

Aus der Klinik und Poliklinik
für
Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie
des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

Direktor Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. J.R. Izbicki

Loss of Heterozygosity in Gastrointestinalen Stromatumoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Stefan Wolter

aus Hamburg

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 18.04.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. J. Izbicki

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. O. Mann

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. J. Aberle

Inhalt

Inhalt	3
1. Einleitung.....	4
1.1. Hintergrund	4
1.2. Therapie.....	9
1.3. Karzinogenese	10
1.4. Tumorsuppressorgene und Proto-Onkogene.....	11
1.5. Loss of heterozygosity	13
2. Material und Methodik	15
2.1. DNA-Isolation.....	15
2.2. PCR	16
2.3. Primer	18
2.4. Auswertung.....	20
2.5. Statistik	23
3. Ergebnisse	24
3.1. Patientenkollektiv	24
3.2. Malignitätsgrad	25
3.3. Demographische Daten	26
3.4. Beobachtungszeitraum	26
3.5. Tumorlokalisation.....	27
3.7. Resektionsausmaß	28
3.8. Inzidenz von Loss of heterozygosity	29
3.9. Loss of heterozygosity nach Malignitätsgrad	31
3.10. Überleben	32
4. Diskussion	38
5. Zusammenfassung	44
6. Abkürzungen	45
7. Literatur	47
8. Danksagung	56
9. Lebenslauf.....	57
10. Eidesstattliche Versicherung.....	58

1. Einleitung

1.1. Hintergrund

Gastrointestinale Stromatumore (GIST) sind die häufigsten mesenchymalen Tumore des Verdauungstraktes, bezogen auf das Gesamtaufkommen von Tumoren müssen sie allerdings als vergleichsweise selten angesehen werden. Eindeutige epidemiologische Daten für Deutschland existieren bisher noch nicht. In einer isländischen Studie ergab sich eine Inzidenz von 1,1/100.000 Einwohner (Tryggvason *et al.*, 2005), passend zu einer Studie aus den Niederlanden mit einer Inzidenz für das Jahr 2003 von 1,27/100.000 Einwohnern (Goettsch *et al.*, 2005), so dass von einem ähnlichen Vorkommen in Deutschland ausgegangen werden kann. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz in den letzten Jahren deutlich zunahm, was auf eine bessere Diagnostik mit einheitlichen Markern zurückzuführen ist.

Bei GIST handelt es sich um eine relativ junge Tumorentität, da erst neue immunhistochemische Methoden GIST sicher als eigene Entität nachweisen. Zuvor waren diese Tumore häufig als Leiomyome, Leiomyosarkome oder Schwannome diagnostiziert worden. So konnte Miettinen (Miettinen *et al.*, 2005b) zeigen, dass es sich bei 1765 der 1869 zuvor als Leiomyom oder Leiomyosarkom klassifizierten Tumoren eigentlich um Gastrointestinale Stromatumore handelte. Auch in unseren Ergebnissen zeigte sich, dass sich einige, der von uns untersuchten, älteren Gewebeproben nach Reklassifizierung als GIST herausstellten.

Gastrointestinale Stromatumore stellen sich histologisch zu 70% als spindelzellförmig dar. Hierbei zeigen sich eosinophile Spindelzellen, welche in kleinen Faszikeln oder in großen storiformen (bastmattenartigen) Wachstumsstrukturen angeordnet sind. GIST vom Epitheloid Typ macht ca. 20% aller Tumore aus und in 10% handelt es sich um gemischt spindelzellig-epitheloide Tumore.

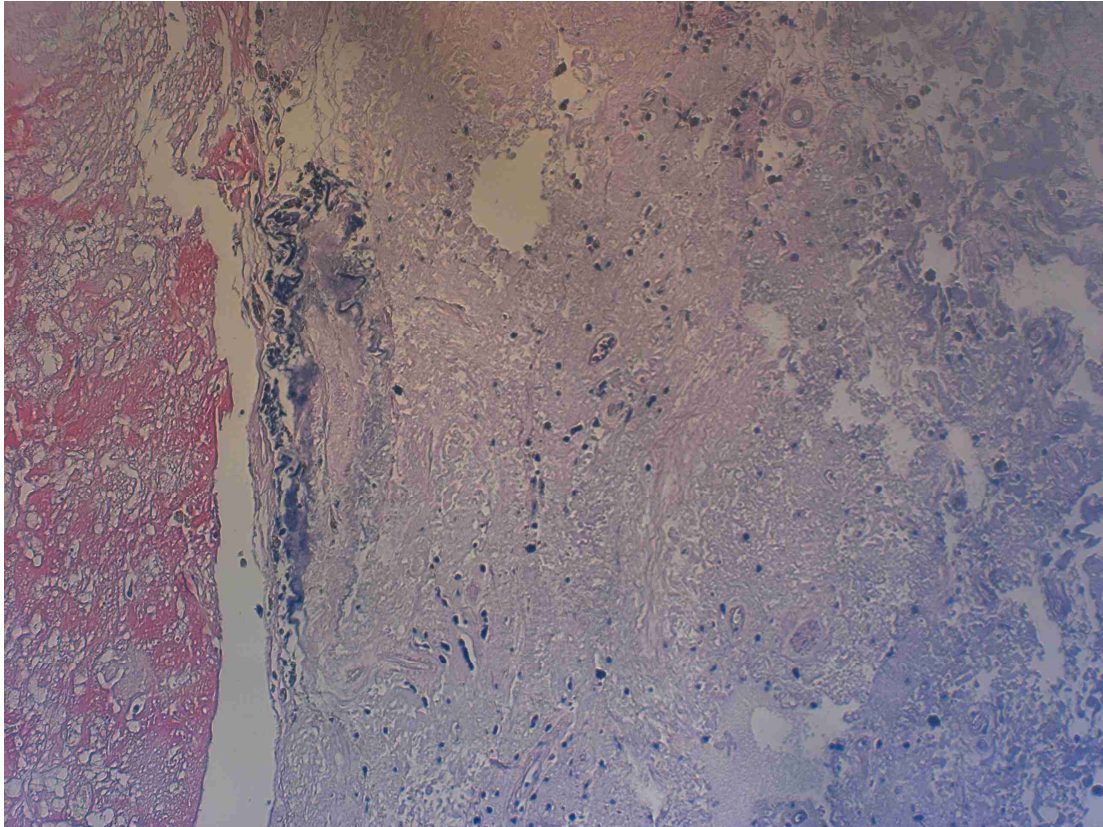


Abbildung 1: Lebermetastase eines Gastrointestinalen Stromatumors mit spindelzelligen Anteilen. Immunhistochemisch c-kit positiv. Die Mutationsanalyse zeigte eine 6bp-Deletion im Exon 11.

Als entsprechender immunhistochemischer Marker gilt heute das Auftreten von CD117 (Fletcher *et al.*, 2002), einer Typ-III-Transmembran Tyrosinkinase, die das Produkt des c-kit Proto-Onkogens auf Chromosom 4 (4q11-q12) darstellt. Als Ligand fungiert das Zytokin SCF (stem cell factor). Das c-kit Protoonkogen wird in hämatopoetischen Stammzellen, in Mastzellen und in Keimzellen expremiert. Tyrosinkinasen spielen generell eine Rolle bei der zellulären Wachstumsregulation (Schlessinger, 2000). Im Normalfall wird die Tyrosinkinase durch die Bindung mit einem entsprechenden Liganden aktiviert und in Folge dessen werden zwei benachbarte Rezeptoren verbunden und es wird eine komplexe Signalkaskade induziert. Daraufhin werden diverse Mechanismen für Proliferation, Apoptose sowie die Zelldifferenzierung induziert (D'Amato *et al.*, 2005).

Ein gewisser Prozentsatz von GIST ist jedoch CD117 negativ. Es kommen noch weitere Marker in variabler Ausprägung vor wie z.B. das Protein BCL-2, welches in der Regulation der Apoptose eine Rolle spielt und in bis zu 80% nachweisbar ist (Steinert *et al.*, 2006). In bis zu 70% ist CD34 nachweisbar (van de Rijn *et al.*, 1994). Hierbei handelt es sich um transmembrales Glycoprotein, welches sich in hämatopoetischen Vorläuferzellen und in Gefäßendothelzellen findet (Robinson *et al.*, 2000; Sarlomo-Rikala *et al.*, 1998b). Myogene Marker wie das muscle-specific actin (50%) oder das smooth-muscle actin (35%) wurden häufig vor der Entdeckung von CD117 als Marker zur Differenzierung von GIST eingesetzt. Seltene Marker sind S-100 (10%) sowie Desmin (5%) (Corless *et al.*, 2004).

In 85% bis 90% zeigt sich eine KIT-aktivierende Mutation. (Corless *et al.*, 2002; Heinrich *et al.*, 2003a; Rubin *et al.*, 2001) Ca. 35% der nicht KIT-aktivierenden Mutationen weisen eine Mutation im Gen des platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) auf (Heinrich *et al.*, 2003b). Dieses Gen spielt zusammen mit der Form der KIT-Mutation eine besondere Rolle beim Ansprechen von GIST auf den Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib. Die häufigste Mutation betrifft mit ca. 70% das Exon 11 des KIT-Gens, der juxtamembranösen Domäne. In ca. 15% ist das Exon 9 betroffen. Mutationen im Exon 13 und Exon 17 sind mit unter 5% seltenere Mutationsstellen (Lasota *et al.*, 1999; Lux *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2001). Bei der insgesamt selten nachgewiesenen Mutation im PDGFRA Gen ist die Punktmutation D842V im Exon 18 bei mehr als 2/3 nachzuweisen (Heinrich *et al.*, 2003b; Hirota *et al.*, 2003). In 5% bis 10% lässt sich weder eine KIT noch eine PDGFRA Mutation nachweisen. Diese Tumore werden als wild-type GISTs bezeichnet.

Einige Autoren vermuten bezüglich der Herkunft von GIST eine Verwandtschaft zu den Interstitiellen Zellen von Cajal (ICC), da diese unter anderem auch CD 177 exprimieren (Kindblom *et al.*, 1998). Diese Theorie wird durch ein Maus Modell erhärtet, bei welchem sich in *Kit*^{V558Δ}/+ Mäusen neben dem gehäuftem Vorkommen von GIST auch eine Hyperplasie der Interstitiellen Zellen von Cajal zeigten. (Sommer *et al.*, 2003) Bei ICC handelt es sich um Schrittmacherzellen des Magen-Darmtraktes. Das sporadische Vorkommen von extraintestinalen

GIST z.B. im Pankreas oder in der Harnblase hat eine Diskussion darüber entfacht, ob ICC auch in anderen Organen vorkommen können.

Die Lokalisation von GIST umfasst den gesamten Verdauungstrakt, betrifft jedoch am häufigsten den Magen und das Duodenum. Auch extragastrointestinale Stromatumore (EGIST) können vorkommen und betreffen meist das Omentum, Mesenterium oder das Retroperitoneum.

Tabelle 1: Lokalisation

	(Schurr <i>et al.</i> , 2006)	(Corless <i>et al.</i> , 2004)
Ösophagus	3,2%	2%
Magen	68,3%	60%
Dünndarm	21,6%	25%
Dickdarm	5%	5%
Andere	1,6%	5%

Gastrointestinale Stromatumore metastasieren bevorzugt in die Leber und ins Peritoneum, seltener in Lymphknoten, Knochen und Lunge (DeMatteo *et al.*, 2000). Während eine Metastasierung in Lymphknoten bei sporadischen GIST eher eine Ausnahme darstellt und von einigen Autoren als nicht existent beschrieben wird (Miettinen *et al.*, 2005b; Rubin, 2006), zeigten einige Studien ein gehäuftes Auftreten von Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit multifokalen Tumoren (Prakash *et al.*, 2005; Sauseng *et al.*, 2007) sowie bei Patienten jünger als 40 Jahre (Agaimy & Wunsch, 2009).

Das mediane Alter beim Auftreten von GIST wird mit 55 bis 65 Jahre angegeben. Die Datenlage zur geschlechtsbezogenen Verteilung ist nicht einheitlich. GIST kommen tendenziell häufiger beim männlichen Geschlecht vor.

Es gibt aber auch Beschreibungen von GIST im Kindesalter, welche sich von den adulten Formen durch das Fehlen von KIT bzw. PDGFRA Mutationen

unterscheiden (Miettinen *et al.*, 2005a). Familiären Formen von GIST (Li *et al.*, 2005; Maeyama *et al.*, 2001) und das Auftreten der sog. Carney Triad sind im Kindesalter beschrieben (Zhang *et al.*, 2010). Beim Carney Triad handelt es sich um das parallele Auftreten von pulmonalen Chondromen, extra-adrenalen Paragangliomen sowie Gastrointestinalen Stromatumoren (in der Erstbeschreibung von Carney aus dem Jahr 1977 noch als Leiomyosarkome bezeichnet (Carney *et al.*, 1977)). Weitere Assoziationen bestehen mit der Neurofibromatose Typ 1. Beschreibungen von multiplen GIST treten hierbei gehäuft auf (Yantiss *et al.*, 2005). Mittlerweile werden hier unterschiedliche Muster der Pathogenese bei selten nachweisbarer KIT oder PDGFRA Mutation vermutet (Andersson *et al.*, 2005; Maertens *et al.*, 2006; Miettinen *et al.*, 2006). Erworbene Risikofaktoren sind bis dato nicht bekannt.

Die Malignität von GIST wird heute allgemein nach der GIST Consensus Criteria (Fletcher Score) eingeteilt (Fletcher *et al.*, 2002). Dabei wird das Risiko anhand der Größe und der Mitoserate angegeben. Die Beschreibung von benignen GIST wurde mittlerweile weitgehend aufgegeben, da sich gezeigt hat, dass in Einzelfällen auch diese zu Rezidiven führen können. Meist wird das Risiko einer Malignität angegeben. GIST des Magens scheinen im Vergleich zu GIST des Dünndarms ein weitaus weniger aggressives Verhalten zu zeigen, so dass von einer baldigen Revision der Malignitätskriterien mit Bezug auf den Tumorentstehungsort auszugehen ist (Hornick & Fletcher, 2007).

Tabelle 2: Risikostratifizierung

Risiko	Größe	Mitoserate
very low	<2cm	< 5/50HPF
Low	2-5cm	< 5/50HPF
intermediate	<5cm	6-10/50HPF
	5-10cm	< 5/50HPF
High	>5cm	> 5/50HPF
	>10cm	All
	All	>10/50HPF
HPF=high power fields		

1.2. Therapie

Die komplette chirurgische Resektion des Tumors ist die primäre Therapieoption in der Behandlung von Gastrointestinalen Stromatumoren. Aber auch bei R0 Resektionen werden im Verlauf häufig Metastasen und Lokalrezidive beobachtet. So konnten DeMatteo et al. an einer Studie mit 200 Patienten zeigen, dass trotz R0 Resektion das krankheitsfreie 5-Jahresüberlebensintervall lediglich bei 54% lag (DeMatteo *et al.*, 2000). Als häufigster Metastasierungsort gilt die Leber (70%) sowie das Peritoneum (20%). Andere Lokalisationen wie Lunge oder Lymphknoten sind insgesamt selten (Langer, 2006).

Verschiedene Konzepte in der Primär- und adjuvanten Therapie von Gastrointestinalen Stromatumoren kamen vor der Verwendung von Imatinib zum Einsatz, zeigten mit Ansprechraten von unter 5% aber nahezu keinen therapeutischen Effekt (Dematteo *et al.*, 2002).

