

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

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

## ***Das Glykoprotein Tenascin-C als Marker im Serum und Gewebe von Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren***

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von

Scherin Jeratli  
aus Rotenburg/ Wümme

Hamburg 2011

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.07.2011**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:** *PD Dr. M. Bockhorn*

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:** *PD Dr. J. Kaifi*

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:** *Prof. Dr. G. Sauter*

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
<b>1. Arbeitshypothese und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Gastrointestinale Stromatumoren</b>	<b>2</b>
2.1.1 Immunhistochemische Definition von GIST	2
2.1.2 Epidemiologie	3
2.1.3 Klinik und Diagnostik	
2.1.4 Malignitätseinschätzung und Risikoklassifizierung	5
2.1.5 Therapie	6
<b>2.2 Die extrazelluläre Matrix</b>	<b>8</b>
2.2.1 Tumorassoziierte Modulation der extrazellulären Matrix	9
<b>2.3 Die Tenascin-Familie</b>	<b>11</b>
<b>2.4 Tenascin-C</b>	<b>12</b>
2.4.1 Expression in embryonalen und adultem Gewebe	13
2.4.2 Expression im Rahmen von pathologischen Vorgängen und bei Tumoren	13
2.4.3 Molekülstruktur von Tenascin-C	16
2.4.4 Bedeutung der alternativ gespleißten Tenascin-C-Isoformen	17
<b>2.5 Die Rolle von Tenascin-C in Tumoren</b>	<b>19</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Multitumor Tissue Microarray</b>	<b>22</b>
3.1.1 Gewebeproben	22
3.1.2 Durchführung	23
3.1.2.1 Immunhistochemische Färbung	23
3.1.3 Semiquantitative Auswertung	24
<b>3.2 Enzyme-linked immunosorbent Assay</b>	<b>24</b>
3.2.1 Serumproben	25
3.2.2 Verwendete Antikörper und Reagenzien	26

3.2.3 Durchführung	27
3.2.4 Verlaufsdaten	28
3.2.5 Statistische Auswertung	28
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Multitumor Tissue Microarray</b>	<b>29</b>
4.1.1 Tenascin-C-Expression bei GIST und differentialdiagnostisch Relevanten Tumoren	31
4.1.2 Tenascin-C-Expression bei Tumoren des Pankreas	32
<b>4.2 ELISA bei GIST</b>	<b>32</b>
4.2.1 Tenascin-C-Serumkonzentration bei GIST und Kontrollgruppe	33
4.2.2 Tenascin-C-Serumkonzentration und Korrelation mit klinisch- pathologischen Daten	33
4.2.2.1 Alter und Geschlecht	34
4.2.2.2 Risikofaktoren	35
4.2.2.3 Resektionsausmaß	37
4.2.2.4 Metastase und Rezidiv	37
4.2.3 Progressionsfreies Überleben	38
4.2.4 Tenascin-C-Serumkonzentration und Imatinib-Therapie	39
<b>4.3 ELISA bei Pankreastumoren</b>	<b>39</b>
4.3.1 Tenascin-C-Serumkonzentration bei Adenokarzinomen und neuroendokrinen Tumoren des Pankreas	40
4.3.2 Tenascin-C-Serumkonzentration und Korrelation mit klinisch- pathologischen Daten	41
4.3.2.1 Kurzzeit- und Langzeitüberleben	42
4.3.2.2 Tumorbedingter Tod	42
4.3.3 5-Jahres-Überleben	43
<b>5. Diskussion</b>	<b>45</b>
5.1 Tenascin-C als Tumormarker im Gewebe?	45
5.2 Tenascin-C-Expression bei GIST	47
5.3 Tenascin-C als Serummarker bei Tumoren?	48
5.4 Tenascin-C im Serum von GIST-Patienten	49
5.5 Tenascin-C bei Pankreastumoren	52
5.6 Ausblick: Tenascin-C als therapeutisches Target?	53
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>56</b>

<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>57</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>75</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>76</b>
<b>10. Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>77</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
CI	Konfidenzintervall
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CT	Computertomographie
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor-Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase
EZM	extrazelluläre Matrix
FNIII	Fibronektin Typ III
GIST	Gastrointestinale Stromatumoren
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPF	High power field
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iRNA	interfering RNA
Lif-1	Ligase-interacting factor 1
MAP	Mitogen aktivierte Kinase
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
MRT	Magnetresonanztomographie
NET	Neuroendokrine Tumoren
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PanIN	Intraepitheliale Neoplasie des Pankreas
PET	Positronen-Emissionstomographie
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies (Reactive Oxygen Species)
Rpm	Rotations per minute
SD	Standardabweichung
siRNA	small interfering RNA
SPSS	Statistical Package for Social Science
TAF	Tumorassoziierte Fibroblasten
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TMA	Tissue Micro Array
TNC-Expression	Tenascin-C-Expression

TNC-S-Konzentration	Tenascin-C-Serumkonzentration
TNF	Tumornekrosefaktor
UICC	Internationale union contre le cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid

## **Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1:** HE-Färbung eines GIST (aus Fletcher et al. 2002)
- Abbildung 2:** Tumorassoziierte Modulation der extrazellulären Matrix (aus Mueller und Fusening 2004)
- Abbildung 3:** Immunhistochemische Färbungen gegen Tenascin-C in einer embryonalen Brustdrüse und einem Mammakarzinom (aus Chiquet-Ehrismann und Chiquet 2003)
- Abbildung 4:** Molekülstruktur von Tenascin-C (aus Joester und Faissner 2001, Garwood et al. 2001, Orend und Chiquet-Ehrismann 2006)
- Abbildung 5:** Schematische Darstellung eines Tenascin-C-Monomers und seiner Fibronektin TyplII-Module (aus Orend und Chiquet-Ehrismann 2006)
- Abbildung 6:** Multitumor Array-Slide angefärbt mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen Tenascin-C
- Abbildung 7:** Tenascin-C-Expression in drei Gewebeproben des Multitumor Arrays
- Abbildung 8:** Tenascin-C-Expression im Multitumor Array
- Abbildung 9:** Balkendiagramm-Analyse zur Darstellung der medianen Tenascin-C-Konzentration im Serum von Kontrollgruppe und GIST-Patienten
- Abbildung 10:** Balkendiagramm-Analyse zur Darstellung der medianen Tenascin-C-Konzentration im Serum von Patienten ohne Metastase und Rezidiv und Patienten mit Metastase und/oder Rezidiv
- Abbildung 11:** Kaplan-Meier-Funktion für das progressionsfreie 5-Jahres-Überleben bei Patienten mit Tenascin-C-Serumkonzentrationen unter und über 140 ng/ml
- Abbildung 12:** Balkendiagramm-Analyse zur Darstellung der medianen Tenascin-C-Konzentration im Serum von Patienten mit Pankreasadenokarzinom und neuroendokrinen Tumoren des Pankreas
- Abbildung 13:** Balkendiagramm-Analyse zur Darstellung der medianen Tenascin-C-Konzentration im Serum von Kurzzeit- und Langzeitüberlebenden
- Abbildung 14:** Balkendiagramm-Analyse zur Darstellung der medianen Tenascin-C-Konzentration im Serum von Patienten, die während der Nachverfolgungszeit tumorbedingt verstarben und derer, die die Nachverfolgungszeit überlebten
- Abbildung 15:** Kaplan-Meier-Funktion für das 5-Jahres-Überleben bei Pankreastumorpatienten mit TNC-S-Konzentrationen unter und über 35 ng/ml



## **Tabellenverzeichnis**

- Tabelle 1:** Risikokategorien (WHO 2002) (nach Fletcher et al. 2002)
- Tabelle 2:** Tenascin-C-Expression exemplarisch bei einigen der im Multitumor Array untersuchten Entitäten
- Tabelle 3:** Tenascin-C-Expression bei im Multitumor Array untersuchten benignen Tumoren
- Tabelle 4:** Tenascin-C-Expression bei GIST und differentialdiagnostisch relevanten Tumoren
- Tabelle 5:** Tenascin-C-Expression bei Pankreasadenokarzinomen und neuroendokrinen Tumoren des Pankreas
- Tabelle 6:** Tenascin-C-Serumkonzentration bei GIST und Kontrollgruppe
- Tabelle 7:** Korrelation der medianen und mittleren Tenascin-C-Serumkonzentration bei GIST mit klinisch-pathologischen Daten
- Tabelle 8:** Korrelation der medianen und mittleren Tenascin-C-Serumkonzentration bei GIST mit der TumorgroÙe
- Tabelle 9:** Korrelation der medianen und mittleren Tenascin-C-Serumkonzentration bei GIST mit der Mitoserate
- Tabelle 10:** Korrelation der medianen und mittleren Tenascin-C-Serumkonzentration bei GIST mit der Imatinib-Therapie
- Tabelle 11:** Tenascin-C-Serumkonzentration bei Patienten mit Pankreasadenokarzinomen und neuroendokrinen Tumoren des Pankreas
- Tabelle 12:** Korrelation der medianen und mittleren Tenascin-C-Serumkonzentration bei Pankreastumoren mit klinisch-pathologischen Daten.

## **1. Arbeitshypothese und Fragestellung**

Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) sind die häufigsten mesenchymalen Tumoren des Magen-Darm-Traktes. Eine immunhistochemische Differenzierung ist in ca. 90% der Fälle durch den Nachweis von CD117 möglich (Fletcher et al. 2002, Hirota et al. 1998, Kindblom et al. 1998). Einen Serummarker gibt es bislang noch nicht.

Tenascin-C ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, welches im Rahmen der embryonalen Entwicklung exprimiert wird, daneben aber auch bei pathologischen Vorgängen reexprimiert werden kann (Mackie 1994). Schon früh wurde das Vorkommen von Tenascin-C im Zusammenhang mit neoplastischen Vorgängen beschrieben (Chiquet-Ehrismann et al. 1986). Tumorassoziierte Veränderungen in der Expression von Tenascin-C sind Gegenstand aktueller tumorbiologischer Forschung. Die auffallend starke Expression von Tenascin-C im Tumorgewebe und die neusten Erkenntnisse über seine Funktion bei der Tumorprogression machen das Glykoprotein zudem zu einem potentiellen Kandidaten für die Tumordiagnostik und die Verlaufskontrolle von Tumorerkrankungen. Veränderungen der Tenascin-C-Expression (TNC-Expression) konnten bisher erfolgreich als prognostische Parameter für einige Tumoren beschrieben werden. Trotz vielversprechender Ergebnisse erster Untersuchungen von Tenascin-C im Serum von Krebspatienten, sind die Studien zu diesem Thema in ihrer Anzahl bis heute recht überschaubar.

Die vorliegende Arbeit soll das Glykoprotein Tenascin-C sowohl im Gewebe als auch im Serum von Patienten mit GIST untersuchen: Mittels eines Tissue Microarrays mit Gewebeproben unterschiedlicher Entitäten soll die Expression von Tenascin-C in GIST und differentialdiagnostisch relevanten Tumoren untersucht werden. Mithilfe eines ELISA soll die Tenascin-C-Konzentration wiederum im Serum von GIST-Patienten quantifiziert und die Ergebnisse mit denen gesunder Kontrollpersonen verglichen werden. Die ermittelten Serumkonzentrationen sollen anschließend mit klinisch-pathologischen Angaben sowie Verlaufsdaten der Patienten korreliert werden. Auf diese Weise soll die Nutzbarkeit von Tenascin-C als potentieller Tumor- und oder Prognosemarker im leicht zugänglichen Blut von Patienten mit GIST evaluiert werden.

## 2. Einleitung

### 2.1 Gastrointestinale Stromatumoren

Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) sind die häufigsten mesenchymalen Tumoren des Gastrointestinaltrakts. Es handelt sich um eine heterogene Gruppe von Tumoren, die über die gesamte Länge des Gastrointestinaltrakts auftreten können, jedoch am häufigsten in Magen und Dünndarm lokalisiert sind (DeMatteo et al. 2000, Nilsson et al. 2005). GIST besitzen ein weites klinisches Spektrum von kleinen, zufällig entdeckten Knötchen bis hin zu ausgesprochen malignen Tumoren (Miettinen und Lasota 2001). Früher wurden GIST meist als Leiomyome, Leiomyosarkome oder Leiomyoblastome klassifiziert (Fletcher et al. 2002). Erst seit 1998 werden GIST über ihre Expression des mutierten KIT (CD117) definiert und so gegenüber glattmuskulären Tumoren abgegrenzt (Hirota et al. 1998). KIT (CD117) entspricht einer TyplIII-Rezeptor-Tyrosinkinase, deren Mutation zu dauerhafter Aktivierung führt und als Grundlage für die Entstehung von GIST angesehen wird. Durch Inhibition dieser Tyrosinkinase ist mit Imatinib (früher STI571) eine effektive Therapie für GIST verfügbar (Demetri et al. 2002). Eine akkurate Diagnostik und klare Abgrenzung von GIST gegenüber anderen Weichteiltumoren ist daher von großer Bedeutung. Laborchemische Tumormarker sind bislang nicht bekannt.

#### 2.1.1 Immunhistochemische Definition von GIST

Fast alle GIST, sowohl maligne als auch benigne, exprimieren CD117 (Fletcher et al. 2002, Hirota et al. 1998, Kindblom et al. 1998, Sarlomo-Rikala et al. 1998). Entscheidend für die Pathogenese von GIST scheint jedoch nicht der Nachweis von CD117 zu sein, sondern das Vorhandensein einer Genmutation: CD117 wird durch das Protoonkogen *c-kit* codiert. Durch „*gain-of-function*“-Mutation des *c-kit*-Gens kommt es zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung der KIT-Rezeptor-Tyrosinkinase und damit zu gesteigerter Zellproliferation und verminderter Apoptose (Hirota et al. 1998). Allerdings zeigen nur ca. 88% der GIST mit Aktivierung der Tyrosinkinase eine *c-kit*-Mutation. Andere besitzen alternative onkogenetische Mechanismen, die zur Freisetzung von Onkoproteinen führen. Demnach sorgen bei 5% aller GIST Mutationen des *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFRA) für zytogenetische Veränderungen im Rahmen der Tumorprogression (Heinrich et al. 2003).

Als weiterer sensitiver immunhistochemischer Marker neben CD117 ist das Protein CD 34 bei 70% aller GIST nachweisbar. Diese immunhistochemische Charakterisierung deutet auf eine Beziehung des Tumors zu den interstitiellen Zellen von Cajal (Robinson et al. 2000). Diese befinden sich im Nervenplexus der Muscularis propria und gelten als Schrittmacherzellen der Darmmotorik (Kindblom et al. 1998). Darüber hinaus sind 20-30% der GIST positiv für Aktin, 10% positiv für das Protein S100 und weniger als 5% positiv für

Desmin (Miettinen und Lasota 2001).

Ein für GIST spezifischer Marker konnte bisher noch nicht gefunden werden: CD117 ist in zahlreichen gesunden Geweben, aber auch in anderen Neoplasien, darunter das kleinzellige Bronchialkarzinom, Melanome und Sarkome, nachweisbar (Miettinen und Lasota 2001, Krystal et al. 2000). Einige der GIST (weniger als 5%) sind weder CD34- noch CD117-positiv (Kindblom et al. 1998, Robinson et al. 2000). Auch bleibt die definitive Diskriminierung zwischen gut- und bösartigen GIST weiter Gegenstand aktueller Forschung.

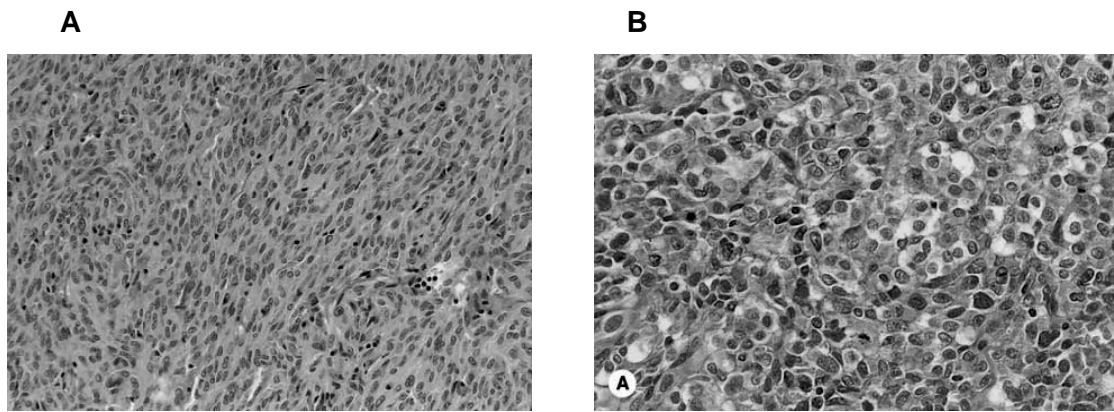
### **2.1.2 Epidemiologie**

Obwohl GIST die häufigste Form der mesenchymalen Neoplasien des Gastrointestinaltrakts repräsentieren, bleiben sie im Vergleich zu epithelialen Tumoren der gleichen Lokalisation insgesamt eher selten. Je nach Datenbank wird die Inzidenz mit Fallzahlen zwischen 1 und 2 pro 100.000 Einwohner angegeben (Miettinen et al. 2002, Nilsson et al. 2005). Das mediane Alter bei Erkrankungsbeginn liegt bei 69 Jahren (Nilsson et al. 2005). Eine 2005 unternommene Analyse von fast 1500 GIST-Fällen aus der Datenbank des *National Cancer Institutes* der USA ermittelte dagegen eine altersadaptierte Inzidenz von nur 0,68 pro 100.000 Einwohner mit einem medianen Erkrankungsalter von 62,9 Jahren. Es wurden signifikante Unterschiede in der altersadaptierten Inzidenz zwischen unterschiedlichen Rassen und Geschlechtern gefunden. Demnach waren die Inzidenzen bei Schwarzen sowie bei Männern höher als in ihren Vergleichsgruppen (Tran et al. 2005). Andere Studien hingegen berichten von einer Ausgeglichenheit in der Geschlechterverteilung (Nilsson et al. 2005).

GIST können im gesamten Gastrointestinaltrakt vom oberen Ösophagus bis hin zum Anorektum auftreten, deutlich bevorzugt jedoch in Magen (59%) und Dünndarm (Jejunum und Ileum, 34%) gefolgt von Kolon und Rektum (6%) (Nilsson et al. 2005). Sehr selten finden sich GIST in Ösophagus, Duodenum oder extraintestinal. GIST metastasieren fast ausschließlich in die Leber und die Peritonealhöhle (Miettinen et al. 1999).

### **2.1.3 Klinik und Diagnostik**

Die Diagnose eines GIST wird oftmals erst nach Laparotomie und feingeweblicher Untersuchung gestellt. Goldstandard der konventionellen Diagnostik von GIST in der täglichen Praxis bleibt die typische HE-Morphologie, ergänzt durch immunhistochemische Merkmale (Positivität für CD117 und CD34). Dabei lassen sich histologisch verschiedene Phänotypen unterscheiden: Die Tumorzellen können spindelzellig (70%) oder epitheloid (20%) gestaltet sein oder als Intermediärformen vorliegen (Fletcher et al. 2002).



**Abbildung 1: HE-Färbung eines GIST vom A: spindelzelligen und B: epitheloiden Typ (aus Fletcher et al. 2002). Mit freundlicher Genehmigung von Sage Publications.**

Die präoperative Diagnostik erfordert ein hohes Maß an Vertrautheit mit den radiologischen Befunden eines GIST (Gold und DeMatteo 2006). Diese weisen ein breites morphologisches Spektrum auf: Sie können einzeln oder multipel auftreten, ihre Größe reicht von mikroskopisch-kleinen Läsionen (Chetty 2008) bis zu großen Tumoren mit 10-20 cm Durchmesser (Van Roggen et al. 2001). Kontrastmittelverstärkte Computertomographie (CT) sowie Magnetresonanztomographie (MRT) sind hilfreich bei der Beurteilung von Primärtumor, Leber und Peritonealhöhle. Dabei präsentieren sich die Primärtumoren als gut abgrenzbare und oftmals stark vaskularisierte Raumforderungen mit enger örtlicher Beziehung zu Magen oder Dünndarm. Nekrosen, hämorrhagische Gebiete und degenerative Tumorkomponenten lassen das Bild inhomogen erscheinen. Die 18Fluor-Deoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie (18FDG-PET) ist hoch sensitiv, aber nicht spezifisch für die Diagnose eines GIST, kann aber nützliche Informationen über das Ansprechen einer medikamentösen Therapie liefern (Stroobants et al. 2003). Endoskopisch erscheinen GIST als submuköse Masse. Die Endosonographie in Kombination mit einer Feinnadelaspiration oder Stanzbiopsie stellt eine weitere Möglichkeit der Diagnostik dar. Die präoperative Biopsie wird aber aufgrund einer oftmals eingeschränkten Beurteilbarkeit des Präparats bei gleichzeitig erhöhtem Risiko eines „*Canalseedings*“ entlang des Biopsiekanals kontrovers diskutiert (Ando et al. 2002, Williams et al. 1999).

Das klinische Bild eines GIST variiert stark; eine charakteristische Symptomatik gibt es nicht und die Beschwerden sind stark von der Lokalisation des Tumors abhängig. Bei GIST des Magens sind Schleimhautulzerationen mit konsekutiver Anämie häufig, wohingegen GIST des Jejunums durch abdominale Schmerzen oder Ileus, GIST des Ösophagus wiederum durch Schluckbeschwerden, auffallen. Bei etwa einem Drittel der Patienten bestehen unspezifische Beschwerden oder die Tumoren werden durch Zufall im Rahmen anderer Untersuchungen entdeckt. So wurden im Rahmen einer

populationsbasierten Studie in Schweden von 1460 GIST-Fällen 29% zufällig im Rahmen anderer Operationen sowie weitere 10 % bei Obduktionen gefunden (Nilsson et al. 2005).

### 2.1.4 Malignitätseinschätzung und Risikoklassifizierung

Die Einschätzung des biologischen Verhaltens von GIST stellt eine Herausforderung dar, die mit konventionellen histopathologischen Kriterien leider nicht zu überwinden ist. Eine Malignitätseinschätzung, wie sie für andere Tumoren üblich ist und zum Beispiel gemäß dem FNCLCC-Schema (Gradingssystem der French Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer) für andere Weichteiltumoren durchgeführt wird, ist bei GIST nicht anwendbar. Eindeutige Malignitätskriterien sind lediglich organüberschreitendes, invasives Wachstum, peritoneale Metastasenaussaat und Fernmetastasierung (Miettinen et al. 1999). Für Tumoren, die sich ohne diese Faktoren präsentieren, ist die Dignitätsbeurteilung schwierig. Zurzeit gibt es keinen einzelnen Prognosefaktor, welcher für die Beurteilung des Tumorverhaltens genutzt werden kann. Es gibt aber den allgemeinen Konsensus darüber, dass für die Risikoeinschätzung bezüglich eines aggressiven klinischen Krankheitsverlaufs die Kombination aus Daten zur Tumorgroße und Mitosezahl pro 50 hochauflösender Gesichtsfelder (High power fields, HPF) im Mikroskop entscheidend ist (Tabelle 1) (Fletcher et al. 2002).

Tabelle 1: Risikokategorien (WHO 2002) nach Fletcher et al. 2002:

Risiko	Tumorgroße	Mitoserate
<b>Sehr niedrig</b>	<2 cm	≤5 Mitosen pro 50 HPF
<b>Niedrig</b>	2-5 cm	≤5 Mitosen pro 50 HPF
<b>Mittel</b>	<5 cm	6-10 Mitosen pro 50 HPF
	5-10 cm	≤5 Mitosen pro 50 HPF
<b>Hoch</b>	>5 cm	>5 Mitosen pro 50 HPF
	>10 cm	jede Anzahl
	jede Größe	>10 Mitosen pro 50 HPF

\*HPF= High power Field

So ist es allgemein anerkannt, dass eine Tumorgroße von über 5 cm mit einem hohen Risiko für Metastasen oder Rezidiv assoziiert ist (DeMatteo et al. 2000, Franquemont 1995) und eine Mitoserate von mehr als 5 Mitosen pro 50 HPF auf ein malignes Verhalten des Tumors hindeutet (Miettinen et al. 2002). Ungeklärt ist dagegen weiterhin die Frage, ob neben Tumorgroße und Mitoserate auch die Lokalisation des Tumors eine prognostische Aussagekraft besitzt. Studien konnten zeigen, dass GIST des Dünndarms bei gleicher Größe und Mitosezahl eine schlechtere Prognose besitzen als GIST des

Magens (Emory et al. 1999, Ueyama et al. 1992). Eine aktuelle Studie aus dem *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York* zeigte in der Analyse von 127 vollständig resezierten primären GIST eine signifikante Korrelation zwischen dem rezidivfreien Überleben und der Lokalisation des GIST. So wiesen GIST des Magens die beste Prognose auf, gefolgt von GIST des Dünndarms, während der schlechteste Verlauf bei kolorektalen GIST beobachtet werden konnte. Es wird daher diskutiert, neben der Tumorgöße und der Mitoserate, auch die Variable der Organmanifestation für die Risikostratifizierung zu berücksichtigen (DeMatteo et al. 2008).

In der siebten Edition der TNM-Klassifikationen für maligne Tumoren, die Anfang 2010 von der *Internationale union contre le cancer* (UICC) herausgegeben wurde, wird erstmals auch eine TNM-Klassifikation für GIST angegeben. Auch diese Klassifikation greift auf die Kriterien der Tumorgöße und der Mitoserate zurück und teilt die Tumoren in vier T-Gruppen sowie korrespondierende UICC-Gruppen ein (Agaimy 2010).

### **2.1.5 Therapie**

Die Standardtherapie von primären, lokalisierten GIST ist die chirurgische Resektion. Das chirurgische Vorgehen ist dabei von der Lokalisation des Tumors abhängig. Primäres Ziel der chirurgischen Therapie sollte aber immer die komplette Entfernung des Tumors mit tumorfreien Resektionsrändern (R0) sein (DeMatteo et al. 2000, Heinrich und Corless 2005). Hierdurch kann eine 5-Jahres-Überlebensrate von 48%-65% erreicht werden (Connolly et al. 2003). Aufgrund der niedrigen Inzidenz der lymphogenen Metastasierung wird eine Lymphadenektomie nicht empfohlen (DeMatteo et al. 2000). Insgesamt ist eine komplette Resektion bei etwa 85% der Patienten mit primärem, lokalisiertem GIST möglich; allerdings entwickeln mindestens 50% der Patienten ein Rezidiv nach kompletter Resektion (Gold und DeMatteo 2006).

Die Behandlung von metastasierten oder nicht resezierbaren GIST mit Standard-Chemotherapeutika oder Strahlentherapie hat sich als uneffektiv erwiesen. Bis vor einigen Jahren gab es daher neben der chirurgischen Resektion keine wirkungsvolle Therapie für GIST. Mit der Entdeckung der c-kit-Protoonkogen-Mutation als zentraler Faktor in der Pathogenese von GIST und der Entwicklung von Imatinib (STI571, *Glivec®*), einem spezifischen Inhibitor der KIT-Tyrosinkinase, wurde die Therapie von GIST revolutioniert. Heute gilt die Therapie mit Imatinib als erste Wahl bei nicht resezierbaren, rezidivierenden oder metastasierten GIST (DeMatteo et al. 2002).

Imatinib wurde ursprünglich als Inhibitor der bcr-abl-Tyrosinkinase bei Patienten mit Philadelphia-Chromosom-positiver Chronisch myeloischer Leukämie (CML) entwickelt (Druker et al. 1996) und 2000 erstmals bei einem Patienten mit metastasiertem GIST eingesetzt (Joensuu et al. 2001). Der eindrucksvolle Erfolg der Behandlung führte rasch zur Initiierung zweier großer klinischer Multicenter-Studien, die den Effekt von Imatinib bei

metastasierten GIST untersuchen sollten. Diese konnten zeigen, dass über 50 % aller Patienten ein partielles Ansprechen auf Imatinib vorwies, welches zur eindeutigen Reduktion der Tumormasse führte. Weitere 27% zeigten unter Imatinib-Gabe immerhin einen stabilen Krankheitsverlauf (Demetri et al. 2002, Verweij et al. 2004). Die Erfolge der Therapie führten in Deutschland im Juli 2002 zur Zulassung von Imatinib für metastasierte und lokal fortgeschrittene, nicht resezierbare GIST. Durch die Einführung von Imatinib als Standardtherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem GIST ließ sich die 2-Jahres-Überlebensrate von 26% auf 76% steigern (Demetri et al. 2002).

Bei jedem zweiten R0-resezierten Patienten kommt es aufgrund einer peritonealen Dissemination zu einem Tumorrezidiv. Die postoperative Einnahme von Imatinib reduziert signifikant die Rezidivrate bei primären GIST. Nach einem Jahr Imatinib-Therapie blieben 98% der Patienten rezidivfrei (DeMatteo et al. 2009). Im Mai 2009 erhielt Imatinib deshalb in Deutschland auch die Zulassung für die adjuvante Therapie von GIST.

