

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
Prof. Dr. Doris Henne-Bruns

Stellenwert und prognostische Aussagekraft der Mutationsanalytik von c-kit und PDGFR α bei Gastrointestinalen Stromatumoren

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

Stephan Schwarz
Augsburg
2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Kramer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Cario

Tag der Promotion: 9. Februar 2017

Widmung

Für Jakob

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Definition.....	1
1.2 Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik	1
1.3 Epidemiologie.....	1
1.4 Pathogenese	2
1.5 Einteilung.....	4
1.6 Immunhistochemische Marker	5
1.7 genetische Veränderungen.....	10
1.8 GIST-Syndrome.....	14
1.9 GIST bei Neurofibromatose Typ I.....	14
1.10 Therapie	15
1.11 Fragestellung	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Material.....	18
2.2 Methoden	20
2.3 Statistische Methoden.....	33
3. Ergebnisse	35
3.1 Kollektiv, Epidemiologie.....	37
3.2 Altersverteilung	37
3.3 Geschlechtsverteilung.....	38
3.4 Klinische Parameter.....	39
3.5 Pathologische Basisparameter	43
3.6 Risikoklassifikation nach Fletcher (ROM).....	44
3.7 Immunhistochemie	49
3.8 Mutationsanalytik und spezielle Überlebenszeitanalysen	51
4. Diskussion	69
4.1 Allgemeine Überlebenszeitanalyse und krankheitsfreies Überleben	69
4.2 Mutationsfrequenz	70
4.3 Mutationsanalytik und spezielle Überlebenszeitanalysen	70
5. Zusammenfassung	75
6. Literaturverzeichnis	76

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
a	Jahre
CD	cluster of differentiation
c-kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
cm	Centimeter
CT	Computertomographie
DFS	disease-free survival (Zeitraum von Erstdiagnose bis zum Auftreten von Rezidiv/Metastase)
DOG	discovered on GIST
DSS	disease-specific survival (Zeitraum von Erstdiagnose bis zum tumorbedingten Tod)
et al.	et alia (und andere)
EGFR	epidermal growth factor receptor
EUS	endoscopic ultrasonography / Endosonographie
FDG	Fluor-Desoxyglucose
GIST	Gastrointestinale(r) Stromatumor(en)
HPF	High-Power-Fields (Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung)
HRM	High-Resolution melting assay
kDA	Kilo-Dalton
MR	Mitoserate (Anzahl der Mitosen pro 50 Gesichtsfelder)
MRT	Magnetresonanztomographie
NF	Neurofibromatose
PDGFR α	platelet-derived growth factor receptor α
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor

1. Einleitung

1.1 Definition

Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) sind mesenchymale Tumoren des Verdauungstraktes. Charakteristisches Merkmal ist der immunhistochemische Nachweis des Tyrosinkinase-Rezeptors KIT (CD117).

Vormals oft als Leiomyome, Leiomyoblastome, Leiomyosarkome, Neurofibrome oder Schwannome diagnostiziert [6], konnten Mazur und Clark im Jahre 1983 zeigen, dass diesen Tumoren sowohl das für Schwannome typische Oberflächenprotein S100 als auch die elektronenmikroskopische Ultrastruktur von glatten Muskelzellen fehlt. In der Folge wurde dann für diese neue Entität erstmalig der Begriff „Gastric Stromal Tumors“ eingeführt [70]. Retrospektiv ist davon auszugehen, dass es sich bei einer Vielzahl der mesenchymalen Tumoren des Gastrointestinaltraktes, welche zuvor als von glattem Muskelgewebe ausgehend beschrieben worden waren, um GIST gehandelt hat.

1.2 Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik

Das klinische Erscheinungsbild von GIST ist vielfältig und unspezifisch. Am häufigsten treten gastrointestinale Blutungen (33%) sowie Bauchschmerzen (19%) auf. Auch eine neu aufgetretene Anämie (9%) oder ein abdominaler Tastbefund bei der klinischen Untersuchung (7%) sind mögliche Symptome. Seltener kommt es zu Gewichtsverlust (4%), Dysphagie (3%) oder Zeichen einer intestinalen Obstruktion (3%) [99].

Zur Diagnostik steht ein breites Spektrum an bildgebenden Techniken zur Verfügung. Neben Endoskopie, konventioneller Sonographie sowie der kontrastmittelgestützten CT, kommen auch MRT, PET-CT und Endosonographie zur Anwendung [4]. Die Auswahl des bildgebenden Verfahrens ist hierbei abhängig von der vermuteten Lokalisation und der Erfahrung des Kliniklers.

1.3 Epidemiologie

GIST sind die häufigsten mesenchymalen Tumoren des Gastrointestinaltraktes. Mit 1-3% aller Neoplasien im Magen-Darm-Trakt stellen sie jedoch im Vergleich zu den häufigeren

epithelialen Neubildungen in der Relation eine relativ kleine Entität dar [24, 74, 85]. In Studien schwankt die Inzidenz zwischen 1,1 - 1,45/100.000 und Jahr. Die Prävalenz wird auf 12,9/100.000 geschätzt [84, 112]. GIST treten im Verlauf des gesamten Magen-Darm-Traktes, d.h. vom Ösophagus bis zum Rektum auf, ein Teil der Tumore bildet Metastasen insbesondere der Leber. Einige GIST sind auch primär extra-gastrointestinal lokalisiert, diese werden als eGIST bezeichnet. Neuere Untersuchungen zeigen, dass ösophageal lokalisierte GIST signifikant häufiger bei Männern auftreten und mit einem schlechteren Outcome assoziiert sind [62]. In einzelnen Fallberichten sind metastatische Absiedelungen in Scrotum [109] oder Spinalkanal [116] beschrieben.

GIST treten gehäuft jenseits des 50. Lebensjahres auf, mit einem medianen Erkrankungsalter um das 60. Lebensjahr. 5-20% aller Erkrankungsfälle finden sich jedoch vor dem 40. Lebensjahr. In seltenen Fällen (<1%) erkranken die Patienten bereits im Kindes- oder Jugendalter [77].

Eine eindeutige Geschlechtswendigkeit kann nicht gefunden werden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass maligne Verläufe bei männlichen Patienten häufiger auftreten [77], und dass ein Alter <50 Jahren bei Erstdiagnose mit einer besseren Prognose einhergeht [57].

1.4 Pathogenese

Es wird davon ausgegangen, dass GIST aus den sogenannten „Interstitial cells of Cajal“ (ICC) hervorgehen. ICC sind vorwiegend im Plexus myentericus sowie in der muscularis propria des Gastrointestinaltraktes lokalisiert und nehmen eine Mittlerfunktion zwischen autonomem Nervensystem und glatter Muskulatur ein [110].

Kluppel konnte im Jahre 1998 zeigen, dass die glatten Muskelzellen des Dünndarmes und die ICC einen gemeinsamen Stammzellursprung haben und es erst in einem relativ späten Entwicklungsstadium zu einer Differenzierung in zwei Zellreihen kommt [55]. ICC sind immunhistochemisch positiv für den Oberflächenmarker KIT (CD117), einen Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität. Torihashi et al. zeigten, dass eine Unterdrückung des entsprechenden Signals zu einer Ausdifferenzierung der ICC in glatte Muskelzellen führen kann [111]. Am Mausmodell fand man, dass eine konstitutionelle Aktivierung des KIT-

Rezeptors - etwa durch Mutation - zu Zellproliferation und schließlich zur Entstehung eines GIST führen kann [106].

Auf molekularer Ebene findet sich in 75-80% der sporadischen GIST eine Mutation in c-kit, einem zentromernah auf Chromosom 4q12 lokalisierten Gen, das für ein Transmembranprotein mit Tyrosinkinaseaktivität - KIT bzw. CD117 genannt - kodiert. Am häufigsten finden sich Mutationen in Exon 11. Diese betreffen die Juxtamembrandomäne des Transmembranproteins, welche physiologischerweise in Abwesenheit des Liganden die Kinase-Aktivität inhibiert. Bei einer Fehlfunktion kommt es zu einer konstitutionellen Aktivierung des Rezeptors und zu einer Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege über PI3K, JAK/STAT sowie RAS/MAP-Kinase.

Bei ca. 8% aller GIST findet sich eine Mutation in PDGFR α , einer Typ-III-Rezeptor-Tyrosinkinase. Meist ist hierbei die Kinase-II-Domäne betroffen, was über eine Veränderung in der Aktivierungsschlinge zu einer alterierten Bindung von ATP führt. Die damit verbundene Dysfunktion resultiert in einer Aktivierung der Signalwege von PI3K und STAT3 und konsekutiv in einer gesteigerten Proliferation mit Inhibition der Apoptose [95].

Bei 10-15% aller GIST findet sich innerhalb der bekannten Exons für c-KIT und PDGFR α eine Wildtyp-Sequenz [95]. Die molekulare Pathogenese dieser als Wildtyp-GIST bezeichneten Neoplasmen ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass auch andere, bislang nicht erfasste Genloci für Mutationen in Frage kommen, z.B. BRAF [2, 81] oder Veränderungen im Succinat-Dehydrogenase-Komplex [78, 89]. In diesem Zusammenhang sind auch sporadische GIST bei Patienten mit Neurofibromatose Typ I (Morbus Recklinghausen) zu nennen. Hier finden sich i.d.R. weder Mutationen in c-KIT noch in PDGFR α [53, 71], vielmehr ist davon auszugehen, dass mit NF1 assoziierte GIST überwiegend über das k-RAS vermittelte Neurofibromin-Gen entstehen.

1.5 Einteilung

1.5.1 Histologische Einteilung

Im Wesentlichen werden bei histopathologischer Betrachtung drei morphologische GIST-Varianten unterschieden. Am häufigsten findet sich ein spindelzelliger Typ (74%) mit fischgrätenartigem Wachstumsmuster, seltener treten epitheloidzellige (10%) oder pleomorphe Typen (16%) auf [46].

Von einigen Autoren wird eine weitergehende histologische Subdifferenzierung vorgenommen. So unterscheiden Miettinen et al. [80] bei spindelzelligen GIST des Magens eine sklerosierende, palisadenartig-vakuolisierte, hyperzelluläre und eine sarkomatöse Form. Die epitheloiden GIST werden weiter unterteilt in sklerosierend, dyskohäsiv, hyperzellulär und sarkomatös.

1.5.2 Einteilung nach Risikogruppen

Nachdem die Spezifizierung der Entität „GIST“ in den 1980er Jahren geklärt war, wurde deutlich, dass die Prognose der Tumoren heterogen war. 2002 wurde in einer WHO-Konsensus-Konferenz eine Risikoklassifikation vereinbart, welche sich auf die Parameter „Tumorgroße“ und „Mitoserate“ stützt [79-80]. Die Tumorgroße ist dabei durch den maximalen Tumordurchmesser in cm definiert. Die Mitoserate wird durch manuelles Auszählen der Mitosen bezogen auf 50 „high power fields“ (HPF) ermittelt. Ein HPF entspricht dabei dem Bildausschnitt eines Lichtmikroskops bei 400-facher Vergrößerung. Die Verwendung spezieller Proliferationsmarker (z.B. Ki-67) ist bei der Prognoseabschätzung der Bestimmung der Mitoserate bezogen auf 50 HPF unterlegen [30, 96].

In der Klassifikation nach Fletcher et al. [33] werden anhand der maximalen Tumorgroße sowie der Anzahl der Mitosen pro 50 HPF vier Risikogruppen - „Very Low“, „Low“, „Intermediate“ und „High“ - gebildet, welche das Risiko eines malignen Verhaltens des Tumors abschätzen (siehe Tabelle 1, S. 21). Diese Einteilung hat sich im klinischen Einsatz bewährt, hat jedoch Grenzen. So sind durchaus Patienten mit malignen Verläufen (Metastasierung, Rezidiv) zu beobachten, die initial in eine Gruppe mit geringem Risiko

eingeorordnet wurden. Ebenso werden zusätzliche Kriterien wie Tumorrupturn oder eine Ulzeration nicht erfasst, welche mit einem erhöhten Risiko einhergehen können.

Ab 2005 etablierten Mietinen et al. eine erweiterte Klassifikation. Diese basiert ebenfalls auf maximaler Tumorgröße und Mitoserate, bezieht aber zusätzlich noch die Tumorlokalisierung (Magen oder Dünndarm) mit ein. Auch hier finden sich die vier Risikogruppen „Very Low“, „Low“, „Intermediate“ und „High“ (siehe Tabellen 2, S. 21 und 3, S. 22). Die Einteilung basiert auf empirischen Daten und trägt der Tatsache Rechnung, dass GIST des Dünndarms im Vergleich zu gastral lokalisierten GIST ein höheres Malignitätspotenzial aufweisen.

Neben Tumorgröße, Mitoserate und Lokalisation gelten Koagulationsnekrosen, Ulzerationen der Oberfläche oder eine Invasion der Mukosa bei GIST als ungünstig. Diese Kriterien fanden Eingang in die Klassifikation nach Joensuu [47].

1.6 Immunhistochemische Marker

1.6.1 KIT und PDGFR α

Das Transkriptions- und Translations-Produkt des Gens c-kit wird als KIT (CD117) bezeichnet und stellt das diagnostisch wichtigste Protein bei Gastrointestinalen Stromatumoren dar [97]. Mehr als 95% der GIST sind immunhistochemisch positiv für KIT [77]. Meist kommt es bei der immunhistochemischen Färbung zu einer starken, den ganzen Tumor durchsetzenden Färbung, die oftmals panzytoplasmatisch nachweisbar ist. Bei GIST-Subgruppen können auch andere Färbemuster auftreten, z.B. eine deutliche Positivität der Zellmembranen bei Gastrointestinalen Stromatumoren mit epitheloidzelligem Wachstumsmuster [76].

Neben GIST findet sich auch in physiologisch vorkommenden Geweben eine Positivität für KIT: Mastzellen, Seminome und pulmonale kleinzellige Karzinome exprimieren überwiegend KIT. Bei metastatischen Melanomen, klarzelligen Karzinomen, Ewing- und Angiosarkomen ist eine Expression von KIT fakultativ [75].

Etwa 3-5% aller GIST sind immunhistochemisch positiv für PDGFR α [40]. Physiologischerweise spielt dieser Tyrosinkinase-Rezeptor eine Rolle bei der Zellkommunikation, Signaltransduktion sowie insbesondere der embryonalen Lungenentwicklung. Auch ein Einfluss auf die Entwicklung neuronaler Stammzellen wird diskutiert [22].

1.6.2 DOG-1

Das DOG-Gen kodiert für ein Protein mit bislang unbekannter Funktion. Ein diagnostischer Vorteil im Hinblick auf die Sensitivität scheint bei immunhistochemisch KIT-negativen GIST gegeben, welche 5% der GIST-Fälle darstellen [77, 94, 114]. Nach Liegl et al. führt der monoklonale Antikörper DOG1.1 bei etwa 36% der KIT-negativen GIST-Tumoren [60] zur Diagnose. Darüber hinaus sind alle KIT-positiven GIST auch DOG1.1-positiv. Ein weiterer Vorteil von DOG1.1 besteht darin, dass hochspezifisch Tumorzellen und ICC angefärbt werden, während es bei KIT auch - wie unter 1.6.1 beschrieben - gleichzeitig zu einer Anfärbung von Mastzellen kommen kann.

1.6.3 CD34

CD34 ist ein membranständiges Sialomucin-Protein mit einem Molekulargewicht von 116kD. Es wird in unreifen hämatopoetischen Stammzellen gebildet und darüber hinaus auf Kapillarendothelien exprimiert. CD34 ist als Oberflächenmarker seit mehr als 20 Jahren bekannt und findet klinisch im Rahmen der Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen Verwendung. Die exakte Funktion des Proteins ist bislang nicht geklärt [35], es wird jedoch angenommen, dass es die Proliferation von Stammzellen fördert und deren Differenzierung blockiert. Ebenso wird die intravaskuläre Adhäsion von Lymphozyten in lymphatischem Gewebe mit CD 34 in Verbindung gebracht [83].

Bei Gastrointestinalen Stromatumoren findet sich häufig eine Überexpression von CD34. 82% der im Magen lokalisierten GIST sind positiv für CD34 [80], bei GIST des Dünndarms findet sich in 40% der Fälle eine Positivität für CD34 [79]. Eine prognostische Bedeutung kommt der Proteinexpression nicht zu.

1.6.4 Muskellzellmarker

Aktin bildet intrazellulär dynamische Filamente und ist Bestandteil des Zytoskeletts. In Muskelzellen ist es Teil des Kontraktionsapparats. In der nicht polymerisierten Form handelt es sich um ein nahezu globuläres Protein mit einer Molekülmasse von 42kDa. Von mehreren Isoformen spielt das α -smooth-muscle-actin (SMA) die bedeutendste Rolle als Marker für glatte Muskelzellen. In Gastrointestinalen Stromatumoren kommt es in ca. 25% der Patienten zu einer Expression von SMA, in GIST des Dünndarms (34%) häufiger als in solchen des Magens (19%). Einzelne Daten deuten darauf hin, dass die Positivität für SMA mit einer niedrigeren tumorspezifischen Mortalität assoziiert zu sein scheint [79-80].

Desmin ist ein Intermediärfilament, das in glatter Muskulatur und in Skelettmuskulatur gefunden werden kann. Es verbindet die Z-Scheiben der Skelettmuskelfasern und wird als Marker einer myogenen Differenzierung des Gewebes verstanden. In GIST wird es selten exprimiert, dann jedoch gehäuft in gastralen Tumoren mit epitheloidem Wachstumsmuster und einer niedrigen Mitoserate [80].

Vimentin ist als Typ-3-Intermediärfilament ebenfalls ein Bestandteil des Zytoskeletts und hat eine Molekülmasse von 54 kDa. Über seine genaue Funktion ist wenig bekannt, man findet es im Zytoplasma der meisten Zellen mesenchymaler Herkunft. Es wird in Sarkomen vermehrt gebildet und deswegen als Marker für Neoplasien des Bindegewebes verwendet. Auch in Gastrointestinalen Stromatumoren ist es regelhaft zu finden [77, 86].

1.6.5 p53

Das für den Tumorsuppressor p53 kodierende Gen ist auf Chromosom 17p13.1 lokalisiert. Das translatierte Protein hat ein Molekulargewicht von 53kDa und spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus, seine Expression ist insbesondere in proliferierenden und maligne entarteten Zellen verändert. Dort führt es beim Auftreten von DNA-Schäden zum Arrest des Zellzyklus und induziert Reparaturmechanismen. Der Zelle wird so ermöglicht, bis zur nächsten Zellteilung die vorliegenden Schäden am Erbgut zu beheben. Bei einer zu ausgeprägten Akkumulation von p53, etwa beim Auftreten irreparabler Schäden, wird über eine Signalkaskade die Apoptose eingeleitet.

Eine Mutation des p53-Gens wird gehäuft bei Tumorerkrankungen beobachtet und führt zu einem Verlust der proapoptotischen Wirkung. GIST sind im Mittel bei etwa 28% der Patienten positiv für p53, es findet sich jedoch eine Abhängigkeit von der Lokalisation des Tumors. So zeigt sich bei gastralen GIST in 20% der Patienten eine Expression von p53, bei GIST des Dün- oder Dickdarms ist dies in 40-50% der Fall. Bei extragastralen GIST ist eine Expression von p53 assoziiert mit einer Tumorgröße von mehr als 50 mm, nukleären Atypien, epitheloidem Wachstumsmuster, mukosaler Invasion und einer Mitoserate $>5/50$ HPF [32].

Der prognostische Wert der Expression von p53 für das klinische Outcome wird kontrovers diskutiert. Er wird von einigen Autoren ausgeschlossen [21], von anderen Autoren wiederum als nachgewiesen betrachtet [3]. Eine Metaanalyse von 9 Studien mit insgesamt 768 Patienten aus dem Jahre 2012 zeigt, dass eine p53-Überexpression mit einem erhöhten Risiko für eine Malignität des Tumors einhergeht [120].

1.6.6 p16

p16 ist ein Zellzyklusregulator aus der Gruppe der INK-Proteine. Das codierende Gen ist auf Chromosom 9p21 lokalisiert. Physiologischerweise führt p16 bei Expression zu einem Arrest der Zelle in der G₁-S-Phase, dies geschieht über eine Inhibierung der Proteine CDK4 und CDK8, die pRb phosphorylieren [104]. Das ebenfalls zur INK4-Familie gehörende Protein p19^{ARF} ist in der Lage, mit MDM2 zu interagieren und so die Degradation des tumorsuppressiv wirksamen Proteins p53 zu hemmen [93]. Veränderungen im biochemischen Signalweg von Cyclin D–CDK4/6/INK4/Rb/E2F sind bei unterschiedlichen neoplastischen Veränderungen in bis zu 80% der Patienten zu finden [88], wobei die prognostische Bedeutung des Verlusts oder der Überexpression von p16 kontrovers diskutiert wird [31, 37, 42, 44, 66].

In GIST kommt es laut Schneider-Stock et al. in 62,8% der Patienten zu Alterationen in der Expression von p16, wobei ein Verlust der p16-Expression neueren Ergebnissen zufolge mit einer schlechteren klinischen Prognose vergesellschaftet ist [102-103]. Untersuchungen unserer eigenen Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass eine Überexpression von p16 in Patienten mit High-Risk-GIST Prädiktor für ein ungünstiges Outcome [100] sein könnte.

1.6.7 S100

Die Familie der S100-Proteine setzt sich aus mindestens 21 verschiedenen Isoformen zusammen, deren Gene nahezu sämtlich auf Chromosom 1q21 lokalisiert sind. Die Molekülmasse reicht von 9-13 kDa. S100-Proteine finden sich bevorzugt in Zellen, welche embryologisch aus der Neuralleiste hervorgehen, wie z.B. Schwannzellen, Melanozyten oder Gliazellen. Sie werden daher als Marker für neuronales Gewebe eingesetzt. Darüber hinaus sind auch Chondrozyten, Adipozyten, Makrophagen und dendritische Zellen häufig immunhistochemisch positiv. Physiologischerweise ist S100 an der Phosphorylierung von Proteinen, der Calcium-Homöostase sowie an Zellwachstum und -differenzierung beteiligt.

GIST exprimieren S100 selten. Bei 5-10% der Patienten kommt es zu einer zytoplasmatischen oder nukleären Färbereaktion, bei GIST des Dünndarmes in bis zu 15% der Patienten und damit häufiger als bei gastraler Lokalisation des Tumors [79]. Einige Untersuchungsergebnisse mit jedoch geringer Fallzahl deuten auf einen negativen prognostischen Wert einer Expression von S100 in gastralen GIST, nicht aber in GIST des Dünndarmes hin [77].

1.6.8 EGFR

EGFR stellt eine membranständige Rezeptor-Tyrosinkinase aus der Familie der ErbB-Membran-Rezeptoren dar [41]. Eine Aktivierung durch die Liganden EGF oder TGF α führt zu einer Dimerisierung des Rezeptors und durch Autophosphorylierung zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Hierdurch kommt es zu vermehrtem Zellwachstum und einer gesteigerten DNA-Synthese sowie einer Inhibition der Apoptose [87]. Diese Effekte sind potentielle Risikofaktoren für eine onkogene Transformation der Zelle. Von einzelnen Autoren wird auch das Vorliegen einer autokrinen Schleife zwischen TGF α und EGFR diskutiert [10].

Eine vermehrte Expression von EGFR findet sich in ca. 30% aller epithelialen Tumoren, so z.B. in Bronchialkarzinomen, Glioblastomen, Nierenzellkarzinomen und Kolonkarzinomen. In GIST besteht immunhistochemisch in 96% der Patienten eine Überexpression von EGFR. Genomische Veränderungen im Sinne einer Amplifikation des kodierenden Gens werden hier aber im Regelfall nicht gefunden [61].

1.6.9 weitere Marker

Gastrointestinale Stromatumoren sind durchweg positiv für Nestin, ein Intermediärfilament vom Typ IV, welches in Zellen muskulären und neuronalen Ursprungs vorkommt. Nestin findet sich jedoch ebenso häufig in Schwannomen des Gastrointestinaltraktes, es hat somit keinen diagnostischen Wert bei GIST [98].

Eine Positivität für Keratin 18 und - in geringerem Maße - für Keratin 8 wird bei einigen GIST beobachtet. Für Keratin 7, 13, 14, 17, 19 und 20 sind GIST jedoch im Regelfall negativ [77].

Die Proteinkinase C ϕ (PKC ϕ) ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche in GIST im Vergleich zu anderen mesenchymalen Tumoren vermehrt exprimiert wird. Untersuchungen von Duensing et al. konnten 2004 zeigen, dass die PKC ϕ in Gastrointestinalen Stromatumoren unabhängig vom Mutationsstatus und von der KIT-Expression konstitutiv enzymatisch aktiv ist [27].

Einen diagnostischen Ansatzpunkt, insbesondere in der Abgrenzung des GIST von Schwannomen, bietet das saure Gliafaserprotein (GFAP). Während dies in Schwannomen regelhaft exprimiert wird, sind GIST immunhistochemisch negativ für GFAP.

1.7 genetische Veränderungen

In Gastrointestinale Stromatumoren sind mittlerweile Veränderungen an verschiedenen des Erbgutes beschrieben. Am häufigsten treten Mutationen in c-kit und PDGFR α auf. Die klinische Relevanz derartiger Mutationen für die Prognose der Erkrankung ist derzeit weiter Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Joensuu et al. wiesen zuletzt auf das variable klinische Outcome beim Vorliegen identischer Mutationen in c-kit und PDGFR α hin [50].

1.7.1 c-kit

c-kit ist ein aus 1306 Basenpaaren bestehendes Gen, welches auf Chromosom 4q11-q12 lokalisiert ist. Es wurde ursprünglich als zelluläres Homolog des viralen Onkogens v-kit (Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene) identifiziert, ein Auslöser feliner (d.h. bei Katzen auftretender) Sarkome. Das Genprodukt stellt einen Glykoprotein-

Transmembranrezeptor dar, der durch den Stammzellofaktor (SCF) aktiviert wird und Tyrosinkinaseaktivität aufweist. Genetische Veränderungen in c-kit finden sich bei Gastrointestinalen Stromatumoren, Mastzellerkrankungen, akuten myeloischen Leukämien und Piebaldismus. Beim Piebaldismus handelt es sich um eine durch Mutation im KIT-Rezeptor verursachte Migrationsstörung von embryonalen Melanozyten. Klinisch finden sich umschriebene Hypopigmentierungen der Haut bzw. der Haare [38].

In GIST sind bei 80-85% der Patienten aktivierende Mutationen in c-kit detektierbar [19], welche Zellproliferation fördern und Apoptose inhibieren [63] können. Überwiegend befinden sich diese Mutationen in vier verschiedenen Exonen des Gens. Dies sind in absteigender Frequenz Exon 11, Exon 9, Exon 13 und Exon 17. Die meisten Mutationen sind gegenüber einer Therapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib sensibel, mit Ausnahme von Mutationen in Exon 17, die primär resistent gegenüber einer Therapie mit Imatinib sind. Mutationen in Exon 9 zeigen teilweise eine verminderte Sensibilität mit der Notwendigkeit einer Dosisverdoppelung von Imatinib zum Erreichen einer therapeutischen Antwort [39]. Auch die Mutation p.K642E von Exon 13 scheint Imatinib-sensibel [7].

Im Jahre 1998 konnten Hirota et al. zeigen, dass Mutationen, welche im Exon 11 und damit im der juxtamembranären Domäne entsprechenden Genlokus des KIT-Rezeptors liegen, mit einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors einhergehen. C-kit-Exon-11-Mutationen treten bei GIST in 66% aller Patienten auf [43]. Die Juxtamembrandomäne inhibiert physiologischerweise eine Dimerisierung des Rezeptors in Abwesenheit von SCF. Diese Funktion wird durch In-frame-Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen gestört [14, 54, 65], was zu einer ligandenunabhängigen Dimerisierung, einer Aktivierung und somit zu einem onkogenen Signal führt.

Genetische Veränderungen in Exon 9 finden sich in 13% der GIST-Patienten. Sie betreffen den extrazellulären Teil des Rezeptors und treten gehäuft bei Tumoren des Dünndarms auf. Welcher Mechanismus dieser Assoziation zugrunde liegt, konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Gegenwärtig wird jedoch davon ausgegangen, dass Mutationen in Exon 9 ein Antidimerisierungsmotiv der extrazellulären Domäne stören [19].

Mutationen in den Exonen 13 und 17 treten mit einer Frequenz von 0,8 - 4,1% bzw. 0,6% auf. Sie betreffen die Kinase-I-Domäne bzw. die Aktivierungsschleife der Rezeptor-Tyrosinkinase. Auch hier wird davon ausgegangen, dass es durch die Veränderungen in der Gen- bzw. Aminosäuresequenz zu einer konstitutionellen Aktivierung des Enzyms und einem onkogenen Signal kommt.

1.7.2 PDGFR α

PDGFR α ist ein auf Chromosom 4q11-q13 kodiertes Protein aus der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Das zugehörige Gen weist eine Größe von 3270bp auf. Physiologischerweise wird der Rezeptor durch Liganden aus der platelet-derived-growth-factor-(PDGF)-Familie aktiviert, was zur Weiterleitung eines intrazellulären Proliferationssignals führt. Neben der Entstehung von GIST ist PDGFR α auch mit dem Hypereosinophiliesyndrom (HES) assoziiert [17].