Mit der Entdeckung von gain-of-function Mutationen im Exon 11 des c-kit Proto-Onkogens durch Hirota et al. im Jahre 1998, konnte die Bedeutung dieser Typ-III-Transmembran Tyrosinkinase in der Pathogenese Gastrointestinaler Stromatumore gezeigt werden (Hirota *et al.*, 1998). Hierdurch ergaben sich in den letzten Jahren vollkommen neue Therapiekonzepte in der Behandlung von GIST. So führte der Nachweis dieser Tyrosinkinase nach Versuchen an GIST Zellen (Tuveson *et al.*, 2001), zu dem Einsatz von Imatinib (ST-571 auch CGP57148B, Handelsname Glivec® oder Gleevec®, Novartis Pharma, Basel, Schweiz). Bei Imatinib handelt es sich um ein Phenylaminopyrimidinderivat, welches zuvor schon in der Behandlung der Chronischen Myeloischen Leukämie eine herausragende Bedeutung gewonnen hat (Druker *et al.*, 1996). Der Wirkmechanismus besteht in einer kompetitiven Blockade der ATP-Bindungsstelle spezifischer Tyrosinkinasen, wie c-kit, abl, Bcr-abl oder PDGF.

Eine Reihe von Patienten entwickelt allerdings eine Resistenz gegenüber Imatinib unter der laufenden Therapie. Hierbei werden zwei Formen der Resistenz unterschieden. So findet sich eine primäre oder auch frühe Resistenz

bei 10 bis 15% aller Patienten (Blanke *et al.*, 2008a; Blanke *et al.*, 2008b; Gramza *et al.*, 2009). Als Gründe für die primäre Resistenz werden unterschiedliche Ansprechraten in Bezug auf die Mutation sowie unterschiedlich Dosierungsanforderungen vermutet. So scheinen Mutationen im Exon 9 des KIT Gens sowie PDGFRA Mutationen und die wild-type Mutation eine schlechtere Ansprechrate auf Imatinib zu haben (Gounder & Maki, 2011). Die zweite Form der Resistenz tritt nach 12 bis 36 Monaten auf. Hierbei weisen 50 bis 70% aller Patienten unter Imatinib Therapie einen Tumorprogress auf (Blanke *et al.*, 2008b; Verweij *et al.*, 2004). Hierbei werden Neumutationen im KIT bzw. PDGFRA vermutet (Gounder & Maki, 2011).

Seit 2006 steht der Tyrosinkinase Inhibitor Sunitinib maleat (SU11248, Handelsname Sutent; Pfizer, New York, USA) als Zweitlinientherapeutikum für Patienten die eine Imatinib Resistenz entwickelt haben oder Unverträglichkeiten aufweisen, zur Verfügung (Demetri *et al.*, 2006).

1.3. Karzinogenese

Der Entstehung von Malignomen gehen verschiedene Veränderungen auf genetischer Ebene voraus. So können unterschiedliche Genabschnitte durch Mutationen ihre Funktion verlieren („loss of function“) oder neue Funktionen hinzugewinnen („gain of function“). Derartige Mutationen lassen sich vor allem in Regionen, die für Zelldifferenzierung, Zellteilung oder für das Zellwachstum notwendig sind, finden. Hierbei kann man hauptsächlich zwischen zwei unterschiedlichen Gentypen differenzieren: den Proto-Onkogenen und den Tumorsuppressorgenen.

Die Vermehrung der Genprodukte von Proto-Onkogenen kann eine neoplastische Transformation bewirken (Pall, 1981), so dass dieses Gen nun als Onkogen fungiert. Proto-Onkogene kodieren meist Proteine, welche den Zellzyklus kontrollieren. So führen Mutationen in Regionen die z.B. Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren kodieren zu einem ungehinderten Wachstum der Zelle, während bei normalen Zellen eine Autoregulation stattfindet.

Dem gegenüber stehen Tumorsuppressorgene (TSG), welche die Zellteilung oder Zelldifferenzierung hemmen. Die Knudsonhypothese besagt, dass für die Tumorentstehung zunächst die Aktivierung von Onkogenen notwendig ist und in einem zweiten Schritt mit der Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen einhergeht (Knudson, 1996).

1.4. Tumorsuppressorgene und Proto-Onkogene

Für die hier verwendeten Primer konnten Zusammenhänge mit der Expression von bestimmten Proto-Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen nachgewiesen werden.

Die von uns untersuchte Region NF2, welche auf Chromosom 22q12 lokalisiert ist, ist in die Entwicklung verschiedener benignen und malignen Tumoren des Nervensystems involviert (Szijan *et al.*, 2003). NF2 kodiert das Protein Merlin (Moesin-Ezrin-Radixin-Like Protein), welches ein Protein des Zytoskeletts ist. Mutationen treten sowohl im Rahmen von sporadischen Tumoren als auch im Rahmen von Neurofibromatose assoziierten Tumoren auf. Hauptsächlich treten NF2 Mutationen in Zusammenhang mit Meningeomen und Schwannomen auf. Bei Gastrointestinalen Stromatumoren konnten Pylkkänen *et al.* nachweisen, dass Loss of Heterozygosity (LOH) in der Region 22q in 70% der Fälle nachgewiesen werden konnte und sowohl mit der Rezidivrate und dem Überleben korrelierte (Pylkkänen *et al.*, 2003).

P16 liegt auf Chromosom 9p21 und kodiert für ein Protein, welches als Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2), aber auch als MTS1 und INK4 bekannt ist. CDK-Inhibitor 2A wirkt regulierend auf den Zellzyklus. P16 Mutationen konnten bei verschiedenen Tumorentitäten, insbesondere im Pankreaskarzinom und in Melanomen nachgewiesen werden (Bartsch *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995). In Gastrointestinalen Stromatumoren konnte gezeigt werden, dass p16 positive Tumore mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Schmieder *et al.*, 2008; Schneider-Stock *et al.*, 2005).

Das p53 Gen liegt auf Chromosom 17p13.1. Dieses Tumorsuppressorgen wird auch als der Wächter des Genoms bezeichnet und ist an der Entwicklung einer Vielzahl von Tumoren beteiligt (Lane, 1992). Unter anderem kontrolliert p53 den Übergang der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase und kann bei Zellschädigungen zu einer Arretierung der Zelle in dieser Phase führen. Das Auftreten von Genalterationen im Bereich dieses Tumorsuppressorgens wurde an diversen Tumorentitäten untersucht. So konnte z.B. ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von LOH beim hepatocellulärem Karzinom in der Region D17S520 und der Expression von p53 gezeigt werden (Shao *et al.*, 2000). Ob p53 einen Einfluss auf die Prognose von Gastrointestinalen Stromatumoren hat, ist bisher nicht abschließend geklärt (Al-Bozom, 2001; Cunningham *et al.*, 2001; Gunji *et al.*, 2005; Neves *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2003).

Das Tumorsuppressorgen „Deleted in Pancreatic Carcinoma 4“ (DPC4) liegt auf Chromosom 18q21.1. Es ist auch als SMAD4 bekannt. SMAD4 ist bei der Signalübertragung von Genen der TGF-Beta Familie beteiligt. TGF-Beta wirkt als antiproliferativer Faktor bei Epithelzellen (Schwarte-Waldhoff & Schmiegel, 2002). LOH im Bereich des Chromosoms 18q konnte in über 90% der Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden (Schutte *et al.*, 1996).

Rb, welches das Retinoblastom Protein kodiert, liegt auf Chromosom 13q14.1-q14.2. Da Rb Protein unterdrückt das Zellwachstum und fördert die Zelldifferenzierung. Ein Ausfall von Rb kann zu einer malignen Transformation der Zelle führen. Goodrich *et al.* konnten zeigen, dass ein Verlust beider Allele dieses Gens zum Auftreten des Retinoblastoms führte (Goodrich & Lee, 1990). Mutationen im Rb Gen konnten neben dem Retinoblastom in einer ganzen Reihe von malignen Tumoren nachgewiesen werden. So konnte LOH u.a. im Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom nachgewiesen (NSCLC) werden (Tamura *et al.*, 1997). Alterationen im Bereich 13q konnten in verschiedenen Studien bei Gastrointestinalen Stromatumoren nachgewiesen werden (Gunawan *et al.*, 2002; Wozniak *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008).

1.5. Loss of heterozygosity

Im gesamten Abschnitt des Genoms von Eukaryonten kommen Abschnitte vor, welche aus repetitiven Basensequenzen bestehen. Je nach Länge dieser Basenpaarsequenzen werden diese als Satelliten-DNA bezeichneten Abschnitte unterteilt. So bezeichnen Minisatelliten Abfolgen von 10 bis 100 Basenpaaren. Short Tandem Repeats (STR) bestehen aus Wiederholungen mit weniger als 10 Basenpaaren. Mikrosatelliten bestehen aus kurzen DNA-Sequenzen von 10 bis 50 Kopien mit einer Länge von 2 bis 6 Basenpaaren (Litt & Luty, 1989). Aufgrund der Heterogenität und des ubiquitären Vorkommens im Genom werden Mikrosatelliten häufig als Marker zur Genomanalyse verwendet.

Im Allgemeinen versteht man unter Mikrosatellitenalliteration einen Oberbegriff für Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) und Loss of heterozygosity (LOH), dem Verlust der Heterozygotität. Während MSI, auch replication error positive (RER⁺) genannt, das Auftreten von Deletionen und Insertionen einzelner Basenpaaren bezeichnet, liegt beim LOH der Verlust eines kompletten Mikrosatellitenallels vor. Fehlerhafte Replikationen von repetitiven Sequenzen werden normalerweise von DNA-Reparaturproteinen erkannt und ein sog. mismatch repair durchgeführt. Belchis et al. beschrieben bereits 1996, dass die Instabilität von Mikrosatelliten-DNA auf ein Versagen des DNA-Mismatch-Repair-Systems hinweist (Belchis *et al.*, 1996). Das Auftreten von Mikrosatellitenalliteration in Bereichen von Tumorsuppressorgenen kann somit zu einer Inaktivierung dieser Regionen führen.

Für die Untersuchung eines LOH im Gewebe wird ein Vergleich zum heterozygoten Normalgewebe (z.B. Blut) vorgenommen. Entscheidend für die Untersuchung von LOH ist die Heterogenität der untersuchten Allele, um den Verlust eines Allels nachweisen zu können. Bei homozygoter Ausprägung ist der Nachweis eines LOH nicht möglich, weil gleich lange DNA-Fragmente in der Kapillarelektrophorese nicht aufgetrennt werden und sich deshalb nur eine Bande darstellt. In diesen Fällen wird dieser Locus für die vorliegende Probe als nicht informativ gewertet.

Am weitesten verbreitet ist die Verwendung von Mikrosatelliteninstabilitäten in der Diagnostik des hereditären nicht-polypösen Kolorektalen Karzinom (HNPCC). So konnten Aaltonen *et al.* zeigen, dass bei 86% aller Tumore von Patienten mit einem HNPCC Mikrosatelliteninstabilitäten nachgewiesen werden konnten (Aaltonen *et al.*, 1994). Hierbei kommt es zu Fehlern in der DNA-Replikation bzw. der DNA-Reparatur. Bislang konnten Mutationen in den Genen MSH2, MLH1, MSH6 und PMS2 identifiziert werden (Papadopoulos & Lindblom, 1997), wobei 90% der Mutationen in den Genen MSH2 und MLH1 zu finden waren. Die Wertigkeit weiterer nachgewiesener Mutationen, wie PMS1 und MLH3, ist bisher nicht geklärt. Aufgrund dieser Befunde empfiehlt die aktuelle S3-Leitlinie zum Kolorektalen Karzinom, dass sobald die krankheitsverursachende Mutation in der betreffenden Familie bekannt ist, diese bei den weiteren Risikopersonen untersucht werden sollte (Schmiegel *et al.*, 2008).

Das Auftreten von Mikrosatellitenalterationen wurde an einer Reihe weiterer Tumorentitäten untersucht. So konnte das Auftreten von MSI in unterschiedlichen Loci unter anderem bei oropharyngealen Karzinomen, bei Endometriumkarzinomen sowie bei Karzinomen des Magens und des Ösophagus nachgewiesen werden (Choi *et al.*, 2000; Grati *et al.*, 2000; Sirchia *et al.*, 2000; Yanagi *et al.*, 2000).

Bereits 1996 konnten El-Rifai *et al.* nachweisen, dass es bei Gastrointestinalen Stromatumoren zum Verlust von DNA Kopien im Bereich des Chromosoms 14q22 kommen kann (el-Rifai *et al.*, 1996). Dieselbe Forschergruppe konnte zwei Jahre später zusätzliche Veränderungen im Bereich von Chromosom 22 nachweisen (Sarlomo-Rikala *et al.*, 1998a).

Das Auftreten von Chromosomenaberrationen im Bereich der Chromosomen 1, 9, 14 und 22 wurde 2002 durch Gunawan *et al.* mittels Untersuchung der Karyotypen bestätigt (Gunawan *et al.*, 2002).

Im weiteren Verlauf wurde auf verschiedenen Genomabschnitten Allelverluste nachgewiesen, von denen einzelne mit hochmalignen GIST assoziiert waren (Pylkkanen *et al.*, 2003; Sabah *et al.*, 2004).

2. Material und Methodik

Untersucht wurde Gewebe von Gastrointestinalen Stromatumoren, welches intraoperativ in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in den Jahren 1992 bis 2004 gewonnen wurde sowie Serumproben (Follow-Up-Material, FUP), welche den Patienten in zeitlich zumutbaren Intervallen postoperativ entnommen wurden. Als Vergleichsgewebe diente intraoperativ gewonnenes Normalgewebe oder, falls dieses nicht zur Verfügung stand, EDTA-Blut, welches präoperativ zusammen mit dem Vollblut für die Serumgewinnung entnommen wurde. Bis zur weiteren Bearbeitung der Proben wurde das Gewebe bei -80° C und das Serum und EDTA-Blut bei -20 °C gelagert.

Alle Patienten wurden über die Studie informiert und gaben ihr Einverständnis im Sinne eines informed consent.

2.1. DNA-Isolation

2.1.1. DNA-Isolation aus Gewebe

Nach Beurteilung durch den Pathologen, wurden aus dem Paraffinblock 10 Schnitte zur Materialgewinnung sowie 2 Inspektionsschnitte zur Beurteilung des Tumorgehaltes angefertigt. Die Inspektionsschnitte wurden einer H.-E.-Färbung unterzogen. Bei einem Tumorgehalt unter 70% wurde eine Dissektion aller restlichen Schnitte durchgeführt. Das Gewebe wurde mittels Zugabe von 1200 µl Xylol entparaffiniert, für 5min bei 14000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem weiteren Entparaffinierungsschritt mit 600µl Xylol wurde nach Zentrifugation erneut der Überstand verworfen. Das so entstandene Pellet wurde durch zweimaliges Waschen mit Ethanol vom restlichen Xylol befreit. Um Alkoholreste zu entfernen, wurde das Pellet für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 180 µl ATL Puffer aufgefüllt. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit dem Tissue Protocol des QIAamp® DNA Mini Kit der Firma Qiagen.

Daraus ergab sich folgender Ablauf:

1. Zugabe von 20µl Proteinase K, Inkubation auf dem Thermomixer bei 56 °C für mind. 12 Stunden, bis das Gewebe komplett lysiert ist
2. Zugabe von 200µl AL Puffer, mischen, 10min bei 70 °C inkubieren
3. Zugabe von 200µl Ethanol absolut, mischen
4. Überführen in ein sog. QIAamp spin column, Zentrifugation (1 Minute bei 8000rpm), das Filtrat wird verworfen, der Filter in ein neues Gefäß überführt
5. Waschen mit 500µl Puffer AW1, Zentrifugation (1 Minute bei 8000rpm), Filtrat wird verworfen
6. Waschen mit 500µl Puffer AW2, Zentrifugation (erst 1 Minute bei 8000rpm, dann 2 Minuten bei 14000 rpm), Filtrat wird verworfen
7. Zugabe von 200µl Aqua destillata, Inkubation für 3 Minuten bei Raumtemperatur, Zentrifugation (1 Minute bei 8000rpm)

Die so in Aqua destillata gelöste DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C bzw. bei langfristiger Lagerung bei -80 °C gelagert.

