

Aus dem Institut für Pathologie
(Prof. Dr. med. P. Ströbel)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

MET-Alterationen als therapeutisches Target bei metastasierten kolorektalen Karzinomen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Amelie Lüders

aus

Westerstede

Göttingen 2024

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in	Prof. Dr. med. P. Ströbel
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. A. Bleckmann
Drittreferent/in:	Prof. Dr. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 06.02.2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „MET-
Alterationen als therapeutisches Target bei metastasierten
kolorektalen Karzinomen“ eigenständig angefertigt und keine
anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel
verwendet zu haben.

Göttingen, den 30.01.2024

.....

(Unterschrift)

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Kolonkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Prävention	2
1.1.2 Klinik	2
1.1.3 Therapie	3
1.2 Met und HGF	4
1.2.1 Physiologie der Metkinase	4
1.2.2 MET in Malignomen	5
1.3 PIK3CA	6
1.4 BRAF und KRAS	7
1.5 MET als Prognostikator	8
1.6 Targeted Therapy unter dem Aspekt von Met, KRAS, PIK3ca und BRAF Mutationen	8
1.7 Varianten der MET-Inhibition	9
1.7.1 HGF-kompetitive molekulare Analoga/ HGF-Antagonisten	10
1.7.2 HGF- Antikörper	11
1.7.3 MET-Antikörper	11
1.7.4 MET-Decoy Rezeptoren	12
1.7.5 MET-Tyrosinkinaseinhibitoren	12
1.7.6 Inhibitoren der Signaltransduktion und Regulierung der MET-Expression ...	13
1.8 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	16
2.1 Material & Probenkollektiv	16
2.2 Methoden	16
2.2.1 Materialblöcke	16
2.2.2 Immunhistochemie	16
2.2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	18
2.2.4 RNA-in-situ-Hybridisierung	20
2.3 Statistische Analysen	21

3	Ergebnisse	23
3.1	Ergebnisse der MET-Immunhistochemie	23
3.2	Ergebnisse der Met-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	24
3.3	Ergebnisse der MET-RNA-in-situ-Hybridisierung	26
3.4	Korrelation der MET-FISH Ergebnisse und der MET-Immunhistochemie	27
3.5	Korrelation der MET-Immunhistochemie und der MET-RNA-ISH	29
3.6	Korrelation der MET-FISH und MET-RNA-Scope Ergebnisse	32
3.7	Ergebnisse der MET-Immunhistochemie, RNA-ISH und FISH im Vergleich	35
3.8	Prognostischer Wert von MET-Aberrationen.....	37
4	Diskussion.....	39
5	Zusammenfassung.....	42
6	Anhang	44
6.1	Protokoll der Fluoreszenz in situ Hybridisierung	44
6.2	Protokoll der Immunhistochemie	45
7	Literaturverzeichnis	46