Zurzeit wird auch die neoadjuvante Anwendung von Imatinib bei initial nicht resezierbaren GIST diskutiert. Insbesondere bei Eingriffen, die mit Funktionsverlust von Organen verbunden wären, gilt die Imatinib-Therapie als mögliches Behandlungskonzept zur Verkleinerung von inoperablen Tumoren (Haller et al. 2007, Gold und DeMatteo 2007, DeMatteo 2009).

Eine neue klinische Herausforderung stellt auch die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Imatinib bei GIST-Patienten dar (Gramza et al. 2009). Leider zeigt die Mehrheit der Patienten mit metastasiertem GIST irgendwann im Laufe der Behandlung eine Resistenz gegenüber dem Medikament: 14 % sind bereits Initial resistent und weitere 50% der Patienten entwickeln innerhalb von 2 Jahren eine Resistenz (Demetri et al. 2002, Verweij et al. 2004). Für die neu erworbenen Resistenzen werden sekundäre KIT-Mutationen verantwortlich gemacht, die die Tyrosinkinase unsensibel für den Inhibitor Imatinib machen sollen (Antonescu et al. 2005). Die molekularen Mechanismen, die den primären und sekundären Resistenzen zugrunde liegen, sind Gegenstand aktueller Forschung (Heinrich et al. 2006). Diskutiert wurden jüngst Veränderungen in der Enzymkonformation der Tyrosinkinase, die diese unempfindlich für die Inhibition machen (Gajiwala et al. 2009). Verschiedene Therapeutika der zweiten Wahl (zum Beispiel Sunitinib) sowie eine Kombination von Tyrosinkinase-Inhibitoren, die sich gegen verschiedene Tyrosinkinase-Konformationen richten, sind als Umgehungsstrategie im Gespräch. Sunitinib (SU11248) hat bereits Wirkung gegen bestimmte Imatinib-resistente Mutanten zeigen können (Demetri et al. 2006, Heinrich et al. 2008).

## **2.2 Die Extrazelluläre Matrix**

Die vielen Gewebearten, die unseren Körper formen, sind nicht einzig und allein aus



Zellen zusammengesetzt; vielmehr bestehen sie aus Zellen und der extrazellulären Matrix (EZM), welche diese umgibt; in ihrer Einheit als Stroma bezeichnet. Die EZM ist ein komplexes, dreidimensionales Netzwerk aus extrazellulären Makromolekülen, welches von Fibroblasten des Stromas und von Epithelzellen gemeinsam synthetisiert wird. Sie sorgt für die strukturelle Unterstützung der Gewebearchitektur und dient als Baugerüst für Zelladhäsion und Migration (Hay 1981). Neben ihrer mechanischen Funktion ist sie aber auch essentiell für die Kontrolle von Zellschicksalen. So stellt die EZM für die angrenzenden Zellen eine Informationsquelle und Funktionshilfe dar.

So vielfältig, wie sich die verschiedenen Gewebeformen des menschlichen Körpers darstellen, variiert auch die Zusammensetzung der EZM von Gewebe zu Gewebe und ist abhängig von der Funktion des Organs, welches sie unterstützt. Die zwei Grundbestandteile, die dennoch in allen EZM Netzwerken gefunden werden, sind: 1. Faserige Bestandteile, zu denen neben anderen fibrillären Proteinen auch das Kollagen gehört, welches ca. 25% aller Proteine unseres Körpers ausmacht und 2. die nicht-faserige Grundsubstanz. Diese wiederum besteht aus Proteoglykanen, welche aus langen Polysaccharidketten gebildet werden, sowie einer Vielfalt an Glykoproteinen, zu denen neben dem am besten charakterisierten Fibronectin auch die Familien der Laminine, der Integrine sowie der Tenascine gehören. Die Zusammensetzung der EZM ist darüber hinaus auch vom Gewebestatus abhängig und variiert beispielsweise in embryonalen und adulten Gewebe, so wie in Gewebe, welches pathologischem Stress ausgesetzt ist. So darf die EZM nicht als statische Netzwerkstruktur verstanden werden, sondern befindet sich vielmehr in einer Art Fließgleichgewicht in Wechselwirkung mit den Zellen, die sie umgibt (Adams und Watt 1993). Dabei kontrollieren und koordinieren Zell-Matrix-Interaktionen zelluläre Ereignisse wie Differenzierung und Proliferation in einer spezifischen und reproduzierbaren Art und Weise und machen damit komplexe Gewebestrukturen möglich (Von der Mark et al. 1992).

Im Rahmen von Organogenese beispielsweise müssen epitheliale Zellen, die das künftige Organ formen, nach einem streng kontrollierten Muster proliferieren, migrieren und differenzieren. Die Koordination dieser Prozesse basiert auf einem Zusammenspiel zwischen Epithelzellen und Zellen des Mesenchyms beziehungsweise des Stromas (Adams und Watt 1993). In adultem Gewebe bleibt die Rolle der EZM elementar bei der Generierung der apikobasalen Polarität des Epithels und seiner Aufrechterhaltung in einem stabilen Zustand, zum Beispiel nach pathologischem Stress (Bissell und Radisky 2001). In gleicher Weise sind aber auch Verletzungen in nicht-epithelialen Organen, wie Muskeln oder Sehnen, von Veränderungen im Stroma begleitet (Brellier et al. 2009). Darüber hinaus besitzt die EZM im adulten Gewebe wichtige Funktionen bei der Erhaltung der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung. So unterscheidet sich das Stroma

welches Tumorzellen umgibt beispielsweise signifikant in seiner Zusammensetzung von Stroma in gesundem Gewebe (Brellier et al. 2009). Heute ist es erwiesen, dass nahezu alle zellulären Ereignisse während der embryonalen Entwicklung und Organogenese, aber auch im Rahmen von Gewebe-Remodelling und Wundheilung sowie Tumorgenese und Metastasierung durch Komponenten der EZM beeinflusst werden (Von der Mark et al. 1992). Im Folgenden soll auf die Modulation der EZM im Zusammenhang mit Prozessen der Tumorentstehung näher eingegangen werden.

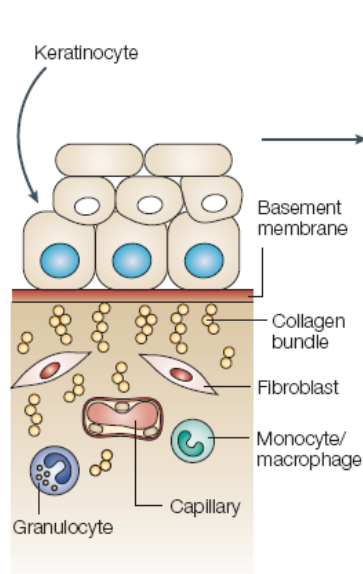
### **2.2.1 Tumorassoziierte Modulation der extrazellulären Matrix**

Basierend auf den Anfang des 20. Jahrhunderts erstmals gemachten Beobachtungen, dass sich einige Tumoren in Familien häufen, begann die Suche nach genetischen Veränderungen, die der Tumorgenese unterliegen. In den folgenden Jahrzehnten erzielte man große Fortschritte bei der Erforschung der molekularen Determinanten, die zur Entstehung von Krebs führen könnten. Nach dem heutigen Verständnis ist die Tumorgenese ein mehrschrittiger Vorgang, bei dem Tumorzellen multiple genetische und epigenetische Veränderungen erfahren (Hanahan und Weinberg 2000). Die Entstehung von Tumoren ist demnach ein evolutionärer Prozess. Genetische Mutationen können einen Selektionsvorteil für somatische Zellen bieten, welche auf diese Art und Weise anti-proliferative und zelltodinduzierende Mechanismen umgehen können, die normalerweise ihre klonale Expansion limitieren (Lowe et al. 2004). Voraussetzung für diese genetischen Veränderungen ist die Instabilität des Genoms, welche ebenfalls Teil dieses Tumormodells ist. Mittlerweile konnte erfolgreich eine ganze Reihe von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen identifiziert werden, deren Mutation für die Entstehung von Tumoren verantwortlich gemacht wird (Bishop und Weinberg 1996). Obwohl Pagets sogenannte „*seeds and soil*“-Theorie auf das Jahr 1889 datiert ist, hat man erst in den letzten zwei Jahrzehnten damit begonnen die Veränderung im sogenannten *tumor microenvironment*, also der Gewebe-Mikroumgebung des Tumors in die Aufklärung der Tumorgenese mit einzubeziehen (Mueller und Fusening 2004). Der englische Chirurg Paget verglich die Tumorzellen mit Samen (*Seeds*) von Pflanzen. Beide würden „in alle Richtungen getragen, doch können sie nur leben und wachsen, wenn sie auf kompatiblen Boden fallen“ („*When a plant goes to seed, its seeds are carried in all directions; but they can only live and grow if they fall on congenial soil*“) (Paget 1889). Bis heute sind die molekularen Faktoren, welche die „*Seeds*“ bestimmen, besser verstanden als die des „*soil*“ (Fidler 2003). Mittlerweile weiß man jedoch, dass neben den Mutationen in den Tumorzellen selbst viele Veränderungen in der Mikroumgebung dieser Zellen auftreten, in der extrazellulären Matrix (EZM) (Liotta 1986). Diese Veränderungen können der Transformation von Epithelzellen, welche den Ursprung der meisten Tumoren des

Menschen darstellen, sogar noch vorausgehen (Orend und Chiquet-Ehrisman 2006). Das Stroma in malignen Tumoren weist Charakteristika auf, die sich in normalem Gewebe nicht finden lassen, dazu gehören zum Beispiel die Ansammlung von Tumorassoziierten Makrophagen (TAM), Endothelzellen und Tumorassoziierten Fibroblasten (TAF) oder Myofibroblasten, die tumorspezifische EZM-Moleküle, Cytokine, Wachstumsfaktoren und Matrix modellierende Enzyme sezernieren (Abbildung 2) (Elenbaas und Weinberg 2001). Die wechselseitige Stimulation von Tumorzellen sowie spezifischen Zellen des Stromas kann die Tumorprogression induzieren und letztendlich zu Angiogenese und Metastasierungsprozessen führen. Tumore sind also ein Produkt ihrer Mikroumgebung (Liotta und Kohn 2001). So konnte zum Beispiel eine Studie zeigen, dass das erfolgreiche Verpflanzen von humanen Brusttumor-Xenotransplantaten in Mäuse von dem Vorhandensein von humanen, tumorspezifischen Fibroblasten abhängt (Kupperwasser et al. 2004).

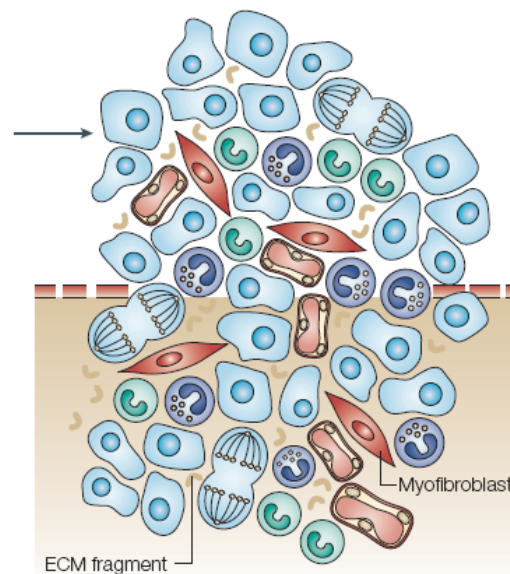
#### A: Normales Epithel

##### *ruhendes Stroma*



#### B: Karzinom

##### *aktiviertes Tumorstroma*



**Abbildung 2: Tumorassoziierte Modulation der extrazellulären Matrix** A: Gut differenziertes, normales Epithel; durch die Basalmembran abgegrenzt vom Stroma. Dieses besteht aus Kollagenbündeln, die ruhende Fibroblasten, Kapillaren sowie einige ansässige Leukozyten umgeben B: Die Progression zum Karzinom ist verbunden mit einer Proliferation des Epithels, dem Durchbruch der Basalmembran und der Entwicklung eines aktivierten Tumorstromas. Die Kollagenbündel sind vermindert, die Anzahl der inflammatorischen Zellen steigt an und Fibroblasten differenzieren zu Myofibroblasten, die Wachstumsfaktoren, Proteasen und andere Matrixkomponenten sezernieren (aus Mueller und Fusening 2004). Mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

Tenascin-C ist ein Faktor in der tumorspezifischen Mikroumgebung, welcher sowohl von transformierten Epithel- als auch von Stromazellen selbst exprimiert werden kann

(Hanamura et al. 1997, Yoshida et al. 1997). Die verstärkte Expression von Tenascin-C in Tumorgewebe deutet darauf hin, dass Tenascin-C eine Schlüsselrolle in der Mikroumgebung von Tumoren besitzt und somit nicht nur in die Anfänge der Tumorgenese, sondern auch in Vorgänge der Tumorprogression und Metastasierung involviert sein könnte (Orend und Chiquet-Ehrismann 2006).

### 2.3 Die Familie der Tenascine

Die Tenascine sind eine Familie von oligomeren Glykoproteinen, die in der extrazellulären Matrix von Vertebraten gefunden wurden. Sie haben nicht nur eine unterstützende Funktion in der Aufrechterhaltung der Matrix Struktur, sondern beeinflussen auch das Verhalten von Zellen die im Kontakt zur EZM stehen. Unter anderem spielen sie eine Rolle bei der Modulation von Zellmigration, Zelladhäsion und Wachstum. So kommen die Tenascine primär während der Gewebeentwicklung in embryonalem Gewebe vor, werden aber auch im Rahmen von Umbau- und Remodellierungsprozessen, zum Beispiel nach Gewebeverletzung, exprimiert. Neben Tenascin-C existieren noch drei weitere Moleküle: Tenascin-R, Tenascin-W und Tenascin-X. Die ehemals als Tenascin-Y und Tenascin-N bezeichneten Tenascine konnten mittlerweile als Mitglieder der Tenascin-X- und Tenascin-W- Genfamilie identifiziert werden (Tucker et al. 2006).

Ogleich Mitglieder einer Proteinfamilie und folglich ähnlich in Struktur und Aufbau, besitzen die vier Tenascine auffällig unterschiedliche Expressionsmuster während der embryonalen Entwicklung und im adulten Organismus, die auf unabhängige Regulationsmuster deuten. **Tenascin-C** kommt vor allem im embryonalen Gewebe vor, vorzugsweise in der Nähe von migrierenden Zellen, im Mesenchym, das aufkeimendes Epithel umgibt und in sich entwickelndem Bindegewebe, insbesondere von Knochen, Knorpel und Sehnen (Chiquet- und Fambrough 1984a, Chiquet-Ehrismann et al. 1986). In adultem Organismus persistiert Tenascin-C dann nur noch an wenigen Stellen, seine Expression kann aber in Gewebe, welches Umbauprozessen ausgesetzt ist, erneut hochreguliert werden. So erscheint Tenascin-C zum Beispiel erneut unter pathologischen Bedingungen wie zum Beispiel im Rahmen von Wundheilung, Inflammation und Tumorgenese (Chiquet-Ehrismann et al. 1986, Garin-Chesa et al. 1989, Whitby et al. 1991). **Tenascin-X** wird vor allem in lockerem Bindegewebe, insbesondere in Dermis, Epimysium und Blutgefäßen, sowohl während der fetalen Entwicklung als auch im adulten Organismus, exprimiert. Mutationen im Tenascin-X-Gen können zu einer Form des Ehlers-Danlos-Syndroms führen (Bristow et al. 2005). Die Expressionsmuster von Tenascin-R und Tenascin-W sind deutlich begrenzter. So kommt **Tenascin-R** ausschließlich im zentralen und peripheren Nervensystem vor (Rathjen et al. 1991). **Tenascin-W** findet man vornehmlich im fetalen Skelettsystem und im Periost des

Erwachsenen, sowie in der Niere und bestimmten Muskeln (Scherberich et al. 2004). Darüber hinaus konnte man Tenascin-W ähnlich wie Tenascin-C im Stroma einiger Tumoren nachweisen, so zum Beispiel beim malignen Mammakarzinom sowie beim Kolonkarzinom (Scherberich et al. 2005, Degen et al. 2007, Degen et al. 2008).

Längere Zeit ging man davon aus, dass alle vier Mitglieder der Tenascin-Familie trotz ihrer individuellen, spezifischen Expressionsmuster eine streng regulierte und transiente Expression während der embryonalen Entwicklung und postnatal gemeinsam hätten, die sie grundlegend von allen anderen Proteinen der extrazellulären Matrix unterschied (Hsia und Schwarzbauer 2005). Mittlerweile ist man dazu übergegangen, die Tenascine in zwei Gruppen zu unterteilen: Die erste Gruppe, bestehend aus Tenascin-R und Tenascin-X, besitzt tatsächlich ein streng reguliertes, aber stabiles Expressionsmuster. Die zweite Gruppe, gebildet von Tenascin-C und Tenascin-W, hingegen ist in ihrer Expression maßgeblich von der Gewebemikroumgebung beeinflusst und reguliert (Tucker und Chiquet-Ehrismann 2009). Demzufolge ist es letztere Gruppe, die häufig im Zusammenhang mit Krankheit oder Trauma in der extrazellulären Matrix vorzufinden ist, insbesondere im Stroma von Tumoren.

Das Vorkommen der Tenascine als Matrixproteine während der embryonalen Entwicklung und ihr Wiedererscheinen bei pathologischen Prozessen ist mittlerweile anerkannt, jedoch nicht gut verstanden. Das am besten untersuchte und charakterisierte Mitglied der Tenascin-Familie ist das Tenascin-C. Seine Effekte auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Motilität sind bis heute am besten dokumentiert und beschrieben.

## 2.4 Tenascin-C

Als erstes Mitglied der Familie der Tenascine wurde Tenascin-C in den 80er Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entdeckt; infolgedessen taucht es in der Literatur unter verschiedenen Namen auf: *Glioma mesenchymal extracellular matrix antigen GMEM* (Bourdon et al. 1983), *hexabrachion* (Chiquet and Fambrough 1984a), *myotendinous antigen* (Erickson und Inglesias 1984), *J1 glycoproteins* (Kruse et al. 1985), *Cytotactin* (Grumet et al. 1985) und *Neuronectin* (Rettig et al. 1989). Der endgültige Name *Tenascin* setzt sich zusammen aus dem lateinischen „*tenere*“ (halten) und „*nascere*“ (geboren werden, gedeihen), dem Ursprung der englischen Wörter „*tendon*“ (Sehne) und „*nascent*“ (*werdend, aufkeimend*) und bezieht sich auf die Lokalisation von Tenascin-C, die zu diesem Zeitpunkt beobachtet wurde, und seine Expression während der embryonalen Entwicklung (Chiquet-Ehrisman et al. 1986).

Die Wechselwirkungen von Tenascin-C sind komplex. Aufgrund seiner Multidomänen-Struktur kann Tenascin-C mit vielen Zell-Oberflächen-Rezeptoren sowie mit zahlreichen anderen Matrixmolekülen, darunter auch Fibronectin, interagieren. Das Glykoprotein

nimmt so direkten und indirekten Einfluss auf Zellantworten und Zellverhalten sowie auf Gewebearchitektur und –resilienz (Midwood und Orend 2009). Dabei fungiert Tenascin-C nicht als klassisches Adhäsionsprotein wie zum Beispiel Fibronektin, sondern kann in vielen Fällen auch anti-adhäsiv wirken. In vielen Berichten wird es daher als adhäsionsmodulierendes Protein der EZM klassifiziert (Orend und Chiquet-Ehrismann 2000, Sage et al. 1991). Eine Vielzahl von Zelltypen ist in der Lage, Tenascin-C zu synthetisieren. Das Expressionsmuster von Tenascin-C ist jedoch streng mit der embryonalen Entwicklung und pathologischen Vorgängen verbunden (Mackie 1994).

#### **2.4.1 Expression im embryonalen und im adulten Gewebe**

Wesentliche Orte der Tenascin-C Synthese während der embryonalen Entwicklung sind Nerven-, Skelett- und Gefäßsystem. Weitgehend verbreitet, in fast jedem Organsystem, ist Tenascin-C jedoch durch seine Expression im Mesenchym, welches sich entwickelndes Epithel umgibt (Chiquet-Ehrismann et al. 1986). So fand man Tenascin-C zum Beispiel auch in Brustdrüse, Zähnen und Haarfollikeln (Chiquet-Ehrismann et al. 1986), in der Niere (Aufderheide et al. 1987), entlang des Sinus Urogenitalis (Takeda et al. 1988) oder im Darm (Aufderheide und Ekblom 1988).

Im gesunden adulten Organismus ist das Expressionsmuster von Tenascin-C wesentlich eingeschränkter. Es gibt jedoch einige Gewebe, unterschiedlicher embryologischer Herkunft, in denen Tenascin-C persistiert (Natali et al. 1990). Dazu gehören Perichondrium, Periost und Endost (Mackie et al. 1987), bestimmte Teile der Niere, einige glatte Muskeln, so zum Beispiel die Lamina muscularis mucosae des Magen-Darmtrakts, sowie die Media von Arterien und Arteriolen (Oike et al. 1990). Natali et al. fanden daneben auch eine Tenascin-C Expression in adultem Gewebe in den Basalmembranen von Haut, Laryngotrachealtrakt, Ösophagus, Duodenum und Rektum (1990). Allerdings lässt sich eine Hochregulation der TNC-Expression im Rahmen von Wundheilung, sowie unter pathologischen Bedingungen wie zum Beispiel bei Inflammation oder Krebserkrankungen, beobachten.

#### **2.4.2 Expression im Rahmen von pathologischen Prozessen und bei Tumoren**

Zellproliferation, Zellmigration und Zelldifferenzierung sowie Gewebe-Remodelling sind Vorgänge, die neben ihrer Bedeutung während der embryonalen Entwicklung auch im Rahmen von Wundheilungsprozessen eine Rolle spielen. So überrascht es nicht, dass eine starke Akkumulation von Tenascin-C im Granulationsgewebe der Haut während Wundheilungsprozessen nachgewiesen werden konnte (Mackie et al. 1988). Daneben induzieren auch hyperproliferative Erkrankungen der Haut, wie Psoriasis (Schalkwijk et al. 1991), Sklerodermie (Lacour et al. 1992) oder bullöse Dermatosen (Schenk et al. 1994)

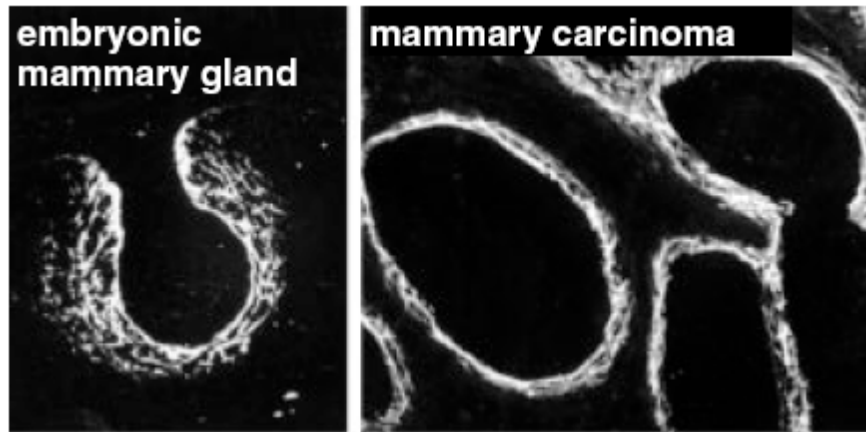
die TNC-Expression.

Bei alkoholinduzierten und Cholestase-bedingten Lebererkrankungen, sowie bei akuter und chronischer Hepatitis, wurde ebenfalls eine erhöhte Immunreaktivität für Tenascin-C im Vergleich zu gesundem Lebergewebe festgestellt (Van Eyken et al. 1990). Auch im Zusammenhang mit Asthma bronchiale als typisch chronisch-inflammatorische Krankheit wurde eine gesteigerte TNC-Expression beobachtet (Laitinen et al. 1997). Dabei scheint diese, interessanterweise, durch den Neuropeptid S-Rezeptor 1 hochreguliert zu werden, welcher selbst als Suszeptibilitäts-Gen für Asthma bekannt ist (Orsmark-Pietras et al. 2008). Auch bei dilatativer Kardiomyopathie hat sich Tenascin-C in einer Studie als erfolgreicher Marker für Inflammation unter Beweis stellen können (Tsukada et al. 2009). Im Zusammenhang mit rheumatoider Arthritis konnte kürzlich sogar gezeigt werden, wie Tenascin-C in Makrophagen und Fibroblasten die Synthese von inflammatorischen Cytokinen mittels Aktivierung des *Toll-like* Rezeptors 4 induziert (Midwood et al. 2009). All dies lässt vermuten, dass Tenascin-C Teil einer allgemeinen inflammatorischen Antwort ist (Midwood und Orend 2009).

Die TNC-Expression wird auch bei Infektionen induziert. So fand man verstärkte TNC-Expressionen zum Beispiel im Lungengewebe von Tuberkulose-Patienten (Kaarteenaho-Wiik et al. 2000) oder im Zervixepithel von Patienten mit humanem Papillomavirus (Tiitta et al. 1992).

Am auffälligsten verstärkt ist die TNC-Expression allerdings in vielen Tumoren, die bisher im Zusammenhang mit dem Glykoprotein untersucht worden sind. Schon früh wurde das Vorkommen von Tenascin-C im Rahmen von neoplastischen Vorgängen beobachtet. So wurde Tenascin-C ursprünglich 1983 erstmals als *glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen* im Mesenchym von Gliomen entdeckt und beschrieben (Bourdon et al. 1983). Kurze Zeit später stellten Chiquet-Ehrismann et al. fest, dass Tenascin-C sich im Gewebe der embryonalen Brustdrüse, jedoch nicht im normalen adulten Brustgewebe nachweisen ließ, dass es aber in Karzinogen-induzierten Mammakarzinomen erneut zu einer TNC-Expression kam (Abbildung 3) (Chiquet-Ehrismann et al. 1986).

Mittlerweile existiert eine ganze Reihe von Studien, die über Tenascin-C im Zusammenhang mit Tumoren berichten. Dabei lässt sich eine Tenascin-C-Überexpression in den meisten soliden Tumoren, die bisher untersucht worden sind, finden. Dazu gehören Tumore von Gehirn, Mamma, Uterus, Ovar, Prostata, Pankreas, Kolon, Magen, Mund, Larynx, Leber, Niere, Blase, Haut, Knochen und Weichteilgewebe sowie Lymphome (reviewed von Orend und Chiquet-Ehrismann 2006).



**Abbildung 3:** Immunhistochemische Färbungen gegen Tenascin-C in einer embryonalen Brustdrüse und einem Mammakarzinom. Tenascin-C ist im Mesenchym, welches das sich entwickelnde Mamma-Epithel umgibt, sowie im Stroma um die Tumorzellnester herum vorhanden (aus Chiquet-Ehrismann und Chiquet 2003). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

In Gliomen (Leins et al. 2003) und Karzinomen von Mamma (Ishihara et al. 1995, Suwiwat et al. 2004), Pankreas (Vaidya et al. 1996), Blase (Brunner et al. 2004) und Lunge (Ishiwata et al. 2005) korrelierte die TNC-Expression zudem mit einer schlechten Überlebensprognose für die betroffenen Patienten.

Die genauen Funktionen von Tenascin-C und folglich auch seine Bedeutung im Zusammenhang mit der Entwicklung und Progression von Tumoren sind bisher noch schlecht verstanden, man schreibt Tenascin-C bei der Tumorgenese aber zwei wichtige Rollen zu: Zum einen soll das Glykoprotein die Tumorzellen direkt durch Aktivierung ihrer Proliferations-, Invasions- und Migrationsfähigkeiten stimulieren, zum anderen einen Einfluss auf die Förderung der Angiogenese durch Stimulation von Endothelzellen ausüben (Brellier et al. 2009). Neben den Aufgaben, die man Tenascin-C bei der primären Tumorentwicklung zuteilt, hat man mittlerweile auch interessante Hinweise auf den Einfluss von Tenascin-C auf die Metastasierung von Tumoren gefunden (Tavazoie et al. 2008).

Die molekularen Mechanismen, die diesen Beobachtungen zugrunde liegen, sind Gegenstand aktueller tumorbiologischer Forschung und bisher noch nicht ausreichend aufgeklärt. Dies ist vor allem auf die Komplexität der Wechselwirkungen, die das Molekül zu anderen Zellen und Bestandteilen der EZM aufweist, zurückzuführen. Um die vielfältigen und teilweise auch konträren Funktionsweisen von Tenascin-C besser verstehen zu können, soll im Folgenden zunächst auf die Struktur des Glykoproteins eingegangen werden.