Bei wenigen Proben, welche lediglich als Kryo-Gewebe vorlagen, erfolgte die Isolation entsprechend ohne Entparaffinierung.

2.1.2. DNA-Isolation aus dem Serum

Nach Abzentrifugation des Serums wurde das Spin Protocol des QIAamp® Blood Midi Kit angewendet. Dabei wurden 1-2ml Serum verwendet und letztendlich die in 200µl Aqua destillata gelöste DNA bei –20 °C bzw. bei langfristiger Lagerung bei -80 °C eingelagert.

2.1.3. DNA-Isolation aus EDTA-Blut

Entsprechend wurde bei dem EDTA-Blut das QIAamp® Blood Mini Kit angewendet.

2.2. PCR

Für die PCR wurden jeweils 2µl gelöste DNA und 8µl des PCR-Ansatzes (siehe Tabelle 3) verwendet. Die PCR erfolgte im Thermocycler der Firma Biometra®.

Tabelle 3: PCR-Ansatz Taq-Polymerase

Stammlösung	Volumen
Aqua destillata	5 µl
10x PCR-Puffer	1 µl
DNTP's (10mM), Invitrogen®	1µl
Primer, forward[farbmarkiert]+reverse (5pM/µl)	1µl
AmpliTaq Gold® (5U/µl), Applied Biosystems®	0,05 µl

Zum Schutz vor Verdunstung während des PCR-Vorganges, wurde mit Chill-Out™14 Liquid Wax der Firma MJResearch® überschichtet.

Für die verwendeten Primer hat sich gezeigt, dass einheitliche Temperaturen beim PCR-Vorgang möglich sind, wodurch ein Standardablauf mit einer Denaturierung bei 94 °C, dem Annealing bei 55 °C und die Extension bei 72 °C stattfand, welcher in Tabelle 4 dargestellt ist. Bei einzelnen Primer wurde zur Optimierung ein Versuch mit anderen Annealingtemperaturen unternommen, welcher jedoch keine Verbesserung der Darstellbarkeit der Ergebnisse hervorbrachte.

Tabelle 4: PCR-Programm Taq-Polymerase

Schritt	Dauer	Temperatur	Anzahl Wiederholungen	
1	10min	94 °C		
2	30s	94 °C	39	Denaturierung
3	30s	55 °C		Annealing
4	60s	72 °C		Elongation
5	10min	72 °C		
6	∞	4 °C		

Bei einzelnen Proben ließ sich auch nach mehrmaligem Wiederholen kein Ergebnis mit obigem Vorgehen darstellen, so dass in diesen Fällen ein Versuch mit der iProof-Polymerase von BioRad® unternommen wurde. Dieses führte jedoch nur in sehr wenigen Fällen zu einem verwertbaren Ergebnis, so dass

eine komplette Umstellung auf diese Polymerase verworfen wurde. Tabelle 5 und 6 geben die verwendeten Bestandteile und Programmabläufe wieder.

Tabelle 5: PCR-Ansatz iProof-Polymerase

Stammlösung	Volumen
Aqua destillata	3.95 µl
5x iProof™ HF Puffer	2 µl
dNTP's (10mM), Invitrogen®	1µl
Primer, forward[farbmarkiert]+reverse (5pM/µl)	1µl
IProof™ High Fidelity DNA Polymerase, BioRad	0,05 µl

Tabelle 6: PCR-Programm iProof-Polymerase

Schritt	Dauer	Temperatur	Anzahl Wiederholungen	
1	30s	98 °C		
2	5s	98 °C	34	Denaturierung
3	10s	58 °C		Annealing
4	15s	72 °C		Elongation
5	5min	72 °C		
6	∞	4 °C		

2.3. Primer

Die insgesamt 21 verwendeten Primer wurden von der Firma MWG hergestellt, dabei wurden die forward-Primer mit Fluoreszenzfarbstoffen (Tamra, Hex, 6-Fam) zur Identifizierung im Sequenzer AbiPrism® 310 versehen. Die Primersequenzen und ihre Lokalisation wurden der Genom Datenbank (NCBI) entnommen. Ihre Zusammenstellung ist in den Tabellen 7 bis 10 zu erkennen.

Tabelle 7: Mikrosatelliten-Panel

Name	Chromosom	Farbe	Länge		Sequenz
1) D22S683	22	Tamra	168-214bp	For	5'-AAC AAA ACA AAA CAA AAC AAA CA-3'
		Schwarz		Rev	5'-GGT GGA AAT GCC TCA TGT AG-3'
2) D22S685	22	Hex	183bp	For	5'-TTC TTA GTG GGG AAG GGA TC-3'
		Grün		Rev	5'-TGA GTT TGA TGT TTT TGA TAG ACA-3'
3) D22S446	22	6-Fam	159bp	For	5'-TTT CAT ACA ATT CGG TGT GAA TC-3'
		Blau		Rev	5'-CCT AAC CTC TGG TGT TTG GA-3'
4) D22S420	22	Tamra	139bp	For	5'-TGT TCT ACA CTG AAA ATT CTG ACGG -3'
		Schwarz		Rev	5'- GAG GGC GTT ATC CAT GAC C-3'
5) D22S425	22	Hex	132bp	For	5'-AAG ACA CTT GAG GGA ACA CTC-3'
		Grün		Rev	5'-CTT CTG ATG AGT CCA CCT CA-3'
6) D22S445	22	6-Fam	11-130bp	For	5'-GTC CAT CCG TTT GTT TGT TC-3'
		Blau		Rev	5'-TGG ATG GAG AGA AGG AAT GA-3'

Tabelle 8: Mikrosatelliten-Panel II

Name	Chromosom	Farbe	Länge		Sequenz
1) D22S689	22	6-Fam	202-226bp	For	5'-TAT GTA CAG ACC TGC AAC TTG C-3'
		Blau		Rev	5'-CCT GCC TGC CTA TCT ATC TG-3'
2) D22S303	22	Hex	220-233bp	For	5'-AGG ACC TCA GAC TGG TCA GTC-3'
		Grün		Rev	5'-CTC CCA TGA GAA GGT ACA CTC C-3'
3) D22S311	22	Tamra	262bp	For	5'-GCT AGT GTG AGA TAA CGA AGC C-3'
		Schwarz		Rev	5'-TTT TTG TAT TTT TAG TAG AGA CGG-3'
4) D17S804	17	Tamra	160bp	For	5'-GCC TGT GCT GCT GAT AAC C-3'
		Schwarz		Rev	5'-CAC TGT GAT GAG ATG TCA TTC C-3'
5) D9S1748	9	6-Fam	130-150bp	For	5'- CAC CTC AGA AGT CAG TGA GT -3'
		Blau		Rev	5'- GTG CTT GAA ATA CAC CTT TCC -3'
6) D3S1286	3	Hex	120-150bp	For	5'-GCA GTG ACT TCA GAG GGG C-3'
		Grün		Rev	5'-ATT GAC GGG GCT AGG GC-3'

Tabelle 9: Mikrosatelliten-Panel III

Name	Chromosom	Farbe	Länge		Sequenz
1) D17S796	17	6-Fam	165bp	For	5'-CAA TGG AAC CAA ATG TGG TC-3'
		Blau		Rev	5'-AGT CCG ATA ATG CCA GGA TG-3'
2) RB12	13	Tamra		For	5'-ATA CAG GGC TAT GTA TAA CC-3'
		Schwarz		Rev	5'-AGC AGT GAA GGT CTA AGC-3'
3) D13S284	13	6-Fam	138bp	For	5'-ATC AGG TGG AAA CAG AAT TC-3'
		Blau		Rev	5'-TAA AAG GCT AAC TAC GAA GG-3'
4) D3S1038	3	Hex	115bp	For	5'- TCC AGT AAG AGG CTT CCT AG -3'
		Grün		Rev	5'- AAA GGG GTT CAG GAA ACC TG -3'
5) D18S51	18	Hex	263bp	For	5'-GAG CCA TGT TCA TGC CAC TG-3'
		Grün		Rev	5'-CAA ACC CGA CTA CCA GCA AC-3'
6) ---					

Tabelle 10: Mikrosatelliten-Panel IV

Name	Chromosom	Farbe	Länge		Sequenz
1) D17S520	17	Hex	210bp	For	5'-GTA CTG GGC CTC TAA ACT CTA-3'
		Grün		Rev	5'-TTA GGA GAA AGT GAT ACA AGG-3'
2) D9S162	9	Hex	172-196bp	For	5'-GCA ATG ACC AGT TAA GGT TC-3'
		Grün		Rev	5'-AAT TCC CAC AAC AAA TCT CC-3'
3) D9S171	9	Tamra	158-177bp	For	5'- AGC TAA GTG AAC CTC ATC TCT GTCT-3'
		Schwarz		Rev	5'- ACC CTA GCA CTG ATG GTA TAG TCT -3'
4) D13S262	13	6-Fam	270-300bp	For	5'-CTA AAA CAA ACA AAT ACA ACT CC-3'
		Blau		Rev	5'-TTG CTC AAG ATG AAG TCA TG-3'
5) D4S1594	4	Tamra	237-247bp	For	5'-TCA TCT GGG AAC TCA AAA GAG AAG -3'
		Schwarz		Rev	5'- AGA AGA GGT TGA GAT ATA CTA GCC-3'
6) D22S275	22	6-Fam	160-174bp	For	5'- CTC CAG CCT GTG CAA CAGA -3'
		Blau		Rev	5'- GGC TCA ACC CAT CCT CCT -3'

Wie bereits unter 1.4. erwähnt liegen die gewählten Primer in Regionen verschiedener Tumorsuppressorgene, wie NF2, p53, p16, DPC4 und RB. Die Primer auf Chromosom 22 wurden zum Teil in einer Studie mit 42 GISTs verwendet, die einen Bezug in der Pathogenese von Gastrointestinalen Stromatumoren zur Region des Neurofibromatose Gens NF2 herstellte (Pylkkanen *et al.*, 2003).

Die anderen Primer konnten ein Auftreten von LOH in verschiedenen Karzinom- oder Sarkomstudien aufzeigen ((Eisenberger *et al.*, 1999) (Eisenberger *et al.*, 2003)).

2.4. Auswertung

Die Analyse erfolgte mittels Kapillarelektrophorese am AbiPrism® 310 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems gemäß Herstellerangaben. Dafür wurden 0.5µl des PCR-Produkts einem Gemisch aus 40µl Hi-Di Formamid und 0,2µl des Größenstandards GeneScan™ 500 ROX™ zugegeben sowie eine 2 Minuten dauernde Denaturierung bei 94°C durchgeführt, bevor die Analyse erfolgte.

Die Auswertung erfolgte mittels der GeneScan™ Software. Zur Beurteilung des Allelverlustes (Loss of heterozygosity, LOH) wurde das Verhältnis der Ausschläge (Fluoreszenz Intensität) des Normalgewebes zum Tumorgewebe

bzw. zum Serum ermittelt. Dabei kam die vom Hersteller empfohlene Formel zum Einsatz:

$$X = \frac{\frac{\text{Höhe des Allels Normal zwei}}{\text{Höhe des Allels Normal eins}}}{\frac{\text{Höhe des Allels Tumor zwei}}{\text{Höhe des Allels Tumor eins}}}$$

Als loss of heterozygosity wurden Werte von $X \leq 0.5$ und $X \geq 1.5$ definiert. Im Falle von Homozygotie wurde dieses als nicht informativ (Ni) gewertet. Die folgenden Abbildungen zeigen Beispiele für die unterschiedlichen Ergebnisse in verschiedenen Proben. Die obere Grafik bezieht sich jeweils auf das Tumorgewebe, die untere auf das Referenzgewebe.

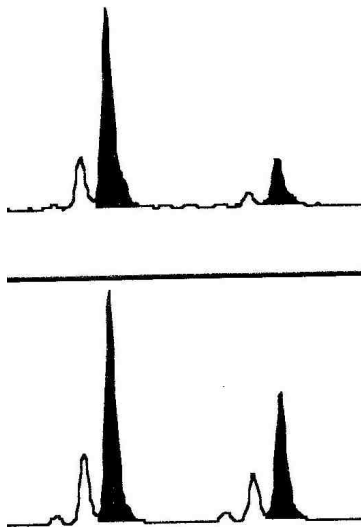


Abbildung 2: LOH in Probe 11562 und dem Primer D22S303.

Die Allel- höhe des Normalgewebes (unten) entspricht den Werten 1841 und 1033, während das Tumorgewebe (oben) einen Wert von 928 und 225 aufweist.



Abbildung 3: Kein Allelverlust in Probe 14562 und dem Primer D22 S445.
Die Allelhöhe des Normalgewebes (unten) entspricht den Werten 1741 und 1287, während das Tumorgewebe (oben) einen Wert von 3761 und 3081 aufweist.

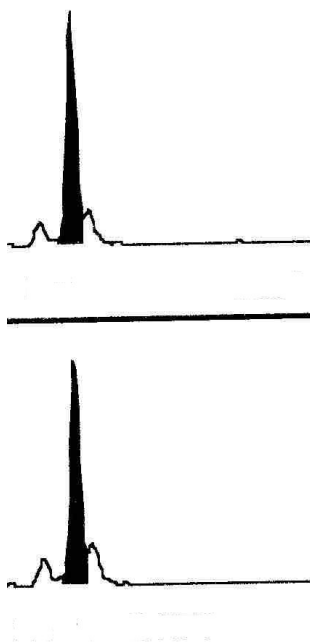


Abbildung 4: Homozygotie/Ni in Probe 15549 und dem Primer D22S446.
Normalgewebe und Tumorgewebe sind homozygot. Ein Allelverlust kann somit nicht beobachtet werden. Die Probe wurde als nicht informativ (Ni) gewertet.

Die Daten bezüglich Geschlecht, Alter, Histopathologie, Tumorgröße, Auftreten von Metastasen sowie der Malignitätskriterien wurden den klinischen und pathologischen Aufzeichnungen entnommen. Auch der klinische Verlauf wurde den Aufzeichnungen entnommen oder durch ambulante Wiedervorstellung beziehungsweise durch telefonischen Kontakt erfasst.

2.5. Statistik

Sämtliche Daten wurden mittels Excel® (Microsoft) aufgearbeitet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistical Package for the Social Science Software Version 11.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois).

Die Berechnung der Überlebenskurven wurde die Kaplan-Meier Methode angewandt. Der Vergleich der Kurven erfolgte mittels des Log-Rang Tests. Zum Vergleich der Einflussfaktoren Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation, Tumorart und -größe, Anzahl von LOH und Fletcher Score wurden Chi-Quadrat Test sowie der Fischer Exakt Text verwendet. Ein p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkollektiv

Untersucht wurde Tumorgewebe von 93 Patienten, die in dem Zeitraum von 1992 bis 2003 in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie mit dem Verdacht eines Weichteiltumors des Gastrointestinaltraktes operiert wurden. Die histologischen Erstdiagnosen umfassten Gastrointestinale Stromatumore, Leiomyome, Leiomyosarkome, Liposarkome, benigne und maligne Schwannome, maligne fibröse Histiozytome sowie Fibrosarkome. Sämtliche Proben wurden durch die Abteilung für Pathologie reklassifiziert und nach der GIST Consensus Criteria in Bezug auf die Malignität eingeteilt (Fletcher *et al.*, 2002). Bei 7 Tumoren zeigte sich im Rahmen der Reklassifizierung eine Änderung der ursprünglich diagnostizierten Tumorentität, so dass insgesamt 60 Patienten mit der Diagnose Gastrointestinaler Stromatumor in die Studie eingebracht wurden. Diese Proben wurden zur weiteren Untersuchung verwendet.

