

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki, F.A.C.S.

**Der Wachstumsfaktor Midkine als Marker im Serum und Gewebe
von Patienten mit gastrointestinalem Stromatumor**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von:

Miriam Kunkel
aus Heidelberg

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 20.01.2011

**Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. M. Blessmann

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter/in: PD Dr. J. Kaifi

Prüfungsausschuss, 3 Gutachter/in: Prof. Dr. K. Pantel

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
1. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2. Einleitung	2
2.1 Midkine	2
2.1.1 Protein Midkine	2
2.1.2 Gen MDK	2
2.1.3 Midkine-Rezeptoren	2
2.1.4 Biologische Aktivität	3
2.1.5 Midkine bei malignen Tumoren	4
2.2 Gastrointestinale Stromatumore	6
2.2.1 Definition	6
2.2.2 Epidemiologie	6
2.2.3 Ätiologie	6
2.2.4 Einteilung	7
2.2.5 Klinik, Lokalisation und Metastasierung	7
2.2.6 Risikostratifizierung und Prognoseeinschätzung	8
2.2.7 Diagnose, Histologie und Immunhistochemie	9
2.2.8 Therapie	11
3. Material und Methoden	14
3.1 Studiendesign und Patientenkollektiv	14
3.2 Tissue-Microarray und Immunhistochemie	15
3.2.1 Tissue-Microarray	15
3.2.2 Prinzip, Durchführung und Auswertung der Immunhistochemie	15

3.3 Enzyme linked Immunosorbent Assay	18
3.3.1 Prinzip und Methoden des ELISA	18
3.3.2 Durchführung und Auswertung des ELISA	19
3.4 Statistische Analyse	20
4. Ergebnisse	21
4.1 Tissue-Microarray	21
4.1.1. Midkine-Expression bei Patienten mit Ösophagus-, Kolon-, Bronchial-, und Pankreaskarzinom	21
4.1.2. Midkine-Expression bei Patienten mit GIST und differentialdiagnostisch relevanten Tumoren	22
4.2. ELISA	23
4.2.1. Serum-Midkine-Konzentration bei Patienten mit Ösophagus-, Kolon-, Bronchial-, und Pankreaskarzinom	23
4.2.2. Serum-Midkine-Konzentration bei Patienten mit GIST	24
5. Diskussion	32
6. Zusammenfassung	38
Literaturverzeichnis	39
Anhang	
Danksagung	VII
Lebenslauf	VIII
Eidesstattliche Versicherung	IX
Rawnaq T, Kunkel M, Bachmann K, Simon R, Zander H, Brandl S, Sauter G, Izbicki, JR, Kaifi JT. Serum Midkine Correlates with Tumor Progression and Imatinib Response in Gastrointestinal Stromal Tumors. <i>Annals of Surgical Oncology</i> 2010 Jun 30.	X

Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
ALK	Anaplastic leukemia kinase
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APAPP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cm	Zentimeter
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CT	Computertomographie
DBS	3,3'-Diaminobenzidin
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FDA	Food and Drug Administration
FDG	Fluorodeoxyglucose
GI	Gastrointestinaltrakt
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
H.E.	Hämatoxylin Eosin
HB-GAM	Heparin-binding growth-associated molecule
HBGF	Heparin-binding growth factor
HPF	High Power Fields
ICC	Interstitielle Cajal Zellen
ICH	Immunhistochemie
JNCCN	Journal of the National Comprehensive Cancer Network
l	Liter
kDa	KiloDalton
LDL	Low density lipoprotein
LRP	Low density lipoprotein receptor-related protein
M	Molar
MK	Midkine
ml	Milliliter
mm	Millimeter

MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
MRT	Magnetresonanztomographie
MTA	Multitumorarray
NEGF	Neurite Growth-promoting Factor
NF-1	Neurofibromatose Typ1
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PET	Positronenemissionstomographie
pg	Pikogramm
PI-3	Phosphatidylinositol-3
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute
RPTP	Receptor-type protein tyrosine phosphatase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SCF	Stammzellefaktor
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SD	Standardabweichung
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TMA	Tissue Microarray
WHO	World Health Organisation
WT	Wilms-Tumorsuppressorgen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Midkine-Expression bei GIST- und Leiomyom-Gewebeproben	23
Abbildung 2:	Balkendiagramm-Analyse der Serum-Midkine- Konzentrationen im ELISA	24
Abbildung 3:	Balkendiagramm-Analyse der Serum-Midkine- Konzentrationen im ELISA von gesunden Kontrollprobanden und GIST-Patienten	25
Abbildung 4:	Kaplan-Meier-Überlebensfunktion für metastasen- und/oder rezidivfreies Überleben bei R0-resezierten Patienten	28
Abbildung 5:	Kaplan-Meier-Überlebensfunktion für Tumorgöße und Mitoserate	29
Abbildung 6:	Balkendiagramm-Analyse der Serum-Midkine- Konzentrationen bei GIST-Patienten unter Imatinib-Therapie	30
Abbildung 7:	Kaplan-Meier-Überlebensfunktion für GIST-Patienten unter Imatinib-Therapie	31

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Kriterien zur Beurteilung der Aggressivität von GIST nach <i>Fletcher</i> und Arbeitsgruppe	9
Tabelle 2:	Expressionsmuster der GIST und differentialdiagnostisch bedeutsamer Tumoren nach <i>Fletcher</i> und Arbeitsgruppe (Human Pathol. 2002)	11
Tabelle 3:	MK-Expression bei Patienten mit Ösophagus-, Kolon-, Bronchial- und Pankreaskarzinom im TMA	22
Tabelle 4:	Mittlere und mediane Serum-Midkine-Konzentration bei Patienten mit Ösophagus-, Kolon-, Bronchial- und Pankreaskarzinom und bei Kontrollprobanden	23
Tabelle 5:	Klinisch-pathologische Daten der GIST-Patienten und Serum-Midkine-Konzentration	26

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) sind seltene Tumoren neuronalen Ursprungs, die erst seit einigen Jahren als eigenständige Entität definiert werden. Histologisch können GIST anhand Mitoserate, Tumorgröße und Primärtumorlokalisation in Risikogruppen hinsichtlich ihrer Dignität eingeteilt werden, wobei jeder GIST als potentiell maligne betrachtet werden sollte (Nilsson et al. 2005). Die Prognose der an GIST erkrankten Patienten verschlechtert sich erheblich, wenn der Tumor metastasiert oder Rezidive bildet (Tryggvason et al. 2005). Die endgültige diagnostische und therapeutisch relevante Abgrenzung zu den differentialdiagnostisch in Frage kommenden Tumoren wie dem Leiomyom lässt sich derzeit nur anhand von immunhistochemischer Analyse des Tumorgewebes auf die Tyrosinkinase *c-Kit* stellen, die von etwa 90% der GIST exprimiert wird (Hirota et al. 1998). Trotz der Existenz dieses und weiterer Gewebemarker sind einfacher zugängliche Differenzierungs- und Prognosemarker nicht vorhanden.

Der Wachstumsfaktor Midkine (MK) spielt eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und wird von einer Vielzahl an Tumorentitäten verstärkt exprimiert (Garver et al. 1993, Nakagawara et al. 1995, Aridome 1998). Immunhistochemisch konnte eine MK-Expression im Primärtumor bereits mit einer schlechten Prognose bei GIST-Patienten assoziiert werden (Kaifi et al. 2007). In Studien wurde MK bereits im Serum von Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen (Song et al. 1997, Shimada et al. 1997, Ikematsu et al. 2003).

Ziel der Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt wurden, ist es die MK-Expression in Gewebe- und Serumproben von GIST-Patienten zu bestimmen. In einem *Tissue-Microarray* aus Gewebeproben von 60 Tumorentitäten soll untersucht werden, ob MK im Tumorgewebe von GIST-Patienten im Vergleich zu den differentialdiagnostisch zu erwägenden Tumorproben exprimiert wird. Mittels *Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)* soll MK im Serum von GIST-Patienten detektiert und quantifiziert werden, um die Nutzbarkeit als Prognose-, Verlaufs- und Tumormarker im leicht zugänglichen peripheren Blut zu untersuchen. Des Weiteren soll geklärt werden, inwiefern MK als Serummarker eine Rolle im Therapieverlauf mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib spielt. Die Befunde der Gewebe- und Blutuntersuchungen werden mit den klinischen Verlaufsdaten und den pathologischen Daten der Patienten korreliert.

2. Einleitung

2.1) Midkine

2.1.1) Protein Midkine: Das Protein Midkine (MK), auch *Neurite Growth-promoting Factor 2 (NEGF2)* genannt, wurde Ende der 1980er Jahre als das Produkt eines für Retinsäure responsiven Gens entdeckt (Kadomatsu 1988, Tomomura et al. 1990, Matsubara et al. 1994).

MK ist ein an Cystein und basischen Aminosäuren reiches Protein, das aus einer N- und einer C-terminalen Domäne besteht. Die beiden Domänen nehmen je eine dreisträngige β -Faltblattstruktur an und sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden (Matsubara et al. 1990, Iwasaki et al. 1997). Die C-terminale Domäne besitzt zwei Heparin-Bindungsstellen und übt die biologischen Funktionen von MK aus (Tomomura et al. 1990, Asai et al. 1997).

MK stimmt in seiner Aminosäuresequenz zu 45% mit dem Wachstumsfaktor Pleiotrophin *HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule)* überein. Die beiden Proteine werden zu einer eigenen Familie zusammengefasst, die sich vor allem strukturell von den anderen Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren (HBGF) unterscheidet (Nakamoto et al. 1992, Muramatsu 1993, Muramatsu 2002).

2.1.2) Gen MDK: Das für humanes MK kodierende Gen (MDK) liegt auf Chromosom 11p11.2 und besteht aus vier Exonen mit etwa 3500 Basepaaren (Matsubara et al. 1990, Tomomura et al. 1990). MDK besitzt ein Element, das retinsäure-abhängig die MK-Expression induziert (Matsubara et al. 1994, Pedraza et al. 1995). Ein weiteres Element auf MDK ist abhängig vom Wilms-Tumorsuppressoren *WT1*, welches die MK-Expression inhibieren kann (Adachi et al. 1996).

2.1.3) MK-Rezeptoren: Der genaue Weg der Signaltransduktion, über den MK seine Wirkung vermittelt, ist noch unbekannt. Man nimmt an, dass der MK-Rezeptor ein molekularer Komplex aus verschiedenen Proteinen ist. Über Heparin-Bindungsstellen kann MK an das Heparansulfat der extrazellulären Matrix binden. Das Heparansulfat *N-Syndecan* ist auch direkter Bestandteil der Signaltransduktion (Raulo et al. 1994, Nakanishi et al. 1997). MK bindet an die *receptor-type protein tyrosine phosphatase z (RPTP z)* und wirkt über das *low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)* sowie die *anaplastische Lymphomkinase (ALK)* und die *Protein-Tyrosin-Phosphatase ζ* (Maeda et al. 1999, Muramatsu et al. 2000).

Es ist noch unklar, ob nur einzelne Rezeptoren an den unterschiedlichen biologischen Funktionen von MK beteiligt sind, oder ob MK über eine Vielzahl von Rezeptoren seine Wirkung entfaltet. *Maeda et al.* konnten zeigen, dass die Bindung von MK an die *Protein-Tyrosin-Phosphatase* ζ die neuronale Migration stimuliert (Sakaguchi et al. 2003). Die Bindung von MK an die *ALK* konnte mit der Induktion von Tumorigenität assoziiert werden (Stoica et al. 2002). Über das *LRP* kann MK per Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, in den Nukleus gelangen und so das Überleben diverser Zellen fördern (Muramatsu et al. 2000).

Bei der Osteoblastenmigration und dem neuronalen Überleben konnten Signaltransduktionswege über die *Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase)* oder die *Extrazellulärsignal abhängige Kinase (ERK)* nachgewiesen werden (Qi et al. 2001, Owada et al. 1999).

2.1.4) Biologische Aktivität: MK übt wichtige biologische Funktionen in der Entwicklung, Angiogenese und Inflammation aus (Muramatsu et al. 1993, Kurtz et al. 1995). Während der Embryogenese der Maus ist die MK-Expression zeitlich und örtlich streng reguliert (Kadomatsu 1988, Matsubara et al. 1990). Wegen der starken Expression während der Mitte der Embryonalzeit (midgesetation) erhielt dieser Wachstumsfaktor seinen Namen Midkine (Michikawa et al. 1993, Mitsiadis et al. 1995).

Die Funktion von MK bei der Entwicklung des Nervensystems ist bisher am gründlichsten erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass durch MK die Überlebensrate von embryonalen Neuronen erhöht wird und dass MK das Aussprossen von Neuriten, die neuronale Differenzierung und die neuronale Migration stimuliert (Yoshida et al. 1995, Mochizuki et al. 1998, Wang et al. 1998).

In adulten Mäusen und Menschen wird die MK-Expression stark eingeschränkt (Kadomatsu 1988, Matsubara et al. 1990). Während entzündlicher Prozesse, der Wundheilung und der Kanzerogenese wird MK jedoch stark hochreguliert oder neu induziert und spielt dann eine Rolle bei der Zellproliferation, Zellmigration, Fibrinolyse sowie bei der Angiogenese (Muramatsu 1993, Matsubara et al. 1994, Muramatsu 2002).

Verschiedene Studien haben sich mit den biologischen Funktionen von MK während entzündlicher Prozesse befasst und konnten eine anti-apoptotische, anti-inflammatorische und angiogenetische Funktion des Proteins nachweisen.

Nach Induktion eines experimentellen Gehirnfarktes bei Ratten konnte eine MK-Expression in Astrozyten nachgewiesen werden (Yoshida et al. 1995, Nakamura et al. 1998, Mochizuki et al. 1998). Intrathekale MK-Injektionen verzögerten den ischämischen Zelltod im Hippocampus bei Wüstenrennmäusen. MK konnte in vivo Photorezeptoren im Auge von Ratten vor lichtinduziertem Schaden schützen (Zhang et al. 1995, Miyashiro et al. 1998). Bei Alzheimer Patienten bindet MK an die Amyloid- β -Plaques und unterdrückt deren zytotoxische Aktivität (Yasuhara et al. 1993).

MK wurde in der Synovia, den Synoviozyten und in Endothelzellen von neugebildeten Blutgefäßen bei chronischer Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis gefunden (Takada et al. 1997). In aortalen Endothelzellen von Rindern wurden durch MK die Plasminogenaktivator-Spiegel und die Plasmin-Aktivität erhöht (Kojima et al. 1995). Des Weiteren stimuliert MK die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Takada et al. 1997, Horiba et al. 2000).

2.1.5) MK bei malignen Tumorerkrankungen: Nicht nur bei entzündlichen Reaktionen, sondern auch bei malignen Prozessen spielt MK eine Rolle. Es wird angenommen, dass MK die Tumorprogression vorantreibt, indem es Überleben, Wachstum, Migration und Angiogenese von Tumorzellen fördert (Kurtz et al. 1995, Choudhui et al. 1997, Muramatsu 2002, Kadomatsu und Muramatsu 2004). In den letzten Jahren konnte im Vergleich zu den benachbarten gesunden Geweben eine erhöhte MK-Expression in diversen Malignomen nachgewiesen werden.

In neuroektodermalen Tumoren konnte eine erhöhte MK-Expression in MPNST, Neuroblastomen, Astrozytomen, Schwannomen, Meningeomen und anderen ZNS-Tumoren gezeigt werden (Nakagawara et al. 1995, Kato et al. 1999, Watson et al. 2004). Eine erhöhte MK-Expression wurde auch in Tumorgewebe anderer Herkunft, wie dem hepatozellulären Karzinom, dem Ösophaguskarzinom, dem Magenkarzinom, dem kolorektalen Karzinom, dem Pankreaskarzinom, dem Prostatakarzinom, dem Harnblasenkarzinom, dem Mammakarzinom, dem Bronchialkarzinom, dem Schilddrüsenkarzinom, dem Hodgkin-Lymphom und in Wilms-Tumoren nachgewiesen (Garver et al. 1993, Tsutsui et al. 1993, Aridome 1998, Miyauchi et al. 1999, Koide et al. 1999, Konishi et al. 1999, Kato et al. 2000, Maeda et al. 2007).

Vor allem in Neuroblastomen, Astrozytomen und Harnblasenkarzinomen konnte eine starke MK-Expression mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert werden (Nakagawara et al. 1995, Mishima et al. 1997, O'Brien et al. 1996).

Eine erhöhte MK-Expression konnte außerdem bereits in frühen Stadien der Kanzerogenese nachgewiesen werden. Etwa die Hälfte der in einer Studie untersuchten kolorektalen Adenome mit mittelgradiger Dysplasie hat eine MK-Überexpression gezeigt (Ye et al. 1999).

Als sekretorisches Protein kann MK auch im Blut nachgewiesen werden (Song et al. 1997). Erhöhte MK-Konzentrationen wurden beispielsweise im Blut von Patienten mit Ösophaguskarzinom und Neuroblastom detektiert (Shimada et al. 2003, Ikematsu et al. 2003). Hohe MK-Konzentrationen sind nach Entfernung des Primärtumors gesunken (Kadomatsu und Muramatsu 2004). Beim Endometriumkarzinom konnte die S-MK-Konzentration signifikant mit einer schlechten Prognose und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen korreliert werden (Tanabe et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die MK-Konzentration im Serum und Urin von Patienten mit Magenkarzinom mit dem Tumorstadium assoziiert werden kann (Shimada et al. 2003, Obata et al. 2005). Kürzlich wurde herausgefunden, dass MK im Plasma von Patientinnen mit Mammakarzinom als neuer Marker dienen könnte, der den alten peripheren Markern, wie dem carcinoembryonalem Antigen (CEA), überlegen ist (Ibusuki et al. 2009).

Antisense oligo-DNA oder siRNA (small interfering Ribonukleinsäure) gegen MK, unterdrückt das Tumorwachstum in Nacktmäusen. MK könnte zukünftig in der Krebstherapie von größter Bedeutung sein (Dai et al. 2007).

All diese Studien legen nahe, dass MK eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese und Tumorprogression spielt und als neuer Tumormarker dienen könnte.

2.2) Gastrointestinale Stromatumore (GIST)

2.2.1) Definition: Gastrointestinale Stromatumore (GIST) sind sehr seltene Tumoren, die nur 0,2-1% der gastrointestinalen Malignome ausmachen. Sie gehören zur Gruppe der Weichgewebstumore, die zu etwa 10-15% ihren Ursprung im Gastrointestinaltrakt (GI) nehmen und sind der häufigste nicht-epitheliale Tumor des Magen-Darm-Trakts.

Kennzeichnend für GIST ist der Nachweis des Rezeptors *c-Kit* (*CD117*) auf der Zelloberfläche der Tumorzellen.

Vor der heutigen Definition wurden GIST als benigne oder maligne Tumoren der glatten Muskulatur oder als neuronale Tumoren eingestuft (Nilsson et al. 2005, Fletcher et al. 2002, Connolly et al. 2003).

2.2.2) Epidemiologie: GIST wurden erst vor einigen Jahren als eigenständige Entität erkannt und definiert. In Studien konnte nach Revision der Histologie und Immunhistochemie eine Inzidenz von 0,68-2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner festgestellt werden (Tryggvason et al. 2005). Es wird angenommen, dass die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland etwa 1500 pro Jahr beträgt (Jost et al. 2003, Reichardt et al. 2004). Die Prävalenz des GIST wurde auf etwa 13 Fälle pro 100.000 Einwohner geschätzt (Nilsson et al. 2005).

Das mediane Alter der Erkrankung liegt zwischen 55 und 65 Jahren, 80% der Patienten sind bei Diagnosestellung älter als 50 Jahre. Die Verteilung Männer zu Frauen beträgt etwa 54 zu 46% (Blay et al. 2005).

2.2.3) Ätiologie: Die genaue Ätiologie des GIST ist noch unbekannt.