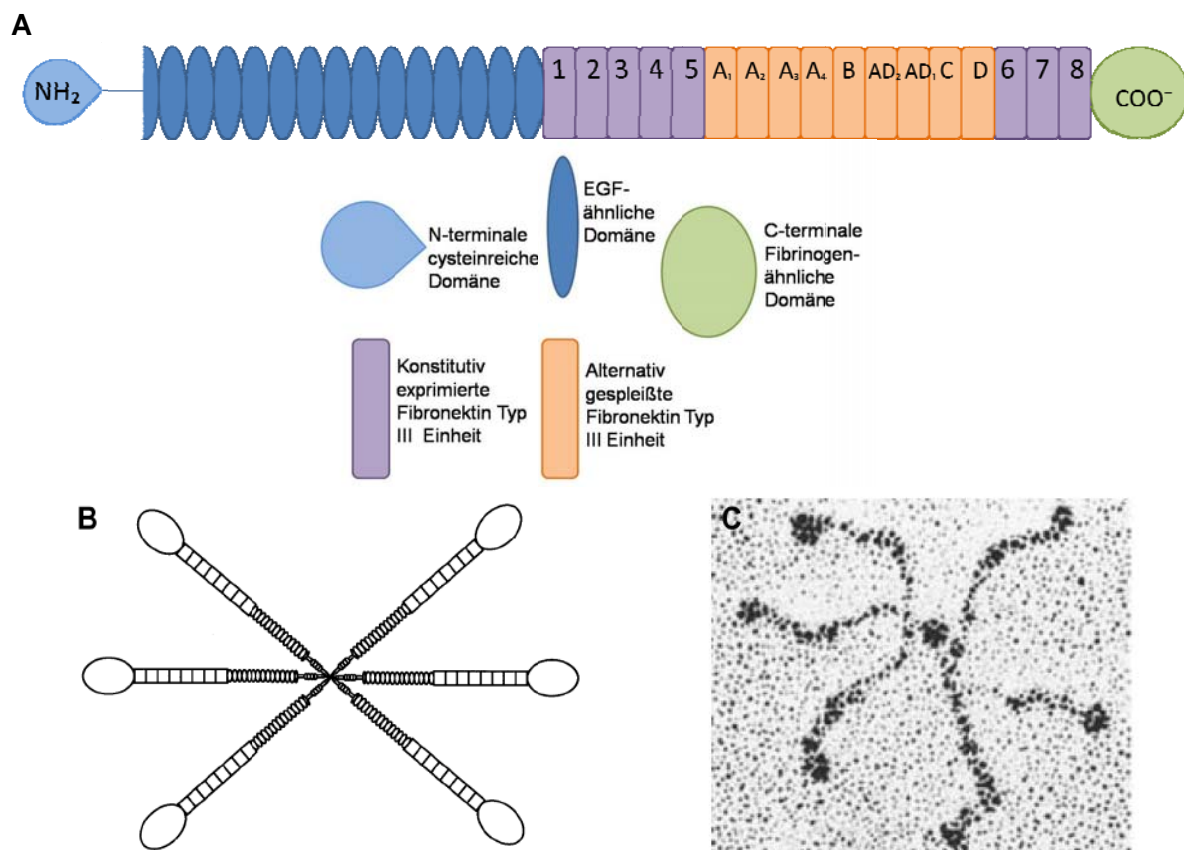


### 2.4.3 Molekülstruktur von Tenascin-C

Tenascin-C ist ein sehr großes Molekül mit einer Masse von bis zu 1900kDa, wenn es als intaktes Hexamer vorliegt (Taylor et al. 1989). Tenascin-C wurde zunächst elektronenmikroskopisch als eine sechsarmige Struktur mit einem zentralen Kern sichtbar gemacht und aufgrund seines Aufbaus als Hexabrachion bezeichnet (Abbildung 4 C), (Erickson und Inglesias 1984). Biochemische Analysen zeigten dann, dass es sich tatsächlich um ein über Disulfidbrücken verknüpftes Oligomer mit sechs identischen Polypeptidketten handelt (Chiquet und Fambrough 1984b, Friedlander et al. 1988), deren Struktur mittlerweile vollständig entschlüsselt werden konnte (Abbildung 4 A) (Nies et al. 1991). Das proximale Ende jeder dieser sechs Polypeptidketten besteht aus einer amino-(N)-terminalen cysteinreichen Domäne, die von 14 ½ repetitiven Einheiten gefolgt wird (Nies et al. 1991, Siri et al. 1991). Diese 14 ½ Einheiten weisen eine große Ähnlichkeit zum epidermalen Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor) auf und werden deshalb als EGF-ähnliche Domänen (EGF-like repeats, EGFL repeats) bezeichnet (Jones et al. 1988). Auf diese 14 ½ EGF-ähnlichen Einheiten folgen eine Reihe von Modulen, die mit den Typ III- Domänen des Fibronektin identisch sind (Jones et al. 1988). Von diesen sogenannten Fibronektin- TypIII- Modulen (FNIII) finden sich im Tenascin-C-Monomer stets 8 konstitutive, sowie zusätzlich bis zu 9 weitere variable Einheiten, welche durch alternatives Spleißen des primären Transkriptes eingebaut werden können (Gulcher et al. 1989, Jones et al. 1989, Mighell et al. 1998, Spring et al. 1989, Sriramarao und Bourdon 1993). Diese neun alternativ gespleißten FNIII- Module werden zwischen die fünfte und die sechste FNIII-Einheit eingefügt und werden mit A1, A2, A3, A4, B, AD2, AD1, C und D bezeichnet. Das C-terminale Ende der Polypeptidkette bildet schließlich eine globuläre Domäne, die dem Fibrinogen ähnelt (Jones et al. 1988, 1989).

Die Oligomerisierung der Tenascin-C-Monomere geschieht cotranslational in zwei Einzelschritten. Zunächst vereinigen sich drei Polypeptidketten über die N-terminale Domäne zu einer gewundenen, sogenannten „triple-coiled coil“ Helix. In einem zweiten Schritt werden dann zwei dieser Trimere zusammengeführt und bilden so das Tenascin-C-Hexamer, welches mittels Disulfidbrücken stabilisiert wird (Kammerer et al. 1998) (Abbildung 4 B und C).

Das alternative Spleißen der neun zusätzlichen FNIII- Module, die unabhängig voneinander kombinatorisch eingefügt oder entfernt werden können, erlaubt eine extrem hohe Anzahl an Tenascin-C-Isoformen (Gulcher et al. 1991, Jones et al. 1988, 1989, Spring et al. 1989). Diese Vielzahl und Diversität veranschaulicht die Untersuchung von Joester und Faissner, die im Rahmen der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung des zentralen Nervensystems der Maus 27 Tenascin-C- Isoformen finden konnten (1999).



**Abbildung 4: Molekülstruktur von Tenascin-C** A: Schematischer Aufbau eines Tenascin-C-Monomers bestehend aus einer amino-(N)-terminalen cysteinreichen Domäne, gefolgt von 14 ½ EGF-ähnlichen Einheiten, 8 konstanten und bis zu 9 weiteren, alternativ gespleißten FNIII-Modulen sowie einer C-terminalen, Fibrinogen-ähnlichen, globulären Domäne (modifiziert nach Joester and Faissner 2001). B: Schematische Darstellung eines Tenascin-C-Hexabrachions, welches sich über die cysteinreichen Domänen von sechs Polypeptidketten mittels „coiled-coil“-Interaktion bildet. Diese Verbindung wird durch Disulfidbrücken stabilisiert (aus Garwood et al. 2001). C: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Tenascin-C-Hexamers (aus Orend and Chiquet-Ehrismann 2006). Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Darüber hinaus besitzt Tenascin-C 23 potentielle N- Glykosylierungsstellen (Siri et al. 1991), von denen sich die meisten auf den FNIII-Modulen befinden. Die strukturelle Variabilität, infolge der potentiellen Glykosylierungsstellen sowie der verschiedenen Spleiß-Isoformen, erklärt die verschiedenen Massenangaben bezüglich des humanen Tenascin-C-Monomers, welche zwischen 180 und 225 kDa (Gulcher et al. 1989) bis hin zu 230/ 240 und 320kDa (Aukhil et al. 1993) variieren.

#### 2.4.4 Bedeutung der alternativ gespleißten Tenascin-C-Isoformen

Die entscheidenden Mechanismen, die dem alternativen Spleißen des primären Transkriptes zugrunde liegen sind bis jetzt noch nicht verstanden, aber es gibt Hinweise darauf, dass der proliferative Status einer Zelle (Borsi et al. 1994), der extrazelluläre pH-Wert (Borsi et al. 1995), der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  Typ 1 (Zhao und Young 1995) und

der *splicing factor sam68* (Moritz et al. 2008) beteiligt sind. Da die meisten Tenascin-C-Liganden mit den FNIII-Einheiten interagieren (Jones und Jones 2000), geht man davon aus, dass die zahlreichen FNIII-Einheiten den verschiedenen Tenascin-C-Isoformen spezifische Funktionen übertragen (Meiners et al. 1997), die bis jetzt aber noch weitgehend unbekannt sind. So konnte in diesem Zusammenhang beispielsweise gezeigt werden, dass eine 190 kDa Isoform des Tenascin-C-Moleküls eine stärkere Affinität zu dem Molekül Fibronectin aufweist als ein Tenascin-C-Molekül mit einer größeren Masse (Chiquet-Ehrismann et al. 1991).

Für die Vermutung, dass die Wechselwirkungen von Tenascin-C zu seinen Liganden von den verschiedenen Isoformen abhängig zu sein scheint, spricht auch die Beobachtung, dass verschiedene Tenascin-C-Spleißvarianten in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (Chiquet-Ehrismann et al. 1991, Dörries und Schachner 1994, Kaplony et al. 1991, Mackie und Tucker 1992, Prieto et al. 1990, Tucker 1994) und darüber hinaus auch noch von unterschiedlichen Entwicklungsstadien abhängig sind (Borsi et al. 1992, Oyama et al. 1991, Schenk et al. 1994, Schwögler et al. 1992).

Ferner konnte beobachtet werden, dass die Expression besonders großer, hochmolekularer Tenascin-C-Isoformen mit gesteigerter Zellmigration (Kaplony et al. 1991), der Herunterregulation von Zell-Matrix-Adhäsion (Murphy-Ullrich et al. 1991) sowie mit Gewebeumbauprozessen (Tucker 1993) korreliert, wohingegen kleinere Tenascin-C-Isoformen in ruhendem Gewebe vorkommen und mit einer beständigen extrazellulären Matrix assoziiert sind. Große Spleißvarianten fand man auch im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen wie zum Beispiel in chronisch Hepatitis C-infiziertem Gewebe (El-Karef et al. 2007) oder in, von Asthma betroffenen, Lungengewebe (Matsuda et al. 2005). Daneben gibt es auch Hinweise auf das Vorkommen von bestimmten, hochmolekularen Tenascin-C-Spleißvarianten bei gewissen Tumorentitäten (Abbildung 5), so zum Beispiel beim Astrozytom (Carnemolla et al. 1999), beim Melanom und duktalem Mammakarzinom (Derr et al. 1997), bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (Mighell et al. 1997), beim Mammakarzinom (Koukoulis et al. 1991, Borsi et al. 1992, Takatsugu et al. 2003), beim Prostatakarzinom (Ibrahim et al. 1993) sowie beim Kolorektalen Karzinom (Dueck et al. 1999, Hauptmann et al. 1995).

Beim Mammakarzinom (Adams et al. 2002, Borsi et al. 1992) sowie beim Urothelkarzinom der Blase (Richter et al. 2009) korrelierte die Expression großer Tenascin-C-Varianten zudem mit der Invasivität des Tumors. Eine neue kürzlich veröffentlichte Untersuchung zum Mammakarzinom konnte erfolgreich darstellen, dass bestimmte große tumorassoziierte Tenascin-C-Spleißvarianten das Wachstum und die Zellinvasion fördern können (Hancox et al. 2009).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Tenascin-C-Monomers und seiner Fibronectin TypIII-Module. Die alternativ gespleißten Einheiten sind mit A bis D kenntlich gemacht. Fibronectin TypIII-Repeats, die in bestimmten Tumorentitäten detektiert wurden sind über der Darstellung gekennzeichnet (aus Orend und Chiquet-Ehrismann 2006). Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.**

## 2.5 Die Rolle von Tenascin-C in Tumoren

Tenascin-C wird in den meisten soliden Tumoren exprimiert und spielt eine Rolle in der Förderung von Proliferation, Invasion und Angiogenese im Zuge von Tumorgenese und Metastasenbildung. Darüber hinaus zeigen die neusten Untersuchungen, dass Tenascin-C bei der Entstehung von Tumoren auch durch Einfluss auf die Genomstabilität (Ruiz et al. 2004) sowie durch Blockierung der Immunabwehr mitwirkt (Hemesath et al. 1994). Tenascin-C hat eine wichtige Funktion in der Schaffung einer Mikroumgebung, in der Tumorzellen expandieren können. So korreliert eine starke TNC-Expression in einigen Tumorentitäten mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten (u.a. Brunner et al. 2004, Leins et al. 2003, Ishiwata et al. 2005, Suwiwat et al. 2004).

Die Mechanismen, die dieser Beobachtung auf molekularer Ebene zugrunde liegen, sind komplex und bisher schlecht verstanden, so dass an dieser Stelle nur eine unvollständige Übersicht über die Beobachtungen zur Rolle von Tenascin-C im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen gegeben werden kann.

Die Expression von Tenascin-C kann durch verschiedene pro- und anti-inflammatorische Cytokine wie zum Beispiel IL-1, 4, 6, 8, 13, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  sowie durch Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF $\beta$ , LIF-1 und CTGF induziert werden (reviewed in Chiquet-Ehrismann und Chiquet 2003). Dabei scheinen auch die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und c-Jun (Mettouchi et al. 1997) sowie Ets und Sp1 (Shirasaki et al. 1999) in die komplexe Regulierung der Expression involviert zu sein.

Zusätzlich fördern auch Faktoren, die speziell in entzündetem oder in Tumorgewebe vorkommen, wie Hypoxie (Gebb et al. 2003), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Yamamoto et al. 1999) oder mechanischer Stress (Sarasa-Renedo und Chiquet 2005) die TNC-Expression.

Genauso kann diese aber auch durch Tumor-assoziierte Signalkaskaden, zum Beispiel mittels des ERK/MAP- (Maschler et al. 2004) oder des Wnt-Signalwegs (Beiter et al. 2005) gesteigert werden. Interessanterweise werden beide Signalkaskaden wiederum

selbst durch Tenascin-C induziert, so dass ein positiver Feedback-Mechanismus bei der Regulation von TNC-Expression und Tenascin-C-Antworten im Rahmen der Tumorgenese denkbar sind (Orend und Chiquet-Ehrismann 2006).

Huang und Arbeitsgruppe fanden eine weitere Wirkweise des Tenascin-C, welche die Zellproliferation beeinflusst. So ist Tenascin-C in der Lage, durch Interferenz der Bindung zwischen Fibronectin und dem Proteoglykan Syndecan-4, die Zelladhäsion zu blockieren und die Zellproliferation zu stimulieren: Dabei bindet Tenascin-C an eine Domäne im Fibronectin, die Syndecan-4 als Ligand dient. Syndecan-4 ist ein transmembranes Heparansulfat-Proteoglykan, welches als Co-Rezeptor für Integrin $\alpha$ 5 $\beta$ 1- vermittelte Zelladhäsion fungiert. Die Inhibition der Integrin $\alpha$ 5 $\beta$ 1/Syndecan-4 abhängigen Zelladhäsion durch Tenascin-C führt zu gesteigerter Proliferation von Tumorzellen aus Gliomen und Mammakarzinomen (Huang et al. 2001).

Ein Mechanismus, mit dem Tenascin-C die Tumorzellmigration unterstützt, wurde von De Wever und seiner Arbeitsgruppe bei Untersuchungen von Kolonkarzinomen entdeckt. Demnach stimuliert das von tumorassoziierten Fibroblasten sezernierte Tenascin-C die Tumorzellinvasion durch Blockierung des RhoA- und Aktivierung des Rac-Signalpfads (De Wever et al. 2004).

Darüber hinaus haben Studien, bei denen rekombinante Fragmente von Tenascin-C verwendet wurden, offen gelegt, dass die alternativ gespleißten Domänen des Tenascin-C Annexin II auf Endothelzellen binden und so die Zellmigration fördern können (Chung und Erickson 1994, Chung et al. 1996). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass wohlmöglich besonders die größeren Tenascin-C-Isoformen an der Loslösung von Zellen aus dem Tumorverband beteiligt und so mitverantwortlich für die Malignität der Tumorzellen sein könnten (Kusagawa et al. 1998).

Ein experimenteller Hinweis auf die bedeutende Rolle von Tenascin-C bei Metastasierungsvorgängen sind die Ergebnisse von Tavazoie und Arbeitsgruppe (2008). Diese konnten zeigen, dass bei Mammakarzinom-Zellen, in denen die TNC-Expression durch siRNA supprimiert wurde, die Fähigkeit Lungenmetastasen zu bilden stark vermindert war. Außerdem konnte dargestellt werden, dass Tenascin-C ein Target von miR-335, einer „Metastasen-unterdrückenden“ Mikro-RNA, ist, deren Expression bei Mammakarzinom verloren geht, sobald dieses in Lunge oder Knochen metastasiert (Tavazoie et al. 2008).

Parallel zu dieser Studie, hob auch eine Analyse von VEGF-regulierten Genen beim Mammakarzinom, welche mit erhöhtem Potential für Lungenmetastasen assoziiert sind, eine bedeutende Rolle von Tenascin-C bei Metastasierungsprozessen hervor (Calvo et al. 2008).

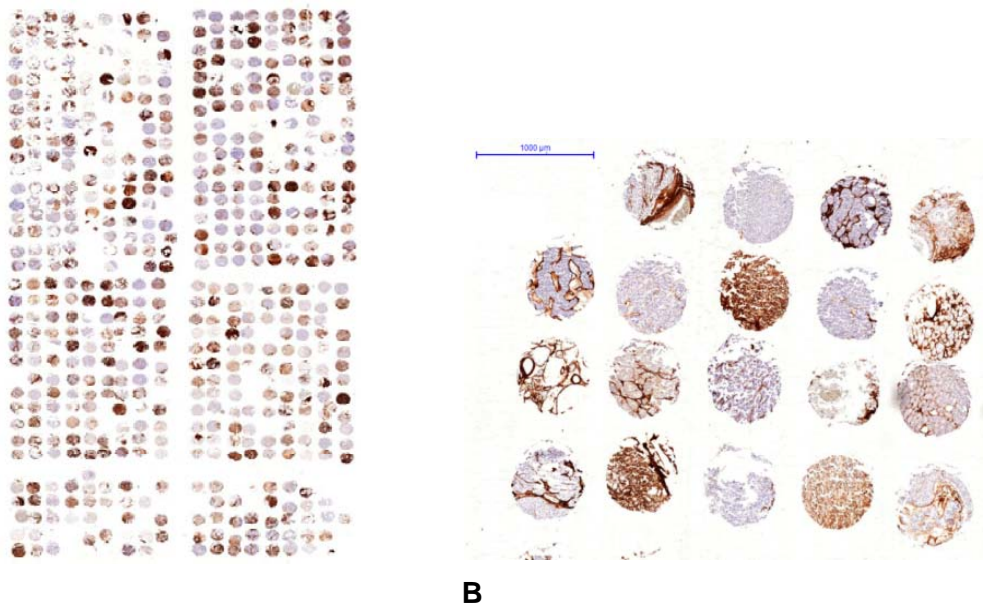
Die neusten Erkenntnisse über die Rolle von Tenascin-C bei der Tumorprogression sowie seine verstärkte Expression bei vielen soliden Tumoren machen das Glykoprotein zu einem interessanten Kandidaten für die Tumordiagnostik sowie für die Verlaufskontrolle von Tumorerkrankungen.

### 3. Material und Methoden

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg überprüft und mit einem positiven Votum versehen. Es lagen Einverständniserklärungen von allen teilnehmenden Patienten über die Durchführung der Untersuchungen an Gewebe und Serum vor.

#### 3.1 Multitumor Tissue Microarray

Für den immunhistochemischen Nachweis von Tenascin-C im Tumorgewebe wurde das Verfahren des *Tissue Microarray* (TMA) angewandt. Dieses erlaubt die gleichzeitige Untersuchung einer großen Anzahl von Gewebeproben (bis zu 1000) auf einem einzigen Objektträger (Abbildung 6). Beim TMA werden winzige Gewebezyylinder aus Hunderten von verschiedenen zu untersuchenden Geweben ausgestanzt und anschließend auf einen leeren „Empfänger“-Paraffinblock übertragen. Die Schnitte dieser TMA-Blöcke können dann wiederum für simultane in-situ Untersuchungen auf DNA-, RNA- oder Protein-Ebene verwendet werden (Simon et al. 2004). In unserer Untersuchung wurden Hunderte von Primärtumoren auf die Expression des Proteins Tenascin-C untersucht. Im Folgenden wird daher synonym dem Begriff TMA auch die Bezeichnung *Multitumor Array* verwendet.



**Abbildung 6:** A: Multitumor Array-Slide angefärbt mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen Tenascin-C (anti-Tenascin BC-24, NB600-508, Novus Biologicals) und B: Ausschnitt daraus

#### 3.1.1 Gewebeproben

Die für den Multitumor Array verwendeten Gewebeproben stammen aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf. Insgesamt wurden

in unseren Untersuchungen 4579 Proben, inklusive 3978 Proben von Primärtumoren von 99 verschiedenen Entitäten und Subtypen (darunter 37 Proben von GIST) sowie 601 Proben von 42 verschiedenen Kontrollgeweben, auf TMA-Format gebracht und ausgewertet.

### 3.1.2 Durchführung

Das entnommene Gewebe wurde in 4%iges Paraformaldehyd überführt und anschließend in Paraffinblöcke eingebettet. Von diesen wurden 3µm-Serienschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, um zunächst einen Überblick über das gewonnene Gewebematerial zu gewinnen und für den Tumor repräsentative Regionen auszumachen. Anders als bei herkömmlichen Paraffinblöcken, werden die fertigen TMA-Blöcke bei Raumtemperatur geschnitten. Folglich musste für die Herstellung der leeren *Empfänger*-Blöcke ein spezielles Paraffin verwendet werden. Das von uns verwendete *Peel-A-Way*®-Paraffin besitzt eine Schmelztemperatur von 56- 58°C (*Polysciences, Warrington, PA*). Der eigentliche Ablauf der TMA- Herstellung bestand aus folgenden vier Schritten, die für jede Probe wiederholt wurden: 1. Ausstanzen eines Lochs im Empfänger-Block, 2. Entfernen des Paraffins aus der Nadel, 3. Ausstanzen eines Gewebezylinders aus dem Spender-Block und 4. Einbringen dieses Gewebezylinders in den Empfängerblock. Hierfür wurde ein eigens vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf entwickeltes halbautomatisiertes Array-Gerät verwendet. Für eine leichtere Orientierung und Übersichtlichkeit bei der späteren Auswertung der einzelnen Schnitte wurden die Blöcke in 6 Untereinheiten (A bis F) eingeteilt und die Proben nach diesem Schema eingebracht. Auf diese Art und Weise wurden aus jedem Spender-Block Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 0,6mm ausgestanzt und auf insgesamt 8 *Empfänger*-Blöcke übertragen, von denen jeder schließlich zwischen 400 und 600 Proben beinhaltete. Sobald alle Gewebezylinder in die neuen Paraffinblöcke eingebracht waren, wurden diese für 10 Minuten auf 40°C erwärmt, um eine ausreichende Verschmelzung der Präparate zu erreichen. Vorstehende Gewebezylinder wurden mithilfe eines Glasträgers sanft, tiefer in den gewärmten Paraffinblock gepresst. Von den neu zusammengesetzten Multitumor-TMA-Blöcken wurden wiederum 5µm-Schnitte angefertigt und mittels *ParaffinTape-Transfer System*® [bestehend aus haftfähigen Trägern (PSA-CS4x), haftfähigem Band und UV-Lampe; *Instrumedics, Inc., Hackensack, NJ*] auf Objektträger gebracht.

#### 3.1.2.1 Immunhistochemische Färbung

Vor der immunhistochemischen Färbung müssen die Träger zunächst entparaffiniert werden, da Paraffinreste die unspezifische Hintergrundfärbung verstärken. Hierzu wurden die Träger zweimal für jeweils fünf Minuten in Xylene getaucht und anschließend durch



Baden in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils weitere fünf min (1. 100% Ethanol, 2. 96% Ethanol, 3. 70% Ethanol) rehydriert. Es folgte eine kurze Spülung mit destilliertem Wasser. Die Demaskierung der Epitope wurde mittels Pronase-Behandlung bei 37°C für fünf min durchgeführt (*Pronase, S2013, Dako, USA*). Anschließend wurden die Schnitte mit TBS-Waschpuffer (*Tris-buffered Saline, S1968, Dako, USA*) fünf Minuten gespült. Es folgte eine Behandlung der Multitumor Arrays mit 3% Wasserstoffperoxid für zehn min zur Blockierung der endogenen Peroxidase und damit zur Vermeidung von Hintergrundfärbungen. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit TBS für fünf min folgte die Auftragung des Antikörpers und die Inkubation bei 30°C. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler Mausantikörper, welcher ein Epiptop in der N-terminalen EGF-ähnlichen Domäne des humanen Tenascin-C-Moleküls erkennt (*Mouse Monoclonal anti-Tenascin BC-24, NB600-508, Novus Biologicals Inc., Littelton, USA*). Nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit wurde erneut zweimal für jeweils fünf min mit TBS gewaschen. Die immunhistochemische Färbung wurde mittels eines Peroxidase-Nachweissystems von *Dako, USA* vorgenommen. Hierfür wurde zunächst ein Peroxidase-markiertes Polymer (*EnVision+System-HRP, Labeled Polymer, Anti-Mouse k4001, Dako, USA*) aufgetragen und inkubiert (30 Minuten, 30°C) und anschließend eine DAB-Substrat-Chromogen-Lösung (*Liquid DAB+ Substrate- Chromogen System, k3468, Dako, USA*) (Inkubation zehn Minuten bei Raumtemperatur). Zwischen den Arbeitsschritten wurde erneut zweimal für fünf min mit TBS gespült. Nach fünfminütigem Waschen mit destilliertem Wasser wurde mit Hämalaun für eine Minute sanft gegengefärbt und mittels Spülen in Leitungswasser für weitere fünf Minuten gebläut. Die fertig angefärbten Schnitte wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylene überführt und unter einem Deckglas mit Eindeckbalsam eingedeckt.

### 3.1.3 Semiquantitative Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse wurde von drei unabhängigen Untersuchern durchgeführt. Bei unterschiedlichen Meinungen bezüglich eines Schnittes, wurde die des Pathologen als verbindlich genommen. Jede Gewebeprobe wurde hinsichtlich der Intensität der Färbung (0, 1+, 2+, 3+) und des prozentualen Anteils der positiven Zellen beurteilt. Für die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse wie folgt zusammengefasst: negativ (keine Färbung), schwach positiv (1+ Färbung oder 2+ Färbung in  $\leq 30\%$ ) und stark positiv (2+ Färbung in  $>31\%$  oder 3+ Färbung).

### 3.2 Enzyme-linked immunosorbent assay

Die Serumkonzentrationen von Tenascin-C bei GIST-Patienten, Pankreaskarzinompatienten und in der Kontrollgruppe wurden mittels eines *Enzyme-*

*linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt. Dabei handelt es sich um ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Antigen, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Der von uns verwendete ELISA ist ein sogenannter *Double-Antibody-Sandwich-ELISA* (Sandwich-ELISA). Hierbei kommen zwei Antikörper, die an unterschiedlichen Stellen des Antigens binden, zum Einsatz. Der erste Antikörper, der sogenannte *coating*-Antikörper, ist an die Oberfläche der Kavitäten (*Wells*) der Mikrotiterplatte gebunden. Auf diese Mikrotiterplatte wird die Probe aufgetragen, in der man das nachzuweisende Antigen erwartet. Während der nun folgenden Inkubationszeit bindet der feste Antikörper der Mikrotiterplatte das in der Probe vorhandene Antigen. Anschließend wird ein zweiter Antikörper, der sogenannte Detektions-Antikörper, in die Kavitäten der Mikrotiterplatte gegeben. Dieser ist an ein Enzym gekoppelt und bindet nun ebenfalls an das Antigen. Es entsteht der sogenannte Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Nach erneutem Waschen zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wird ein zum Enzym passendes, chromogenes Substrat in die Kavitäten der Mikrotiterplatte gegeben. Dieses wird vom Enzym umgesetzt und es kommt zur Färbung, welche anschließend photometrisch gemessen werden kann.

### 3.2.1 Serumproben

Aus den Vollblutproben wurde nach Zentrifugieren bei 2500 Rotationen pro Minute (rpm) für 15 Minuten Serum extrahiert und dieses bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zum Zeitpunkt der Analyse eingefroren.