Tabelle 11: Untersuchte Tumore

	Erstdiagnose	Reklassifizierung
Gesamt	93	93
GIST	53	60
Andere ¹	40	33

¹: Leiomyome, Leiomyosarkome, Liposarkome, benigne und maligne Schwannome, maligne fibröse Histiozytome, Fibrosarkome

3.2. Malignitätsgrad

Die Gewebeproben wurden nach den Konsensus Kriterien eingeteilt (Fletcher *et al.*, 2002). Hierbei ergab sich folgende Verteilung:

Tabelle 12: Malignität

Risikostratifizierung	Anzahl Patienten
Very low risk	4
Low risk	16
Intermediate risk	16
High risk	13
Metastasiert	11

Zur besseren Darstellbarkeit und Übersichtlichkeit wurden die Malignitätskriterien in 2 Gruppen aufgeteilt. Die nach den Konsensus Kriterien in very low, low und intermediate eingeteilten Tumore wurden in die Gruppe der eher niedrig malignen GIST aufgenommen, high risk GIST sowie metastasierte GIST wurden in die Gruppe der hochmalignen GIST aufgenommen.

Elf Patienten (18,3%) wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung Metastasen auf.

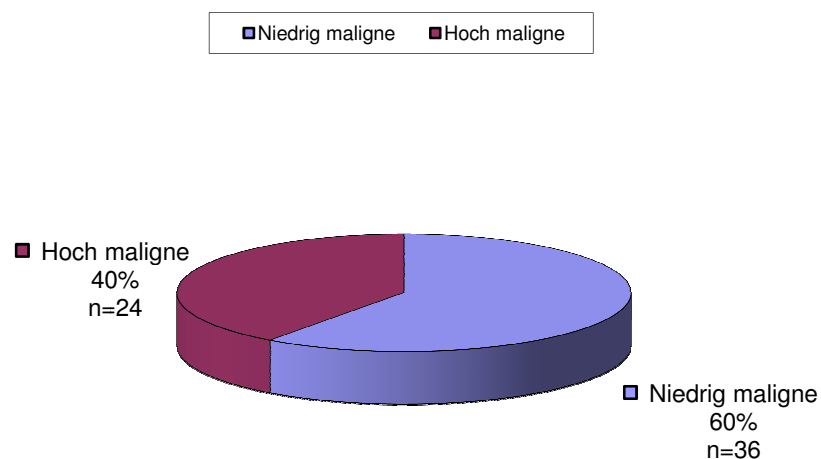


Abbildung 5: Malignitätsgrad

3.3. Demographische Daten

Die Studie schloss letztendlich insgesamt 36 männliche Patienten und 24 weibliche Patienten ein. Die Geschlechterverteilung zeigte sich in Bezug auf den Malignitätsgrad des Tumors mit einem p-Wert von 0,06 als statistisch nicht signifikant.

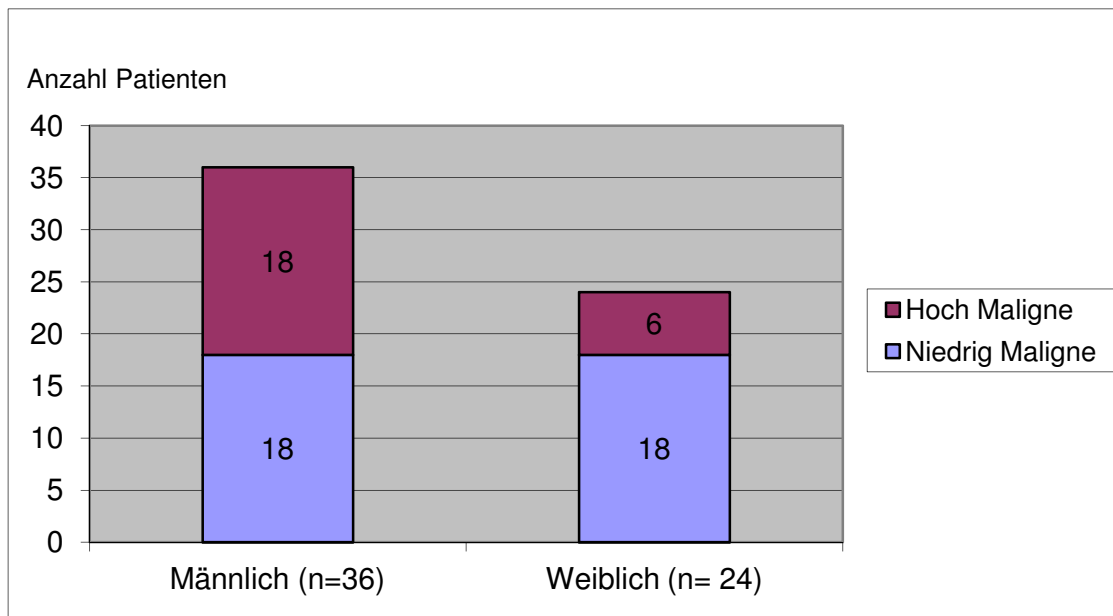


Abbildung 6: Geschlechterverteilung

Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation betrug 59,3 Jahre, mit einer Bandbreite von 23 bis 80 Jahren.

3.4. Beobachtungszeitraum

Der mediane Nachbeobachtungszeitraum der 60 eingeschlossenen Patienten betrug 33,3 Monate mit einem Konfidenzintervall (95%) von 23,9 bis 42,6 Monaten.

3.5. Tumorlokalisation

Die von uns untersuchten Tumore kamen wie in Abbildung 7 dargestellt im gesamten Gastrointestinaltrakt vor. Die Verteilung zwischen niedrig malignen und hoch malignen Gastrointestinalen Stromatumoren in den unterschiedlichen Lokalisationen zeigte sich als statistisch nicht signifikant ($p=0,154$).

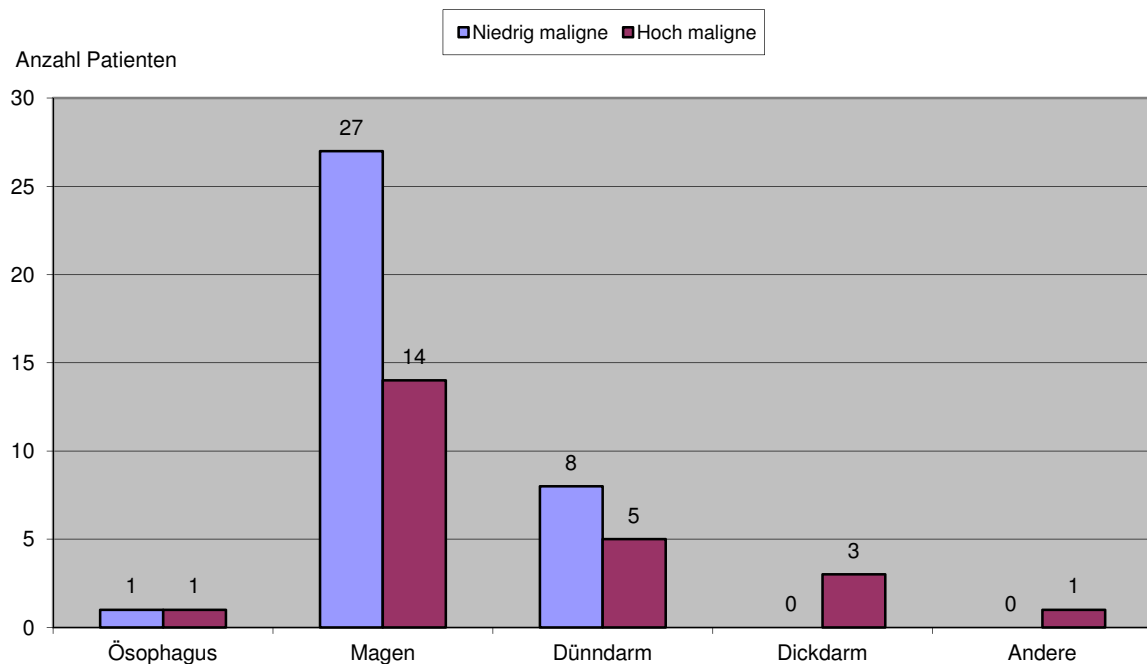


Abbildung 7: Verteilung der Tumorlokalisationen in Bezug auf die Malignität

3.6. Mutationsanalyse

Bei 29 Patienten wurde eine Analyse auf KIT aktivierende Mutationen durchgeführt. In diesem Kollektiv zeigten sich weder Mutationen im Exon 9 noch andere seltene Mutationen. Erstaunlicherweise wurde, entgegen der aktuellen Literatur, lediglich bei 11 Proben eine Mutation in Exon 11 nachgewiesen. Die restlichen 18 Tumore zeigten sich als wild-type GIST. Dieser Unterschied zeigte sich jedoch in Bezug auf die Malignität als statistisch nicht signifikant ($p=0,237$) (Abb. 8).

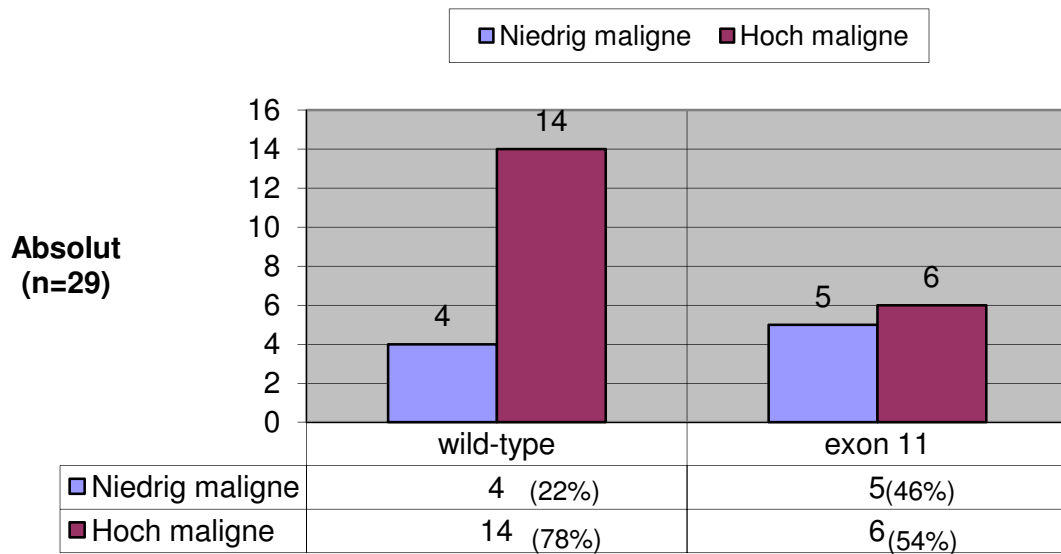


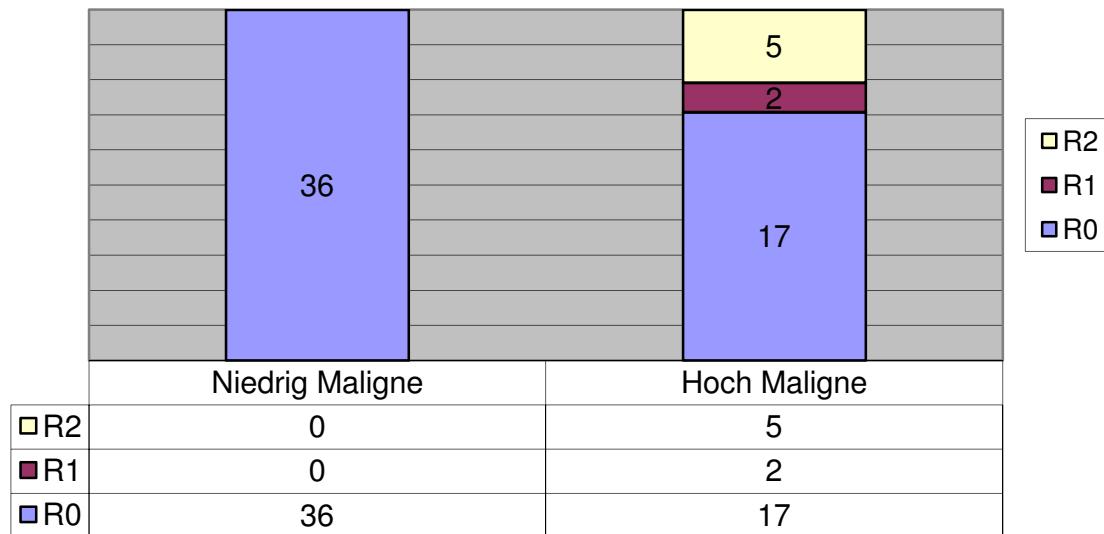
Abbildung 8: Mutationsanalyse

3.7. Resektionsausmaß

Das Ausmaß der chirurgischen Resektion zeigte sich, wie in Abbildung 9 zu sehen, abhängig vom Malignitätsgrad des Tumors. Bei insgesamt 54 Patienten war eine vollständige Resektion möglich (R0), bei 2 Patienten fand sich ein mikroskopischer Residualtumor (R1) und bei 5 Patienten verblieb ein makroskopischer Residualtumor (R2).

Mit einem p-Wert von 0,003 zeigte sich ein statistisch signifikanter Wert in Bezug auf die Möglichkeit der vollständigen Resektion. Dieses war zu erwarten, da die Malignitätsgrade wie bereits oben beschrieben, die Größe des Primärtumores beinhalten.