Immunphänotypisch und ultrastrukturell zeigen GIST-Zellen Eigenschaften von interstitiellen Cajal-Zellen (ICC), die als histogenetischer Ursprung des GIST diskutiert werden (Kindblom et al. 1998, Sircar et al. 1999, Torihashi et al. 1999). ICC sind Schrittmacherzellen des Gastrointestinaltraktes und stimulieren die gastrointestinale Peristaltik, indem sie zwischen autonomem Nervenplexus und glatter Muskulatur vermitteln. Da GIST jedoch auch an Lokalisationen entstehen, an denen keine ICC lokalisiert sind (beispielsweise im Omentum), wird heute eher das Konzept vertreten, dass GIST-Zellen und ICC aus einer gemeinsamen indeterminierten Stammzelle entspringen (Miettinen et al. 1999).

In 67% der GIST-Zellen ist eine Mutation auf Exon 11 nachweisbar. Patienten mit einer Mutation in diesem Exon sprechen am besten auf eine Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib an.

Am zweithäufigsten sind mit einem Anteil von 17% Mutationen auf Exon 9. Sie konnten nur bei GIST des Dünndarms und Kolons nachgewiesen werden. Patienten mit dieser Mutation sprechen schlechter auf Imatinib an als Patienten mit Exon 11 Mutationen, jedoch besser als Patienten mit einem Wildtyp-GIST. Selten kommen auch Mutationen auf Exon 13 und 17 vor.

2.2.4) Einteilung: Seitdem GIST als eigene Entität betrachtet wird, wurden weitere Einteilungen des GIST in Untergruppen vorgenommen. Der Tumor kann eingeteilt werden in GIST des Erwachsenen, familiären GIST, kindlichen GIST und GIST bei Neurofibromatose Typ I (NFI). Diese Kategorien können dann weiter unterteilt werden, beispielsweise nach Mutationstyp (*c-Kit*, *PDGFR α* oder Wildtyp), Mutationslokalisierung und Tumorlokalisierung.

Die meisten GIST sind sporadisch vorkommende GIST des Erwachsenen. Nur etwa 1-2% der GIST kommen bei Patienten unter 18 Jahren vor (Prakash et al. 2005, Miettinen et al. 2005).

Die familiäre Form des GIST ist äußerst selten und betrifft nur etwa zwei Dutzend Familien weltweit. Bei diesen Patienten, bei denen eine *c-Kit* Mutation in allen Körperzellen vorhanden ist, treten je nach Mutationslokalisierung neben GIST verschiedene weitere Erkrankungen wie Mastozytose, partieller Albinismus und Hyperpigmentationen auf (Robson et al. 2004, Zhang et al. 2005). Familiärer GIST wird autosomal-dominant mit hoher Penetranz vererbt (Li et al. 2005).

Das Carney-Syndrom ist eine weitere eigenständige Erkrankung, die sich durch die Trias Magen-GIST, pulmonale Chondrome und extraadrenale Paragangliome definiert und bevorzugt bei jungen Frauen auftritt.

2.2.5) Klinik, Lokalisation und Metastasierung: Etwa ein Drittel der GIST Patienten bleiben asymptomatisch (Kindblom et al. 2000). GIST werden häufig inzidentiell während einer Laparoskopie/Laparotomie oder einer Computertomographie (CT) entdeckt (Joensuu et al. 2002). Bei symptomatischen Patienten ist das Beschwerdebild je nach Tumorgröße und Primärtumorlokalisierung variabel. Mit 50% sind gastrointestinale Blutungen das häufigste Symptom. Des Weiteren kommen häufig undefinierbare Bauchschmerzen (20-50%) und intestinale Obstruktionen (10-30%) vor (Ghanem et al. 2003). Sekundär kann es durch Tumorblutungen zu einer Anämie kommen.

40-70% der GIST entstehen im Magen, 20-40% im Dünndarm und 5-15% im Dickdarm. Weitere Lokalisationen sind Ösophagus (<5%), Omentum (<5%), Mesenterium und Retroperitoneum (Joensuu et al. 2002, Reichardt et al. 2004).

Als „eGIST“ werden seltene, außerhalb des Gastrointestinaltraktes auftretende Primärtumoren bezeichnet.

In bis zu 50% der Fälle streuen GIST Metastasen. Mehr als die Hälfte der Patienten stellt sich mit bereits fortgeschrittenem GIST vor und zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind bereits 15-50% der Tumoren metastasiert. Anders als gastrointestinale Leiomyosarkome, die typischerweise in die Lunge metastasieren, streuen GIST vor allem hämatogen über die Vena portae in die Leber (65%) und in das Peritoneum (20%) (Joensuu et al. 2002). Selten werden Metastasen in Lunge, Knochen, Lymphknoten, Pleura und ZNS beobachtet. Auch nach Operation des Primärtumors haben GIST-Patienten ein hohes Risiko für die Entwicklung von Metastasen und Lokalrezidiven (Blay et al. 2005).

2.2.6) Risikostratifizierung und Prognoseeinschätzung: Bei der Erstmanifestation eines GIST ist die Prognose kaum vorhersehbar. Metastasen oder Rezidive verschlechtern die Prognose erheblich (Miettinen et al. 2001, Tryggvason et al. 2005). Kriterien zur Beurteilung der Aggressivität von GIST wurden lange diskutiert. Prognostisch am bedeutsamsten sind die beiden Faktoren Tumorgöße und Mitoserate (Appelman und Helwig 1977, Corless et al. 2004).

Anhand der *Konsensus Risikoklassifikation* aus dem Jahre 2002 können diese Faktoren mit dem Risiko für Metastasen- und Rezidivbildung assoziiert werden (Kindblom et al. 1998). Tumoren mit entweder einer hohen Mitoserate (>10/50 high-power field [HPF]) oder einer Größe von über 10 cm tendieren zu einem aggressiven Verhalten (Fletcher et al. 2002, Miettinen et al. 2002). Allerdings können auch kleine Tumoren mit niedriger Mitoserate metastasieren, weswegen alle Tumoren als potentiell maligne zu betrachten sind. Die nachfolgende Tabelle (Tab. 1) führt die Kriterien zur Beurteilung der Aggressivität nach *Fletcher* auf (Fletcher et al. 2002, Miettinen et al. 2002).

Tabelle 1: Kriterien zur Beurteilung der Aggressivität von GIST nach *Fletcher* und Arbeitsgruppe

Risikogruppe	Tumgröße (cm)	Anzahl Mitosen (pro 50 HPF)
sehr niedriges Risiko	<2	<5
niedriges Risiko	2-5	<5
intermediäres Risiko	<5	6-10
	5-10	<5
hohes Risiko	>5	>5
	>10	jede Anzahl
	jede Größe	>10

2007 wurde die Tumorlokalisierung vom „*Journal of the National Comprehensive Cancer Network*“ (JNCCN) als dritter prognostisch bedeutsamer Indikator hinzugefügt (Miettinen und Arbeitsgruppe; 2001, 2005, 2006). Dünndarm-GIST verhalten sich aggressiver als Magen-GIST.

Weiter wurde in einer Veröffentlichung von Singer im „*Journal of Clinical Oncology*“ gezeigt, dass Patienten mit Tumoren mit spindelzellförmiger Morphologie ein längeres rezidivfreies Überleben haben, als Patienten mit Tumoren mit epitheloider Morphologie (Singer et al. 2002). Patienten mit gemischter Morphologie hatten die kürzeste rezidivfreie Überlebenszeit. Weitere Faktoren, die mit einem hohen Risiko zur Rezidivbildung einhergehen, sind eine intraoperative Tumorrupturn und eine R1/2-Resektion.

Die 5-Jahres-Überlebensrate lag nach vollständiger chirurgischer Resektion bislang bei etwa 50%. Die mediane Überlebenszeit von Patienten mit metastasierten GIST vor der Imatinib-Ära liegt bei 10-20 Monaten. Seit Einführung des Tyrosinkinasehemmers überleben 60% drei Jahre.

2.2.7) Diagnose, Histologie und Immunhistochemie: Bei klinischem Verdacht auf einen GIST erlauben Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) genauere Aussagen über Größe und Struktur von Primärtumor und eventuell vorhandenen Metastasen. Auch die Fluorine-18-Fluordeoxyglucose (FDG)-Positronen-Emissions-Tomographie (18FDG-PET) und die Endosonographie werden zur Diagnostik eingesetzt. Mittels PET kann differenziert werden, ob es sich bei einer Raumforderung um ein Rezidiv oder Narben handelt. Es kann außerdem schon sehr früh anzeigen, ob eine Tyrosinkinaseinhibitor-Therapie anschlägt (Blay et al. 2005).

In der Labordiagnostik hat die Bestimmung von Tumormarkern derzeit keinen Stellenwert.

Die Differenzialdiagnostik der GIST ist komplex und die endgültige Diagnose kann nur anhand von Tumorgewebsuntersuchungen gestellt werden.

Histologisch können GIST in drei Kategorien eingeteilt werden. 70% der Zellen zeigen ein spindelzellförmiges, 20% ein epitheloides und 10% ein gemischtes Zellmuster (Blay et al. 2005). Bis zum Jahr 2000 wurden GIST fälschlicherweise bei spindelzellförmiger Morphologie als Leiomyom/Leiomyosarkom und bei epitheloider Morphologie als benignes oder malignes Leiomyoblastom klassifiziert (Appelman und Helwig 1977).

Obwohl bereits 1983 erstmals der Begriff „GIST“ von *Mazur* und *Clark* verwendet wurde, konnte erst die 1998 von *Hirota* gemachte Entdeckung, dass die Mehrzahl der GIST Mutationen im *c-Kit* (*CD117*) Gen enthält, zu einer Definition des GIST als eigenständige Krebserkrankung führen (Hirota et al. 1998). Nach *WHO 2001* ist die *CD117*-Expression das am besten definierte Kriterium des GIST.

c-Kit ist ein transmembranöser Wachstumsfaktor-Rezeptor mit Stammzellfaktor (SCF) als Ligand. In 85-90% der GIST-Zellen liegen Mutationen im *c-Kit* Protoonkogen vor. Es kommt zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase, was zu einer permanenten Aktivierung des Rezeptors führt. Dadurch kommt es zu dauerhafter Zellproliferation und Inhibierung der Apoptose in GIST-Zellen.

Eine positive *c-Kit*-Färbung kann GIST von anderen Neoplasien wie dem Leiomyom, Leiomyosarkom und dem Schwannom abgrenzen. Neben den 90% der GIST-Patienten, die eine Mutation im *c-Kit* aufweisen, sind bei 5% der Patienten Mutationen im *PDGFR α* nachweisbar. 60-70% der GIST exprimieren CD34 (Zhang et al. 2005, Li et al. 2005). Die meisten GIST sind Desmin und S100 negativ. Als Standard wird auch die Analyse der in der nachfolgenden Tabelle aufgezeigten Marker anerkannt (Tab. 2) (Joensuu et al. 2002, Miettinen et al. 2002, Blay et al. 2005).

Tabelle 2: Expressionsmuster der GIST und differentialdiagnostisch bedeutsamer Tumoren nach *Fletcher* und Arbeitsgruppe (Human Pathol. 2002)

Marker	GIST	Leiomyogene Tumoren	Schwannome
CD117	+++ 85-90%	-	-
CD34	+ 60-70%	+ 10-15%	+
Aktin	+ 30-40%	+	-
Desmin	(+) Sehr selten	+	-
S100	(+) Ca. 5%	-	+++

2.2.8) Therapie: Die operative Entfernung des Tumors ist nach wie vor erste Wahl für lokalisierte, resektable GIST. Ziel der chirurgischen Therapie eines GIST ist die komplette chirurgische Resektion (R0), ohne dabei die bei GIST zumeist vorhandene Pseudokapsel zu zerstören (Blay et al. 2005, Reichardt 2006). Indikation und Ausmaß der chirurgischen Intervention hängen von der Lage und Größe des Primärtumors ab. Nach den neuesten *JNCCN* Leitlinien für GIST sollen alle Tumore, die eine Größe von 2 cm überschreiten, operativ entfernt werden. Das kurative Ziel einer Operation wird jedoch selten erreicht, da GIST häufig rezidivieren. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach R0-Resektion variiert zwischen 50 und 65% und sinkt bei fortgeschrittenen GIST auf etwa 35% (DeMatteo et al. 2000, Eisenberg und Judson 2004). Die Rolle der chirurgischen Therapie bei metastasierten GIST nach Imatinib-Therapie ist noch nicht ganz geklärt. In einigen Studien wird gezeigt, dass Chirurgie bei metastasierten oder weit fortgeschrittenen GIST keinen großen Überlebensvorteil für die Patienten bringt (Gronchi et al. 2005, Gronchi et al. 2007, Hohenberger et al. 2006, Raut et al. 2006).

Die Entdeckung, dass eine mutierte Tyrosinkinase für die Entstehung von GIST verantwortlich ist, führte schließlich zum gleichen Behandlungsansatz wie bei chronisch myeloischer Leukämie (CML).

Eine bedeutende Rolle spielt dabei der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Gleevec®), der nicht nur *BCR-ABL*, das die chronisch myeloische Leukämie (CML) verursacht, sondern auch *c-Kit*, *PDGFR α* und andere Formen der *Abl-Enzyme* inhibiert (Buchdunger et al. 2000, Demetri et al. 2002, Dewar et al. 2005).

Imatinib bindet kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle spezifischer Tyrosinkinasen, was die Phosphorylierung von Tyrosinresten verhindert (Deininger et al. 2001). Es resultiert eine Hemmung der Zellproliferation und ein Wiedereinsetzen der Apoptose in den Tumorzellen (D'Amato et al. 2005, Krause und Van Etten 2005).

Neben den Indikationen für Patienten mit CML, akuter lymphatischer Leukämie (ALL), myelodysplastischem Syndrom (MDS) und Dermatofibrosarkom protuberans wurde Imatinib 2002 für die Behandlung von erwachsenen Patienten mit *CD117* positiven nicht resektablen und/oder metastasierten GIST und für die adjuvante Behandlung Erwachsener mit signifikantem Risiko eines Rezidivs nach Resektion *c-Kit*-positiver GIST zugelassen (Novartis Oncology).

Seit der Einführung von Imatinib hat sich die Prognose von Patienten mit fortgeschrittenen und/oder metastasierten GIST drastisch verbessert. Vor der Zulassung von Imatinib bestand die einzige Behandlungsoption für GIST-Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung in der Gabe von konventioneller Chemo- und Strahlentherapie, gegen die jedoch die meisten GIST resistent sind. Durch die hohe Resistenzrate und die Toxizität der Strahlentherapie auf die den Tumor umgebenden Gewebe ist der Wert dieser Therapieform begrenzt (DeMatteo et al. 2000, Demetri et al. 2004, Eisenberg und Judson 2004). Gegen Chemo- und Strahlentherapie resistente Patienten mit GIST-Metastasen oder -Rezidiven hatten nach chirurgischer Resektion ein medianes Überleben von 12 Monaten (Bucher et al. 2004, Blay et al. 2005). Nach der Einführung von Imatinib zur Therapie von Patienten mit GIST konnte nach einer 52 Monate langen Nachverfolgungszeit einer Phase 2 Studie gezeigt werden, dass bei 84% der Patienten mit fortgeschrittenen GIST die Krankheit stabilisiert werden konnte oder noch bessere Ergebnisse erzielt wurden (16% stabile Erkrankung, 67% partielle Remission, 1% komplette Remission) (DeMatteo et al. 2000, Demetri et al. 2004,). Etwa 85% der GIST-Patienten sprechen auf Imatinib mit signifikanter Reduktion der Tumormasse oder einem Tumor-Wachstumsstopp an. Durch die selektive Wirkung von Imatinib konnten auch die toxischen Nebenwirkungen einer konventionellen Chemo- oder Strahlentherapie limitiert werden. Die mediane Überlebenszeit unter Imatinib-Therapie beträgt 4,8 Jahre.

Häufig erfüllt die initiale Antwort auf die Imatinib-Therapie bei GIST Patienten nicht die *Response Evaluation Criteria in Solid Tumor (RECIST)* Leitlinien für Therapieerfolge. GIST können sich trotz gutem Therapieansprechen langsam verkleinern oder nur einen Wachstumsstillstand während der Therapie aufweisen.

Das 18FDG-PET ist eine gute Hilfe zur Evaluation des Therapieerfolges. Mittels PET kann der Therapieerfolg schon 24 Stunden nach Therapiebeginn evaluiert werden. Signifikante Aktivitätsverlust können innerhalb eines Monats nachvollzogen werden, während diese im CT erst viel später sichtbar werden. Die primär gegen Imatinib resistenten Patienten können mittels PET identifiziert werden und Therapiealternativen sollten erwogen werden.

3. Material und Methoden

3.1) Studiendesign und Patientenkollektiv

Die wissenschaftlichen Projekte im Rahmen dieser Dissertation wurden mit offizieller Zustimmung der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg durchgeführt. 96 GIST Patienten aus Deutschland, Österreich und der Schweiz wurden retrospektiv ausgewählt. Von allen Patienten deren Serum-, oder Gewebeproben untersucht wurden, liegt eine schriftliche Einwilligungserklärung vor.

Die Teilnahme der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) an einem Diagnostik-Projekt für GIST, das von der GIST-Selbsthilfeorganisation „*Das Lebenshaus e.V.*“ unterstützt wird, ermöglichte die Sammlung einer großen Anzahl von GIST-Blutproben.

„*Das Lebenshaus e.V.*“ ist ein gemeinnütziger Verein, der seit 2003 Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen (darunter GIST) und deren Angehörige in Deutschland, der Schweiz und Österreich in Kooperation mit medizinischen Experten, der Pharmaindustrie und anderen Patientenorganisationen informiert und betreut.

Weitere Patienten konnten mit freundlicher Unterstützung des Pharmaunternehmens „*Novartis Oncology*“ rekrutiert werden, das GIST-Patienten durch das Auslegen von Laufzetteln in onkologischen Praxen über das Projekt informierte.

An der Forschung interessierte GIST Patienten ließen sich in ihrem betreuenden Krankenhaus oder ihrer onkologischen bzw. Hausarztpraxis venöses Blut entnehmen. Das Blut wurde zusammen mit der Forschungseinwilligung der Patienten und den gegebenenfalls vorhandenen klinischen Daten (z.B. Operationsberichte, CT-Befunde) gekühlt mittels Kurier an die Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie des UKE versandt. Es wurde angestrebt, dass die Patienten regelmäßig alle drei Monate Blut an das UKE schicken. Unglücklicherweise wurden in einigen Fällen die Blutentnahmen unregelmäßig durchgeführt oder es fehlten vollständige klinisch-pathologische Befunde.

Aus dem Vollblut wurde nach Zentrifugieren Serum extrahiert und bei -20° Celsius eingefroren oder sofort mittels ELISA weiter verarbeitet.

Die Blutproben wurden aufgrund der Seltenheit des Tumors zunächst alle gesammelt und verarbeitet, ohne eine Vorauswahl zum Beispiel durch verschiedene Therapieregime zu treffen. Alle Patientendaten, einschließlich Alter, Geschlecht, Tumorgröße, Mitoserate, Primärtumorlokalisierung, Metastase, Rezidiv und Imatinib-Therapie wurden den gegebenenfalls mitgesendeten klinischen und pathologischen Befunden entnommen.

Zusätzlich wurden im Rahmen der Vorbereitung auf dieses Projekt in Zusammenarbeit mit dem Blutspendedienst des UKE (Prof. Dr. Kühnl) 148 Blutproben von gesunden Blutspendern, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme mindestens 30 Jahre alt waren, für die Studie zu Kontrollzwecken gesammelt.

3.2) Tissue-Microarray und Immunhistochemie

In Vorarbeiten konnte eine MK-Überexpression in 57 GIST-Tumorproben bereits mit einer schlechten Prognose korreliert werden. Aus diesem Grund wurde im ersten Teil dieser Studie ein Multi-Tumorarray mit Tumorproben von unter anderem GIST und Leiomyomen angefertigt.