Mutationen in PDGFR α sind mittels Sanger-Sequenzierung oder mittels eines High-Resolution Melting Assays (HRM) detektierbar [58]. Sie finden sich bei 5-7% der GIST [40] und betreffen mit einer Frequenz von 5,6% sämtlicher GIST das für die Aktivierungsschleife kodierende Exon 18 und mit einer Frequenz von 1,5% aller GIST-Erkrankungen das Exon 12, welches für die Juxtamembrandomäne kodiert [19]. Nahezu alle GIST mit Mutationen in PDGFR α zeigen ein epitheloides Wachstumsmuster. Darüber hinaus sind sie häufig mit einer schwachen bis nicht nachweisbaren Expression von KIT vergesellschaftet. Mutationen in c-kit und PDGFR α schließen sich nach gegenwärtiger Kenntnis wechselseitig aus [39-40].

1.7.3 BRAF

BRAF ist Teil der RAF-Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen. Diese sind wichtige Effektoren der RAF-Aktivierung und Teil der RAS-RAF-ERK-Signalkaskade. Bei RAF-Proteinen handelt es sich um eine Familie von Kinasen, die ein extrazelluläres Signal von Wachstumsfaktoren in den MAPK-Signalweg überleiten. In gesunden Zellen führt die Bindung eines extrazellulären Liganden zu einem intrazellulären Signal, welches wiederum zur Transkription von Genen führt, welche an Zellwachstum, Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt sind. Es handelt sich um eine im Laufe der Evolution hoch-konservierte Kaskade, die für eine reguläre Funktion der Zelle essenziell ist.

Mutationen in BRAF sind die häufigsten genetischen Veränderungen in malignen Melanomen der Haut. Gegenstand aktueller Untersuchungen ist die Fragestellung, inwiefern BRAF auch für die Pathogenese von „Wildtyp-GIST“, die weder eine Mutation in c-kit noch in PDGFR α aufweisen, eine Rolle spielen. So wurden von einer Arbeitsgruppe um Agaram et al. 61 Patienten untersucht, bei denen weder Mutationen in c-kit noch in PDGFR α nachweisbar waren. Bei diesen Wildtyp-Patienten, die 10-15% der GIST ausmachen, konnte in 4% der Patienten in BRAF Exon 15 die Mutation V600E detektiert werden [2]. BRAF-Mutationen treten somit bei < 1% der GIST auf, sie scheinen dann bevorzugt bei Frauen mittleren Alters vorzukommen und überwiegend im Dünndarm lokalisiert zu sein. Auffällig sind ein hohes Malignitätspotential sowie eine starke Expression des KIT-Proteins. In der Literatur werden Mutationen in BRAF auch mit dem Vorliegen einer primären Resistenz gegen eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) in Verbindung gebracht [81]. Nicht vollständig geklärt ist bisher die Frage, ob sich Mutationen in c-kit/PDGFR α und BRAF wechselseitig ausschließen [1].

1.7.4 KRAS

Das KRAS-Gen kodiert für ein Protein aus der Familie des RAS. Bei RAS handelt es sich um eine Familie von Proteinen, die an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind und bei Aktivierung proliferative und antiapoptotische Wirkung haben. Der Name RAS leitet sich von einer Abkürzung für „rat sarcoma“ ab, da die Proteine primär in Sarkomen der Ratte beschrieben wurden. KRAS besitzt eine GTPase-Aktivität und ist an vielen intrazellulären Signalkaskaden beteiligt. Mutationen in KRAS haben oftmals onkogenes Potenzial und werden in Leukämien sowie in Karzinomen des Kolon, des Pankreas und der Lunge gefunden. In Imatinib-resistenten Gastrointestinalen Stromatumoren konnten Miranda et al. Mutationen des KRAS-Genes nachweisen [82]. Dem entgegen steht eine Untersuchung aus dem Jahre 2013. Hier wurden 514 primäre GIST auf Veränderungen in KRAS gescreent. Bei keinem der Patienten wurde eine KRAS-Mutation gefunden, so dass man derzeit davon ausgehen muss, dass derartige Veränderungen keine relevante Rolle in der Pathogenese von GIST spielen [59].

1.7.5 SDH-defiziente GIST

Seit 2010 rücken vermehrt Wildtyp-GIST in den Focus der Untersuchungen [78]. Bei 7-10% aller Gastrointestinalen Stromatumoren kann immunhistochemisch eine Defizienz des

Succinat-Dehydrogenase-Komplexes an der inneren Mitochondrien-Membran nachgewiesen werden [45, 72, 91]. Die Pathogenese dieser GIST-Subgruppe ist bislang nicht vollständig verstanden, es wird jedoch davon ausgegangen, dass es durch Succinat-Akkumulation über HIF1- α -vermittelte Pseudohypoxie zu einem Proliferationssignal kommt [72, 91].

Der SDH-Komplex ist Teil der mitochondrialen Atmungskette und besteht aus zwei hydrophilen Untereinheiten (SDHA und SDHB) und zwei hydrophoben Untereinheiten (SDHC und SDHD) [108]. Erstmals nachgewiesen werden konnten SDH-defiziente GIST im Jahre 2011 [45]. Bei GIST-Wildtypen fand sich dabei eine immunhistochemisch nachweisbare Reduktion oder ein totaler Verlust der SDHB-Expression.

Im Verlauf konnten durch Sequenzierung mehrere inaktivierende Mutationen in den Exonen 1-15 von SDHA nachgewiesen werden [90, 92]. Alle Patienten waren junge Frauen mit gastralischer Lokalisation des Tumors, gemischtzelliger Morphologie, häufiger Metastasierung in Lymphknoten und einer klinischen Inapparenz.

1.8 GIST-Syndrome

1.9 GIST bei Neurofibromatose Typ I

Die Neurofibromatose Typ I ist mit einer Frequenz von 1/3.000 Neugeborenen die häufigste autosomal-dominant vererbte Erkrankung. Sie kommt durch eine Mutation im NF1-Gen zustande, welches auf Chromosom 17q11.2 lokalisiert ist, und wird zur Gruppe der Phakomatosen gezählt. Die NF zeigt ein breites klinisches Spektrum. So sind auf der Haut der überwiegenden Anzahl der Patienten Café-au-Lait-Flecken zu finden, ebenso kommt es zu kutanen Neurofibromen. Im ZNS-Bereich ist das Auftreten von pilozytischen Astrozytomen sowie Tumoren im Bereich der Hirnnerven, die eine chirurgische Intervention nötig machen können, typisch.

NF Typ 1 ist häufig mit Gastrointestinalen Stromatumoren vergesellschaftet. So beschreiben Mietinen et al. bei 6% der Patienten mit NF1 auch GIST. Dies entspricht gegenüber der Normalbevölkerung einer Steigerung der Inzidenz um das 180-fache [73].

GIST in Zusammenhang mit NF1 weisen eine Prädilektion für den Dünndarm auf. Oftmals treten sie multipel auf, sind klinisch inapparent und mitotisch wenig aktiv. Es kann jedoch in einigen Fällen durchaus zu malignen Transformationen kommen, welche früher vermutlich häufig als maligne Schwannome eingeordnet wurden [77]. Wenngleich auch sporadische GIST bei NF1-Patienten vorkommen können, zeigen sogenannte NF1-assoziierte GIST bei Patienten mit Neurofibromatose i.d.R. keine Mutationen in den Genen c-kit und PDGFR α [118].

1.9.1 Carney-Triad

Eine weitere eigene Entität sind GIST im Rahmen einer Carney Triad. Als Carney-Triad bezeichnet man eine Kombination aus gastralem GIST, einem extraadrenalen Paragangliom und einem pulmonalen Enchondrom. Die Erstbeschreibung erfolgte 1983 durch J.A. Carney [12-13]. Üblicherweise weist der GIST hierbei eine Lokalisation im Magen sowie eine epitheloidzellige Morphologie auf. Betroffen sind überwiegend Patienten jüngeren Alters und mit 85% überwiegend Frauen. Der Großteil der Tumoren zeigt einen benignen Verlauf.

1.9.2 Familiäre GIST-Syndrome

Weltweit sind 34 Familien mit familiärem GIST-Syndrom bekannt [51]. Typischerweise finden sich autosomal-dominante, aktivierende Mutationen in c-kit oder PDGFR α . Üblicherweise kommt es bei diesen Patienten ab dem mittleren Lebensalter zur Entwicklung von multiplen und manchmal diffusen GIST. Die Malignität der Neoplasien reicht vom indolenten Tumor bis hin zu einer sarkomatösen Entartung [77]. Häufig kommt es zur Entstehung eines GIST auch bereits in jüngeren Jahren, etwa zwischen 25 und 45 Jahren [5].

1.10 Therapie

Die chirurgische R₀-Resektion mit primär kurativem Ansatz ist bei nicht metastasierten GIST die Therapie der Wahl. Bei Patienten mit lokalisierter Erkrankung kann durch operative Entfernung des Tumors häufig eine Heilung erreicht werden [48]. Für Patienten mit hohem Rezidivrisiko („High-Risk-GIST“) oder einer intraoperativen Tumorrupturn wird von der European Society of Medical Oncology (ESMO) eine adjuvante Chemotherapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib (Gleevec®) in einer Dosis von 400 mg/Tag

empfohlen. In dieser Patientengruppe kann die Therapie sowohl das tumorfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben verbessern [18, 49]. Bei Patienten mit niedrigem Risiko eines Rezidives ist die adjuvante Therapie derzeit nicht empfohlen [119]. Zur zielgerichteten Steuerung der Dosierung von Imatinib wird eine Mutationsanalytik empfohlen. Es besteht Konsens, dass Patienten mit der Mutation PDGFR α D842V aufgrund einer primären Medikamentenresistenz nicht zu behandeln sind. Für Mutationen in c-kit Exon 9 wird eine Verdoppelung der Tagesdosis auf 800 mg befürwortet. Bis zu 15% der GIST werden in der Literatur als primär resistent gegenüber einer Therapie mit Imatinib beschrieben. Weitere 40-50% entwickeln nach einer mehr als 24 Monate dauernden Therapie eine sekundäre Resistenz [15].

Bei primär nicht resektablen Tumoren ist ein neoadjuvanter Therapieansatz zur Zytoreduktion zu diskutieren [28]. Sollte bereits bei Diagnosestellung eine Metastasierung oder eine absolute Inoperabilität bestehen, dann ist eine orale Therapie mit Imatinib Mittel der Wahl [8, 23], ggf. kann im Verlauf eine Resektion von Metastasen erfolgen [113]. Der optimale Zeitpunkt zur definitiven Operation mit angestrebter R₀-Resektion wird mit 6-12 Monaten nach Beginn der Imatinib-Therapie angegeben, ist jedoch sicherlich im Einzelfall variabel und vom klinischen Verlauf abhängig. Eine Mutationsanalytik vor Therapiebeginn ist essenziell, um primäre Resistenzen zu erfassen bzw. eine Dosisadaptation vornehmen zu können. Bei Therapieversagen oder Medikamenten-Unverträglichkeit stehen weitere Tyrosinkinase-Inhibitoren zur Verfügung.

1.11 Fragestellung

Seit der Charakterisierung der GIST als eigene Tumor-Entität ist es Ziel zahlreicher Arbeitsgruppen, eine Klassifikation zu erarbeiten, die eine Einschätzung des Malignitätspotenziales und damit auch eine Prognose der verschiedenen Tumore ermöglicht. Derzeit finden im klinischen Alltag vor allem die Einteilungen nach Fletcher, Miettinen und Joensuu Verwendung.

Auch unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit diversen Parametern, die für die Prognose eines GIST relevant sind. So konnten Schmieder et al. nachweisen, dass bei Patienten mit High-Risk-GIST eine hohe Expression von p16 mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist [100]. Dorn et al. zeigten den negativen prognostischen Wert von Cyclin H [26].

Mit der zunehmenden Etablierung der Mutationsanalytik hat diese auch in der Routinediagnostik Anwendung gefunden. Mutationen auf Ebene der DNA führen jedoch nicht immer zum Austausch einer Aminosäure auf Proteinebene. Auch ist nicht jeder Aminosäureaustausch mit einem anderen sterischen Verhalten des Rezeptorproteins verbunden. Teilweise ist der Rezeptor auch nach Austausch mehrerer Aminosäuren noch funktionell.

Singer et al. konstatierten 2002, dass bestimmte Mutationen in c-kit mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert sind [105]. Im Jahre 2003 gewann eine Arbeitsgruppe aus Bonn erste Hinweise auf eine weitere Subpopulation innerhalb der c-kit-Mutanten, welche mit einer erhöhten Malignität des Tumors einhergeht [115]. Es handelt sich hierbei um Patienten, in denen die genetische Veränderung bei c-kit in den Codons 557 (Tryptophan) oder 558 (Lysin) vorliegt. In der damaligen Untersuchung wurden n=55 GIST-Patienten untersucht. In 35 Fällen konnte eine Mutation in c-kit gefunden werden. In sämtlichen metastasierten GIST-Fällen war eine Mutation in den Codons 557 oder 558 vorhanden. Somit ergaben sich bereits zu diesem Zeitpunkt Daten, die den Mutationsstatus in den Focus des Interesses stellten. Aufgrund der geringen Fallzahl waren aber noch keine eindeutigen Aussagen zu treffen.

2005 konnte eine Arbeitsgruppe um Martin et al. anhand einer Untersuchung von n=162 Patienten ebenfalls zeigen, dass eine Mutation in den Codons 557 und/oder 558 mit einer erhöhten Rate an Rezidiven und Metastasen assoziiert sind [69]. Auch weitere Untersuchungen stützen diese Annahme [9, 29, 67].

Ziel der vorliegenden Studie ist es, den prognostischen Wert von Mutationen in c-kit und PDGFR α bei Gastrointestinalen Stromatumoren zu untersuchen. Ferner wird geprüft, ob eine Mutation im kritischen Bereich der Codons 557 und 558 von c-kit Exon 11 einen Effekt auf das krankheitsspezifische Überleben (DSS) und das tumorfreie Überleben (DFS) der Patienten hat.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- Färbeautomat
 - Ames Histo-Tek Slide Stainer; Vogel Medizinische Technik und Elektronik, Deutschland
- Eindeckelautomat
 - Promounter RCM 60; Medite Medizintechnik, Deutschland
- Mikroskop:
 - Zeiss Axiolab; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Deutschland
- Pipetten:
 - Eppendorf Research; Eppendorf AG, Deutschland
 - Pipetman; Gilson Inc., USA
- Thermomixer
 - Thermomixer 5436; Eppendorf AG, Deutschland
- Zentrifugen
 - Centrifuge 5417R; Eppendorf AG, Deutschland
 - Centrifuge 5417C; Eppendorf AG, Deutschland
 - Centrifuge/Vortex Combi-Spin FVL 2400; peqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
- Reinraumwerkbank
 - Clene Cab; Herolab Laborgeräte GmbH, Deutschland
- PCR-Cycler
 - Primus 96 plus; MWG Biotech AG, Deutschland
- Elektrophorese-Systeme
 - Electrophoresis Power Supply EPS300; Amersham Pharmacia Biotech, USA
 - Easy-Cast Electrophoresis System #B2
 - Easy-Cast Electrophoresis System #B1A
- UV-Tisch
 - UV-Transilluminator 302nm; Bachhofer GmbH, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Einmalhandschuhe
 - o Nitra-Tex; Ansell Ltd., USA
 - o DermaClean; Ansell Ltd., USA
- Probengefäße
 - o 0,2ml Eppendorf-Gefäß
 - o 1,5ml Eppendorf Gefäß
- Pipettenspitzen, steril
 - o Biosphere Filter-Tips 10µl, 100µl, 1000µl; Sarsted, Deutschland
- Objektträger/Deckgläser
 - o SuperFrost-Plus 76x26mm; Menzel GmbH & Co. KG, Deutschland
 - o Deckgläser 24x50mm; Menzel GmbH & Co. KG, Deutschland
- DNA-Aufreinigungs-Kit
 - o peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit; peqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland

2.1.3 Allgemeine Reagenzien

- TEN-Puffer
 - o 1mM Na-EDTA
 - o 10mM TRIS pH 8,0
 - o 0,1 M NaCl
- Agarose High Resolution Roti Garose; Carl Roth GmbH, Deutschland
- Amersham 100-Base-Pair-Ladder; GE Healthcare Life Sciences, USA

2.1.4 PCR-Reagenzien

- Illustra dNTP Polymerisation Mix; GE Healthcare Life Sciences, USA
- Illustra rTAQ-DNA-Polymerase; GE Healthcare Life Sciences, USA
- Spezifischer Primer für c-Kit Exon 11, 9, 13 und 17; Eurofins MWG Operon, Martinsried, Deutschland
- Spezifischer Primer für PDGFR α Exon 12 und 18; Eurofins MWG Operon, Martinsried, Deutschland

2.1.5 Software & Tools

- Chromatogramm-Bearbeitung und -auswertung
 - o Chromas Version 2.33; Technelysium Pty Ltd.; <http://technelysium.com.au/>
- Online-Tools
 - o Basic Local Alignment Search Tool (B.L.A.S.T.); <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, National Library of Medicine (NLM), USA
 - o Catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC); <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>; Wellcome Trust Sanger Institute, UK
 - o Emboss Transeq; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html>; EMBL-EBI, UK
- Datenbank
 - o Microsoft Office Access 2007®; Microsoft Corporation, USA
- Statistische Auswertung
 - o Microsoft Office Excel 2007®, Microsoft Corporation, USA
 - o SPSS® Statistics 17.0; SPSS Inc., USA
 - o WinSTAT® für Microsoft Excel, Version 2007.1, R. Fitch Software, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Datenerfassung und -aktualisierung

Als Grundlage für die Erfassung und Aktualisierung der Datensätze stand eine auf Microsoft Access® basierte Datenbank zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der vorhandene Bestand ergänzt und aktualisiert. Dokumentiert wurden von klinischer Seite Daten zu Person und Hausarzt, zur aufgetretenen Initialsymptomatik, das Datum der Diagnosestellung, durchgeführte therapeutische Maßnahmen, aufgetretene Zweitneoplasien oder Rezidive. Basierend auf Arztbriefen und pathologischen Befundberichten wurden Lokalisation, Tumorgröße, Mitoserate sowie das histopathologische Profil erfasst.

Tabelle 1: Risikoklassifikation Gastrointestinaler Stromatumoren in Abhängigkeit von maximaler Tumorgroße (in cm) und Mitoserate (MR) auf 50 HPF. Darstellung nach **Fletcher** et al. [33].

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

Tabelle 2: Gruppeneinteilung Gastrointestinaler Stromatumoren in Abhängigkeit von maximaler Tumorgroße (in cm) und Mitoserate (MR) auf 50 HPF. Darstellung nach **Miettinen** et al. [79-80].

Gruppe	Größe (cm)	MR pro 50
1	≤ 2	≤ 5
2	$> 2 \leq 5$	≤ 5
3		
3a	$> 5 \leq 10$	≤ 5
3b	> 10	≤ 5
4	≤ 2	> 5
5	$> 2 \leq 5$	> 5
6		
6a	$> 5 \leq 10$	> 5
6b	> 10	> 5

Tabelle 3: Risikoeinteilung Gastrointestinaler Stromatumoren in Abhängigkeit von Gruppenzugehörigkeit und Lokalisation. Darstellung nach **Miettinen** et al. [79-80].

Gruppe	Magen	Dünndarm
1	Very Low	Very Low
2	Low	Low
3		
3a	Low	Intermediate
3b	Intermediate	High
4	Low	High
5	Intermediate	High
6		
6a	High	High
6b	High	High

Zu sämtlichen Patienten wurde im Rahmen der klinischen Tumornachsorge oder telefonisch unter Einbezug der Hausarztbefunde Kontakt aufgenommen, um die aktuelle gesundheitliche Situation zu erfassen. Hierbei wurde gezielt nach Rezidivsymptomen sowie eventuell aufgetretenen Zweitneoplasien gefragt. Neben dem Datum und der Art des Kontaktes (klinisch, telefonisch, Hausarzt) wurden sämtliche erhobenen Daten in ein separates Kontakt-Formular eingegeben, welches direkt mit dem korrespondierenden Patienten in der Datenbank verknüpft war. Somit war eine lückenlose und nachvollziehbare Dokumentation sämtlicher Patientenkontakte möglich.

2.2.2 Erhebung und Ablage

Von allen Patienten wurde eine schriftliche Einwilligung eingeholt und mit Befunden und Arztbriefen abgelegt. Neben der Papierform erfolgte eine EDV-gestützte Erfassung in der o.g. Datenbank. Hier waren sämtliche klinische, bildgebende und pathologische Befunde zu dokumentieren.

2.2.3 Gewinnung von genomischer DNA aus Paraffin-eingebettetem Tumorgewebe

Von 121 Patienten konnte aus dem Archiv des Institutes für Pathologie am Universitätsklinikum Ulm genomische DNA aus in Paraffin eingebettetem Material gewonnen werden. Bei sechs Patienten wurden vorliegende Ergebnisse externer Kooperationspartner übernommen.

Pro Patient wurden jeweils zwei gleichartige Schnitte á 5µm Schichtdicke angefertigt, in Xylol sowie aufsteigender Reihe Ethanol entparaffiniert und anschließend getrocknet. Ein Schnitt wurde mittels Färbeautomat nach Standardprotokoll mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und mit einem Deckglas versehen, um die jeweilige Ausdehnung des Tumors lichtmikroskopisch erfassen und markieren zu können. Nekrotische, kalzifizierte und insbesondere stark eingeblutete Bereiche wurden hierbei im Sinne der Gewinnung eines möglichst hohen Anteils an tatsächlichem Tumor-Gewebe abgegrenzt.

Nach Aufbringen von 100µl TEN-Puffer auf den markierten Bereich des ungefärbten Schnittes wurde das Gewebe in der Reinraumwerkbank an den zuvor markierten Stellen homogenisiert und in Lösung gebracht. Nach Abpipettieren des Lysats und Verfüllen in ein Eppendorf-Schraubgefäß wurden mit einer neuen Pipettenspitze nochmals 100µl TEN-Puffer aufgebracht um abgelöste, aber auf dem Objektträger verbliebene Zellen aufnehmen zu können. Das Lysat wurde in das selbe Eppendorf-Schraubgefäß verfüllt.

Zur Zytolyse und Freisetzung der genomischen DNA wurden je 100µl Templatevolumen 10µl Proteinase K [107], im vorliegenden Fall also 20µl, eingesetzt. Zur Unterstützung der Reaktion erfolgt die Zufuhr von Energie über einen Thermomixer und ständiges Bewegen der Eppendorf-Schraubgefäße über Nacht. Danach 5-minütiges Erhitzen auf 95°C zur Denaturierung der Proteinase K. Vor dem Einsatz in das PCR-Röhrchen wurde jedes Template für 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um eventuell noch vorhandenen Zelldebris zu separieren. Zuletzt erfolgte das Abpipettieren unter der Reinraumwerkbank und das Einfüllen in ein neues, zuvor sterilisiertes Eppendorf-Schraubgefäß.

2.2.4 Amplifikation und Aufreinigung

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist davon auszugehen, dass sich in GIST-Primärtumoren die Mutationen wechselseitig ausschließen [40]. Ein Auftreten von Mutationen in mehreren Exonen innerhalb eines Tumors wurde bisher nicht beschrieben. Aus diesem Grund wurden nicht für jeden Patient sämtliche Exons sequenziert. Begonnen wurde mit dem Exon mit der höchsten Mutations-Inzidenz (Exon 11). Bei negativem Befund wurden in einer Reihe - unter Berücksichtigung der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit des Auftretens einer Mutation - weitere Exons untersucht, bis eine Mutation nachgewiesen werden konnte. Fand sich keine der bekannten Mutationen (c-kit Exon 11, 9, 13, 17; PDGFR α 18, 12), so wurde der Tumor als Wildtyp bezeichnet und als solcher in die Datenbank aufgenommen.

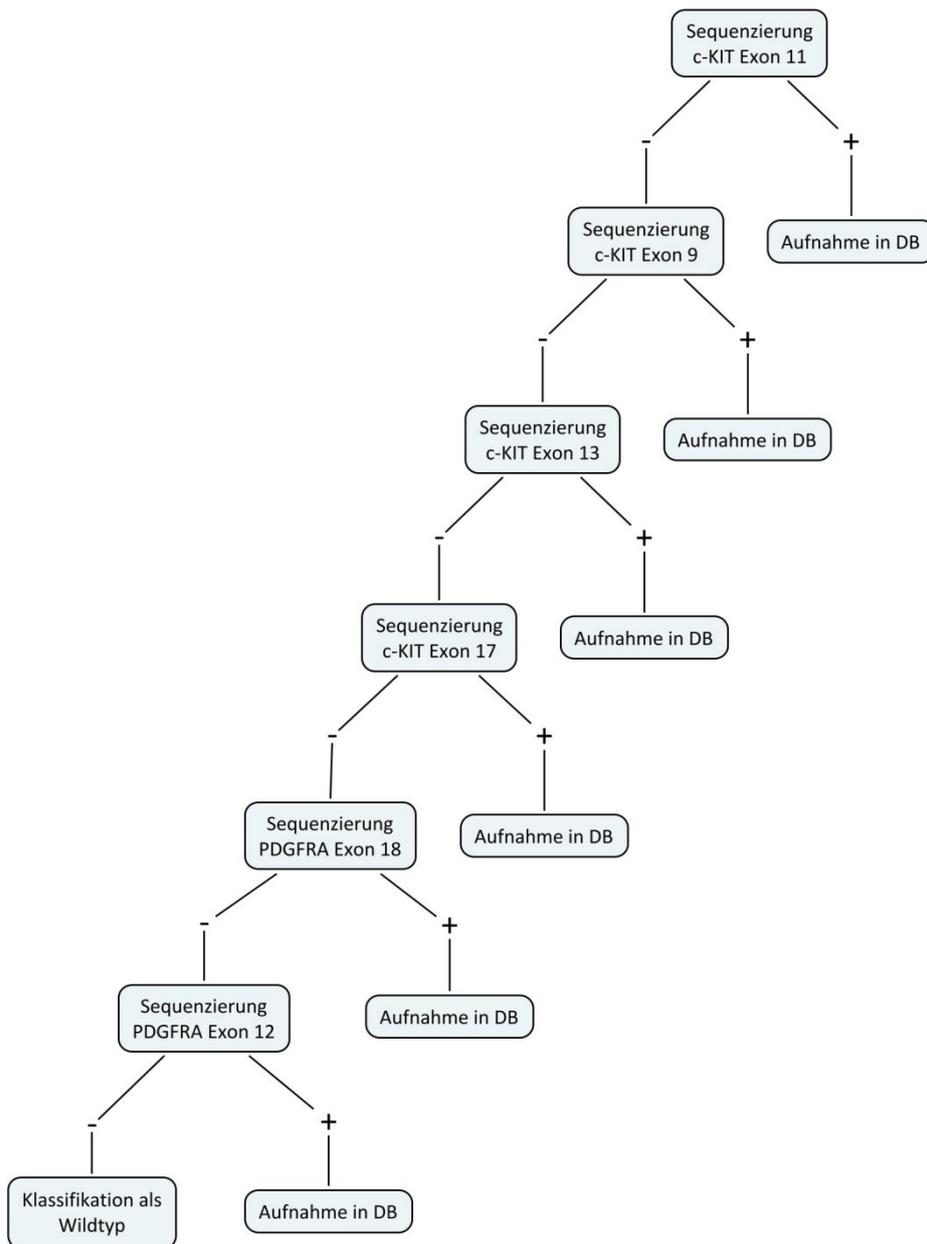


Abbildung 1: Abgestuftes Vorgehen bei der Mutationsanalytik Gastrointestinaler Stromatumoren unter Berücksichtigung der Häufigkeit verschiedener Mutationsloci (nach Corless et al. [19]). Begonnen wurde die Analytik mit der Sequenzierung von c-kit Exon 11. Wurde eine Mutation detektiert („+“), so wurde der Tumor unter Angabe der entsprechenden Mutation in die Datenbank aufgenommen und keine weiteren Sequenzierungen durchgeführt. Wurde für das entsprechende Exon ein Wildtyp detektiert („-“), so wurde das jeweils nächste Exon untersucht. Wurde in keinem Exon eine Mutation erfasst, so wurde der Tumor definitionsgemäß als „Wildtyp“ bezeichnet.

Zur Durchführung einer spezifischen PCR für die einzelnen Exons wurden jeweils passende Primer benutzt. Die jeweiligen Sequenzen wurden unterstützt durch ein im Internet verfügbares Tool des Herstellers Eurofins MWG Operon, Martinsried, Deutschland generiert. Hierbei war lediglich die Eingabe des zu amplifizierenden Exonabschnittes nötig. Softwarebasiert wurde dann vom Hersteller ein hochspezifischer Primer generiert, der zu einer Vervielfältigung exakt des gewünschten Abschnittes genutzt werden konnte. Um nach Amplifikation des DNA-Materials eine entsprechende Bindung des nötigen Sequenzierprimers zu ermöglichen, wurden alle Vorwärts-Primer mit der bekannten M13-Sequenz (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') versehen.

Tabelle 4: Tabellarische Aufstellung der für die einzelnen Exons verwendeten Primer. Die rot markierten Bereiche der vorwärts („forward“) gerichteten Primer stellen die M13-Sequenz dar, welche in einem späteren Arbeitsschritt als Anknüpfungspunkt für den Sequenzierprimer benötigt wird. In Kleinbuchstaben und fett gedruckt der korrespondierende Ausschnitt aus dem zu sequenzierenden Exon.