Es wurden die Seren von insgesamt 94 GIST-Patienten retrospektiv untersucht. Es handelt sich um die Serumproben von Patienten, die mit der Diagnose eines GIST zwischen 1992 und 2007 in Deutschland, Österreich und der Schweiz behandelt worden sind. Diese Proben wurden uns in Zusammenarbeit mit der Selbsthilfeorganisation „*Das Lebenshaus*“ (*Das Lebenshaus e.V., Bad Nauheim*) zur Verfügung gestellt. Die Patienten wurden gemäß der Verfügbarkeit von Serumproben ausgewählt und aufgrund der Seltenheit ihrer Erkrankung und der Verschiedenheit der Therapieoptionen nicht stratifiziert. Alle klinisch-pathologischen Daten, inklusive Tumorlokalisation, Tumorgröße, das Auftreten von Metastase und/oder Rezidiv, Mitoseanzahl und Imatinib-Therapie stammen aus den Krankenhausakten der teilnehmenden Patienten. Sie wurden in der Regel alle drei Monate durch die Organisation „*Das Lebenshaus*“ von den behandelnden Ärzten an uns übermittelt und aktualisiert. In wenigen Fällen wurden die Daten leider nicht komplett an uns weitergeleitet, so dass wir einige Datenlücken verzeichnen mussten.

Zusätzlich wurden die Seren von insgesamt 68 Pankreaskarzinom-Patienten retrospektiv untersucht, darunter 55 Adenokarzinome sowie 11 neuroendokrine Karzinome des Pankreas. Bei den Proben handelt es sich um die Seren von Patienten, die zwischen

1997 und 2007 im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf operiert worden sind. Die Patienten wurden gemäß der Verfügbarkeit von Serumproben ausgewählt und aufgrund der Seltenheit ihrer Erkrankung und der Verschiedenheit der Therapieoptionen nicht stratifiziert. Die klinisch-pathologischen Daten, inklusive Tumorlokalisierung, TNM-Klassifikation, Grading, Resektionsstatus, Auftreten von Metastase und/oder Rezidiv stammen aus den Krankenhausakten der teilnehmenden Patienten oder wurden von weiterbehandelnden Ärzten eingeholt.

Als Kontrollgruppe dienten die Seren von 154 Blutspendern aus dem Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf. Einschlusskriterium war ein Mindestalter von 30 Jahren zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Alle Blutproben wurden bei 2500rpm für 15 Minuten zentrifugiert und bei -80°C bis zum Zeitpunkt der Analyse eingefroren.

### 3.2.2 Verwendete Antikörper und Reagenzien

Für den zur Konzentrationsbestimmung von Tenascin-C im Serum durchgeführten Sandwich-ELISA wurden ausschließlich Reagenzien aus dem Kit „*Human Tenascin-C Large (FNIII-C)*“ der Firma IBL® (*Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., MN, USA*) verwendet. Dieser ELISA dient durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Antikörpern der Detektion von hochmolekularen Tenascin-C-Molekülen, welche die FNIII-C Domäne besitzen. Diese hochmolekulare Tenascin-C-Varianten treten im Gegensatz zum niedermolekularen Tenascin-C vor allem in pathologischem Gewebe, also auch in Tumorgewebe auf.

Verwendete Antikörper:

1. *Coating Antibody*: Anti-Human Tenascin-C (19C4MS) Mouse IgG MoAb Affinity Purify : specific to human FNIII-C domain
2. *Labeled Antibody* : Horseradish Peroxidase (HRP) conjugated Anti-Human Tenascin-C (4F10TT) Mouse IgG Fab' Affinity Purify : react to EGF-like domain

Verwendete Reagenzien:

- |                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| (1) <i>Standard</i> :                | Purified Human Tenascin-C               |
| (2) <i>EIA Buffer</i> :              | 1% BSA, 0.05% Tween 20 in PBS           |
| (3) <i>Chromogen</i> :               | Tetra Methyl Bezidine (TMB) solution    |
| (4) <i>Stop Solution</i> :           | 1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       |
| (5) <i>Wash Buffer Concentrate</i> : | (40X) 0.05% Tween20 in phosphate buffer |

### 3.2.3 Durchführung

Für die Serumkonzentrationsbestimmung wurden die Proben zunächst aufgetaut und 1:20 mit *EIA Buffer* (2) verdünnt. Anschließend wurden je 100µl der verdünnten Proben auf die bereits mit dem Antikörper (*Coating Antibody*) vorbeschichtete *96-Well-Microtiterplatte* (*IBL*®) pipettiert und diese bei 37°C inkubiert. Nach Ende der 60-minütigen Inkubationszeit wurde die Platte zehn Mal gewaschen. Hierfür wurde die Platte zunächst mit der Waschlösung (*Wash Buffer Concentrate* (5), 40fach verdünnt in destilliertem Wasser) gefüllt, die Flüssigkeit dann abgesaugt und zum restlosen Entfernen eventueller Rückstände die Platte schließlich „ausgeklopft“. Im darauffolgenden Arbeitsschritt wurden je 100µl des zweiten Antikörpers (*Labeled Antibody*) 30fach verdünnt in *EIA buffer* (2) in die Kavitäten gegeben. Anschließend folgte eine zweite 30minütige Inkubation bei 4°C, in der der zweite Antikörper auf die bereits gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe andockte. Um ungebundenen Detektionsantikörper aus den Kavitäten zu entfernen, wurde im Anschluss an die Inkubationszeit die Platte erneut zehn Mal gewaschen. Für den folgenden Schritt des Farbumschlages und damit Antigen-Nachweises wurden je 100µl *Chromogen* (3) in die Kavitäten gegeben und die Platte dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es resultierte eine Blaufärbung der Flüssigkeit in den Kavitäten. Um die Reaktion der Substratumwandlung durch das Chromogen zu beenden, wurden im letzten Schritt je 100 µl *Stop Solution* (4) in die Kavitäten gegeben. Infolgedessen folgte der Farbumschlag von Blau auf Gelb und es konnte die Messung der Extinktion mittels Photometer bei 450nm durchgeführt werden. Diese erfolgte im direkten Anschluss innerhalb der ersten Minuten nach Farbumschlag um keine Verfälschung der Werte herbeizuführen. Für den quantitativen Nachweis wurde bei jedem Assay mithilfe des *Standards* (1) eine Serie (acht Kavitäten) mit bekannten Antigenkonzentrationen durchgeführt und so eine Kalibrierungskurve für die optische Extinktion erhalten. Diese diente dann für die Ermittlung der Konzentrationen an Tenascin-C in den Serumproben. Der ELISA wurde stets mit Doppelbestimmungen der Konzentrationen durchgeführt, aus welchen anschließend der Mittelwert errechnet wurde. Der Messbereich des *ELISA-Kits* ist mit 0.38 bis 24ng/ml angegeben.

### 3.2.4 Verlaufsdaten

Die Blutentnahme erfolgte bei allen Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Krankengeschichte, jedoch immer nach der Erstoperation. Die klinischen Verlaufsdaten wurden durch regelmäßigen Kontakt zu den behandelnden Ärzten der teilnehmenden Patienten zusammengetragen. Das Tumorspezifische Überleben wurde für den Zeitraum von der Erstoperation am Primärtumor bis zum Zeitpunkt des Todes bzw. zum Zeitpunkt der letzten Verlaufsuntersuchung ermittelt. Patienten, die an anderen Ursachen als an

ihrer Tumorerkrankung verstarben wurden zum Todeszeitpunkt zensiert.

Das progressionsfreie Überleben wurde für den Zeitraum von der Erstoperation am Primärtumor bis zum Zeitpunkt des Auftretens von Metastase oder Rezidiv ermittelt. GIST-Patienten, die früher als sechs Monate vor ihrer ersten Operation und somit auch mindestens sechs Monate vor Blutentnahme bereits eine Metastase entwickelt hatten, wurden von uns als Metastasen-frei deklariert. Dies war nur bei sechs Patienten der Fall. Bei allen sechs Patienten lagen mindestens zwölf Monate zwischen dem Zeitpunkt der Metastase und der Blutentnahme. Von diesen sechs Patienten entwickelte nur ein Patient im weiteren Verlauf ein Rezidiv.

### **3.2.5 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm *Statistical Package for Social Sciences (SPSS®)* für *Windows (Version 11.5.1, SPSS Inc. Chicago, IL, USA)* verwendet. Für die deskriptive Statistik wurden Median- und Mittelwerte, Standardabweichung, sowie minimale und maximale Werte bestimmt. Für den Vergleich der Daten zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe wurden T-Test sowie die nicht-parametrischen Prüfverfahren Mann-Whitney-U- und Kruskal-Wallis-Test verwendet. Beim Vergleich von Häufigkeiten kam der Fishers-Exakt-Test zum Einsatz. Das Überleben wurde nach der Life-Table-Methode von Kaplan und Meier dargestellt und mit dem Log-rank-Test analysiert. Als statistisch signifikant wurden p-Werte  $<0,05$  in zweiseitigen Tests festgelegt.

## 4. Ergebnisse

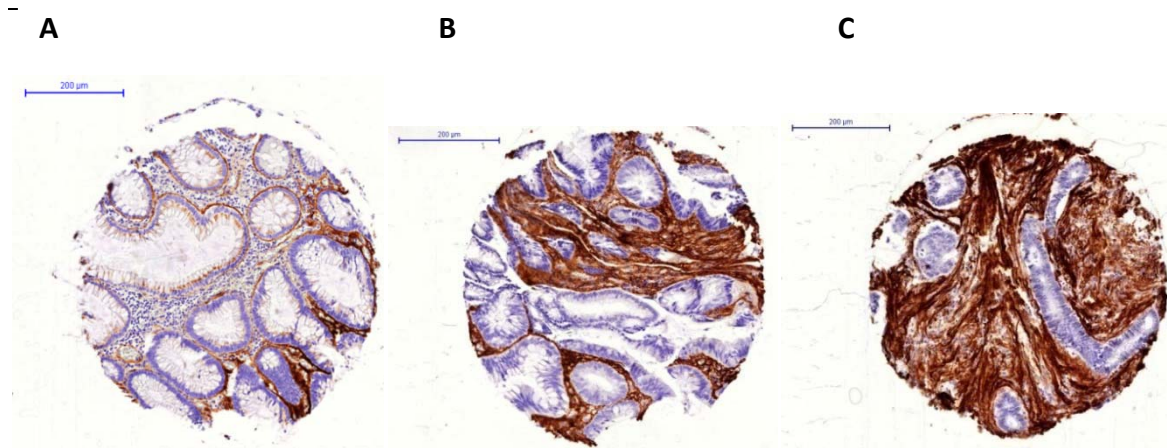
### 4.1 Multitumor Tissue Microarray

Es wurden insgesamt 3978 Gewebeproben aus Primärtumoren von 99 verschiedenen Entitäten und Subtypen im Multitumor Array mit einem Antikörper gegen humanes Tenascin-C angefärbt und ausgewertet. Eine Tenascin-C-Expression (TNC-Expression) konnte im Stroma nahezu aller untersuchter Tumorentitäten (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden. Exemplarisch sollen hier einige interessante Ergebnisse präsentiert werden (Tabelle 2):

**Tabelle 2: TNC-Expression exemplarisch bei einigen der 99 im TMA untersuchten Entitäten (Fett gedruckt sind die Entitäten mit einer stark positiven TNC-Expression in  $\geq 50\%$  der Proben).**

Entität	Anzahl (n)	Negativ (%)	Schwach positiv (%)	Stark positiv (%)
<b>Kolon</b>				
Kolonadenom low grade	39	6 (15)	26 (67)	7 (18)
Kolonadenom high grade	26	5 (19)	14 (54)	7 (27)
Kolonkarzinom	54	1 (2)	12 (22)	<b>41 (76)</b>
<b>Haut</b>				
Benigne Hautnaevi	58	7(12)	33 (57)	18 (31)
Malignes Melanom	13	0 (0)	3 (23)	<b>10 (77)</b>
Merkelzellkarzinom	3	0 (0)	1 (33)	<b>2 (67)</b>
Pilomatrixom	23	1 (4)	8 (35)	<b>14 (64)</b>
Basaliom	33	0 (0)	11 (33)	<b>22 (67)</b>
<b>Lymphome</b>				
Hodgin Lymphom	38	2 (5)	13 (34)	<b>23 (61)</b>
Non-Hodgin Lymphom	9	2 (22)	5 (56)	2 (22)
<b>Neuroendokrine Tumoren</b>				
Karzinoid	33	5 (15)	20 (61)	8 (24)
Phäochromozytom	50	3 (6)	34 (68)	13 (26)
Paragangliom	20	2 (10)	10 (50)	8 (40)
NET des Pankreas	16	2 (13)	11 (69)	3 (19)

Unter den untersuchten Proben waren 39 *low grade* Kolonadenome, 26 *high grade* Kolonadenome sowie 54 Kolonkarzinome. Von den 39 untersuchten *low grade* Adenomen waren 26 (67%) schwach positiv für Tenascin-C und nur 7 (18%) stark positiv. Unter den *high grade* Kolonadenomen waren dagegen 14 (54%) schwach positiv für das Glykoprotein und 7 (27%) stark positiv gefärbt. Von den Kolonkarzinomen waren wiederum gleich 41 (76%) der Gewebespots stark positiv für Tenascin-C, während sich nur 12 (22%) schwach positiv anfärben ließen (siehe Tabelle 2 und Abbildung 7).



**Abbildung 7: TNC-Expression in drei Gewebeproben des Multitumor Arrays A: Kolonadenom, low grade, B: Kolonadenom, high grade, C: Kolonkarzinom**

Von 58 untersuchten benignen Hautnaevi waren 40 (69%) negativ oder nur schwach positiv, während 18 (31%) stark positiv für Tenascin-C waren. Von den untersuchten 13 malignen Melanomen, 3 Merkelzellkarzinomen und 33 Basaliomen der Haut hingegen war keine einzige der Proben negativ für Tenascin-C. 10 (67%) der malignen Melanome waren stark positiv für das Glykoprotein, ebenso wie 2 (67%) der 3 Merkelzellkarzinome und 22 (67%) der Basaliome. Unter den 23 Pilomatrixomen waren nur eine Probe (4%) negativ und 14 Proben (64%) stark positiv (siehe Tabelle 2). Unter den untersuchten Proben befanden sich auch 47 Lymphome, davon 38 Hodgkin- und 9 Non-Hodgkin-Lymphome. Von den Hodgkin-Lymphomen waren 23 (61%) stark positiv für Tenascin-C. Bei den Non-Hodgkin-Lymphomen waren dagegen nur 2 (22%) stark angefärbt (siehe Tabelle 2).

Die Gruppe der neuroendokrinen Tumoren fiel bei der Auswertung durch eine weniger stark ausgeprägte Färbung im Vergleich zu anderen Entitäten auf. Von 33 untersuchten Karzinoiden waren 25 (76%) negativ oder nur schwach positiv für Tenascin-C, während nur 8 (24%) stark positiv ausfielen. Bei den Phäochromozytomen waren von 50 untersuchten Proben nur 13 (26%) stark positiv für Tenascin-C. Von 16 untersuchten neuroendokrinen Tumoren des Pankreas waren nur 3 (19%) der Gewebeproben stark positiv für Tenascin-C (siehe Tabelle 2). Im Gegensatz hierzu fielen die Färbungen bei den Adenokarzinomen des Pankreas deutlich stärker aus (siehe oben).

Neben malignen Tumoren wurden auch einige benigne Entitäten im TMA untersucht. Von 18 untersuchten Leiomyomen waren 17 (94%) stark positiv für Tenascin-C. Keine einzige Probe war negativ. Von 50 untersuchten pleomorphen Adenomen der Speicheldrüse waren 48 (96%) stark positiv für das Glykoprotein. Auch hier war keine einzige Probe negativ. Von 48 untersuchten Neurofibromen waren 19 (40%) stark positiv, 28 (58%) schwach positiv und nur eine Probe (2%) negativ für Tenascin-C. 14 (43%) von 33 untersuchten Schilddrüsenadenomen waren stark positiv für Tenascin-C, 11 (33%) schwach positiv und 8 (24%) negativ (Tabelle 3).

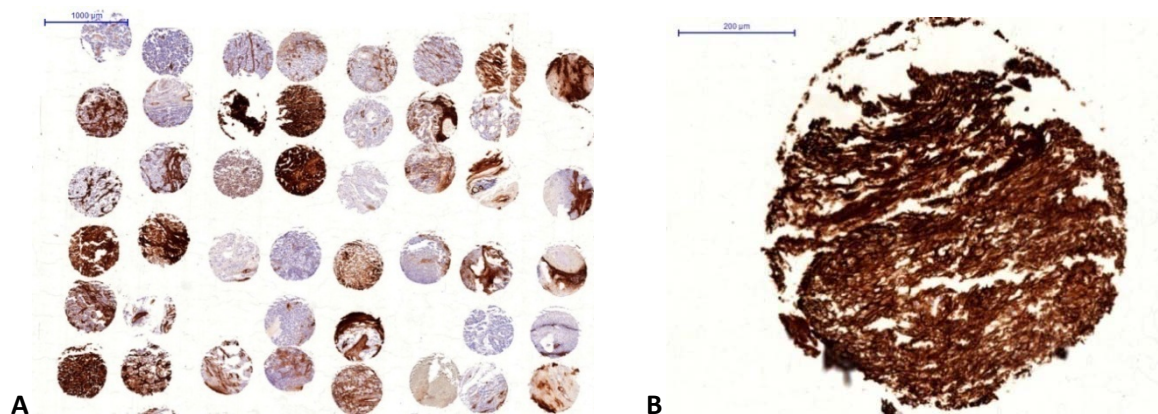
**Tabelle 3: TNC-Expression bei im TMA untersuchten benignen Tumoren (Fett gedruckt sind die Entitäten mit einer stark positiven TNC-Expression in  $\geq 50\%$  der Proben).**

Entität	Anzahl (n)	Negativ (%)	Schwach positiv (%)	Stark positiv (%)
<b>Benigne Tumoren</b>				
Leiomyom	18	0 (0)	1 (6)	<b>17 (94)</b>
Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse	50	0 (0)	2 (4)	<b>48 (96)</b>
Neurofibrom	48	1 (2)	28 (58)	19 (40)
Schilddrüsenadenom	33	8(24)	11(33)	14(43)

Neben den Ergebnissen der Auswertung bei GIST und differentialdiagnostisch relevanten Tumoren soll auch kurz auf das TNC-Expressionsmuster bei Pankreastumoren eingegangen werden.

#### 4.1.1 TNC-Expression bei GIST und differentialdiagnostisch relevanten Tumoren

Unter den untersuchten Gewebeproben waren Proben von 38 GIST, 18 Leiomyomen, 48 Neurofibromen, 26 Leiomyosarkomen sowie 14 Schwannomen. Dabei konnte eine TNC-Expression in allen 5 Entitäten festgestellt werden (siehe Tabelle 4). In 33 (87%) der 38 GIST-Proben konnte eine TNC-Expression nachgewiesen werden, davon wiederum waren 19 (58%) Proben stark positiv für Tenascin-C (siehe Abbildung 8). Nur 5 (13%) der 38 untersuchten GIST-Tumoren waren negativ für Tenascin-C.



**Abbildung 8: TNC-Expression im Multitumor Array: A zeigt einen Ausschnitt aus einem TMA-Schnitt. B zeigt eine stark positiv für Tenascin-C angefärbte Gewebeprobe eines GIST.**

Auch die Gewebeproben der als differentialdiagnostisch relevant geltenden malignen Entitäten zeigten eine hohe TNC-Expression: So waren 23 (88%) der 26 untersuchten Leiomyosarkome sowie 12 (86%) der 14 Gewebeproben von malignen Schwannomen stark positiv für Tenascin-C. Ähnliche Expressionsmuster konnten auch bei den benignen differentialdiagnostisch zu erwägenden Tumoren gefunden werden. 17 (94%) der untersuchten Leiomyome zeigten eine starke TNC-Expression, keine der 18



Gewebeproben war hingegen negativ für Tenascin-C. Bei den 48 gegen Tenascin-C angefärbten Neurofibrome waren insgesamt 47 (98%) positiv für Tenascin-C, allerdings waren von diesen 48 Proben 28 (58%) nur schwach positiv (Tabelle 4).

**Tabelle 4: TNC-Expression bei GIST und differentialdiagnostisch relevanten Tumoren (Fett gedruckt sind die Entitäten mit einer stark positiven TNC-Expression in  $\geq 50\%$  der Proben).**

Entität	Anzahl (n)	Negativ (%)	Schwach positiv (%)	Stark positiv (%)
<b>GIST</b>	38	5 (13)	14 (37)	<b>19 (50)</b>
<b>Leiomyosarkome</b>	26	1 (4)	2 (8)	<b>23 (88)</b>
<b>Schwannome</b>	14	1 (7)	1 (7)	<b>12 (86)</b>
<b>Leiomyome</b>	18	0 (0)	1 (6)	<b>17 (94)</b>
<b>Neurofibrome</b>	48	1 (2)	28 (58)	19 (40)

#### 4.1.2. TNC-Expression bei Tumoren des Pankreas

Es wurden insgesamt 90 Gewebeproben von Tumoren des Pankreas im Multitumor Array untersucht, darunter 40 duktale Pankreasadenokarzinome, 25 papilläre Pankreasadenokarzinome sowie 16 neuroendokrine Pankreastumoren. Es ließen sich deutliche Unterschiede in der TNC-Expression zwischen den Adenokarzinomen und den neuroendokrinen Pankreastumoren feststellen: So waren bei den dukталen Adenokarzinomen 38 (78%) und bei den papillären Adenokarzinomen 20 (80%) Gewebeproben stark positiv für Tenascin-C, während bei den neuroendokrinen Pankreastumoren nur 3 (19%) Gewebeproben eine starke TNC-Expression aufwiesen (Tabelle 5).

**Tabelle 5: TNC-Expression bei Pankreasadenokarzinomen und neuroendokrinen Tumoren des Pankreas (Fett gedruckt sind die Entitäten mit einer stark positiven TNC-Expression in  $\geq 50\%$  der Proben).**

Entität	Anzahl (n)	Negativ (%)	Schwach positiv (%)	Stark positiv (%)
<b>Duktale Pankreasadenokarzinome</b>	49	0 (0)	11 (22)	<b>38 (78)</b>
<b>Papilläre Pankreasadenokarzinome</b>	25	0 (0)	5 (20)	<b>20 (80)</b>
<b>Neuroendokrine Pankreastumoren</b>	16	2 (13)	11 (69)	3 (19)

#### 4.2 ELISA bei GIST

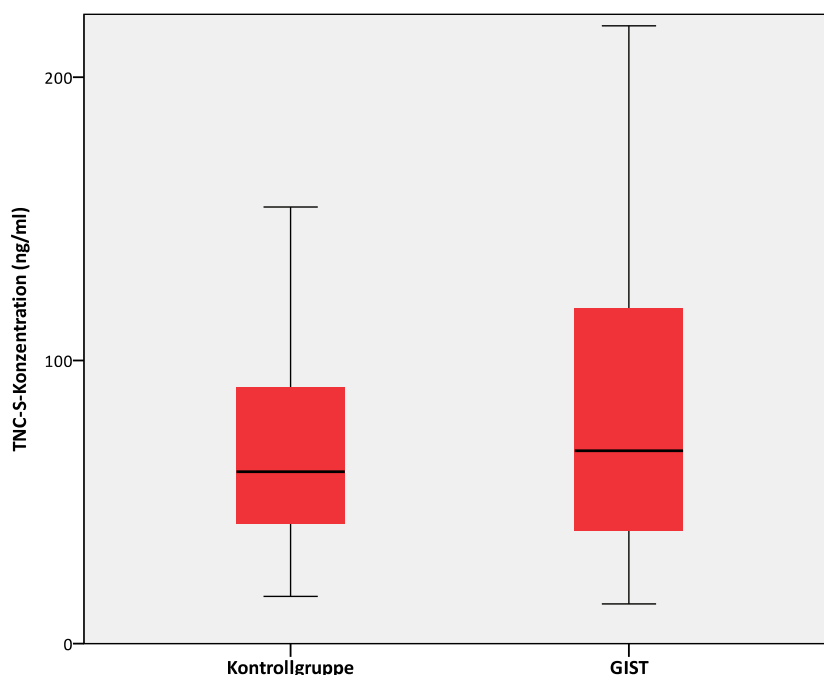
Mittels ELISA wurden die Tenascin-C-Serumkonzentrationen (TNC-S-Konzentrationen) von 94 GIST-Patienten und 154 gesunden Kontrollpersonen untersucht. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Messungen sowie deren statistische Auswertung vorgestellt werden.

#### 4.2.1 TNC-S-Konzentration bei GIST und Kontrollgruppe

Die TNC-S-Konzentration der GIST-Patienten war im Mittel ( $\pm$ Standardabweichung (SD)) mit 103 ( $\pm$ 109) ng/ml signifikant höher als die der Kontrollgruppe mit 72 ( $\pm$ 42) ng/ml ( $p$ -Wert=0,011; T-Test). Die mediane (25ste und 75ste Perzentile) TNC-S-Konzentration der Patienten mit GIST betrug 68 (40 und 120) ng/ml, während die mediane TNC-S-Konzentration der Kontrollgruppe bei 61 (42 und 92) ng/ml lag. Es konnte jedoch keine statistische Signifikanz ermittelt werden ( $p$ -Wert=0,199; Mann-Whitney-U-Test) (Tabelle 6, Abbildung 9).

**Tabelle 6: TNC-S-Konzentration bei GIST und Kontrollgruppe. Der  $p$ -Wert wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt**

	Anzahl	Mediane TNC-S-Konzentration (25ste und 75ste Perzentile) (ng/ml)	Mittlere TNC-S-Konzentration $\pm$ SD (ng/ml)	$p$ -Wert
<b>GIST</b>	94	68 (40 und 120)	103 $\pm$ 109	
<b>Kontrollgruppe</b>	154	61 (42 und 92)	72 $\pm$ 42	0,199



**Abbildung 9: Balkendiagramm-Analyse zur Darstellung der medianen TNC-S-Konzentration im Serum von Kontrollgruppe (n=154) und GIST-Patienten (n=94).  $p$ =0,199. Der Unter- bzw. Oberrand der schwarzen Balken zeigt jeweils die 25ste bzw. 75ste Perzentile an. Die mediane Serumkonzentration wird durch die schwarze Linie dargestellt. Der  $p$ -Wert wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt.**

#### 4.2.2 TNC-S-Konzentration und Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten

Tabelle 7 gibt Auskunft über Patientencharakteristika und klinisch-pathologische Daten

der 94 GIST-Patienten, deren Seren auf Tenascin-C untersucht wurden. Es wurden folgende Charakteristika mit der TNC-S-Konzentration korreliert: Alter, Geschlecht, Resektionsausmaß, die Risikofaktoren Tumorgröße, Mitoserate und Tumorlokalisation, das Auftreten von Metastase und Rezidiv sowie die Therapie mit Imatinib.

**Tabelle 7: Korrelation der medianen und mittleren TNC-S-Konzentration bei GIST mit klinisch-pathologischen Daten. Es sind jeweils die medianen (25ste und 75ste Perzentile) sowie die mittleren ( $\pm$  SD) TNC-S-Konzentrationen angegeben. Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U- und Kruskal-Wallis-Test bestimmt. (Die Patientenzahlen in den einzelnen Untergruppen ergeben insgesamt in einigen Fällen nicht die komplette Anzahl der GIST-Patienten (n=94), da die Daten zum Teil nicht komplett an das UKE gesendet wurden.)**

<b>Merkmal</b>	<b>Anzahl (%)</b>	<b>Mediane TNC-S-Konzentration (25ste und 75ste Perzentile) (ng/ml)</b>	<b>Mittlere TNC-S-Konzentration <math>\pm</math> SD (ng/ml)</b>	<b>p-Wert</b>
Mittleres Alter; Jahre $\pm$ SD	69 $\pm$ 12			
<b>Geschlecht</b>				
Männlich	49 (52)	79 (51 und 156)	127 $\pm$ 133	
Weiblich	45 (48)	53 (34 und 97)	76 $\pm$ 67	0,013
<b>Tumorgröße (cm)</b>				
<2	8 (11)	92 (47 und 116)	91 $\pm$ 48	
2-5	20 (29)	59 (35 und 121)	100 $\pm$ 110	
5-10	21(30)	46 (34 und 70)	69 $\pm$ 37	
>10	21(30)	83 (36 und 156)	128 $\pm$ 154	0,173
<b>Mitoserate (pro 50 HPF)</b>				
<5	26 (48)	58 (35 und 118)	94 $\pm$ 100	
5-10	8 (15)	61 (33 und 170)	93 $\pm$ 74	
>10	20 (37)	81 (47 und 142)	120 $\pm$ 154	0,615
<b>Tumorlokalisation</b>				
Magen	52 (67)	64 (42 und 125)	105 $\pm$ 121	
Dünndarm	21 (27)	52 (34 und 99)	70 $\pm$ 48	
Andere	5 (6)	89 (53 und 292)	156 $\pm$ 127	0,205
<b>Resektionsrand</b>				
R0	51 (76)	53 (37 und 107)	86 $\pm$ 82	
R1/2	16 (24)	81 (55 und 126)	135 $\pm$ 174	0,186
<b>Metastase und/ oder Rezidiv</b>				
Nein	37 (47)	52 (34 und 92)	71 $\pm$ 58	
Ja	42 (53)	79 (44 und 160)	120 $\pm$ 126	0,020

#### 4.2.2.1 Alter und Geschlecht

Das mediane Alter (25ste und 75ste Perzentile) der GIST-Patienten betrug 61 (53 und 68) Jahre, das der Kontrollgruppe 47 (40 und 56) Jahre. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der TNC-S-Konzentration und dem Alter der Patienten ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). 49 der 94 (52%) GIST-Patienten waren männlich und 45

(48%) weiblich. In der Kontrollgruppe waren 103 (67%) der untersuchten Personen männlich und 51 (33%) weiblich. Die mediane (25ste und 75ste Perzentile) TNC-S-Konzentration der männlichen GIST-Patienten war mit 79 (51 und 156) ng/ml signifikant höher als die der GIST-Patientinnen mit 53 (34 und 97) ng/ml (p-Wert=0,013; Mann-Whitney-U-Test) (siehe Tabelle 7).