3.2.1) Tissue-Microarray: Der Begriff Microarray bezeichnet molekularbiologische Untersuchungssysteme, die es ermöglichen mehrere tausend Einzelnachweise in einer geringen Menge Probenmaterial zu analysieren.

Um im Tissue-Microarray (TMA) untersucht zu werden, werden Gewebe unterschiedlicher Herkunft (z.B. unterschiedliche Tumorentitäten) zunächst in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbt.

Anschließend werden dünne Schnitte angefertigt. Aus den Schnitten werden präzise Stanzkerne aus selektierten Bereichen des Gewebes (Donorblock) entnommen und auf einem neuen Paraffinblock (Empfängerblock) mit regelmäßig ausgestanzten Löchern platziert. Die Schnitte des Tissue-Arrays können für alle histologischen Färbeverfahren und in situ Analysen verwendet werden

3.2.2) Prinzip, Durchführung und Auswertung der Immunhistochemie: Die Immunhistochemie (IHC) ist eine der zentralen Methoden der histopathologischen Diagnostik und Forschung. Das Prinzip der IHC beruht auf dem Einsatz von AK, durch deren spezifische Bindung die Verteilung bestimmter Antigene (AG) am histologischen Schnitt oder in Zellen sichtbar gemacht werden kann. Durch Koppelung des AK an Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme, partikuläres Material (z.B.

Goldpartikel) oder radioaktive Isotope kann die Verteilung des nachzuweisenden AG aufgezeigt werden. Als Enzyme werden meist Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase (HRP)) oder alkalische Phosphatase (AP) eingesetzt. Durch die enzymatische Aktivität wird ein farbloses Chromogen in ein farbiges Enzymprodukt umgewandelt.

Für die Antikörperfärbung wird fixiertes Gewebe verwendet, das beispielsweise mittels Mikrotomschnitt aus Gewebeproben entnommen werden kann. Das Standardverfahren ist die Formalinfixierung. Durch Formalin werden die Proteine miteinander vernetzt, was aber auch dazu führt, dass antigene Strukturen maskiert werden. Die Molekülvernetzungen lassen sich durch Andauen der Schnitte mit Pronase E (Gemisch verschiedener Proteasen), Protease oder Trypsin aufbrechen. Als Alternative zur Formalinfixierung bietet sich bei empfindlichen AG die Gefriertechnik an.

Von den diversen immunhistochemischen Färbemethoden soll im Folgenden nur auf die Methode eingegangen werden, die für die dieser Dissertation zugrunde liegenden Studie genutzt wurde, das Verfahren der löslichen Enzym-Immunkomplexe. Für dieses Verfahren existieren 2 Methoden: Die *Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)*-Methode und die von uns verwendete *Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)*-Methode. Bei der PAP-Methode bestehen die Immunkomplexe aus drei Molekülen Enzym und zwei Antikörpern, die gegen das Enzym gerichtet sind. Der Sekundär-AK fungiert als Brücke zwischen Primär-AK und PAP-Komplex.

Nach Bindung des Primärantikörper an das zu untersuchende AG werden Sekundärantikörper (Brückenantikörper), löslicher Enzym-Immunkomplex und Substrat hinzugegeben. Der Primärantikörper und der AK des Enzym-Immunkomplexes entstammen derselben Spezies, so dass der Brückenantikörper diese beiden verbinden kann.

Das Enzym Peroxidase (Horseradish peroxidase, HRP) setzt als Substrat Wasserstoffperoxid um. Die freiwerdenden Protonen oxidieren das Chromogen zu seinem farbigen Endprodukt unter Bildung von Wasser. Es existiert eine Vielzahl an Chromogenen. Das in dieser Studie eingesetzte 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)/EnVision Polymer-HRP (K3468 and K4003; Dako, North America, USA) bildet nach seiner Umsetzung ein braunes Endprodukt.

Die GIST-Gewebeproben wurden zunächst in vierprozentig gepuffertem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbt. Die mittels „*Paraffin Sectioning Aid System*“ (Instrumentics, Hackensack, NJ, USA)

angefertigten drei Mikrometer dicken Schnitte wurden aus Donorblöcken repräsentativer Tumorregionen aus den jeweiligen Primärtumoren gewonnen. Gewebezylinder mit je 0,6 mm Durchmesser wurden dann aus den jeweiligen Regionen des Donorblocks mittels einem vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf selbst hergestelltem halbautomatischem Tissue-Arrayer entnommen.

Für die IHC wurde ein kommerzielles Kit für in Paraffin eingebettete Gewebe der Firma *Novus Biologicals* verwendet. Als Primärantikörper dient ein monoklonaler Kaninchen AK (IgG; Clone EP1143Y, 1:450; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) gegen das C-terminale Ende von humanem MK.

Testdurchführung: Die Tumorproben des TMA wurden immunhistochemisch mit einem Antikörper (AK) gegen das C-terminale Ende von humanem MK gefärbt.

Nach Entparaffinieren wird eine durch Hitze induzierte AG-Demaskierung durchgeführt. Um endogene Peroxidase zu inaktivieren, werden die Schnitte mit dreiprozentigem H₂O₂ bedeckt und anschließend mit Block-Puffer inkubiert.

Der mit Block-Puffer verdünnte Primär-AK wird auf jeden Schnitt gegeben und über Nacht inkubiert. Nach einem Waschgang wird der in Blockpuffer verdünnte und mit HRP konjugierte Sekundär-AK auf jeden Schnitt gegeben. Durch Zugabe von DAB-Substrat entwickelt sich die passende Färbung.

Abschließend werden die Schnitte mit H.E gegengefärbt, dehydriert und mit Permound Medium bedeckt.

Testauswertung: Im TMA wurden neben etwa 4500 Proben von 60 Entitäten 39 GIST-Proben und 17 Leiomyom-Proben von chirurgisch im UKE resezierten Tumoren untersucht. Die immunhistochemische Analyse und Auswertung erfolgte durch drei unabhängige Personen. Bei unterschiedlichen Meinungen bezüglich eines Schnittes galt die des Pathologen als verbindlich. Die Intensität der Färbung wurde in einer vierstufigen Skala eingeteilt (0, 1+, 2+, 3+). Die Ergebnisse aller TMAs wurden dann in drei Kategorien unterteilt: negativ (keine detektierbare Färbung im Vergleich zur unspezifischen Hintergrundfärbung), schwach positiv (1+) und stark positiv (2+ oder 3+).

3.3) Enzyme linked Immuno sorbent assay (ELISA)

Um die Detektion von MK auch in Serumproben vorzunehmen, wurden bereits in ausgiebigen Vorversuchen verschiedene ELISA-Systeme getestet, um eine optimale Bestimmung des Proteins im Serum zu gewährleisten.

3.3.1) Prinzip und Methoden des ELISA: Als ELISA bezeichnet man ein immunologisches Nachweisverfahren (Assay), das zur Gruppe der Immunoassay-Verfahren gehört. Immunoassays gehören zu den am weitesten verbreiteten Methoden in der Bioanalytik. Mit Hilfe des ELISA können durch AG-AK-Bindung Proteine, Viren, aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone und Toxine in einer flüssigen Phase (z.B. Körperflüssigkeiten) nachgewiesen werden. Zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung des Analyten werden markierte Reagenzien verwendet.

Es gibt unterschiedliche Formen des Immunoassays. Im Folgenden soll nur auf den in dieser Studie verwendeten *Sandwich-ELISA* eingegangen werden.

Im Sandwich-ELISA werden zwei AK, die beide spezifisch an das nachzuweisende AG binden, verwendet. Um sich nicht gegenseitig zu behindern, binden beide AK an unterschiedliche Bindungsstellen des AG. Der Primärantikörper wird an eine feste Phase gebunden.

Für den ELISA werden in der Regel sog. Mikrotiterplatten mit einer definierten Anzahl an Vertiefungen mit einem bestimmten Volumen verwendet.

Die Probe mit dem nachzuweisenden AG wird dann in die Kavitäten gegeben, inkubiert und der Primärantikörper kann hinzugegeben werden, um spezifisch an das nachzuweisende AG zu binden. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen um die ungebundenen, überschüssigen Primärantikörper zu entfernen. Im nächsten Schritt wird ein zweiter AK, der Detektions-AK, zugegeben, an dessen Ende ein Enzym, meist HRP oder AP, gebunden ist. Er bindet ebenfalls spezifisch an das AG und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich). Nach gründlichem Auswaschen von überschüssigem Detektions-AK wird ein zum Enzym passendes chromogenes Substrat zugegeben und vom Enzym umgesetzt, wodurch ein Farbumschlag entsteht.

Beim ELISA werden Enzyme verwendet, die eine chemische Reaktion katalysieren, bei der das Enzym ein Substrat umsetzt und dadurch als Reaktionsprodukt ein Farbumschlag (chromogenes Substrat), eine Fluoreszenz oder eine Chemolumineszenz nachgewiesen werden kann. Für eine exakte Konzentrationsbestimmung des

Analyten in der flüssigen Phase ist eine Kalibrationskurve, für die Proben mit bekannter Analytkonzentration mitgemessen werden, notwendig. Nach der Erstellung einer Kurve, bei der die gemessenen Aktivitäten im Assay gegen die jeweiligen Konzentrationen des Analyten in den Vergleichsproben aufgetragen werden, lässt sich die Konzentration des Analyten in den zu untersuchenden Proben aus der Kurve berechnen. Die Signalstärke ist also eine Funktion der Antigenkonzentration, so dass der ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

3.3.2) Durchführung und Auswertung des ELISA: Die GIST-Blutproben wurden mittels Sandwich-ELISA zur Detektion von humanem MK im Serum mit einem kommerziellen humanen MK-ELISA Kit (BioVendor®, Heidelberg, Germany) verarbeitet.

Testdurchführung: Im humanen MK-ELISA werden je 100 µl des Standards (rekombinantes 14,6 KiloDalton (kDa) großes Protein aus 131 Aminosäuren), einer Qualitätskontrolle und der zu verarbeitenden Proben in Doppelbestimmungen auf eine bereits mit einem polyklonalen gegen menschliches MK im Serum gerichteten Primärantikörper vorbeschichtete Mikrotiterplatten pipettiert (solide Phase).

Die Platte wird bei RT zwei Stunden auf einem Schüttler mit 300 Rotationen pro Minute (rpm) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,35 ml Waschlösung pro Kavität wird die Platte auf einem Papiertuch abgeklatscht.

Anschließend werden 100 µl des biotinylierten, polyklonalen gegen humanes MK gerichtete Detektions-AK pro Kavität hinzugeben. Nach erneutem Waschen wird 100 µl Streptavidin-HRP pro Kavität hinzugegeben und inkubiert. Anschließend werden 100 µl des Substrates H₂O₂-Tetramethylbenzidine (TMB) pro Kavität auf die Platte pipettiert und die Platte zum Inkubieren in Alufolie als Lichtschutz eingepackt. Die verwendete Substratlösung TMB erzeugt nach etwa 10-15 Minuten Inkubationszeit einen Farbumschlag von gelb nach blau. Die Reaktion wird durch Zugabe von je 100 µl einer sauren Lösung gestoppt. Die Absorption der blauen Lösung kann photometrisch bei 450 Nanometer (nm) (OD450) Wellenlänge im ELISA-Lesegerät (Dynatech MR 500) gemessen werden.

Das von uns benutzte Computerprogramm *Mikrowin 2000*® berechnet die Konzentrationen aus den gemessenen Absorptionen automatisch. Die Standardkurve wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen die Konzentration von humanem MK im Serum berechnet.

Das Detektionslimit (Konzentration des Analyten, mit einer höheren Absorption als die des Puffers plus dreifache Standardabweichung) beträgt 33 pg/ml. Werte, die diese Konzentration oder eine niedrigere besaßen, wurden von uns für die statistische Auswertung als 33 pg/ml definiert.

Die benutzten Antikörper richten sich spezifisch gegen humanes MK, es existieren keine Kreuzreaktivitäten gegen den verwandten Wachstumsfaktor Pleiotrophin.

3. 4) Statistische Analyse

„*Statistical Package for Social Sciences*“ (SPSS®) für Windows (Version 11.5.1) (SPSS® Inc., Chicago, IL, USA) wurde zur statistischen Auswertung verwendet. Statistische Signifikanz der Korrelationen zwischen den MK-Konzentrationen und klinisch-pathologischen Daten wurde mittels *Mann-Whitney-U-Test*, *Kruskal-Wallis-Test* und *T-Test* nachgewiesen. Die Kreuztabellen-Statistiken wurden mittels *Fishers-Test* berechnet. Die Überlebensanalysen wurden mit der *Kaplan-Meier-Methode* berechnet und statistische Signifikanzen wurden mittels *log-rank-Test* nachgewiesen. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0,05 in zweiseitigen Tests festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1) Tissue-Microarray (TMA)

4.1.1) MK-Expression bei Patienten mit Ösophagus-, Kolon-, Bronchial- und Pankreaskarzinom: Die Ergebnisse einiger der im TMA untersuchten Entitäten werden im Folgenden kurz dargestellt (s. Tab. 3). 39 der 56 (70%) untersuchten Gewebeproben aus Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus zeigten keine MK-Färbung, 9 (16%) waren schwach MK positiv und 8 (15%) stark MK positiv. Bei den Adenokarzinomen des Ösophagus waren 24 von 59 (41%) negativ, 7 (13%) schwach positiv und 27 (46%) stark positiv.

24 der 45 (53%) untersuchten *low grade* Kolonkarzinome waren MK negativ, 8 (18%) schwach positiv und 13 (29%) stark positiv, wohingegen 19 der 35 (54%) untersuchten *high grade* Kolonkarzinome stark MK positiv, 5 (14%) schwach positiv und 11 (31%) negativ waren.

Von den insgesamt 198 untersuchten Bronchialkarzinomen waren nur 29 (15%) MK negativ. 6 der 10 (60%) untersuchten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC), 46 der 70 (66%) untersuchten Adenokarzinome, 43 der 57 (75%) Plattenepithelkarzinome, 10 der 13 (77%) bronchioalveolären Karzinome und 12 der 15 (80%) kleinzelligen Bronchialkarzinome (SCLC) ließen sich stark MK positiv anfärben.

13 der 19 (68%) neuroendokrinen Pankreaskarzinome, 41 der 56 (73%) duktaalen Adenokarzinome des Pankreas und 23 der 28 (82%) Pankreasadenokarzinome der Papille waren stark MK positiv.

Tabelle 3: Darstellung der untersuchten Entitäten mit Aufführung der Gesamtzahl aller untersuchten Tumorproben und der Anzahl an MK stark positiv gefärbten Tumorproben

Entität	Anzahl gesamt	stark positive Färbung Anzahl (%)
Ösophaguskarzinom		
Plattenepithelkarzinom	56	8 (15%)
Adenokarzinom	59	27 (46%)
Kolonkarzinom		
Low grade	45	13 (29%)
High grade	35	19 (54%)
Bronchialkarzinom		
NSCLC	10	6 (60%)
Adenokarzinom	70	46 (66%)
Plattenepithelkarzinom	57	43 (75%)
Bronchoalveoläres Karzinom	13	10 (77%)
SCLC	15	12 (80%)
Pankreaskarzinom		
Neuroendokrin	19	13 (68%)
Duktales Adenokarzinom	56	41 (73%)
Papilläres Adenokarzinom	28	28 (82%)

4.1.2) MK-Expression bei Patienten mit GIST und differentialdiagnostisch relevanten Tumoren: Im TMA wurden Gewebeproben von 39 im UKE resezierten GIST, 17 Leiomyomen, 52 Neurofibromen, 26 Leiomyosarkomen und 14 Schwannomen auf eine etwaige MK-Expression untersucht.

Eine MK-Expression konnte in etwa 60% der GIST-Proben festgestellt werden, 18 (46%) der GIST-Gewebeproben waren stark positiv (s. Abb. 1). Gegenüber den benignen differentialdiagnostisch zu erwägenden Tumoren ließen sich GIST gut abgrenzen: Unter den Leiomyomen waren 12 der 17 (71%) Proben negativ. Eine starke Färbung konnte in nur einem (6%) der Leiomyome gefunden werden.

44 der 52 (83%) untersuchten Neurofibrome waren MK negativ, nur 2 (4%) waren stark MK positiv.

Die MK-Expression bei den malignen differentialdiagnostisch zu erwägenden Entitäten unterschied sich hingegen weniger deutlich von der Färbung bei GIST. 8 der 26 (31%) untersuchten Leiomyosarkome und 5 der 14 (36%) malignen Schwannome waren stark MK positiv.

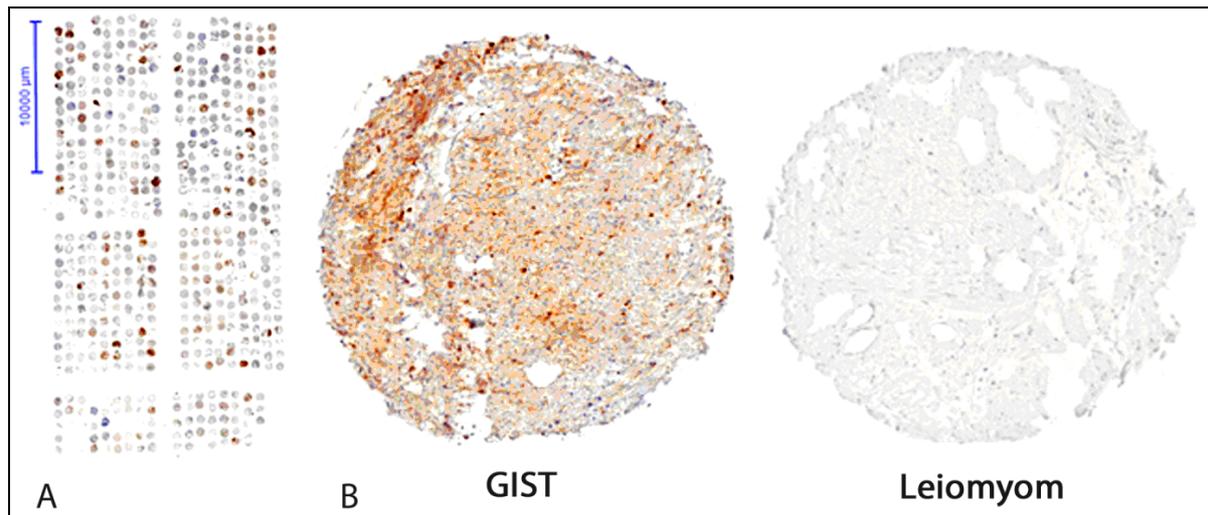


Abbildung 1: MK-Expression bei GIST- und Leiomyom-Gewebe. Die immunhistochemische Färbung wurde mittels PAP-Methode mit einem monoklonalem Antikörper (Clone EP1143Y) gegen Midkine durchgeführt. (A) zeigt einen kompletten Tissue-Microarray (TMA) (B) zeigt ein Beispiel eines einzelnen Gewebeslots eines GIST und eines Leiomyoms (Vergrößerung, $\times 100$).

4.2) ELISA

4.2.1) Serum-MK-Konzentration bei Patienten mit Ösophagus-, Kolon-, Bronchial- und Pankreaskarzinom: Die Ergebnisse der Serumuntersuchung aller untersuchten Tumorprieten und der Kontrollprobanden sind Tabelle 3 zu entnehmen. Die mittleren (\pm Standardabweichung (SD)) und medianen (25. und 75. Perzentile) MK-Konzentrationen im Serum aller untersuchten Tumorprieten waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden erhöht. Der Mittelwert der S-MK-Konzentration der Kontrollprobanden betrug $128 (\pm 115)$ pg/ml, die mediane S-MK-Konzentration 99 (33 und 198) pg/ml (s. Tab. 4 und Abb. 2).