Exon	forward/ reverse	Sequenz
c-Kit 11	f	5'-CGTT GTAAAACGACGGCCAGT GAA ttgttctctctccagagt gct-3'
	r	5'- acc aaaaaggtgacatgga-3'
c-Kit 9	f	5'-CGTT GTAAAACGACGGCCAGT GAA atgccacatccaagtg ttt-3'
	r	5'-gacagagcctaacaatccccta-3'
c-Kit 13	f	5'-CGTT GTAAAACGACGGCCAGT TTT Gccagttgtgct ttttg-3'
	r	5'- g ttataatctagcattgcca aa tca-3'
c-Kit 17	f	5'- CGTT GTAAAACGACGGCCAGT GAA tggtgactgaatact taaa ca aaa-3'
	r	5'- tg caggactgtcaagcagag-3'
PDGFR α 12	f	5'- CGTT GTAAAACGACGGCCAGT ctctgg tg cactggg acttt-3'
	r	5'- g caagggaaaagggag ct t-3'
PDGFR α 18	f	5'- CGTT GTAAAACGACGGCCAGT cagctacagatggct gat ct g-3'
	r	5'- act ttagagattaaag tg aaggagga-3'

Sämtliche Pipettierarbeiten wurden zur Vermeidung einer Kontamination mit Fremd-DNA mit Handschuhen und unter der Reinraumwerkbank durchgeführt. Das benötigte Material wurde vor Benutzung für 15 Minuten mit ultraviolettem Licht bestrahlt um eventuell vorhandene DNA-Antragungen zu degradieren.

Zunächst wurden sämtliche Materialien mit Ausnahme der Taq-Polymerase auf Eis gestellt, um unspezifische Amplifikationsreaktionen während des Pipettierens zu verhindern. Nach Vorlage von jeweils 4 μ l Patienten-Template in 0,2 ml PCR-Tubes wurde ein

exonspezifischer Mastermix pipettiert. Dieser setzte sich aus den für die PCR nötigen Reagenzien zusammen:

Tabelle 5: Zusammensetzung des exonspezifischen PCR-Ansatzes.

	Menge (μ l)
H ₂ O	42
10x-Puffer	5
dnTP	0,5
exonspezifischer Primer	0,5
Taq-Polymerase	0,5
gesamt	48,5

Pro PCR-Tube wurden nun 48,5 μ l des Mastermix zum bereits vorgelegten Patienten-Template zugefügt. Nach kurzer Durchmischung des Reaktionsgemisches mit dem Vortexgerät erfolgte ein kurzes Abzentrifugieren, um Antragungen am Deckel bzw. am Rand des PCR-Tubes zu verhindern. Währenddessen wurde der PCR-Cycler vorgeheizt, um den Zeitraum unspezifischer Raumtemperatur möglichst gering zu halten. Im Anschluss an die Pipettierarbeiten wurden die PCR-Tubes in den Cycler gestellt und die Amplifikation mittels Touch-Down-PCR gestartet (Programm-Protokoll siehe Tabelle 6). Hierbei wird die Spezifität der Primer-Bindung durch zyklusweise Annäherung der Annealing-Temperatur an die Schmelztemperatur des Primers erhöht. Das Auftreten von Primer-Dimeren und weiteren Artefakten kann so verringert werden [25].

Tabelle 6: Protokoll des durchgeführten PCR-Programms. Die grau hinterlegten Zeilen geben an, wie häufig der vorhergehende Abschnitt zyklisch wiederholt wird und bei welchem Schritt dieser beginnt.

Step	Temperature	Time (min) /Cycles	
1	95° C	5	Initial Denaturation
2	95° C	30	Cycle Denaturation
3	62° C	30	Primer Annealing
4	72° C	30	Primer Extension
5	Go to Step 2	2 Times	
6	95° C	30	Cycle Denaturation
7	60° C	30	Primer Annealing
8	72° C	30	Primer Extension
9	Go to Step 6	2 Times	
10	95° C	30	Cycle Denaturation
11	58° C	30	Primer Annealing
12	72° C	30	Primer Extension
13	Go to Step 10	2 Times	
14	95° C	30	Cycle Denaturation
15	56° C	30	Primer Annealing
16	72° C	30	Primer Extension
17	Go to Step 14	35 Times	
18	72° C	10	Substrate Clearance
19	4° C	Hold	Storage

Der PCR folgte die Auftrennung des Produktes mittels Gel-Elektrophorese. Hierzu wurden 1,5g High-Resolution-Agarose in einen Erlenmeyer-Kolben eingewogen und nach Zugabe von 110ml H₂O bis zur vollständigen Lösung der Agarose erhitzt. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von 10 ml 10xTAE-Puffer sowie 2 Tropfen Ethidium-Bromid. Nach Einbringen des flüssigen Gels in einen passenden Gelträger und Versehen desselben mit einem 16-Well-Kamm wurde das Gel bis zum Erstarren abgekühlt. Anschließend folgte das Einbringen des 100 bp-Standards sowie von jeweils 35 µl der PCR-Produktes in die Taschen. Mit einer Spannung von 120V erfolgte danach der Gel-Elektrophorese-Lauf über den Zeitraum einer Stunde.

Unter UV-Licht-gesteuerter optischer Kontrolle wurden dann zur spezifischen Extraktion der passenden Fragmente die entsprechenden Banden mittels Einmalskalpell ausgeschnitten. Hierbei wurde neben dem Schutz des Laboranten vor der UV-Strahlung insbesondere auch versucht, die Exposition des Gels mit der enthaltenen DNA möglichst kurz zu halten. Dies wurde durch Unterlegen eines für UV-Licht undurchlässigen Streifens Aluminiumfolie bewerkstelligt. Die ausgeschnittenen Gel-Stücke wurden in sterile 1,5ml-Eppendorf-Gefäße verfüllt.

Die Extraktion der amplifizierten DNA aus dem Agarosegel erfolgte mittels peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kits nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll:

1. Bei Gewicht von ca. 120-150 mg des Gelstücks Zugabe von 500 µl GP-Puffer. Erhitzen des Reaktionsgemisches im Thermomixer unter ständiger Bewegung auf 60° C. Hierdurch Auflösung des Gelstücks.
2. Zugabe von 250 µl CP-Puffer, anschließend vermischen.
3. Pipettieren von 750 µl des Inhalts jeweils auf eine MicroSpin-Zentrifugensäule, welche zuvor in ein UV-bestrahltes 2ml Sammeltube eingebracht wurde. 1-minütige Zentrifugation bei 10.000 g und Raumtemperatur. Verwerfen des Säulendurchflusses.
4. 700µl des Waschpuffers CG auf die Säule pipettieren, 2-3 Minuten warten, anschließend für 1 Minute bei 10.000 g zentrifugieren. Verwerfen des Säulendurchflusses.
5. Wiederholen von Schritt 4
6. Zentrifugensäule in das geleerte 2ml Sammel-Tube stecken und bei 10.000 g für eine Minute trocknen.
7. Eluieren der DNA durch aufpipettieren von 10 µl Elutionspuffer, anschließendes Inkubieren bei Raumtemperatur und zweiminütige Zentrifugation bei 10.000 g unter Raumtemperatur.

2.2.5 Sequenzierung

Sämtliche Sequenzierarbeiten wurden von Eurofins MWG Operon, Martinsried, Deutschland durchgeführt. Die Anmeldung der Proben erfolgte digital über die Internetpräsenz des Unternehmens (<http://www.eurofinsgenomic.eu>).

Pos	Label	Template Name	Template Type	Primer	Delete
1	ADM001X	64ex11	PCR product purified	S) M13 uni (-21)	delete
2	ADM001X	65ex11	PCR product purified	as above	delete
3	ADM001X	66ex11	PCR product purified	as above	delete
4	ADM001X		Plasmid DNA	as above	delete
5	ADM001X		Plasmid DNA	as above	delete
6	ADM001X		Plasmid DNA	as above	delete
7	ADM001X		Plasmid DNA	as above	delete
8	ADM001X		Plasmid DNA	as above	delete

Abbildung 2: Screenshot der Eingabemaske für die Auftragssequenzierung bei Eurofins MWG Operon, Martinsried, Deutschland. Im rot markierten Bereich sind Nummer des Barcode-Labels, Probenname (Template Name) und -typ und gewünschter Sequenzierprimer einzutragen.

2.2.6 Auswertung der Sequenzdaten

Das mit der Sequenzierung beauftragte Unternehmen lieferte die fertigen Sequenz- und Chromatogramm-Daten im SCF-Format. Dieses Format konnte mittels der Software Chromas angezeigt und die entsprechenden Daten ausgewertet werden.

Nach Identifikation der Probe und Zuordnung zum richtigen Patienten wurde die erhaltene Sequenz zunächst mittels B.L.A.S.T. (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) an die Wildtyp-Sequenz des entsprechenden Exons angelegt, um entsprechende Abweichung grob orientierend beurteilen zu können.

```

Alignments  Select All Get selected sequences NEW

>lc1|27853
Length=127

Score = 235 bits (127), Expect = 2e-67
Identities = 127/127 (100%), Gaps = 0/127 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AAACCCATGTATGAAGTACAGTGAAGGTTGTTGAGGAGATAAATGGAACAATTATGTT 60
      |||
Sbjct 1 AAACCCATGTATGAAGTACAGTGAAGGTTGTTGAGGAGATAAATGGAACAATTATGTT 60

Query 61 TACATAGACCCAACACAACCTTCCTTATGATCACAAATGGGAGTTTCCAGAAACAGGCTG 120
      |||
Sbjct 61 TACATAGACCCAACACAACCTTCCTTATGATCACAAATGGGAGTTTCCAGAAACAGGCTG 120

Query 121 AGTTTTG 127
      |||
Sbjct 121 AGTTTTG 127

```

Abbildung 3: Screenshot der Ergebnisausgabe der onlinebasierten B.L.A.S.T.-Software. Im gezeigten Fall findet sich eine Wildtyp-Sequenz für c-KIT Exon 11. Die Nukleotidsequenz des Patienten (untere Reihe „Sbjct“) ist vollständig identisch mit der Wildtyp-Sequenz (obere Reihe „Query“).

In einem zweiten Schritt wurde eine manuelle Überprüfung und Analyse jedes einzelnen Chromatogramms durchgeführt. Bei komplexeren Mutationen, wie etwa Insertionen oder größeren Deletionen wurde auch ein manuelles Alignment der Sequenzen durchgeführt. Punktmutationen stellen sich hierbei dadurch dar, dass im Chromatogramm ein deutlich sichtbarer zusätzlicher Peak erscheint. Bei Deletionen oder Insertionen kommt es zu einer kompletten Verschiebung des Rasters, so dass ab dem Basenpaar, an dem die Veränderung lokalisiert ist, keine Einzelpeaks mehr zu erkennen sind.

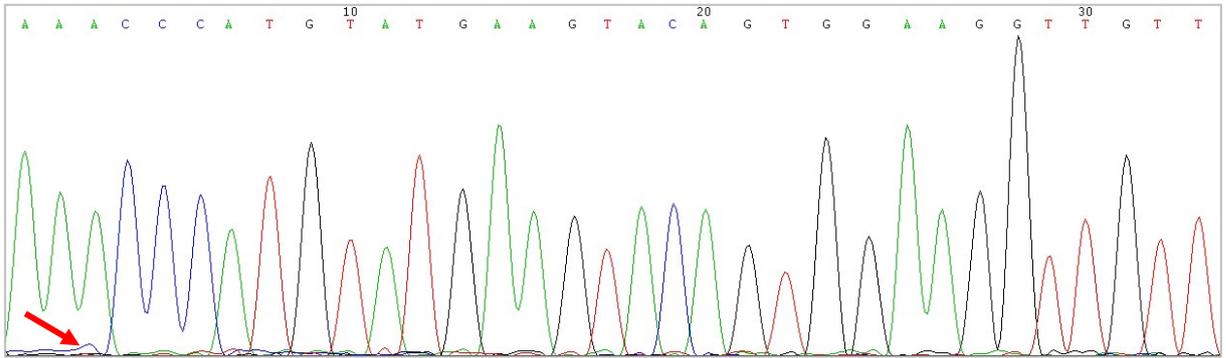


Abbildung 4: Ausschnitt eines Sequenz-Chromatogramms mit **Wildtyp-Sequenz**. Das Hintergrundsignal (siehe beispielhaft roter Pfeil) ist nur minimal vorhanden, für jedes dem Patienten zuzuordnende Basenpaar ist ein einzelner Signalpeak abgrenzbar.

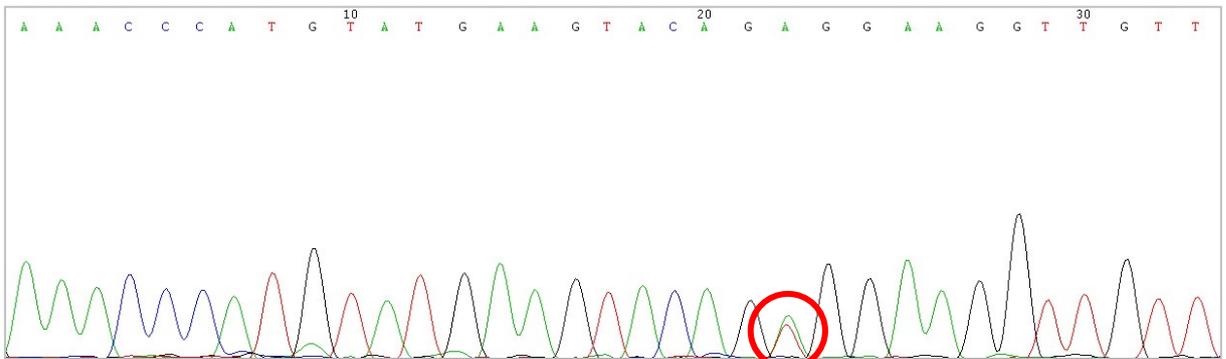


Abbildung 5: Ausschnitt eines Sequenz-Chromatogramms mit **Punktmutation**. Bei Auftreten einer Mutation (siehe roter Kreis) kommt es zur Abbildung von zwei Peaks. Ein Peak repräsentiert die im amplifizierten Material vorhandenen Zellen mit Wildtyp-Sequenz, der andere die mutierten Tumorzellen.

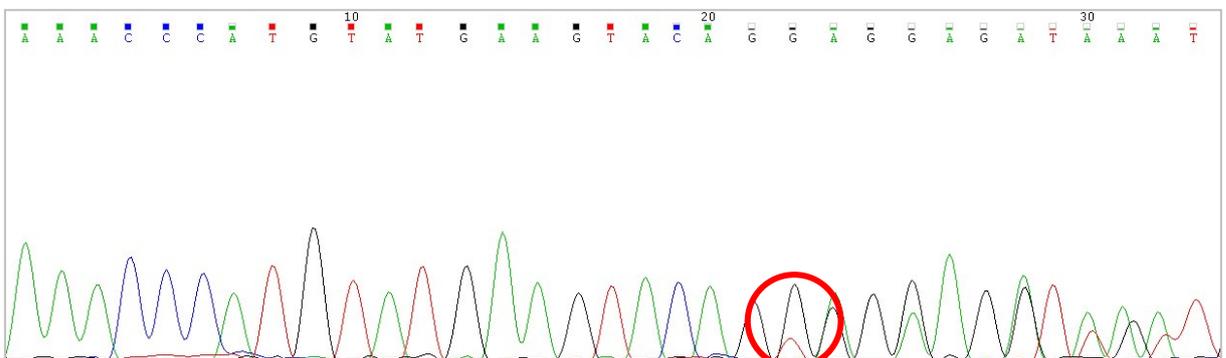


Abbildung 6: Ausschnitt eines Sequenz-Chromatogramms mit einer **Deletion**. Beginnend an der Stelle der Mutation (siehe roter Kreis) kommt es zu einer Verschiebung des Rasters, so dass ab diesem Zeitpunkt keine einzelnen Peaks mehr erkennbar sind.

Die Auswertung sämtlicher Sequenzchromatogramme erfolgte standardisiert auf einem Formblatt. Dort wurde die ID-Nummer des Patienten, der Name des amplifizierten Exons, die gemessene Basensequenz inklusive Benennung der Mutation sowie auch die daraus berechnete Aminosäuresequenz dokumentiert. Des Weiteren wurde ein Screenshot mit einem Teil des Chromatogramms eingefügt, anhand dessen die Mutation ersichtlich wird.

2.3 Statistische Methoden

Sämtliche Kalkulationen erfolgten unter Verwendung der Statistiksoftware SPSS® sowie des Plugins Winstat® für Microsoft Excel.

Die Beschreibung des Kollektivs erfolgte durch statistische Betrachtung der Nachbeobachtungszeit sowie der Alters- und Geschlechtsverteilung. Bei der Nachbeobachtungszeit wurde das arithmetische Mittel als „mittlere Nachbeobachtungszeit“ angegeben, ergänzend Minimum und Maximum. Beim Erkrankungsalter erfolgte neben der Angabe des arithmetischen Mittel auch die Angabe des Medians sowie der Spannweite vom jüngsten zum ältesten Patienten.

An weiteren Parametern wurde die Tumorlokalisation und das Auftreten etwaiger Zweitneoplasien ebenso beschrieben wie die Häufigkeit eines GIST-Rezidivs und einer GIST-Metastasierung. Hierbei wurde neben der absoluten Anzahl auch die prozentuale Anzahl berechnet. Ebenso erfolgte die Auswertung der pathologischen Befunde im Hinblick auf Tumorgröße, Mitoserate und immunhistochemische Parameter.

Überlebenszeitanalysen wurden anhand der Methode nach Kaplan und Meier durchgeführt, bei Vorhandensein mehrerer Gruppen wurde der Log-Rank-Test durchgeführt. Statistische Signifikanz für das Auftreten von Unterschieden wurde hierbei entsprechend den gängigen Konventionen bei $p < 0,05$ angenommen. Unterschieden wurde zwischen krankheitsspezifischem Überleben (DSS) und krankheitsfreiem Überleben (DFS). Das krankheitsspezifische Überleben (DSS) ist hierbei definiert als Zeitspanne von Erstdiagnose bis zum tumorbedingten Tod bzw. zum letzten bekannten Follow-Up. Das krankheitsfreie Überleben (DFS) ist als Zeitspanne von Erstdiagnose bis zum Auftreten eines Rezidives oder einer Metastasierung festgelegt.

Ergänzend wurde für die einzelnen Gruppen von Mutationen das Risiko mittels der Odds Ratio bestimmt. Das 95%-Konfidenzintervall wurde dabei wie folgt angegeben:

OR = X [KI untere Grenze; KI obere Grenze].

3. Ergebnisse

Die Grundlage der vorgelegten Untersuchung bildet das Ulmer GIST-Register. Erfasst werden dort sämtliche GIST-Erkrankungen des Universitätsklinikums Ulm sowie zahlreicher umliegender Kooperationspartner. Von 127 Patienten innerhalb dieses Registers waren Gewebeproben vorhanden und wurden wie oben beschrieben mutationsanalytisch untersucht. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden anschließend mit den epidemiologischen Daten des Registers gemeinsam ausgewertet. Insbesondere der Zusammenhang zwischen den erfassten Mutationen und dem krankheitsspezifischen Überleben (DSS) bzw. dem krankheitsfreien Überleben ohne Tumorrezidiv oder Metastasierung (DFS) waren Gegenstand der Untersuchung.

Tabelle 7: Übersicht ausgewählter epidemiologischer sowie pathologischer Daten des untersuchten Kollektivs aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

	n	%
Geschlecht (n_{total}=127)		
weiblich	72	56,7
männlich	55	43,4
Lokalisation (n_{total}=127)		
Magen	73	57,5
Dünndarm	36	28,3
Colon/Rectum	7	5,5
Andere	7	5,6
Diffus	4	3,1
Tumorgröße (n_{total}=127)		
<5	60	48
5-10	35	28
>10	32	25,6
Mitoserate (n_{total}=122)		
<5 / 50 HPF	69	56,6
5-10 / 50 HPF	27	22,1
>10 / 50 HPF	26	21,3
Risikoklassifikation (n. Fletcher) (n_{total}=127)		
Very Low	16	12,6
Low	35	27,6
Intermediate	29	22,8
High	47	37,0
Zweitneoplasien (n_{total}=39)	39	30,7
Prostatakarzinom	11	8,7
Mammakarzinom	6	4,7
Nierenzellkarzinom	5	3,9
Pankreaskarzinom	4	3,1
Kolonkarzinom	3	2,4
Ösophaguskarzinom	3	2,4
Andere	7	5,5
Mittlere Nachbeobachtungszeit	49,68 Monate	
Medianes Erkrankungsalter	66,25 Jahre	
Gesamtüberleben (OS)	1 Jahr	93,7%
	3 Jahre	78,0%
	5 Jahre	70,8%
Krankheitsspezifisches Überleben (DSS)	1 Jahr	96,3%
	3 Jahre	87,3%
	5 Jahre	84,3%
Krankheitsfreies Überleben (DFS)	1 Jahr	82,3%
	3 Jahre	79,9%
	5 Jahre	76,6%

3.1 Kollektiv, Epidemiologie

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mutationsanalyse-Ergebnisse von 127 GIST-Patienten samt den korrespondierenden klinischen Daten ausgewertet. Die mittlere Nachbeobachtungszeit des Kollektivs betrug 4,14 Jahre, entsprechend 49,68 Monaten. Das Minimum lag bei 0, das Maximum bei 14,61 Jahren (siehe Abbildung 7).

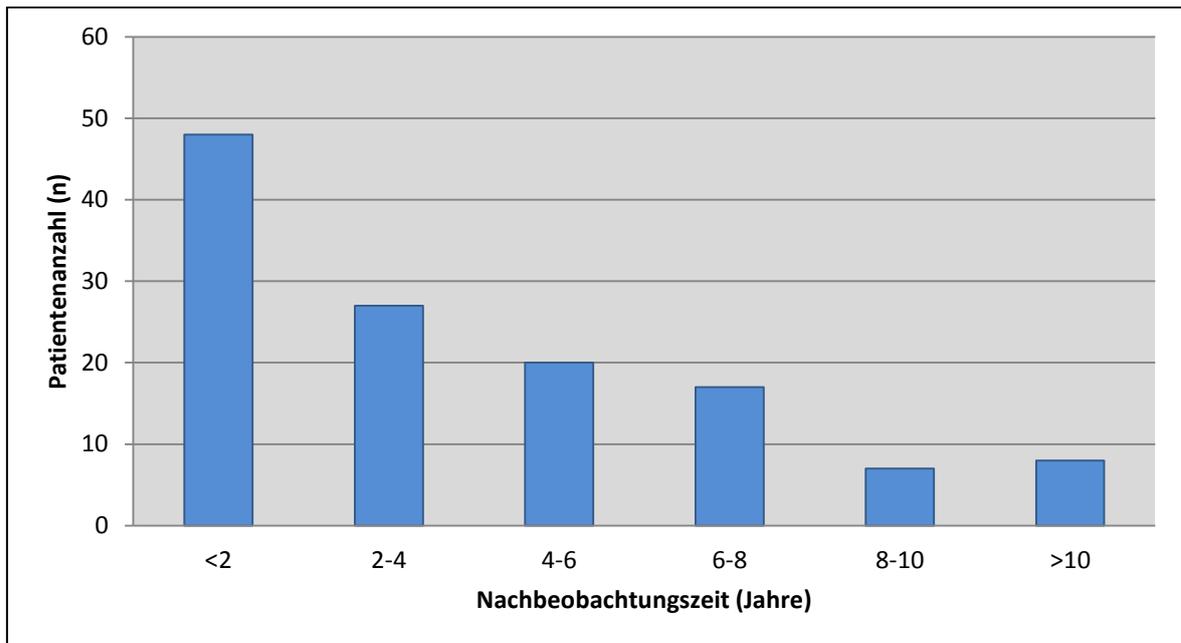


Abbildung 7: Nachbeobachtungszeit des untersuchten Kollektivs aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010 als Säulendiagramm. $n_{\text{total}}=127$ Patienten.

3.2 Altersverteilung

Das Patientenalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug im arithmetischen Mittel 63,91 Jahre bei einer Standardabweichung von 12,80 Jahren (siehe Abbildung 8). Insgesamt zeigt sich eine rechtsschiefe Verteilung mit einem Median von 66,25 Jahren. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Ersterkrankung 14,91 Jahre alt, der älteste 94,09 Jahre. Somit ergibt sich eine Spannweite von 79,18 Jahren.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren 17,3% der Patienten jünger als 50 Jahre und 9,4% der Patienten jünger als 40 Jahre.

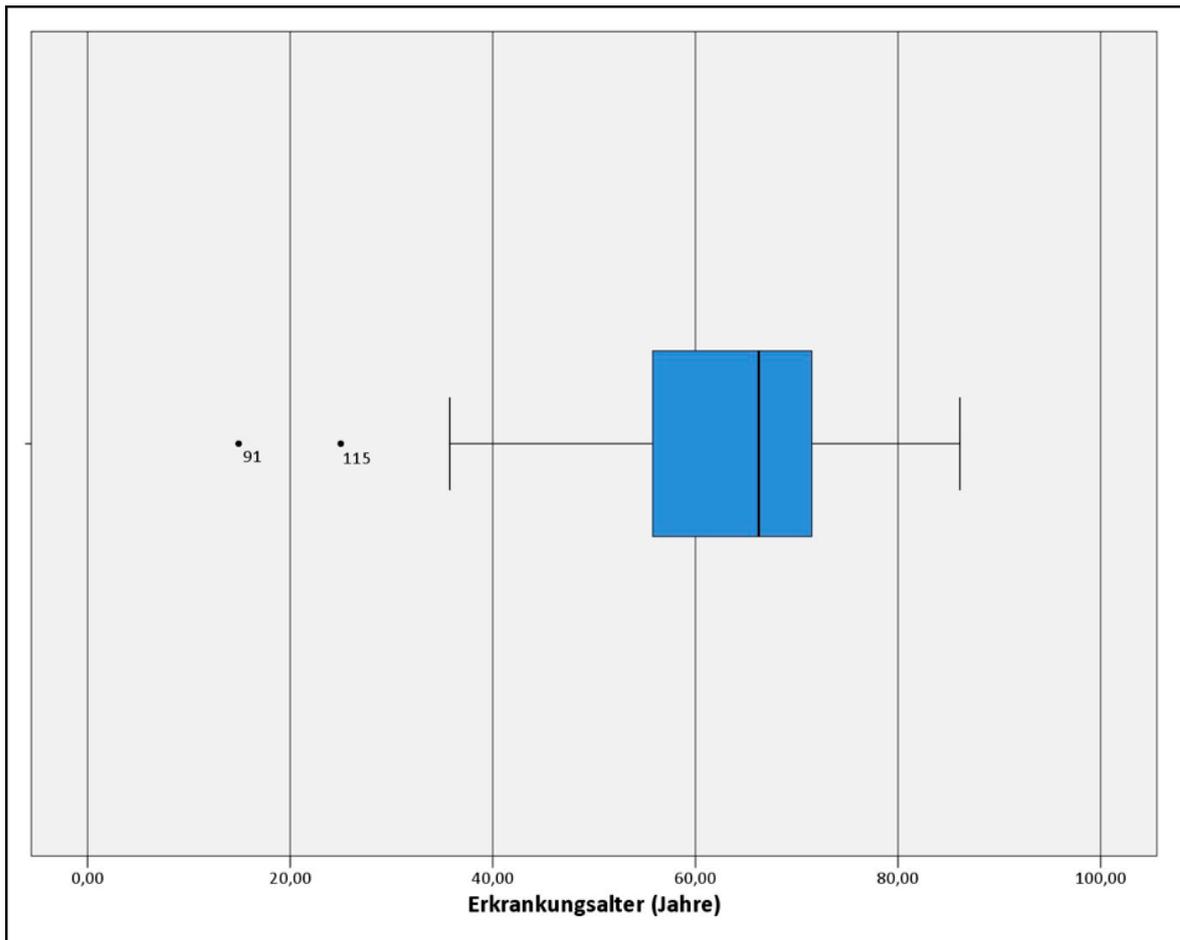


Abbildung 8: Patientenalter bei Erstdiagnose als Box-Whiskers-Plot. Der obere Whisker gibt das 97,5%-Quantil an, der untere Whisker das 2,5%-Quantil. Zwei Patienten mit geringem Alter bei Auftreten des GIST („91“ und „115“) sind als Ausreißer separat angegeben. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010. $n_{\text{total}}=127$.

3.3 Geschlechtsverteilung

Die Analyse des Geschlechtes zeigte ein geringgradig häufigeres Auftreten von GIST bei weiblichen Patienten: bei einer Gesamtzahl von $n=127$ Patienten waren 56,7% ($n=72$) weiblich und 43,3% ($n=55$) männlich (siehe Abbildung 9).