#### 4.2.2.2 Risikofaktoren

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Korrelation der TNC-S-Konzentration mit den als prognostische Parameter für die Malignitätseinschätzung eines GIST geltenden Risikofaktoren (Tumorgröße, Mitoserate, Primärtumorlokalisation) vorgestellt. Mediane und mittlere Serumkonzentrationen, sowie p-Werte sind Tabelle 7 zu entnehmen. Tumorgröße: Für die Korrelation der TNC-S-Konzentration mit der Tumorgröße wurde diese gemäß der Risikoklassifizierung nach Fletcher in 4 Gruppen eingeteilt: Dabei hatten 8 (11%) Patienten eine Tumorgröße von unter 2 cm, 20 (29%) Patienten eine Tumorgröße von 2-5 cm und jeweils 21 (30%) Patienten eine Tumorgröße von 5-10 cm bzw. über 10 cm. Beim Vergleich der medianen und mittleren TNC-S-Konzentrationen (siehe Tabelle 7) zwischen den 4 Gruppen ließ sich keine signifikante Korrelation zur Tumorgröße feststellen (p-Wert=0,173; Kruskal-Wallis-Test). Bei der Zusammenlegung der 4 Gruppen in 2 Gruppen (Tumorgröße <10 und ≥10 cm) wird hingegen eine klare Tendenz deutlich: So lag die mediane TNC-S-Konzentration (25ste und 75ste Perzentile) in der Gruppe mit einer Tumorgröße unter 10 cm bei 53 (37 und 106) ng/ml, während das Serumlevel in der Gruppe mit einer Tumorgröße von 10 oder mehr cm 83 (36 und 156) ng/ml betrug. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch weder beim Vergleich der Mediane (p-Wert=0,160; Mann-Whitney-U-Test) noch beim Vergleich der Mittelwerte (p-Wert=0,094; T-Test) nachgewiesen werden (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Korrelation der medianen und mittleren TNC-S-Konzentration bei GIST mit der Tumorgröße. Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U- bzw. T-Test bestimmt.**

Tumorgröße (cm)	Anzahl (%)	Mediane TNC-S-Konzentration (25ste und 75ste Perzentile) (ng/ml)	p-Wert	Mittlere TNC-S-Konzentration ± SD (ng/ml)	p-Wert
<10	49 (70)	53 (37 and 106)		81± 78	
>10	21(30)	83 (36 and 156)	0,160	128±154	0,094

Mitoserate: Für die Korrelation der TNC-S-Konzentration mit der Mitoserate pro 50 HPF wurde diese gemäß der Risikoklassifizierung nach Fletcher in 3 Gruppen eingeteilt: Dabei hatten 26 Patienten (48%) eine Mitoserate von unter 5 pro 50 HPF, 8 (15%) Patienten

eine Mitoserate von 5-10 pro 50 HPF sowie 20 (37%) Patienten eine Mitoserate von mehr als 10 pro 50 HPF. Beim Vergleich der medianen und mittleren TNC-S-Konzentrationen zwischen den 3 Gruppen ließ sich keine signifikante Korrelation zur Tumorgroße feststellen (p-Wert=0,615; Kruskal-Wallis-Test) (siehe Tabelle 7). Die mediane TNC-S-Serumkonzentration (25ste und 75ste Perzentile) war in der Gruppe mit der Mitoserate von unter < 5 pro 50 HPF jedoch mit einem Wert von 53 (35 und 118) ng/ml am niedrigsten, gefolgt von dem medianen Serumlevel der Gruppe mit einer Mitoserate von 5-10 pro 50 HPF, welches 61 (33 und 170) ng/ml betrug. Die Gruppe mit der höchsten Mitoserate wies mit 81 (47 und 142) ng/ml auch die höchste mediane TNC-S-Konzentration auf. Bei der Zusammenlegung der 3 Gruppen in nur noch 2 Gruppen (Mitoserate <10 pro 50 HPF und >10 pro 50 HPF wird diese Tendenz noch deutlicher (siehe Tabelle 7). So lag die mediane TNC-S-Konzentration (25ste und 75ste Perzentile) in der Gruppe mit einer Mitoserate unter 10 pro 50 HPF bei 59 (35 und 127) ng/ml, während das Serumlevel in der Gruppe mit einer Mitoserate von über 10 pro 50 HPF 81 (47 und 142) ng/ml betrug. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch weder beim Vergleich der Mediane (p-Wert=0,350; Mann-Whitney-U-Test) noch beim Vergleich der Mittelwerte (p-Wert=0,439; T-Test) festgestellt werden (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Korrelation der medianen und mittleren TNC-S-Konzentration bei GIST mit der Mitoserate. Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U- bzw. T-Test bestimmt.**

Mitoserate pro 50 HPF	Anzahl (%)	Mediane TNC-S-Konzentration (25ste und 75ste Perzentile) (ng/ml)	p-Wert	Mittlere TNC-S-Konzentration ± SD (ng/ml)	p-Wert
<10	34 (63)	59 (35 and 127)		94± 94	
>10	20 (37)	81 (47 and 142)	0,350	120±154	0,439

Tumorlokalisation: 52 (67%) der GIST-Primärtumoren waren im Magen lokalisiert, 21 (27%) im Dünndarm. Weitere Primärmanifestationen des GIST waren Kolon, Rektum und Ösophagus (n=5, 6%). Die mediane TNC-S-Konzentration für GIST-Primärtumoren im Magen betrug 64 (42 und 125) ng/ml, diese für GIST im Dünndarm 52 (34 und 99) ng/ml, während das mediane Serumlevel für alle anderen Primärtumoren (Kolon, Rektum, Ösophagus) bei 89 (53 and 292) ng/ml lag. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Primärmanifestation des GIST und der TNC-S-Konzentration ausgemacht werden (p-Wert=0,205; Kruskal-Wallis-Test) (siehe Tabelle 7).

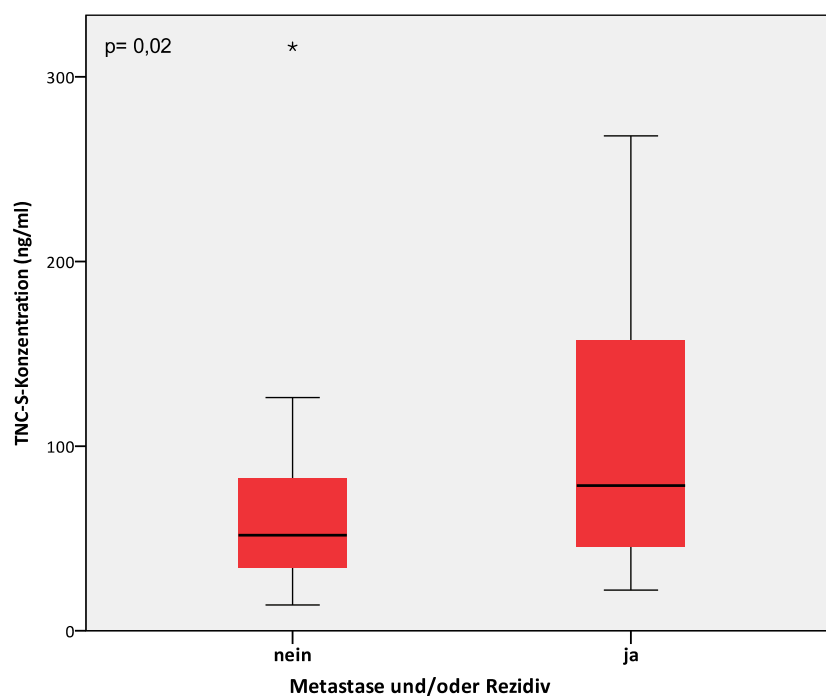
#### 4.2.2.3 Resektionsausmaß

51 (76%) GIST-Patienten wurden R0-reseziert, bei 16 (24%) Patienten fand eine R1- bzw.

R2-Resektion statt. Patienten, die R0-reseziert wurden, hatten niedrigere TNC-S-Konzentrationen als die Gruppe der R1/R2-resezierten (siehe Tabelle 7). So betrug die mediane TNC-S-Konzentration (25ste und 75ste Perzentile) in der Gruppe der R0-resezierten 53 (37 und 107) ng/ml, während die Gruppe der Patienten mit R1- oder R2-Resektion eine mediane TNC-S-Konzentrationen von 81 (55 und 126) ng/ml aufwies. Eine statistische Signifikanz konnte nicht ermittelt werden ( $p$ -Wert=0,186; Mann-Whitney-U-Test).

#### 4.2.2.4 Metastase und Rezidiv

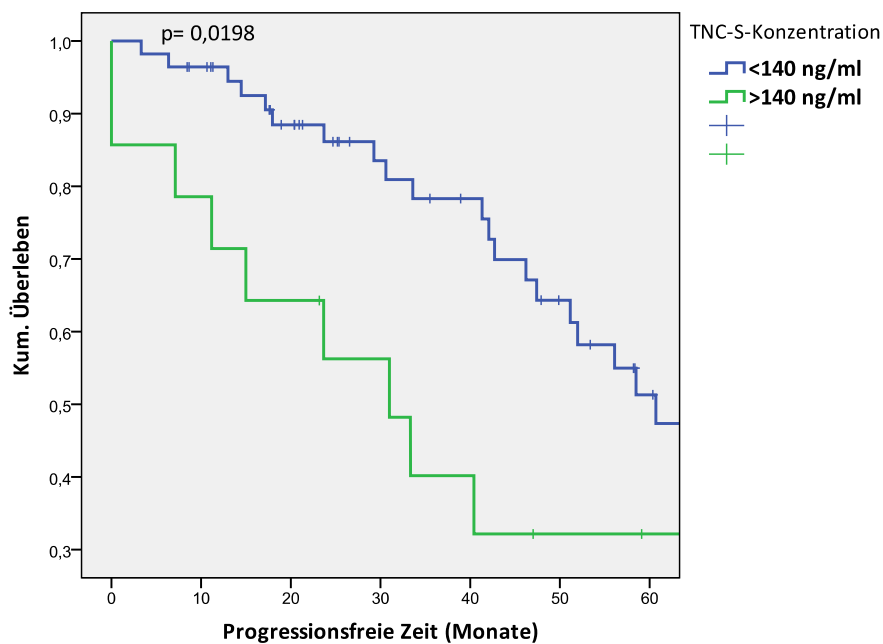
42 der 94 GIST-Patienten (53%) entwickelten im Krankheitsverlauf Metastasen oder hatten ein Rezidiv, 37 (47%) Patienten blieben hingegen metastasen- und rezidivfrei. Patienten, die eine Metastase und/oder ein Rezidiv entwickelten, hatten signifikant höhere TNC-S-Konzentrationen als diese mit metastasen- und rezidivfreiem Krankheitsverlauf: So betrug die mediane TNC-S-Konzentration (25ste und 75ste Perzentile) in der Gruppe ohne Metastase und Rezidiv nur 52 (34 und 92) ng/ml, während die Patienten mit Metastase und/oder Rezidiv mediane TNC-S-Konzentrationen von 79 (44 und 160) ng/ml aufwiesen ( $p$ -Wert=0,020; Mann-Whitney-U-Test) (siehe Tabelle 7 und Abbildung 13).



**Abbildung 10:** Balkendiagramm-Analyse zur Darstellung der medianen Tenascin-C-Konzentration im Serum von Patienten ohne Metastase und Rezidiv (n=37) und Patienten mit Metastase und/oder Rezidiv (n=42).  $p=0,020$ . Der Unter- bzw. Oberrand der schwarzen Balken zeigt jeweils die 25ste bzw. 75ste Perzentile an. Die mediane Serumkonzentration wird durch die schwarze Linie dargestellt. Der  $p$ -Wert wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt.

### 4.2.3 Progressionsfreies Überleben

Die mittlere Nachverfolgungszeit der 94 GIST-Patienten 50 Monate (8-273 Monate). Da in der Nachverfolgungszeit nur ein Patient tumorbedingt verstarb, konnte keine Analyse für das Gesamtüberleben berechnet werden. Es wurde das metastasen- und rezidivfreie (progressionsfreie) Überleben für den Zeitraum von 5 Jahren berechnet. Zur statistischen Analyse des progressionsfreien Überlebens wurden die Patienten gemäß ihrer TNC-S-Konzentration in zwei Gruppen eingeteilt (TNC-S-Konzentration <140 ng/ml und TNC-S-Konzentration >140 ng/ml) und in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier dargestellt (siehe Abbildung 13). Die p-Werte wurden mittels Log-rank-Test bestimmt. Dabei zeigten die Patienten mit TNC-S-Konzentrationen über 140 ng/ml ein signifikant kürzeres progressionsfreies 5-Jahres-Überleben im Vergleich zur Patientengruppe mit Serumleveln unter 140 ng/ml ( $p=0,0198$ ; log-rank-Test).



**Abbildung 11:** Kaplan-Meier-Funktion für das progressionsfreie 5-Jahres-Überleben bei Patienten mit TNC-S-Konzentrationen unter und über 140 ng/ml.  $p$ -Wert=0,0198. Die statistische Signifikanz wurde mit dem log-rank-Test berechnet.

Die Patientengruppe mit TNC-S-Konzentrationen unter 140 ng/ml zeigte für die Nachverfolgungszeit von 5 Jahren eine mittlere progressionsfreie Lebenszeit von 49 Monaten [95%CI: 44; 53], wohingegen die Patienten mit Serumleveln über 140 ng/ml im Mittel nur 32 Monate [95%CI: 20; 44] ohne die Entwicklung einer Metastase oder eines Rezidivs weiterlebten. Nach 5 Jahren zeigten 64% der Patienten mit einer TNC-S-Konzentration von über 140 ng/ml eine Metastase oder ein Rezidiv, während in der Gruppe mit den Serumkonzentrationen unter 140 ng/ml lediglich 34% eine Metastase oder ein Rezidiv entwickelten. Von den 16 R1/2-resezierten Patienten entwickelten 10

(63%) eine Metastase und/oder ein Rezidiv. Dagegen zeigten von den 51 R0-resezierten Patienten lediglich 22 (43%) eine Metastase und/oder ein Rezidiv im Verlauf ihrer Erkrankung. Bei der Analyse des progressionsfreie 5-Jahres-Überlebens für ausschließlich R0-resezierte Patienten zeigten diese mit TNC-S-Konzentrationen über 140 ng/ml ein signifikant kürzeres progressionsfreies 5-Jahres-Überleben im Vergleich zu den R0-resezierten Patienten mit Serumleveln unter 140 ng/ml ( $p=0,0337$ ; log-rank-Test). Die mittlere progressionsfreie Überlebenszeit für R0-resezierte mit einer TNC-S-Konzentration unter 140 ng/ml betrug 48 Monate [95%CI: 43; 54], während die Patienten mit TNC-S-Konzentrationen über 140 ng/ml im Mittel nur 26 Monate [95%CI: 7; 46] ohne die Entwicklung einer Metastase oder eines Rezidivs überlebten. Nach 5 Jahren zeigten 75% der R0-resezierten Patienten mit einer TNC-S-Konzentration von über 140 ng/ml eine Metastase oder ein Rezidiv, während in der Gruppe mit den Serumleveln unter 140 ng/ml lediglich 38% eine Metastase oder ein Rezidiv entwickelten.

#### 4.2.4 TNC-S-Konzentration und Imatinib-Therapie

41 (55%) der in diese Studie eingeschlossenen GIST-Patienten erhielten eine medikamentöse Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib. Nach einer mittleren Nachverfolgungszeit von 36 Monaten (3-83 Monate) nach der ersten Imatinib-Gabe zeigten die Patienten, die Imatinib erhielten verminderte TNC-S-Konzentrationen im Vergleich zu den Patienten ohne Imatinib-Therapie. Die medianen TNC-S-Konzentrationen (25. und 75. Perzentile) bei Patienten mit Imatinib-Therapie betrug 59 (35 und 86) ng/ml, während die Patienten ohne diese medikamentöse Therapie ein medianes Serumlevel von 68 (45 und 135) ng/ml aufwiesen. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht ermittelt werden ( $p$ -Wert=0,084; Mann-Whitney-U-Test) (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Korrelation der medianen und mittleren TNC-S-Konzentration bei GIST mit der Imatinib-Therapie. Der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt.**

Imatinib-Therapie	Anzahl (%)	Mediane TNC-S-Konzentration (25ste und 75ste Perzentile) (ng/ml)	Mittlere TNC-S-Konzentration $\pm$ SD (ng/ml)	p-Wert
Nicht erhalten	33 (45)	68 (45 und 135)	102 $\pm$ 78	
Erhalten	41 (55)	59 (35 und 86)	75 $\pm$ 63	0,084

#### 4.3 ELISA bei Pankreastumoren

Aufgrund der interessanten Ergebnisse im Multitumor Array wurden zusätzlich die Seren



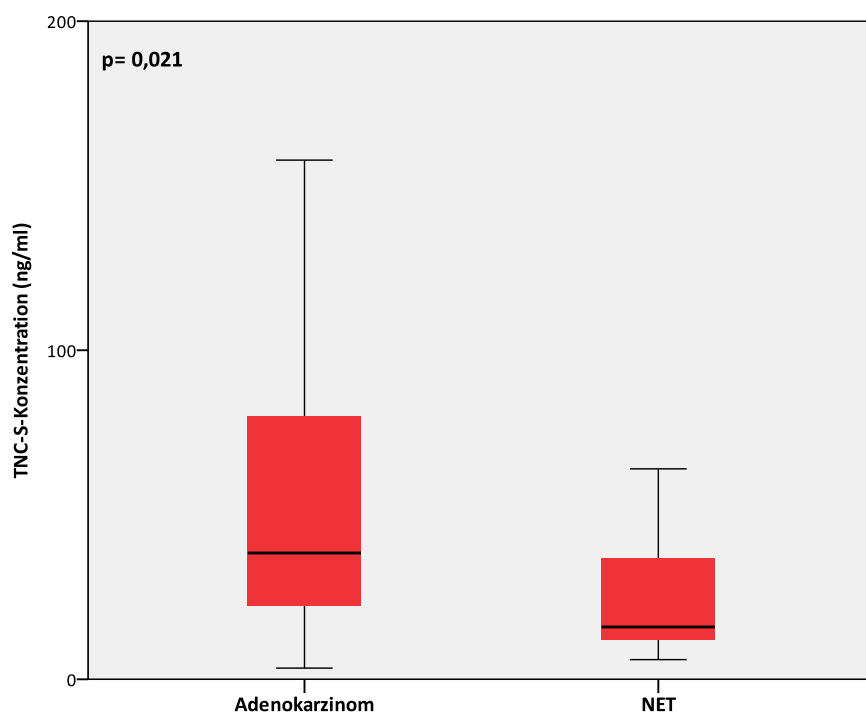
von 68 Patienten mit Tumoren des Pankreas mittels ELISA auf Tenascin-C untersucht, darunter 55 Adenokarzinome sowie 11 neuroendokrine Tumoren (NET) des Pankreas.

#### 4.3.1 TNC-S-Konzentration bei Adenokarzinomen und NET des Pankreas

Bei 55 (83%) der Pankreastumoren handelte es sich um Adenokarzinome, 11 (17%) Tumoren waren neuroendokrine Tumoren (NET) des Pankreas. Patienten mit NET hatten signifikant niedrigere TNC-S-Konzentrationen im Vergleich zur Patientengruppe mit Adenokarzinomen: So betrug die mediane TNC-S-Konzentration (25ste und 75ste Perzentile) in der Gruppe mit NET nur 15 (8 und 41) ng/ml, während die Patienten mit einem Adenokarzinom mediane TNC-S-Konzentrationen von 38 (22 und 85) ng/ml aufwiesen ( $p$ -Wert=0,021; Mann-Whitney-U-Test) (siehe Tabelle 11 und Abbildung 12).

**Tabelle 11: TNC-S-Konzentration bei Patienten mit Pankreasadenokarzinomen und neuroendokrinen Tumoren des Pankreas. Der  $p$ -Wert wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt.**

	Anzahl (%)	Mediane TNC-S-Konzentration (25ste und 75ste Perzentile) (ng/ml)	Mittlere TNC-S-Konzentration $\pm$ SD (ng/ml)	$p$ -Wert
<b>Adenokarzinome</b>	55 (83)	38 (22 und 85)	70 $\pm$ 86	
<b>NET</b>	11 (17)	15 (8 und 41)	27 $\pm$ 27	0,021



**Abbildung 12: Balkendiagramm-Analyse zur Darstellung der medianen Tenascin-C-Konzentration im Serum von Patienten mit Pankreasadenokarzinom (n=55) und NET (n=11).  $p = 0,021$ . Der Unter- bzw. Oberrand der schwarzen Balken zeigt jeweils die 25ste bzw. 75ste Perzentile an. Die mediane Serumkonzentration wird durch die schwarze Linie dargestellt. Der  $p$ -Wert wurde mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt.**

### 4.3.2 TNC-S-Konzentration und Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten

Tabelle 12 gibt Auskunft über Patientencharakteristika und klinisch-pathologische Daten der 68 Pankreastumorpatienten, deren Seren auf Tenascin-C untersucht wurden. Es wurden folgende Charakteristika mit der TNC-S-Konzentration korreliert: Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation, Resektionsausmaß, das Auftreten von Metastase und Rezidiv, Kurzzeit- bzw. Langzeitüberleben sowie tumorbedingter Tod. Die Resultate der Korrelation sind ebenfalls der Tabelle 12 zu entnehmen. Im Folgenden soll nur auf einige der Ergebnisse näher eingegangen werden.

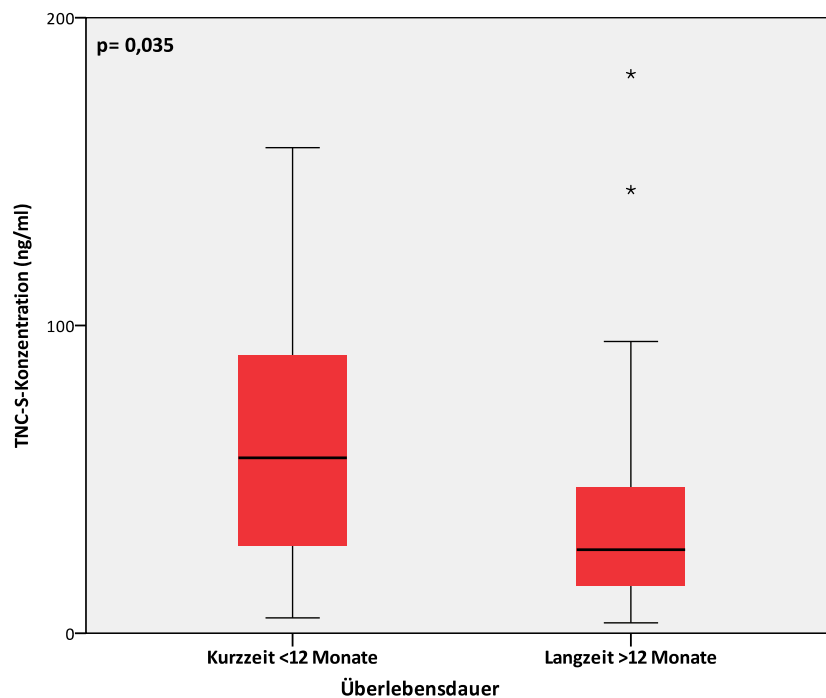
**Tabelle 12: Korrelation der medianen und mittleren TNC-S-Konzentration bei Pankreastumoren mit klinisch-pathologischen Daten. Es sind jeweils die medianen (25ste und 75ste Perzentile) sowie die mittleren ( $\pm$  SD) TNC-S-Konzentrationen angegeben. Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U- und Kruskal-Wallis-Test bestimmt. (Die Patientenanzahlen in den einzelnen Untergruppen ergeben insgesamt in einigen Fällen nicht die komplette Anzahl der Pankreastumorpatienten (n=68), da die Daten zum Teil unvollständig waren.)**

<b>Merkmal</b>	<b>Anzahl (%)</b>	<b>Mediane TNC-S-Konzentration (25ste und 75ste Perzentile) (ng/ml)</b>	<b>Mittlere TNC-S-Konzentration <math>\pm</math> SD (ng/ml)</b>	<b>p-Wert</b>
Mittleres Alter; Jahre $\pm$ SD	65 $\pm$ 11			
<b>Geschlecht</b>				
Männlich	38 (56)	38 (33 und 91)	70 $\pm$ 83	
Weiblich	30 (44)	33 (13 und 48)	54 $\pm$ 79	0,143
<b>Tumorlokalisation</b>				
Kopf/ Papille	37 (76)	33 (16 und 44)	41 $\pm$ 55	
Corpus/ Cauda	12 (24)	64 (19 und 155)	115 $\pm$ 133	0,123
<b>Resektionsausmaß</b>				
R0	52 (81)	34 (14 und 64)	66 $\pm$ 90	
R1	12 (19)	44 (31 und 80)	59 $\pm$ 42	0,326
<b>Metastase und/oder Rezidiv</b>				
Nein	8 (21)	21 (11 und 39)	25 $\pm$ 16	
Ja	31 (79)	42 (20 und 97)	68 $\pm$ 78	0,132
<b>Überleben</b>				
Langzeit(>12 Monate)	43 (63)	32 (15 und 52)	43 $\pm$ 41	
Kurzzeit (<12 Monate)	25 (37)	50 (26 und 94)	98 $\pm$ 115	0,035
<b>Tod</b>				
Kein Tod	15 (48)	19 (13 und 34)	26 $\pm$ 17	
Tod durch Tumor	16 (52)	44 (25 und 131)	87 $\pm$ 95	0,019

#### 4.3.2.1 Kurzzeit-/ Langzeitüberleben

Die mediane Überlebenszeit (25ste und 75ste Perzentile) aller Pankreastumorpatienten betrug 31 (7 und 40) Monate. Um Aussage über einen möglichen Zusammenhang zwischen TNC-S-Konzentration und der Prognose für die betroffenen Tumorpatienten zu machen, wurde diese gemäß ihrer Überlebenszeit in Monaten in zwei Gruppen

(Kurzzeitüberlebende < 12 Monate und Langzeitüberlebende >12 Monate) eingeteilt und mit der Höhe ihrer Serumlevel korreliert. Dabei hatten 25 (37%) der 68 Patienten eine Überlebenszeit unter 12 Monaten und 43 (63%) eine Überlebensdauer von mehr als 12 Monaten. Es konnte gezeigt werden, dass die Patientengruppe der Kurzzeitüberlebenden (<12 Monate) mit einer medianen TNC-S-Konzentration von 50 (26 und 94) ng/ml signifikant höhere Serumlevel aufwies als die Gruppe der Langzeitüberlebenden (>12 Monate) mit medianen Konzentrationen von 32 (15 und 52) ng/ml (p-Wert=0,035; Mann-Whitney-U-Test) (siehe Tabelle 12 und Abbildung 13).