Tabelle 4: Mittlere und mediane S-MK-Konzentrationen bei Patienten mit Ösophagus-, Kolon-, Bronchial- und Pankreaskarzinom und bei Kontrollprobanden

	Anzahl	Mediane S-MK-Konzentration (\pm SD) (pg/ml)	Mittlere S-MK-Konzentration (25. und 75. Perzentile) (pg/ml)
Kontrollprobanden	148	128 ± 115	99 (33 und 198)
Ösophaguskarzinome	38	896 ± 1111	705 (705 und 1013)
Kolonkarzinome	42	609 ± 414	518 (351 und 750)
Bronchialkarzinome	40	2630 ± 3121	2015 (1336 und 2505)
Pankreaskarzinome	37	1200 ± 1712	721 (409 und 1107)

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 2) stellt die S-MK-Konzentrationen bei allen untersuchten Kontrollprobanden (n= 148) und Tumorpatienten in einer Balkendiagramm-Analyse dar.

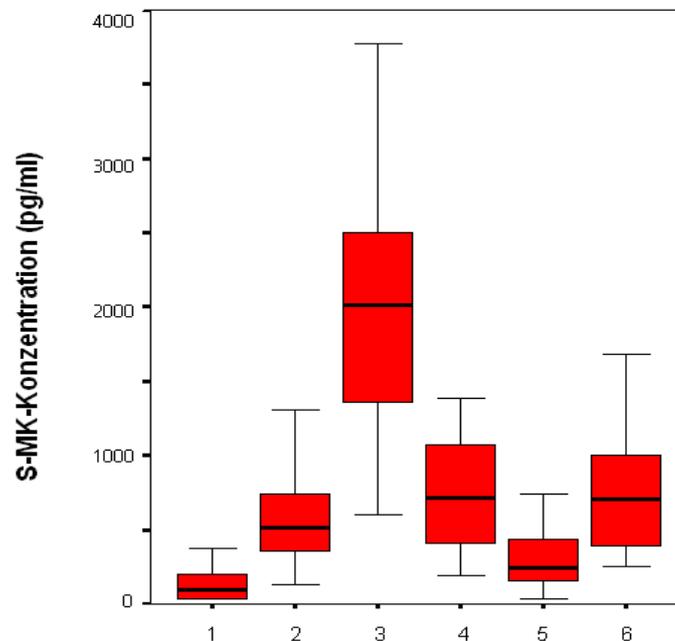


Abbildung 2: Balkendiagramm-Analyse der S-MK-Konzentrationen bei gesunden Kontrollprobanden (n= 148) (1), Patienten mit Kolonkarzinom (n= 42) (2), Bronchialkarzinom (n= 40) (3), Pankreaskarzinom (n= 37) (4), GIST (n= 96) (5) und Ösophaguskarzinom (n= 38) (6). Im Balkendiagramm wird die niedrigste bzw. höchste S-MK-Konzentration angezeigt. Der Oberrand des roten Balkens zeigt die 75. Perzentile, der Unterrand die 25. Perzentile an. Innerhalb des roten Balkens wird mit einer schwarzen Linie die mediane S-MK-Konzentration dargestellt.

4.2.2) Serum-MK-Konzentration bei Patienten mit GIST: Insgesamt wurden 96 GIST-Patienten und 148 gesunde Kontrollprobanden in die Studie miteinbezogen. Die S-MK-Konzentrationen der GIST Patienten waren signifikant höher als die der Kontrollprobanden. Die mediane (25. und 75. Perzentile) S-MK-Konzentration betrug 235 (139 und 376) pg/ml bei den GIST-Patienten und 99 (33 und 198) pg/ml bei der Kontrollgruppe ($p < 0.001$; Mann-Whitney-U-Test) (s. Abb. 3). Die mittlere S-MK-Konzentration (\pm SD) betrug 317 (\pm 377) pg/ml bei den GIST-Patienten und 128 (\pm 115) pg/ml bei der Kontrollgruppe.

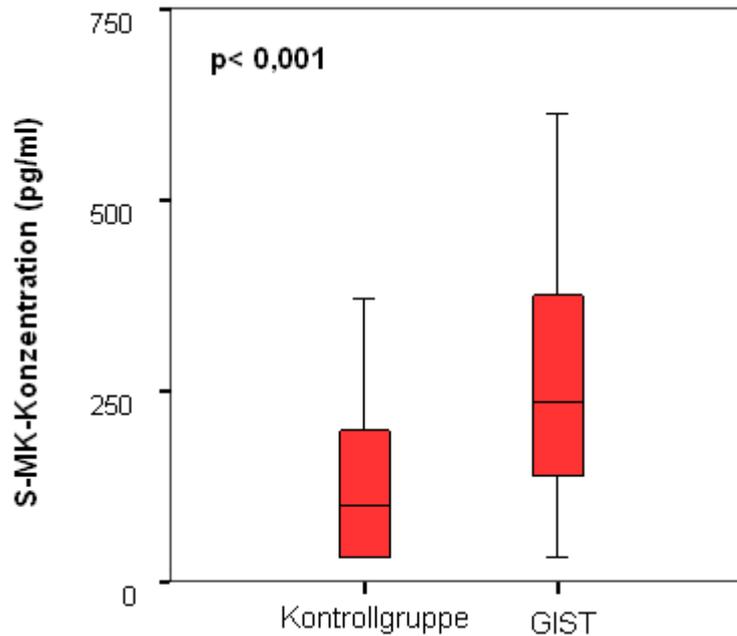


Abbildung 3: Balkendiagramm-Analyse der S-MK-Konzentrationen im ELISA von gesunden Kontrollprobanden (n= 148) und GIST-Patienten (n= 96). Statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test ($p < 0.001$) ermittelt.

Das mediane Alter der GIST Patienten betrug 60 Jahre (28-81 Jahre), das der Kontrollprobanden 47 Jahre (30-70 Jahre). 50 der 96 (52%) GIST-Patienten waren männlich und 46 (48%) weiblich. In der Kontrollgruppe waren 98 (66%) Probanden männlich und 50 (34%) weiblich. Es ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der S-MK-Konzentration und Alter oder Geschlecht (s. Tab. 5).

In Tabelle 4 werden die klinisch-pathologischen Daten der 96 GIST-Patienten mit den jeweiligen medianen (25. und 75. Perzentile) und mittleren (\pm SD) S-MK-Konzentrationen aufgelistet. Die jeweiligen p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test, Kruskal-Wallis-Test und Fishers-Test berechnet.

Tabelle 5: Klinisch-pathologische Daten der GIST-Patienten mit mittleren und medianen S-MK-Konzentrationen und p-Werten. Die jeweiligen p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-Test ermittelt.

Patientendaten und klinisch-pathologische Daten	Anzahl (%)	Mediane S-MK-Konzentration (25. und 75. Perzentile) (pg/ml)	Mittlere S-MK-Konzentration \pm SD (pg/ml)	p-Wert
Mittleres Alter Jahre \pm SD	60 \pm 12			
Geschlecht Männlich Weiblich	50 (52) 46 (48)	241 (144 und 435) 233 (113 und 317)	369 \pm 483 235 \pm 151	0,173
Tumorgröße (cm) <2 2-5 5-10 >10	8 (10) 21 (30) 21 (30) 21 (30)	239 (118 und 437) 240 (167 und 414) 232 (151 und 308) 243 (87 und 501)	275 \pm 183 271 \pm 155 229 \pm 114 414 \pm 653	0,927
Mitoserate (pro 50 HPF) < 5 5-10 >10	27 (49) 8 (15) 20 (36)	241 (113 und 424) 232 (144 und 241) 244 (190 und 407)	267 \pm 171 195 \pm 55 414 \pm 653	0,473
Tumorlokalisation Magen Dünndarm Andere	52 (66) 22 (28) 5 (6)	240 (138 und 380) 227 (74 und 284) 290 (182 und 510)	328 \pm 440 244 \pm 212 328 \pm 175	0,421
Resektionsausmaß R0 R1/2	54 (77) 16 (23)	233 (115 und 370) 190 (106 und 511)	263 \pm 187 469 \pm 800	0,924
Rezidiv/Metastase Nein Ja	28 (42) 39 (58)	230 (80 und 247) 295 (166 und 489)	197 \pm 115 386 \pm 458	0,009

Hinsichtlich ihres Risikoprofils für aggressives Verhalten sind Mitoserate und Tumorgröße wichtige prognostische Faktoren. Neuerdings wird auch die Tumorlokalisation als prognostischer Indikator gewertet. Im Folgenden soll auf die Korrelation dieser und weiterer prognostischer Parameter speziell eingegangen werden.

Die Patientengruppe mit einer Mitoserate von <5 Mitosen pro 50 HPF umfasste 27 Patienten. In der Gruppe mit 5-10 Mitosen/50 HPF waren 8 und in der Hochrisikogruppe mit >10 Mitosen/50 HPF 20 Patienten.

Im Vergleich der drei Gruppen untereinander konnte keine signifikante Beziehung zu der Höhe der S-MK-Konzentration festgestellt werden ($p= 0,473$; Kruskal-Wallis-Test). Bei einer Zusammenlegung der drei Gruppen in zwei Gruppen mit >10 und <10 Mitosen/50 HPF kann festgestellt werden, dass sich die Mediane der

S-MK-Konzentrationen der beiden Gruppen kaum unterscheiden, dass jedoch im Mittelwertvergleich große Unterschiede gefunden werden können. Die mediane S-MK-Konzentration in der Gruppe mit >10 Mitosen/50 HPF (n= 20) betrug 244 (190 und 407) pg/ml und die mittlere S-MK-Konzentration 428 (\pm 646) pg/ml. In der Patientengruppe mit Mitoseraten unter 10 Mitosen/50 HPF (n= 35) war der Median 236 (144 und 308) pg/ml und der Mittelwert 249 (\pm 152) pg/ml. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation beobachtet werden ($p= 0,456$; Mann-Whitney-U-Test und $p= 0,127$; T-Test).

In der Gruppe von Patienten mit einer Tumorgröße von <2 cm befanden sich 8 Patienten. Die anderen 3 Gruppen umfassten je 21 Patienten. Beim Vergleichen der Gruppen untereinander unterschieden sich die Mediane kaum voneinander ($p= 0,927$; Kruskal-Wallis-Test). Bei einer Unterteilung in zwei Gruppen, mit einer Tumorgröße, die größer beziehungsweise kleiner als 10 cm betrug, konnten im Mittelwertvergleich jedoch ähnliche Tendenzen wie bei der Gruppe von Mitoseraten > bzw. < 10 Mitosen/50 HPF festgestellt werden. In der Gruppe mit einer Tumorgröße von über 10 cm (n= 20) betrug der Mittelwert 409 (\pm 636) pg/ml, wohingegen er in der Gruppe mit kleineren Tumoren (n= 39) nur 252 (\pm 143) pg/ml betrug. Statistische Signifikanz konnte nicht ermittelt werden ($p= 0,145$; T-Test).

66% der GIST-Primärtumoren waren im Magen und 28% im Dünndarm lokalisiert. Weitere Primärtumorlokalisationen waren Kolon, Rektum und Ösophagus. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der medianen S-MK-Konzentration und der Primärtumorlokalisation ($p= 0,421$; Kruskal-Wallis-Test).

54 GIST-Patienten wurden R0-reseziert, 16 R1 bzw. R2. Beim Vergleich der Mediane konnten keine signifikanten Unterschiede in der S-MK-Konzentration gezeigt werden ($p= 0,924$; Kruskal-Wallis-Test). Beim Mittelwertvergleich der beiden Gruppen R0 und R1/2 gab es deutliche Unterschiede. In der Gruppe der R0-resezierten Patienten betrug der Mittelwert 263 (\pm 187) pg/ml, in der Gruppe von R1/2-resezierten Patienten 469 (\pm 800) pg/ml ($p= 0,152$; T-Test).

Bei Patienten, die im Verlauf eine Metastase und/oder ein Rezidiv entwickelt haben (n= 39), konnten signifikant höhere S-MK-Konzentrationen gefunden werden als bei denen, die weder Metastase noch Rezidiv entwickelten (n= 28). Die mediane (25. und 75. Perzentile) S-MK-Konzentration betrug 295 (166 und 489) pg/ml bei den Patienten mit Metastase und/oder Rezidiv und 230 (80 und 247) pg/ml bei den Patienten ohne ($p= 0,009$; Mann-Whitney-U-Test).

Die mittlere Nachverfolgungszeit der Patienten zum Zeitpunkt der Durchführung des ELISA betrug 50 Monate (8-273 Monate). Zur statistischen Analyse wurden die S-MK-Konzentrationen in zwei Gruppen (Konzentration höher und niedriger als 400 pg/ml) eingeteilt und in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier dargestellt (s. Abb. 4).

Die Patienten in der Gruppe mit S-MK-Konzentrationen über 400 pg/ml schnitten signifikant schlechter im metastasen- und rezidivfreien Überleben ab ($p < 0,026$; log-rank-Test).

Die Patienten mit Konzentrationen, die weniger als 400 pg/ml betragen, zeigten eine mediane metastasen- und rezidivfreie Überlebenszeit von 61 Monaten [95%-CI: 21; 100], wohingegen die Patienten mit hohen S-MK-Konzentrationen nur 46 Monate [95%-CI: 17; 75] ohne die Entwicklung eines Rezidivs und/oder einer Metastase überlebten. Die 5-Jahres metastasen- und rezidivfreie Überlebensrate bei Patienten mit niedrigen Konzentrationen betrug 50%, bei den Patienten mit hohen Konzentrationen hingegen nur 15%.

Von den 54 R0-resezierten Patienten entwickelten 24 (56%) eine Metastase und/oder ein Rezidiv. Von den 16 R1/2-resezierten Patienten entwickelten 11 (73%) eine Metastase und/oder ein Rezidiv.

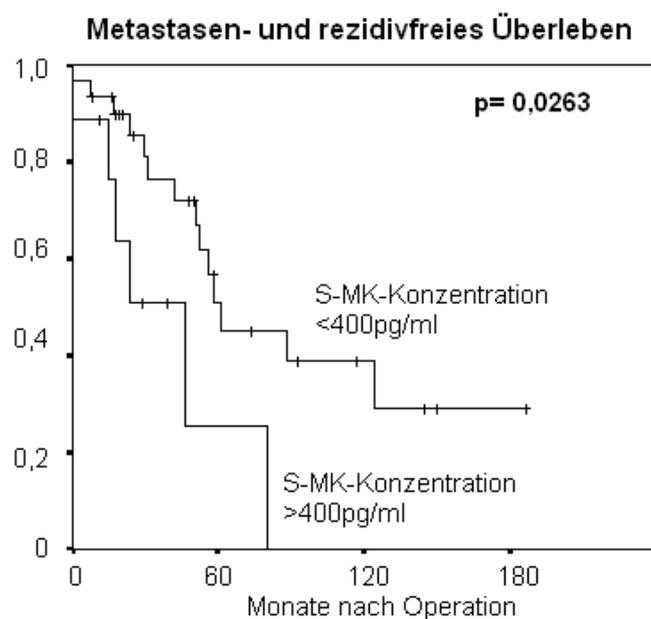


Abbildung 4: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion für metastasen- und rezidivfreies Überleben bei R0-resezierten Patienten (n= 39) mit S-MK-Konzentrationen höher und niedriger als 400 pg/ml.

Statistische Signifikanz wurde mit dem log-rank-Test berechnet.

Da in der Nachbeobachtungszeit nur ein Patient tumorbedingt verstorben ist, konnte keine Analyse für das Gesamtüberleben berechnet werden.

Weder Mitoserate noch Tumorgröße konnten signifikant mit der Entwicklung eines Rezidivs und/oder einer Metastase korreliert werden ($p= 0,270$ und $p= 0,744$; Fishers-Test) und beide Faktoren zeigten keinen Einfluss auf das metastasen- und rezidivfreie Überleben in der Kaplan-Meier-Analyse ($p= 0,7026$ und $p= 0,6721$; log-rank-Test).

Die Patienten mit einer Mitoserate über 10 Mitosen/50 HPF und einer Größe über 10 cm hatten ein signifikant schlechteres metastasen- und rezidivfreies Überleben als die Patienten mit Mitoseraten unter 10/50 HPF und Tumorgröße kleiner als 10 cm ($p= 0,0372$; log-rank-Test) (s. Abb. 5).

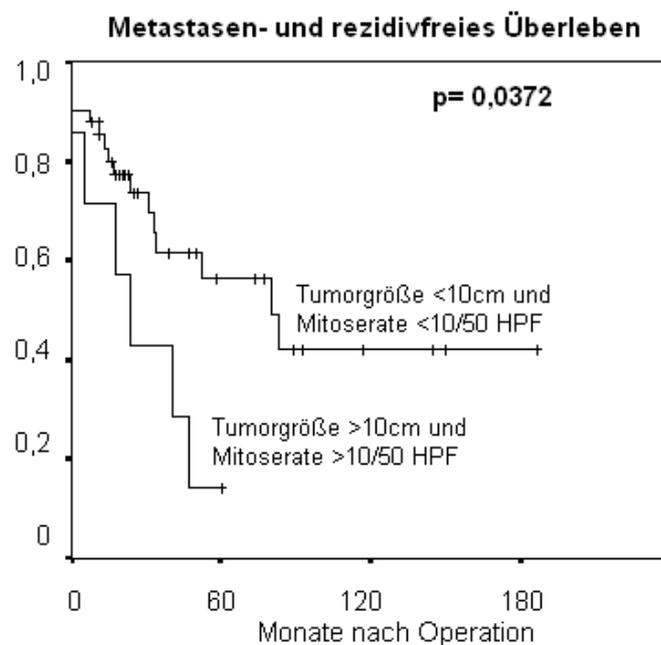


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion für Tumorstadium und Mitoserate über 10 cm bzw. über 10 Mitosen/50 HPF und unter 10 cm und unter 10 Mitosen/50 HPF. Die Patienten, bei denen beiden Faktoren erhöht waren, zeigten ein kürzeres metastasen- und rezidivfreies Überleben. Statistische Signifikanz wurde mit dem log-rank-Test berechnet.

Von den 96 in die Studie eingeschlossenen Patienten erhielten 40 eine Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib. Nach einer mittleren Nachverfolgungszeit von 36 Monaten (3-83 Monate) nach der ersten Imatinib-Gabe zeigten die Patienten, die eine Imatinib-Therapie erhielten, verminderte S-MK-Konzentrationen im Vergleich zu den Patienten ohne Imatinib-Therapie (s. Abb. 6).

Die medianen S-MK-Konzentrationen (25. und 75. Perzentile) bei Patienten ohne Therapie betrug 201 (128 und 241) pg/ml und 331 (236 und 472) pg/ml bei Patienten mit Imatinib-Therapie ($p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test).

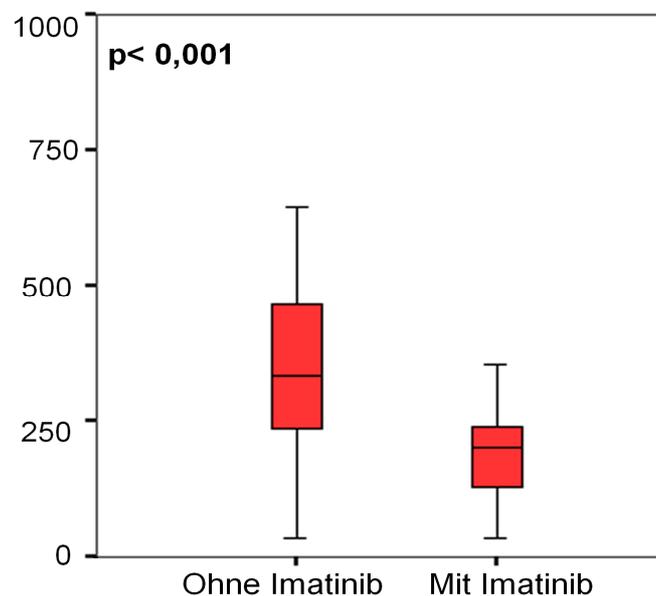


Abbildung 6: Balkendiagrammanalyse der S-MK-Konzentrationen bei GIST Patienten, die Imatinib-Therapie erhielten ($n = 40$) und bei Patienten, die keine Imatinib-Therapie erhielten ($n = 34$). Patienten mit Therapie zeigten niedrigere mediane S-MK-Konzentrationen im Vergleich zu den Patienten ohne Therapie. Statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet ($p < 0,001$).