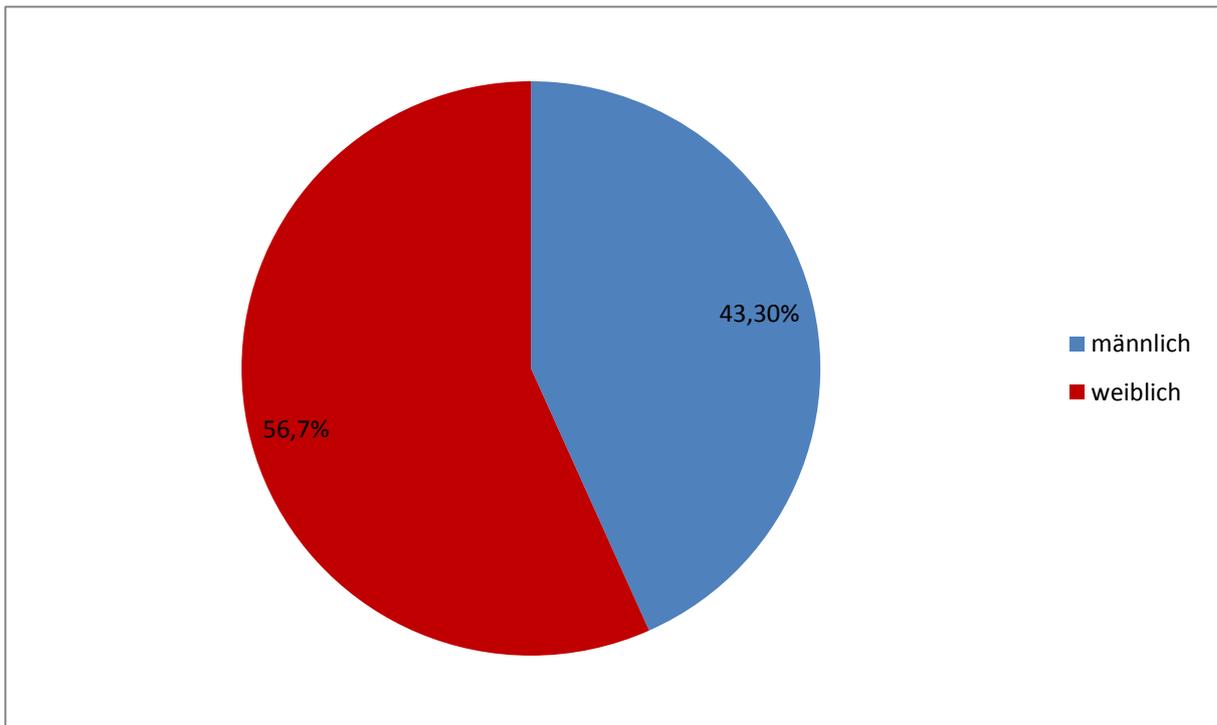


Abbildung 9: Geschlechtsverteilung innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs ($n_{\text{total}}=127$) aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010 als Kreisdiagramm. $n_{\text{total}}=127$.

3.4 Klinische Parameter

3.4.1 Lokalisation

Bei 57,6% ($n=73$) fand sich eine Tumorlokalisation im Magen. Im Dünndarm waren 28,3% ($n=36$) der GIST nachweisbar, hiervon lagen 5,5% im Duodenum, 9,4% im Jejunum und 13,4% im Ileum. In 4,7% ($n=6$) fand sich der GIST im Colon, bei 0,8% ($n=1$) im Rectum und bei weiteren 1,6% ($n=2$) im Ösophagus (siehe Abbildung 10).

Bei 2,4% ($n=3$) befand sich der Primärtumor im Mesenterium, bei 0,8% ($n=1$) im Ligamentum falciforme hepatis und bei 0,8% ($n=1$) retroduodenal. Diese werden definitionsgemäß als extraintestinale GIST bzw. eGIST (3,9%; $n=5$) bezeichnet. Bei 3,1% ($n=4$) lag zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits eine ausgedehnte Metastasierung vor, die eine klare Lokalisation des Primarius nicht mehr ermöglichte.

Aus diesen Zahlen ergibt sich folgende graphische Verteilung.

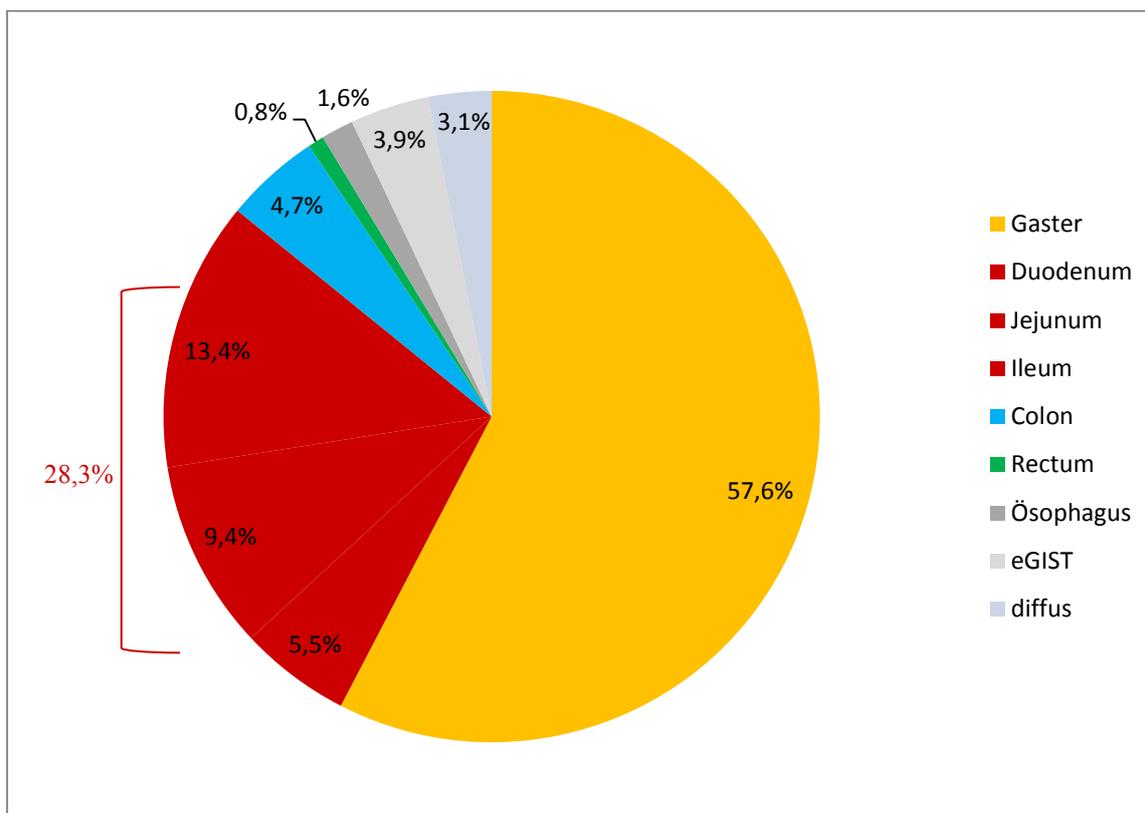


Abbildung 10: Lokalisation des gastrointestinalen Stromatumors bei Erstdiagnose als Kreisdiagramm. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010. $n_{\text{total}}=127$.

3.4.2 Zweitneoplasien

Bei 30,7% ($n=39$) der Patienten kam es vor Diagnose des GIST oder im weiteren klinischen Verlauf zum Auftreten einer malignen Zweitneoplasie. Am häufigsten wurden dabei Prostatakarzinome mit 8,7% ($n=11$) und Mammakarzinome mit 4,7% ($n=6$) vorgefunden, außerdem fanden sich Karzinome des Kolon ($n=3$), des Pankreas ($n=4$), der Niere ($n=5$), oder des Ösophagus ($n=3$). Bei jeweils 0,8% ($n=1$) der Patienten fand sich ein Angiosarkom der Mamma, ein Magenkarzinom, Endometrium-Karzinom, malignes B-Zell-Lymphom, Larynx-Karzinom, Schilddrüsen-Karzinom oder ein Osteosarkom.

Sekundärneoplasien benigner Natur fanden sich bei 20,5% ($n=26$) der Patienten, hier am häufigsten Adenome der Kolonschleimhaut, Leiomyome des Uterus oder benigne Hyperplasien der Prostata.

3.4.3 allgemeine Überlebenszeitanalyse

Von den insgesamt in die Studie aufgenommenen Patienten (n=127) waren zum Zeitpunkt der Auswertung noch 73,2% (n=93) am Leben und 26,8 % (n=34) bereits verstorben. Das Gesamtüberleben (OS) sämtlicher Patienten ohne Rücksicht auf die Todesursache lag nach 1 Jahr bei 93,7%, nach 3 Jahren bei 78,0% und nach 5 Jahren bei 70,8%. Von den Verstorbenen wurden 47,1% (n=16) als tumorbedingte Todesereignisse klassifiziert. Die restlichen Patienten 52,9% (n=18) verstarben im Rahmen einer Zweitneoplasie oder unabhängig von einer onkologischen Erkrankung.

Es zeigte sich eine GIST-tumorspezifische 1-Jahres-Überlebensrate (DSS) von 96,3%, eine 3-Jahres-Überlebensrate von 87,3% und eine 5-Jahres-Überlebensrate von 84,3% (siehe Abbildung 11).

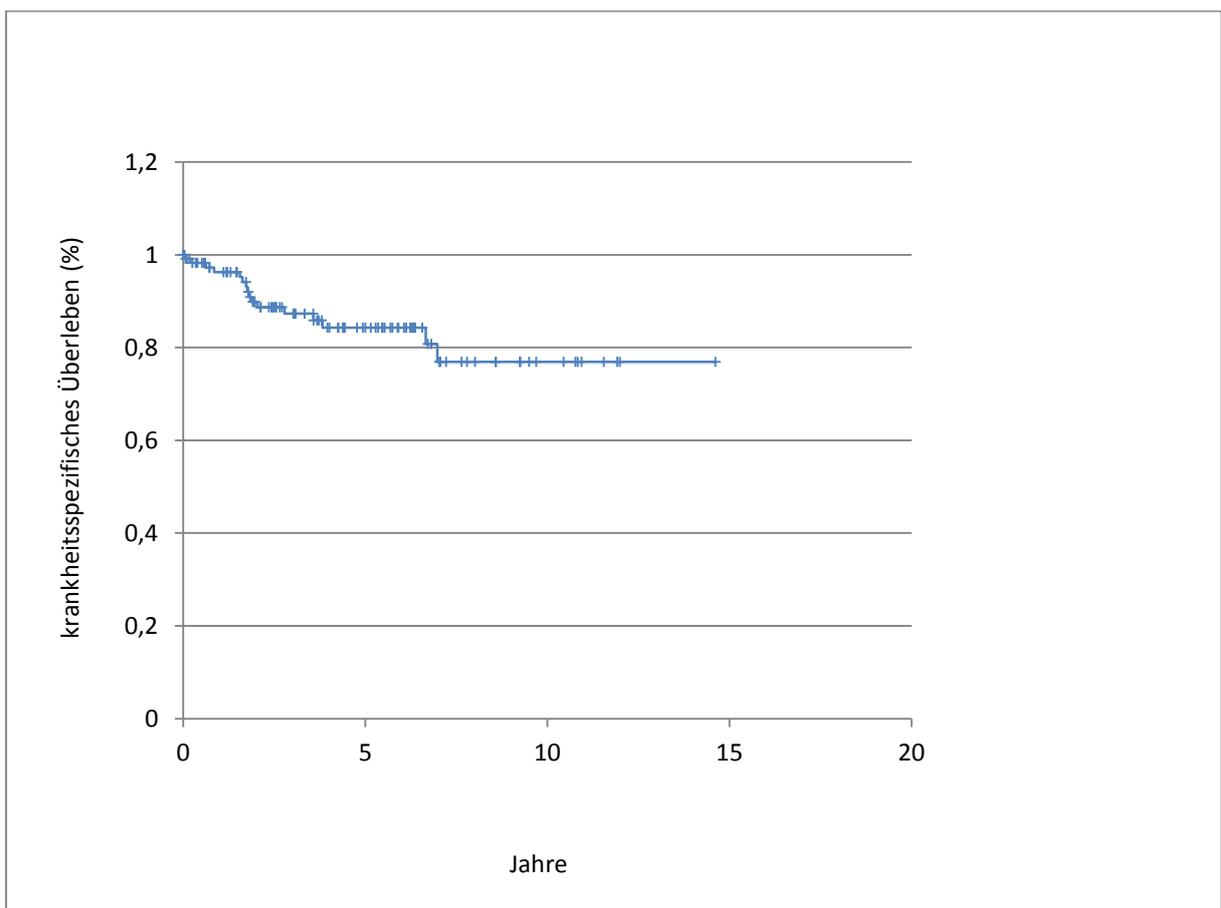


Abbildung 11: Allgemeines krankheitsspezifisches Überleben (**DSS**) des untersuchten Kollektivs aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010 nach Diagnosestellung (n_{total}=127).

3.4.4 Rezidive und Metastasierung

Daten zur Rezidiven und Metastasen konnten bei 90,6% (n=115) der Patienten erhoben werden. Bei 21,3% (n=27) der Patienten fand sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose oder im Verlauf ein Rezidiv oder eine Metastasierung. 69,3% (n=88) waren zum Zeitpunkt des letzten Follow-Ups tumorfrei.

Die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Ereignisses (Rezidiv oder Metastasierung) betrug 3,69 Jahre. Die Rate tumorfreier Patienten betrug nach 1-, 3- und 5 Jahren 82,3%, 79,9% bzw. 76,6% (siehe Abbildung 12).

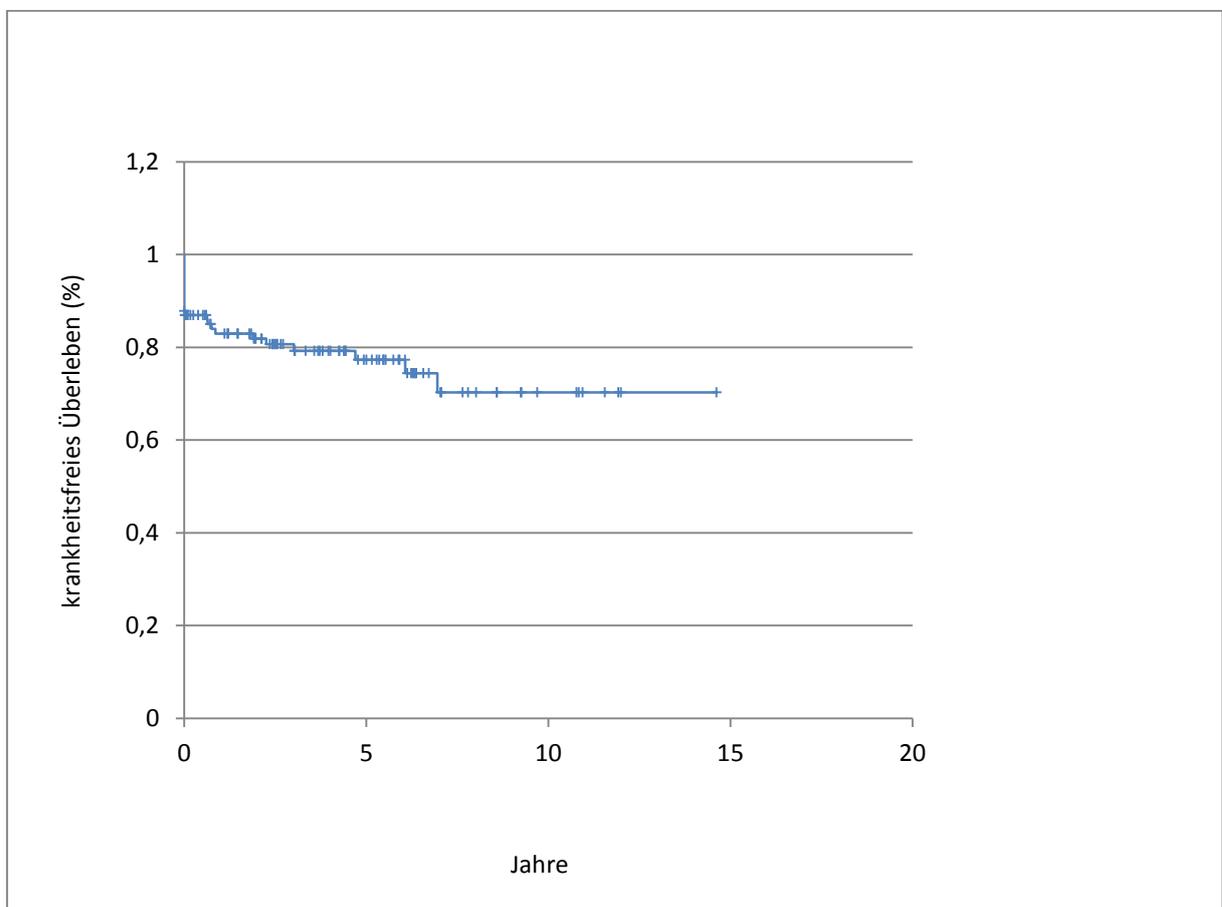


Abbildung 12: Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens (**DFS**) bis zum Auftreten eines Rezidives oder einer Metastasierung. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010. $n_{\text{total}}=127$.

Angaben zur Ausbreitung des Tumors bei Erstdiagnose lagen von allen Patienten vor. Hierbei zeigte sich bei 86,6% (n=110) ein unifokaler Befall. Bei 1,6% (n=2) lag initial eine

hepatische Metastasierung, bei 9,4% (n=12) eine peritoneale und bei 2,4% (n=3) eine Absiedelung sowohl in Leber als auch im Peritoneum vor.

3.5 Pathologische Basisparameter

Bei 98,43% (n=125) der Patienten war es möglich, die Größe des Primärtumors zu erfassen. Dabei wiesen 48% (n=60) der Tumore eine Größe von kleiner als 5 cm auf, die restlichen 52% (n=65) waren größer als 5 cm.

Legt man als Cut-Off eine Größe von 10 cm zu Grunde, so waren 74,4% (n=93) bis 10 cm groß. 25,6% (n=32) der diagnostizierten GIST waren folglich bei Erstdiagnose größer als 10 cm. Die mittlere Größe betrug 7,16 cm (siehe Abbildung 13).

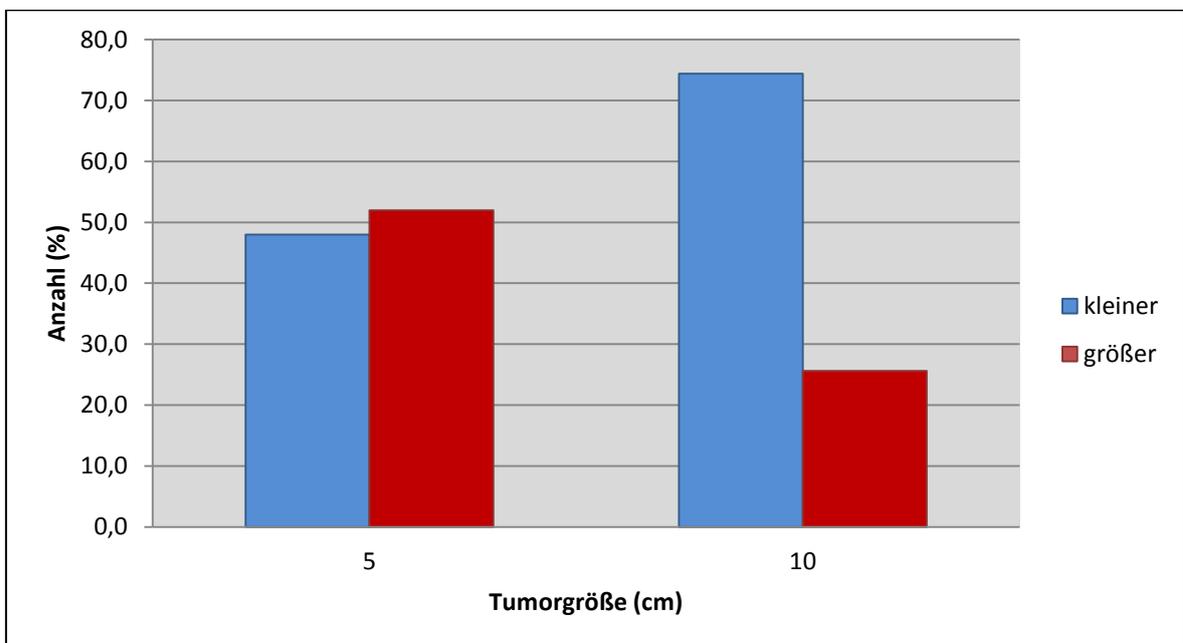


Abbildung 13: Größe des Primärtumors (n_{total}=125) als Säulendiagramm. Das linke Säulenpaar zeigt, dass 52% der Neoplasmen bei Diagnosestellung größer als 5cm sind. Aus dem rechten Säulenpaar lässt sich entnehmen, dass bei Diagnosestellung 25,6% der GIST einen Durchmesser >10cm aufweisen. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

Ein weiterer prognostisch relevanter Parameter ist die Mitoserate. Hier konnte bei 96,1% (n=122) der Patienten im Kollektiv die entsprechenden Daten erhoben werden. Dabei waren bei 56,6% (n=69) jeweils weniger als 5 Mitosen/50 HPF zu finden, bei 43,4%

(n=53) konnten mehr als 5 Mitosen/50 HPF gezählt werden. Bei 21,3% (n=26) der erhaltenen Datensätze lag die Zahl der Mitosen/50 HPF über 10 (siehe Abbildung 14).

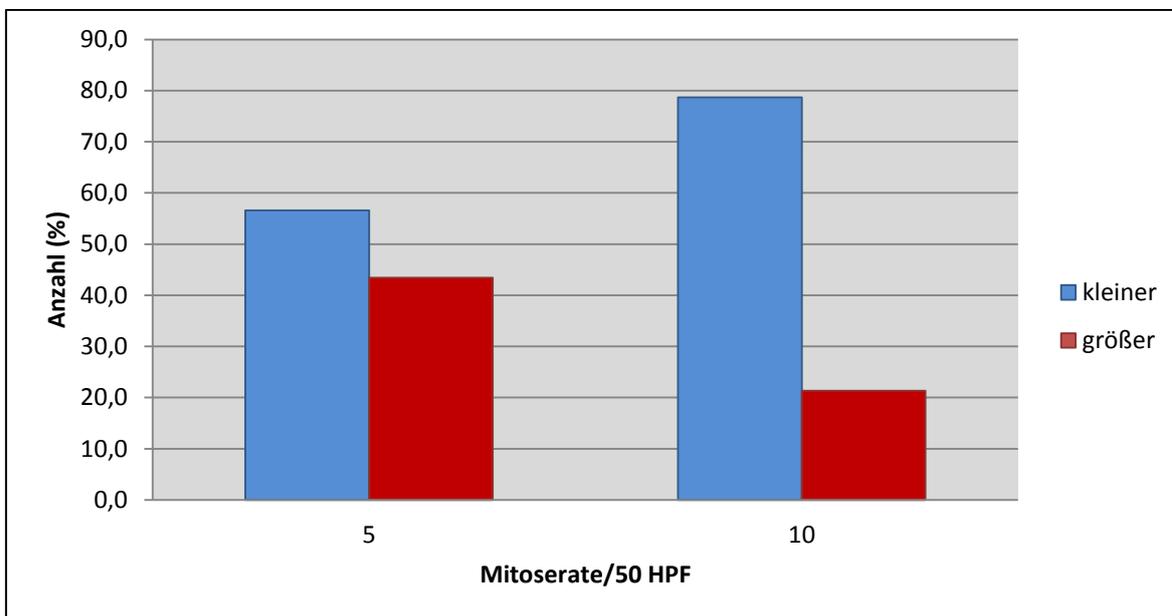


Abbildung 14: Mitoserate der Primärtumore von $n_{\text{total}}=122$ Patienten als Säulendiagramm. Wie im linken Säulenpaar dargestellt, zeigen bei Diagnosestellung 43,4% (rote Säule, linkes Paar) eine Mitoserate von $>5/50$ HPF. Das rechte Säulenpaar zeigt, dass bei 21,3% (rote Säule, rechtes Paar) der Patienten der GIST eine Mitoserate von $>10/50$ HPF aufweist. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

Bei 92,9% (n=118) der Patienten lag eine differenzierte histomorphologische Subtypisierung vor. In 83,1% (n=98) der Fälle war mikroskopisch ein spindelzelliges Aussehen zu erkennen, in 16,9% (n=20) waren die Tumoren von epitheloider Morphe. In 11,0% (n=14) der Patienten war makro- oder mikroskopisch eine Ulceration des Tumors zu erkennen. Ein teilweiser nekrotischer Zerfall des Gewebes fand sich in 6,2% (n=8) der Fälle.

3.6 Risikoklassifikation nach Fletcher (ROM)

Bei der Einteilung der Patienten in die von Fletcher et al. festgelegten Risikogruppen ergibt sich für das Kollektiv dieser Studie folgende Verteilung:

Es konnten 12,6% (n=16) in die Gruppe „Very Low Risk“ eingeordnet und 27,6% (n=35) in „Low-Risk“. Weitere 22,8% (n=29) wurden der Gruppe „Intermediate Risk“ und 37% (n=47) der Gruppe „High-Risk“ zugeordnet (siehe Abbildung 15).

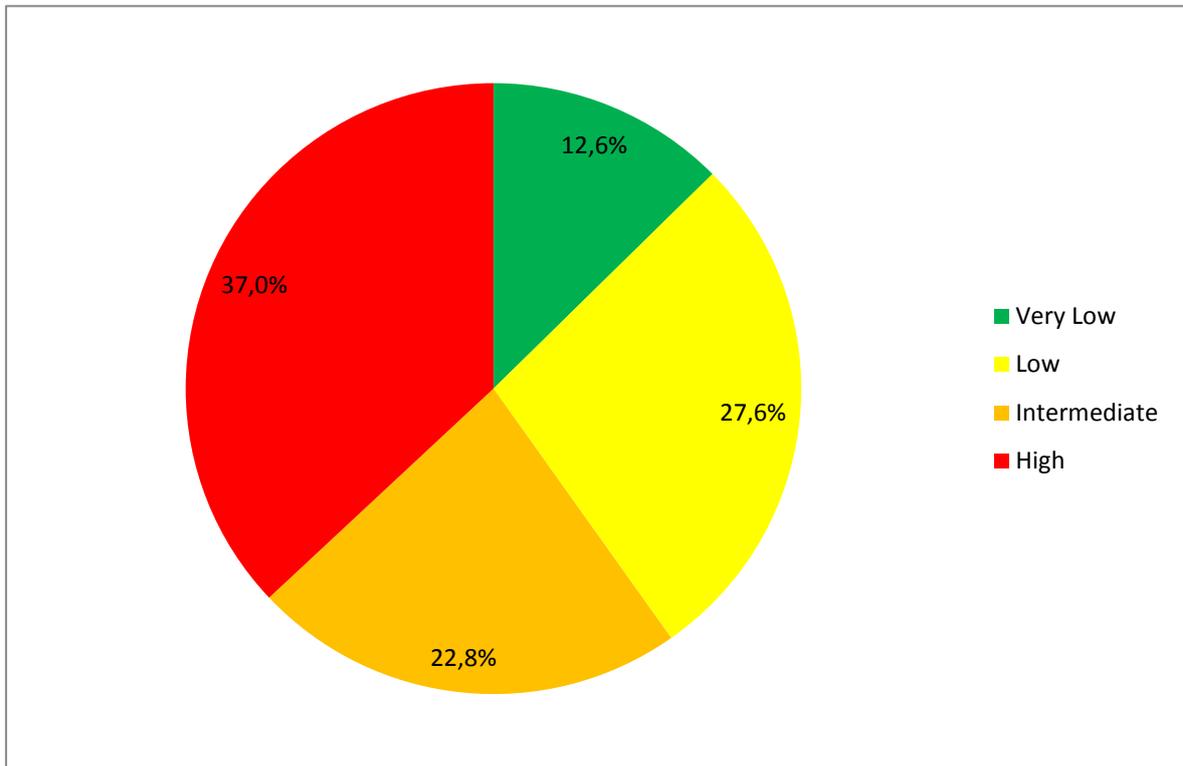


Abbildung 15: Risikoverteilung nach Fletcher et al. [33] als Säulendiagramm ($n_{\text{total}}=127$). Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

Wird die tumorspezifische Überlebenszeit (DSS) bei Patienten mit High-Risk-GIST den Tumoren sämtlicher anderen Risikogruppen (Very Low, Low, Intermediate) gegenübergestellt, ergibt sich ein hoch signifikanter Zusammenhang ($p<0,001$) zwischen tumorspezifischem Überleben (DSS) und dem Vorliegen einer High-Risk Konstellation. So findet sich bei High-Risk-GIST ein tumorspezifisches Überleben nach 1 Jahr von 89,9%, nach 3 Jahren von 69,2% und nach 5 Jahren von 65,5%. In den Gruppen mit niedrigem oder intermediärem Risiko zeigt sich eine 1- und 3-Jahres-Überlebensrate von 98,1%, nach 5 Jahren eine Überlebensrate von 95,6% (siehe Abbildung 16).

Die Odds Ratio für einen tumorbedingten Tod betrug für die Gruppe „High-risk“ in Relation zur Gruppe „Non-High-Risk“ 16,54 mit einem 95%-Konfidenzintervall von [3,56; 76,91], das Risiko eines tumorbedingten Todes in Gruppe „High-Risk“ ist damit statistisch gesehen in etwa 16fach erhöht (siehe Tabelle 8).

Noch deutlicher zeigt sich ein erhöhtes Risiko für Rezidiv/Metastase in Gruppe „High-Risk“. Die Odds Ratio beträgt hier 31,11 mit einem 95%-Konfidenzintervall von [8,42; 114,98]. Metastasen oder Rezidive sind damit in der Gruppe „High-Risk“ etwa um Faktor 31 häufiger als in der Gruppe der „Non-High-Risk“ Patienten.

