soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 6(4): 1279-87
34. Grange, F, Petrella, T, Beylot-Barry, M, Joly, P, D'Incan, M, Delaunay, M, Machet, L, Avril, MF, Dalac, S, Bernard, P, Carlotti, A, Esteve, E, Vergier, B, Dechelotte, P, Cassagnau, E, Courville, P, Saiag, P, Laroche, L, Bagot, M, Wechsler, J (2004) Bcl-2 protein expression is the strongest independent prognostic factor of survival in primary cutaneous large B-cell lymphomas. *Blood* 103(10): 3662-8
35. Gustafson, P (1994) Soft tissue sarcoma. Epidemiology and prognosis in 508 patients. *Acta Orthop Scand Suppl* 259: 1-31
36. Hague, A, Moorthen, M, Hicks, D, Chapman, M, Paraskeva, C (1994) BCL-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Oncogene* 9(11): 3367-70
37. Hameetman, L, Kok, P, Eilers, PH, Cleton-Jansen, AM, Hogendoorn, PC, Bovee, J V. (2005) The use of Bcl-2 and PTHLH immunohistochemistry in the diagnosis of peripheral chondrosarcoma in a clinicopathological setting. *Virchows Arch* 446(4): 430-7
38. Hanahan, D, Weinberg, RA (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57-70
39. Hasegawa, T, Yokoyama, R, Lee, YH, Shimoda, T, Beppu, Y, Hirohashi, S (2000) Prognostic relevance of a histological grading system using MIB-1 for adult soft-tissue sarcoma. *Oncology* 58(1): 66-74

40. Hendriks, Y, Franken, P, Dierssen, JW, De Leeuw, W, Wijnen, J, Dreef, E, Tops, C, Breuning, M, Brocker-Vriends, A, Vasen, H, Fodde, R, Morreau, H (2003) Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol* 162(2): 469-77
41. Heslin, MJ, Cordon-Cardo, C, Lewis, JJ, Woodruff, J.M, Brennan, MF (1998) Ki-67 detected by MIB-1 predicts distant metastasis and tumor mortality in primary, high grade extremity soft tissue sarcoma. *Cancer* 83(3): 490-7
42. Hirakawa, N., Naka, T., Yamamoto, I., Fukuda, T., Tsuneyoshi, M. (1996). "Overexpression of bcl-2 protein in synovial sarcoma: a comparative study of other soft tissue spindle cell sarcomas and an additional analysis by fluorescence in situ hybridization." *Hum Pathol* 27(10): 1060-5
43. Hollstein, M, Rice, K, Greenblatt, MS, Soussi, T, Fuchs, R, Sorlie, T, Hovig, E, Smith-Sorensen, B, Montesano, R, Harris, CC (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22(17): 3551-5
44. Holst, F, Stahl, PR, Ruiz, C, Hellwinkel, O, Jehan, Z, Wendland, M, Lebeau, A, Terracciano, L, Al-Kuraya, K, Jänicke, F, Sauter, G, Simon, R (2007) Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Gen* 39(5): 655-600
45. Hoos, A, Lewis, JJ, Antonescu, CR, Dudas, ME, Leon, L, Woodruff, JM, Brennan, MF, Cordon-Cardo, C (2001) Characterization of molecular abnormalities in human fibroblastic neoplasms: a model for genotype-phenotype association in soft tissue tumors. *Cancer Res* 61(7): 3171-5
46. Hoos, A, Stojadinovic, A, Mastorides, S, Urist, MJ, Polsky, D, Di Como, CJ, Brennan, MF, Cordon-Cardo, C (2001) High Ki-67 proliferative index predicts disease specific survival in patients with high-risk soft tissue sarcomas. *Cancer* 92(4): 869-74
47. Hoos, A, Urist, MJ, Stojadinovic, A, Mastorides, S, Dudas, ME, Leung, DH, Kuo, D, Brennan, MF, Lewis, JJ, Cordon-Cardo, C (2001) Validation of tissue microarrays for

immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 158(4): 1245-51

48. Hwang, JH, Lim, SC, Kim, YC, Park, KO, Ahn, SJ, Chung, WK (2001) Apoptosis and bcl-2 expression as predictors of survival in radiation-treated non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50(1): 13-8
49. Janiak, F, Leber, B, Andrews, DW (1994) Assembly of Bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 269(13): 9842-9
50. Jensen, V, Sorensen, FB, Bentzen, SM, Ladekarl, M, Nielsen, OS, Keller, J, Jensen, OM (1998) Proliferative activity (MIB-1 index) is an independent prognostic parameter in patients with high-grade soft tissue sarcomas of subtypes other than malignant fibrous histiocytomas: a retrospective immunohistological study including 216 soft tissue sarcomas. *Histopathology* 32(6): 536-46
51. Kaifi, JT, Strelow, A, Schurr, PG, Reichelt, U, Yekebas, EF, Wachowiak, R, Quaas, A, Strate, T, Schäfer, H, Sauter, G, Schachner, M, Izbicki, JR (2006) L1 (CD171) is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors. *Mod. Pathol.* 19: 399-406
52. Kaur, P, Kallakury, BS, Sheehan, CE, Fisher, HA, Kaufman, RP Jr., Ross, JS (2004) Survivin and Bcl-2 expression in prostatic adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 128(1): 39-43
53. Kawai, A, Noguchi, M, Beppu, Y, Yokoyama, R, Mukai, K, Hirohashi, S, Inoue, H, Fukuma, H (1994) Nuclear immunoreaction of p53 protein in soft tissue sarcomas. A possible prognostic factor. *Cancer* 73(10): 2499-505
54. Kononen, J, Bubendorf, L, Kallioniemi, A, Barlund, M, Schraml, P, Leighton, S, Torhorst, J, Mihatsch, MJ, Sauter, G, Kallioniemi, OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4(7): 844-7
55. Lane, DP, Crawford, LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV 40 transformed cells. *Nature* 278(5701): 261-3

56. Latres, E, Drobnjak, M, Pollack, D, Oliva, MR, Ramos, M, Karpeh, M, Woodruff, JM, Cordon-Cardo, C (1994) Chromosome 17 abnormalities and TP53 mutations in adult soft tissue sarcomas. *Am J Pathol* 145(2): 345-55
57. Levine, AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3): 323-31
58. Manne, U, Myers, RB, Moron, C, Poczatek, RB, Dillard, S, Weiss, H, Brown, D, Srivastava, S, Grizzle, WE (1997) Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 74(3): 346-58
59. Mancuso, T, Mezzelani, A, Riva, C, Fabbri, A, Dal Bo, L, Sampietro, G, Perego, P, Casali, P, Zunino, F, Sozzi, G, Pierotti, MA, Pilotti, S (2000) Analysis of SYT-SSX fusion transcripts and bcl-2 expression and phosphorylation status in synovial sarcoma. *Lab Invest* 80(6): 805-13
60. Meis-Kindblom, JM and LG Kindblom (1998) Angiosarcoma of soft tissue: a study of 80 cases. *Am J Surg Pathol* 22(6): 683-97
61. Miettinen, M, El-Rifai, WHL, Sobin L, Lasota, J (2002) Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review. *Hum Pathol* 33(5): 478-83
62. Miettinen, M, Sarlomo-Rikala, M, Kovatich, AJ (1998) Cell-type- and tumour-type-related patterns of bcl-2 reactivity in mesenchymal cells and soft tissue tumours. *Virchows Arch* 433(3): 255-60
63. Mittal, K and Demopoulos, RI (2001) MIB-1 (Ki-67), p53, estrogen receptor, and progesterone receptor expression in uterine smooth muscle tumors. *Hum Pathol* 32(9): 984-7
64. Montgomery, E and Fisher, C (2001) Myofibroblastic differentiation in malignant fibrous histiocytoma (pleomorphic myofibrosarcoma): a clinicopathological study. *Histopathology* 38(6): 499-509