Des Weiteren wurden die S-MK-Konzentrationen in der Gruppe von Patienten, die mit Imatinib behandelt wurden ($n = 40$) in 2 Gruppen (S-MK höher und niedriger als 400 pg/ml) eingeteilt. Die beiden Gruppen wurden anschließend in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Patienten mit S-MK-Konzentrationen über 400 pg/ml ein signifikant kürzeres rezidiv- und/oder metastasenfreies Überleben haben, als die Patienten mit Konzentrationen niedriger als 400 pg/ml ($p = 0,0047$; log-rank Test) (s. Abb. 7).

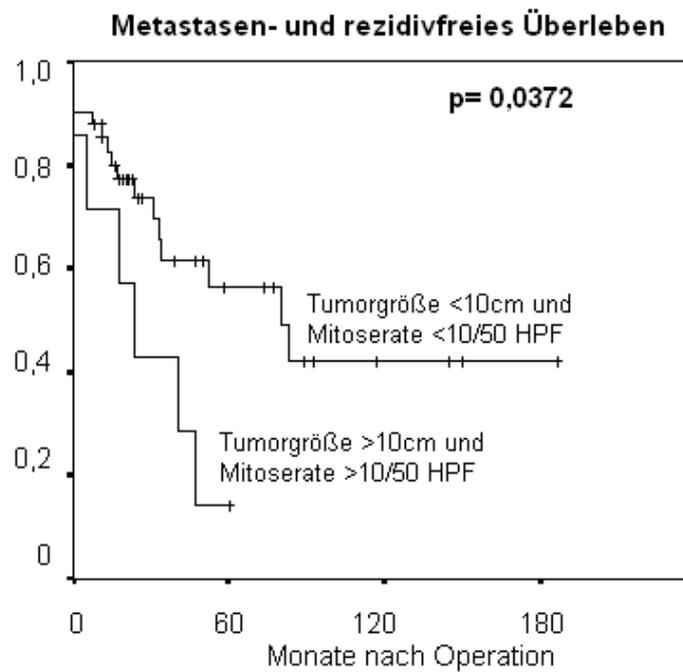


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion für GIST-Patienten unter Imatinib-Therapie. Patienten mit S-MK-Konzentrationen unter 400 pg/ml zeigten ein signifikant längeres metastasen- und/oder rezidivfreies Überleben als Patienten mit S-MK-Konzentrationen über 400 pg/ml.

Statistische Signifikanz wurde mit dem log-rank-Test berechnet.

In der Gruppe von GIST-Patienten mit S-MK-Konzentrationen unter 400 pg/ml betrug die mediane rezidiv- und metastasenfrie Überlebenszeit 52 Monate [95%-CI: 32; 72], wohingegen Patienten mit S-MK-Konzentrationen über 400 pg/ml nur 18 Monate [95%-CI: 8; 28] rezidiv- und metastasenfrie überlebten. Die 5-Jahres rezidiv- und metastasenfrie Überlebensrate bei den Patienten mit S-MK-Levels unter 400 pg/ml betrug 56%. In der Gruppe mit Konzentrationen über 400 pg/ml gab es keinen Patienten der 5 Jahre ohne die Entwicklung eines Rezidivs und/oder einer Metastase überlebte.

5. Diskussion

Das Protein Midkine (MK) ist ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor, der stark während der Mitte der Embryonalzeit exprimiert wird und bedeutende Funktionen in der Entwicklung ausübt. Die Rolle von MK bei der Entwicklung des Nervensystems ist bisher am besten erforscht (Vanderwinden et al. 1992, Matsumoto 1994, Amet et al. 2001, Kadomatsu und Muramatsu 2004). Es konnte gezeigt werden, dass durch MK die Überlebensrate von embryonalen Neuronen erhöht wird und dass MK das Aussprossen von Neuriten, die neuronale Differenzierung und die neuronale Migration stimuliert (Asai et al. 1997). Beim gesunden Erwachsenen ist die MK-Expression auf einige Gewebe begrenzt (Kadomatsu 1988, Matsubara et al. 1990, Nakamoto et al. 1992). Während entzündlicher Prozesse, der Wundheilung und der Kanzerogenese wird MK jedoch stark hochreguliert oder neu induziert (Muramatsu 1993, Matsubara et al. 1994). Es wird angenommen, dass MK die Tumorprogression vorantreibt, indem es Überleben, Wachstum, Migration und Angiogenese von Tumorzellen fördert (Kurtz et al. 1995, Choudhui et al. 1997, Dai et al. 2007). Eine erhöhte MK-Expression wurde in einer Vielzahl maligner Tumoren neuronaler Genese wie dem MPNST aber auch in Tumorgeweben anderer Herkunft wie dem Pankreaskarzinom nachgewiesen (Mishima et al. 1997, Ikematsu et al. 2000, Mashour et al. 2001, Kadomatsu und Muramatsu 2004, Maeda et al. 2007). Vor allem in Neuroblastomen, Astrozytomen und Harnblasenkarzinomen konnte eine starke MK-Expression mit einer schlechten Prognose für die Patienten korreliert werden (Nakagawara et al. 1995, O'Brien et al. 1996, Mishima et al. 1997). All diese Studien legen nahe, dass MK eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese und Tumorprogression spielt und als neuer Tumormarker dienen könnte. In einem im UKE angefertigten TMA mit einem monoklonalem Kaninchen AK gegen das C-terminale Ende von humanem MK wurden 60 Entitäten auf eine etwaige MK-Expression untersucht. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung konnten vorausgehende Daten bestätigen.

Eine starke MK-Expression wurde beispielsweise in Neuroblastomen, Bronchialkarzinomen, Pankreaskarzinomen und high-grade Kolonkarzinomen detektiert. Die Daten müssen noch genauer ausgewertet und in einem für die jeweilige Entität spezifischem Array bestätigt sowie mit den klinisch-pathologischen Daten der Patienten korreliert werden.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass MK im Gewebe von GIST-Patienten überexprimiert wird sowie eine differentialdiagnostische und prognostische Relevanz aufweist (Kaifi et al. 2007).

Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) sind sehr seltene Tumoren neuronalen Ursprungs aus der Gruppe der Weichgewebstumoren, die sich aus interstitiellen Cajal-Zellen (ICC) oder deren Vorläuferzellen entwickeln (Fletcher et al. 2002, Nilsson et al. 2005).

Bei der Erstmanifestation eines GIST ist die Prognose kaum vorhersehbar. In bis zu 50% der Fälle streuen GIST Metastasen. Mehr als die Hälfte der Patienten stellen sich mit bereits fortgeschrittenen GIST vor und zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind bereits 15-50% der Tumoren metastasiert (Joensuu et al. 2002). Metastasen oder Rezidive verschlechtern die Prognose erheblich (Miettinen et al. 2001, Tryggvason et al. 2005). Faktoren, die eine Einschätzung hinsichtlich der Aggressivität des Tumors erlauben, wurden lange diskutiert. Mitoserate, Tumorgröße und Lokalisation des Primärtumors erlauben eine Einstufung des Tumors hinsichtlich seiner Tendenz zur Metastasierung und Rezidivbildung (Appelman und Helwig 1977, Corless et al. 2004). Weitere Faktoren, die mit einem hohen Risiko zur Rezidivbildung einhergehen, sind eine intraoperative Tumorrupturn und eine R1/2-Resektion.

Die Differentialdiagnostik der GIST ist komplex und die endgültige Diagnose kann nur anhand von Tumorgewebsuntersuchungen gestellt werden. Vor der heutigen Definition wurden GIST als benigne und maligne Tumoren der glatten Muskulatur oder als neuronale Tumoren eingestuft (Fletcher et al. 2002, Connolly et al. 2003). Mit der Identifizierung des mutierten *c-Kit*-Rezeptors als Auslöser von GIST konnten erstmals genauere Kenntnisse über die Entstehung von GIST gewonnen werden (Hirota et al. 1998). Eine positive *c-Kit*-Färbung kann GIST von anderen Neoplasmen wie dem Leiomyom, Leiomyosarkom und dem Schwannom abgrenzen. Bei ungefähr 90% der Patienten lassen sich Mutationen im *c-Kit*-Gen oder *PDGFR α* -Gen nachweisen.

In dieser Studie konnten die vorausgehenden Daten unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden. Im TMA waren 61% der GIST Gewebeproben MK positiv, wohingegen nur 29% der differentialdiagnostisch zu erwägenden Leiomyome und nur 17% der Neurofibrome MK exprimierten. Die Abgrenzung der MK-Färbung zwischen GIST und den malignen differentialdiagnostisch in Frage kommenden Tumoren war

weniger deutlich. 46%, der GIST, 36% der Schwannome und 31% der Leiomyosarkome waren stark MK positiv.

Immunhistochemisch spielen neben *c-Kit* in der GIST-Diagnostik noch weitere Marker, wie z.B. *CD34*, eine Rolle. Kürzlich wurde die Expression des neuronalen Zelladhäsionsmolekül *L1 (CD171)* bei GIST entdeckt, was unterstreicht, dass GIST ein Tumor neuronalen Ursprungs ist (Kaifi et al. 2006). Es ist weiterhin geplant, immunhistochemisch die Expression anderer Moleküle der L1-Familie wie ChL1, Nr-CAM und Tenascin C in GIST-Gewebeproben zu bestimmen und hinsichtlich ihrer Funktion als Differentialdiagnose- und Prognosemarker für GIST zu untersuchen. Obwohl *c-kit* der etablierte Standardmarker zur Diagnostik eines GIST ist, könnte MK als neuer zusätzlicher Differenzierungsmarker für GIST gegenüber anderen, vor allem benignen Weichgewebstumoren, dienen. Da GIST oft zu malignerem Verhalten tendieren und so radikalerer chirurgischer Therapie bedürfen als die differentialdiagnostischen Tumoren und da Patienten mit GIST häufig effektiv mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib behandelt werden können, ist es von großer Bedeutung GIST von anderen in Frage kommenden Tumoren abzugrenzen und die richtige Therapieindikation zu stellen (Demetri et al. 2002).

Bei klinischem Verdacht auf einen GIST erlauben Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) genauere Aussagen über Größe und Struktur von Primärtumor und eventuell vorhandenen Metastasen (Blay et al. 2005). In der Labordiagnostik hat die Bestimmung von Tumormarkern bislang keinen Stellenwert.

Da MK ein sekretorisches Protein ist, ist seine Analytik nicht nur auf die immunhistochemische Diagnostik aus Tumorgewebeproben begrenzt, sondern es ist auch im peripheren Blut detektierbar. Erhöhte MK-Konzentrationen konnten im Blut von Patienten mit verschiedenen Malignomen, wie dem Ösophaguskarzinom und dem Neuroblastom, nachgewiesen werden (Shimada et al. 2003, Ikematsu et al. 2003, Obata et al. 2005). Beim Magen- und Ösophaguskarzinom konnte die S-MK-Konzentration mit dem Tumorstadium assoziiert werden (Shimada et al. 2003, Obata et al. 2005). Beim Ösophaguskarzinom konnte gezeigt werden, dass die S-MK-Konzentration nach operativer Entfernung des Tumors sinkt. S-MK-Konzentrationen konnten signifikant mit einer schlechten Prognose und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen beim Endometriumkarzinom korreliert werden (Tanabe et al. 2008). In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mittels Sandwich-ELISA konnte gezeigt werden, dass MK im Serum von Patienten mit Ösophagus-, Kolon-,

Pankreas- und Bronchialkarzinomen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden deutlich erhöht ist. Es steht noch aus höhere Fallzahlen der jeweiligen Entität zu untersuchen und die Daten der Serumanalyse mit den klinisch-pathologischen Daten und dem Tumorstadium der Patienten zu korrelieren.

Da für GIST kein klinisch relevanter Tumormarker vorhanden ist, wurde in dem Versuch, einen passenden Serummarker zu identifizieren, MK mittels Sandwich-ELISA im peripheren Blut von GIST-Patienten bestimmt. Es soll die Nutzbarkeit als Prognose-, Verlaufs- und Tumormarker im leicht zugänglichen peripheren Blut untersucht und geklärt werden, inwiefern MK als Serummarker eine Rolle im Therapieverlauf mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib spielt.

Im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden war die S-MK-Konzentration bei den GIST-Patienten signifikant erhöht.

Da Mitoserate, Tumorgöße, Primärtumorlokalisation und Resektionsausmaß wichtige prognostische Faktoren sind, haben wir versucht diese mit der Höhe der S-MK-Konzentration zu assoziieren. Durch hohe Varianzen der S-MK-Konzentrationen unterschieden sich die Mediane der einzelnen Gruppen nicht voneinander. Bei der Unterteilung der einzelnen Gruppen in „Hochrisikogruppen“ von über 10 cm Tumorgöße und mehr als 10 Mitosen/50 HPF konnten jedoch im Mittelwertvergleich klare Tendenzen festgestellt werden. Die Mittelwerte der Patientengruppen von Tumoren mit einer Größe über 10 cm bzw. mit >10 Mitosen pro 50 HPF waren deutlich höher als die der Gruppen mit geringerer Größe bzw. niedriger Mitoserate.

Die Mittelwerte der R1/2-resezierten Patienten waren höher als die der R0-resezierten.

Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte S-MK-Konzentrationen bei GIST mit schlechter Prognose einhergehen (Ikematsu et al. 2003). Patienten, die im Verlauf eine Metastase oder ein Rezidiv entwickelten, zeigten signifikant höhere S-MK-Werte als Patienten ohne. Weiter konnte für R0-resezierte Patienten gezeigt werden, dass Patienten mit hohen S-MK-Konzentrationen ein signifikant kürzeres metastasen- und/oder rezidivfreies Überleben hatten als solche mit niedrigeren Konzentrationen.

Patienten in einer Hochrisikogruppe von >10 Mitosen/50 HPF und >10 cm Tumorgöße hatten ein signifikant kürzeres metastasen- und/oder rezidivfreies Überleben als solche mit weniger Mitosen und einer geringeren Tumorgöße.

Die operative Entfernung des Tumors ist nach wie vor die erste Wahl für lokalisierte resektable GIST (Blay et al. 2005). Doch auch nach kompletter operativer Entfernung

des Primärtumors haben GIST-Patienten ein hohes Metastasierungsrisiko und Lokalrezidive sind häufig. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach vollständiger chirurgischer Resektion lag bislang bei etwa 50% und sinkt auf etwa 35% bei fortgeschrittenen GIST (DeMatteo et al. 2000, Eisenberg und Judson 2004). Seit der Einführung des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib hat sich die Prognose von Patienten mit fortgeschrittenen und/oder metastasierten GIST dramatisch verbessert. Der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib wurde 2002 für die Behandlung von erwachsenen Patienten mit *CD117* positiven nicht resektablen und/oder metastasierten GIST und für die adjuvante Behandlung Erwachsener mit signifikantem Risiko eines Rezidivs nach Resektion *c-Kit* positiver GIST zugelassen (Novartis Oncology).

In dieser Studie hatten Patienten, die mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib behandelt wurden, signifikant niedrigere MK-Konzentrationen als Patienten ohne Imatinib-Therapie. Patienten mit hohen S-MK-Konzentrationen unter Imatinib-Therapie hatten ein kürzeres rezidivfreies Überleben, als solche mit niedrigen Konzentrationen.

MK kann als Prognosemarker und Verlaufsmarker für GIST-Patienten dienen, indem es in hohen Konzentrationen helfen könnte, eine Metastase oder ein Rezidiv frühzeitig zu identifizieren. So könnten Patienten mit fortgeschrittenen GIST, die für eine Tyrosinkinaseinhibitor-Therapie in Frage kommen, früh identifiziert werden.

MK ist ein potentieller Indikator für das Ansprechen auf die Tyrosinkinaseinhibitor-Therapie, welches derzeit nur mittels PET und CT beurteilt werden kann.

Hohe S-MK-Konzentrationen könnten bei der Indikationsstellung für (neo)adjuvante Therapien hilfreich sein oder dabei helfen Patienten auszuwählen, die gegen Imatinib resistent sind und einer anderen Therapie bedürfen.

Hohe S-MK-Konzentrationen könnten dabei helfen vor Operationen Hochrisikopatienten zu identifizieren, was möglicherweise als Auswahlkriterium für neoadjuvante Therapien dienen könnte.

Auch die Zelladhäsionsmoleküle der L1-Familie sollen auf Serumebene bestimmt werden, um die Daten der Immunhistochemie mit den Daten des ELISA zu korrelieren. Hierfür wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits ein ELISA zur Diagnostik von L1 und ChL1 etabliert. Tenascin C wird mittels handelsüblichem ELISA detektiert. Die Daten werden derzeit ausgewertet.

Die Identifizierung von durch Tumorzellen exprimierten Molekülen, anhand derer eine gezielte Tumorerstörung und Hemmung einer Metastasensetzung erreicht werden kann, könnte einen Ansatz für eine gezielte immuntherapeutische Behandlung bieten

und diese Moleküle könnten als Tumormarker in der Diagnostik eingesetzt werden. Im Mausmodell konnte mithilfe von Antisense-Oligonukleotiden das Tumorwachstum und die Angiogenese inhibiert werden (Dai et al. 2007). Das Vorhandensein einer siRNA macht MK als Zielmolekül für eine Antitumor-Therapie einsetzbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse dieser Studie indizieren, dass MK immunhistochemisch und im Blut von Patienten mit GIST nachgewiesen werden kann und so nicht nur als Differenzierungsmarker im Gewebe, sondern auch als einfach zugänglicher Prognose- und Progressionsmarker im Blut, speziell auch unter einer Tyrosinkinaseinhibitor-Therapie im peripheren Blut, dienen kann. Hohe S-MK-Konzentrationen könnten dabei helfen, Hochrisikopatienten zu identifizieren und so könnte diese Patientengruppe frühzeitig von neuen Therapie-strategien, wie beispielsweise einer (neo)adjuvanten Tyrosinkinaseinhibitor-Therapie, profitieren.

Zukünftige Studien sollten sich auf die Rolle von MK in der Tumorigenese und auf die Bedeutung von MK als Tumormarker und Therapie-Ansprechmarker für Imatinib-Therapie fokussieren.

Obwohl eine relativ große Anzahl an GIST-Patienten in diese Studie eingeschlossen wurde, war eine Limitation dieser Studie, dass es bei einigen Patienten durch logistische Schwierigkeiten bei der Sammlung von Proben aus verschiedenen Kliniken zu fehlenden Daten gekommen ist.

6. Zusammenfassung

Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) sind Tumoren neuronalen Ursprungs, die erst seit einigen Jahren als eigene Entität betrachtet werden (Fletcher et al. 2002). Ihre endgültige Diagnose lässt sich derzeit nur durch immunhistochemische Analyse des Tumorgewebes anhand der Expression des Tyrosinkinase-Rezeptors *c-kit* stellen, für den mehr als 90% der GIST positiv sind (Miettinen et al. 2002, DeMatteo et al. 2000). Ein klinisch relevanter Serummarker für GIST ist bisher nicht vorhanden. Da Patienten mit GIST häufig effektiv mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Glivec®) behandelt werden können, ist es von großer Bedeutung, GIST von den differentialdiagnostisch zu erwägenden Tumoren abzugrenzen. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass der Wachstumsfaktor Midkine (MK) im Gewebe von GIST-Patienten überexprimiert wird sowie eine differentialdiagnostische und prognostische Relevanz aufweisen kann (Kaifi et al. 2007). In dieser Studie konnte immunhistochemisch im TMA bestätigt werden, dass MK in GIST Gewebeproben im Gegensatz zu Leiomyomen überexprimiert wird. Die Serumanalyse mittels ELISA ergab, dass bei GIST-Patienten MK im Serum nachweisbar und im Gegensatz zu gesunden Normalprobanden signifikant erhöht ist. Hohe S-MK-Konzentrationen konnten mit einer schlechten Prognose verbunden werden. Bei Patienten, die im Langzeitverlauf eine Metastase und/oder ein Rezidiv entwickelten, wurden signifikant höhere MK-Konzentrationen gemessen als bei Patienten ohne Rezidiv und Metastase. In der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse zeigten die Patienten mit hohen S-MK-Konzentrationen ein signifikant schlechteres Überleben als die mit niedrigen S-MK-Konzentrationen.