Anzahl Patienten

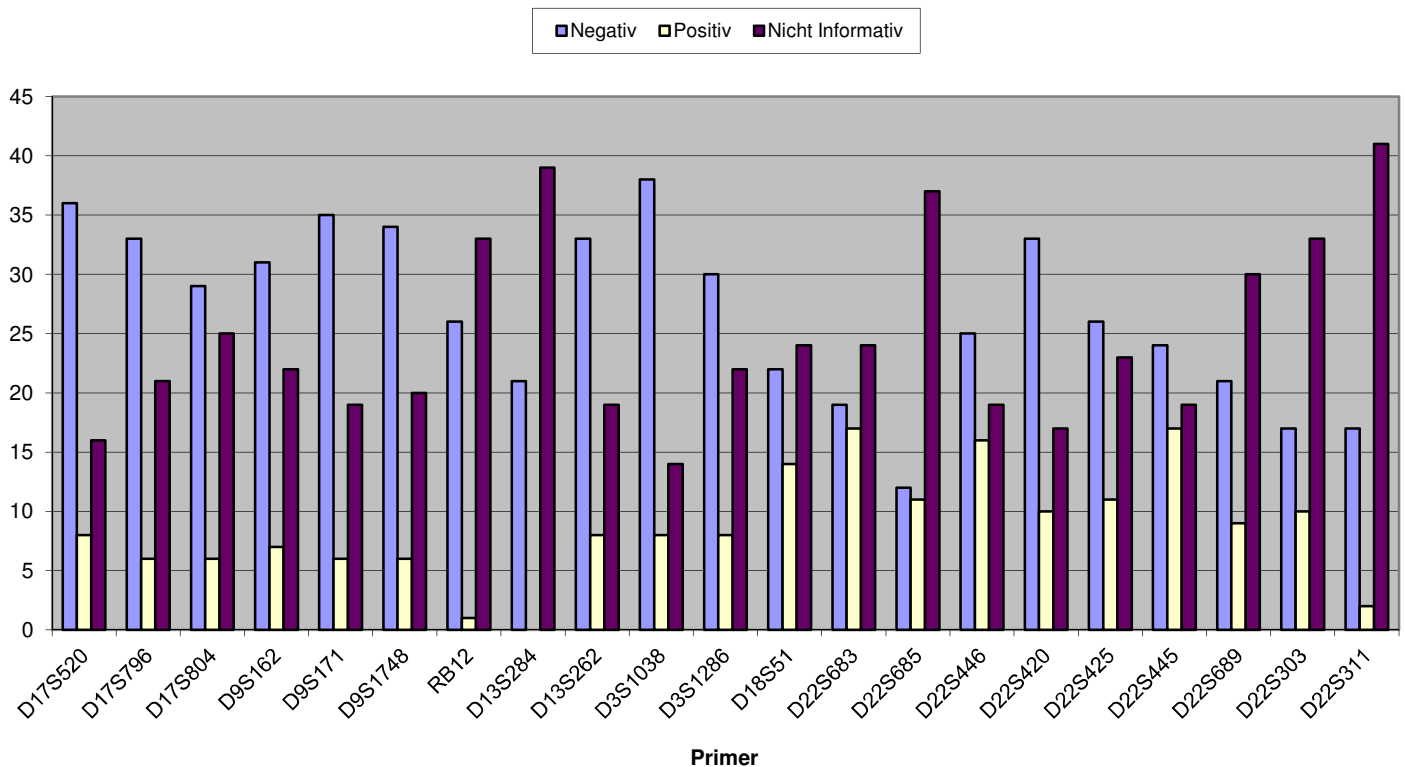
**Abbildung 9: Resektionsausmaß nach Malignitätsgrad****3.8. Inzidenz von *Loss of heterozygosity***

Loss of heterozygosity konnte in allen Tumoren unabhängig vom Malignitätsgrad nachgewiesen werden.

Häufig kam es zum Auftreten von LOH an mehreren verschiedenen Markern. Bei 28 von 60 Tumoren (46,7%) konnten mehr als zwei LOH mittels der 21 verschiedenen Marker festgestellt werden. Die Frequenz des Auftretens von LOH variierte in den verschiedenen Markern zwischen 0% und 28,3%. (Tab.13). Bei allen Tumoren wurden im unterschiedlichen Ausmaß homozygote Allele gefunden, so dass diese als nicht informativ gewertet wurden.

Mikrosatelliteninstabilitäten konnten lediglich im Serum einer Patientin nachgewiesen werden. Die Daten der Serumauswertung fließen nicht in diese Auswertung mit ein.

Tabelle 13: Inzidenz LOH nach Primer



Marker	Negativ	Negativ %	Positiv	Positiv %	Nicht Informativ	Nicht Informativ %	Val. negativ	Val. positiv
D17S520	36	60,0	8	13,3	16	26,7	81,8	18,2
D17S796	33	55,0	6	10,0	21	35,0	84,6	15,4
D17S804	29	48,3	6	10,0	25	41,7	82,9	17,1
D9S162	31	51,7	7	11,7	22	36,7	81,6	18,4
D9S171	35	58,3	6	10,0	19	31,7	85,4	14,6
D9S1748	34	56,7	6	10,0	20	33,3	85,0	15,0
RB12	26	43,3	1	1,7	33	55,0	96,3	3,7
D13S284	21	35,0	0	0,0	39	65,0	100,0	0,0
D13S262	33	55,0	8	13,3	19	31,7	80,5	19,5
D3S1038	38	63,3	8	13,3	14	23,3	82,6	17,4
D3S1286	30	50,0	8	13,3	22	36,7	78,9	21,1
D18S51	22	36,7	14	23,3	24	40,0	61,1	38,9
D22S683	19	31,7	17	28,3	24	40,0	52,8	47,2
D22S685	12	20,0	11	18,3	37	61,7	52,2	47,8
D22S446	25	41,7	16	26,7	19	31,7	61,0	39,0
D22S420	33	55,0	10	16,7	17	28,3	76,7	23,3
D22S425	26	43,3	11	18,3	23	38,3	70,3	29,7
D22S445	24	40,0	17	28,3	19	31,7	58,5	41,5
D22S689	21	35,0	9	15,0	30	50,0	70,0	30,0
D22S303	17	28,3	10	16,7	33	55,0	63,0	37,0
D22S311	17	28,3	2	3,3	41	68,4	89,5	10,5

3.9. Loss of heterozygosity nach Malignitätsgrad

Der Vergleich des Auftretens von LOH und dem Malignitätsgrad des Tumors zeigte, dass die Häufigkeit von LOH an mehreren Marker statistisch signifikant mit einem höheren Malignitätsgrad korreliert.

Tabelle 14: Crosstable der Risikogruppen

Chromosom	Assoziierte Onkogene	Niedrig Maligne n (%)	Hoch Maligne n (%)	p-Wert
Alle (3,9,13,17,18,22)	p53, NF, p16, RB, DPC4, andere			<0,001
0-2 LOH		26 (43,3)	6 (10,0)	
3-11 LOH		10 (16,7)	18 (30,0)	
Chromosom 17 (n=3)	p53			0,011
0-1 LOH		36 (60,0)	18 (30,0)	
2-3 LOH			6 (10,0)	
Chromosom 9 (n=3)	p16			0,030
0-1 LOH		36 (60,0)	21 (35,0)	
2-3 LOH			3 (5,0)	
Chromosom 13 (n=3)	RB			0,077
0-1 LOH		33 (55,0)	18 (30,0)	
2-3 LOH		3 (5,0)	6 (10,0)	
Chromosom 3 (n=2)	DPC4			0,224
0 LOH		29 (48,3)	16 (26,7)	
1-2 LOH		7 (11,7)	8 (13,3)	
Chromosom 18 (n=1)	Unbekannt			0,383
0 LOH		29 (48,3)	17 (28,3)	
1 LOH		7 (11,7)	7 (11,7)	
Chromosom 22 (n=9)	NF, unbekannt			0,001
0-2 LOH		30 (50,0)	10 (16,7)	
3-7 LOH		6 (10,0)	14 (23,3)	

3.10. Überleben

Mithilfe der klinischen Daten wurde die Korrelation des Auftretens von Loss of Heterozygosity zur Tumordignität untersucht. Auch hierfür wurden die Patienten in zwei Gruppen in Anlehnung an die Konsensus Kriterien eingeteilt. Very low, low und intermediate Tumore wurden in die Gruppe der eher niedrig malignen GIST aufgenommen, während high risk GIST sowie metastasierte GIST in die Gruppe der hochmalignen GIST eingeteilt wurden. Durch Kaplan-Meier Analysen wurden das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben dargestellt (Abb. 10 und 11).

Während des Nachbeobachtungszeitraumes verstarben insgesamt 20 der 60 Patienten, wobei in der Gruppe der niedrigmalignen Tumore 6 von 36 Patienten verstarben und in der Gruppe der hochmalignen Tumore 14 von 24 Patienten verstarben.

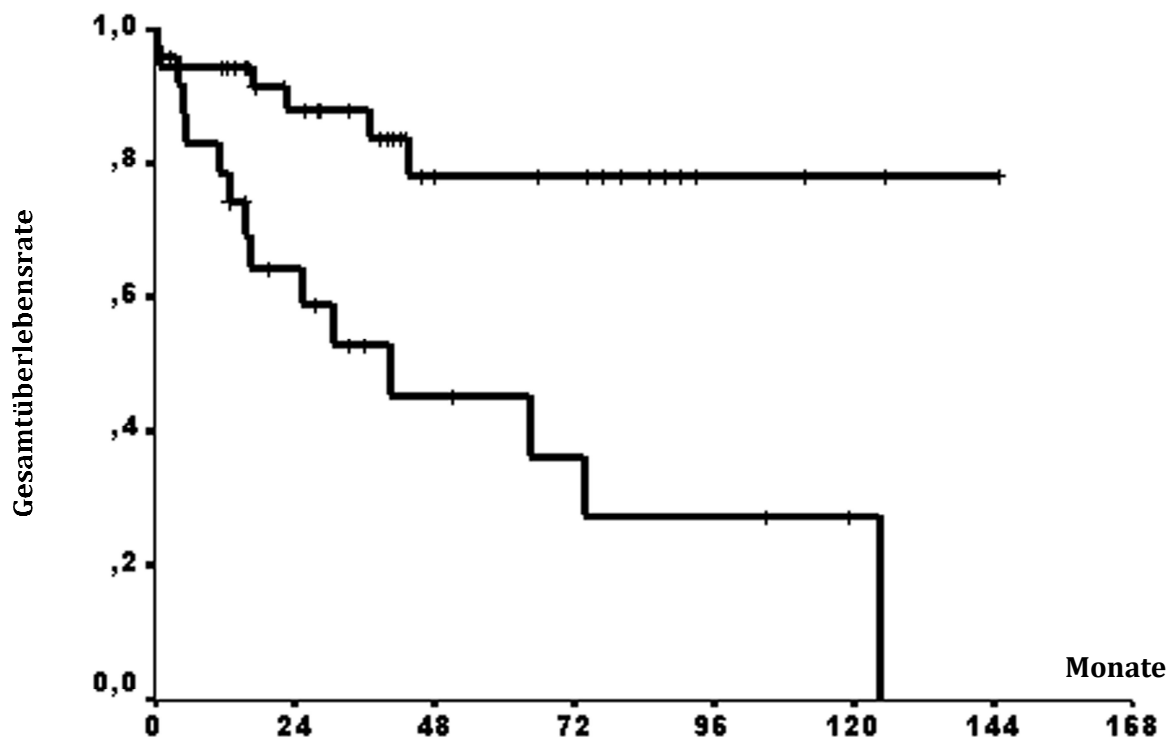


Abbildung 10: Gesamtüberleben (in Anzahl Monaten) in der Gruppe der niedrigmalignen Tumore (n=36, obere Kurve) gegenüber hochmalignen Tumoren (n=24, untere Kurve) $p=0,005$

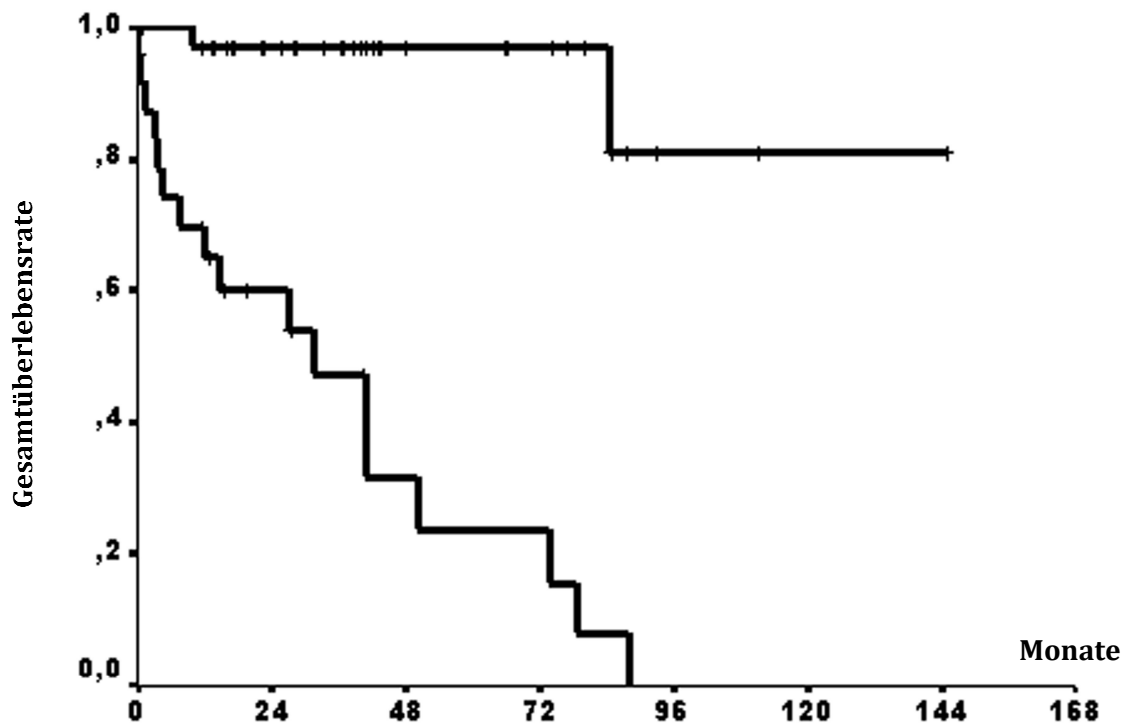


Abbildung 11: Krankheitsfreies Überleben (in Anzahl Monaten) in der Gruppe der niedrigmalignen Tumore (n=36, obere Kurve) gegenüber hochmalignen Tumoren (n=24, untere Kurve) $p<0,001$

Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit niedrigmalignen Tumoren signifikant länger überleben ($p=0,005$) mit einer längeren krankheitsfreie Überlebensdauer ($p=0,001$) (Abb. 10 und Abb. 11).

Auch in der multivariaten Analyse zeigte sich erwartungsgemäß, dass hochmaligne Tumore gegenüber niedrigmalignen Tumoren ein Relatives Risiko bezogen auf das Gesamtüberleben von 4,237 haben (95%-Konfidenzintervall 1,397-12,851). Dieser Wert zeigte sich mit einem p-Wert von 0,011 als statistisch signifikant.

3.10.1. Überleben in Bezug auf das Auftreten von LOH

Das Auftreten von drei und mehr loss of heterozygosity in dem von uns verwendeten Primer Panel zeigte einen statistisch signifikanten Einfluss sowohl auf das Gesamt- als auch auf krankheitsfreies Überleben.

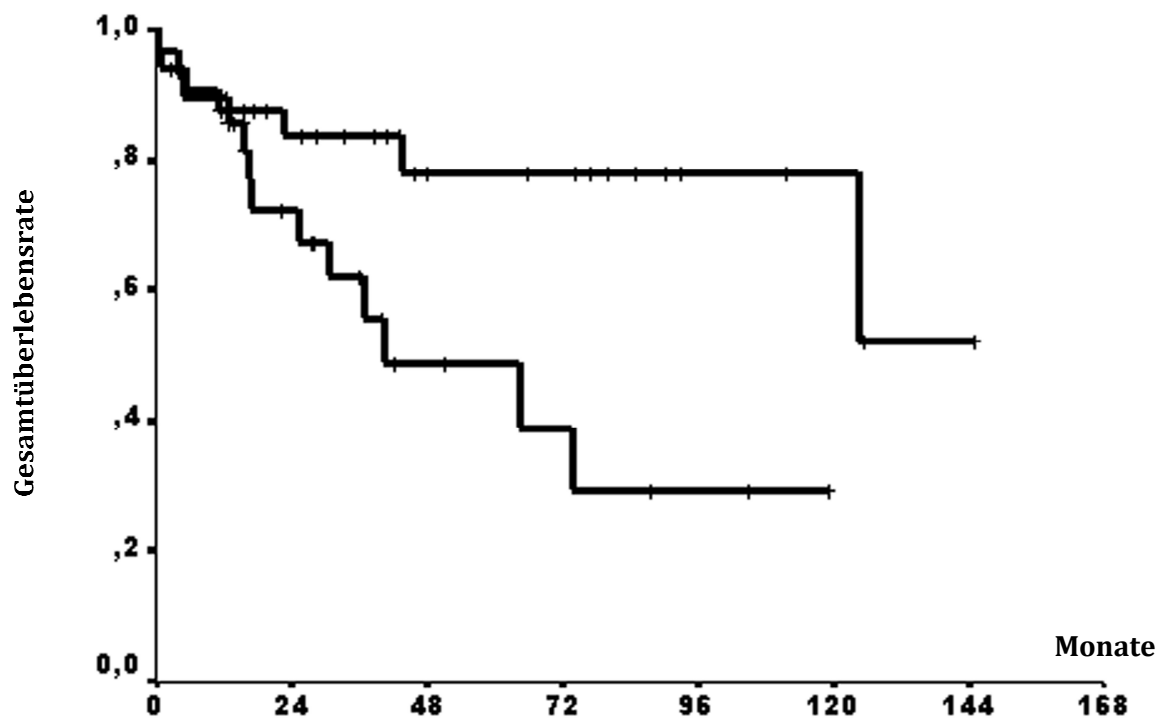


Abbildung 12: Gesamtüberleben (in Anzahl Monaten) aller Patienten mit 0-2 LOH (n=32, obere Kurve) gegenüber 3 und mehr LOH (n=28, untere Kurve) $p<0,013$

Wie in Abbildung 12 dargestellt, konnte außerdem gezeigt werden, dass Patienten mit 0-2 LOH signifikant länger Überleben als Patienten mit 3 oder mehr LOH ($p=0,013$).