65. Nakamura, N, Yamamoto, H, Yao, T, Oda, Y, Nishiyama, K, Imamura, M, Yamada, T, Nawata, H, Tsuneyoshi, M (2005) Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade. *Hum Pathol* 36(7): 828-37
66. Nawa, G, Ueda, T, Mori, S, Yoshikawa, H, Fukuda, H, Ishiguro, S, Funai, H, Uchida, A (1996) Prognostic significance of Ki67 (MIB1) proliferation index and p53 over-expression in chondrosarcomas. *Int J Cancer* 69(2): 86-91
67. Noguchi, T, Sato, T, Takeno, S, Uchida, Y, Kashima, K, Yokoyama, S, Muller, W (2002) Biological analysis of gastrointestinal stromal tumors. *Oncol Rep* 9(6): 1277-82
68. Olejniczak, ET, Van Sant, C, Anderson, MG, Wang, G, Tahir, SK, Sauter, G, Lesniewski, R, Semizarov, D (2007) Integrative genomic analysis of small-cell lung carcinoma reveals correlates of sensitivity to bcl-2 antagonists and uncovers novel chromosomal gains. *Mol Cancer Res* 5(4): 331-9
69. Park, YB, Kim, HS, Oh, JH, Lee, SH (2001) The co-expression of p53 protein and P-glycoprotein is correlated to a poor prognosis in osteosarcoma. *Int Orthop* 24(6): 307-10
70. Pindzola, JA, Palazzo, JP, Kovatich, AJ, Tuma, B, Nobel, M (1998) Expression of p21WAF1/CIP1 in soft tissue sarcomas: a comparative immunohistochemical study with p53 and Ki-67. *Pathol Res Pract* 194(10): 685-91
71. Pösl, M, Amling, M, Werner, M, Basler, I, Salzer-Kuntschik, M, Winkler, K, Delling, G (1994) Osteosarcoma, apoptosis and proliferation. Study of bcl-2 expression. *Pathologie* 15(6): 337-44
72. Rantanen, S, Monni, O, Joensuu, H, Franssila, K, Knuutila, S (2001) Causes and consequences of BCL2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 42(5): 1089-98

73. Rozeman, LB, Hameetman, L, Cleton-Jansen, AM, Taminiau, AH, Hogendoorn, P C., Bovee, JV (2005) Absence of IHH and retention of PTHrP signalling in enchondromas and central chondrosarcomas. *J Pathol* 205(4): 476-82

74. Ruiz, C, Seibt, S, Al Kuraya, K, Siraj, AK, Mirlacher, M, Schraml, P, Maurer, R Spichtin, H, Torhorst, J, Popovska, S, Simon, R, Sauter, G (2006) Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer* 118: 2190-2194

75. Sabah, M, Cummins, R, Leader, M, Kay, E (2007) Immunoreactivity of p53, Mdm2, p21WAF1/CIP1, Bcl-2, and Bax in Soft Tissue Sarcomas. Correlation With Histologic Grade. *Appl Immunohistochem Mol Morph* 15(1), 64-69

76. Schneider-Stock, R, Radig, K, Oda, Y, Mellin, W, Rys, J, Niezabitowski, A, Roessner, A (1997) p53 gene mutations in soft-tissue sarcomas--correlations with p53 immunohistochemistry and DNA ploidy. *J Cancer Res Clin Oncol* 123(4): 211-8

77. Schneider-Stock, R, Ziegeler, A, Haeckel, C, Franke, DS, Rys, J, Roessner, A (1999) Prognostic relevance of p53 alterations and Mib-1 proliferation index in subgroups of primary liposarcomas. *Clin Cancer Res* 5(10): 2830-5

78. Schraml, P, Kononen, J, Bubendorf, L, Moch, H, Bissig, H, Nocito, A, Mihatsch, M J, Kallioniemi, OP, Sauter, G (1999) Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 5(8): 1966-75

79. Soini, Y and Paakko, P (1996) bcl-2 is preferentially expressed in tumours of muscle origin but is not related to p53 expression. *Histopathology* 28(2): 141-5

80. Stefanou, DG, Nonni, AV, Agnantis, NJ, Athanassiadou, SE, Briassoulis, E, Pavlidis, N (1998) p53/MDM-2 immunohistochemical expression correlated with proliferative activity in different subtypes of human sarcomas: a ten-year follow-up study. *Anticancer Res* 18(6B): 4673-81