Patienten, die im Verlauf mit Imatinib behandelten wurden, hatten signifikant niedrigere S-MK-Konzentrationen als Patienten ohne Tyrosinkinaseinhibitor-Therapie und in der Kaplan-Meier Überlebensanalyse hatten Patienten mit hohen S-MK-Konzentrationen unter der Therapie ein signifikant höheres Risiko ein Rezidiv und/oder Metastasen zu entwickeln.

MK kann also nicht nur in der Tumorgewebsuntersuchung unterstützend wirken, GIST von anderen in Frage kommenden Tumoren abzugrenzen, sondern es ist auch ein potentieller Serummarker zur Evaluierung der Progression und Prognose von GIST, speziell unter Imatinib-Therapie.

Literaturverzeichnis

Amet LE, Lauri SE, Hienola A, et al. Enhanced hippocampal long-term potentiation in mice lacking heparin-binding growth-associated molecule. *Mol Cell Neurosci.* 2001; 17:1014-1024.

Appelman HD, Helwig EB. Sarcomas of the stomach. *Am J Clin Pathol.* 1977 Jan; 67(1):2-10.

Aridome K. Truncated midkine as a marker of diagnosis and detection of nodal metastases in gastrointestinal carcinomas. *Br J Cancer* 1998; 78:472-477.

Asai T, Watanabe K, Ichihara-Tanaka K, et al. Identification of heparin-binding sites in midkine and their role in neurite-promotion. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 236:66-70.

Blay JY, Bonvalot S, Casali P, et al. Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumours. Report of the GIST Consensus Conference of 20 21 March 2004, under the auspices of European Society for Medical Oncology. *Ann Oncol.* 2005; 16:566-578.

Bucher P, Villiger P, Egger JF, Buhler LH, Morel P. Management of gastrointestinal stromal tumours: from diagnosis to treatment. *Swiss Med Wkly.* 2004; 134:145-153.

Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 295:139-145.

Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Ziche M, Bicknell R. An angiogenic role for the neurokinin midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res* 1997; 57:1814-9.

Connolly EM, Gaffney E, Reynolds JV. Gastrointestinal stromal tumours, *Br J Surg.* 2003; 90:1178-1186.

Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Oncol.* 2004; 22:3813-3825.

L. C. Dai, X. Wang, X. Yao, Y. L. Lu, J. L. Ping, and J. F. He, Antisense oligonucleotide targeting midkine suppresses in vivo angiogenesis, *World J Gastroenterol* 13 (2007) 1208-1213.

D'Amato G, Steinert DM, McAuliffe JC, Trent JC. Update on the biology and therapy of gastrointestinal stromal tumours. *Cancer Control.* 2005; 12:44-56.

Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Blood.* 2000; 96:3343-3356.

DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumours: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg.* 2000; 231:51-58.

Dematteo RP, Heinrich MC, El-Rifai WM, Demetri G. Clinical management of gastrointestinal stromal tumours: before and after STI-571. *Hum Pathol.* 2002; 33:466-477.

Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002; 347(7):472-80.

Demetri G, Benjamin R, Blanke CD, et al. NCCN Task Force Report: optimal management of patients with gastrointestinal stromal tumour (GIST)--expansion and update of NCCN Clinical Practice Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw.* 2004; 2(1):1-26.

Demetri GD, Benjamin RS, Blanke CD, Blay JY, Casali P, Choi H, Corless CL, Debiec-Rychter M, DeMatteo RP, Ettinger DS, Fisher GA, Fletcher CD, Gronchi A, Hohenberger P, Hughes M, Joensuu H, Judson I, Le Cesne A, Maki RG, Morse M, Pappo AS, Pisters PW, Raut CP, Reichardt P, Tyler DS, Van den Abbeele AD, von Mehren M, Wayne JD, Zalcborg J; NCCN Task Force report: management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST)-update of the NCCN clinical practice guidelines. *J Natl Compr Canc Netw.* 2007 Aug;5(7).

Demetri, Benjamin, Blanke, et al., The Lessons of GIST-PET and PET/CT: A New Paradigm for Imaging Oncologist. Update of the NCCN Clinical Practice Guidelines *J Natl Compr Canc Netw.* 2008;5(2): 8-13.

Dewar AL, Cambareri AC, Zannettino AC, et al. Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. *Blood.* 2005; 105:3127-3132.

Eisenberg BL, Judson I. Surgery and imatinib in the management of GIST: emerging approaches to adjuvant and neoadjuvant therapy. *Ann Surg Oncol.* 2004; 11:464-475.

Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumors: A Consensus Approach *Hum Pathol.* 2002 May;33(5):459-65.

Garver RI, Jr., Chan CS, Milner PG. Reciprocal expression of pleiotrophin and midkine in normal versus malignant lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993; 9:463-466.

Garver RI, Jr., Radford DM, Donis-Keller H, Wick MR, Milner PG. Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue. *Cancer.* 1994; 74:1584-1590.

Ghanem N, Althoefer C, Furtwangler A, et al. Computed tomography in gastrointestinal stromal tumours. *Eur Radiol.* 2003; 13:1669-1678.

Glivec Summary of Product Characteristics [SMPC]. Basel, Switzerland: Novartis Pharma AG; 2006.

A. Gronchi, M. Fiore, R. Bertulli, M. Colecchia, E. Tamborini, S. Pilotti, A. Messina, P. Coco, S. Stacchiotti, P. G. Casali Surgery of residual disease following Imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors (GIST) *Journal of Clinical Oncology*, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings. Vol 23, No. 16S, Part I of II (June 1 Supplement), 2005:9038.

A. Gronchi, M. Fiore, S. Radaelli, P. Coco, E. Fumagalli, S. Stacchiotti, P. Collini, E. Tamborini, S. Pilotti, P. G. Casali Perioperative morbidity in metastatic gastrointestinal stromal tumors (GIST) undergoing surgery of residual disease following imatinib (IM) *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 10043.

Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumours. *Science.* 1998; 279:577-580.

P. Hohenberger, C. Langer, S. Pistorius, I. Iesalnieks, E. Wardelmann, P. Reichardt, Indication and results of surgery following imatinib treatment of locally advanced or metastatic GI stromal tumors (GIST) *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006:9500.

Horiba M, Kadomatsu K, Nakamura E, Muramatsu H, Ikematsu S, Sakuma S, Hayashi K, Yuzawa Y, Matsuo S, Kuzuya M, Kaname T, Hirai M, Saito H, Muramatsu T. Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 489–95.

Ibusuki M, Fujimori H, Yamamoto Y, Ota K, Ueda M, Shinriki S, Taketomi M, Sakuma S, Shinohara M, Iwase H, Ando Y. Midkine in plasma as a novel breast cancer marker. *Cancer Sci.* 2009 Sep;100(9):1735-9.

Ikematsu S, Yano A, Aridome K, Kikuchi M, Kumai H, Nagano H, Okamoto K, Oda M, Sakuma S, Aikou T, Muramatsu H, Kadomatsu K, Muramatsu T. Serum midkine concentrations are increased in patients with various types of carcinomas. *Br J Cancer* 2000; 83:701–6.

Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, Sakuma S, Wakai K, Muramatsu T, Kadomatsu K. Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas. *Br J Cancer* 2003; 88:1522–6.

Ikematsu S, Okamoto K, Yoshida Y, et al. High levels of urinary midkine in various cancer patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 306:329-332.

- Iwasaki W, Nagata K, Hatanaka H, et al. Solution structure of midkine, a new heparin-binding growth factor. *Embo J*. 1997; 16:6936-6946.
- Joensuu H, Fletcher C, Dimitrijevic S, Silberman S, Roberts P, Demetri G. Management of malignant gastrointestinal stromal tumours. *Lancet Oncol*. 2002; 3:655-664.
- Joensuu H. Current perspectives on the epidemiology of gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer*. 2006; 4(1):4-9.
- Jost D, Stroszczyński C, Chmelik P, Gaffke G, Schlecht I, Pink D, Reichardt P, Schneider U, Hohenberger P, Felix R. [Morphology of gastrointestinal stromal tumors in advanced stages of the disease: baseline findings before chemotherapy with imatinib] *Rofo*. 2003 Jun; 175(6):791-8.
- Kadomatsu K. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in midgestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 151:1312-1318.
- Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett*. 2004;204:127-143.
- Kaifi JT, Strelow A, Schurr PG, Reichelt U, Yekebas EF, Wachowiak R, Quaas A, Strate T, Schaefer H, Sauter G, Schachner M, Izbicki JR. L1 (CD171) is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol*. 2006 Mar;19(3):399-406.
- J. T. Kaifi, H. C. Fiegel, S. L. Rafnsdottir, K. Aridome, P. G. Schurr, U. Reichelt, R. Wachowiak, H. Kleinhans, E. F. Yekebas, O. Mann, K. Ichihara-Tanaka, T. Muramatsu, D. Kluth, T. Strate, and J. R. Izbicki, Midkine as a prognostic marker for gastrointestinal stromal tumors, *J Cancer Res Clin Oncol* 133 (2007) 431-435.
- Kato H, Watanabe K, Murari M, et al. Midkine expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma*. 2000; 37:415-424.
- Kato M, Maeta H, Kato S, Shinozawa T, Terada T. Immunohistochemical and in situ hybridization analyses of midkine expression in thyroid papillary carcinoma. *Mod Pathol*. 2000; 13:1060-1065.
- Kato M, Shinozawa T, Kato S, Awaya A, Terada T. Increased midkine expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Laboratory Med* 2000; 124:848-52.
- Kato M, Shinozawa T, Kato S, Endo K, Terada T. Increased midkine expression in intrahepatic cholangiocarcinoma: immunohistochemical and in situ hybridization analyses. *Liver*. 2000; 20:216-221.
- Kato S, Ishihara K, Shinozawa T, et al. Monoclonal antibody to human midkine reveals increased midkine expression in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999; 58:430-441.
- Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumour (GIPACT): gastrointestinal stromal tumours show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol*. 1998; 152:1259-1269.

- Koide N, Hada H, Shinji T, et al. Expression of the midkine gene in human hepatocellular carcinomas. *Hepatogastroenterology*. 1999; 46:3189-3196.
- Konishi N, Nakamura M, Nakaoka S, et al. Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma. *Oncology*. 1999; 57:253-257.
- Kojima S, Muramatsu H, Amanuma H, Muramatsu T. Midkine enhances fibrinolytic activity of bovine endothelial cells. *J Biol Chem*. 1995; 270:9590-9596.
- Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*. 2005; 353:172-187.
- Kurtz A, Schulte AM, Wellstein A. Pleiotrophin and midkine in normal development and tumor biology. *Crit Rev Oncog*. 1995; 6:151-177.
- Li FP, Fletcher JA, Heinrich MC, Garber JE, Sallan SE, Curiel-Lewandrowski C, Duensing A, van de Rijn M, Schnipper LE, Demetri GD. Familial Gastrointestinal Stromal Tumor Syndrome: Phenotypic and Molecular Features in a Kindred *J Clin Oncol*. 2005 Apr 20; 23(12):2735-43.
- Maeda N, Ichihara-Tanaka K, Kimura T, Kadomatsu K, Muramatsu T, Noda M. A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *J Biol Chem*. 1999; 274:12474-12479.
- S. Maeda, H. Shinci, H. Kurahara, Y. Mataka, H. Noma, K. Maemura, K. Aridome, T. Yokomine, S. Natsugoe, T. Aikou, and S. Takao, Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma, *Br J Cancer* 97 (2007) 405-411.
- Mashour GA, Ratner N, Khan GA, Wang HL, Martuza RL, Kurtz A. The angiogenic factor midkine is aberrantly expressed in NF1-deficient Schwann cells and is a mitogen for neurofibroma derived cells. *Oncogene*. 2001; 20:97-105.
- Matsubara S, Tomomura M, Kadomatsu K, Muramatsu T. Structure of a retinoic acid responsive gene, MK, which is transiently activated during the differentiation of embryonal carcinoma cells and the mid-gestation period of mouse embryogenesis. *J Biol Chem*. 1990; 265:9441-9443.
- Matsubara S, Take M, Pedraza C, Muramatsu T. Mapping and characterization of a retinoic acid-responsive enhancer of midkine, a novel heparin-binding growth/differentiation factor with neurotrophic activity. *J Biochem*. 1994; 115:1088-1096.
- Matsumoto K, Wanaka A, Mori T, et al. Localization of pleiotrophin and midkine in the postnatal developing cerebellum. *Neurosci Lett*. 1994; 178:216-220.
- Matsumoto K, Wanaka A, Takatsuji K, Muramatsu H, Muramatsu T, Tohyama M. A novel family of heparin-binding growth factors, pleiotrophin and midkine, is expressed in the developing rat cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res*. 1994; 79:229-241.

Michikawa M, Xu RY, Muramatsu H, Muramatsu T, Kim SU. Midkine is a mediator of retinoic acid-induced neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192:1312–8.

Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Hum Pathol.* 1999 Oct; 30(10):1213-20.

Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumours--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch.* 2001; 438:1-12.

Miettinen M, El-Rifai W, L HLS, Lasota J. Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumours: a review. *Hum Pathol.* 2002; 33:478-483.

Miettinen M, Majidi M, Lasota J. Pathology and diagnostic criteria of gastrointestinal stromal tumours (GISTs): a review. *Eur J Cancer.* 2002 Sep;38 Suppl 5:S39-51.

Markku Miettinen, MD,* Jerzy Lasota, MD,* and Leslie H. Sobin, MD†
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.*
2005 Oct;29(10):1373-81.

Mishima K, Asai A, Kadomatsu K, et al. Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas. *Neurosci Lett.* 1997; 233:29-32.

Mitsiadis TA, Salmivirta M, Muramatsu T, et al. Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. *Development.* 1995; 121:37-51.

Miyashiro M, Kadomatsu K, Ogata N, et al. Midkine expression in transient retinal ischemia in the rat. *Curr Eye Res.* 1998; 17:9-13.

Miyauchi M, Shimada H, Kadomatsu K, Muramatsu T, Matsubara S, Ikematsu S, Takenaga K, Asano T, Ochiai T, Sakiyama S, Tagawa M. Frequent expression of midkine gene in esophageal cancer suggests a potential usage of its promoter for suicide gene therapy. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90:469–75.

Mochizuki R, Takeda A, Sato N, et al. Induction of midkine expression in reactive astrocytes following rat transient forebrain ischemia. *Exp Neurol.* 1998; 149:73-78.

Muramatsu T. Midkine (MK), the product of a retinoic acid responsive gene, and pleiotrophin constitute a new protein family regulating growth and differentiation (review). *Int J Dev Biol* 1993; 37:183–8.

Muramatsu H, Shirahama H, Yonezawa S, Maruta H, Muramatsu T. Midkine, a retinoic acid-inducible growth/differentiation factor: immunochemical evidence for the function and distribution. *Dev Biol.* 1993; 159:392-402.

- Muramatsu H, Zou K, Sakaguchi N, Ikematsu S, Sakuma S, Muramatsu T. LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 270:936-94.
- Muramatsu Takashi. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J. Biochem. (Tokyo)* 2002; 132 (3):359–71.
- Nakagawara A, Milbrandt J, Muramatsu T et al. Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res.* 1995; 55: 1792-1797.
- Nakamoto M, Matsubara S, Miyauchi T, Obama H, Ozawa M, Muramatsu T. A new family of heparin binding growth/differentiation factors: differential expression of the midkine (MK) and HB-GAM genes during mouse development. *J Biochem.* 1992; 112:346-349.
- Nakamura E, Kadomatsu K, Yuasa S, et al. Disruption of the midkine gene (Mdk) resulted in altered expression of a calcium binding protein in the hippocampus of infant mice and their abnormal behaviour. *Genes Cells.* 1998; 3:811-822.
- Nakanishi T, Kadomatsu K, Okamoto T, et al. Expression of syndecan-1 and -3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine. *J Biochem (Tokyo)* 1997; 121:197-205.
- Nakanishi T, Kadomatsu K, Okamoto T, Tomoda Y, Muramatsu T. Expression of midkine and pleiotrophin in ovarian tumors. *Obstetrics Gynecol* 1997; 90:285–90.
- Nilsson B, Bummig P, Meis-Kindblom JM, et al. Gastrointestinal stromal tumours: The incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era. *Cancer.* 2005; 103:821-829.
- Obata Y, Kikuchi S, Lin Y, et al. Serum midkine concentrations and gastric cancer. *Cancer Sci.* 2005; 96:54-56.
- O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res.* 1996; 56:2515-2518.
- Owada K, Sanjo N, Kobayashi T, et al. Midkine inhibits caspase-dependent apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in cultured neurons. *J Neurochem.* 1999; 73:2084-2092.
- Pedraza C, Matsubara S, Muramatsu T. A retinoic acid-responsive element in human midkine gene. *J Biochem.* 1995; 117:845-849.

Sonam Prakash, MD, Lisa Sarran, MS, Nicholas Socci, PhD, Ronald P. DeMatteo, MD, Jonathan Eisenstat, MD, Alba M. Greco, MD, Robert G. Maki, MD, PhD, Leonard H. Wexler, MD, Michael P. LaQuaglia, MD, Peter Besmer, PhD, and Cristina R. Antonescu, MD 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.* 2005 Apr;27(4):179-87.

Qi M, Ikematsu S, Maeda N, et al. Haptotactic migration induced by midkine. Involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta. Mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 2001; 276:15868-15875.

Raulo E, Chernousov MA, Carey DJ, Nolo R, Rauvala H. Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3). *J Biol Chem.* 1994; 269:12999-13004.

C. P. Raut, M. Posner, J. Desai, J. A. Morgan, S. George, D. Zahrieh, C. D. Fletcher, G. D. Demetri, M. M. Bertagnolli Surgical management of advanced gastrointestinal stromal tumors after treatment with targeted systemic therapy using kinase inhibitors. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2325–2331.

Reichardt P, Pink D, Mrozek A, Lindner T, Hohenberger P. [Gastrointestinal stromal tumors (GIST)] *Z Gastroenterol.* 2004 Apr; 42(4):327-31.

Reichardt P. Optimising therapy for GIST patients. *Eur J Cancer.* 2006; 4 (1):19-26.

Robson ME, Glogowski E, Sommer G, Antonescu CR, Nafa K, Maki RG, Ellis N, Besmer P, Brennan M, Offit K. Pleomorphic characteristics of a germ-line KIT mutation in a large kindred with gastrointestinal stromal tumors, hyperpigmentation, and dysphagia. *Clin Cancer Res.* 2004 Feb 15; 10(4):1250-4.

Sakaguchi N, Muramatsu H, Ichihara-Tanaka K, et al. Receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta as a component of the signaling receptor complex for midkine dependent survival of embryonic neurons. *Neurosci Res.* 2003; 45:219-224.

Shimada H, Nabeya Y, Tagawa M, Okazumi S, Matsubara H, Okazumi S, Muramatsu H, Kadomatsu K, Muramatsu T, Ikematsu S, Sakuma S, Ochiai T. Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 628–32.

Shimada H, Nabeya Y, Okazumi S, et al. Increased serum midkine concentration as a possible tumor marker in patients with superficial esophageal cancer. *Oncol Rep* 2003; 10(2):411-4.