Es bestätigt sich, dass Patienten der Gruppe „High-Risk“ ein signifikant höheres Risiko aufweisen, ein Rezidiv oder eine Metastase zu erleiden. Bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung gelten in der Gruppe „High-Risk“ lediglich 67,5% der Patienten als tumorfrei, so dass die Darstellung nach Kaplan-Meier hier bereits einen ersten Drop anzeigt (siehe Abbildung 17). Die Wahrscheinlichkeit eines ereignisfreien (tumorfreien) Überlebens für Patienten mit High-Risk GIST liegt in unserem Kollektiv nach 1 Jahr bei 58,4%, nach 3 Jahren bei 52,3%, nach 5 Jahren bei 44,7%. Alle anderen Patienten („Very Low“, „Low“, „Intermediate“ sind nach 1, 3 bzw. 5 Jahren mit einer Wahrscheinlichkeit von 95,6% tumorfrei. Es ergibt sich ein hoch signifikanter Unterschied $p < 0,001$ (High-Risk vs. Non-High-Risk).

Tabelle 8: Krankheitsspezifisches Überleben („DSS“) und krankheitsfreies Überleben („DFS“) nach 1, 3 und 5 Jahren, jeweils in Abhängigkeit von der Einteilung in „High Risk“ und „Non-High Risk“ nach Fletcher et al. Zusätzlich angegeben wurde das Quotenverhältnis (Odds Ratio) incl. 95%-Konfidenzintervall, bei einer Einordnung in die Gruppe „High Risk“ tumorbedingt zu versterben oder Rezidiv/Metastasierung zu erleiden ($n_{\text{total}}=127$). Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

	DSS (%)		DFS (%)	
	High-Risk	Non-High-Risk	High-Risk	Non-High-Risk
1-a-DSS/DFS	89,9	98,1	58,4	95,6
3-a-DSS/DFS	69,2	98,1	52,3	95,6
5-a-DSS/DFS	65,5	95,6	44,7	95,6
OR	16,54 [3,56; 76,91]		31,11 [8,42; 114,98]	
Log-Rank-Test	$p < 0,001$		$p < 0,001$	

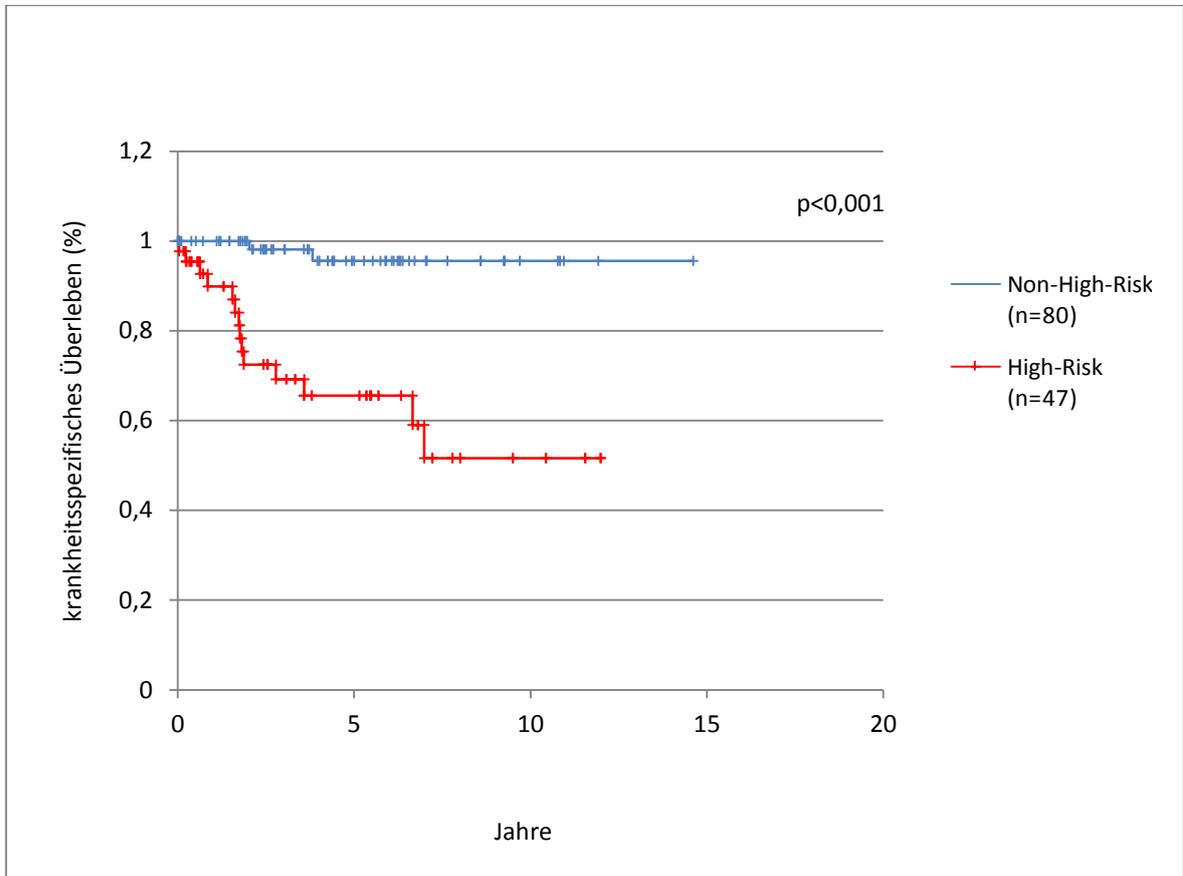


Abbildung 16: Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen Überlebens (**DSS**) für Patienten mit hohem Risiko („High-Risk“) vs. sämtliche andere Risikogruppen („Non-High-Risk“) ($n_{\text{total}}=127$). Nach 5 Jahren zeigt sich eine deutliche Divergenz der Kurven, die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit High-Risk-GIST liegt bei 65,5%. Von Patienten mit Non-High-Risk-GIST sind nach 5 Jahren noch 95,6% am Leben. Bei einem p-Wert von $<0,001$ ist der Unterschied statistisch hoch signifikant. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

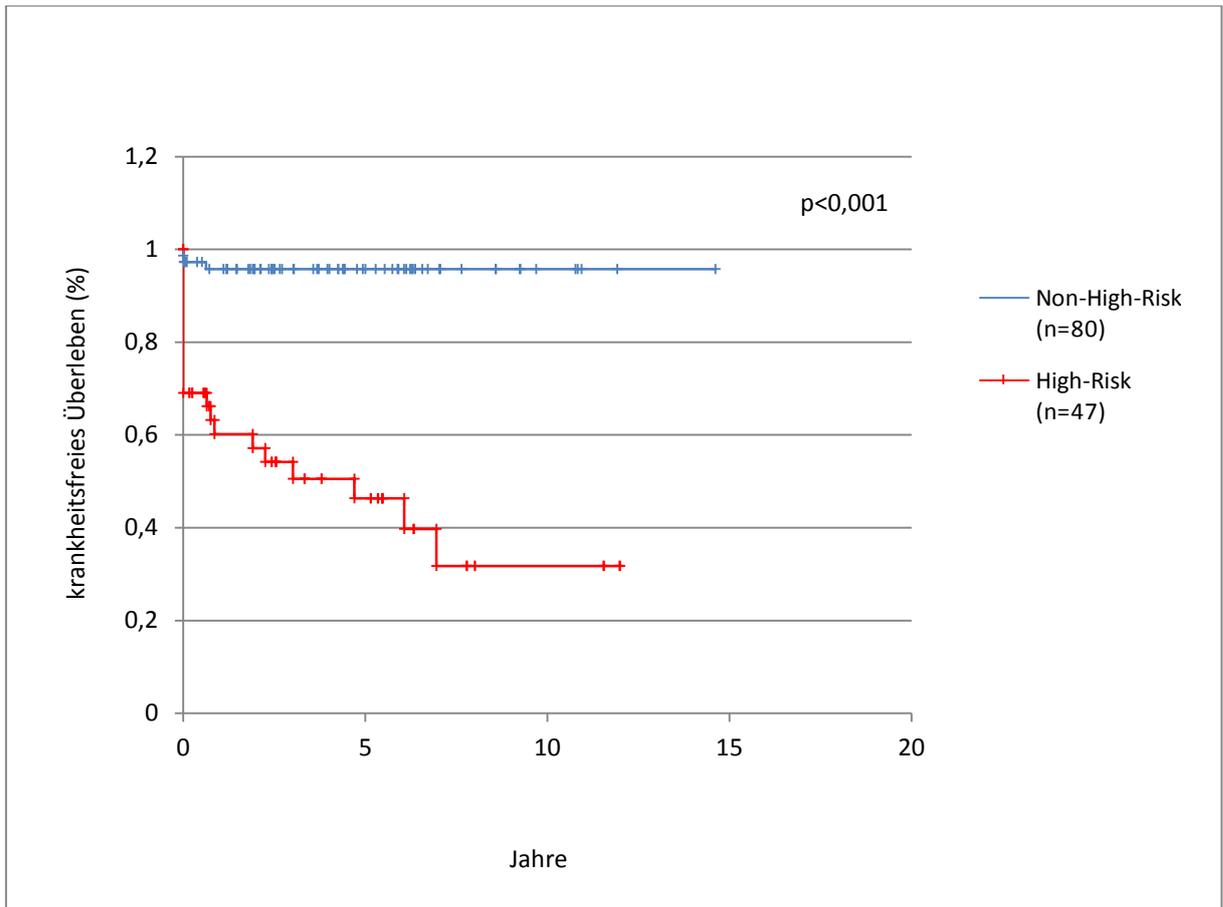


Abbildung 17: Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens (**DFS**) für Patienten mit hohem Risiko („High-Risk“) vs. sämtliche andere Risikogruppen („Non-High-Risk“) ($n_{\text{total}}=127$). Die initiale Divergenz der Kurven zum Zeitpunkt 0 ist durch eine bereits bei Diagnosestellung vorliegende Metastasierung bei etwa 30% der High-Risk-Patienten zu erklären, welche somit bereits per definitionem bei Aufnahme in das Register als nicht-tumorfrei gelten. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

3.7 Immunhistochemie

Im Rahmen der Erhebung wurden die verfügbaren immunhistochemischen Parameter erfasst. Im Folgenden werden diese nun einzeln dargestellt (siehe Abbildung 18).

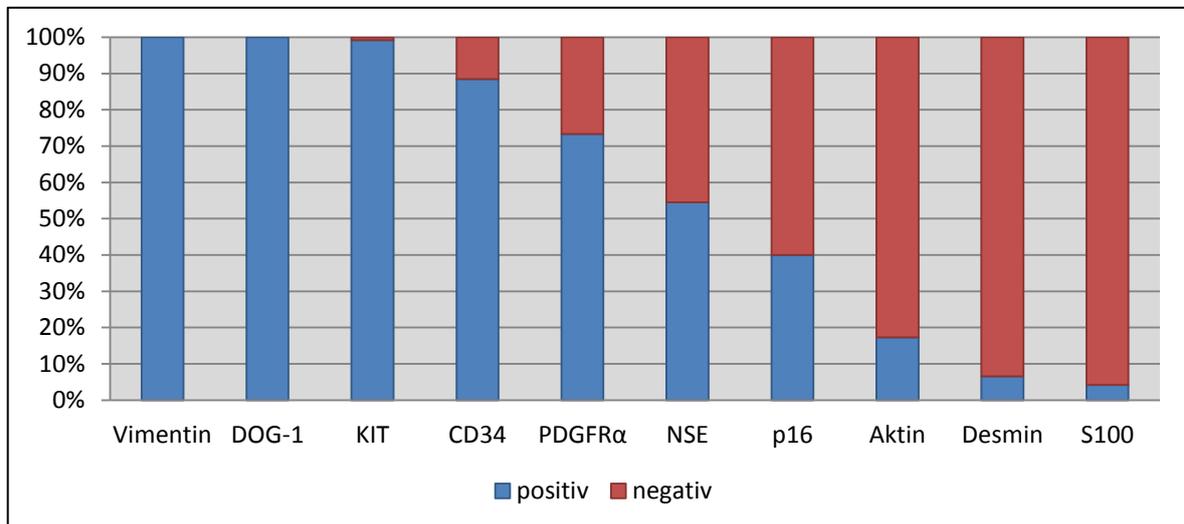


Abbildung 18: Gestapeltes Säulendiagramm der erhobenen immunhistochemischen Parameter mit prozentalem Anteil von positiven (blau) und negativen (rot) Ergebnissen. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

3.7.1 KIT und PDGFR α

Bei 92,9% ($n_{\text{total}}=118$) der Patienten wurden Daten zur Expression von KIT eindeutig dokumentiert. Davon waren 99,2% ($n=117$) der Proben positiv für KIT. Allein 0,8% ($n=1$) war negativ.

Für den Marker PDGFR α waren von $n_{\text{total}}=15$ Patienten Ergebnisse verfügbar. In 73,3% ($n=11$) der Fälle konnte dabei PDGFR α immunhistochemisch nachgewiesen werden, in 26,7% ($n=4$) der Proben nicht.

3.7.2 CD34

Eine Expression von CD34 ($n_{\text{total}}=95$) fand sich in 88,4% ($n=84$) der Tumore, in 11,6% ($n=11$) war diese nicht nachweisbar. Bei GIST des Magens war CD34 in 97,9% ($n=47$) nachweisbar, bei GIST des Dünndarmes in 80,0% ($n=24$). Im Log-Rank-Test fand sich kein signifikanter Einfluss einer immunhistochemischen Expression von CD34 auf das

Gesamtüberleben (DSS) ($p=0,166$). Für das krankheitsfreie Überleben (DFS) zeigte sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,295$).

3.7.3 p16

Von $n_{\text{total}}=90$ Patienten lagen Daten zum Färbeverhalten von p16 vor. Dabei wurde eine Anfärbung von mehr als 10% der Zellen als positiv gewertet. In 40% ($n=36$) fand sich p16-Positivität, 60% ($n=54$) waren negativ. Im Log-Rank-Test fand sich sowohl für das Gesamtüberleben ($p=0,822$) als auch für das krankheitsfreie Überleben ($p=0,725$) in den beiden Gruppen kein statistisch signifikanter Einfluss einer Positivität von p16.

3.7.4 Muskelzellmarker

Aktin konnte bei 17,3% ($n=14$) der Tumore immunhistochemisch nachgewiesen werden, negativ waren 82,7% ($n=67$) des untersuchten Subkollektivs. ($n_{\text{total}}=81$).

Ähnliche Zahlen fanden sich für das Intermediärfilament Desmin ($n_{\text{total}}=61$). In 6,6% ($n=4$) konnte dies mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden, in 93,4% ($n=57$) waren die untersuchten Proben negativ.

Von $n_{\text{total}}=40$ Patienten lagen auch Daten über das Vorhandensein von Vimentin vor. In 100% ($n=40$) fand sich hier ein positiver Befund.

3.7.5 S100

Für $n_{\text{total}}=71$ Patienten konnte das Färbeverhalten von S100 dokumentiert werden. 95,8% ($n=68$) der Tumore waren negativ, lediglich 4,2% ($n=3$) waren positiv für diesen Marker.

3.7.6 NSE

Ein homogenes Bild zeichnete sich für die neuronenspezifische Enolase. Bei geringer Fallzahl ($n_{\text{total}}=11$), waren 54,5% ($n=6$) Patientenproben immunhistochemisch positiv und 45,5% ($n=5$) negativ.

3.7.7 DOG-1

Immunhistochemische Ergebnisse für den den Marker DOG-1 lagen lediglich in $n_{\text{total}}=2$ Patienten vor. In beiden GIST und somit in 100% konnte DOG-1 immunhistochemisch nachgewiesen werden.

3.8 Mutationsanalytik und spezielle Überlebenszeitanalysen

Für $n=127$ Patienten wurde eine Mutationsanalytik der häufigsten Exons von c-kit und PDGFR α durchgeführt bzw. aus vorhandenen Daten entnommen. Wenn sich in der Sequenzierung der bekannten Exons von c-kit und PDGFR α keine Mutation detektieren ließ, dann wurde der Tumor definitionsgemäß als Wildtyp gewertet. Es ergab sich die folgende Verteilung:

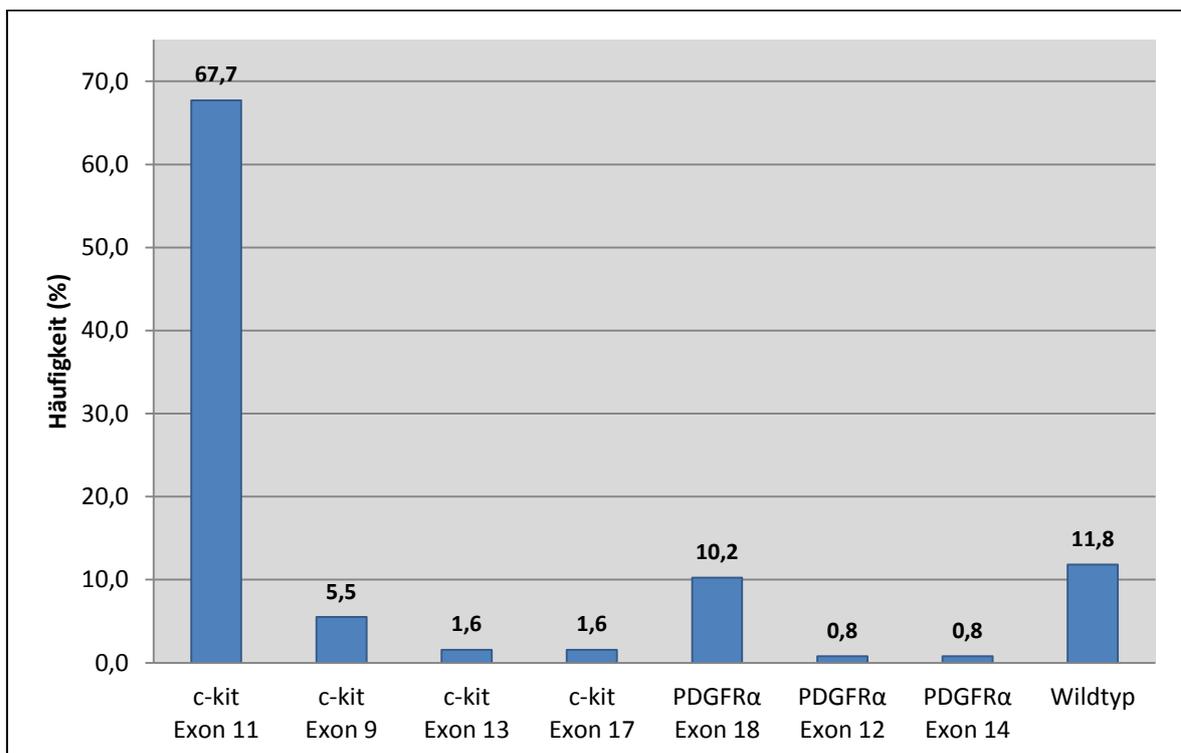


Abbildung 19: Säulendiagramm der Häufigkeit des Auftretens der Mutationen von $n_{\text{total}}=127$ Patienten. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

Bei 88,2% ($n=112$) der Patienten fand sich eine Mutation in den bekannten Exons von c-kit oder PDGFR α . 11,8% ($n=15$) wurden als Wildtyp klassifiziert. Mit einer Frequenz von 67,7% ($n=86$) fanden sich am häufigsten Mutationen in c-kit Exon 11. Am zweithäufigsten

ergaben sich mit 10,2% (n=13) Veränderungen in PDGFR α Exon 18, gefolgt von der Wildtypsequenz mit 11,8%. Mutationen in c-kit Exon 9 waren in 5,5% (n=7) und in c-kit Exon 13 oder 17 in 1,6% (n=2) der Patienten apparent. In je 0,8% (n=1) fanden sich Mutationen in PDGFR α Exon 12 oder 14 (siehe Abbildung 19).

3.8.1 Vergleich Mutation vs. Wildtyp

Zunächst wurde anhand n=127 Patienten untersucht, ob das Auftreten einer Mutation - ganz gleich welchen Typs - im Vergleich zum Vorliegen einer Wildtyp-Sequenz einen eigenständigen Risikofaktor darstellt (siehe Tabelle 9). Bei Patienten mit Wildtyp-GIST fand sich nach 1, 3 und 5 Jahren ein Überleben von 91,7% der Patienten. War eine Mutation in einem der Exons von c-kit oder PDGFR α nachgewiesen worden, fand sich eine 1-Jahres-Überlebensrate von 96,9% und eine 3-Jahres-Überlebensrate von 86,6%. Nach 5 Jahren fand sich bei Patienten mit Mutation eine Überlebensrate von 83,1%. Im Log-Rank-Test errechnet sich ein p-Wert von p=0,433, statistisch ergibt sich somit kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 20).

Für das Auftreten von Metastasen zeigte sich ein ähnliches Bild. Nach 1, 3 und 5 Jahren waren von den n=15 Patienten mit Wildtyp-GIST jeweils zwei Drittel (66,7%) tumorfrei. Bei Patienten mit einer detektierten Mutation lag diese Rate nach 1 Jahr bei 80,2%, nach 3 Jahren bei 77,5% und nach 5 Jahren mit 73,6% auf ähnlichem Niveau wie bei Wildtyp-Patienten. Bei p=0,202 findet sich auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied.

Tabelle 9: Krankheitsspezifisches Überleben („DSS“) und krankheitsfreies Überleben („DFS“) nach 1, 3 und 5 Jahren, jeweils in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer Mutation oder dem Vorliegen eines Wildtyps (n_{total}=127). Zusätzlich angegeben wurde das Quotenverhältnis (Odds Ratio) incl. 95%-Konfidenzintervall, bei einer Einordnung in die Gruppe „Mutation“ tumorbedingt zu versterben oder Rezidiv/Metastasierung zu erleiden. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

	DSS (%)		DFS (%)	
	Mutation	Wildtyp	Mutation	Wildtyp
1-a-DSS/DFS	96,9	91,7	80,2	66,7
3-a-DSS/DFS	86,6	91,7	77,5	66,7
5-a-DSS/DFS	83,1	91,7	73,6	66,7
OR	2,165 [0,265; 17,686]		1,603 [0,329; 7,808]	
Log-Rank-Test	p=0,433		p=0,202	

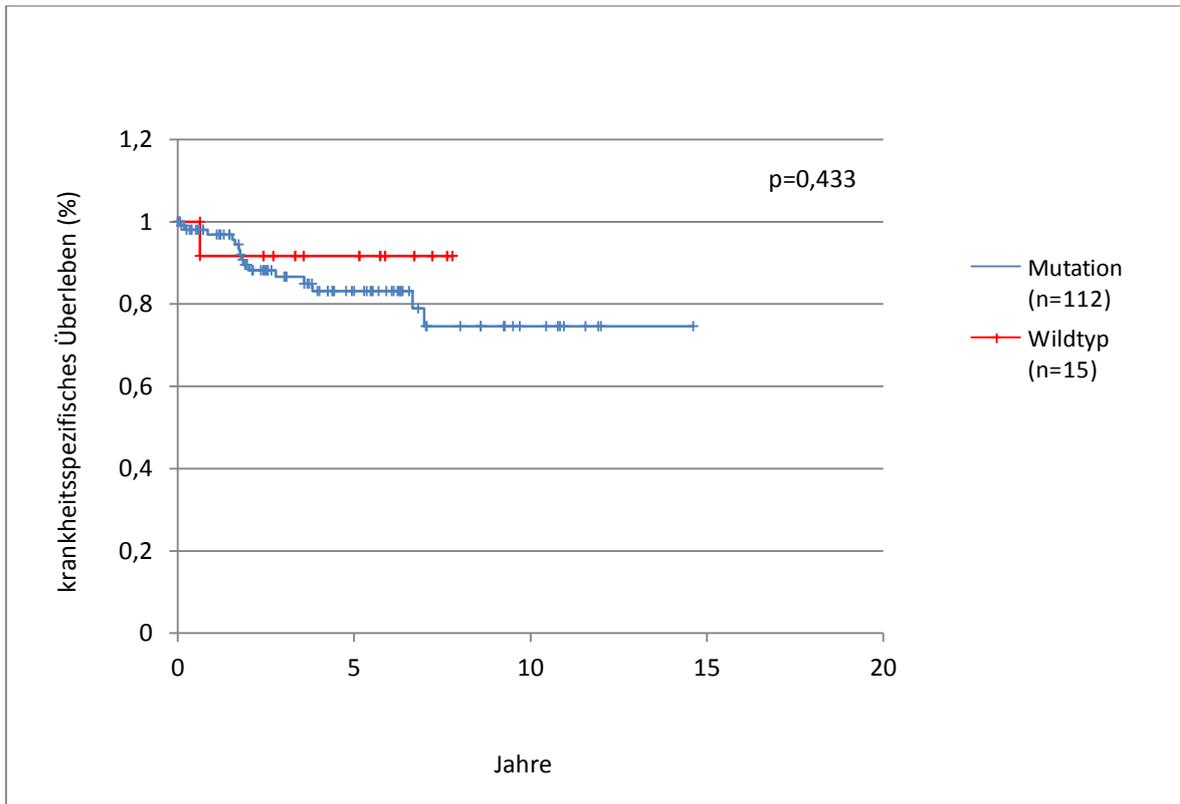


Abbildung 20: Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) für Patienten mit nachgewiesener Mutation in einem der sequenzierten Exone von c-kit oder PDGFR α („Mutation“) in Gegenüberstellung zu Patienten mit Wildtyp-Sequenz („Wildtyp“) ($n_{\text{total}}=127$). Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

3.8.2 Vergleich c-kit vs. non-c-kit

Untersucht wurden insgesamt $n=127$ Patienten. Bei Patienten ohne Mutation in c-kit ergab sich nach 1, 3 und 5 Jahren ein Überleben von 96,0%. War hingegen eine Mutation in c-kit nachgewiesen worden, fand sich eine 1-Jahres-Überlebensrate von 96,4%, eine 3-Jahres-Überlebensrate von 84,9% und eine 5-Jahres-Überlebensrate von 81,0%. Im Log-Rank-Test errechnet sich für den Unterschied ein p-Wert von $p=0,113$ (siehe Abbildung 21). Für das Auftreten von Metastasen zeigt sich ein ähnliches Bild. Nach 1 Jahr waren von den Patienten ohne Mutation in c-kit 95,7% tumorfrei, nach 3 Jahren 90,6% und nach 5 Jahren 90,6%. Bei den Patienten mit Mutation in c-kit lag diese Rate nach 1 Jahr bei 78,6%, nach 3 Jahren bei 77,1% und nach 5 Jahren bei 73,0%. Mit $p=0,202$ liegt auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied vor.

Tabelle 10: Krankheitsspezifisches Überleben (DSS) und krankheitsfreies Überleben (DFS) nach 1, 3 und 5 Jahren. Verglichen wurde das Vorliegen einer Mutation in c-kit („c-kit“) mit dem Rest des Kollektivs ohne Mutation in c-kit („non-c-kit“) ($n_{\text{total}}=127$). Zusätzlich angegeben wurde das Quotenverhältnis (Odds Ratio) incl. 95%-Konfidenzintervall, bei einer Einordnung in die Gruppe „c-kit“ tumorbedingt zu versterben oder Rezidiv/Metastasierung zu erleiden. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

	DSS (%)		DFS (%)	
	c-kit	non-c-kit	c-kit	non-c-kit
1-a-DSS/DFS	96,4	96,0	78,6	95,7
3-a-DSS/DFS	84,9	96,0	77,1	90,6
5-a-DSS/DFS	81,0	96,0	73,0	90,6
OR	5,305 [0,671; 41,959]		1,802 [0,560; 5,804]	
Log-Rank-Test	p=0,113		p=0,202	

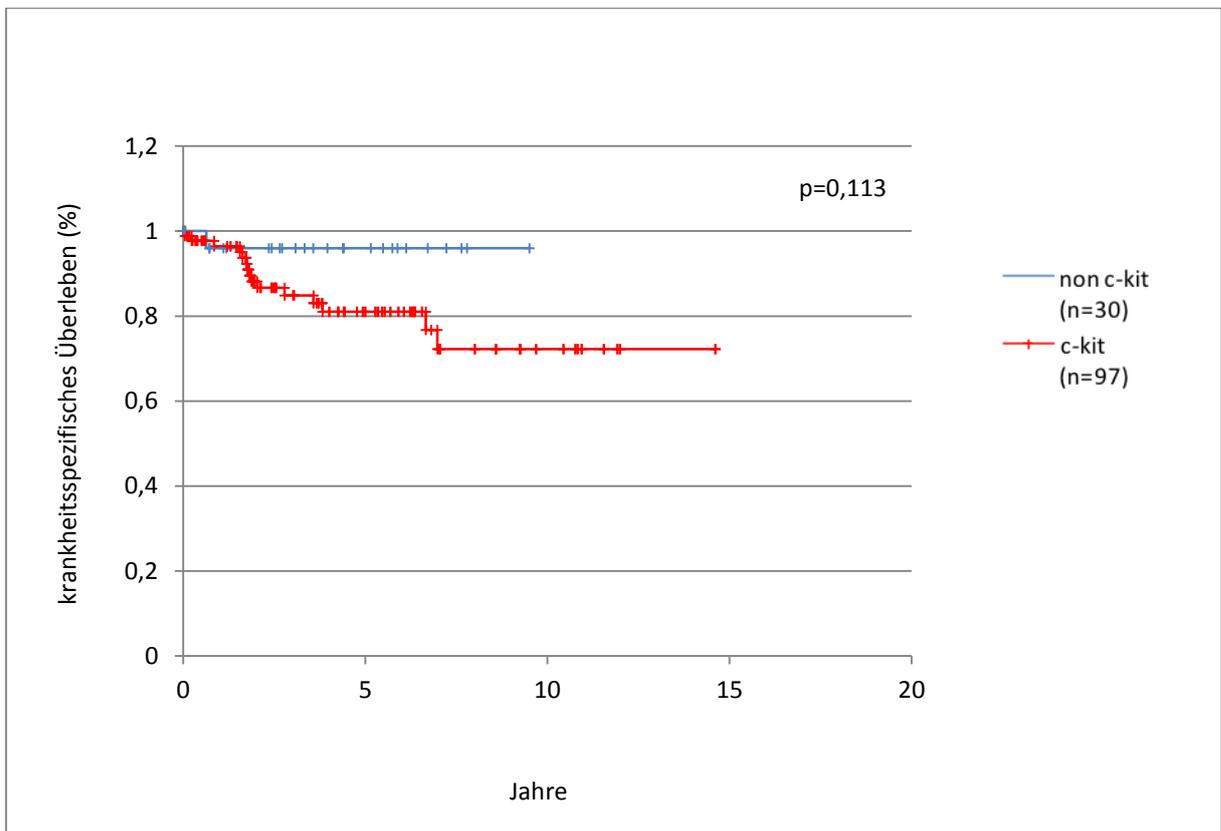


Abbildung 21: Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) für Patienten mit Mutationen in c-kit („c-kit“) im Vergleich zu Patienten ohne Mutation in c-kit („non-c-kit“) ($n_{\text{total}}=127$). Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

3.8.3 Vergleich PDGFR α vs. non-PDGFR α

Analog zum voranstehenden Punkt wurde bei n=127 Patienten in der Auswertung ein Zusammenhang zwischen Überleben bzw. Metastasierung/Rezidiv in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Mutation in PDGFR α gesucht. In der Kontrollgruppe ohne Mutation in PDGFR α zeigte sich nach 1 Jahr ein Überleben von 95,7%, nach 3 Jahren ein Überleben von 85,7% und nach 5 Jahren eine Überlebensrate von 82,3%. War dagegen eine Mutation in PDGFR α nachgewiesen worden, fand sich eine 1/3/5-Jahres-Überlebensrate von 100%, eine statistische Signifikanz ergibt sich aufgrund der mit n=15 geringen Fallzahl PDGFR α -positiver Patienten nicht, der errechnete p-Wert liegt bei p=0,155 (siehe Abbildung 22).