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1- MET- TYROSINKINASE- MÖGLICHKEITEN DER THERAPEUTISCHEN INTERVENTION (ZHANG ET AL. 2004) MIT FREUNDLICHER GENEHMIGUNG DES ELSEVIER VERLAGES	10
ABBILDUNG 2- IMMUNHISTOCHEMIE; VON LINKS OBEN NACH UNTEN RECHTS- HIGH, INTERMEDIATE, LOW UND NEGATIVE BEWERTETE PROBEN	24
ABBILDUNG 3- ERGEBNISSE DER FISH; OBEN- ERGEBNIS „HOCHGRADIG“, LINKS UNTEN - ERGEBNIS „NIEDRIG“, RECHTS UNTEN- ERGEBNIS „MITTELGRADIG“	25
ABBILDUNG 4- BOXPLOT AUFTRAGUNG IMMUNHISTOCHEMIE UND FISH ERGEBNISSE. IHC SCORE „LOW“ ENTSpricht GRAD 1, „INTERMEDIATE“ ENTSpricht GRAD 2 UND „HIGH“ GRAD 3. FISH- SCORE „LOW“ ENTSpricht EINEM NIEDRIGEN AMPLIFIKATIONSLEVEL, „INTERMEDIATE“ EINEM MITTELGRADIGEN UND „HIGH“ EINEM HOCHGRADIGEN AMPLIFIKATIONSLEVEL.	29
ABBILDUNG 5- BOXPLOT AUFTRAGUNG- ERGEBNISSE DER RNA-ISH IM VERGLEICH ZU IMMUNHISTOCHEMIE ERGEBNISSEN. AUCH HIER ENSpricht IHC-SCORE „LOW“ GRAD 1, „INTERMEDIATE“ GRAD 2 UND „HIGH“ GRAD 3. IM RNA-ISH SCORE ENTSpricht „LOW“ EINEM NIEDRIGEN, „INTERMEDIATE“ EINEM MITTELGRADIGEN, „HIGH“ EINEM HOHEN UND „MAXIMUM“ EINEM MAXIMALEN AMPLIFIKATIONSLEVEL.	32
ABBILDUNG 6- GRAFISCHE AUFTRAGUNG DER ERGEBNISSE DER FISH UND RNA-ISH. „LOW“ ENTSpricht IN BEIDEN SCORES EINEM NIEDRIGEN AMPLIFIKATIONSLEVEL, „INTERMEDIATE“ EINEM MITTELGRADIGEN, „HIGH“ EINEM HOHEN UND „MAXIMUM“ IM RNA-ISH EINEM MAXIMALEN AMPLIFIKATIONSLEVEL.	35
ABBILDUNG 7- EINFLUSS EINES POSITIVEN ERGEBNISSES IN RNA-ISH ODER IMMUNHISTOCHEMIE AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN IN MONATEN. DIE LINKE GRAFIK VERGLEICHT DAS ÜBERLEBEN DER PATIENTEN MIT EINEM IHC ERGEBNIS VON NEGATIV UND GRAD 1 MIT DEN PATIENTEN MIT EINEM POSITIVEN ERGEBNIS (GRAD 2 UND 3, BLAUER GRAPH). DIE RECHTE GRAFIK VERANSCHAULICHT DAS GESAMTÜBERLEBEN DER PATIENTEN MIT NEGATIVEN RNA-ISH ERGEBNIS (ROTER GRAPH) IM VERGLEICH ZU PATIENTEN MIT POSITIVEN ERGEBNIS (BLAUER GRAPH). STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WIRD IN BEIDEN FÄLLEN NICHT ERREICHT (P 0,09, P 0,39).	38

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1- FÄRBEINTENSITÄTSSTUFEN DER IMMUNHISTOCHEMIE	18
TABELLE 2- ERGEBNIS DER IMMUNHISTOCHEMIE	23
TABELLE 3- ERGEBNISHÄUFIGKEITEN IN DER FISH	26
TABELLE 4- ERGEBNISSE DER RNA-ISH	27
TABELLE 5- VERGLEICH DER FISH UND IMMUNHISTOCHEMIE ERGEBNISSE.....	27
TABELLE 6- CHI- QUADRAT UND FISHER'S EXAKT TEST FÜR ERGEBNISÜBEREINSTIMMUNG DER FISH UND IMMUNHISTOCHEMIE.....	28
TABELLE 7- VERGLEICH DER ERGEBNISSE IMMUNHISTOCHEMIE UND RNA-ISH	30
TABELLE 8- CHI-QUADRAT UND FISHER'S EXAKT TEST: IMMUNHISTOCHEMIE VS. RNA-ISH	31
TABELLE 9- ERGEBNISÜBERSICHT DER FISH UND RNA- ISH	33
TABELLE 10- CHI-QUADRAT-TEST UND FISHER'S EXAKT TEST: FISH VS. RNA-ISH	34
TABELLE 11- ÜBERSICHT DER ERGEBNISSE DER DREI METHODEN IM VERGLEICH	37

Abkürzungsverzeichnis

5-FU.....	5-Fluoruracil
AP2.....	<i>activator protein 2</i>
BRAF.....	<i>b-raf proto-oncogene</i>
CA 19-9.....	<i>carbohydrate antigen 19-9</i>
CEA.....	Carcinoembryonales Antigen
CEN.....	<i>centromere (Zentromer)</i>
CRK.....	<i>CT10 oncogene homolog</i>
CRKL.....	<i>crk-like</i>
CSD.....	<i>cancer specific survival</i>
DAPI.....	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAXX.....	<i>death domain associated protein 6</i>
DFS.....	<i>disease free survival</i>
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
EFS.....	<i>event free survival</i>
EGFR.....	<i>epidermal growth factor receptor</i>
Ets.....	<i>e-twenty six</i>
FISH.....	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GRB2.....	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
Gy.....	Gray
HGFR.....	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
HNPCC.....	Hereditäres, nicht polypöses Kolonkarzinom
IHC.....	Immunhistochemie
KRAS.....	<i>kras proto-oncogene</i>
mAb.....	<i>monoclonal antibody</i>
MAPK.....	<i>mitogen-activated protein kinase pathway</i>
Met.....	<i>mesenchymal epithelial transition factor gene</i>
miR-206.....	MicroRNA-206
MRT.....	Magnetresonanztomographie
NSCLC.....	<i>non-small cell lung cancer</i>
OS.....	<i>overall survival</i>
Pax3m.....	<i>paired box 3</i>
PFS.....	<i>progression free survival</i>
PI3K.....	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIC3CA.....	<i>phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PLC γ	Phospholipase C γ
PTK.....	Protein Tyrosine-Kinase
RNA.....	Ribonukleinsäure
SHC.....	<i>src homology-2-containing</i>
SHIP-2.....	<i>src homology domain-containing 5' inositol phosphatase</i>
SRC.....	<i>v-sarcoma viral oncogene homolog</i>
STAT-3.....	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tcf-4.....	<i>transcription factor 4</i>