81. Steinert, DM, Oyarzo, M, Wang, X, Choi, H, Thall, PF, Medeiros, LJ, Raymond, AK, Benjamin, RS, Zhang, W, Trent, JC (2006) Expression of Bcl-2 in gastrointestinal

- stromal tumors: correlation with progression-free survival in 81 patients treated with imatinib mesylate. *Cancer* 106(7): 1617-23
82. Sup, SJ, Alemany, CA, Pohlman, B, Elson, P, Malhi, S, Thakkar, S, Steinle, R, Hsi, ED (2005) Expression of bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome. *J Clin Oncol* 23(16): 3773-9
 83. Takahashi, Y, Oda, Y, Kawaguchi, K, Tamiya, S, Yamamoto, H, Suita, S, Tsuneyoshi, M (2004) Altered expression and molecular abnormalities of cell-cycle-regulatory proteins in rhabdomyosarcoma. *Mod Pathol* 17(6): 660-9
 84. Taubert, H, Würfl, P, Bache, M, Meye, A, Berger, D, Holzhausen, HJ, Hinze, R, Schmidt, H, Rath, FW (1998) The p53 gene in soft tissue sarcomas: prognostic value of DNA sequencing versus immunohistochemistry. *Anticancer Res* 18(1A): 183-7
 85. Taubert, H, Würfl, P, Meye, A, Berger, D, Thamm, B, Neumann, K, Hinze, R, Schmidt, H, Rath, FW (1995) Molecular and immunohistochemical p53 status in liposarcoma and malignant fibrous histiocytoma: identification of seven new mutations for soft tissue sarcomas. *Cancer* 76(7): 1187-96
 86. Toffoli, G, Doglioni, C, Cernigoi, C, Frustaci, S, Perin, T, Canal, B, Boiocchi, M (1994) P53 overexpression in human soft tissue sarcomas: relation to biological aggressiveness. *Ann Oncol* 5(2): 167-72
 87. Tornillo, L, Duchini, G, Carafa, V, Lugli, A, Dirnhofer, S, Di Vizio, D, Boscaino, A, Russo, R, Tapia, C, Schneider-Stock, R, Sauter, G, Insabato, L, Terracciano, LM (2005) Patterns of gene amplification in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Lab Invest* 85(7): 921-31
 88. Tsujimoto, Y, Cossman, J, Jaffe, E, Croce, CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228(4706): 1440-3
 89. Uozaki, H, Ishida, T, Kakiuchi, C, Horiuchi, H, Gotoh, T, Iijima, T, Imamura, T, Machinami, R (2000) Expression of heat shock proteins in osteosarcoma and its relationship to prognosis. *Pathol Res Pract* 196(10): 665-73

90. Vaux, DL, Cory, S, Adams, JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335(6189): 440-2
91. Viguer, JM, Jimenez-Heffernan, JA, Vicandi, B, Lopez-Ferrer, P, Gamallo, C (1998) Cytologic features of synovial sarcoma with emphasis on the monophasic fibrous variant: a morphologic and immunocytochemical analysis of bcl-2 protein expression. *Cancer* 84(1): 50-6
92. Vlaykova, T, Talve, L, Hahka-Kemppinen, M, Hernberg, M, Muhonen, T, Collan, Y, Pyrhonen, S (2002) Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in metastatic melanoma: association with survival and treatment response. *Oncology* 62(3): 259-68
93. Wadayama, B, Toguchida, J, Yamaguchi, T, Sasaki, MS, Yamamuro, T (1993) p53 expression and its relationship to DNA alterations in bone and soft tissue sarcomas. *Br J Cancer* 68(6): 1134-9
94. Weiss, SW, Goldblum, JR, (1995) *Enzinger and Weiss's soft tissue tumors*. 4th ed. Mosby: St. Louis, USA
95. Wong, NA, Young, R, Malcomson, RD, Nayar, AG, Jamieson, LA, Save, VE, Carey, FA, Brewster, DH, Han, C, Al-Nafussi, A (2003) Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology* 43(2): 118-26
96. Würl, P, Meye, A, Lautenschlager, C, Schmidt, H, Bache, M, Kalthoff, H, Schonfelder, M, Rath, FW, Taubert, H (1999) Clinical relevance of pRb and p53 co-overexpression in soft tissue sarcomas. *Cancer Lett* 139(2): 159-65
97. Würl, P, Meye, A, Schmidt, H, Lautenschlager, C, Kalthoff, H, Rath, FW, Taubert, H (1998) High prognostic significance of Mdm2/p53 co-overexpression in soft tissue sarcomas of the extremities. *Oncogene* 16(9): 1183-5