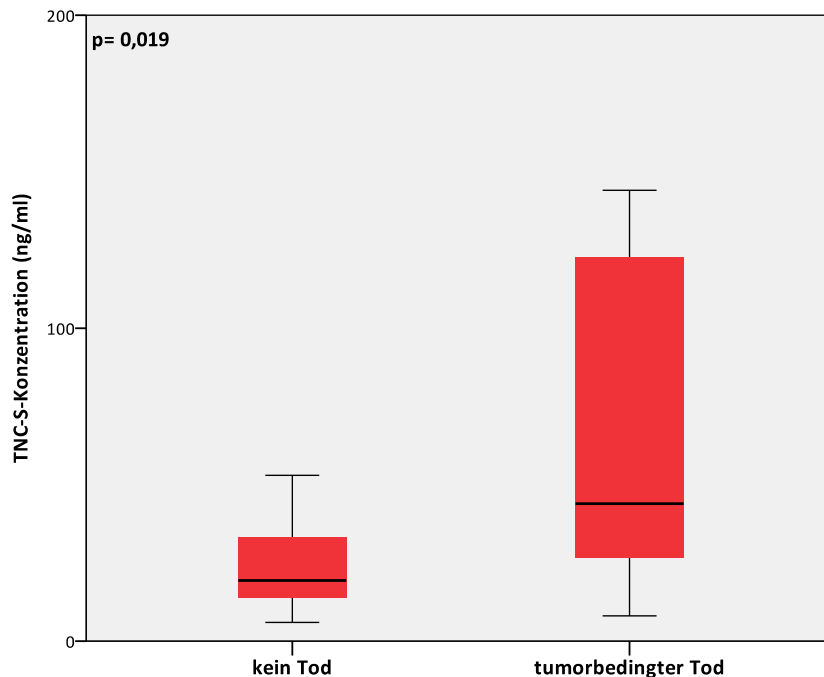


**Abbildung 13:** Balkendiagramm-Analyse zur Darstellung der medianen Tenascin-C-Konzentration im Serum von Kurzzeit- (n=25) und Langzeitüberlebenden (n=43). p=0,035. Der Unter- bzw. Oberrand der schwarzen Balken zeigt jeweils die 25ste bzw. 75ste Perzentile an. Die mediane Serumkonzentration wird durch die schwarze Linie dargestellt. Der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt.

#### 4.3.2.2 Tumorbedingter Tod

Während der Nachverfolgungszeit verstarben 16 (52%) Patienten tumorbedingt, wohingegen 15 (48%) Patienten die komplette Nachverfolgungszeit überlebten. Die restlichen 37 Patienten verstarben aus unbekannter Ursache oder nicht-tumorbedingt und wurden in der folgenden Korrelation nicht weiter berücksichtigt: Patienten, die in der Nachverfolgungszeit tumorbedingt verstarben, hatten signifikant höhere TNC-S-Konzentrationen als die Patienten, die die Nachverfolgungszeit überlebten (p-Wert=0,019; Mann-Whitney-U-Test). So betrug die mediane TNC-S-Konzentration (25ste und 75ste Perzentile) der tumorbedingt Verstorbenen 44 (25 und 131) ng/ml, während das

Serumlevel der Überlebenden im Median bei 19 (13 und 34) ng/ml lag (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Balkendiagramm-Analyse zur Darstellung der medianen Tenascin-C-Konzentration im Serum von Patienten, die während der Nachverfolgungszeit tumorbedingt verstarben (n=16) und derer, die die Nachverfolgungszeit überlebten (n=15). p=0,019. Der Unter- bzw. Oberrand der schwarzen Balken zeigt jeweils die 25ste bzw. 75ste Perzentile an. Die mediane Serumkonzentration wird durch die schwarze Linie dargestellt. Der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt.

#### 4.3.3 5-Jahres-Überleben

Zur statistischen Analyse des 5-Jahres-Überlebens wurden die Patienten gemäß ihrer TNC-S-Konzentration in zwei gleichgroße Gruppen (n jeweils=34) eingeteilt (TNC-S-Konzentration <35 ng/ml und TNC-S-Konzentration >35 ng/ml) und in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier dargestellt (siehe Abbildung 15). Die p-Werte wurden mittels Log-rank-Test bestimmt. Dabei zeigten die Patienten mit TNC-S-Konzentrationen über 35 ng/ml ein signifikant kürzeres 5-Jahres-Überleben im Vergleich zur Patientengruppe mit Serumleveln unter 35 ng/ml (p-Wert=0,0326; log-rank-Test).

Die Patientengruppe mit TNC-S-Konzentrationen unter 35 ng/ml zeigte für die Nachverfolgungszeit von 5 Jahren eine mittlere Überlebenszeit von 33 Monaten [95%CI: 26; 41], wohingegen die Patienten mit Serumleveln über 35 ng/ml im Mittel nur 22 Monate [95%CI: 15; 29] überlebten. Nach 5 Jahren waren 32% der Patienten mit einer TNC-S-Konzentration von über 35 ng/ml tumorbedingt verstorben, während in der Gruppe mit den Serumkonzentrationen unter 35 ng/ml lediglich 15% tumorbedingt verstarben.

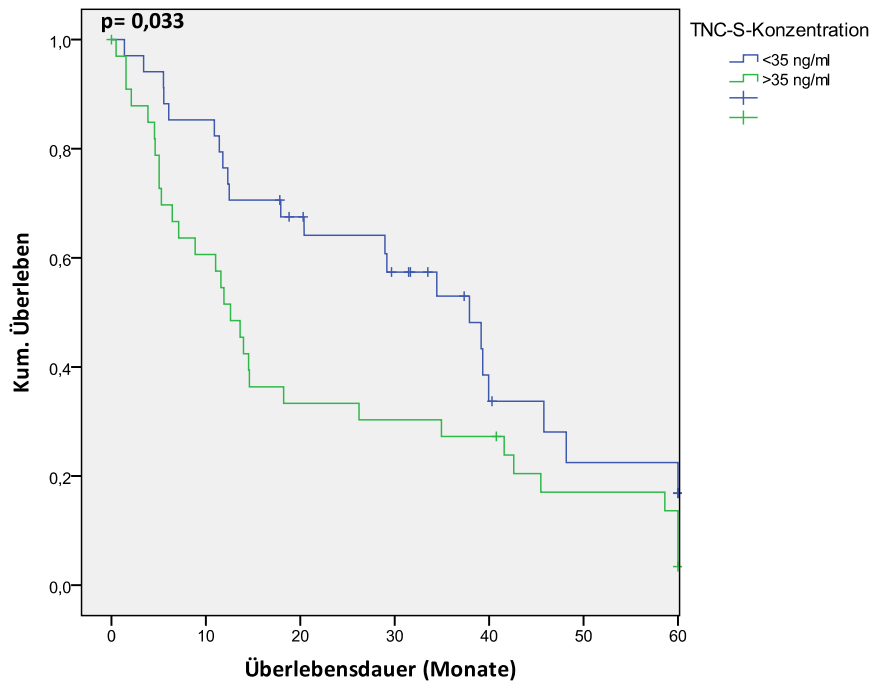


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Funktion für das 5-Jahres-Überleben bei Pankreastumorpatienten mit TNC-S-Konzentrationen unter (n=34) und über 35 ng/ml (n=34).  $p=0,0326$ . Die statistische Signifikanz wurde mit dem log-rank-Test berechnet.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem sowohl die Expression von Tenascin-C im Gewebe von GIST als auch die Tenascin-C-Konzentration im Serum von GIST-Patienten untersucht. Als Methoden kamen dabei eine immunhistochemische Färbung mittels Multitumor Array und ein monoklonaler Sandwich-ELISA zum Einsatz.

### 5.1 Tenascin-C als Tumormarker im Gewebe?

In bisherigen Studien konnte eine Überexpression von Tenascin-C bei den meisten soliden Tumoren nachgewiesen werden. Dazu gehören unter anderem Tumore von Gehirn, Mamma, Uterus, Ovar, Prostata, Pankreas, Kolon, Magen, Mund, Larynx, Leber, Niere, Blase, Haut, Knochen und Weichteilgewebe sowie Lymphome (reviewed von Orend und Chiquet-Ehrismann 2006).

Die auffallend starke Expression von Tenascin-C in Tumorgewebe und die neusten Erkenntnisse über seine Funktion bei der Tumorprogression machen das Glykoprotein zudem zu einem potentiellen Kandidaten für die Tumordiagnostik. In einer Studie, die nach Tumor-assoziierte Proteinen in Pleuraergüssen suchte, erreichte Tenascin-C die beste Punktzahl unter den getesteten potentiellen Markern und wurde ausschließlich in malignen Fällen, jedoch nicht in den Kontrollen, gefunden (Lawniczak et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Multitumor Array mit insgesamt 3978 Gewebeproben aus Primärtumoren von 99 verschiedenen Entitäten und Subtypen mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Tenascin-C angefärbt und ausgewertet. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte eine TNC-Expression in nahezu allen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Die anfänglichen Annahmen, dass es sich bei Tenascin-C um einen Marker für ausschließlich maligne Tumoren handeln könne, wurden in den vergangenen Jahren schon von anderen Studien widerlegt (Chiquet-Ehrismann 1993). Aber auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass manche benigne Tumoren ebenfalls eine vermehrte TNC-Expression aufweisen, wie zum Beispiel im Falle des pleomorphen Adenoms der Speicheldrüse (96% der untersuchten Proben stark positiv für Tenascin-C) oder des Leiomyoms (94% der Proben stark positiv).

Andererseits scheint es jedoch auch Tumorentitäten zu geben bei denen sich Tenascin-C als Indikator für Malignität eventuell eignen könnte: So waren in unserem Multitumor Array zum Beispiel nur 12 (31%) der 58 untersuchten benignen Hautnaevi stark positiv für Tenascin-C, während von 13 untersuchten malignen Melanomen der Haut wiederum 10 (77%) stark positiv für Tenascin-C waren. Auch andere maligne Hauttumoren wie das Basaliom, das Pilomatrixom oder der Merkelzellkarzinom zeigten ähnlich starke Färbungsergebnisse. Interessanterweise stellt eine Untersuchung aus dem Jahre 1994 übereinstimmende Resultate vor: Die Arbeitsgruppe von Van Duinen untersuchte die EZM

im Gewebe von blanden Hautnaevi über dysplastische Vorstufen bis hin zu invasiven Melanomen und fand komplexe Veränderung in der Zusammensetzung der EZM: unter anderem auch eine verstärkte TNC-Expression, die mit dem Ausmaß der melanozytären Tumorprogression korrelierte.

Neben diesen Ergebnissen sind auch die Resultate bei den im Multitumor Array untersuchten Proben von Adenomen des Kolons und Kolonkarzinomen vielversprechend: Während sich bei den *low grade* Adenomen nur 18% der untersuchten Proben stark positiv für Tenascin-C darstellten, waren es bei den *high grade* Adenomen schon 27% und bei den Adenokarzinomen des Kolons schließlich 76% der untersuchten Proben. Diese unterschiedlichen Expressionsmuster von Tenascin-C in der Kolonmukosa sind in vorausgegangenen Studien bereits ähnlich beschrieben worden (u.a. Natali et al. 1991, Riedl et al. 1992). Neuere Studien gingen noch einen Schritt weiter und beschäftigten sich zudem mit der prognostischen Aussagekraft der TNC-Expression bei Kolorektalen Karzinomen. So zeigten Emoto und Arbeitsgruppe, dass die Überexpression von Tenascin-C und Annexin II ein Hinweis auf eine schlechte Prognose für Patienten mit kolorektalen Tumoren sei (2001). Andere Studien hingegen fanden keine prognostische Signifikanz in der immunhistochemischen Untersuchung der TNC-Expression bei Karzinomen des Kolons (Lundin et al. 2007).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit im Multitumor Array untersuchten Gewebeproben lagen leider keine klinisch-histologischen Variablen oder Überlebensdaten vor, mit denen die TNC-Expression hätte korreliert werden können. Dies ist eine der Limitationen der hier verwendeten Methode des Multitumor Arrays. Die gleichzeitige Färbung einer sehr hohen Anzahl von verschiedenen Entitäten in einem Arbeitsschritt dient eher einem Screening-ähnlichen Untersuchen auf Expression als der anschließenden genauen Analyse und statistischen Korrelation mit klinischen und histologischen Daten. Ein spezifischer Array mit ausschließlich kolorektalen Karzinomen zur Ermittlung der klinisch-prognostischen Aussagekraft der TNC-Expression wäre als zukünftiges Projekt anzustreben, zumal die hier dargestellten Ergebnisse aussichtsvoll sind. Zwar hat die Studie von Lundin und seiner Arbeitsgruppe keine prognostische Signifikanz der Expression von Tenascin-C ermitteln können (2007), doch lässt sich dies vielleicht auch auf den in der Studie verwendeten Antikörper zurückführen, welcher sich gegen die Fibrinogen-ähnliche Domäne des Tenascin-C richtet. Überhaupt sind die Ergebnisse zum prognostischen Wert der TNC-Expression im Tumorgewebe sehr kontrovers diskutiert worden. In einigen Entitäten, wie zum Beispiel in Tumoren von Mamma (Suwiat et al. 2004) oder Lunge (Ishiwata et al. 2005), in Phäochromozytomen (Salmenkivi et al. 2001) und Cholangiokarzinomen (Aishima et al. 2003), aber auch in Astrozytomen (Leins et al. 2003) oder den oben erwähnten malignen Melanomen (Ilmonen et al. 2004), konnte eine hohe

TNC-Expression mit einer schlechten Überlebensrate korreliert werden.

Eigentümlicherweise gibt es aber auch einige Berichte über eine Korrelation der TNC-Expression in Tumoren mit einem besseren Überleben für die betroffenen Patienten. So zum Beispiel im Falle des invasiven Mammakarzinoms (Shoji et al. 1993) sowie bei Karzinomen von Zervix (Pilch et al. 1999), Magen (Wiksten et al. 2003) und, wie kürzlich erst gezeigt, beim Osteosarkom (Xiong et al. 2009).

Auch für das viel diskutierte Kolonkarzinom gibt es ältere Studien, die von einer besseren Prognose in Korrelation mit verstärkter TNC-Expression ausgehen (Sugawara et al. 1991, Iskaros et al. 1997). So wurde auch die Rolle von Tenascin-C als Indikator für eine adäquate Tumorabwehr (Pilch et al. 1999) sowie als limitierender Faktor bei der Tumorinvasion (Sugawara et al. 1991) diskutiert.

Es scheint also so zu sein, als müsse man die TNC-Expression differenzierter betrachten. Die Ansicht, dass besonders die großen, alternativ-gespleißten Tenascin-C-Isoformen in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen stehen, hat sich mittlerweile durchgesetzt und stellt eine mögliche Erklärung für die konträren Studienergebnisse dar. Demgemäß lassen sich die verschiedenen Studien nur schwer miteinander vergleichen, da die meisten Untersuchungen mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt wurden. Die Forderung nach genaueren Investigationen auf dem Gebiet des tumorassoziierten alternativen Spleißens scheint gerechtfertigt. So zeigte eine neuere Studie über kolorektale Karzinome kürzlich, dass eine bestimmte große Tenascin-C-Spleißvariante ein spezifischerer potentieller Marker ist als die totale TNC-Expression in kolorektalen Karzinomen (Takeda et al. 2007). Ginge man davon aus, dass diese Beobachtung zuträfe, wären viele der im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen verwendeten Antikörper gegen Tenascin-C nutzlos. Auch der von uns im Multitumor Array verwendete Antikörper richtet sich leider nicht gegen eine der alternativ gespleißten Untereinheiten des Tenascin-C, sondern gegen die EGF-ähnlichen Domänen des Moleküls. Diese sind sowohl in den kleinen, als auch in den großen Tenascin-C-Isoformen vorhanden. Man schreibt ihnen vor allem Aufgaben in der Modulation von Zelladhäsion und Migration zu (Pietro et al. 1992).

## **5.2 Tenascin-C-Expression bei GIST**

Eine Untersuchung von Tenascin-C im Zusammenhang mit GIST wurde bislang noch nicht publiziert. In unserem Multitumor Array konnte in 33 (87%) der 38 GIST-Proben eine TNC-Expression nachgewiesen werden. Jedoch zeigten auch die differentialdiagnostisch abzugrenzenden Entitäten, unabhängig von ihrer Dignität, ein ähnliches Expressionsmuster: Von den Leiomyosarkomen waren 88% der Proben stark positiv für Tenascin-C, von den Schwannomen 86%, von den untersuchten Leiomyomen 94% und von den Neurofibromen zeigten sogar 98% eine starke Färbung für Tenascin-C.



Somit ist Tenascin-C im Gewebe offensichtlich kein geeigneter Differenzierungsmarker für GIST.

Ohne Zweifel ist es von großer Bedeutung, GIST gegenüber anderen differentialdiagnostisch wichtigen, vor allem gutartigen, Weichgewebstumoren abgrenzen zu können. Schließlich neigen GIST oftmals zu malignerem Verhalten als andere Weichgewebstumoren, bedürfen einer radikaleren chirurgischen Therapie und haben zusätzlich gute Ansprechraten auf die medikamentöse Therapie mit Imatinib. Die richtige Diagnose eines GIST zu stellen ist also ausschlaggebend für das weitere therapeutische Vorgehen. Tatsächlich können schon heute ca. 90% aller GIST über ihre Expression von c-KIT immunhistochemisch differenziert werden (Fletcher et al. 2002, Hirota et al. 1998, Kindblom et al. 1998). Es stellt sich also durchaus die kritische Frage nach der Notwendigkeit eines zusätzlichen Gewebemarkers. Indessen ist aber die Malignitätseinschätzung von GIST weiterhin schwierig. Es gibt keine eindeutigen histopathologischen Malignitätskriterien, welche Aussage über das biologische Verhalten des Tumors machen können (Miettinen et al. 1999). Die Abgrenzung von benignen GIST gegenüber malignen Tumoren ist aber entscheidend für die Festsetzung der Therapieindikation. Des Weiteren gibt es auch noch keinen etablierten Serummarker für GIST. Einen zuverlässigen Marker im leicht zugänglichen peripheren Blut zu finden, könnte in Zukunft die Diagnostik von GIST erleichtern und den Patienten früher eine adäquate Therapie ermöglichen.

Neben der Untersuchung der TNC-Expression im Gewebe von GIST, wurde Tenascin-C deshalb im Verlauf dieser Arbeit auch auf Serumebene untersucht und die Ergebnisse mit klinischen Daten korreliert. Bislange gibt es nur wenige Forschungsergebnisse zur Untersuchung von Tenascin-C im Serum von Tumorpatienten. Im Folgenden sollen die Ergebnisse unserer Untersuchungen diskutiert werden.

### **5.3 Tenascin-C als Serummarker bei Tumoren?**

Nachdem das Vorhandensein von Tenascin-C im Serum erfolgreich dargestellt werden konnte, beschäftigten sich einige Studien mit der Untersuchung von Serumkonzentrationen des Glykoproteins im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen. So wurde Tenascin-C erstmals im Serum von Melanom-Patienten nachgewiesen und gleichzeitig festgestellt, dass die Serumlevel bei Patienten mit fortgeschrittenen Melanomen signifikant höher waren als diese von Patienten mit geringer Tumormasse oder von gesunden Kontrollpersonen (Herlyn et al. 1991). Nach der erfolgreichen Etablierung eines Enzyme-linked Immunoassays (ELISA) zur Detektion von Tenascin-C im Serum durch Kimura et al. (1993), quantifizierte die gleiche Arbeitsgruppe Tenascin-C im Serum von gesunden Personen sowie von Krebskranken und fand heraus, dass die

Krebspatienten zu höheren TNC-S-Konzentrationen neigten als die gesunde Vergleichsgruppe (Washizu et al. 1993). Ein signifikanter Anstieg von Tenascin-C im Serum konnte auch für Gliome und Prostatakarzinome (Schenk et al. 1995) sowie für Plattenepithelkarzinome von Hals und Kopf mit erhöhten Tumorstadien nachgewiesen werden (Pauli et al. 2002).

Eine Untersuchung von Riedl et al. zeigte, dass Patienten mit kolorektalen Karzinomen ebenfalls signifikant höhere Tenascin-C-Serumlevel als ihre Kontrollgruppe aufwiesen. Während das Tumorgrading keinen Einfluss auf die Konzentration im Serum zeigte, stieg mit höherer pT-Kategorie das Serumlevel von Tenascin-C an. Außerdem hatten Patienten mit Fernmetastasen signifikant höhere Serumkonzentrationen als Tumorpatienten ohne Fernmetastasen (1995). Prognostische Aussagekraft von Tenascin-C im Serum fand man auch beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom: Hier waren die Konzentrationen der Tumorpatienten zwar nur leicht gegenüber denen der gesunden Probanden erhöht; interessanterweise wiesen aber die Patienten mit niedrigeren TNC-S-Konzentrationen (<96 ng/ml) ein signifikant besseres Überleben auf als die Gruppe mit hohen Tenascin-C-Werten (≥96 ng/ml) (Ishiwata et al. 2005). Eine Studie von Gazzaniga et al. aus demselben Jahr untersuchte Tenascin-C gemeinsam mit EGFR als potentielle Marker für zirkulierende Tumorzellen im Serum von Patienten mit Blasen- und Kolonkarzinomen. Unter allen Patienten, die analysiert wurden, zeigte die Gruppe mit negativen Ergebnissen sowohl für Tenascin-C als auch für EGFR signifikant längere Überlebenszeiten (Gazzaniga et al. 2005).

All diese Ergebnisse machen Tenascin-C zu einem potentiellen Marker im Rahmen von Tumordiagnostik und zu einem aussichtsvollen Kandidaten für die Prognose-Einschätzung von Tumorpatienten. Trotz vielversprechender Ergebnisse erster Untersuchungen von Tenascin-C im Serum von Krebspatienten sind die Studien zu diesem Thema in ihrer Anzahl bis heute recht überschaubar. Eine publizierte Untersuchung von Tenascin-C sowohl in Gewebe als auch im Serum von Patienten mit GIST liegt bis heute noch nicht vor.

#### **5.4 Tenascin-C im Serum von GIST-Patienten**

Mithilfe eines ELISAS wurden die Tenascin-C-Konzentrationen im Serum von 94 GIST-Patienten sowie 154 gesunden Kontrollpersonen bestimmt. Das mediane Alter des von uns untersuchten Patientenkollektivs betrug 61 (53 und 68) Jahre und ist somit repräsentativ für das in der Literatur beschriebene mediane Erkrankungsalter von GIST-Patienten (Tran et al. 2005). Das mediane Alter der Kontrollgruppe lag mit 47 (40 und 56) leider etwas darunter, was auf die Herkunft der Kontrollseren von Blutspendern aus der Spenderbank des UKE zurückzuführen ist.

Die Geschlechterverteilung bei den von uns untersuchten GIST-Patienten war ausgeglichen (Männer 51%, Frauen 49%). Dies deckt sich ebenfalls mit den Ergebnissen aus Untersuchungen zur Epidemiologie von GIST (Nilsson et al. 2005). Die Lokalisation des Primärtumors wird neuerdings als möglicher Risikofaktor in der Prognoseeinschätzung von GIST gehandelt und wurde daher ebenfalls von uns erfasst. Die Verteilung der Tumorlokalisation in Magen (67%), Dünndarm (27%) und anderen Organen (6%) stellte sich dabei in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv ebenso als repräsentativ für GIST dar. In der Studie von Nilsson et al. mit 1460 GIST-Patienten traten 59% der Tumoren im Magen auf, gefolgt von 34% im Dünndarm sowie 6% in Kolon und Rektum (2005). Im Vergleich der TNC-S-Konzentrationen bei GIST-Patienten und gesunden Kontrollpersonen konnte leider keine statistische Signifikanz ermittelt werden. Dennoch zeigt sich hier eine deutliche Tendenz: die Gruppe der GIST-Patienten hatte höhere Konzentrationen von Tenascin-C im Serum als die Kontrollgruppe. Ähnliche Ergebnisse erzielten wir auch bei der Korrelation der TNC-S-Konzentration mit den allgemeingültigen Risikofaktoren für GIST, der Tumorgröße und der Mitoserate. So zeigte sich auch hier die Tendenz, dass Patienten mit größerem Tumor oder einer erhöhten Mitoserate höhere Tenascin-C-Konzentrationen aufweisen als Patienten mit kleinerem Tumor oder niedrigerer Mitoserate. Eine statistische Signifikanz konnte dennoch auch hier nicht ermittelt werden. Interessanterweise zeigte sich auch in der Gruppe der R1/R2 resezierten Patienten der Trend zu höheren Tenascin-C-Serumleveln, verglichen mit der Gruppe der R0-resezierten GIST-Patienten. Man kann also möglicherweise von einem Einfluss der Tumormasse auf die Tenascin-C-Konzentration ausgehen. Tenascin-C eignet sich folglich vielleicht weniger zur Diagnostik von GIST, aber dennoch als Verlaufsmarker zur Therapiekontrolle. Für eine Eignung von Tenascin-C im Therapiemonitoring von GIST sprechen auch unsere Untersuchungsergebnisse bei der Korrelation von Serumkonzentrationen und der Gabe von Imatinib. Demnach konnte trotz fehlender statistischer Signifikanz die Tendenz herausgearbeitet werden, dass Patienten mit Imatinib-Therapie niedrigere Konzentrationen von Tenascin-C aufwiesen als solche ohne medikamentöse Therapie ( $p=0,084$ ).

Die Wirkung von Imatinib auf GIST-Tumore konnte bereits in vielen Studien gezeigt werden: So wiesen in einer Untersuchung von Van Oosterom et al. 53% aller Patienten unter Imatinib eine deutliche Reduktion der Tumormasse auf (2001). In Zukunft ließe sich ein Ansprechen der Therapie also vielleicht auch im Serum der Patienten verfolgen.

In letzter Zeit wurde auch die Lokalisation des Primärtumors als Faktor zur Risikoeinschätzung von GIST diskutiert (DeMatteo et al. 2008). Diese Entdeckung konnten wir leider nicht weiter bestätigen. Es korrelierte weder die Tenascin-C-Konzentration mit der Lokalisation des Tumors, noch ließ sich ein Zusammenhang

zwischen der Lokalisation des Tumors und der Prognose der Patienten finden (Daten nicht gezeigt).

In einer Studie mit 200 GIST-Patienten konnte dargestellt werden, dass die Prognose von GIST-Patienten stark vom Vorhandensein von Metastasen und/oder eines Rezidivs abhängt (DeMatteo et al. 2000). Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikante Korrelation zwischen der TNC-S-Konzentration und dem frühen Auftreten von Metastasen und/oder Rezidiven. So scheinen Patienten mit hohen TNC-S-Konzentrationen häufiger und auch früher eine Metastase und/oder ein Rezidiv zu entwickeln als solche mit niedrigeren Konzentrationen. Um diese Beobachtung zu verifizieren, führten wir die Korrelation der Serumlevel auch für ausschließlich R0-resezierte Patienten durch. Auch hier fanden wir eine Korrelation zwischen niedriger Serumkonzentration von Tenascin-C und dem progressionsfreien Überleben. Tenascin-C eignet sich folglich möglicherweise als Verlaufs- und Prognosemarker bei GIST-Patienten. Daneben scheint ein Zusammenhang zwischen der Tumormasse und der Höhe der Serumkonzentrationen wahrscheinlich. Weitere Untersuchungen könnten vielleicht verifizieren, ob ein Anstieg der TNC-S-Konzentration bei resezierten GIST-Patienten frühzeitig auf das Auftreten einer Metastase oder die Entwicklung eines Rezidivs hindeuten kann. Eine Anwendung als Marker zur Erkennung von Hochrisikopatienten, die von einer frühzeitigen Imatinib-Therapie profitieren könnten, wäre ebenfalls denkbar und potentiell ein Untersuchungsziel für weiterführende Arbeiten.

55% der von uns untersuchten GIST Patienten erhielten eine Therapie mit Imatinib. Da Imatinib das Outcome von Patienten mit GIST verbessert, liegt hier ein Kritikpunkt bei der Beurteilung unserer Ergebnisse: Patienten mit und ohne Imatinib-Therapie wurden nicht differenziert betrachtet. Ginge man davon aus, dass die Gabe von Imatinib zu einer Reduktion der Tumormasse führe und diese wiederum zu einem Herabsinken der Tenascin-C-Konzentration im Serum, so erklärt dies vielleicht die fehlende statistische Signifikanz vieler unserer Ergebnisse trotz deutlicher Tendenzen.

Ein weiterer Kritikpunkt ist, dass für die Untersuchung im Gewebe mittels MTA ein anderer Antikörper verwendet wurde als bei den Untersuchungen auf Serumebene. Beim von uns durchgeführten ELISA kamen gleich zwei Antikörper zum Einsatz, die sich beide gegen die FNIII-C Domäne des Tenascin-C richten. Somit wurden zwar mit dem ELISA die hochmolekularen Isoformen des Tenascin-C detektiert, welche vor allem in Tumoren vorkommen, dennoch lassen sich die Ergebnisse nur schwer miteinander vergleichen. Für eine adäquate Aussage hätte man mit den gleichen Antikörpern arbeiten müssen.

## 5.5 Tenascin-C bei Pankreastumoren

Neben den Untersuchungen von Tenascin-C bei GIST wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die TNC-S-Konzentration bei Patienten mit Pankreaskarzinomen untersucht. Auslöser hierfür waren insbesondere die interessanten Ergebnisse der TNC-Expression im Pankreastumorgewebe. Im MTA konnte gezeigt werden, dass die Pankreasadenokarzinome eine hohe TNC-Expression aufwiesen (78% der Proben stark positiv) während die Expression bei neuroendokrinen Tumoren des Pankreas deutlich geringer ausfiel (19% stark positiv).