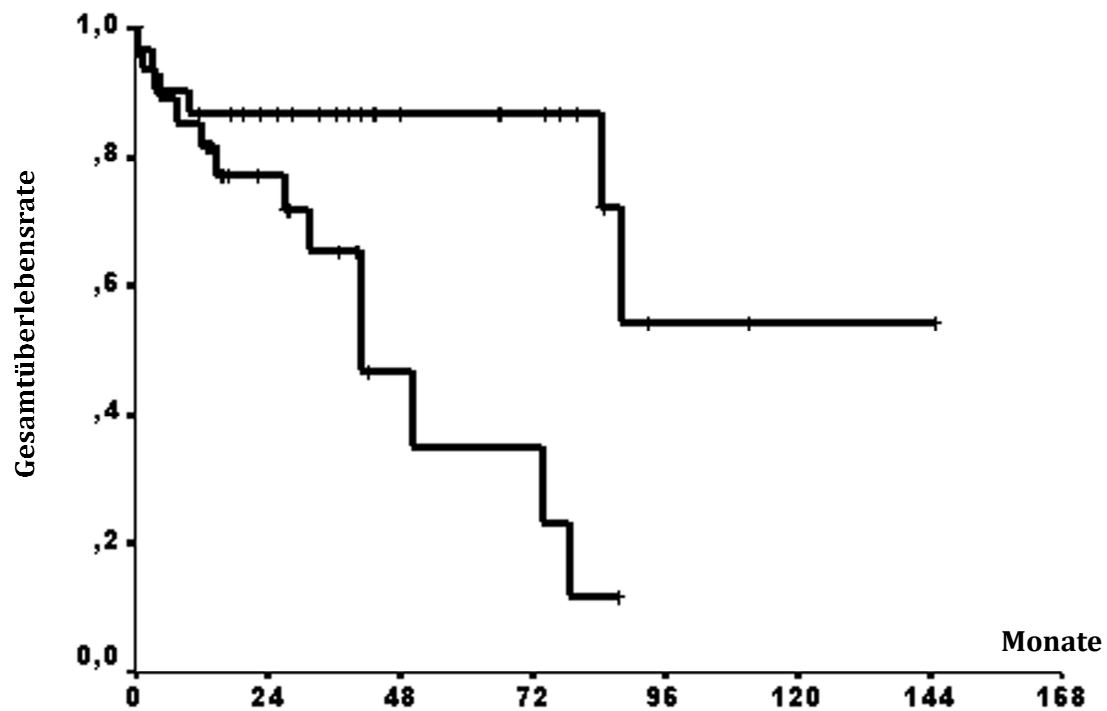


Abbildung 13: Krankheitsfreies Überleben (in Anzahl Monaten) aller Patienten mit 0-2 LOH (n=32, obere Kurve) gegenüber 3 und mehr LOH (n=28, untere Kurve) $p<0,003$

Genauso zeigten Patienten mit 0-2 LOH ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben als Patienten mit 3 und mehr LOH in allen verwendeten Primern ($p<0,003$).

3.10.2. Überleben in Bezug auf das Auftreten von LOH in einzelnen chromosomalen Regionen

Das Auftreten von LOH im Bereich des Chromosoms 22 zeigte sich für die Gesamtprognose mit einem p-Wert von $p=0,11$ als nicht signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte sich das Auftreten eines LOH im Bereich des Chromosoms 17 als prognostischer Faktor. Das Auftreten von LOH in den weiteren untersuchten chromosomalen Regionen erwies sich als nicht signifikant in Bezug auf das krankheitsfreie und Gesamtüberleben.

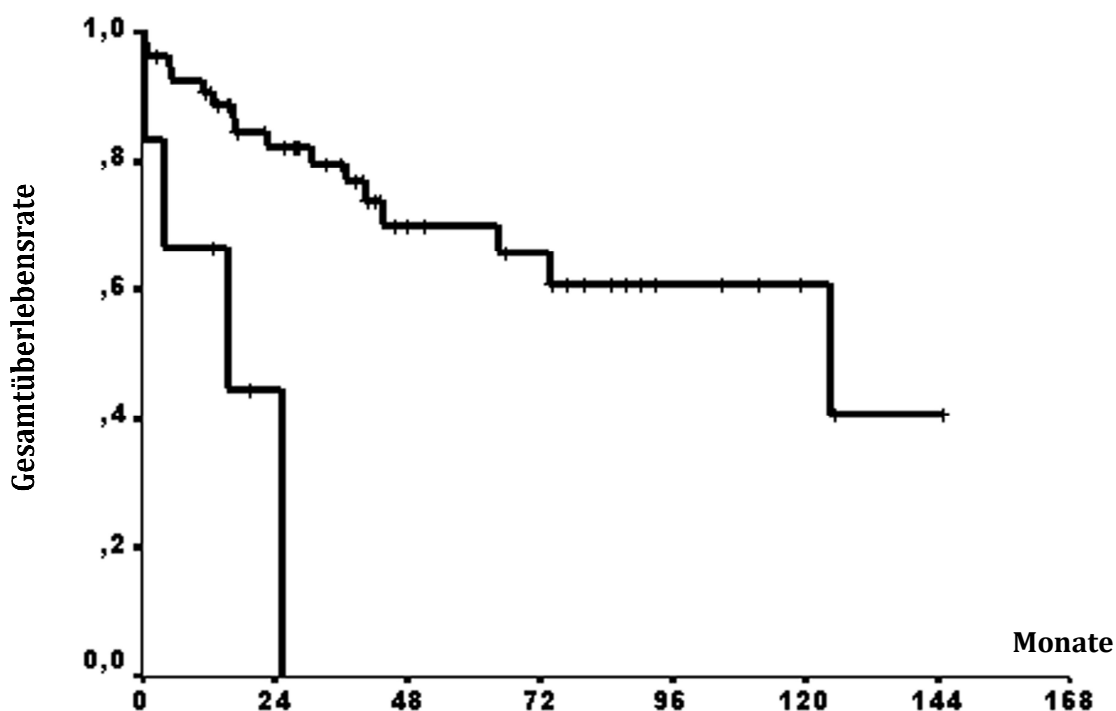


Abbildung 14: Gesamtüberleben aller Patienten mit 0-1 LOH in der Region des Markers D17S520-804 (n=54, obere Kurve) gegenüber 2 und mehr LOH in dieser Region (n=6, untere Kurve) $p<0,001$

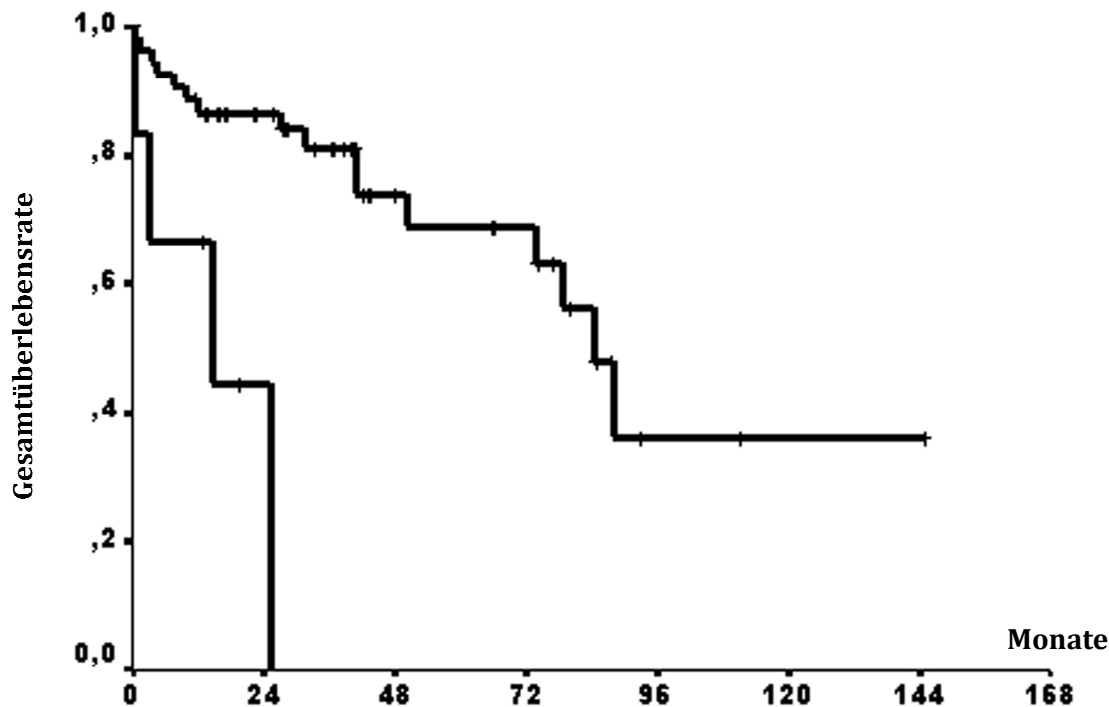


Abbildung 15: Krankheitsfreies Überleben aller Patienten mit 0-1 LOH in der Region des Markers D17S520-804 (n=54, obere Kurve) gegenüber 2 und mehr LOH in dieser Region (n=6, untere Kurve) $p < 0,001$

Auch in der von uns durchgeführten Cox Regressionsanalyse zeigte sich das Auftreten von zwei und mehr Loss of Heterozygosity in der Region des Chromosoms 17 als unabhängiger Risikofaktor für das Gesamtüberleben. Das Auftreten von 2 und mehr LOH in dieser Region ergab bezüglich des Relativen Risikos von 2,140 bei einem 95%-Konfidenzintervall von 1,110 bis 4,124 einen statistisch signifikanten Wert (p-Wert $< 0,023$).

Andere unabhängige Risikofaktoren wie z.B. das Alter über 60 Jahre oder das Geschlecht erwiesen sich als nicht signifikant (p-Wert 0,126 bzw. 0,407).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Auftretens von Loss of Heterozygosity in verschiedenen Regionen des Genoms auf das Überleben bei insgesamt 60 Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren untersucht.

In dem untersuchten Gesamtpatientenkollektiv (n=93) wurden neben Gastrointestinalen Stromatumoren auch abdominelle Leiomyome, Leiomyosarkome, Liposarkome, benigne und maligne Schwannome, maligne fibröse Histiozytome sowie Fibrosarkome eingeschlossen. Bei 53 Patienten lag bereits die Diagnose eines gastrointestinalen Stromatumors vor. Eine Nachuntersuchung aller Patienten ergab in sieben Fällen eine Diagnoseänderung im Sinne eines Gastrointestinalen Stromatumors nach Anwendung der gültigen Diagnosekriterien (Fletcher *et al.*, 2002). Derartige Fehldiagnosen wurden vormals gehäuft beobachtet und beruhen am ehesten auf der Tatsache, dass die Tumorentität GIST erstmalig 1992 beschrieben wurde und erst in den folgenden Jahren die Diagnostik dieser Tumore vervollständigt werden konnte (Kitamura, 2008). Abschließend wurden n=60 in die statistische Auswertung, die dieser Arbeit zugrunde liegen, eingebracht.

Die Geschlechterverteilung in der Untersuchungsgruppe belief sich auf 36 männliche Patienten und 24 weibliche Patienten. Auch wenn hier ein leichtes Überwiegen des männlichen Geschlechts vorliegt, zeigte sich dieses jedoch nicht als statistisch signifikant. Einzelne Studien zeigten zwar ein leichtes Überwiegen des männlichen Geschlechts, allerdings überwiegt in der Literatur ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis (DeMatteo *et al.*, 2000). Im beschriebenen Patientenkollektiv zeigte sich die Geschlechterverteilung in Bezug auf den Malignitätsgrad des Tumors mit einem p-Wert von 0,06 zwar als statistisch nicht signifikant, jedoch zeigte sich hier eine deutliche Tendenz für das Auftreten von hochmalignen Tumoren bei Patienten männlichen Geschlechts.

Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation betrug 59,3 Jahre. Der jüngste in dieser Arbeit aufgenommene Patient war zu diesem Zeitpunkt 23 Jahre, der älteste Patient 80 Jahre alt. Die Altersverteilung

entspricht damit weitestgehend der in der Literatur angegebenen Verteilung (Rubin, 2006).

Ebenso stimmt die Tumorlokalisation in dem eingeschlossenen Patientenkollektiv mit den in der Literatur angegebenen Lokalisationen annähernd überein (Corless *et al.*, 2004). Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass sich das verwendete Patientenkollektiv hinsichtlich der demografischen Daten gut für die Analyse von Verlaufsdaten geeignet ist.

Bei der Tumorentstehung kommt es zu verschiedenen Veränderungen auf genetischer Ebene. Laut der Knudsonhypothese ist für die Tumorentstehung zunächst die Aktivierung von Onkogenen und die Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen notwendig (Knudson, 1996). Das Auftreten von Loss of Heterozygosity beschreibt den Verlust eines kompletten Mikrosatellitenallels. Beim Auftreten von Loss of Heterozygosity in Bereichen von Tumorsuppressorgenen kann es daher zu einer Inaktivierung dieser Regionen kommen.

Wie bereits beschrieben spielt Loss of Heterozygosity eine wichtige Rolle bei der Prognose verschiedener Malignome und hat stark an klinischer Bedeutung, z.B. bei der Therapie des hereditären Kolonkarzinoms gewonnen (Ribic *et al.*, 2003). Es wurde eine starke Assoziation zwischen dem Auftreten von LOH und dem Malignitätsgrad von GIST nach den Konsensus Kriterien von 2001 beobachtet. Dieses war zu erwarten, da verschiedene vorherige Studien bereits Assoziationen zwischen DNA Veränderungen und den Tumoreigenschaften von Gastrointestinalen Stromatumoren zeigten (Fukasawa *et al.*, 2000; Lasota *et al.*, 2001; Lasota *et al.*, 2003; Lasota *et al.*, 2005; Pylkkanen *et al.*, 2003).