Singer S, Rubin BP, Lux ML, Chen CJ, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. Prognostic Value of KIT Mutation Type, Mitotic Activity, and Histologic Subtype in Gastrointestinal Stromal Tumors. *J Clin Oncol.* 2002 Sep 15; 20(18):3898-905.

Sircar K, Hewlett BR, Huizinga JD, Chorneyko K, Berezin I, Riddell RH. Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol.* 1999 Apr; 23(4):377-89.

Song XJ, Muramatsu H, Aridome K, Aikou T, Koide N, Tsuji T, Muramatsu T. The serum concentration of midkine, a heparin-binding growth factor, as a tumor marker. *Biomed Res* 1997; 18: 375–81.

Stoica GE, Kuo A, Powers C, et al. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem.* 2002; 277:35990-35998.

Takada T, Kinkori T, Muramatsu H, Hayakawa A, Torii S, Muramatsu T. Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine, is a novel regulator of intracellular calcium in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 241:756-761.

Takada T, Toriyama K, Muramatsu H, Song X-J, Torii S, Muramatsu T. Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neurophils and association with inflammatory synovitis. *J. Biochem.* 1997; 122:453–8.

Tanabe K, Matsumoto M, Ikematsu S, et al. Midkine and its clinical significance in endometrial carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99(6):1125-30.

Tomomura M, Kadomatsu K, Nakamoto M, Muramatsu H, Kondoh H, Imagawa K, Muramatsu T. A retinoic acid responsive gene, MK, produces a secreted protein with heparin binding activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171:603–9.

Torihashi S, Horisawa M, Watanabe Y. c-Kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract. *J Auton Nerv Syst.* 1999; 75:38-50.

Tryggvason G, Gíslason HG, Magnússon MK, Jónasson JG. Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: the icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study. *Int J Cancer.* 2005 Nov 1;117(2):289-93.

Tsutsui J, Kadomatsu K, Matsubara S, et al. A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res.* 1993; 53:1281-1285.

Vanderwinden JM, Mailloux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ. Cellular distribution of the new growth factor pleiotrophin (HB-GAM) mRNA in developing and adult rat tissues. *Anat Embryol.* 1992; 186:387-406.

Wang S, Yoshida Y, Goto M, et al. Midkine exists in astrocytes in the early stage of cerebral infarction. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998; 106:205-209.

Watson MA, Perry A, Tihan T, et al. Gene expression profiling reveals unique molecular subtypes of Neurofibromatosis Type I-associated and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *Brain Pathol.* 2004; 14:297-303.

Yasuhara O, Muramatsu H, Kim SU, Muramatsu T, Maruta H, McGeer PL. Midkine, a novel neurotrophic factor, is present in senile plaques of Alzheimer disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Apr 15; 192 (1):246-51.

Ye C, Qi M, Fan QW, Ito K, Akiyama S, Kasai Y, Matsuyama M, Muramatsu T, Kadomatsu K. Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 79:179–84.

Yoshida Y, Goto M, Tsutsui J, et al. Midkine is present in the early stage of cerebral infarct. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995; 85:25-30.

Zhang L, Rees MC, Bicknell R. The isolation and long-term culture of normal human endometrial epithelium and stroma. Expression of mRNAs for angiogenic polypeptides basally and on oestrogen and progesterone challenges. *J Cell Sci.* 1995; 108:323-331.

Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, Fitzgibbon J, Lister TA, Melo JV, Cross NC, Cavenagh JD. A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis-in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res.* 2006 Apr; 30(4):3738.

Danksagung

Für die Bereitstellung aller zur Durchführung meiner Promotion erforderlichen Daten und materiellen Voraussetzungen danke ich dem Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki, F.A.C.S.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Privatdozent PD. Dr. med. J. T. Kaifi, Oberarzt der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, für die interessante Promotionsthematik, wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und Unterstützung bei fachlichen und organisatorischen Problemen.

Ich danke Frau Dr. med. T. Rawnaq, wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, für die Anleitung bei der Durchführung und Auswertung meiner Experimente.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. G. Sauter, Direktor des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und Herrn PD Dr. rer. nat. R. Simon, Oberarzt im Institut für Pathologie, für die freundliche Bereitstellung der untersuchten Gewebeproben.

Ich danke ferner der Biologin Frau Dr. rer. nat. T. Kalinina, der medizinisch-technischen Angestellten Frau A. Heinecke sowie den Studiensekretärinnen Frau C. Brodersen und Frau S. Pohl aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für ihre Unterstützung und ihren Rat bei der Durchführung meiner Experimente sowie für ihre Hilfe bei organisatorischen Problemen.

Mein besonderer Dank gilt auch der Selbsthilfeorganisation "das Lebenshaus e.V." für die großartige Unterstützung bei der Beschaffung der Blutproben von GIST-Patienten sowie bei der Aufklärung der Patienten über das dieser Dissertation zu Grunde liegende Projekt.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich speziell meinen Freundinnen Katharina Stehr, Katharina Hamel und meiner Schwester Annika Kunkel.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern Gerhard und Ulrike Kunkel, die mir das Studium erst ermöglichten und mich jederzeit liebevoll und vorbehaltlos unterstützen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Miriam Kunkel
Geburtsdatum	11.01.1984
Geburtsort	Heidelberg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Luruper Weg 7, 20257 Hamburg
Telefonnummer	0176-81191703
Email-Adresse	miriamkunkel@gmail.com

Ausbildung

- 1990-1994 Lindenschule (Grundschule) in Nußloch (Baden-Württemberg)
- 1994-2003 Friedrich-Ebert-Gymnasium in Sandhausen (Baden-Württemberg)
Abschluss: Abitur
- 2003-2004 Freiwilliges Soziales Jahr am Universitätsklinikum Heidelberg, Klinik für Unfallchirurgie
- 2004-2006 Vorklinisches Studium der Humanmedizin und 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz am 29.03.2006
- 2006-2010 Klinisches Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- 2006-2009 wissenschaftliche Arbeit im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Allgemein- Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- 2009-2010 Praktisches Jahr in der psychiatrischen zentralen Aufnahme im AK Nord-Ochsenzoll, in der medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und in der Chirurgie des Israelitischen Krankenhauses Hamburg

Publikationen

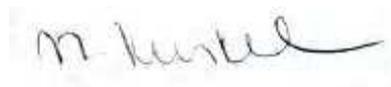
Rawnaq T, Kunkel M, Bachmann K, Simon R, Zander H, Brandl S, Sauter G, Izbicki JR, Kaifi JT. Serum Midkine Correlates with Tumor Progression and Imatinib Response in Gastrointestinal Stromal Tumors. Annals of Surgical Oncology 2010 Jun 30.

Hamburg, 10.09.2010

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.



Miriam Kunkel

Serum Midkine Correlates with Tumor Progression and Imatinib Response in Gastrointestinal Stromal Tumors

Tamina Rawnaq, MD¹, Miriam Kunkel, MS¹, Kai Bachmann, MD¹, Ronald Simon, PhD², Hilke Zander, PhD¹, Stephan Brandl, MD³, Guido Sauter, MD², Jakob R. Izbicki, MD¹, and Jussuf T. Kaifi, MD¹

¹Department of General, Visceral and Thoracic Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ²Institute for Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ³Department of Oncology and Hematology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

ABSTRACT

Background. A previous study identified midkine (MK) expression in primary gastrointestinal stromal tumor (GIST) as a prognostic marker. The aim of the current study was to compare serum midkine (S-MK) concentrations of GIST patients with those of healthy controls and to determine if MK can serve as a prognostic serum marker for these patients.

Materials and Methods. S-MK concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay in GIST patients ($n = 96$) and healthy controls ($n = 148$). S-MK levels were then correlated with clinicopathological data and the administration of imatinib therapy. In addition, MK expression was evaluated in 39 surgically resected GIST and in 17 leiomyoma specimens on a tissue microarray.

Results. S-MK concentrations in GIST patients were significantly higher than in healthy controls: median (25th and 75th percentiles) S-MK concentration was 235 (139 and 376) pg/ml in the GIST patients and 99 (33 and 198) pg/ml in the controls ($P < 0.001$; Mann-Whitney U test). Significantly higher median S-MK concentrations were found in GIST with recurrence compared with those without (295 vs 230; $P = 0.009$). GIST patients with S-MK levels higher than 400 pg/ml showed a significantly worse recurrence-free survival ($P = 0.026$; log-rank test).

Patients receiving imatinib therapy had decreased median S-MK concentrations compared with those who were not treated with imatinib (331 vs 201; $P < 0.001$).

Conclusions. S-MK concentration is a potential marker for evaluating the progression and prognosis of GIST, especially during imatinib therapy. Further studies could focus on the role of midkine in the tumorigenesis of GIST and responsiveness toward imatinib therapy.

Gastrointestinal stromal tumors (GIST) are believed to arise from the interstitial cells of Cajal (ICC) in the nerve plexus of the tunica muscularis in the gut wall.¹ GIST is a very rare tumor, making up only 0.2% of intestinal tract malignancies. Most GIST occur in the stomach and small intestine, but they are found occasionally in the esophagus and colorectum.² On primary manifestation, the outcome of GIST is hardly predictable. By tumor size and mitotic count, GIST can be stratified into a risk profile concerning the development of metastases. Once recurrence or metastasis is discovered, patients have a poor prognosis.^{3,4} The protein kinase inhibitor imatinib (Gleevec) provides an effective treatment for GIST. Differential expression of c-kit (CD 117) and PDGFRA plays an important role in GIST, diagnostically and therapeutically.^{1-3,5} Another marker is CD 34 which is expressed in 60–70% of cases.^{6,7} Microsatellite DNA alterations of resected GIST were shown to be predictive for outcome.⁸ Despite the existence of these different immunopathological markers that require tumor resection, more convenient and more easily approached prognostic factors predicting metastatic and recurrence potential are needed.

Midkine (MK) is a heparin-binding growth factor playing a central role in carcinogenesis, including antiapoptotic and angiogenic activities, and in signaling through

This study was funded by research grants from the Dr. Mildred Scheel Stiftung (German Cancer Aid) and supported by a Research Grant from Novartis Oncology, Switzerland.

© Society of Surgical Oncology 2010

First Received: 3 March 2010

T. Rawnaq, MD
e-mail: trawnaq@uke.de

Published online: 30 June 2010

the ALK receptor.^{9,10} The expression of MK is increased in various human tumors, making it a promising target for specific therapy. Inhibition of MK by antisense techniques would be a novel therapeutic strategy.¹¹ An elevated MK expression has been detected in tumors such as colon, lung, pancreatic, stomach, and esophageal tumors and hepatocellular carcinoma.¹² MK plays an important role in neuronal survival and differentiation.^{9,13} It has been proven to be involved in tumorigenesis of neuroblastoma, astrocytoma, and malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs).^{14–17} Since MK is a secretory protein, it can be detected in the peripheral blood of patients with MK overexpressing tumors. It has been reported that elevated serum MK (S-MK) levels decrease after removal of tumors.^{13,18} S-MK levels are significantly correlated with poor prognosis and the presence of lymph node metastasis in endometrial carcinoma.¹⁹ It is also associated with the progression stage of gastric and esophageal carcinomas.^{20,21} An earlier immunohistochemical study identified midkine as being expressed as a prognostic marker in 57 surgically resected GIST.²² The aim of the current study was to determine if midkine levels are increased in the serum of GIST patients compared with healthy controls and if midkine can serve as a peripheral prognostic marker for GIST.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Patients

The study was approved by the Ethics Committee of the Chamber of Physicians in Hamburg, Germany. Written informed consent was obtained from all patients for using tissue and serum samples. For this study, 96 patients with GIST were chosen retrospectively. It was possible to evaluate a rather large number of patients suffering from this rare tumor because of the cooperation of a self-help organization for GIST patients called “Lebenshaus,” which allowed collecting serial serum samples from patients of different areas in Germany, Austria, and Switzerland. The blood samples were first acquired at diagnosis and then during the disease process in 3-month intervals. Patients were selected on the basis of availability of specimens and were not stratified because of rare occurrence and different treatment strategies. All data including sex, age, tumor size, mitotic count, tumor location, metastasis, recurrence, and imatinib therapy were obtained from the clinical and pathological records. The clinicopathological data from externally treated patients participating in the self-help project were sent regularly by their attending physicians. Unfortunately, clinicopathological data were not complete in some cases, with the

consequence of some missing data. As healthy controls, 148 blood bank donors were included in the study. In addition to formerly stained 57 GIST specimens, a tissue microarray (TMA), including 39 resected GIST and 17 leiomyoma tissue samples, was stained with a rabbit monoclonal antibody against human MK (Clone EP1143Y, Novus Biologicals, Littleton, CO). Staining reaction was performed by the peroxidase method.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Human Midkine

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect human MK in serum was performed using a human MK ELISA (BioVendor, Heidelberg, Germany). Briefly, microtiter wells precoated with a rabbit polyclonal anti-human MK antibody were incubated with the serum of GIST patients. After washing, a biotin-labeled polyclonal anti-human MK antibody was added and the plates with captured MK were incubated for 1 h. After a thorough wash, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate was added to convert the substrate H₂O₂-tetramethylbenzidine. The reaction was stopped by the addition of an acid solution. Finally, the absorbance was measured at 450 nm (OD₄₅₀). Additionally, human recombinant MK (Chemicon International, Temecula, CA) was used as a positive control.

Tissue Microarray Construction and Immunohistochemistry

Tissue samples were fixed in 4% buffered formalin, paraffin embedded, and used for TMA construction as described elsewhere.²³ Hematoxylin-eosin stained sections were made from selected primary tumor blocks (donor blocks) to define representative tumor regions. Sections 3 μm thick were made by the use of the Paraffin Sectioning Aid System (Instrumentics, Hackensack, NJ). Tissue cylinders (0.6 mm in diameter) were then punched from that region of the donor block using a homemade semiautomated tissue arrayer. Heat-induced antigen retrieval by autoclaving was performed on deparaffinized sections at 120°C for 5 min with TBS-buffer (pH 9.0). Peroxidase blocking (3% H₂O₂ in methanol) was performed for 10 min. MK incubation with the prediluted primary antibody lasted 2 h at 30°C using a monoclonal rabbit anti-human antibody (IgG; clone EP1143Y, 1:450; Novus Biologicals, Littleton, CO) that binds to the C-terminus of human MK. Visualization of the immunoreaction was performed with DAB-chromogen/EnVision Polymer-HPR (K3468 and K4003; Dako, North America, Carpinteria, CA). Mild counterstaining was performed with

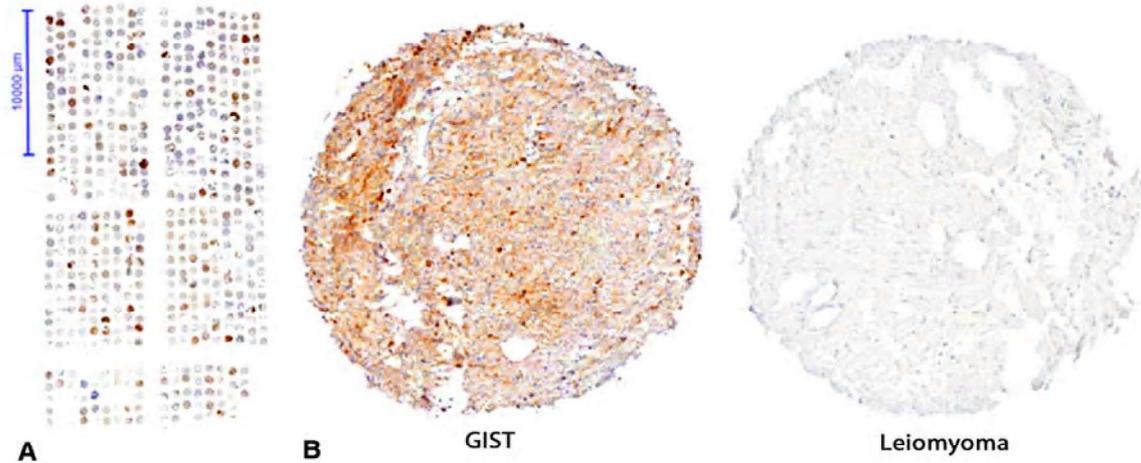


FIG. 1 MK expression in GIST and leiomyoma tissue spots. Immunohistochemical staining was performed by the peroxidase method using a monoclonal antibody (Clone EP1143Y) against midkine. **a** illustrates a complete tissue array. **b** represents an example of a single tissue spot of GIST and leiomyoma (magnification 100 \times)

hematoxylin for 30 s. Immunohistochemical analysis and scoring were performed by 3 independent investigators (T.R., J.T.K., and R.S.). The staining intensity was scored using a 4-step scale (0, 1+, 2+, 3+). The results of all MTAs were then grouped into 3 categories: negative (no detectable staining beyond nonspecific background staining), weak (1+ staining), moderate (2+ staining), and strong (3+ staining). The TMA and single-tissue spots of GIST and leiomyoma are shown in Fig. 1.

Statistical Analysis

SPSS for Windows (Version 11.5.1) (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for statistical analysis. Statistical significance was evaluated by Mann–Whitney U test and Kruskal–Wallis test. Cross-table statistics were performed using the Fisher test. Recurrence-free survival was plotted using the Kaplan–Meier method and analyzed by the log-rank test. Significance statements refer to *P* values of two-tailed tests less than 0.05.

RESULTS

Characteristics of Patients and Healthy Controls

A total of 96 patients suffering from GIST and 148 healthy controls were included in our study. The median age of GIST patients was 58 years (range 28–80 years) and 47 years (range 27–70 years) for the healthy controls. With regard to gender, 50 of the GIST patients (52%) were male and 46 (48%) were female; in the control group 98 (66%) were male and 50 (34%) were female. Patients' characteristics and clinicopathological data are listed in Table 1.

Serum Midkine Concentrations of Healthy Controls and GIST Patients

S-MK concentrations in GIST patients were significantly higher than those in healthy controls: median (25th and 75th percentiles) S-MK values were 235 (139 and 376) pg/ml in the GIST patients and 99 (33 and 198) pg/ml in the controls ($P < 0.001$; Mann–Whitney U test) (Fig. 2). The mean (\pm SD) S-MK concentration was 317 ± 377 pg/ml for GIST patients and 128 ± 115 pg/ml for healthy controls.

Increased Serum Midkine Concentrations Correlate with Recurrence

Significantly higher median S-MK concentrations were found in GIST patients with recurrence compared with those without: median (25th and 75th percentiles) S-MK concentration was 295 (166 and 489) pg/ml in GIST patients with recurrence and 230 (80 and 247) pg/ml in patients who did not develop relapse ($P = 0.009$; Mann–Whitney U test).