Für das Auftreten von Metastasen oder eines Rezidives zeigt sich: Nach 1 Jahr waren von n=111 Patienten der Vergleichsgruppe 80,9% tumorfrei, nach 3 Jahren 79,6% und nach 5 Jahren 76,0%. Bei den Patienten mit Mutation in PDGFR α lag diese Rate nach 1 Jahr bei 92,3% und nach 3 sowie 5 Jahren bei 82,1%. Bei einem im Log-Rank-Test berechneten p=0,579 ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Krankheitsspezifisches Überleben (DSS) und krankheitsfreies Überleben (DFS) nach 1, 3 und 5 Jahren. Verglichen wurde das Vorliegen einer Mutation in PDGFR α („PDGFR α^+ “) mit dem Rest des Kollektivs ohne Mutation in PDGFR α („non-PDGFR α^+ “) ($n_{\text{total}}=127$). Zusätzlich angegeben wurde das Quotenverhältnis (Odds Ratio) incl. 95%-Konfidenzintervall, bei einer Einordnung in die Gruppe „PDGFR α^+ “ tumorbedingt zu versterben oder Rezidiv/Metastasierung zu erleiden. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

	DSS (%)		DFS (%)	
	PDGFR α	non-PDGFR α	PDGFR α	non-PDGFR α
1-a-DSS/DFS	100	95,7	92,3	80,9
3-a-DSS/DFS	100	85,7	82,1	79,6
5-a-DSS/DFS	100	82,3	82,1	76,0
OR	0,856 [0,793; 0,924]		0,507 [0,106; 2,420]	
Log-Rank-Test	p=0,155		p=0,579	

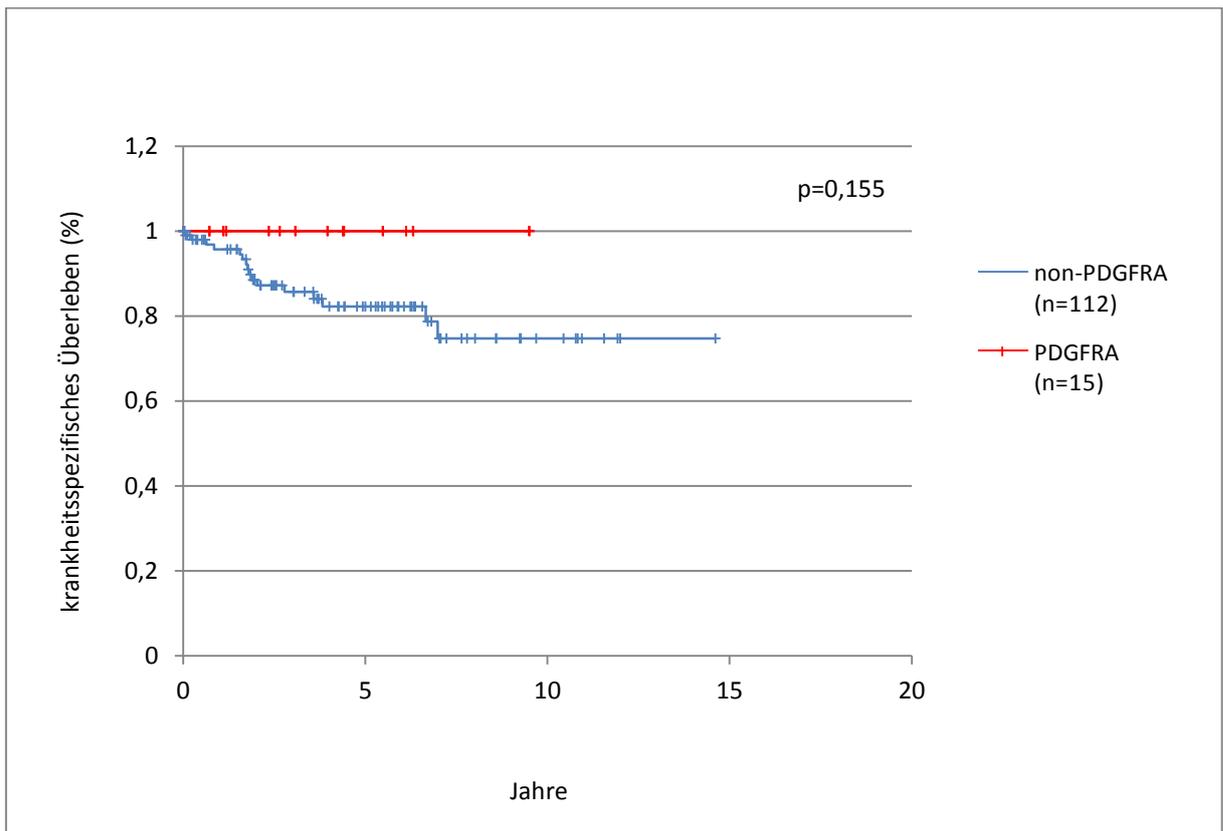


Abbildung 22: Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) für Patienten mit Mutationen in PDGFR α („PDGFR α^+ “) im Vergleich zu Patienten ohne Mutation in PDGFR α („non-PDGFR α^+ “) ($n_{\text{total}}=127$). Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

3.8.4 Vergleich c-kit vs. PDGFR α

Es wurde in einem Subkollektiv von n=112 Patienten das krankheitsspezifische Überleben (DSS) von Patienten mit nachgewiesener Mutation in c-kit und Patienten mit Mutation in PDGFR α untersucht. Für die c-kit-Gruppe fand sich eine Überlebensrate nach 1 Jahr von 96,4%, nach 3 Jahren von 84,9% und nach 5 Jahren von 81,0%. Erkrankte, deren GIST eine Veränderung in PDGFR α aufwies, zeigten nach 1, 3 und 5 Jahren jeweils ein Überleben von 100%. Mit einem p-Wert von 0,140 ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant (siehe Abbildung 23).

Ebenso wurde das krankheitsfreie Überleben (DFS) analysiert. Bei Patienten mit c-kit-mutierten GIST zeigten sich 1-, 3- und 5-Jahres-Raten eines krankheitsfreien Überlebens in 78,6%, 77,1% beziehungsweise 73,0%. Bei PDGFR α -mutierten GIST betrug DFS nach 1 Jahr 92,3% und nach 3 sowie 5 Jahren jeweils 82,1%. Eine statistische Signifikanz ist bei einem im Log-Rank-Test berechneten p-Wert von 0,444 nicht nachweisbar.

Tabelle 12: Krankheitsspezifisches Überleben (DSS) und krankheitsfreies Überleben (DFS) nach 1, 3 und 5 Jahren. Verglichen wurde das Vorliegen einer Mutation in c-kit („c-kit“) mit dem Vorliegen einer Mutation in PDGFR α („non-PDGFR α “) ($n_{\text{total}}=112$). Zusätzlich angegeben wurde das Quotenverhältnis (Odds Ratio) incl. 95%-Konfidenzintervall, bei einer Einordnung in die Gruppe „c-kit“ tumorbedingt zu versterben oder Rezidiv/Metastasierung zu erleiden. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

	DSS (%)		DFS (%)	
	c-kit	PDGFR α	c-kit	PDGFR α
1-a-DSS/DFS	96,4	100	78,6	92,3
3-a-DSS/DFS	84,9	100	77,1	82,1
5-a-DSS/DFS	81,0	100	73,0	82,1
OR	0,835 [0,764; 0,912]		2,091 [0,435; 10,054]	
Log-Rank-Test	p=0,140		p=0,444	

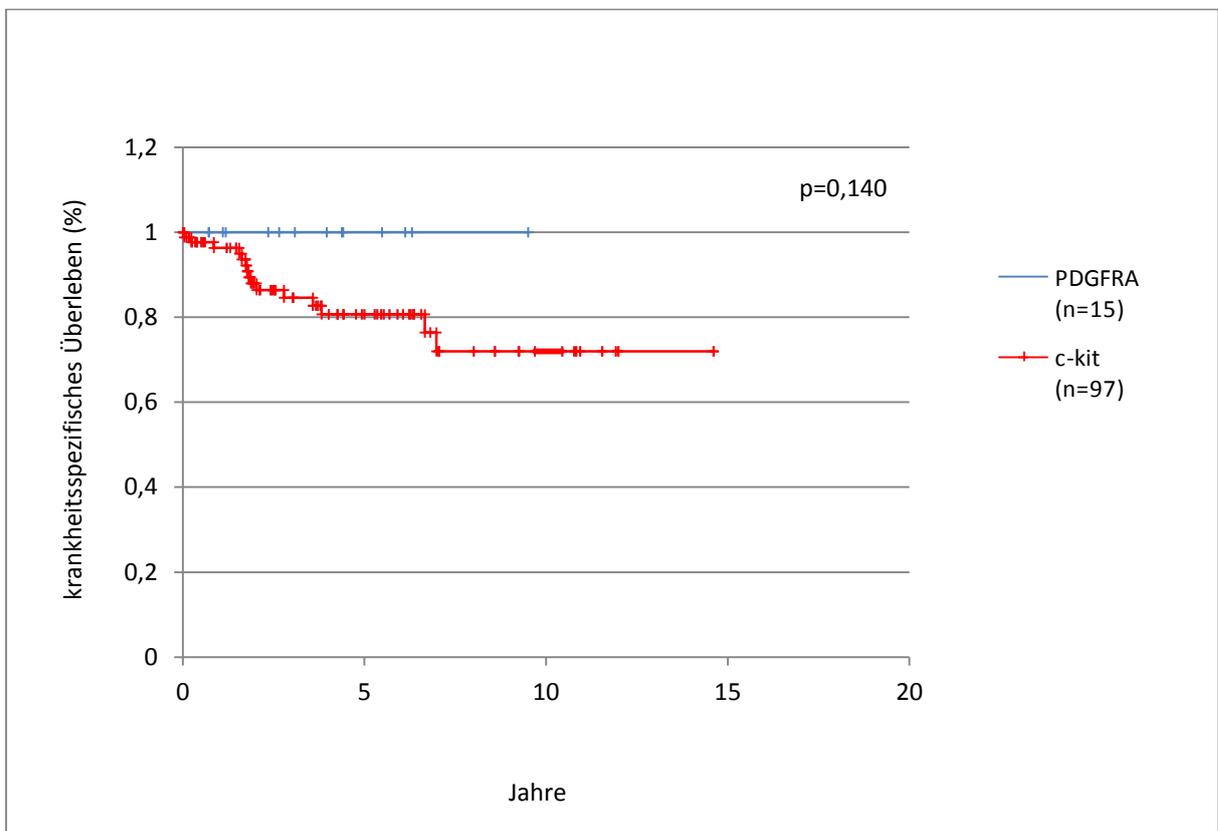


Abbildung 23: Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) für Patienten mit Mutationen in PDGFR α („PDGFR α “) im Vergleich zu Patienten mit Mutation in c-kit („c-kit“) ($n_{\text{total}}=112$). Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

3.8.5 Vergleich c-kit vs. Wildtyp

Untersucht wurde anhand eines Subkollektivs von n=112 Patienten das krankheitsspezifische Überleben (DSS) mit Mutation in c-kit im Vergleich mit Patienten mit der c-kit Wildtyp-Sequenz. In der Gruppe mit nachgewiesener Mutation in c-kit zeigte sich eine 1-Jahres-Überlebensrate von 96,4%, nach 3 Jahren betrug diese 84,9% und nach 5 Jahren 81,0%. Bei an Wildtyp-GIST erkrankten Patienten ergab sich eine Überlebensrate nach 1,3 und 5 Jahren von 91,7%. Eine statistische Signifikanz lässt sich mit einem p-Wert von 0,362 nicht nachweisen (siehe Abbildung 24).

Das krankheitsfreie Überleben (DFS) lag bei Patienten mit c-kit-Mutation nach 1 Jahr bei 78,6%, nach 3 Jahren bei 77,1 % und nach 5 Jahren bei 73,0%. Patienten mit Wildtyp-Sequenz waren nach 1,3 und 5 Jahren zu jeweils 66,7% tumorfrei. Auch hier ergibt sich mit $p=0,194$ statistisch keine Signifikanz.

Tabelle 13: Krankheitsspezifisches Überleben (DSS) und krankheitsfreies Überleben (DFS) nach 1, 3 und 5 Jahren. Verglichen wurde das Vorliegen einer Mutation in c-kit („c-kit“) mit dem Vorliegen eines Wildtyps ohne Mutation in einem der sequenzierten Exons ($n_{\text{total}}=112$). Zusätzlich angegeben wurde das Quotenverhältnis (Odds Ratio) incl. 95%-Konfidenzintervall, bei einer Einordnung in die Gruppe „c-kit“ tumorbedingt zu versterben oder Rezidiv/Metastasierung zu erleiden. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

	DSS (%)		DFS (%)	
	c-kit	Wildtyp	c-kit	Wildtyp
1-a-DSS/DFS	96,4	91,7	78,6	66,7
3-a-DSS/DFS	84,9	91,7	77,1	66,7
5-a-DSS/DFS	81,0	91,7	73,0	66,7
OR	0,390 [0,048; 3,195]		0,583 [0,119; 2,858]	
Log-Rank-Test	p=0,362		p=0,194	

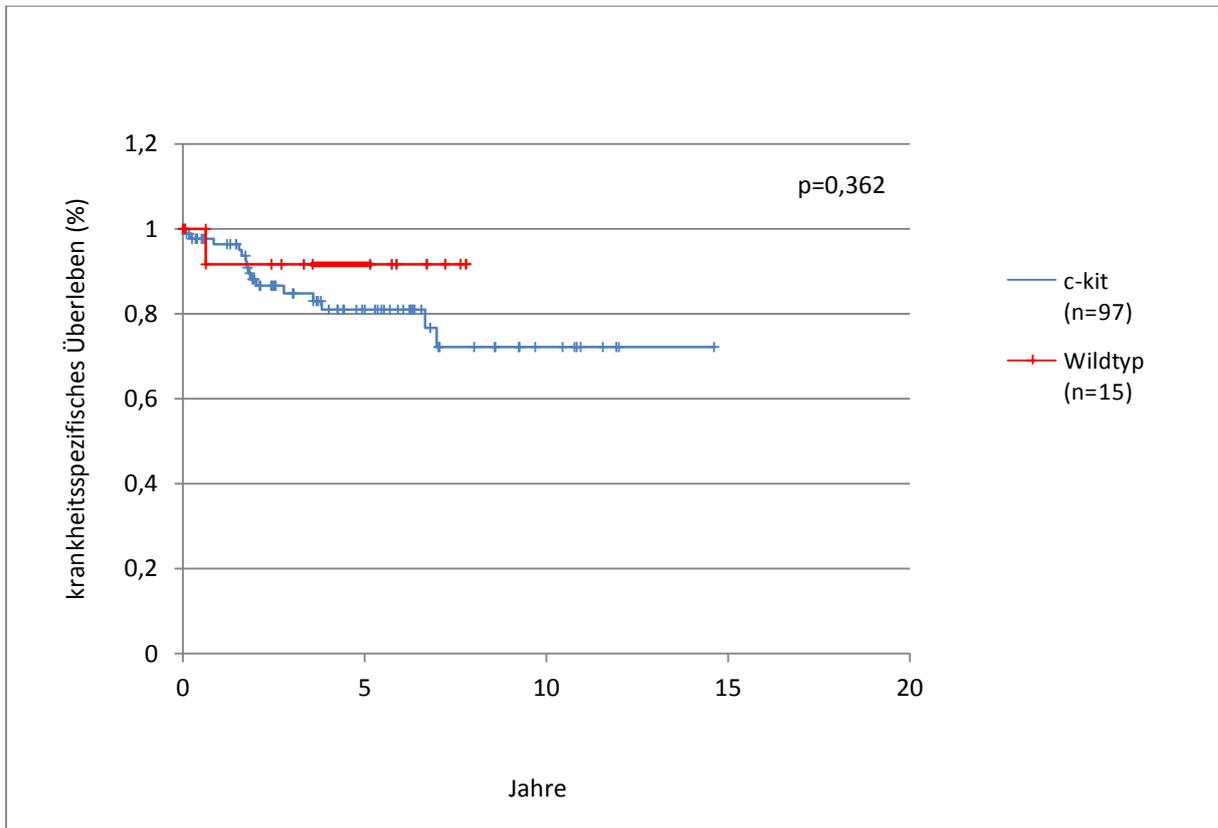


Abbildung 24: Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) für Patienten mit Mutationen in c-kit („c-kit“) im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp-Sequenz („Wildtyp“) ($n_{\text{total}}=112$). Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

3.8.6 Vergleich PDGFR α vs. Wildtyp

Analog dazu wurde eine Subkollektiv von n=30 Patienten mit genetischer Veränderung in PDGFR α mit Wildtyp-GIST verglichen. Für PDGFR α -mutierte GIST ergab sich bei eingeschränkter Beurteilbarkeit aufgrund geringer Fallzahl ein krankheitsspezifisches Überleben (DSS) von 100% nach 1, 3 und 5 Jahren. Für Wildtyp-GIST lag dieses jeweils bei 91,7%. Der p-Wert dieser Untersuchung ist mit p=0,280 nicht signifikant (siehe Abbildung 25).

Das krankheitsfreie Überleben (DFS) lag für die Gruppe mit Mutationen in PDGFR α nach 1 Jahr bei 92,3% sowie nach 3 und 5 Jahren bei je 82,1%. Bei Wildtyp-GIST waren nach 1, 3 und 5 Jahren jeweils 66,7% der Patienten tumorfrei. Ein statistisch signifikanter Unterschied ergibt sich mit p=0,152 auch hier nicht.

Tabelle 14: Krankheitsspezifisches Überleben (DSS) und krankheitsfreies Überleben (DFS) nach 1, 3 und 5 Jahren. Verglichen wurde das Vorliegen einer Mutation in PDGFR α („PDGFR α “) mit dem Vorliegen eines Wildtyps ohne Mutation in einem der sequenzierten Exons ($n_{\text{total}}=30$). Zusätzlich angegeben wurde das Quotenverhältnis (Odds Ratio) incl. 95%-Konfidenzintervall, bei einer Einordnung in die Gruppe „PDGFR α “ tumorbedingt zu versterben oder Rezidiv/Metastasierung zu erleiden. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

	DSS (%)		DFS (%)	
	PDGFR α	Wildtyp	PDGFR α	Wildtyp
1-a-DSS/DFS	100	91,7	92,3	66,7
3-a-DSS/DFS	100	91,7	82,1	66,7
5-a-DSS/DFS	100	91,7	82,1	66,7
OR	0,467 [0,318; 0,684]		1,200 [0,142; 10,119]	
Log-Rank-Test	p=0,280		p=0,152	

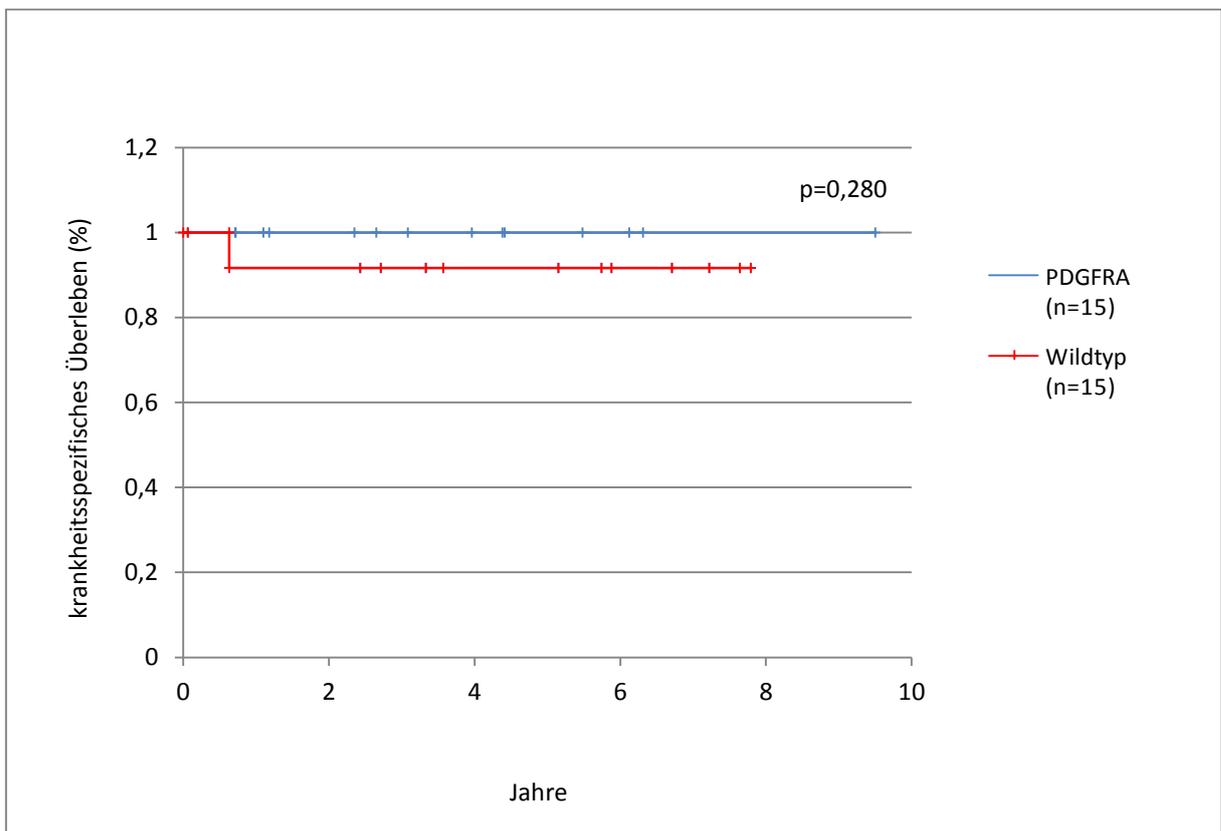


Abbildung 25: Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) für Patienten mit Mutationen in PDGFR α („PDGFR α “) im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp-Sequenz („Wildtyp“) ($n_{\text{total}}=30$). Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

3.8.7 Vergleich c-kit vs. non-c-kit in High-Risk-GIST

In einer weiteren Untersuchung wurde ein Subkollektiv untersucht, welches sich aus n=44 Patienten zusammensetzte, die nach Fletcher et al. als High-Risk GIST zu bezeichnen waren. Patienten mit „Very Low Risk“, „Low Risk“ oder „Intermediate Risk“ GIST wurden nicht mit einbezogen.

Es zeigte sich in Bezug auf das krankheitsspezifische Überleben (DSS) ein statistisch nicht signifikanter Unterschied. Bei High-Risk-Patienten mit Mutationen in c-kit fand sich eine 1-Jahres-Überlebensrate von 90,6%, eine 3-Jahre-Überlebensrate von 63,4% und eine 5-Jahres-Überlebensrate von 58,9%. In der Gruppe von High-Risk-Patienten ohne Nachweis einer Mutation in c-Kit lebten nach 1, 3 bzw. 5 Jahren noch 88,9% der Patienten. Bei einem p-Wert von 0,180 findet sich lediglich eine Tendenz in Richtung eines früheren tumorbedingten Todes bei Mutationen in c-kit bei High-Risk-GIST. Das statistische Signifikanzniveau wird jedoch nicht erreicht (siehe Abbildung 26).

Bei der Untersuchung des krankheitsfreien Überlebens (DFS) ohne Rezidiv und/oder Metastasierung zeigt sich eine ähnliche Verteilung. High-Risk-Patienten mit Mutationen in c-kit sind nach 1 Jahr zu 50,8%, nach 3 Jahren zu 46,9% und nach 5 Jahren zu 36,9% tumorfrei. In der Gruppe von High-Risk-Patienten ohne Mutation in c-kit sind dies nach 1 Jahr 87,5% und nach 3 bzw. 5 Jahren zu 72,9%. Mit einem p-Wert von 0,176 besteht keine statistische Signifikanz.

Tabelle 15: Krankheitsspezifisches Überleben (DSS) und krankheitsfreies Überleben (DFS) nach 1, 3 und 5 Jahren. Eingeschlossen wurden ausschließlich Patienten, deren Tumor nach Fletcher et al. als „High-Risk-GIST“ einzustufen war ($n_{\text{total}}=44$). Verglichen wurde das Vorliegen einer Mutation in c-kit („c-kit HR“) mit dem Rest des Kollektivs ohne Mutation in c-kit („non-c-kit HR“). Zusätzlich angegeben wurde das Quotenverhältnis (Odds Ratio) incl. 95%-Konfidenzintervall, bei einer Einordnung in die Gruppe „c-kit HR“ tumorbedingt zu versterben oder Rezidiv/Metastasierung zu erleiden. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

	DSS (%)		DFS (%)	
	c-kit HR	non-c-kit HR	c-kit HR	non-c-kit HR
1-a-DSS/DFS	90,6	88,9	50,8	87,5
3-a-DSS/DFS	63,4	88,9	46,9	72,9
5-a-DSS/DFS	58,9	88,9	36,9	72,9
OR	4,875 [0,555; 42,844]		1,923 [0,434; 8,522]	
Log-Rank-Test	p=0,108		p=0,176	

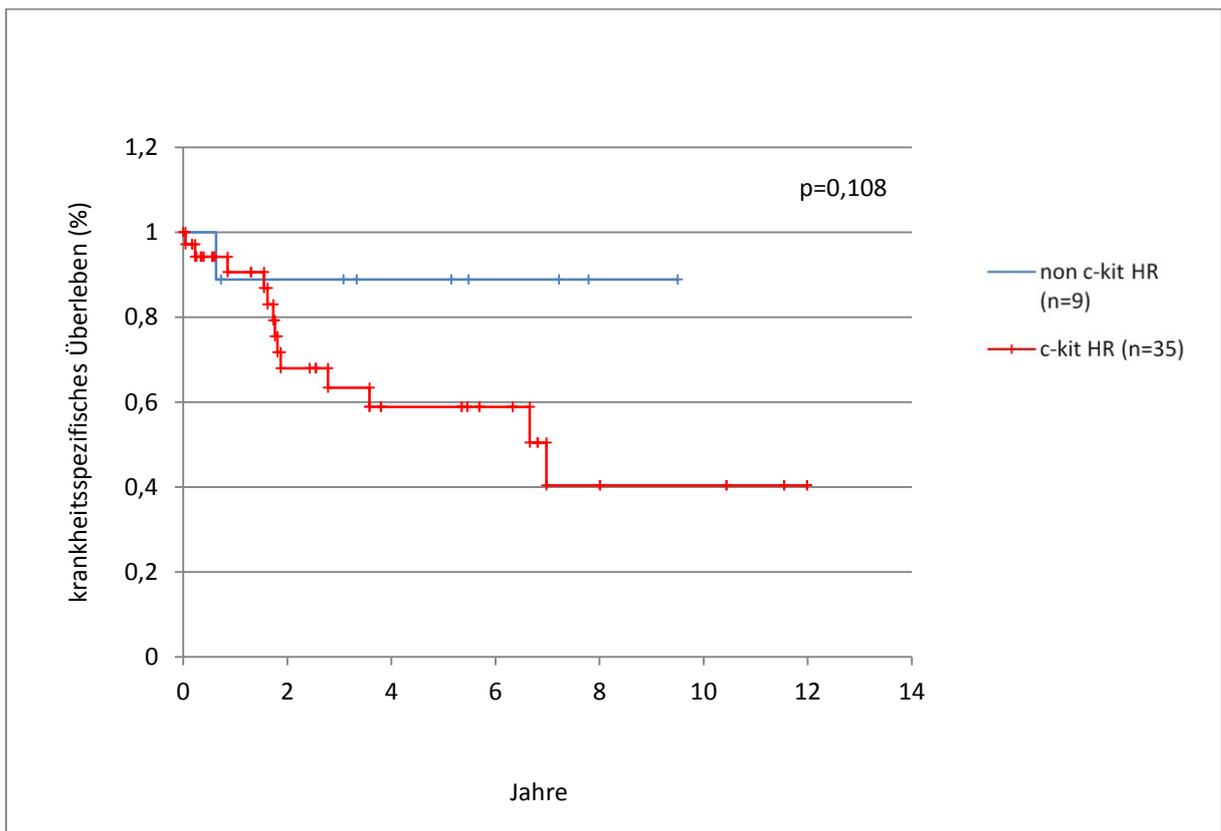


Abbildung 26: Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) für Patienten mit High-Risk-GIST ($n_{\text{total}}=44$). Verglichen wurden High-Risk-Patienten mit Mutationen in c-kit („c-kit HR“) mit High-Risk-Patienten ohne Mutation in c-kit („non c-kit HR“). Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

3.8.8 Vergleich c-kit Codon 557/558 vs. Non- c-kit Codon 557/558

Ein weiterer Schritt beinhaltete die Untersuchung von Patienten mit einer Mutation in den Codons 557 und 558 von c-kit. Diese kodieren für die Aminosäure Tryptophan und Lysin und werden von manchen Autoren mit einem gehäuften Auftreten von Rezidiven in Verbindung gebracht [56]. In unserem Kollektiv fand sich bei 17,3% (n=22) der Patienten eine derartige Mutation. Die restlichen 105 Patienten wurden als Vergleichsgruppe gegenübergestellt.