Aufgrund der vorliegenden Verlaufsdaten der Patienten mit einem durchschnittlichen Beobachtungszeitraum von 33,3 Monaten, konnte erstmals die prognostische Bedeutung des Auftretens von LOH beurteilt werden. Hierbei zeigte sich, dass das Auftreten von LOH die Prognose beeinflusst. Durch die Bildung von Risikogruppen zeigte sich, dass das Auftreten von mehr als 2 LOH bei den jeweiligen Patienten mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Da eine hohe Anzahl an LOH ein Zeichen für eine hohe regenerative Instabilität

darstellt, war die Assoziation von LOH mit einer schlechten Prognose nicht unerwartet.

Es wurden 21 LOH Marker in 60 GIST untersucht. Die Mikrosatellitenmarker D3S1038, D3S1286, D4S1594, D9S162, D9S171, D9S1748, D13S262, D13S284, D17S520, D17S796, D17S804, D18S51, D22S275, D22S303, D22S311, D22S420, D22S425, D22S446, D22S445, D22S683, D22S685, D22S689 und RB12 wurden aufgrund ihrer Lokalisation in der Nähe von bekannten Tumorsuppressorgen ausgewählt. Bei diesen Tumorsuppressorgen handelt es sich um NF2, p53, p16, DPC4 und RB.

Bei der näheren Analyse der einzelnen Marker bestätigten sich sowohl die Häufigkeit des Auftretens von LOH im Bereich des Chromosoms 22, als auch die Assoziation der Malignität von GIST mit dem Auftreten von LOH in diesem Bereich. Im untersuchten Patientenkollektiv zeigte sich allerdings wider erwarten kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von LOH im Bereich Chromosom 22 und dem Gesamtüberleben. Verluste von DNA Material im Bereich des Chromosoms 22 in GIST konnten bereits 1996 nachgewiesen werden (el-Rifai *et al.*, 1996). Der Nachweis von Chromosomenalterationen im Bereich des langen Armes von Chromosom 22 zeigte später eine Assoziation mit dem Malignitätsgrad der untersuchten Tumore (Kim *et al.*, 2000). Im Bereich des Chromosoms 22q12 liegt das Tumorsuppressorgen NF2, dessen Bedeutung für die Pathogenese von GIST von Fukasawa *et al* vermutet (Fukasawa *et al.*, 2000), allerdings von Pylkkanen *et al* auf Basis einer Sequenzierung dieses Bereiches angezweifelt wurde (Pylkkanen *et al.*, 2003). Andere Studien vermuten das Vorhandensein eines weiteren, bisher unbekannten Tumorsuppressorgens in der Nähe von NF2. (Versteeg *et al.*, 1998). So bleibt die Ursache der Assoziation von Malignität und dem Auftreten von LOH im Bereich des langen Armes von Chromosom 22 vorerst weiterhin unklar.

Der Nachweis von mehr als 2 Loss of Heterozygosity im Bereich des Chromosom 9 zeigte ebenfalls einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Malignität von Gastrointestinalen Stromatumoren. Auf dem Chromosom 9 liegt

das Tumorsuppressorgen P16, welches den Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2) kodiert. In Gastrointestinalen Stromatumoren konnte in zwei Studien gezeigt werden, dass p16 positive Tumore mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Schmieder *et al.*, 2008; Schneider-Stock *et al.*, 2005). Dieser Effekt auf das Überleben konnte in den hier verwendeten Proben nicht nachgewiesen werden. Hierbei ist zu beachten, dass lediglich bei drei Proben mehr als zwei LOH im Bereich des Chromosom 9 nachgewiesen werden konnten, so dass diese geringe Fallzahl eine nähere Analyse erschwert.

Der größte Einfluss als Einzelmarker sowohl auf das Gesamt- als auch auf das Tumorfremie Überleben zeigte sich beim Auftreten von LOH im Bereich des Chromosom 17. Auf dem Chromosom 17p liegt das Tumorsuppressorgen p53. p53 steht in Verbindung mit dem Tumorstachstum in einer Vielzahl von Tumorentitäten (Lane, 1992). Die Bedeutung von p53 in Gastrointestinalen Stromatumoren ist bislang umstritten. Während einige Autoren einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Mutationen im p53 Gen und dem Malignitätsgrad bei GIST nachweisen konnten (Al-Bozom, 2001; Chang *et al.*, 1998), gibt es diesbezüglich auch widersprüchliche Studien (Lopes *et al.*, 1998). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Studienlage zu der Bedeutung von p53 in GIST könnten die unterschiedlich verwendeten Tumorstoben sein. In einer Studie zu 105 GIST fanden die Autoren mittels Immunhistochemie heraus, dass p53 in GIST verschiedener Tumorstokalisationen anders differenziert ist und folgerten aus ihren Daten, dass die Immunhistochemie bei GIST des Magens eine unabhängige prognostische Rolle spielen kann (Feakins, 2005). In der gleichen Studie wurde eine p53 Überexpression vor allem bei GIST des Dünndarmes nachgewiesen. Es ist bekannt, dass auch die Tumorstokalisation alleine eine prognostische Bedeutung besitzt, wobei GIST des Magens im Vergleich zu anderen Lokalisationen eine bessere Prognose besitzen (Emory *et al.*, 1999).

Allerdings zeigte sich in unseren aktuellen Daten kein statistischer Unterschied bezüglich der Lokalisation des Tumors und der Malignität. Unter Berücksichtigung der Patientenanzahl sind sicherlich weitere Studien zum Auftreten von LOH in dem Bereich des Chromosom 17p notwendig. Allerdings konnten wir zeigen, dass es beim Auftreten von LOH in dieser Region zu einem

deutlich verkürztem Überleben bei Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren kommt.

Für diese Studie wurden die Patienten nach den Kriterien der GIST Consensus Group 2001 klassifiziert (Fletcher *et al.*, 2002). Diese Klassifikation ist allgemein anerkannt für die Risikobeurteilung von resezierten Tumoren. Im untersuchten Patientenkollektiv zeigte sich eine sehr gute Reflektion der Konsensus Kriterien bezüglich des Outcomes der Patienten. Trotzdem bestehen weiterhin einige Unsicherheiten hinsichtlich des Outcomes in Zusammenhang mit den Konsensus Kriterien von 2001, so dass eine weitergehende Risikostratifizierung notwendig wird.

Die Daten zeigten einen signifikanten Einfluss von LOH in den verschiedenen Mikrosatellitenlokalisationen auf das krankheitsspezifische Überleben sowie auf das Gesamtüberleben. Damit ergibt sich eine gute Praktikabilität und Vergleichbarkeit für die Anwendung in der Labordiagnostik. Die Analyse von LOH ist somit ein potentiell wertvolles zusätzliches diagnostisches Werkzeug für die Einschätzung der Prognose.

Ein weiteres Ziel unserer Arbeitsgruppe war der Nachweis von Loss of Heterozygosity im Serum von Tumorpatienten. Bereits 1975 konnte gezeigt werden, dass im Blut von Tumorpatienten die Konzentration von frei zirkulierender DNA deutlich erhöht ist (Leon *et al.*, 1975). Dabei zeigten sich Mikrosatellitenalterationen im Blut übereinstimmend mit den Alterationen im Primärtumor (Bruhn *et al.*, 2000). Die klinische Bedeutung von LOH im Serum von Tumorpatienten konnte in verschiedenen Tumorentitäten, wie z.B. Ösophagus- und Nierenzellkarzinomen nachgewiesen werden (Eisenberger *et al.*, 1999; Eisenberger *et al.*, 2003; Gonzalgo *et al.*, 2002). Auf Basis der oben genannten Primer konnten wir ein Panel entwickeln, welches bei dem Nachweis von Tumor-DNA im Serum von GIST Patienten verwendet wurde. Hierbei konnte gezeigt werden, dass LOH in diesen Regionen in den präoperativen Serumproben spezifisch bei GIST Patienten und nicht in den gängigen Differentialdiagnosen wie Leiomyomen, Leiomyosarkomen und Schwannomen auftritt (Schurr *et al.*, 2009). Ebenso konnte in den postoperativen Seren eine

gute Korrelation des Auftretens eines Rezidives mit dem Vorhandensein eines positiven LOH-Scores von 2 oder mehr LOHs in dem verwendeten Primer Panel nachgewiesen werden.

Zirkulierende DNA von Tumorpatienten ist im Gegensatz zu gesunden Probanden erhöht und verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Konzentration dieser freien DNA im Verlauf einer effektiven Therapie abfallen kann (Leon *et al.*, 1977; Sozzi *et al.*, 2001).

Wie bereits oben einleitend beschrieben, weist ein Großteil der Patienten im Verlauf einen Tumorprogress unter Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren auf (Blanke *et al.*, 2008b; Verweij *et al.*, 2004). Bisher dienen nur bildgebende Verfahren, wie die Positronen Emissions Tomographie (PET), zum Monitoring einer Chemotherapie bei Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren (Choi *et al.*, 2004). Der Nachweis von LOH im Serum von Tumorpatienten könnte somit einen potentiellen Marker zum Therapiemonitoring unter laufender Therapie von Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren darstellen.

5. Zusammenfassung

Gastrointestinale Stromatumore (GIST) stellen den häufigsten mesenchymalen Tumor des Gastrointestinaltraktes dar und können sowohl ein benignes als auch ein malignes Verhalten zeigen. Zur Risikostratifizierung werden die Größe und Mitosezahl der Tumore herangezogen und gemäß den Konsensuskriterien in Tumore mit sehr niedrigem bis hohem Risiko eingeteilt. Allerdings können auch Tumore mit niedrigem Risiko im Verlauf ein malignes Verhalten aufweisen. Daher sind weitere prognostische Marker für die Diagnostik notwendig. Während CD117, das Produkt des c-kit Proto-Onkogens, als diagnostischer Marker bei GIST etabliert ist, ist die Bedeutung entsprechender Tumorsuppressorgene bislang noch nicht bekannt. Durch den Nachweis von Chromosomenalterationen, wie Loss of Heterozygosity (LOH), in Regionen von Tumorsuppressorgen konnte bei verschiedenen Tumorentitäten ein Zusammenhang zum malignen Verhalten nachgewiesen werden.

Um die Bedeutung von LOH in GIST genauer zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit 60 GIST unterschiedlicher Lokalisation mit 21 verschiedenen Mikrosatellitenmarkern auf genomische Aberrationen untersucht. Mit Hilfe der klinischen Verlaufsdaten konnte die prognostische Relevanz von chromosomalen Imbalancen in GIST deutlich gemacht werden.

Hierbei zeigte sich beim Auftreten mehrerer LOH auch in unterschiedlichen Genlokalisationen, als Ausdruck einer hohen genetischen Instabilität, eine deutlich kürzeres Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben. In Bezug auf die einzelnen untersuchten Genabschnitte zeigte sich im Falle des Chromosom 22 zwar ein signifikanter Einfluss von LOH auf die Malignität des Tumors, allerdings ergab sich entgegen den Erwartungen kein Einfluss auf die Überlebensraten. Entsprechende Befunde ergaben sich auch für den Nachweis von LOH im Bereich des Chromosom 9. Als unabhängiger prognostischer Marker in Bezug auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben bei GIST ergab sich im Studienkollektiv der Nachweis von LOH im Bereich des kurzen Armes von Chromosom 17.

Somit stellt das Auftreten von LOH sowohl in der Gesamtanzahl als auch im Bereich des Chromosom 17 bei GIST einen potentiellen prognostischen Marker dar.

6. Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCL-2	B-cell lymphoma 2, Proteinfamilie, Proto-Onkogen
C	Cytosin
CD	Cluster of Differentiation
c-KIT	Typ-III-Rezeptor-Tyrosinkinase, entspricht CD117; als v-KIT erstmals im HZ-4-Katzensarkom-Virus identifiziert (kit=kitten)
DPC4	Tumor-Suppressorgen; Deleted in pancreatic carcinoma, locus 4
EDTA	Ethylin Diamin Tetra Azetat
FUP	Follow-Up
G	Guanin
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolorektales Karzinom
HPF	High Power Fields
ICC	Intestinal Cells of Cajal
kDa	Kilo Dalton
LOH	loss of heterozygosity
Merlin	Moesin-Ezrin-Radixin-Like Protein
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF2	Neurofibromatose Typ 2
NSCLC	Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
p16	Tumor-Suppressorgen; Protein mit 16 kDa
p53	Tumor-Suppressorgen; Protein mit 53 kDa
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PET	Positronen Emissions Tomographie
RB	Retinoblastom
RER ⁺	Replication Error Positive

SCF	stem cell factor
sog.	sogenannt
STR	Short Tandem Repeats
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermos aquaticus
TGF-Beta	Tumor growth factor beta
TSG	Tumorsuppressorgen
VHL	Von-Hippel-Lindau

7. Literatur

Aaltonen, L. A., Peltomaki, P., Mecklin, J. P. & other authors (1994). Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* **54**, 1645-1648.

Agaimy, A. & Wunsch, P. H. (2009). Lymph node metastasis in gastrointestinal stromal tumours (GIST) occurs preferentially in young patients < or = 40 years: an overview based on our case material and the literature. *Langenbecks Arch Surg* **394**, 375-381.

Al-Bozom, I. A. (2001). p53 expression in gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int* **51**, 519-523.

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

Bartsch, D., Shevlin, D. W., Tung, W. S., Kisker, O., Wells, S. A., Jr. & Goodfellow, P. J. (1995). Frequent mutations of CDKN2 in primary pancreatic adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* **14**, 189-195.

Belchis, D. A., Meece, C. A., Benko, F. A., Rogan, P. K., Williams, R. A. & Gocke, C. D. (1996). Loss of heterozygosity and microsatellite instability at the retinoblastoma locus in osteosarcomas. *Diagn Mol Pathol* **5**, 214-219.

Blanke, C. D., Demetri, G. D., von Mehren, M. & other authors (2008a). 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.

Blanke, C. D., Rankin, C., Demetri, G. D. & other authors (2008b). Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. *J Clin Oncol* **26**, 626-632.

Bruhn, N., Beinert, T., Oehm, C., Jandrig, B., Petersen, I., Chen, X. Q., Possinger, K. & Fleischhacker, M. (2000). Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* **906**, 72-82.

Carney, J. A., Sheps, S. G., Go, V. L. & Gordon, H. (1977). The triad of gastric leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma. *N Engl J Med* **296**, 1517-1518.

Chang, M. S., Choe, G., Kim, W. H. & Kim, Y. I. (1998). Small intestinal stromal tumors: a clinicopathologic study of 31 tumors. *Pathol Int* **48**, 341-347.

Choi, H., Charnsangavej, C., de Castro Faria, S., Tamm, E. P., Benjamin, R. S., Johnson, M. M., Macapinlac, H. A. & Podoloff, D. A. (2004). CT evaluation of the response of gastrointestinal stromal tumors after imatinib mesylate treatment: a quantitative analysis correlated with FDG PET findings. *AJR Am J Roentgenol* **183**, 1619-1628.

Choi, S. W., Choi, J. R., Chung, Y. J., Kim, K. M. & Rhyu, M. G. (2000). Prognostic implications of microsatellite genotypes in gastric carcinoma. *Int J Cancer* **89**, 378-383.

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

Corless, C. L., Fletcher, J. A. & Heinrich, M. C. (2004). Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* **22**, 3813-3825.

Cunningham, R. E., Abbondanzo, S. L., Chu, W. S., Emory, T. S., Sobin, L. H. & O'Leary, T. J. (2001). Apoptosis, bcl-2 expression, and p53 expression in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **9**, 19-23.

D'Amato, G., Steinert, D. M., McAuliffe, J. C. & Trent, J. C. (2005). Update on the biology and therapy of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Control* **12**, 44-56.

DeMatteo, R. P., Lewis, J. J., Leung, D., Mudan, S. S., Woodruff, J. M. & Brennan, M. F. (2000). Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* **231**, 51-58.