The median follow-up time was 50 months (range 8–273 months). For statistical analysis, 2 groups of S-MK concentrations (higher or lower than 400 pg/ml) were compared using survival curves plotted by Kaplan–Meier method for recurrence-free survival (Fig. 3). GIST patients with S-MK levels higher than 400 pg/ml with complete tumor resection (R0) showed a significantly worse recurrence-free survival ($P < 0.026$; log-rank test). Patients with concentrations lower than 400 pg/ml showed a median recurrence-free survival of 61 months (95% confidence interval [95% CI]: 21–100), whereas patients with S-MK levels higher than 400 pg/ml had a median

TABLE 1 Clinicopathological characteristics of GIST patients ($n = 96$) and S-MK concentrations

Characteristics	Absolute counts (%)	Median S-MK-concentration [25th and 75th percentile (pg/ml)]	Mean S-MK concentration \pm SD (pg/ml)	<i>P</i> value
Mean age, $y \pm$ SD	60 \pm 13			
Sex				
Male	50 (52)	241 (144 and 435)	369 \pm 483	
Female	46 (48)	233 (113 and 317)	235 \pm 151	0.173
Tumor size (cm)				
<2	8 (10)	239 (118 and 437)	275 \pm 183	
2–5	21 (30)	240 (167 and 414)	271 \pm 155	
5–10	21 (30)	232 (151 and 308)	229 \pm 114	
>10	21 (30)	243 (87 and 501)	414 \pm 653	0.927
Mitotic count (per 50 HPF)				
<5	27 (49)	241 (113 and 424)	267 \pm 171	
5–10	8 (15)	232 (144 and 241)	195 \pm 55	
>10	20 (36)	244 (190 and 407)	414 \pm 653	0.473
Tumor location				
Stomach	52 (66)	240 (138 and 380)	328 \pm 440	
Small intestine	22 (28)	227 (74 and 284)	244 \pm 212	
Others	5 (6)	290 (182 and 510)	328 \pm 175	0.421
Resection margin				
R0	54 (77)	233 (115 and 370)	263 \pm 187	
R1/2	16 (23)	190 (106 and 511)	469 \pm 800	0.759
Recurrence				
No	28 (42)	230 (80 and 247)	197 \pm 115	
Yes	39 (58)	295 (166 and 489)	386 \pm 458	0.009

The patient numbers do not add up to the included full number of all cases ($n = 96$), because there were no more data available in this retrospective study. *P* values were calculated by the Mann–Whitney U and Kruskal–Wallis test

recurrence-free survival of 46 months (95% CI: 17–75) only. The 5-year recurrence-free survival rate among patients with S-MK levels lower than 400 pg/mL was 50%; however, it was 25% for patients with levels higher than 400 pg/ml. Analysis for overall survival was not done because of low numbers ($n = 4$) of death in the patient group in this study.

Neither mitotic count nor tumor size had an influence on recurrence-free survival plotted by Kaplan–Meier analysis ($P = 0.703$ and $P = 0.672$; log-rank test; data not shown). Mitotic count and tumor size were also not significantly correlated with recurrence ($P = 0.270$ and $P = 0.744$, Fisher test). There was no significant difference found between the median S-MK concentrations and age, gender, resection margins, or tumor location (Table 1).

Decreased Serum Midkine Level Correlates with Imatinib Therapy of GIST

After a mean time of 36 months (range 3–83 months) after the first imatinib administration, patients receiving therapy showed decreased S-MK concentrations compared with patients without therapy (Fig. 4). The median

S-MK concentration (25th and 75th percentiles) in patients with imatinib therapy was 201 (128 and 241) pg/ml, and it was 331 (236 and 472) pg/ml in those who did not receive imatinib ($P < 0.001$; Mann–Whitney U-test).

Furthermore, S-MK concentrations of patients receiving imatinib therapy were divided into 2 groups (higher or lower than 400 pg/ml) and compared by survival curves plotted by the Kaplan–Meier method for recurrence-free survival (Fig. 5). GIST patients receiving imatinib with S-MK levels higher than 400 pg/ml showed a significantly worse recurrence-free survival ($P = 0.004$; log-rank test). Under therapy, patients with concentrations lower than 400 pg/ml showed a median recurrence survival of 52 months (95% CI: 32–72), whereas for patients with S-MK levels higher than 400 pg/ml, it was only 18 months (95% CI: 8; 28). The 5-year recurrence-free survival rate among patients with S-MK levels lower than 400 pg/ml was 56%. None of the patients with concentrations above 400 pg/ml showed a recurrence-free survival rate of 5 years or longer. Patients with S-MK levels higher than 400 pg/ml showed a worse recurrence-free survival, even they received imatinib therapy.

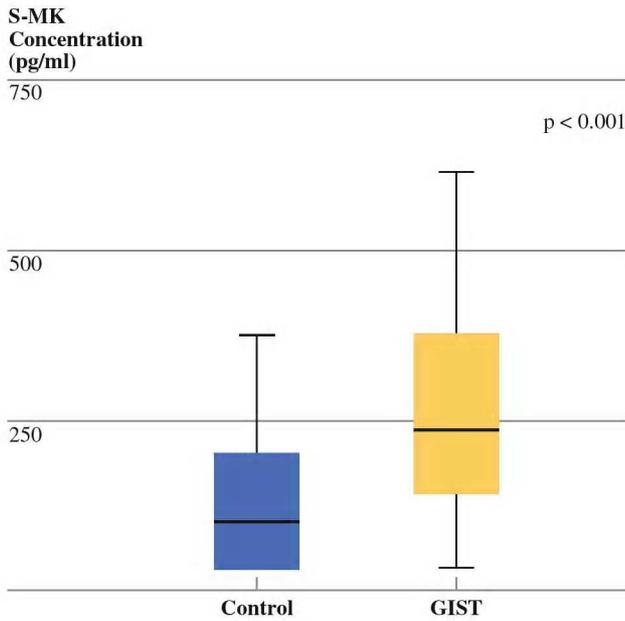


FIG. 2 Box-plot analysis of S-MK protein concentration of healthy controls ($n = 148$) and GIST patients ($n = 96$) determined by ELISA. Statistical significance was determined by Mann-Whitney U test ($P < 0.001$)

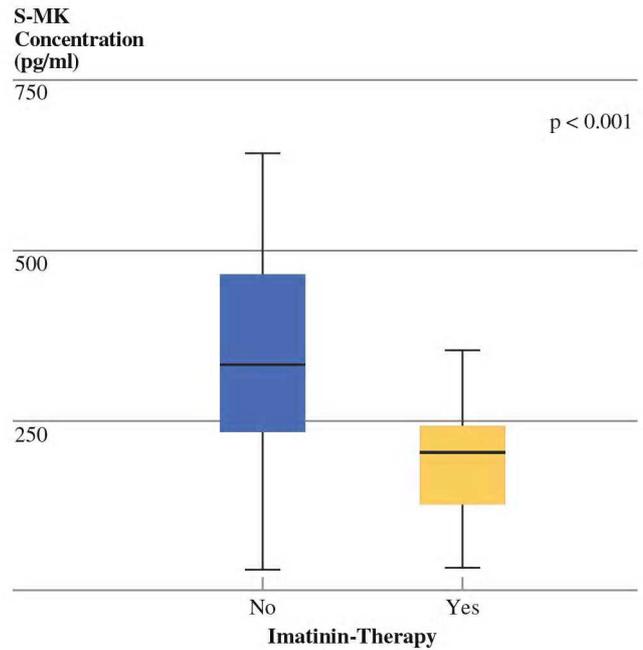


FIG. 4 Box-plot analysis of S-MK concentrations in GIST patients with ($n = 40$) and without ($n = 34$) imatinib-therapy determined by ELISA. Patients receiving imatinib therapy showed decreased median S-MK concentrations in comparison to those who were not treated with imatinib. Statistical significance was determined by Mann-Whitney U test ($P < 0.001$)

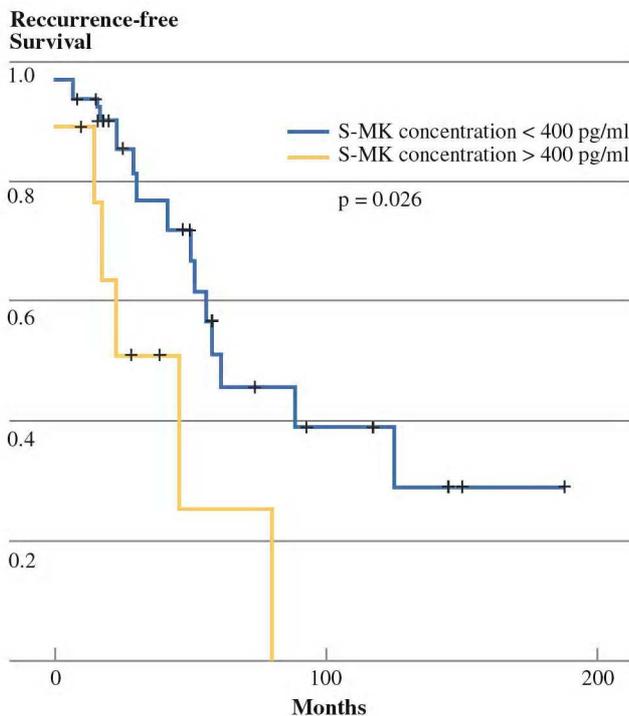


FIG. 3 Kaplan-Meier survival curve for recurrence-free survival in GIST patients ($n = 39$) after surgery with complete resection (R0) with S-MK concentration lower or higher than 400 pg/ml. P values were calculated with log-rank test

Midkine Expression in GIST and Leiomyoma

In addition to 57 previously examined GIST specimens, a tissue microarray including 39 resected GIST and 17 leiomyoma tissues was stained with a monoclonal antibody against human midkine (Clone: EP1143Y).²² MK expression was detected in 61% of all GIST tissue spots: 18 of 39 of the GIST tissues (46%) showed moderate or strong MK expression and 6 (15%) stained weakly. Among all leiomyoma tissue spots, 12 of 17 (71%) did not express MK, while 4 (25%) stained weakly and 1 moderately. No leiomyoma tissues stained strongly at all. Immunohistochemistry correlated with ELISA data.

DISCUSSION

MK plays a role in neuronal survival and differentiation and is also overexpressed at higher concentrations in various malignant tumors.^{12,13} In an attempt to identify a serum marker for GIST, MK was determined in peripheral blood of GIST patients and healthy controls. The present study demonstrated that S-MK concentrations were significantly elevated in GIST patients compared with healthy controls and negatively correlated with imatinib therapy. Furthermore, a significant association between increased S-MK levels and recurrence, which predicts worse

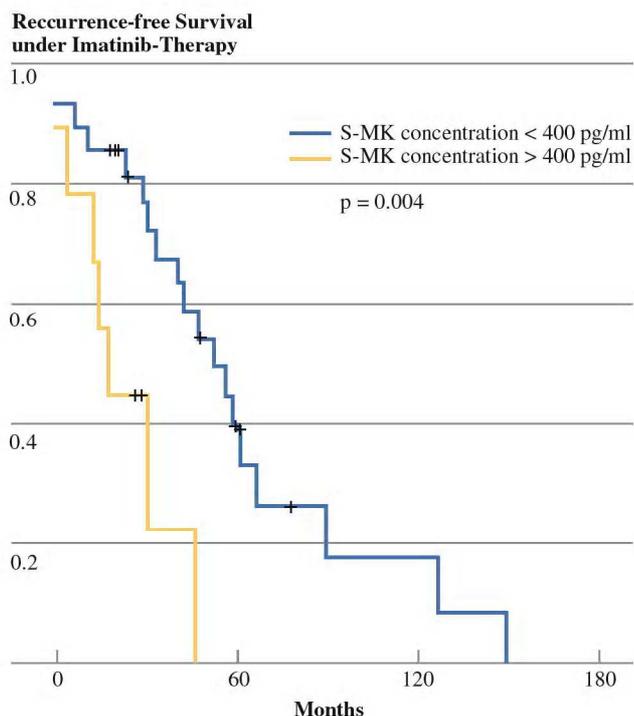


FIG. 5 Kaplan–Meier survival curve for recurrence-free survival in GIST patients ($n = 36$) under imatinib therapy with S-MK concentration lower or higher than 400 pg/ml. P values were calculated with log-rank test

outcome in GIST, was identified. These results are in accordance with previous studies showing elevated S-MK levels linked with negative prognosis in tumors such as esophageal, endometrial, and oral squamous cell carcinomas.^{19,20,24} In gastric cancer, S-MK concentrations were associated with progression stages; a significant association with the pTNM and distant metastasis was observed.²¹ In the past, immunohistochemical studies found MK overexpression to be also related to worse outcome in various human tumors.^{17,25,26} It could be shown that in endometrial carcinoma MK expression was highest at the margins of tumor invasion and low in the superficial areas of the tumor samples. Furthermore, S-MK values in these patients with lymph node metastasis or recurrence, or cancer death, had significant higher S-MK levels. Thus, MK was identified as a useful serum biomarker for high-risk patients to predict prognosis in endometrial carcinoma.¹⁹

Another study demonstrated for esophageal cancer that high S-MK levels were associated with tumor size, immunoreactivity, and poor survival.²⁰ The stratification of S-MK in different levels seems to play an important role to predict poor outcome in cancer patients. For instance, oral squamous cell carcinoma patients in high S-MK groups showed a significantly lower 5-year survival rate compared with patients in low S-MK groups.²⁴ In this study, previous data on MK expression were confirmed; 61% of GIST

specimens on a tissue microarray stained MK-positive, whereas only 29% of leiomyomas showed MK expression. Although c-kit expression is the established standard in the identification of GIST, midkine can be considered as a new additional differential marker that could differentiate GIST from other soft tissue malignancies. Immunohistochemically, other expressions of malignancy-associated markers, for instance HIF-1 α or VEGF, have been shown in GIST.^{27,28} Recently, the neuronal cell adhesion molecule L1 (CD171) was found to be expressed in GIST.²⁹ These findings stress that GIST is a tumor of neuronal origin from the interstitial cells of Cajal. However, MK analysis is not only confined to immunohistochemical analysis of resected tissues, MK can be easily detected in peripheral blood and can serve as a novel convenient tumor marker for GIST. In esophageal carcinoma, preoperatively high S-MK concentrations were decreased after tumor removal.²⁰ MK plays an important role in tumor progression and reflects prognostic tumor stages in several malignancies.^{21,30} S-MK concentration could be a useful marker for tumor progression and metastasis, which predicts prognosis in GIST.

Recent data provide evidence for a role of MK in resistance to chemotherapy. In this study, patients receiving imatinib therapy showed decreased S-MK concentrations. However, it could also be demonstrated that patients under imatinib therapy with high S-MK levels had a shorter recurrence-free survival rate than patients with low levels. Consequently, it could be a potential response indicator for imatinib therapy, if MK concentrations remain low. For patients with continuously high S-MK levels, a new therapeutic strategy is needed because these patient groups showed a worse recurrence-free survival even they received imatinib therapy. This could be, for instance, a higher dose of imatinib from the beginning or an alternative targeted medication. Furthermore, high S-MK levels could serve as selection criteria for (neo) adjuvant therapy regimens.

Because MK is involved in generation and progression of many types of tumors, recent studies examine whether MK has a value as a therapeutic target. In osteosarcoma MK was detected as a novel target for antibody therapy. It could be shown that the anti-MK antibody has the potential to inhibit tumor growth in osteosarcoma.³¹ Another mechanism to examine MK as therapeutic target is to use small interfering RNA (siRNA) targeting MK to down-regulate humane MK expression. It was demonstrated that siRNA targeting MK gene can inhibit gastric cancer cell growth and induce apoptosis via mitochondrial depolarization and caspase-3 activation.³² This MK siRNA may be a promising novel and potential strategy for treatment of MK overexpressing tumors. This would be of high interest to investigate MK as a therapeutic target for GIST in further studies.

In summary, the results indicate that MK can be detected in the serum of GIST patients in addition to the primary tumor and could serve as an easily detectable prognostic marker in the peripheral blood of GIST patients. Future studies could focus on the role of MK in the tumorigenesis of GIST and examine the importance of MK as a tumor marker and response predictor for imatinib therapy.

ACKNOWLEDGMENT We thank Sabine Schmidt for her excellent technical assistance. We thank the patients who willingly and generously provided data and samples for research purposes.

FINANCIAL SUPPORT This study was funded by research grants from the Dr. Mildred Scheel Stiftung (German Cancer Aid) and supported by a Research Grant from Novartis Oncology, Switzerland.

REFERENCES

- Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Int J Surg Pathol.* 2002;10:81–9.
- DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg.* 2000;231:51–8.
- Miettinen M, El-Rifai W, L HLS, Lasota J. Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review. *Hum Pathol.* 2002;33:478–83.
- Miettinen M, Majidi M, Lasota J. Pathology and diagnostic criteria of gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review. *Eur J Cancer.* 2002;38 Suppl 5:S39–51.
- Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med.* 2002;347:472–80.
- Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol.* 2002;33:459–65.
- Graadt van Roggen JF, van Velthuysen ML, Hogendoorn PC. The histopathological differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol.* 2001;54:96–102.
- Schurr P, Wolter S, Kaifi JT, Reichelt U, Kleinhans H, Wachowiak R, et al. Microsatellite DNA alterations of gastrointestinal stromal tumors are predictive for outcome. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5151–57.
- Kadomatsu K. Recent progress of midkine research on cancer. *Nippon Rinsho.* 2000;58:1337–47.
- Stoica GE, Kuo A, Powers C, Bowden ET, Sale EB, Riegel AT, et al. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem.* 2002;277:35990–8.
- Takei Y, Kadomatsu K, Yuasa K, Sato W, Muramatsu T. Morpholino antisense oligomer targeting human midkine: its application for cancer therapy. *Int J Cancer.* 2005;114:490–7.
- Ikematsu S, Yano A, Aridome K, Kikuchi M, Kumai H, Nagano H, et al. Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *Br J Cancer.* 2000;83:701–6.
- Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett.* 2004;204:127–43.
- Friedrich C, Holtkamp N, Cinatl J, Jr., Sakuma S, Mautner VF, Wellman S, et al. Overexpression of Midkine in malignant peripheral nerve sheath tumor cells inhibits apoptosis and increases angiogenic potency. *Int J Oncol.* 2005;27:1433–40.
- Fiegel HC, Kaifi JT, Wachowiak R, Quaa A, Aridome K, Ichihara-Tanaka K, et al. Midkine is highly expressed in neuroblastoma tissues. *Pediatr Surg Int.* 2008;24:1355–9.
- Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, Sakuma S, Wakai K, Muramatsu T, et al. Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas. *Br J Cancer.* 2003;88:1522–6.
- Mishima K, Asai A, Kadomatsu K, Ino Y, Nomura K, Narita Y, et al. Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas. *Neurosci Lett.* 1997;233:29–32.
- Shimada H, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Kadomatsu K, Muramatsu T, et al. Increased serum midkine concentration as a possible tumor marker in patients with superficial esophageal cancer. *Oncol Rep.* 2003;10:411–4.
- Tanabe K, Matsumoto M, Ikematsu S, Nagase S, Hatakeyama A, Takano T, et al. Midkine and its clinical significance in endometrial carcinoma. *Cancer Sci.* 2008;99:1125–30.
- Shimada H, Nabeya Y, Tagawa M, Okazumi S, Matsubara H, Kadomatsu K, et al. Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2003;94:628–32.
- Obata Y, Kikuchi S, Lin Y, Yagyu K, Muramatsu T, Kumai H. Serum midkine concentrations and gastric cancer. *Cancer Sci.* 2005;96:54–6.
- Kaifi JT, Fiegel HC, Rafnsdottir SL, Aridome K, Schurr PG, Reichelt U, et al. Midkine as a prognostic marker for gastrointestinal stromal tumors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007;133:431–5.
- Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, et al. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res.* 1999;5:1966–75.
- Ota K, Fujimori H, Ueda M, Shiniriki S, Kudo M, Jono H, et al. Midkine as a prognostic biomarker in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2008;99:655–62.
- Maeda S, Shinchi H, Kurahara H, Mataka Y, Noma H, Maemura K, et al. Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. *Br J Cancer.* 2007;97:405–11.
- Ren YJ, Zhang QY. Expression of midkine and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2006;12:2006–10.
- Kaifi JT, Strelow A, Schurr PG, Reichelt U, Yekebas EF, Wachowiak R, et al. L1 (CD171) is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol.* 2006;19:399–406.
- Takahashi R, Tanaka S, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Haruma K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncology.* 2003;64:266–74.
- Takahashi R, Tanaka S, Hiyama T, Ito M, Kitadai Y, Sumii M, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncol Rep.* 2003;10:797–802.
- Huang Y, Cao G, Wang H, Wang Q, Hou Y. The expression and location of midkine in gastric carcinomas of Chinese patients. *Cell Mol Immunol.* 2007;4:135–40.
- Maehara H, Kaname T, Yanagi K, Hanzawa H, Owan I, Kinjou T et al. Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358:757–62.
- Wang Q, Huang Y, Ni Y, Wang H, Hou Y. siRNA targeting midkine inhibits gastric cancer cells growth and induces apoptosis involved caspase-3,8,0 activation and mitochondrial depolarization. *J Biomed Sci.* 2007;14:783–95.