Auch in der Vergangenheit gab es bereits bemerkenswerte Studienergebnisse zu Tenascin-C beim Pankreaskarzinom: Nachdem Linder et al. bereits 2001 die Expression von Tenascin-C in der extrazellulären Matrix von Pankreaskarzinomen nachweisen konnten, zeigte eine weitere Studie eine Hochregulation der Expression bei Karzinomen des Pankreas im Vergleich zum gesunden Kontrollgewebe, die außerdem mit dem Differenzierungsgrad des Tumors korrelierte (Luuti et al. 2004). Eine Untersuchung von duktalem Pankreasadenokarzinomen bestätigte die vorausgegangenen Ergebnisse und fand zudem eine Steigerung des Ausmaßes der TNC-Expression beginnend bei leichten intraduktalen Läsionen (PanIN-1A und 1B) über moderate hin zu hochgradigen epithelialen Neoplasien des Pankreas (PanIN-2 und 3) hin zu invasiven Tumoren. Große Tenascin-C-Isoformen wurden in der gleichen Studie sowohl beim Pankreaskarzinom als auch bei chronischer Pankreatitis gefunden, jedoch nicht im gesunden Kontrollgewebe (Esposito et al. 2006). Eine neuere Studie stellte kürzlich unter Beweis, dass fibrilläres Tenascin-C die Tumorprogression fördert. Es wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der TNC-Expression und dem Auftreten von Lebermetastasen beim Pankreasadenokarzinom gefunden (Chen et al. 2009). Eine Untersuchung von Tenascin-C auf Serumebene im Zusammenhang mit Pankreaskarzinomen liegt bislang noch nicht publiziert vor. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir die Serumproben von 55 Patienten mit Adenokarzinomen des Pankreas sowie von 11 Patienten mit einem neuroendokrinen Tumor des Pankreas mittels ELISA auf ihre Tenascin-C-Konzentration. Im Vergleich der Serumlevel zwischen den beiden Entitäten erhielten wir Ergebnisse, die diese des Multitumor Array bestätigten: Patienten mit einem Pankreasadenokarzinom hatten signifikant höhere Serumkonzentrationen als solche, die an einem neuroendokrinen Tumor erkrankt waren. Bei der Korrelation der Tenascin-C-Konzentrationen mit klinisch-pathologischen Daten wie Tumorlokalisation, Resektionsausmaß oder Tumorprogression konnten hingegen keine statistischen Signifikanzen ermittelt werden. Jedoch scheint die Höhe der Tenascin-C-Konzentration im Serum ein Prognosefaktor für das Überleben der Patienten zu sein. So lebten Patienten mit niedrigeren Serumkonzentrationen signifikant länger als Patienten mit hohen

Tenascin-C-Serumleveln.

Eine neue Untersuchung mit größeren Patientenzahlen, die sich ausschließlich mit Pankreastumoren beschäftigt, ist nötig um diese ersten Ergebnisse zu verifizieren. Möglicherweise eignet sich Tenascin-C als Differenzierungsmarker zwischen Adenokarzinomen des Pankreas sowie neuroendokrinen Pankreastumoren. Einen solchen Differenzierungsmarker gibt es bislang nicht. Dieser wäre jedoch von großem Nutzen, da viele neuroendokrine Tumoren des Pankreas keiner radikalen Therapie bedürfen. Durch eine periphere Diagnostik im leicht zugänglichen Blut könnte man invasive diagnostische Maßnahmen umgehen.

Die Behandlungsoptionen für Pankreasadenokarzinome umfassen operative Maßnahmen, Radiatio sowie Chemotherapie. Dabei ist Gemcitabine zurzeit Therapeutikum der ersten Wahl bei Karzinomen des Pankreas. Studien zeigen dennoch ein 1-Jahres-Überleben von nur 18% für Pankreaskarzinompatienten mit Gemcitabine-Therapie sowie eine mediane Überlebensauer von unter 6 Monaten (Burris et al. 1997). Gründe für das kurze Überleben dieser Patienten sind unter anderem Resistenzen gegen das Medikament. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass eine Gemcitabine-Resistenz von Pankreaskarzinomzellen durch Interaktionen zwischen Tenascin-C sowie Annexin All induziert werden kann (Gong et al. 2010). Durch die weitere Entschlüsselung dieser neuen Signalwege erschließen sich hier wohlmöglich neue Forschungsansätze. Ein interessantes Projekt für die zukünftige Weiterverfolgung unserer ersten Ergebnisse über Tenascin-C beim Pankreaskarzinom wäre demnach auch die Untersuchung von TNC-S-Konzentrationen bei Tumorpatienten mit und ohne Gemcitabine-Resistenz. Vielleicht ließe sich sogar anhand der TNC-S-Konzentration eine Aussage über das Vorhandensein einer Gemcitabine-Resistenz treffen. Eine frühzeitige Erkennung dieser Resistenzen sowie eine denkbare Modulation von neu entdeckten Signalwegen, die zur Resistenz führen, stellen möglicherweise neue therapeutische Ansätze in der Therapie des Pankreaskarzinoms dar.

### **5.6 Ausblick: Tenascin-C als therapeutisches Target?**

Für die Therapie von malignen Tumoren werden zurzeit verschiedene Strategien eingesetzt, so zum Beispiel Chemotherapie, Radiotherapie oder Immuntherapie. Bemerkenswerterweise richten sich all diese Therapieformen nicht nur gegen die Tumorzellen selbst, sondern beeinflussen auch das, die Tumorzellen umgebende, Stroma. Dies ist von enormem Vorteil, zumal man heute weiß, dass die EZM eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression spielt. Die Zellen des Stromas, Endothelzellen, Fibroblasten sowie Makrophagen, können das Tumorwachstum aktiv durch die Sekretion von beispielsweise Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder tumorspezifischen Molekülen

fördern. Die Erkenntnis über die Relevanz der tumorassoziierten Modulation der EZM von Tumoren öffnet neue Möglichkeiten in Hinblick auf die Entwicklung innovativer Antitumor-Strategien. Auch Tenascin-C rückt als Bestandteil des tumorassoziierten Stromas ins Zentrum der Aufmerksamkeit der Tumortheraieforschung.

Neben den möglichen diagnostischen Anwendungen von Tenascin-C-Antikörpern wird so auch zunehmend ihr möglicher therapeutischer Nutzen untersucht und diskutiert. Hier gab es bereits die ersten wegbereitenden Studien im Zusammenhang mit der Therapie von Hirntumoren (Bigner et al. 1995, Schold et al. 1993). Das Grundprinzip dieser Versuche liegt in der Verwendung von radiomarkierten Tenascin-C-Antikörpern, die lokal appliziert im Tenascin-C-reichen Tumorgewebe eine Bestrahlung bewirken. Eine klinische Phase-III-Studie konnte kürzlich zeigen, dass eine Radioimmuntherapie mit dem <sup>131</sup>Jod-markierten Anti-Tenascin-C-Antikörper 81C6 bessere Ergebnisse in der Behandlung von neu diagnostizierten malignen Gliomen aufweist als konventionelle Radiatio, <sup>131</sup>Jod-Brachytherapie oder stereotaktische Radiochirurgie. Es wurde ein verlängertes Gesamtüberleben der Patienten mit Radioimmuntherapie registriert (Reardon et al. 2006). Der gleiche Antikörper konnte auch bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom erfolgreich in einer Phase-I-Studie angewandt werden (Rizzieri et al. 2004). Eine klinische Studie von Zukiel und Arbeitsgruppe testete erstmals den Gebrauch von interferierender RNA bei 10 Patienten mit Glioblastom, die sich einer Tumorresektion unterzogen. Hier gelang es durch die lokale Applikation von anti-Tenascin-C iRNA die Expression von Tenascin-C erfolgreich zu unterdrücken (2006).

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die synthetische Isolation von Nuklease-stabilen Tenascin-C-Aptameren, die aufgrund einer kleineren Größe einen Vorteil gegenüber Antikörpern in der Tumortarget-Therapie mit Radioisotopen bieten können (Hicke et al. 2001, 2006). Bislang finden noch keine Aptamere klinische Anwendung in der onkologischen Therapie.

Auch für die Therapie von GIST könnten diese neusten Studienergebnisse in Zukunft durchaus von Interesse sein. Zwar existiert mit Imatinib bereits ein potentes Therapeutikum mit guten Ansprechraten, doch treten bei den Patienten nach dem ersten oder zweiten Behandlungsjahr mit dem Tyrosinkinaseinhibitor leider häufig sekundäre Resistenzen auf (Heinrich et al. 2006). Die Mechanismen, die diesen erworbenen Resistenzen zugrunde liegen, sind bisher noch nicht vollständig verstanden.

Daneben scheinen aufgrund von molekularer Heterogenität unter den GIST einige Patienten auch von Anfang an weniger von einer Therapie mit Imatinib zu profitieren. Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse über die Wirksamkeit von Imatinib bei verschiedenen Genotypen von GIST zeigte, dass die klinische Ansprechrate von der dem Tumor zugrunde liegenden Mutation abhängig ist. So profitierten Patienten mit einer KIT-

Mutation auf Exon 11 am meisten von der Imatinib-Gabe (Chen et al. 2010). Die Identifikation von molekularen Anomalitäten, die eine essentielle Rolle bei der Tumorgenese spielen, ist notwendig um neue Antitumorstrategien zu entwickeln. Ein solcher neuer Angriffspunkt für die Therapie von Tumoren könnte das tumorassoziierte Stroma und Tenascin-C als wichtiger Bestandteil dessen sein. Obwohl die genauen Mechanismen von Tenascin-C und seiner Rolle bei Tumorwachstum und Progression noch nicht gut verstanden sind, deuten diese ersten Studienergebnisse auf ein vielversprechendes Potential des Glykoproteins als Target in der zielgerichteten Tumorthherapie hin. Ob sich Tenascin-C tatsächlich als Angriffspunkt in der onkologischen Therapie durchsetzen kann, werden weitere klinische Studien zeigen müssen.



## 6. Zusammenfassung

Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) sind die häufigsten mesenchymalen Tumoren des Magen-Darm-Traktes. Eine immunhistochemische Differenzierung ist in ca. 90% der Fälle durch CD117 möglich (Fletcher et al. 2002, Hirota et al. 1998). Einen Serummarker gibt es bislang noch nicht.

Tenascin-C ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix (EZM), welches im Rahmen der embryonalen Entwicklung exprimiert wird, daneben aber auch bei pathologischen Vorgängen reexprimiert werden kann (Mackie 1994). Schon früh wurde das Vorkommen von Tenascin-C bei neoplastischen Vorgängen beschrieben (Chiquet-Ehrismann et al. 1986). Veränderungen der Tenascin-C-Expression (TNC-Expression) konnten bisher erfolgreich als prognostische Parameter für einige Tumoren ermittelt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, das EZM-Protein Tenascin-C in seiner Aussagekraft als Marker im Gewebe und Serum von Patienten mit GIST zu untersuchen.

Mittels eines Multitumor Arrays wurde die TNC-Expression in Gewebeproben verschiedener Tumorentitäten darunter GIST und differentialdiagnostisch relevante Tumoren untersucht. Es konnte eine TNC-Expression im Stroma fast aller untersuchten Entitäten festgestellt werden. Die Gewebeproben von GIST zeigten ein starkes Expressionsmuster für Tenascin-C. Ferner waren jedoch auch die untersuchten differentialdiagnostisch relevanten Weichteiltumoren stark positiv für Tenascin-C. Mithilfe eines Enzyme-linked-immunosorbent Assays (ELISA) wurde die Tenascin-C-Konzentration im Serum (TNC-S-Konzentration) von Patienten mit GIST untersucht und mit der von gesunden Kontrollpersonen verglichen. Die GIST-Patienten wiesen tendenziell höhere TNC-S-Konzentrationen auf als die Kontrollgruppe. Eine statistische Signifikanz lag jedoch nicht vor. Darüber hinaus wurde die TNC-S-Konzentration der GIST-Patienten mit klinischen sowie pathologischen Daten korreliert. Es wurde eine positive Korrelation zwischen der TNC-S-Konzentration und dem Auftreten von Metastasen und/oder Rezidiven festgestellt. Patienten mit hohen TNC-S-Konzentrationen wiesen ein kürzeres progressionsfreies Überleben auf. Patienten, die mit Imatinib behandelt wurden, hatten tendenziell niedrigere TNC-S-Konzentrationen, als Patienten, die keine medikamentöse Therapie erhielten. Eine statistische Signifikanz konnte nicht ermittelt werden.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass sich Tenascin-C wohlmöglich zur Prognoseeinschätzung sowie im Therapiemonitoring von GIST-Patienten eignet. Weiterführende Studien sollten die TNC-Expression differenzierter betrachten und sich auf die Untersuchung der Expression von hochmolekularen Tenascin-C-Varianten konzentrieren. Möglicherweise erschließen sich hier innovative Therapiemöglichkeiten, die speziell auf tumorassoziierte Veränderungen der EZM zielen.

## 7. Literaturverzeichnis

- **Adams** JC, Watt FM (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117: 1183-1198.
- **Adams** M, Jones JL, Walker RA, Pringle JH, Bell SC (2002) Changes in Tenascin-C Isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. *Cancer Res* 62: 3289-3297.
- **Agaimy** A (2010) Gastrointestinal stromal tumors (GIST) from risk stratification systems to the new TNM proposal: more questions than answers? A review emphasizing the need for a standardized GIST reporting. *Int J Clin Exp Pathol* 3(5): 461–471.
- **Aishima** S, Taguchi K, Terashi T, Matsuura S, Shimada M, Tsuneyoshi M (2003) Tenascin expression at the invasive front is associated with poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* 16: 1019–1027.
- **Ando** N, Goto H, Niwa Y, Hirooka Y, Ohimiya N, Nagasaka T, Hayakawa T (2002) The diagnosis of GI stromal tumors with EUS-guided fine needle aspiration with immunohistochemical analysis. *Gastrointest Endosc* 55(1): 37-43.
- **Antonescu** CR, Besmer P, Guo T, Arkun K, Hom G, Koryotowski B, Leversha MA, Jeffrey PD, Desantis D, Singer S, Brennan MF, Maki RG, DeMatteo RP (2005) Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res* 11(11): 4182-4190.
- **Aufderheide** E, Ekblom P (1988) Tenascin during gut development: appearance in the mesenchyme, shift in molecular forms, and dependence on epithelial-mesenchymal interactions. *J Cell Biol* 107: 2341-2349.
- **Aufderheide** E, Chiquet-Ehrismann R, Ekblom P (1987) Epithelial-mesenchymal interactions in the developing kidney lead to expression of tenascin in the mesenchyme. *J Cell Biol* 105(1):599-608.
- **Aukhil** I, Joshi P, Yan Y, Erickson HP (1993) Cell- and heparin-binding domains of the hexabrachion arm identified by Tenascin expression proteins. *J Biol Chem* 268: 2542-2553.
- **Beiter** K, Hiendlmeyer E, Brabletz T, Hlubek F, Haynl A, Knoll C, Kirchner T, Jung A (2005) Beta-Catenin regulates the expression of Tenascin-C in human colorectal tumors. *Oncogene* 24(55): 8200-8204.
- **Bigner** DD, Brown M, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, McLendon RE, Bigner SH, Zhao XG, Wikstrand CJ, Pegram CN, Kerby T, Zalutsky MR (1995) Phase I studies of treatment of malignant gliomas and neoplastic meningitis with <sup>131</sup>I-radiolabeled monoclonal antibodies anti-tenascin 81C6 and anti-chondroitin

- proteoglycan sulfate Me1-14 F (ab')<sub>2</sub>--a preliminary report. *J Neurooncol* 24(1): 109-122.
- **Bishop** JM, Weinberg RA (1996) Scientific American Molecular Oncology. Scientific American, Inc., New York. N.Y.
  - **Bissell** MJ, Radisky D (2001) Putting tumors in context. *Nat Rev Cancer* 1: 46-54.
  - **Borsi** L, Carnemolla B, Nicolò G, Spina B, Tanara G, Zardi L (1992) Expression of different Tenascin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer* 52: 688-692.
  - **Borsi** L, Balza E, Castellani P, Carnemolla B, Ponassi M, Querzé G, Zardi L (1994) Cell-Cycle Dependent Alternative Splicing of the Tenascin Primary Transcript. *Cell Adhes Commun* 1: 307-317.
  - **Borsi** L, Balza E, Gaggero B, Allemanni G, Zardi L (1995) The Alternative Splicing Pattern of the Tenascin-C Pre-mRNA Is Controlled by the Extracellular pH. *J Biol Chem* 270: 6243-6245.
  - **Bourdon** MA, Wikstrand CJ, Furthmayr H, Matthews TJ, Bigner DD (1983) Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res* 43: 2796-2805.
  - **Brellier** F, Tucker RP, Chiquet-Ehrismann R (2009) Teneascins and their implication in diseases and tissue mechanics. *Scand J Med Sci Sports* 19: 511–519.
  - **Bristow** J, Carey W, Egging D, Schalkwijk J (2005) Tenascin-X, collagen, elastin, and the Ehlers–Danlos syndrome, *Am J Med Genet* 139: 24–30.
  - **Brunner** A, Mayerl C, Tzankov A, Verdorfer I, Tschörner I, Rogatsch H, Mikuz G (2004) Prognostic significance of tenascin-C expression in superficial and invasive bladder cancer. *J Clin Pathol* 57: 927-931.
  - **Burriss** HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano M, Chripps MC, Portenoy RK, Stomiolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff D (1997) Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 15:2403-13.
  - **Calvo** A, Catena R, Noble MS, Carbott D, Gil-Bazo I, Gonzalez-Moreno O, Huh J-I, Sharp R, Qiu T-H, Anver MR, Merlino G, Dickson RB, Johnson MD, Green JE (2008) Identification of VEGF-regulated genes associated with increased lung metastatic potential: functional involvement of tenascin-C in tumor growth and lung metastasis. *Oncogene* 27(40): 5373–5384.
  - **Carnemolla** B, Castellani P, Ponassi M, Borsi L, Urbini S, Nicolo G, Dorcaratto A, Viale G, Winter G, Neri D, Zardi L (1999) Identification of a Glioblastoma-

- Associated Tenascin-C Isoform by a High Affinity Recombinant Antibody. *Am J Path* 154: 1345-1352.
- **Chen J**, Chen Z, Chen M, Li D, Li Z, Xiong Y, Dong J, Li X (2009) Role of fibrillar Tenascin-C in metastatic pancreatic cancer. *Int J Oncol* 34: 1029-1036.
  - **Chen P**, Zong L, Zhao W, Shi L (2010) Efficacy evaluation of imatinib treatment in patients with gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 16(33): 4227-4232.
  - **Chetty R** (2008) Small and microscopically detected gastrointestinal stromal tumours: an overview. *Pathology* 40(1): 9-12.
  - **Chiquet M**, Fambrough DM (1984a) Chick myotendinous antigen. I. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis. *J Cell Biol* 98: 1926-1936.
  - **Chiquet M**, Fambrough DM (1984b) Chick myotendinous antigen. II. A novel extracellular glycoprotein complex consisting of large disulfide-linked subunits. *J Cell Bio* 98: 1937-1946.
  - **Chiquet-Ehrismann R**, Chiquet M (2003) Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol* 200(4): 488-499.
  - **Chiquet-Ehrismann R**, Maeckie EJ, Pearson CA, Sakakura T (1986) Tenascin: an Extracellular Matrix Protein Involved in Tissue Interactions during Fetal Development and Oncogenesis. *Cell* 47: 131-139.
  - **Chiquet-Ehrismann R**, Matsuoka Y, Hofer U, Spring J, Bernasconi C, Chiquet M (1991) Tenascin variants: differential binding to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues. *Cell Regul* 2(11): 927-938.
  - **Chung CY**, Erickson HP (1994) Cell surface annexin II is a high affinity receptor for the alternatively spliced segment of Tenascin-C. *J Cell Biol* 126(2): 539-548.
  - **Chung CY**, Murphy-Ullrich JE, Erickson HP (1996) Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by Tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. *Mol Biol Cell* 7(6): 883-892.
  - **Connolly EM**, Gaffney E, Reynolds JV (2003) Gastrointestinal stromal tumours. *Br J Surg* 90(10): 1178-1186.
  - **Degen M**, Brellier F, Kain R, Ruiz C, Terracciano L, Orend G, Chiquet-Ehrismann R (2007) Tenascin-W is a novel marker for activated tumor stroma in low-grade human breast cancer and influences cell behavior. *Cancer Res* 67: 9169-9179.
  - **Degen M**, Brellier F, Schenk S, Driscoll R, Zaman K, Stupp R, Tornillo L, Terracciano L, Chiquet-Ehrismann R, Ruegg C, Seelentag W (2008) Tenascin-W, a new marker of cancer stroma, is elevated in sera of colon and breast cancer patients. *Int J Cancer* 122: 2451-2461.

- **DeMatteo** RP (2009) Nanoneoadjuvant therapy of gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann Surg Oncol* 16(4): 799-8000.
- **DeMatteo** RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Bennis MF (2000) Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* 231(1): 51-58.
- **DeMatteo** RP, Heinrich MC, El-Rifai WM, Demetri G (2002) Clinical management of gastrointestinal stromal tumors: before and after STI-571. *Hum Pathol* 33(5): 466-477.
- **DeMatteo** RP, Gold JS, Saran L, Gönen M, Liao KH, Maki RG, Singer S, Besmer P, Brennan MF, Antonescu CR (2008) Tumor mitotic rate, size, and location independently predict recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Cancer* 112(3): 608-615.
- **DeMatteo** RP, Ballman KV, Antonescu CR, Maki RG, Pisters PW, Demetri GD, Blackstein ME, Blanke CD, von Mehren M, Brennan MF, Patel S, McCarter MD, Polikoff JA, Tan BR, Owzar K; American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) Intergroup Adjuvant GIST Study Team (2009) Adjuvant imatinib mesylate after resection of localized, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 373(9669): 1097-1104.
- **Demetri** GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H (2002) Efficacy and Safety of Imatinib Mesylate in Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors. *N Eng J Med* 347(7): 472-480.
- **Demetri** GD, Van Oosterom AT, Garret CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA, Desai J, Fletcher CD, George S, Bello CL, Huang X, Baum CM, Casali PG (2006) Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 368(9544): 1329-1338.
- **Derr** LB, Chiquet-Ehrismann R, Gandour-Edwards R, Spence J, Tucker RP (1997) The expression of tenascin-C with the AD1 variable repeat in embryonic tissues, cell lines and tumors in various vertebrate species. *Differentiation* 62: 71-82.
- **Dueck** M, Riedl S, Hinz U, Tandara A, Möller P, Herfarth C, Faissner A (1999) Detection of tenascin-C isoforms in colorectal mucosa, ulcerative colitis, carcinomas and liver metastases. *Int J Cancer* 82: 477-483.

- **Dörries** U, Schachner M (1994) Tenascin mRNA isoforms in the developing mouse brain. *J Neurosci Res* 37(3): 336-47.
- **Druker** BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2(5): 561-566.
- **Van Duinen** CM, Fleuren GJ, Bruijn JA (1994) The extracellular matrix in pigmented skin lesions: an immunohistochemical study. *Histopathology* 24(1): 33-40.
- **Elenbaas** B, Weinberg RA (2001) Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* 261(1): 169-184.
- **El-Karef** A, Kaito M, Tanaka H, Ikeda K, Nishioka T, Fujita N, Inada H, Adachi Y, Kawada N, Nakajima Y, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T (2007) Expression of large tenascin-C splice variants by hepatic stellate cells/ myofibroblasts in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 46(4): 664–673.
- **Emoto** K, Yamada Y, Sawada H, Fujimoto H, Ueno M, Takayama T, Kamada K, Naito A, Hirao S, Nakajima Y (2001) Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma. *Cancer* 92(6): 1419-1426.
- **Emory** TS, Sobin LH, Lukes L, Lee DH, O’Leary TJ (1999) Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors: dependence on anatomic site. *Am J Surg Pathol* 23(1): 82-87.
- **Erickson** HP, Inglesias JL (1984) A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations. *Nature* 311: 267-269.
- **Esposito** I, Penzel R, Chaib-Harrireche M, Barcena U, Bergmann F, Riedl S, Kayed H, Giese N, Kleeff J, Friess H, Schirmacher P (2006) Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis. *J Pathol* 208(5): 673-685.
- **Van Eyken** P, Sciot R, Desmet VJ (1990) Expression of the novel extracellular matrix component tenascin in normal and diseased human liver. A immunohistochemical study. *J Hepatol* 11: 42- 53.
- **Fidler** IJ (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: The ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3: 453-458.
- **Fletcher** CDM, 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 (2002) Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Hum Pathol* 33: 459-465.

- **Franquemont** DW (1995) Differentiation and risk assessment of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol* 103(1): 41-47.
- **Friedlander** DR, Hoffman S, Edelman GM (1988) Functional mapping of Cytotactin: Proteolytic fragments active in cell-substrate adhesion. *J Cell Biol* 107: 2329-2340.
- **Gajiwala** KS, Wu JC, Christensen J, Deshmukh GD, Diehl W, DiNitto JP, English JM, Greig MJ, He YA, Jacques SL, Lunney EA, McTigue M, Molina D, Quenzer T, Wells PA, Yu X, Zhang Y, Zou A, Emmett MR, Marshall AG, Zhang HM, Demetri GD (2009) KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(5): 1542-1547.
- **Garin-Chesa** P, Melamed MR, Rettig WJ (1989) Immunohistochemical analysis of human neuronectin expression in normal, reactive, and neoplastic tissues. *J Histochem Cytochem* 37: 1767-1776.
- **Garwood** J, Rigato F, Heck N, Faissner A (2001) Tenascin glycoproteins and the complementary ligand DSD-1-PG/ phosphacan – structuring the neural extracellular matrix during development and repair. *Restor Neurol and Neurosci* 19: 51-64.
- **Gazzaniga** P, Nofroni I, Gandini O, Silvestri I, Frati L, Aglianò AM, Gradilone A (2005) Tenascin C and epidermal growth factor receptor as markers of circulating tumoral cells in bladder and colon cancer. *Oncol Rep* 14(5): 1199-1202.
- **Gebb** SA, Jones PL (2003) Hypoxia and lung branching morphogenesis. *Adv Exp Med Biol* 543: 117-125.
- **Gold** JS, DeMatteo RP (2006) Combined surgical and molecular therapy: the gastrointestinal stromal tumor model. *Ann Surg* 244(2): 176-184.
- **Gold** JS, DeMatteo RP (2007) Neoadjuvant therapy for gastrointestinal stromal tumor (GIST): racing against resistance. *Ann Surg Oncol* 14(4): 1247-1248.
- **Gong** XG, Lv YF, Li XG, Xu FG, Ma Qy (2010) Gemcitabine resistance induced by interaction between alternatively spliced segment of tenascin-C and annexin A2 in pancreatic cancer cells. *Biol Pharm Bull* 33(8): 1261-1267.
- **Gramza** AW, Corless CL, Heinrich MC (2009) Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin Cancer Res* 15(24): 7510-7518.
- **Grumet** M, Hoffman S, Crossin KL, Edelman GM (1985) Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8075-8079.
- **Gulcher** JR, Nies DE, Marton LS, Stefansson K (1989) An alternatively spliced region of the human hexabrachion contains a repeat of potential N-glycosylation sites. *Dev Biol* 86: 1588-1592.

- **Gulcher** JR, Nies DE, Alexakos MJ, Ravikant NA, Sturgill ME, Marton LS, Stefansson K (1991) Structure of the human hexabrachion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9438-9442.
- **Haller** F, Detken S, Schulten HJ, Happel N, Gunawa B, Kuhlitz J, Füzesi L (2007) Surgical management after neoadjuvant imatinib therapy in gastrointestinal stromal tumours (GISTs) with respect to imatinib resistance caused by secondary KIT mutations. *Ann Surg Oncol* 14(2): 526-532.
- **Hanahan** D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- **Hanamura** N, Yoshida T, Matsumoto E, Kawarada Y, Sakkakura T (1997) Expression of fibronectin and tenascin-C mRNA by myofibroblasts, vascular cells and epithelial cells in human colon adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 73: 10–15.
- **Hancox** RA, Allen MD, Holliday DL, Edwards DR, Pennigton CJ, Guttery DS, Shaw JA, Walker RA, Pringle H, Jones JL (2009) Tumour-associated tenascin-C isoforms promote breast cancer cell invasion and growth by matrix metalloproteinase-dependent and independent mechanisms. *Breast Canc Res* 11:R24.
- **Hauptmann** S, Zardi L, Siri A, Carnemolla B, Borsi L, Castellucci M, Klosterhalfen B, Hartung P, Weis J, Stöcker G, Haubeck H-D, Kirkpatrick CJ (1995) Extracellular matrix proteins in colorectal carcinomas : Expression of Tenascin and Fibronectin isoforms. *Lab Invest* 73(2): 172-182.
- **Hay** ED (1981) Extracellular Matrix. *J Cell Biol* 91(3): 205-223.
- **Heinrich** MC, Corless CL (2005) Gastric GI stromal tumors (GISTs): the role of surgery in the era of targeted therapy. *J Surg Oncol* 90(3): 195-207.
- **Heinrich** MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA (2003) PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299: 708-710.
- **Heinrich** MC, Corless CL, Blanke CD, Demetri GD, Joensuu H, Roberts PJ, Eisenberg BL, von Mehren M, Fletcher CD, Sandau K, McDougall K, Ou WB, Chen CJ, Fletcher JA (2006) Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 24(29): 4764-4774.
- **Heinrich** MC, Maki RG, Corless CL, Antonescu CR, Harlow A, Griffith D, Town A, McKinley A, Ou WB, Fletcher JA, Fletcher CD, Huang Y, Cohen DP, Baum CM, Demetri GD (2008) Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 26(33): 5352-5359.