Analysiert wurde zunächst das krankheitsspezifische Überleben (DSS). Bei Patienten mit Mutationen in Codon 557 und/oder 558 fand sich eine 1-Jahres-Überlebensrate von 95,2%, nach 3 Jahren betrug diese 76,2% und nach 5 Jahren 60,6%. Im Vergleich dazu lag die 1-Jahres-Überlebensrate in der Gruppe ohne Mutation der Codons 557/558 bei 96,5% sowie nach 3 und 5 Jahren bei 89,6%. Bei einem p-Wert von 0,027 zeigt sich eine statistische Signifikanz für die Annahme, dass Patienten mit einer Mutation in Codon 557 und/oder 558 von c-kit ein höheres Risiko für tumorbedingten Tod aufweisen (siehe Abbildung 27).

Für das krankheitsfreie Überleben (DFS) findet sich für GIST mit Mutationen in Codon 557/558 nach 1 und 3 Jahren eine Rate von 63,3%, nach 5 Jahren sind noch 56,6% der Patienten tumorfrei. Liegt eine derartige Mutation nicht vor, so sind nach 1 Jahr noch 86,4%, nach 3 Jahren noch 83,5% und nach 5 Jahren 81,1% der Patienten tumorfrei. Mit einem p-Wert von 0,064 ergibt sich zwar ein Trend hin zu einem gehäuften Auftreten von Metastasen und Rezidiven bei Mutationen in den Codons 557/558, ein statistisches Signifikanzniveau wird jedoch nicht erreicht.

Tabelle 16: Krankheitsspezifisches Überleben (DSS) und krankheitsfreies Überleben (DFS) nach 1, 3 und 5 Jahren. Verglichen wurden Patienten mit nachgewiesener Mutation in c-kit Codon 557/558 („Codon 557/558“) mit dem Rest des Kollektivs („non-Codon 557/558“) ($n_{\text{total}}=127$). Zusätzlich angegeben wurde das Quotenverhältnis (Odds Ratio) incl. 95%-Konfidenzintervall, bei einer Einordnung in die Gruppe „Codon 557/558“ tumorbedingt zu versterben oder Rezidiv/Metastasierung zu erleiden. Für die Gruppe „Codon 557/558“ ergab sich ein um Faktor 3,563 erhöhtes Risiko eines tumorbedingten Todes. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

	DSS (%)		DFS (%)	
	Codon 557/558	non-Codon 557/558	Codon 557/558	non-Codon 557/558
1-a-DSS/DFS	95,2	96,5	63,3	86,4
3-a-DSS/DFS	76,2	89,6	63,3	83,5
5-a-DSS/DFS	60,6	89,6	56,5	81,1
OR	3,563 [1,137; 11,165]		2,429 [0,881; 6,699]	
Log-Rank-Test	p=0,027		p=0,064	

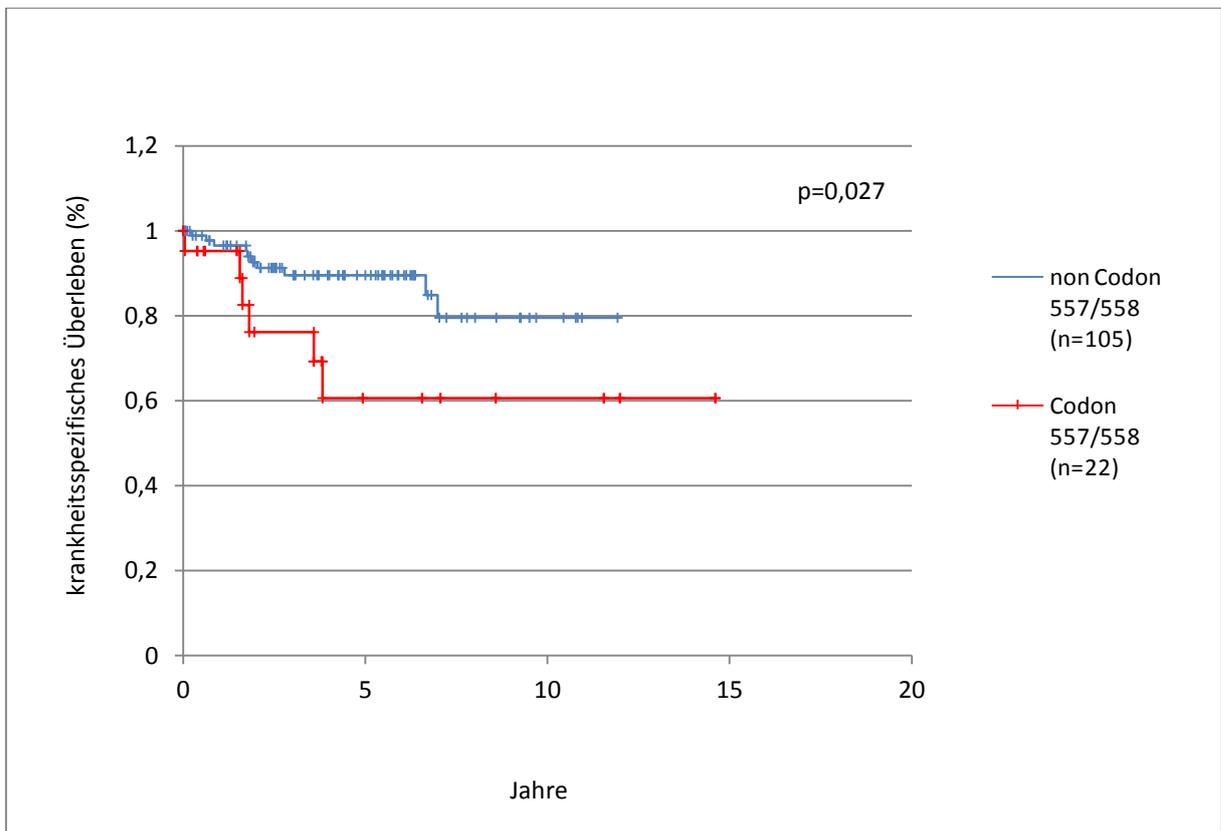


Abbildung 27: Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) für Patienten mit Mutationen in Codon 557/558 („Codon 557/558“) im Vergleich zu Patienten bei denen eine Mutation an diesem Genort nicht vorliegt („non Codon 557/558“) ($n_{\text{total}}=127$). Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

3.8.9 Gesamtübersicht der durchgeführten Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit wurden Gastrointestinale Stromatumoren in Bezug auf Ihren Mutationsstatus untersucht. Anschließend wurden das krankheitsspezifische und krankheitsfreie Überleben der Patienten in verschiedenen Gruppen verglichen.

Tabelle 17: Gesamtübersicht der 1-,3- und 5-Jahres-Überlebensraten („DSS“) sowie der 1-,3- und 5-Jahres-Tumorfreiheitsraten („DFS“) in Abhängigkeit vom ermittelten Mutationsstatus. Daten aus dem Ulmer GIST-Register von 1988-2010.

	DSS (%)		DFS (%)	
Mutation vs. Wildtyp (<i>n</i> _{total} =127)	Mutation (<i>n</i> =112)	Wildtyp (<i>n</i> =15)	Mutation (<i>n</i> =112)	Wildtyp (<i>n</i> =15)
1-a-DSS/DFS	96,9	91,7	80,2	66,7
3-a-DSS/DFS	86,6	91,7	77,5	66,7
5-a-DSS/DFS	83,1	91,7	73,6	66,7
Log-Rank-Test	p=0,433		p=0,202	
c-kit vs. non-c-kit (<i>n</i> _{total} =127)				
	c-kit (<i>n</i> =97)	non-c-kit (<i>n</i> =30)	c-kit (<i>n</i> =97)	non-c-kit (<i>n</i> =30)
1-a-DSS/DFS	96,4	96,0	78,6	95,7
3-a-DSS/DFS	84,9	96,0	77,1	90,6
5-a-DSS/DFS	81,0	96,0	73,0	90,6
Log-Rank-Test	p=0,113		p=0,202	
PDGFRA vs. non-PDGFRA (<i>n</i> _{total} =127)				
	PDGFRA (<i>n</i> =15)	non-PDGFRA (<i>n</i> =112)	PDGFRA (<i>n</i> =15)	non-PDGFRA (<i>n</i> =112)
1-a-DSS/DFS	100	95,7	92,3	80,9
3-a-DSS/DFS	100	85,7	82,1	79,6
5-a-DSS/DFS	100	82,3	82,1	76,0
Log-Rank-Test	p=0,155		p=0,579	
c-kit vs. PDGFRA (<i>n</i> _{total} =112)				
	c-kit (<i>n</i> =97)	PDGFRA (<i>n</i> =15)	c-kit (<i>n</i> =97)	PDGFRA (<i>n</i> =15)
1-a-DSS/DFS	96,4	100	78,6	92,3
3-a-DSS/DFS	84,9	100	77,1	82,1
5-a-DSS/DFS	81,0	100	73,0	82,1
Log-Rank-Test	p=0,140		p=0,444	
c-kit vs. Wildtyp (<i>n</i> _{total} =112)				
	c-kit (<i>n</i> =97)	Wildtyp (<i>n</i> =15)	c-kit (<i>n</i> =97)	Wildtyp (<i>n</i> =15)
1-a-DSS/DFS	96,4	91,7	78,6	66,7
3-a-DSS/DFS	84,9	91,7	77,1	66,7
5-a-DSS/DFS	81,0	91,7	73,0	66,7
Log-Rank-Test	p=0,362		p=0,194	

	DSS (%)		DFS (%)	
PDGFRα vs. Wildtyp (n _{total} =30)	PDGFRα (n=15)	Wildtyp (n=15)	PDGFRα (n=15)	Wildtyp (n=15)
1-a-DSS/DFS	100	91,7	92,3	66,7
3-a-DSS/DFS	100	91,7	82,1	66,7
5-a-DSS/DFS	100	91,7	82,1	66,7
Log-Rank-Test	p=0,280		p=0,152	
c-kit vs. non-c-kit bei High-Risk-GIST (HR) (n _{total} =44)				
	c-kit HR (n=35)	non-c-kit HR (n=9)	c-kit HR (n=35)	non-c-kit HR (n=9)
1-a-DSS/DFS	90,6	88,9	50,8	87,5
3-a-DSS/DFS	63,4	88,9	46,9	72,9
5-a-DSS/DFS	58,9	88,9	36,9	72,9
Log-Rank-Test	p=0,108		p=0,176	
Codon 557/558 vs. non-Codon 557/558 (n _{total} =127)				
	Codon 557/558 (n=22)	non-Codon 557/558 (n=105)	Codon 557/558 (n=22)	non-Codon 557/558 (n=105)
1-a-DSS/DFS	95,2	96,5	63,3	86,4
3-a-DSS/DFS	76,2	89,6	63,3	83,5
5-a-DSS/DFS	60,6	89,6	56,5	81,1
Log-Rank-Test	p=0,027		p=0,064	

4. Diskussion

Bei GIST-Tumoren werden derzeit in der Routine vor allem die Größe des Neoplasmas sowie die ermittelte Mitoserate, häufig auch die Lokalisation des Primärtumors verwendet, um das Risiko eines malignen Verhaltens einzuschätzen. Daneben sind auch immunhistochemische Parameter, wie z.B. p16 [101] hilfreich. In der vorliegenden Arbeit wurde der Stellenwert der häufigsten Mutationen in c-kit und PDGFR α untersucht.

Zusammenfassend zeigt sich, dass das Vorliegen einer Mutation in Codon 557/558 von c-kit mit einem signifikant höheren Risiko eines tumorbedingten Todes sowie eine Tendenz hin zum häufigeren Auftreten eines Rezidives oder einer Metastasierung einhergeht. Darüber hinaus ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede beim Vorliegen von Mutationen in c-kit oder PDGFR α . Die Ergebnisse werden nun im Weiteren in den einzelnen Abschnitten diskutiert.

4.1 Allgemeine Überlebenszeitanalyse und krankheitsfreies Überleben

In der vorliegenden Untersuchung fand sich in einem Kollektiv von n=127 Patienten mit Gastrointestinalem Stromatumor eine 1-Jahres-Überlebensrate (DSS) von 96,3%. Nach 3 Jahren waren noch 87,3% und nach 5 Jahren 84,3% der Patienten am Leben. Bei selektiver Betrachtung einer Subpopulation mit „High-Risk-GIST“ (n=47) waren in dieser Gruppe nach 1 Jahr 89,9%, nach 3 Jahren 69,2% und nach 5 Jahren 65,5% der Patienten noch nicht tumorbedingt verstorben. Eine „High-Risk“-Eingruppierung des Tumors anhand der Klassifikation nach Fletcher [34] ist hochsignifikant ($p < 0,001$) mit einem erhöhten Risiko eines tumorbedingten Todes assoziiert.

Das krankheitsfreie Überleben (DFS) der untersuchten GIST-Patienten betrug nach 1 Jahr 82,3%, nach 3 Jahren 79,9% und nach 5 Jahren 76,6%. Auch waren nach Fletcher als „High-Risk-GIST“ bezeichnete Tumore hochsignifikant ($p < 0,001$) mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Rezidives oder einer Metastasierung verbunden. So waren in der Gruppe „High-Risk-GIST“ nach 1 Jahr 58,4%, nach 3 Jahren 55,3% und nach 5 Jahren lediglich 44,7% der Erkrankten weiterhin tumorfrei.

Die vorliegenden Daten unterstützen das bereits etablierte Klassifikationssystem, das Malignitätsrisiko anhand der Tumorgöße sowie der Mitoserate abzuschätzen. Je größer

der Primärtumor und je höher die Mutationsrate, desto höher ist auch in der vorliegenden Untersuchung das Risiko eines tumorbedingten Todes oder des Auftretens von Rezidiv und/oder Metastasierung.

4.2 Mutationsfrequenz

Bei den Patienten unseres Kollektivs war in 88,2% (n=112) der Tumore eine Veränderung der genetischen Sequenz an den bekannten Exonen nachweisbar. In 76,4% (n=97) waren dies Mutationen in c-kit, in 11,8% (n=15) war PDGFR α betroffen. Bei 11,8% (n=15) der Patienten fanden sich an den untersuchten Stellen keine Veränderungen, so dass diese GIST als Wildtyp zu bezeichnen sind.

Mutationen in c-kit werden in der Literatur mit einer Häufigkeit von 70-80% der GIST [20, 29] angegeben, Mutationen in PDGFR α treten in 5-15% der dokumentierten GIST auf [20, 29]. Unsere Ergebnisse liegen innerhalb dieses Bereiches. Wir konnten somit vorhandene Mutationen mit hoher Sensitivität detektieren.

4.3 Mutationsanalytik und spezielle Überlebenszeitanalysen

Ziel unserer Untersuchung war die Gewinnung von Daten zur Klärung der Frage, ob eine Mutation in c-kit oder PDGFR α einen prognostischen Parameter einer GIST-Erkrankung darstellt. Hierzu wurden von n=127 Patienten die bekannten Exons von c-kit und PDGFR α untersucht. Anschließend wurde der Mutationsstaus mit dem krankheitsspezifischen Überleben (DSS) sowie dem krankheitsfreien Überleben (DFS) korreliert. In der Literatur wird der prognostische Wert des Mutationsstatus unterschiedlich gesehen. Kern et al. gehen nicht von einem Einfluss der Mutation auf den Grad der Malignität aus [52]. Martin et al. hingegen sehen insbesondere in Mutationen der Codons 557/558 von c-kit einen Faktor, der mit einer signifikant schlechteren Prognose einhergeht [68].

4.3.1 Nachweis einer Mutation als prognostischer Faktor

Mutationen in den Rezeptoren c-kit und PDGFR α gehen meist mit einer konstitutionellen Aktivierung des Proteins und den nachgeschalteten Signalwegen einher. Neben GIST wird dieses pathogenetische Modell auch bei akuten myeloischen Leukämien (c-kit) oder dem Hypereosinophiliesyndrom (PDGFR α) diskutiert [16].

Wir untersuchten n=112 Patienten mit Mutationen in c-kit oder PDGFR α . Im Vergleich mit n=15 Patienten, bei denen der GIST eine Wildtyp-Sequenz aufwies, zeigten sich keine Hinweise auf das Vorliegen eines erhöhten Risikos in der Gruppe mit nachgewiesener Mutation. Das krankheitsfreie 5-Jahres-Überleben unterschied sich mit einem p-Wert von 0,433 statistisch nicht signifikant. Das Konfidenzintervall der Odds-Ratio für DSS reichte von 0,057 bis 3,773 und ergab somit ebenso keinen Hinweis auf ein erhöhtes Risiko eines tumorbedingten Todes in der Gruppe mit nachgewiesener Mutation.

Das krankheitsfreie Überleben, d.h. die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidives oder einer Metastasierung unterschied sich innerhalb der beiden Gruppen ebenfalls nicht signifikant. Patienten mit Mutation in c-kit oder PDGFR α waren nach 5-Jahren mit einer Wahrscheinlichkeit von 73,6% tumorfrei, Patienten mit Wildtyp-GIST zu 66,7%. Im Log-Rank-Test ergab sich mit einem p-Wert von 0,202 keine statistische Signifikanz.

Es ist somit zu konstatieren, dass das für das vorliegende Kollektiv das Auftreten einer Mutation in c-kit oder PDGFR α keinen signifikanten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit eines tumorbedingten Todes oder eines Rezidives bzw. einer Metastasierung hat. Diese Annahme deckt sich mit dem Ergebnis der Untersuchung von Kern et al. aus dem Jahre 2011 [52]. Seine Arbeitsgruppe sequenzierte c-kit und PDGFR α bei 63 Patienten mit immunhistochemisch nachgewiesenen GIST. In einer multivariaten Analyse zeigten sich Mutationen in c-kit oder PDGFR α nicht als unabhängige Variablen, die mit einer schlechteren Prognose in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben (DFS) einhergehen. Prinzipiell wird derzeit davon ausgegangen, dass in Wildtyp-GIST ebenfalls aktivierende Mutationen vorliegen, die mit den bislang durchgeführten Untersuchungen noch nicht detektiert werden (z.B. BRAF, KRAS, SDH), die aber ebenfalls durch die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden ein Proliferationssignal erzeugen und somit onkogenetisch wirksam sind. Hier befinden sich Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen.

4.3.2 Mutationen in c-kit als prognostischer Faktor

Mutationen in c-kit treten bei GIST in 80-85% der Patienten auf [20]. Ihr Stellenwert in der Prognose der Erkrankung wird kontrovers diskutiert, wenngleich sich Anhaltspunkte dafür ergeben, dass eine Mutation in c-kit mit einer schlechteren Prognose assoziiert sein kann [36]. Der konstitutionellen Aktivierung des mutierten Rezeptors sowie des

nachgeschalteten Pathways kommt im pathogenetischen Modell des GIST eine zentrale Rolle zu. Durch Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib ergibt sich nicht zuletzt auch ein wichtiger therapeutischer Ansatzpunkt.

Wir untersuchten n=97 Patienten mit Mutationen in c-kit, einbezogen wurden die Exons 11, 9, 13 und 17. Zunächst verglichen wir hierzu die n=97 Patienten mit Mutation in c-kit mit dem Rest des Kollektives, bei denen Mutationen in PDGFR α oder ein Wildtyp vorlagen. Das krankheitsspezifische 5-Jahres-Überleben (DSS) lag bei 81,0% bei Mutation in c-kit bzw. bei 96,0% bei non-c-kit. Im Log-Rank-Test ergab sich ein p-Wert von 0,113, ein statistisch signifikanter Unterschied besteht somit nicht. Ebenso findet sich in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben (DFS) bei einem p-Wert von 0,202 keine signifikante Differenz. In der Gruppe der Patienten mit c-kit-Mutation sind nach 5 Jahren 73,0% der Patienten tumorfrei, sämtliche weiteren Patienten zu 90,6%.

Ein Vergleich von GIST mit Mutationen in c-kit und PDGFR α sowie ein Vergleich von Mutationen in c-kit mit GIST bei Wildtyp-Sequenz erbrachten ebenfalls statistisch nicht-signifikante Unterschiede.

Ein Einzelvergleich der Exons 11, 9, 13 und 17 von c-kit mit der Kontrollgruppe erbrachte ebenfalls keinen Hinweis darauf, dass eine derartige Mutation mit einer höheren Malignität des GIST einhergeht, krankheitsspezifisches und krankheitsfreies Überleben differieren jeweils nur in statistisch nicht-signifikantem Ausmaß. Die Aussagekraft dieser Untersuchung ist bei kleinen Fallzahlen aufgrund nochmaliger Untergruppierung allerdings stark eingeschränkt.

Zusammenfassend ist somit festzuhalten, dass sich in der vorliegenden Untersuchung keine Hinweise für ein erhöhtes Risiko für tumorbedingten Tod oder Metastasierung/Rezidiv bei Vorliegen einer beliebigen Mutation in c-kit ergeben.

4.3.3 Mutationen in PDGFR α als prognostischer Faktor

Untersucht wurden n=15 Patienten mit Mutationen in PDGFR α . Als Vergleichsgruppe wurden die Patienten mit Mutation in c-kit oder einer Wildtypsequenz gegenübergestellt.

Das krankheitsfreie Überleben (DFS) nach 5 Jahren lag in der Gruppe mit Mutation in PDGFR α bei 82,1%, in der Vergleichsgruppe waren zu diesem Zeitpunkt noch 76,0% der Patienten tumorfrei. Bei einem p-Wert von 0,579 im Log-Rank-Test ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

In Bezug auf das krankheitsspezifische Überleben (DSS) ergab sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied. So bestand bei Patienten mit nachgewiesener Mutation in PDGFR α eine 5-Jahres-Überlebensrate von 100%, in der Kontrollgruppe waren zu diesem Zeitpunkt noch 82,3% der Patienten am Leben bzw. nicht-tumorbedingt verstorben. Aufgrund der sehr kleinen Fallzahl weist der Log-Rank-Test mit einem p-Wert von 0,155 auch hier keine Signifikanz aus.

4.3.4 Mutationen in Codon 557/558 von c-kit als prognostischer Faktor

Martin et al. publizierten im Jahre 2005 erstmals Ergebnisse, die Mutationen in den Codons 557 oder 558 von c-kit mit einem schlechteren Überleben bzw. einer höheren Rezidivrate in Zusammenhang brachten [68]. Die Arbeitsgruppen von Wozniak [117] und Calibasi [11] stützen diese Annahme. Die o.g. Bereiche kodieren für die Aminosäuren Tryptophan und Lysin und spielen eine zentrale Rolle in der Phosphorylierung des KIT-Rezeptors. Ma et al. zeigten im Modell eine spontane Aktivierung des Rezeptors bei Austausch einer der beiden Aminosäuren [64].

Wir untersuchten, ob in unserem Kollektiv bei n=22 Patienten mit Mutationen in den Codons 557 oder 558 Hinweise auf ein erhöhtes Risiko für tumorbedingten Tod oder das Auftreten eines Rezidives oder einer Metastasierung vorlagen. In der Gruppe mit nachgewiesener Mutation in einem der Codons 557/558 lag die 5-Jahres Überlebensrate bei 60,6%, in der Kontrollgruppe ohne Mutation an einem dieser Loci betrug die 5-Jahres-Überlebensrate 89,6%. Der Log-Rank-Test ergab einen p-Wert von 0,027. Der gefundene Unterschied ist somit dergestalt statistisch signifikant, dass das Auftreten einer Mutation in den Codons 557 oder 558 von c-kit mit einem erhöhten Risiko eines GIST-bedingten Todes assoziiert scheint. In der Kreuztabelle findet sich eine Odds-Ratio von 3,563, das 95%-Konfidenzintervall reicht von 1,137 bis 11,165. Im Mittel ist somit eine Mutation in den Codons 557/558 von c-kit mit einem 3,5-fach erhöhten Risiko eines tumorbedingten Todes assoziiert.

Für das tumorfreie Überleben ergibt sich bei einem p-Wert von 0,064 ein Trend in Richtung eines schlechteren Outcomes bei Vorliegen einer Mutation in Codon 557/558. Die 5-Jahres-Tumorfreiheit bei Patienten mit Mutation in Codon 557/558 beträgt 56,5%, in der Vergleichsgruppe 81,1%.

5. Zusammenfassung

Trotz konstanter Bemühungen ist die Vorhersage der Malignität eines Gastrointestinalen Stromatumors (GIST) bislang nicht mit ausreichender Sicherheit möglich. Die etablierten Klassifikationssysteme stützen sich auf die Variablen „Tumorgroße“, „Mitoserate“ und „Lokalisation“. Nichtsdestotrotz ergeben sich Konstellationen mit GIST, die anhand der gegebenen Parameter als Neoplasmen mit niedrigem Malignitätsrisiko klassifiziert werden aber dennoch im klinischen Verlauf ein malignes Verhalten zeigen. Ebenso finden sich High-Risk-GIST, die trotz hohem Malignitätspotenzial keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten aufweisen.

Ziel der Arbeit war, die prognostische Relevanz von Mutationen im Stammzellfaktor-Rezeptor (c-kit) und platelet-derived growth factor receptor α (PDGFR α) herauszuarbeiten. Von insgesamt 127 Patienten wurde daher in Paraffin eingebettetes Tumormaterial zur Untersuchung gebracht. Sämtliche Proben wurden auf Mutationen in c-kit und PDGFR α untersucht. Die hieraus generierten Daten wurden mit den klinischen Verlaufsdaten der Patienten in Verbindung gebracht. Insbesondere wurden hierzu Überlebenszeitanalysen in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben sowie das krankheitsspezifische Überleben durchgeführt.

In einer Subgruppe mit Mutationen in den Codons 557/558 von c-kit Exon 11 ließ sich ein Unterschied in Bezug auf das krankheitsspezifische Überleben zeigen. Das Auftreten einer Mutation in diesem Bereich geht mit einer signifikant höheren Wahrscheinlichkeit eines tumorbedingten Todes einher. Im Verlauf kann diskutiert werden, ob Patienten mit nachgewiesener Mutation in den Codons 557/558 unabhängig von der klinischen Risikobeurteilung von einer Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren profitieren.

Mutationen in c-kit und PDGFR α sind bekannt, vergleichsweise gut verstanden und in der Pathogenese von GIST etabliert. Ein besonderes Augenmerk ist in weiteren Arbeiten auf die Erforschung der Pathogenese von Wildtyp-GIST zu richten. Neben den Targets BRAF, ein Proto-Onkogen, und dem „Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog“ (KRAS) ist auch der in den letzten Jahren in den Focus gerückte Succinat-Dehydrogenase-Komplex Gegenstand weiterer Untersuchungen.