98. Yoo, J, Lee, HK, Kang, CS, Park, WS, Lee, JY, Shim, SI (1997) p53 gene mutations and p53 protein expression in human soft tissue sarcomas. Arch Pathol Lab Med 121(4): 395-9
99. Yoo, J, Park, S, Kang, CS, Kang, SJ, Kim, BK (2002) Expression of E-cadherin and p53 proteins in human soft tissue sarcomas. Arch Pathol Lab Med 126(1): 33-8
100. Yoo, J, Park, SY, Kang, SJ, Shim, SI, Kim, BK (2002) Altered expression of G1 regulatory proteins in human soft tissue sarcomas. Arch Pathol Lab Med 126(5): 567-73
101. Zhai, YL, Nikaido, T, Toki, T, Shiozawa, A, Orii, A, Fujii, S (1999) Prognostic significance of bcl-2 expression in leiomyosarcoma of the uterus. Br J Cancer 80(10): 1658-64
102. Zhan, Q, Kontny, U, Iglesias, M, Alamo, I Jr., Yu, K, Hollander, MC, Woodworth, CD, Fornace, AJ Jr. (1999) Inhibitory effect of Bcl-2 on p53-mediated transactivation following genotoxic stress. Oncogene 18(2): 297-304
103. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Weichteilsarkome des Erwachsenen. <http://www.dgho.de>
104. Deutsche Krebsgesellschaft. <http://www.krebsgesellschaft.de>
105. National Cancer Institute, U.S. National Institute of Health
<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/adult-soft-tissue-sarcoma/>

7. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Ganz besonders danken möchte ich für die ausgesprochen unkomplizierte Zusammenarbeit und für die zahlreichen konstruktiven Diskussionen und Anregungen, die mir so manches Mal halfen, den roten Faden nicht aus den Augen zu verlieren.

Meinem Betreuer, Dr. med. Alexander Quaas danke ich für die großartige Einführung in die Tumorpathologie und für die engmaschige Begleitung der praktischen Arbeit. Ich danke für das extrem zeitaufwändige Review der histologischen Präparate und ganz besonders für so manche Ermutigung und das immer offene Ohr.

Ein weiterer Dank geht an Frau Dr. med. Uta Reichelt für die Bereitstellung der klinischen Verlaufsdaten unserer Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren aus der Zusammenarbeit mit der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Ganz herzlich danke ich ihr für die Einführung in die statistische Berechnung und für die geduldige Hilfestellung bei der Ausarbeitung der Daten.

Meinem Mitstreiter Marcel Hochreiter danke ich für die außerordentlich zuverlässige und zielgerichtete Zusammenarbeit bei der Herstellung des Tissue Microarray.

Besonders danke ich auch den Medizinisch Technischen Assistentinnen des Institutes für Pathologie unter der Leitung von Martina Mirlacher für die Anfertigung histologischer Schnitte, für die immunhistochemischen Färbungen und für die Anfertigung und Auswertung der FISH. Namentlich erwähnen möchte ich hier insbesondere Frau Sandra Schmidt (IHC), Frau Sylvia Schnöger und Frau Dr. med. Christina Tsourlakis (FISH). Ihnen allen gilt mein herzlicher Dank.

Das mir entgegengebrachte Vertrauen, welches mir zu jeder Zeit freien Zugang zum Institut, Archiven und Laboratorien ermöglichte, ist mir eine große Ehre und hat die Fertigstellung dieser Arbeit ungemein erleichtert.

8. Lebenslauf

9. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Elisa von Friderici