- **Hemesath** TJ, Marton LS, Stefansson K (1994) Inhibition of T cell activation by the extracellular matrix protein Tenascin. *J Immunol* 152(11): 5199-5207.
- **Herlyn** M, Graeven U, Speicher D, Sela BA, Bannicelli JL, Kath R, Guerry D 4th (1991) Characterization of Tenascin secreted by human melanoma cells. *Cancer Res* 51(18): 4853-4858.
- **Hicke** BJ, Marion C, Chang YF, Gould T, Lynott CK, Parma D, Schmidt PG, Warren S (2001) Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein. *J Biol Chem* 276(52): 48644-48654.
- **Hicke** BJ, Stephens AW, Gould T, Chang YF, Lynott CK, Heil J, Borkowski S, Hilger CS, Cook G, Warren S, Schmidt PG (2006) Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med* 47(4): 668-678.
- **Hirota** S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y (1998) Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279: 577-580.
- **Hsia** HC, Schwarzbauer JE (2005) Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol Chem* 280(29): 26641-26644.
- **Huang** W, Chiquet-Ehrismann R, Moyano JV, Garcia-Pardo A, Orend G (2001) Interference of Tenascin-C with Syndecan-4 binding to Fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Res* 61(23): 8586-8594.
- **Ibrahim** SN, Lightner, VA, Ventimiglia JB, Ibrahim GK, Walther PJ, Bigner DD, Humphrey PA (1993) Tenascin expression in prostatic hyperplasia, intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 24(9): 982-989.
- **Ilmonen** S, Jahkola T, Turunen JP, Muhonen T, Asko-Seljavaara S (2004) Tenascin-C in primary malignant melanoma of the skin. *Histopathology* 45: 405–411.
- **Ishihara** A, Yoshida T, Tamaki H, Sakakura T (1995) Tenascin expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance. *Clin Cancer Res* 1: 1035-1041.
- **Ishiwata** T, Takahashi K, Shimanuki Y, Ohashi R, Cui R, Takahashi F, Shimizu K, Miura K, Fukuchi Y (2005) Serum Tenascin-C as a potential predictive marker of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 25(1): 489-495.
- **Iskaros** BF, Tanaka KE, Hu X, Kadish AS, Steinberg JJ (1997) Morphologic Pattern of Tenascin as a diagnostic biomarker in colon cancer. *J Surg Oncol* 64: 98–101.
- **Joensuu** H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, Silberman S, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B, Demetri GD

- (2001) Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 344(14): 1052-1056.
- **Joester** A, Faissner A (1999) Evidence for combinatorial variability of Tenascin-C isoforms and developmental regulation in the mouse central nervous system. *J Biol Chem* 274 (24): 17144-17151
  - **Jones** FS, Burgoon MP, Hoffman S, Crossin KL, Cunningham BA, Edelman GM (1988) A cDNA clone for cytotoxin contains sequences apparently homologous to EGF repeats and segments of fibronectin and fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2186-2190.
  - **Jones** FS, Hoffman S, Cunningham BA, Edelman GM (1989) A detailed structural model of Cytotoxin: Protein homologies, alternative RNA splicing and binding regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1905-1909.
  - **Jones** PL, Jones FS (2000) Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biol* 19: 581-596.
  - **Kaarteenaho-Wiik** R, Lakari E, Soini Y, Pöllänen R, Kinnula VL, Pääkkö P (2000) Tenascin expression and distribution in pleural inflammatory and fibrotic diseases. *J Histochem Cytochem* 48: 1257-1268.
  - **Kammerer** RA, Schulthess T, Landwehr R, Lustig A, Fischer D, Engel J (1998) Tenascin-C hexamer assembly is a sequential two-step process initiated by coiled-coil alpha-helices. *J Biol Chem* 273(17): 10602-10608.
  - **Kaplony** A, Zimmermann DR, Fischer RW, Imhof BA, Odermatt BF, Winterhalter KH, Vaughan L (1991) Tenascin M<sup>r</sup>220000 isoform expression correlates with corneal cell migration. *Development* 112: 605-614.
  - **Kimura** S, Ishida S, Matsunaga K, Washizu K, Hiraiwa H, Takeuchi K, Wakabayashi T, Yoshida J, Kato K (1993) Determination of Tenascin in human serum by the use of a new enzyme immunoassay. *Biomed Res* 14: 203-208.
  - **Kindblom** LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM (1998) Gastrointestinal stromal tumours show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 152: 1259-1269.
  - **Koukoulis** GK, Gould VE, Bhattacharyya A, Gould JK, Howedy AA, Virtanen I (1991) Tenascin in normal, reactive, hyperplastic, and neoplastic tissues: biologic and pathologic implications. *Hum Pathol* 22: 636-643.
  - **Kruse** J, Keilhauer G, Faissner A, Timpl R and Schachner M (1985) The J1 glycoprotein - a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature* 31: 146-148.

- **Krystal** GW, Honsawek S, Litz J, Buchdunger E (2000) The selective tyrosine kinase inhibitor STI 571 inhibits small cell lung cancer growth. *Clin Cancer Res* 6: 3319–3326.
- **Kupperwasser** C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L, Richardson A, Weinberg RA (2004) Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *PNAS* 101(14): 4966-4971.
- **Kusagawa** H, Onoda K, Namikawa S, Yada I, Okada A, Yoshida T, Sakakura T (1998) Expression and degeneration of Tenascin-C in human lung cancers. *Br J Cancer* 77(1): 98-102.
- **Lacour** JP, Vielteta A, Chiquet-Ehrismann R, Pisani A, Ortonne JP (1992) Increased expression of tenascin in the dermis in skleroderma. *Br J Dermatol* 127: 328- 334.
- **Laitinen** A, Altraja A, Kampe M, Linden M, Virtanen I, Laitinen LA (1997) Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 951–958.
- **Lawniczak** M, Sikora J, Kania P, Zeromski J (1992) The search for tumor-associated proteins in pleural effusions by means of monoclonal antibodies and a dot blot assay. *Lung* 170(2): 65-74.
- **Leins** A, Riva P, Lindstedt R, Davidoff MS, Mehraein P, Weis S (2003) Expression of Tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma. *Cancer* 98(11): 2430-2439.
- **Linder** S, Castañós-Velez E, von Rosen A, Biberfeld P (2001) Immunohistochemical expression of extracellular matrix proteins and adhesion molecules in pancreatic carcinoma. *Hepatogastroenterology* 48(41):1321-7.
- **Liotta** LA (1986) Tumour invasion and metastasis — role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 46: 1–7.
- **Liotta** LA, Kohn EC (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411: 375–379.
- **Lowe** SW, Cepero E, Evan G (2004) Intrinsic tumor suppression. *Nature* 432: 307-315.
- **Lundin** M, Nordling S, Lundin J, Haglund C (2007) Tenascin-C expression and its prognostic significance in colorectal cancer. *Oncology* 72: 403-409.
- **Luoti** A, Nordling S, Louhimo J, Lundin J, Haglund C (2004) Tenascin-C expression is upregulated in pancreatic cancer and correlates with differentiation. *J Clin Pathol* 57: 1151-1155.
- **Mackie** EJ (1994) Tenascin in connective tissue development and pathogenesis. *Perspect Dev Neurobiol* 2(1): 125-132.

- **Mackie** EJ, Tucker RP (1992) Tenascin in bone morphogenesis: expression by osteoblasts and cell type-specific expression of splice variants. *J Cell Sci* 103(3): 765-771.
- **Mackie** EJ, Thesleff I, Chiquet-Ehrismann R (1987) Tenascin Is Associated with Chondrogenic and Osteogenic Differentiation In Vivo and Promotes Chondrogenesis In Vitro. *J Cell Biol* 105 (6): 2569- 2579.
- **Mackie** EJ, Halfter W, Liverani D (1988) Induction of Tenascin in healing wounds. *J Cell Biol* 107(6): 2757-2767.
- **Von der Mark** K, Von der Mark H, Goodman S (1992) Cellular responses to extracellular matrix. *Kidney Int* 41: 632-640.
- **Maschler** S, Grunert S, Danielopol A, Beug H, Wirl G (2004) Enhanced Tenascin-C expression and matrix deposition during Ras/TGF-beta-induced progression of mammary tumor cells. *Oncogene* 23(20): 3622-3633.
- **Matsuda** A, Hirota T, Akahoshi M, Shimizu M, Tamari M, Miyatake A, Takahashi A, Nakashima K, Takahashi N, Obara K, Yuyama N, Doi S, Kamogawa Y, Enomoto T, Ohshima K, Tsunoda T, Miyatake S, Fujita K, Kusakabe M, Izuhara K, Nakamura Y, Hopkin J, Shirakawa T (2005) Coding SNP in tenascin-C Fn-III-D domain associates with adult asthma. *Hum Mol Genet* 14(19): 2779-2786.
- **Meiners** S, Geller HM (1997) Long and short splice variants of human tenascin differentially regulate neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 10: 100-116.
- **Midwood** KS, Orend G (2009) The role of Tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* 3(3-4): 287–310.
- **Midwood** KS, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebault A, Chan E, Drexler S, Sofat N, Kashiwagi M, Orend G, Brennan F, Foxwell B (2009) Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nature Med* 15: 774-780.
- **Miettinen** M, Lasota J (2001) Gastrointestinal stromal tumors – definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 438: 1–12.
- **Miettinen** M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J (1999) Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Hum Pathol* 30(10): 1213-1220.
- **Miettinen** M, Majidi M, Lasota J (2002) Pathology and diagnostic criteria of gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review. *Eur J Cancer* 38(5): 39-51.
- **Mighell** AJ, Thompson J, Hume WJ, Markham AF, Robinson PA (1998) Human tenascin-C: Identification of a novel type III repeat in oral cancer and of novel splice variants in normal, malignant and reactive oral mucosae. *Int J Pathol* 72: 236-240.

- **Moritz S**, Lehmann S, Faissner A, von Holst A (2008) An induction gene trap screen in neural stem cells reveals an instructive function of the niche and identifies the splicing regulator *sam68* as a tenascin-C-regulated target gene. *Stem Cells* 26(9): 22321-22331.
- **Mueller MM**, Fusening NE (2004) Friends or Foes- Bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 839-849.
- **Murphy-Ullrich JE**, Lightner VA, Aukhil I, Yan YZ, Erickson HP, Höök M (1991) Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human Tenascin. *J Cell Biol* 115(4): 1127-36.
- **Natali PG**, Nicotra MR, Bigotti A, Botti C, Castellani P, Risso AM, Zardi L (1991) Comparative analysis of the expression of the extracellular matrix protein Tenascin in normal human fetal, adult and tumor tissues. *Int J Cancer* 47: 811-816.
- **Nies DE**, Hemesath TJ, Kim J-H, Gulcher JR, Steffanson K (1991) The Complete cDNA Sequence of Human Hexabrachion (Tenascin). *J Biol Chem* 266: 2818-2823.
- **Nilsson B**, Bümbling P, Meis-Kindblom JM, Odén A, Dortok A, Gustavsson B, Sablinska K, Kindblom LG (2005) Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era - A population-based study in western Sweden. *Cancer* 103(4): 821-829.
- **Oike Y**, Hiraiwa H, Kawakatsu H, Nishikai M, Okinaka T, Suzuki T, Okada A, Yatani R, Sakakura T (1990) Isolation and characterization of human fibroblast tenascin. An extracellular matrix glycoprotein of interest for developmental studies. *Int J Dev Biol* 34: 309-317.
- **Van Oosterom AT**, Judson I, Verweij J, Stroobants S, Donato di Paola E, Dimitrijevic S, Martens M, Webb A, Sciot R, Van Glabbeke M, Silberman S, Nielsen OS, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. (2001) Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 358(9291): 1421-1423.
- **Orend G**, Chiquet-Ehrismann R (2000) Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Exp Cell Res* 261(1): 104-110.
- **Orend G**, Chiquet-Ehrismann R (2006) Tenascin- C induced signaling in cancer. *Cancer Lett* 244: 143-163.
- **Orsmark-Pietras C**, Melen E, Vendelin J, Bruce S, Laitinen A, Laitinen LA, Lauener R, Riedler J, von Mutius E, Doekes G, Wickman M, van Hage M, Pershagen G, Scheynius A, Nyberg F, Kere J (2008) Biological and genetic interaction between tenascin C and neuropeptide S receptor 1 in allergic diseases. *Hum Mol Genet* 17: 1673–1682.

- **Oyama** F, Hirohashi S, Shimosato Y, Titani K, Sekiguchi K (1991) Qualitative and quantitative changes of human Tenascin expression in transformed lung fibroblast and lung tumor tissues: comparison with Fibronectin. *Cancer Res* 51: 4876-4881.
- **Paget** S (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1: 571-572.
- **Pauli** C, Stieber P, Schmitt UM, Andratschke M, Hoffmann K, Wollenberg B (2002) The significance of Tenascin-C serum level as tumor marker in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 22(5): 3093-3097.
- **Pilch** H, Schäffer U, Schlenger K, Lautz A, Tanner B, Höckel M, Knapstein PG (1999) Expression of Tenascin in human cervical cancer- Association of Tenascin expression with clinicopathological parameters. *Gynecol Oncol* 73: 415-421.
- **Prieto** AL, Jones FS, Cunningham BA, Crossin KL, Edelman GM (1991) Localization during Development of Alternatively Spliced Forms of Cytotactin mRNA by In Situ Hybridization. *J Cell Biol* 111: 685-698.
- **Rathjen** FG, Wolff JM, Chiquet-Ehrismann R (1991) Restrictin: a chick neural extracellular matrix protein involved in cell attachment co-purifies with the cell recognition molecule F11. *Dev Biol* 113: 151-164.
- **Reardon** DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, Herndon JE 2nd, McLendon RE, Pegram CN, Provenzale JM, Quinn JA, Rich JN, Vredenburgh JJ, Desjardins A, Gururangan S, Badruddoja M, Dowell JM, Wong TZ, Zhao XG, Zalutsky MR, Bigner DD (2006) Salvage radioimmunotherapy with murine iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: phase II study results. *J Clin Oncol* 24(1): 115-22.
- **Rettig** WJ, Triche TJ, Garin-Chesa P (1989) Stimulation of human neuronectin secretion by brain-derived growth factors. *Brain Res* 487: 171-177.
- **Richter** P, Tost M, Franz M, Altendorf-Hofmann A, Junker K, Borsi L, Neri D, Kosmehl H, Wunderlich H, Berndt A (2009) B and C domain containing tenascin-C: urinary markers for invasiveness of urothelial carcinoma of the urinary bladder?. *J Cancer Res Clin Oncol* 135(10): 1351-1358.
- **Riedl** S, Bodenmüller H, Hinz U, Holle R, Möller P, Schlag P, Herfarth C, Faissner A (1995) Significance of Tenascin serum level as tumor marker in primary colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 64(1): 65-69.
- **Riedl** S, Möller P, Faissner A, Schlag P (1992) Induction and altered distribution of tenascin in the basal lamina of colorectal adenomas and carcinomas. *EXS* 61: 277-281.

- **Rizzieri** DA, Akabani G, Zalutsky MR, Coleman RE, Metzler SD, Bowsher JE, Toaso B, Anderson E, Lagoo A, Clayton S, Pegram CN, Moore JO, Gockerman JP, DeCastro C, Gasparetto C, Chao NJ, Bigner DD (2004) Phase 1 trial study of 131I-labeled chimeric 81C6 monoclonal antibody for the treatment of patients with non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 104(3): 642-648.
- **Robinson** TL, Sircar K, Hewlett BR, Chorneyko K, Riddell RH, Huizinga JD (2000) Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD34-positive interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 156(4): 1157-1163.
- **Van Roggen** JFG, Van Velthuisen MLF, Hogendoorn PCW (2001) The histopathological differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 54: 96-102.
- **Ruiz** C, Huang W, Hegi ME, Lange K, Hamou M-F, Fluri E, Oakeley EJ, Chiquet-Ehrismann R, Orend G (2004) Differential gene expression analysis reveals activation of growth promoting signaling pathways by Tenascin-C. *Cancer Res* 64: 7377-7385.
- **Sage** EH, Bornstein P (1991) Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, Tenascin, and Thrombospondin. *J Biol Chem* 266(23): 14831-14834.
- **Salmenkivi** K, Haglund C, Arola J, Heikkila P (2001) Increased expression of Tenascin in pheochromocytomas correlates with malignancy. *Am J Surg Pathol* 25: 1419-1423.
- **Sarasa-Renedo** A, Chiquet M (2005) Mechanical signals regulating extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Scand J Med Sci Sports* 15(4): 223-230.
- **Sarlomo-Rikala** M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M (1998) CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 11(8): 728-734.
- **Schalkwijk**, J, Van Vlijmen I, Oosterling B, Perret C, Koopman R, Van den Born J, Mackie EJ (1991) Tenascin expression in hyperproliferative skin diseases. *Br J Dermatol* 124(1): 13-20.
- **Schenk** S, Bruckner-Tuderman L, Chiquet-Ehrismann R (1994) Dermo-epidermal separation is associated with induced tenascin expression in human skin. *Br J Dermatol* 133: 13-22.
- **Schenk** S, Muser J, Vollmer G, Chiquet-Ehrismann R (1995) Tenascin-C in serum: A questionable tumor marker. *Int J Cancer* 61: 443- 449.
- **Scherberich** A, Tucker RP, Samandari E, Brown-Luedi M, Martin D, Chiquet-Ehrismann R (2004) Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed

- in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. *J Cell Sci* 117: 571–581.
- **Scherberich** A, Tucker RP, Degen M, Brown-Luedi M, Andres AC Chiquet-Ehrismann R (2005) Tenascin-W is found in malignant mammary tumors, promotes alpha8 integrin-dependent motility and requires p38MAPK activity for BMP-2 and TNF-alpha induced expression in vitro. *Oncogene* 24: 1525–1532.
  - **Schold** SC Jr., Zalutsky MR, Coleman RE, Glantz MJ, Friedmann AH, Jaszczak RJ, Bigner SH, Bigner DD (1993) Distribution and dosimetry of I-123-labeled monoclonal antibody 81C6 in patients with anaplastic glioma. *Invest Radiol* 28(6): 488-496.
  - **Schwögler** S, Odenthal M, Meyer zum Büschenfelde KH, Ramadori G (1992) Alternative splicing products of the tenascin gene distinguish rat liver fat storing cells from arterial smooth muscle cells and skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 185(2): 768-775.
  - **Shirasaki** F, Makhluף HA, LeRoy C, Watson DK, Trojanowska M (1999) Ets transcription factors cooperate with Sp1 to activate the human tenascin-C promoter. *Oncogene* 18(54): 7755-64.
  - **Shoji** T, Kamiya T, Tsubura A, Hamada Y, Hatano T, Hioki K, Morii S (1993) Tenascin staining positivity and the survival of patients with invasive breast carcinoma. *J Surg Res* 55(3): 295- 297.
  - **Simon** R, Mirlacher M, Sauter G (2004) Tissue microarrays. *Biotechniques* 36: 98–105.
  - **Siri** A, Carnemolla B, Saginati M, Leprini A, Casari G, Baralle F, Zardi L (1991) Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitopes recognized by two monoclonal antibodies. *Nucleic Acids Res* 19: 525-531.
  - **Spring** J, Beck K, Chiquet-Ehrismann R (1989) Two contrary functions of Tenascin: dissection of the active sites by recombinant Tenascin fragments. *Cell* 59(2): 325-334.
  - **Stroobants** S, Goeminne J, Seegers M, Dimitrijevic S, Dupont P, Nuyts J, Martens M, van den Borne B, Cole P, Sciot R, Dumez H, Silberman S, Mortelmans L, van Oosterom A (2003) 18FDG-Positron emission tomography for the early prediction of response in advanced soft tissue sarcoma treated with imatinib mesylate (Imatinib). *Eur J Cancer* 39: 2012–2020.
  - **Sriramarao** P, Bourdon MA (1993) A novel Tenascin type III repeat is part of a complex of Tenascin mRNA alternative splices. *Nucleic Acids Res* 1993 21(1): 163-168.



- **Sugawara** I, Hirakoshi J, Masunaga A, Itoyama S, Sakakura T (1991) Reduced Tenascin expression in colonic carcinoma with lymphogenous metastasis. *Invasion Metastasis* 11(6): 325-331.
- **Suwiat** S, Ricciardelli C, Tammi R, Tammi M, Auvinen P, Kosma V-M, LeBaron RG, Raymond WA, Tilley WD, Horsfall DJ (2004) Expression of extracellular matrix components Versican, Chondroitin Sulfate, Tenascin and Hyaluronan and their association with disease outcome in node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 10: 2491-2498.
- **Takatsugu** T, Inada H, Kalembeiyi I, Imanaka-Yoshida K, Sakakibara M, Okada R, Katsuta K, Sakakura T, Majima Y, Yoshida T (2003) Involvement of Large Tenascin-C Splice Variants in Breast Cancer Progression. *Am J Path* 162: 1857-1867.
- **Takeda** H, Oike Y, Sakakura T (1988) Immunofluorescent localization of tenascin during development of the mouse urogenital sinus: Possible involvement in genital duct morphogenesis. *Differentiation* 39(2): 131-138.
- **Takeda** A, Otani Y, Iseki H, Aikawa K, Tabuchi S, Shinozuka N, Saeki T, Okazaki Y, Koyama I (2007) Clinical significance of large tenascin-C spliced variant as a potential biomarker for colorectal cancer. *World J Surg* 31: 388–394.
- **Tavazoie** SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massagué J (2008) Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451: 147-152.
- **Taylor** HC, Lightner VA, Beyer WF Jr, McCaslin D, Briscoe G, Erickson HP (1989) Biochemical and structural studies of tenascin/hexabrachion proteins. *J Cell Biochem* 41(2):71-90.
- **Tiitta** O, Wahlström T, Paavonen J, Linnala A, Sharma S, Gould VE, Virtanen I (1992) Enhanced Tenascin expression in cervical and vulvar koilocytotic lesions. *Am J Pathol* 141(4): 907-913.
- **Tran** T, Davila JA, El-Serag HB (2005) The Epidemiology of Malignant Gastrointestinal Stromal Tumors: An Analysis of 1,458 Cases from 1992 to 2000. *Am J Gastroenterol* 100(1): 162-168.
- **Tsukada** B, Terasaki F, Shimomura H, Otsuka K, Otsuka K, Katashima T, Fujita S, Imanaka-Yoshida T, Hiroe M, Kitaura Y (2009) High prevalence of chronic myocarditis in dilated cardiomyopathy referred for left ventriculoplasty: expression of Tenascin C as a possible marker for inflammation. *Human Pathol* 40(7): 1015-1022.
- **Tucker** RP (1993) The in situ localization of tenascin splice variants and thrombospondin 2 mRNA in the avian embryo. *Development* 117(1): 347-358.

- **Tucker** RP (1994) The function of tenascin: hypotheses and current knowledge. *Perspect Dev Neurobiol* 2: 1-132
- **Tucker** RP, Chiquet-Ehrismann R (2009) The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments. *Biochim Biophys Acta* 1793: 888-892.
- **Tucker** RP, Drabikowski K, Hess JF, Ferralli J, Chiquet-Ehrismann R, Adams JC (2006) Phylogenetic analysis of the tenascin gene family: evidence of origin early in the chordate lineage. *BMC evolutionary biology*, 6: 60.
- **Ueyama** T, Guo KJ, Hashimoto H, Daimaru Y, Enjoji M (1992) A clinicopathologic and immunohistochemical study of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 69(4): 947-955.
- **Vaidya** P, Yosida T, Sakakura T, Yatani R, Noguchi T, Kawarada Y (1996) Combined analysis of expression of c-erbB-2, Ki-67 Antigen and Tenascin provides a better prognostic indicator of carcinoma of the papilla of Vater. *Pancreas* 12(2): 196-201.
- **Verweij** J, Casali PG, Zalcberg J, LeCesne A, Reichardt P, Blay JY, Issels R, Van Oosterom A, Hogendoorn PC, Van Glabbeke M, Bertulli R, Judson I (2004) Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* 364(9440): 1127-1134.
- **Washizu** K, Kimura S, Hiraiwa H, Matsunaga K, Kuwabara M, Ariyoshi Y, Kato K, Takeuchi K (1993) Development and application of an enzyme immunoassay for Tenascin. *Clin Chim Acta* 219(1-2): 15-22.
- **De Wever**, Nguyen QD, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, Mareel M (2004) Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J* 18(9): 1016-1018.
- **Whitby** DJ, Longaker MT, Harrison MR, Adzick NS, Ferguson MW (1991) Rapid epithelialisation of fetal wounds is associated with the early deposition of tenascin. *J Cell Sci* 99: 583-586.
- **Wiksten** JP, Lundin J, Nordling S, Lundin M, Kokkola A, von Boguslawski K, Haglund C (2003) Tenascin-C expression correlates with prognosis in gastric cancer. *Oncology* 64: 245-250.
- **Williams** DB, Sahai AV, Aabakken L, Penman ID, van Velse A, Webb J, Wilson M, Hoffman BJ, Hawes RH (1999) Endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration biopsy: a large single centre experience. *Gut* 44: 720-726.
- **Xiong** W, Niu PY, Zhu WT, Chen J (2009) Tenascin-C as a prognostic biomarker in osteosarcoma? *Chin Med J* 122(22): 2737-2743.

- **Yamamoto** K, Ichijo H, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G2/M. *Mol Cell Biol* 19(12): 8469-8478.
- **Yoshida** T, Matsumoto E, Hanamura, N, Kalembeiy I, Katsuta K, Ishihara A, Sakakura T (1997) Co-expression of Tenascin and Fibronectin in epithelial and stromal cells of benign lesions and ductal carcinomas in the human breast. *J Pathol* 182: 421–428.
- **Zhao** Y, Young SL (1995) TGF-beta regulates expression of Tenascin alternative-splicing isoforms in fetal rat lung. *Am J Physiol* 268: 173–180.
- **Zukiel** R, Nowak S, Wyszko E, Rolle K, Gawronska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2006) Suppression of human brain tumor with interference RNA specific for tenascin-C. *Cancer Biol Ther* 5(8): 1002-1007.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	<i>Scherin Jeratli</i>
Geburtsdatum	<i>22.07.1985</i>
Geburtsort	<i>Rotenburg/ Wümme</i>
Familienstand	<i>ledig</i>
Staatsangehörigkeit	<i>deutsch</i>
Anschrift	<i>Semperplatz 1</i> <i>22303 Hamburg</i>
Telefonnummer	<i>+49 (0)176 23597863</i>
Emailadresse	<i>s.jeratli@googlemail.com</i>

### Ausbildung

1991- 1995	Stadtschule (Grundschule) in 27356 Rotenburg/ Wümme (Niedersachsen)
1995- 2004	Gymnasialzweig der Kooperativen Gesamtschule in 28844 Weyhe (Niedersachsen). Abschluss: Abitur
2004- 2006	Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg und 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006- 2011	Klinisches Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung voraussichtlich im Frühjahr 2011.
2008-2010	Wissenschaftliche Arbeit im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie der Universität Hamburg
2010-2011	Praktisches Jahr in der psychiatrischen zentralen Notaufnahme des AK Nord (Ochsensoll), der Chirurgie des Israelitischen Krankenhauses und der Abteilung für Innere Medizin des Marienkrankenhauses in Hamburg



Hamburg, im Februar 2011

## 9. 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.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD. Dr. med. J. T. Kaifi, Oberarzt der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, für die Überlassung des Dissertationsthemas und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit. Ich danke ferner Frau Dr. med. T. Rawnaq, wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente.

Ich danke 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.

Mein Dank gilt auch der medizinisch-technischen Angestellten Frau A. Heinecke sowie Frau C. Brodersen aus dem Studiensekretariats 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.

Ferner danke ich der Selbsthilfeorganisation „*Das Lebenshaus e.V.*“ für die einzigartige Unterstützung bei der Beschaffung der Blutproben von GIST-Patienten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Miriam Kunkel für den unvergesslichen Beistand an langen Labortagen sowie für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung der Statistiken.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich meinen Freundinnen Sarah Rengers und Claudia Schob.

Mein ganz persönlicher Dank geht an meine Eltern Widad und Marwan Jeratli, die mir das Studium ermöglicht haben und mich jederzeit mit Vertrauen in meine Fähigkeiten unterstützten.

### **10. Eidesstattliche Versicherung**

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

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

Unterschrift:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Jerath', with a stylized flourish extending from the end.