Dematteo, R. P., Heinrich, M. C., El-Rifai, W. M. & Demetri, G. (2002). Clinical management of gastrointestinal stromal tumors: before and after STI-571. *Hum Pathol* **33**, 466-477.

Demetri, G. D., van Oosterom, A. T., Garrett, C. R. & other authors (2006). Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* **368**, 1329-1338.

Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J. & Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* **2**, 561-566.

Eisenberger, C. F., Schoenberg, M., Enger, C., Hortopan, S., Shah, S., Chow, N. H., Marshall, F. F. & Sidransky, D. (1999). Diagnosis of renal cancer by molecular urinalysis. *J Natl Cancer Inst* **91**, 2028-2032.

Eisenberger, C. F., Knoefel, W. T., Peiper, M. & other authors (2003). Squamous cell carcinoma of the esophagus can be detected by microsatellite analysis in tumor and serum. *Clin Cancer Res* **9**, 4178-4183.

el-Rifai, W., Sarlomo-Rikala, M., Miettinen, M., Knuutila, S. & Andersson, L. C. (1996). DNA copy number losses in chromosome 14: an early change in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* **56**, 3230-3233.

Emory, T. S., Sobin, L. H., Lukes, L., Lee, D. H. & O'Leary, T. J. (1999). Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors: dependence on anatomic site. *Am J Surg Pathol* **23**, 82-87.

Feakins, R. M. (2005). The expression of p53 and bcl-2 in gastrointestinal stromal tumours is associated with anatomical site, and p53 expression is associated with grade and clinical outcome. *Histopathology* **46**, 270-279.

Fletcher, C. D., Berman, J. J., Corless, C. & other authors (2002). Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* **33**, 459-465.

Fukasawa, T., Chong, J. M., Sakurai, S. & other authors (2000). Allelic loss of 14q and 22q, NF2 mutation, and genetic instability occur independently of c-kit mutation in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Cancer Res* **91**, 1241-1249.

Goettsch, W. G., Bos, S. D., Breekveldt-Postma, N., Casparie, M., Herings, R. M. & Hogendoorn, P. C. (2005). Incidence of gastrointestinal stromal tumours is underestimated: results of a nation-wide study. *Eur J Cancer* **41**, 2868-2872.

Gonzalzo, M. L., Eisenberger, C. F., Lee, S. M., Trock, B. J., Marshall, F. F., Hortopan, S., Sidransky, D. & Schoenberg, M. P. (2002). Prognostic significance of preoperative molecular serum analysis in renal cancer. *Clin Cancer Res* **8**, 1878-1881.

Goodrich, D. W. & Lee, W. H. (1990). The molecular genetics of retinoblastoma. *Cancer Surv* **9**, 529-554.

Gounder, M. M. & Maki, R. G. (2011). Molecular basis for primary and secondary tyrosine kinase inhibitor resistance in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Chemother Pharmacol* **67 Suppl 1**, S25-43.

Gramza, A. W., Corless, C. L. & Heinrich, M. C. (2009). Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin Cancer Res* **15**, 7510-7518.

Grati, F. R., Sirchia, S. M., Garagiola, I. & other authors (2000). Losses of heterozygosity in oral and oropharyngeal epithelial carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* **118**, 57-61.

Gunawan, B., Bergmann, F., Hoer, J., Langer, C., Schumpelick, V., Becker, H. & Fuzesi, L. (2002). Biological and clinical significance of cytogenetic abnormalities in low-risk and high-risk gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* **33**, 316-321.

Gunji, Y., Nikaidou, T., Okazumi, S. & other authors (2005). Evaluation of Ki-67 and p53 expression in primary and repeated liver metastases of GISTs. *Hepatogastroenterology* **52**, 829-832.

Heinrich, M. C., Corless, C. L., Demetri, G. D. & other authors (2003a). Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* **21**, 4342-4349.

Heinrich, M. C., Corless, C. L., Duensing, A. & other authors (2003b). PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* **299**, 708-710.

Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y. & other authors (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* **279**, 577-580.

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

Hornick, J. L. & Fletcher, C. D. (2007). The role of KIT in the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* **38**, 679-687.

Kim, N. G., Kim, J. J., Ahn, J. Y., Seong, C. M., Noh, S. H., Kim, C. B., Min, J. S. & Kim, H. (2000). Putative chromosomal deletions on 9P, 9Q and 22Q occur preferentially in malignant gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* **85**, 633-638.

Kindblom, L. G., Remotti, H. E., Aldenborg, F. & Meis-Kindblom, J. M. (1998). Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* **152**, 1259-1269.

Kitamura, Y. (2008). Gastrointestinal stromal tumors: past, present, and future. *J Gastroenterol* **43**, 499-508.

Knudson, A. G. (1996). Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* **122**, 135-140.

Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.

Langer, C. (2006). Gastrointestinale Stromatumoren (GIST). In *Viszeralchirurgie*, pp. 523-531. Edited by H. Becker. München: Urban&Fischer.

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

Lasota, J., Fetsch, J. F., Wozniak, A., Wasag, B., Sciort, R. & Miettinen, M. (2001). The neurofibromatosis type 2 gene is mutated in perineurial cell tumors: a molecular genetic study of eight cases. *Am J Pathol* **158**, 1223-1229.

Lasota, J., Wasag, B., Dansonka-Mieszkowska, A., Karcz, D., Millward, C. L., Rys, J., Stachura, J., Sobin, L. H. & Miettinen, M. (2003). Evaluation of NF2 and NF1 tumor suppressor genes in distinctive gastrointestinal nerve sheath tumors traditionally diagnosed as benign schwannomas: a study of 20 cases. *Lab Invest* **83**, 1361-1371.

Lasota, J., Wozniak, A., Kopczynski, J. & other authors (2005). Loss of heterozygosity on chromosome 22q in gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a study on 50 cases. *Lab Invest* **85**, 237-247.

Leon, S. A., Green, A., Yaros, M. J. & Shapiro, B. (1975). Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA. *J Immunol Methods* **9**, 157-164.

Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. & Yaros, M. J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* **37**, 646-650.

Li, F. P., Fletcher, J. A., Heinrich, M. C. & other authors (2005). Familial gastrointestinal stromal tumor syndrome: phenotypic and molecular features in a kindred. *J Clin Oncol* **23**, 2735-2743.

Litt, M. & Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* **44**, 397-401.

Liu, L., Lassam, N. J., Slingerland, J. M., Bailey, D., Cole, D., Jenkins, R. & Hogg, D. (1995). Germline p16INK4A mutation and protein dysfunction in a family with inherited melanoma. *Oncogene* **11**, 405-412.

Lopes, J. M., Silva, P., Seixas, M., Cirnes, L. & Seruca, R. (1998). Microsatellite instability is not associated with degree of malignancy and p53 expression of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* **33**, 579-581.

Lux, M. L., Rubin, B. P., Biase, T. L. & other authors (2000). KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* **156**, 791-795.

Maertens, O., Prenen, H., Debiec-Rychter, M. & other authors (2006). Molecular pathogenesis of multiple gastrointestinal stromal tumors in NF1 patients. *Hum Mol Genet* **15**, 1015-1023.

Maeyama, H., Hidaka, E., Ota, H. & other authors (2001). Familial gastrointestinal stromal tumor with hyperpigmentation: association with a germline mutation of the c-kit gene. *Gastroenterology* **120**, 210-215.

Miettinen, M., Lasota, J. & Sobin, L. H. (2005a). Gastrointestinal stromal tumors of the stomach in children and young adults: a clinicopathologic,

immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases with long-term follow-up and review of the literature. *Am J Surg Pathol* **29**, 1373-1381.

Miettinen, M., Sobin, L. H. & Lasota, J. (2005b). Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* **29**, 52-68.

Miettinen, M., Fetsch, J. F., Sobin, L. H. & Lasota, J. (2006). Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. *Am J Surg Pathol* **30**, 90-96.

Neves, L. R., Oshima, C. T., Artigiani-Neto, R., Yanaguibashi, G., Lourenco, L. G. & Forones, N. M. (2009). Ki67 and p53 in gastrointestinal stromal tumors-GIST. *Arq Gastroenterol* **46**, 116-120.

Pall, M. L. (1981). Gene-amplification model of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 2465-2468.

Papadopoulos, N. & Lindblom, A. (1997). Molecular basis of HNPCC: mutations of MMR genes. *Hum Mutat* **10**, 89-99.

Prakash, S., Sarran, L., Socci, N. & other authors (2005). Gastrointestinal stromal tumors in children and young adults: a clinicopathologic, molecular, and genomic study of 15 cases and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol* **27**, 179-187.

Pylkkanen, L., Sarlomo-Rikala, M., Wessman, M., Hamalainen, E., Sainio, M., Husgafvel-Pursiainen, K. & Carpen, O. (2003). Chromosome 22q alterations and expression of the NF2 gene product, merlin, in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* **34**, 872-879.

Ribic, C. M., Sargent, D. J., Moore, M. J. & other authors (2003). Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* **349**, 247-257.

Robinson, T. L., Sircar, K., Hewlett, B. R., Chorneyko, K., Riddell, R. H. & Huizinga, J. D. (2000). Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD34-positive interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* **156**, 1157-1163.

Rubin, B. P., Singer, S., Tsao, C. & other authors (2001). KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* **61**, 8118-8121.

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

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

Sarlomo-Rikala, M., El-Rifai, W., Lahtinen, T., Andersson, L. C., Miettinen, M. & Knuutila, S. (1998a). Different patterns of DNA copy number changes in gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas, and schwannomas. *Hum Pathol* **29**, 476-481.

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

Sauseng, W., Benesch, M., Lackner, H. & other authors (2007). Clinical, radiological, and pathological findings in four children with gastrointestinal stromal tumors of the stomach. *Pediatr Hematol Oncol* **24**, 209-219.

Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225.

Schmieder, M., Wolf, S., Danner, B. & other authors (2008). p16 expression differentiates high-risk gastrointestinal stromal tumor and predicts poor outcome. *Neoplasia* **10**, 1154-1162.

Schmiegel, W., Reinacher-Schick, A., Arnold, D. & other authors (2008). [Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]. *Z Gastroenterol* **46**, 799-840.

Schneider-Stock, R., Boltze, C., Lasota, J. & other authors (2005). Loss of p16 protein defines high-risk patients with gastrointestinal stromal tumors: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res* **11**, 638-645.

Schurr, P., Wolter, S., Kaifi, J. & other authors (2006). Microsatellite DNA alterations of gastrointestinal stromal tumors are predictive for outcome. *Clin Cancer Res* **12**, 5151-5157.

Schurr, P. G., Oikonomou, D., Kaifi, J. T. & other authors (2009). Clinical value of loss of heterozygosity in serum microsatellite DNA of patients with gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Gastroenterol* **43**, 27-35.

Schutte, M., Hruban, R. H., Hedrick, L. & other authors (1996). DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res* **56**, 2527-2530.

Schwarte-Waldhoff, I. & Schmiegel, W. (2002). Smad4 transcriptional pathways and angiogenesis. *Int J Gastrointest Cancer* **31**, 47-59.

Shao, J., Li, Y., Li, H., Wu, Q., Hou, J. & Liew, C. (2000). Deletion of chromosomes 9p and 17 associated with abnormal expression of p53, p16/MTS1 and p15/MTS2 gene protein in hepatocellular carcinomas. *Chin Med J (Engl)* **113**, 817-822.

Sirchia, S. M., Sironi, E., Grati, F. R. & other authors (2000). Losses of heterozygosity in endometrial adenocarcinomas: positive correlations with histopathological parameters. *Cancer Genet Cytogenet* **121**, 156-162.

- Sommer, G., Agosti, V., Ehlers, I. & other authors (2003).** 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.
- Sozzi, G., Conte, D., Mariani, L., Lo Vullo, S., Roz, L., Lombardo, C., Pierotti, M. A. & Tavecchio, L. (2001).** Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* **61**, 4675-4678.
- Steinert, D. M., Oyarzo, M., Wang, X. & other authors (2006).** Expression of Bcl-2 in gastrointestinal stromal tumors: correlation with progression-free survival in 81 patients treated with imatinib mesylate. *Cancer* **106**, 1617-1623.
- Szijan, I., Rochefort, D., Bruder, C. & other authors (2003).** NF2 tumor suppressor gene: a comprehensive and efficient detection of somatic mutations by denaturing HPLC and microarray-CGH. *Neuromolecular Med* **3**, 41-52.
- Tamura, K., Zhang, X., Murakami, Y., Hirohashi, S., Xu, H. J., Hu, S. X., Benedict, W. F. & Sekiya, T. (1997).** Deletion of three distinct regions on chromosome 13q in human non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* **74**, 45-49.
- Tryggvason, G., Gislason, H. G., Magnusson, M. K. & Jonasson, J. G. (2005).** Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: the icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study. *Int J Cancer* **117**, 289-293.
- Tuveson, D. A., Willis, N. A., Jacks, T., Griffin, J. D., Singer, S., Fletcher, C. D., Fletcher, J. A. & Demetri, G. D. (2001).** STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene* **20**, 5054-5058.
- van de Rijn, M., Hendrickson, M. R. & Rouse, R. V. (1994).** CD34 expression by gastrointestinal tract stromal tumors. *Hum Pathol* **25**, 766-771.
- Versteeg, I., Sevenet, N., Lange, J., Rousseau-Merck, M. F., Ambros, P., Handgretinger, R., Aurias, A. & Delattre, O. (1998).** Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* **394**, 203-206.
- Verweij, J., Casali, P. G., Zalcberg, J. & other authors (2004).** Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* **364**, 1127-1134.
- Wong, N. A., Young, R., Malcomson, R. D. & other authors (2003).** Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology* **43**, 118-126.
- Wozniak, A., Sciot, R., Guillou, L. & other authors (2007).** Array CGH analysis in primary gastrointestinal stromal tumors: cytogenetic profile correlates with anatomic site and tumor aggressiveness, irrespective of mutational status. *Genes Chromosomes Cancer* **46**, 261-276.

Yanagi, M., Keller, G., Mueller, J., Walch, A., Werner, M., Stein, H. J., Siewert, J. R. & Hofler, H. (2000). Comparison of loss of heterozygosity and microsatellite instability in adenocarcinomas of the distal esophagus and proximal stomach. *Virchows Arch* **437**, 605-610.

Yang, J., Du, X., Lazar, A. J., Pollock, R., Hunt, K., Chen, K., Hao, X., Trent, J. & Zhang, W. (2008). Genetic aberrations of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* **113**, 1532-1543.

Yantiss, R. K., Rosenberg, A. E., Sarran, L., Besmer, P. & Antonescu, C. R. (2005). Multiple gastrointestinal stromal tumors in type I neurofibromatosis: a pathologic and molecular study. *Mod Pathol* **18**, 475-484.

Zhang, L., Smyrk, T. C., Young, W. F., Jr., Stratakis, C. A. & Carney, J. A. (2010). Gastric stromal tumors in Carney triad are different clinically, pathologically, and behaviorally from sporadic gastric gastrointestinal stromal tumors: findings in 104 cases. *Am J Surg Pathol* **34**, 53-64.

8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki, Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, für die Überlassung des Themas, der Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der Patientenmaterialien und Patientendaten.

Außerdem danke ich Herrn Professor Dr. med. Emre Yekebas, ehemals geschäftsführender Oberarzt an der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, für die Unterstützung bei der Ausarbeitung des Themas und anfängliche Betreuung.

Besonderem Dank gilt Herrn Dr. med. Paulus Schurr für die persönliche und hilfreiche Betreuung und Unterstützung bei der Arbeit sowie Petra Merkert für die wertvolle Unterstützung im Labor.

9. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

Stefan Wolter