6. Literaturverzeichnis

1. Agaimy A., Terracciano L.M., Dirnhofer S., Tornillo L., Foerster A., Hartmann A., and Bihl M.P.: V600E BRAF mutations are alternative early molecular events in a subset of KIT/PDGFR α wild-type gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 62: 613--616 (2009)
2. Agaram N.P., Wong G.C., Guo T., Maki R.G., Singer S., Dematteo R.P., Besmer P., and Antonescu C.R.: Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 47: 853--859 (2008)
3. Al-Bozom I.A.: p53 expression in gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int* 51: 519--523 (2001)
4. Amini B., Jessop A.C., Ganeshan D.M., Tseng W.W., and Madewell J.E.: Contemporary imaging of soft tissue sarcomas. *J Surg Oncol* 111: 496-503 (2015)
5. Antonescu C.R.: Gastrointestinal stromal tumor (GIST) pathogenesis, familial GIST, and animal models. *Semin Diagn Pathol* 23: 63--69 (2006)
6. Appelman H.D.: Mesenchymal tumors of the gut: historical perspectives, new approaches, new results, and does it make any difference? *Monogr Pathol* 220--246 (1990)
7. Bachet J.-B., Landi B., Laurent-Puig P., Italiano A., Le Cesne, Axel, Lévy P., Safar V., Duffaud F., Blay J.-Y., and Emile J.-F.: Diagnosis, prognosis and treatment of patients with gastrointestinal stromal tumour (GIST) and germline mutation of KIT exon 13. *Eur J Cancer* (2013)
8. Blanke C.D., Demetri G.D., von Mehren M., Heinrich M.C., Eisenberg B., Fletcher J.A., Corless C.L., Fletcher C.D.M., Roberts P.J., Heinz D., Wehre E., Nikolova Z., and Joensuu H.: Long-term results from a randomized phase II trial of standard-versus higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing KIT. *J Clin Oncol* 26: 620-625 (2008)
9. Braggio E., Braggio D.D.A., Small I.A., Lopes L.F., Valadão M., Gouveia M.E., Moreira A.D.S., Linhares E., Romano S., Bacchi C.E., Renault I.Z., Guimarães D.P., and Ferreira C.G.: Prognostic relevance of KIT and PDGFR α mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Anticancer Res* 30: 2407-2414 (2010)
10. Cai Y.C., Jiang Z., Vittimberga F., Xu X., Savas L., Woda B., Callery M., and Banner B.: Expression of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in gastrointestinal stromal tumours. *Virchows Arch* 435: 112--115 (1999)
11. Calibasi G., Baskin Y., Alyuruk H., Cavas L., Oztop I., Sagol O., Atila K., Ellidokuz H., and Yilmaz U.: Molecular Analysis of the KIT Gene in Gastrointestinal Stromal Tumors With Novel Mutations. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* (2013)
12. Carney J.A.: The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, pulmonary chondroma, and functioning extra-adrenal paraganglioma: a five-year review. *Medicine (Baltimore)* 62: 159-169 (1983)
13. Carney J.A.: Gastric stromal sarcoma, pulmonary chondroma, and extra-adrenal paraganglioma (Carney Triad): natural history, adrenocortical component, and possible familial occurrence. *Mayo Clin Proc* 74: 543--552 (1999)
14. Chan P.M., Ilangumaran S., Rose J.L., Chakrabarty A., and Rottapel R.: Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Mol Cell Biol* 23: 3067--3078 (2003)

15. Comandone A. and Boglione A.: [The importance of mutational status in prognosis and therapy of GIST]. *Recenti Prog Med* 106: 17-22 (2015)
16. Cools J., DeAngelo D.J., Gotlib J., Stover E.H., Legare R.D., Cortes J., Kutok J., Clark J., Galinsky I., Griffin J.D., Cross N.C.P., Tefferi A., Malone J., Alam R., Schrier S.L., Schmid J., Rose M., Vandenberghe P., Verhoef G., Boogaerts M., Wlodarska I., Kantarjian H., Marynen P., Coutre S.E., Stone R., and Gilliland D.G.: A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 348: 1201-1214 (2003)
17. Cools J., DeAngelo D.J., Gotlib J., Stover E.H., Legare R.D., Cortes J., Kutok J., Clark J., Galinsky I., Griffin J.D., Cross N.C.P., Tefferi A., Malone J., Alam R., Schrier S.L., Schmid J., Rose M., Vandenberghe P., Verhoef G., Boogaerts M., Wlodarska I., Kantarjian H., Marynen P., Coutre S.E., Stone R., and Gilliland D.G.: A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 348: 1201--1214 (2003)
18. Corless C.L., Ballman K.V., Antonescu C.R., Kolesnikova V., Maki R.G., Pisters P.W.T., Blackstein M.E., Blanke C.D., Demetri G.D., Heinrich M.C., von Mehren, Margaret, Patel S., McCarter M.D., Owzar K., and DeMatteo R.P.: Pathologic and molecular features correlate with long-term outcome after adjuvant therapy of resected primary GI stromal tumor: the ACOSOG Z9001 trial. *J Clin Oncol* 32: 1563-1570 (2014)
19. Corless C.L., Fletcher J.A., and Heinrich M.C.: Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 22: 3813--3825 (2004)
20. Corless C.L., Fletcher J.A., and Heinrich M.C.: Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 22: 3813-3825 (2004)
21. Cunningham R.E., Abbondanzo S.L., Chu W.S., Emory T.S., Sobin L.H., and O'Leary T.J.: Apoptosis, bcl-2 expression, and p53 expression in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9: 19--23 (2001)
22. Danilov A.I., Gomes-Leal W., Ahlenius H., Kokaia Z., Carlemalm E., and Lindvall O.: Ultrastructural and antigenic properties of neural stem cells and their progeny in adult rat subventricular zone. *Glia* 57: 136--152 (2009)
23. Demetri G.D., von Mehren M., Blanke C.D., den Abbeele A.D.V., Eisenberg B., Roberts P.J., Heinrich M.C., Tuveson D.A., Singer S., Janicek M., Fletcher J.A., Silverman S.G., Silberman S.L., Capdeville R., Kiese B., Peng B., Dimitrijevic S., Druker B.J., Corless C., Fletcher C.D.M., and Joensuu H.: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 347: 472-480 (2002)
24. Diamond T., Danton M.H., and Parks T.G.: Smooth muscle tumours of the alimentary tract. *Ann R Coll Surg Engl* 72: 316--320 (1990)
25. Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K., and Mattick J.S.: 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008 (1991)
26. Dorn J., Spatz H., Schmieder M., Barth T.F., Blatz A., Henne-Bruns D., Knippschild U., and Kramer K.: Cyclin H expression is increased in GIST with very-high risk of malignancy. *BMC Cancer* 10: 350 (2010)
27. Duensing A., Joseph N.E., Medeiros F., Smith F., Hornick J.L., Heinrich M.C., Corless C.L., Demetri G.D., Fletcher C.D.M., and Fletcher J.A.: Protein Kinase C

- theta (PKC θ) expression and constitutive activation in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Cancer Res* 64: 5127--5131 (2004)
28. Eisenberg B.L. and Trent J.C.: Adjuvant and neoadjuvant imatinib therapy: current role in the management of gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 129: 2533-2542 (2011)
 29. Emile J.F., Brahimi S., Coindre J.M., Bringuier P.P., Monges G., Samb P., Doucet L., Hostein I., Landi B., Buisine M.P., Neuville A., Bouché O., Cervera P., Pretet J.L., Tisserand J., Gauthier A., Cesne A.L., Sabourin J.C., Scoazec J.Y., Bonvalot S., Corless C.L., Heinrich M.C., Blay J.Y., and Aegerter P.: Frequencies of KIT and PDGFRA mutations in the MolecGIST prospective population-based study differ from those of advanced GISTs. *Med Oncol* 29: 1765-1772 (2012)
 30. Emory T.S., Sobin L.H., Lukes L., Lee D.H., and O'Leary T.J.: Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors: dependence on anatomic site. *Am J Surg Pathol* 23: 82--87 (1999)
 31. Esteller M., González S., Risques R.A., Marcuello E., Manges R., Germà J.R., Herman J.G., Capellà G., and Peinado M.A.: K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 19: 299--304 (2001)
 32. Feakins R.M.: The expression of p53 and bcl-2 in gastrointestinal stromal tumours is associated with anatomical site, and p53 expression is associated with grade and clinical outcome. *Histopathology* 46: 270--279 (2005)
 33. Fletcher C.D.M., Berman J.J., Corless C., Gorstein F., Lasota J., Longley B.J., Miettinen M., O'Leary T.J., Remotti H., Rubin B.P., Shmookler B., Sobin L.H., and Weiss S.W.: Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 33: 459--465 (2002)
 34. Fletcher C.D.M., Berman J.J., Corless C., Gorstein F., Lasota J., Longley B.J., Miettinen M., O'Leary T.J., Remotti H., Rubin B.P., Shmookler B., Sobin L.H., and Weiss S.W.: Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 33: 459-465 (2002)
 35. Furness S.G.B. and McNagny K.: Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Immunol Res* 34: 13-32 (2006)
 36. Garcés-Albir M., Marti-Obiol R., López-Mozos F., Calabuig-Fariñas S., Navarro-Ros S., and Ortega-Serrano J.: Results on prognostic value of mutations in localized gastrointestinal stromal tumors (GIST) in one single center. *Rev Esp Enferm Dig* 104: 405-410 (2012)
 37. Gessner C., Liebers U., Kuhn H., Stiehl P., Witt C., Schauer J., and Wolff G.: BAX and p16INK4A are independent positive prognostic markers for advanced tumour stage of nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 19: 134--140 (2002)
 38. Giebel L.B. and Spritz R.A.: Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8696-8699 (1991)
 39. Heinrich M.C., Corless C.L., Demetri G.D., Blanke C.D., von Mehren M., Joensuu H., McGreevey L.S., Chen C.-J., den Abbeele A.D.V., Druker B.J., Kiese B., Eisenberg B., Roberts P.J., Singer S., Fletcher C.D.M., Silberman S., Dimitrijevic S., and Fletcher J.A.: Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 21: 4342--4349 (2003)
 40. Heinrich M.C., Corless C.L., Duensing A., McGreevey L., Chen C.-J., Joseph N., Singer S., Griffith D.J., Haley A., Town A., Demetri G.D., Fletcher C.D.M., and Fletcher J.A.: PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299: 708--710 (2003)

41. Herbst R.S.: Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59: 21--26 (2004)
42. Hilton D.A., Penney M., Evans B., Sanders H., and Love S.: Evaluation of molecular markers in low-grade diffuse astrocytomas: loss of p16 and retinoblastoma protein expression is associated with short survival. *Am J Surg Pathol* 26: 472--478 (2002)
43. Hirota S., Isozaki K., Moriyama Y., Hashimoto K., Nishida T., Ishiguro S., Kawano K., Hanada M., Kurata A., Takeda M., Tunio G.M., Matsuzawa Y., Kanakura Y., Shinomura Y., and Kitamura Y.: Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279: 577--580 (1998)
44. Ichi Kawaguchi K., Oda Y., Saito T., Yamamoto H., Tamiya S., Takahira T., Miyajima K., Iwamoto Y., and Tsuneyoshi M.: Mechanisms of inactivation of the p16INK4a gene in leiomyosarcoma of soft tissue: decreased p16 expression correlates with promoter methylation and poor prognosis. *J Pathol* 201: 487--495 (2003)
45. Janeway K.A., Kim S.Y., Lodish M., Nosé V., Rustin P., Gaal J., Dahia P.L.M., Liegl B., Ball E.R., Raygada M., Lai A.H., Kelly L., Hornick J.L., N.I.H.P., Clinic W.-T.G., O'Sullivan M., de Krijger, Ronald R., Dinjens W.N.M., Demetri G.D., Antonescu C.R., Fletcher J.A., Helman L., and Stratakis C.A.: Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 314-318 (2011)
46. Joensuu H.: Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann Oncol* 17 Suppl 10: x280--x286 (2006)
47. Joensuu H.: Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor. *Hum Pathol* 39: 1411--1419 (2008)
48. Joensuu H. and DeMatteo R.P.: The management of gastrointestinal stromal tumors: a model for targeted and multidisciplinary therapy of malignancy. *Annu Rev Med* 63: 247--258 (2012)
49. Joensuu H., Eriksson M., Hall K.S., Hartmann J.T., Pink D., Schütte J., Ramadori G., Hohenberger P., Duyster J., Al-Batran S.-E., Schlemmer M., Bauer S., Wardelmann E., Sarlomo-Rikala M., Nilsson B., Sihto H., Monge O.R., Bono P., Kallio R., Vehtari A., Leinonen M., Alvegård T., and Reichardt P.: One vs three years of adjuvant imatinib for operable gastrointestinal stromal tumor: a randomized trial. *JAMA* 307: 1265--1272 (2012)
50. Joensuu H., Rutkowski P., Nishida T., Steigen S.E., Brabec P., Plank L., Nilsson B., Braconi C., Bordoni A., Magnusson M.K., Sufliarsky J., Federico M., Jonasson J.G., Hostein I., Bringuier P.-P., and Emile J.-F.: KIT and PDGFRA mutations and the risk of GI stromal tumor recurrence. *J Clin Oncol* 33: 634-642 (2015)
51. Jones D.H., Caracciolo J.T., Hodul P.J., Strosberg J.R., Coppola D., and Bui M.M.: Familial gastrointestinal stromal tumor syndrome: report of 2 cases with KIT exon 11 mutation. *Cancer Control* 22: 102-108 (2015)
52. Kern A., Görgens H., Dittert D.-D., Krüger S., Richter K.K., Schackert H.K., Saeger H.-D., Baretton G., and Pistorius S.: Mutational status of KIT and PDGFRA and expression of PDGFRA are not associated with prognosis after curative resection of primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *J Surg Oncol* 104: 59-65 (2011)
53. Kinoshita K., Hirota S., Isozaki K., Ohashi A., Nishida T., Kitamura Y., Shinomura Y., and Matsuzawa Y.: Absence of c-kit gene mutations in gastrointestinal stromal tumours from neurofibromatosis type 1 patients. *J Pathol* 202: 80--85 (2004)

54. Kitayama H., Kanakura Y., Furitsu T., Tsujimura T., Oritani K., Ikeda H., Sugahara H., Mitsui H., Kanayama Y., and Kitamura Y.: Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood* 85: 790--798 (1995)
55. Klüppel M., Huizinga J.D., Malysz J., and Bernstein A.: Developmental origin and Kit-dependent development of the interstitial cells of cajal in the mammalian small intestine. *Dev Dyn* 211: 60--71 (1998)
56. Kontogianni-Katsarou K., Dimitriadis E., Lariou C., Kairi-Vassilatou E., Pandis N., and Kondi-Paphiti A.: KIT exon 11 codon 557/558 deletion/insertion mutations define a subset of gastrointestinal stromal tumors with malignant potential. *World J Gastroenterol* 14: 1891-1897 (2008)
57. Kramer K., Knippschild U., Mayer B., Bögelspacher K., Spatz H., Henne-Bruns D., Agaimy A., Schwab M., and Schmieder M.: Impact of age and gender on tumor related prognosis in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *BMC Cancer* 15: 57 (2015)
58. Künstlinger H., Binot E., Merkelbach-Bruse S., Huss S., Wardelmann E., Buettner R., and Schildhaus H.-U.: High-resolution melting analysis is a sensitive diagnostic tool to detect imatinib-resistant and imatinib-sensitive PDGFRA exon 18 mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 45: 573-582 (2014)
59. Lasota J., Xi L., Coates T., Dennis R., Evbuomwan M.O., Wang Z.-F., Raffeld M., and Miettinen M.: No KRAS mutations found in gastrointestinal stromal tumors (GISTs): molecular genetic study of 514 cases. *Mod Pathol* 26: 1488-1491 (2013)
60. Liegl B., Hornick J.L., Corless C.L., and Fletcher C.D.M.: Monoclonal antibody DOG1.1 shows higher sensitivity than KIT in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes. *Am J Surg Pathol* 33: 437--446 (2009)
61. Lopes L.F. and Bacchi C.E.: EGFR and gastrointestinal stromal tumor: an immunohistochemical and FISH study of 82 cases. *Mod Pathol* 20: 990--994 (2007)
62. Lott S., Schmieder M., Mayer B., Henne-Bruns D., Knippschild U., Agaimy A., Schwab M., and Kramer K.: Gastrointestinal stromal tumors of the esophagus: evaluation of a pooled case series regarding clinicopathological features and clinical outcome. *Am J Cancer Res* 5: 333-343 (2015)
63. Ma Y.-Y., Yu S., He X.-J., Xu Y., Wu F., Xia Y.-J., Guo K., Wang H.-J., Ye Z.-Y., Zhang W., and Tao H.-Q.: Involvement of c-KIT mutation in the development of gastrointestinal stromal tumors through proliferation promotion and apoptosis inhibition. *Onco Targets Ther* 7: 637-643 (2014)
64. Ma Y., Cunningham M.E., Wang X., Ghosh I., Regan L., and Longley B.J.: Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. *J Biol Chem* 274: 13399-13402 (1999)
65. Ma Y., Cunningham M.E., Wang X., Ghosh I., Regan L., and Longley B.J.: Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. *J Biol Chem* 274: 13399--13402 (1999)
66. Mäkitie A.A., MacMillan C., Ho J., Shi W., Lee A., O'Sullivan B., Payne D., Pintilie M., Cummings B., Waldron J., Warde P., Irish J., Brown D., Gilbert R., Gullane P., Liu F.-F., and Kamel-Reid S.: Loss of p16 expression has prognostic significance in human nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 9: 2177--2184 (2003)

67. Maleddu A., Pantaleo M.A., Nannini M., and Biasco G.: The role of mutational analysis of KIT and PDGFRA in gastrointestinal stromal tumors in a clinical setting. *J Transl Med* 9: 75 (2011)
68. Martín J., Poveda A., Llombart-Bosch A., Ramos R., López-Guerrero J.A., del Muro J.G., Maurel J., Calabuig S., Gutierrez A., de Sande J.L.G., Martínez J., Juan A.D., Láinez N., Losa F., Alija V., Escudero P., Casado A., García P., García P., Blanco R., Buesa J.M., and for Sarcoma Research S.G.: Deletions affecting codons 557-558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol* 23: 6190-6198 (2005)
69. Martín J., Poveda A., Llombart-Bosch A., Ramos R., López-Guerrero J.A., del Muro J.G., Maurel J., Calabuig S., Gutierrez A., de Sande J.L.G., Martínez J., Juan A.D., Láinez N., Losa F., Alija V., Escudero P., Casado A., García P., García P., Blanco R., Buesa J.M., and for Sarcoma Research S.G.: Deletions affecting codons 557-558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol* 23: 6190--6198 (2005)
70. Mazur M.T. and Clark H.B.: Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol* 7: 507--519 (1983)
71. Miettinen M., Fetsch J.F., Sobin L.H., and Lasota J.: Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. *Am J Surg Pathol* 30: 90--96 (2006)
72. Miettinen M., Killian J.K., Wang Z.-F., Lasota J., Lau C., Jones L., Walker R., Pineda M., Zhu Y.J., Kim S.Y., Helman L., and Meltzer P.: Immunohistochemical loss of succinate dehydrogenase subunit A (SDHA) in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) signals SDHA germline mutation. *Am J Surg Pathol* 37: 234-240 (2013)
73. Miettinen M., Kopczynski J., Makhlof H.R., Sarlomo-Rikala M., Gyorffy H., Burke A., Sobin L.H., and Lasota J.: Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases. *Am J Surg Pathol* 27: 625--641 (2003)
74. Miettinen M. and Lasota J.: Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 438: 1--12 (2001)
75. Miettinen M. and Lasota J.: KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13: 205--220 (2005)
76. Miettinen M. and Lasota J.: KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13: 205-220 (2005)
77. Miettinen M. and Lasota J.: Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 130: 1466--1478 (2006)
78. Miettinen M. and Lasota J.: Succinate dehydrogenase deficient gastrointestinal stromal tumors (GISTs) - A review. *Int J Biochem Cell Biol* 53C: 514-519 (2014)
79. Miettinen M., Makhlof H., Sobin L.H., and Lasota J.: Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 30: 477--489 (2006)

80. Miettinen M., Sobin L.H., and Lasota J.: Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 29: 52--68 (2005)
81. Miranda C., Nucifora M., Molinari F., Conca E., Anania M.C., Bordoni A., Saletti P., Mazzucchelli L., Pilotti S., Pierotti M.A., Tamborini E., Greco A., and Frattini M.: KRAS and BRAF mutations predict primary resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 18: 1769-1776 (2012)
82. Miranda C., Nucifora M., Molinari F., Conca E., Anania M.C., Bordoni A., Saletti P., Mazzucchelli L., Pilotti S., Pierotti M.A., Tamborini E., Greco A., and Frattini M.: KRAS and BRAF mutations predict primary resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 18: 1769--1776 (2012)
83. Nielsen J.S. and McNagny K.M.: Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 121: 3683-3692 (2008)
84. Nilsson B., Bümning P., Meis-Kindblom J.M., Odén A., Dortok A., Gustavsson B., Sablinska K., and Kindblom L.-G.: Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era--a population-based study in western Sweden. *Cancer* 103: 821--829 (2005)
85. Nishida T. and Hirota S.: Biological and clinical review of stromal tumors in the gastrointestinal tract. *Histol Histopathol* 15: 1293--1301 (2000)
86. Noguchi T., Sato T., Takeno S., Uchida Y., Kashima K., Yokoyama S., and Müller W.: Biological analysis of gastrointestinal stromal tumors. *Oncol Rep* 9: 1277--1282 (2002)
87. Oda K., Matsuoka Y., Funahashi A., and Kitano H.: A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 1: 2005.0010 (2005)
88. Ortega S., Malumbres M., and Barbacid M.: Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1602: 73--87 (2002)
89. Oudijk L., Gaal J., Korpershoek E., van Nederveen, Francien H., Kelly L., Schiavon G., Verweij J., Mathijssen R.H.J., den Bakker, Michael A., Oldenburg R.A., van Loon, Rosa L E., O'Sullivan M.J., de Krijger, Ronald R., and Dinjens W.N.M.: SDHA mutations in adult and pediatric wild-type gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 26: 456-463 (2013)
90. Pantaleo M.A., Astolfi A., Indio V., Moore R., Thiessen N., Heinrich M.C., Gnocchi C., Santini D., Catena F., Formica S., Martelli P.L., Casadio R., Pession A., and Biasco G.: SDHA loss-of-function mutations in KIT-PDGFR α wild-type gastrointestinal stromal tumors identified by massively parallel sequencing. *J Natl Cancer Inst* 103: 983-987 (2011)
91. Pantaleo M.A., Astolfi A., Urbini M., Nannini M., Paterini P., Indio V., Saponara M., Formica S., Ceccarelli C., Casadio R., Rossi G., Bertolini F., Santini D., Pirini M.G., Fiorentino M., Basso U., Biasco G., and G.I.S.T.S.G.: Analysis of all subunits, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, of the succinate dehydrogenase complex in KIT/PDGFR α wild-type GIST. *Eur J Hum Genet* 22: 32-39 (2014)
92. Pantaleo M.A., Nannini M., Astolfi A., Biasco G., and G.I.S.T.S.G.B.: A distinct pediatric-type gastrointestinal stromal tumor in adults: potential role of succinate dehydrogenase subunit A mutations. *Am J Surg Pathol* 35: 1750-1752 (2011)
93. Roussel M.F.: The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18: 5311-5317 (1999)
94. Rubin B.P. and Heinrich M.C.: Genotyping and immunohistochemistry of gastrointestinal stromal tumors: An update. *Semin Diagn Pathol* (2015)

95. Rubin B.P., Heinrich M.C., and Corless C.L.: Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet* 369: 1731--1741 (2007)
96. Rudolph P., Gloeckner K., Parwaresch R., Harms D., and Schmidt D.: Immunophenotype, proliferation, DNA ploidy, and biological behavior of gastrointestinal stromal tumors: a multivariate clinicopathologic study. *Hum Pathol* 29: 791--800 (1998)
97. Sarlomo-Rikala M., Kovatich A.J., Barusevicius A., and Miettinen M.: CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 11: 728--734 (1998)
98. Sarlomo-Rikala M., Tsujimura T., Lendahl U., and Miettinen M.: Patterns of nestin and other intermediate filament expression distinguish between gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and schwannomas. *APMIS* 110: 499--507 (2002)
99. Scarpa M., Bertin M., Ruffolo C., Polese L., D'Amico D.F., and Angriman I.: A systematic review on the clinical diagnosis of gastrointestinal stromal tumors. *J Surg Oncol* 98: 384--392 (2008)
100. Schmieder M., Wolf S., Danner B., Stoehr S., Juchems M.S., Wuerl P., Henne-Bruns D., Knippschild U., Hasel C., and Kramer K.: p16 expression differentiates high-risk gastrointestinal stromal tumor and predicts poor outcome. *Neoplasia* 10: 1154--1162 (2008)
101. Schmieder M., Wolf S., Danner B., Stoehr S., Juchems M.S., Wuerl P., Henne-Bruns D., Knippschild U., Hasel C., and Kramer K.: p16 expression differentiates high-risk gastrointestinal stromal tumor and predicts poor outcome. *Neoplasia* 10: 1154-1162 (2008)
102. Schneider-Stock R., Boltze C., Lasota J., Miettinen M., Peters B., Pross M., Roessner A., and Günther T.: High prognostic value of p16INK4 alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 21: 1688--1697 (2003)
103. Schneider-Stock R., Boltze C., Lasota J., Peters B., Corless C.L., Ruemmele P., Terracciano L., Pross M., Insabato L., Vizio D.D., Iesalnieks I., Dirnhofer S., Hartmann A., Heinrich M., Miettinen M., Roessner A., and Tornillo L.: Loss of p16 protein defines high-risk patients with gastrointestinal stromal tumors: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res* 11: 638--645 (2005)
104. Serrano M.: The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 237: 7--13 (1997)
105. Singer S., Rubin B.P., Lux M.L., Chen C.-J., Demetri G.D., Fletcher C.D.M., and Fletcher J.A.: Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 20: 3898--3905 (2002)
106. Sommer G., Agosti V., Ehlers I., Rossi F., Corbacioglu S., Farkas J., Moore M., Manova K., Antonescu C.R., and Besmer P.: Gastrointestinal stromal tumors in a mouse model by targeted mutation of the Kit receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6706--6711 (2003)
107. Strauss W.M.: Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. *Curr Protoc Immunol* Chapter 10: Unit 10.2 (2001)
108. Sun F., Huo X., Zhai Y., Wang A., Xu J., Su D., Bartlam M., and Rao Z.: Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121: 1043-1057 (2005)
109. Thomas R. and Swamy S.: Rare case of gastrointestinal stromal tumor presenting with scrotal metastasis. *Indian J Surg* 77: 188-189 (2015)
110. Thuneberg L.: One hundred years of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 47: 223--238 (1999)

111. Torihashi S., Nishi K., Tokutomi Y., Nishi T., Ward S., and Sanders K.M.: Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology* 117: 140--148 (1999)
112. Tryggvason G., Gíslason H.G., Magnússon M.K., and Jónasson J.G.: Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: the icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study. *Int J Cancer* 117: 289--293 (2005)
113. Vassos N., Agaimy A., Hohenberger W., and Croner R.S.: Management of liver metastases of gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Ann Hepatol* 14: 531-539 (2015)
114. Wang C., Jin M.-S., Zou Y.-B., Gao J.-N., Li X.-B., Peng F., Wang H.-Y., Wu Z.-D., Wang Y.-P., and Duan X.-M.: Diagnostic significance of DOG-1 and PKC- ζ expression and c-Kit/PDGFR α mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Scand J Gastroenterol* 48: 1055-1065 (2013)
115. Wardelmann E., Losen I., Hans V., Neidt I., Speidel N., Bierhoff E., Heinicke T., Pietsch T., Büttner R., and Merkelbach-Bruse S.: Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 106: 887--895 (2003)
116. Waterman B.R., Kusnezov N., Dunn J.C., and Hakim M.N.: Aggressive gastrointestinal stromal tumor with spinal metastases: a case report. *Mil Med* 180: e618-e621 (2015)
117. Wozniak A., Rutkowski P., Piskorz A., Ciwoniuk M., Osuch C., Bylina E., Sygut J., Chosia M., Rys J., Urbanczyk K., Kruszewski W., Sowa P., Siedlecki J., Debiec-Rychter M., Limon J., and P.C.G.I.S.T.R.: Prognostic value of KIT/PDGFR α mutations in gastrointestinal stromal tumours (GIST): Polish Clinical GIST Registry experience. *Ann Oncol* 23: 353-360 (2012)
118. Yantiss R.K., Rosenberg A.E., Sarran L., Besmer P., and Antonescu C.R.: Multiple gastrointestinal stromal tumors in type I neurofibromatosis: a pathologic and molecular study. *Mod Pathol* 18: 475--484 (2005)
119. Yeh C.-N., Hwang T.-L., Huang C.-S., Lee P.-H., Wu C.-W., Ker C.-G., Jan Y.-Y., and Chen M.-F.: Clinical Practice Guidelines for Patients with Gastrointestinal Stromal Tumor in Taiwan. *World J Surg Oncol* 10: 246 (2012)
120. Zong L., Chen P., and Xu Y.: Correlation between P53 expression and malignant risk of gastrointestinal stromal tumors: evidence from 9 studies. *Eur J Surg Oncol* 38: 189--195 (2012)

Danksagung

Das Ende jeder Arbeit soll in einem dankbaren Rückblick bestehen auf das, was zum Gelingen beigetragen hat. Ich danke Frau Prof. Dr. Henne-Bruns für die Möglichkeit, die Arbeit an Ihrer Klinik anzufertigen. Darüber hinaus gilt mein Dank auch unmittelbar meinem Doktorvater Prof. Dr. Klaus Kramer. Er hat mir von Beginn der Arbeit stets mit Geduld und Nachsicht beigestanden.

Ein ebenso großer Dank gilt dem Institut für Pathologie der Universität Ulm, hier neben Herrn Prof. Dr. Barth auch besonders Dr. Ingo Melzner, der während der Monate im Labor immer wieder zum Gelingen der Versuche beigetragen hat. Ein besonderer Dank gilt selbstverständlich auch den MTAs des Institutes.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Stephan Schwarz
geboren am 11.10.1981 in Augsburg

Schulbildung

09/1987 - 09/1991

09/1991 - 06/2001

Grundschule, Neuburg a.d. Kammel
Simpert-Kraemer-Gymnasium, Krumbach/Schwaben
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

07/2001 - 05/2002

OP-Abteilung des Kreiskrankenhauses Krumbach/Schwaben,
zeitgleich Ausbildung zum Rettungsanitäter

Studium

09/2002 - 04/2009

08/2007 - 07/2008

07/2009

seit 11/2009

Studium der Humanmedizin (Universität Ulm)
Praktisches Jahr (Universitätsklinikum Ulm)
Approbation als Arzt
Assistenzarzt an der Universitätsklinik Ulm - Klinik für
Kinder- und Jugendmedizin
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K.-M. Debatin)