1 Einleitung

1.1 Kolonkarzinom

Drüsig differenzierte, maligne epitheliale Primärtumore des Kolons und Rektums werden unter dem Begriff ‚kolorektales Karzinom‘ zusammengefasst. Bei dem Großteil der kolorektalen Karzinome (90%) geht man von einem sporadischen Auftreten aus, Umweltfaktoren scheinen jedoch eine entscheidende Rolle zu spielen. So haben diverse Fallkontroll- und Kohortenstudien den Einfluss von Ernährung und Lebensstil untersucht. Bekannte Risikofaktoren sind unter anderem der Verzehr von rotem Fleisch, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Übergewicht und eine geringe körperliche Aktivität (Roock et al. 2011). Die klinische Relevanz molekularpathologischer Untersuchungen tritt insbesondere in dem zunehmenden Verständnis der Adenom-Karzinom Sequenz der Kolonkarzinome zutage (Harada und Morlote 2020).

Tumore oral 16 cm ab ano in der starren Rektoskopie werden als Kolonkarzinome bezeichnet, Tumore aboral 16 cm ab ano als Rektumkarzinome. Letztere werden noch in Karzinome des oberen (12 – 16 cm), mittleren (6 – 12cm) und unteren Drittels unterteilt. Die Einteilung ist einerseits therapeutisch (Radiatio nur bei Rektumkarzinom) und andererseits klinisch (Karzinome des mittleren und unteren Rektumdrittels zeigen gehäuft pulmonale Erstmetastasierung) relevant.

Makroskopisch unterscheidet man drei Typen: den am häufigsten auftretenden schüsselförmig exulzerierten Tumor, den polypös-exophytischen Typ und den seltenen diffus infiltrierenden Typ. Meist liegen Adenokarzinome vor. Der schüsselförmig exulzerierte Tumor entsteht gehäuft infolge der oben genannten Adenom- Karzinom-Sequenz. Das molekularpathologische Korrelat hierzu ist die Anhäufung von Mutationen, die zur Aktivierung von Protoonkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führt. Die Mutationssequenz beim kolorektalen Karzinom beginnt typischerweise mit dem Loss-of- Heterozygosity des Chromosoms 5- der Inaktivierung des APC-Gens. Typische weitere Mutationen sind die Aktivierung von k-Ras, LOH Chr. 18q (SMAD2 und SMAD4) und die Inaktivierung von p53. Andere Wege zum Kolonkarzinom führen über Hypermethylierung oder Mikrosatelliteninstabilität. Die Morphologie und Lokalisation des Tumors kann ein Hinweis auf die molekularen Ereignisse sein, die zur Krebsentstehung führten. Beispielsweise zeigen invasive Karzinome des rechten Kolons mit ausgeprägter

muzinöser Differenzierung und lymphatischen Infiltrat überdurchschnittlich häufig eine Mikrosatelliteninstabilität (Kumar et al. 2009).

1.1.1 Epidemiologie und Prävention

Kolonkarzinome gehören in Deutschland zu den häufigsten Krebserkrankungen. Die Inzidenz liegt bei Frauen bei etwa 28: 100.000 Neuerkrankungen im Jahr, bei Männern bei ca. 34:100.000. Das mittlere Erkrankungsalter liegt geschlechtsabhängig zwischen 70 Jahren (Männer) und fast 73 Jahren (Frauen) (Barnes et al. 2016). Das Lebenszeitrisiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken beträgt in den USA 5% (Inger 1999). Aufgrund der epidemiologischen Relevanz und der oft palliativen Situation im metastasierten Zustand wird nun schon ab dem 45. Lebensjahr zur Vorsorge und Früherkennung eine Koloskopie empfohlen. Für Personen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms gelten abweichende Empfehlungen. Neben der Koloskopie stehen mit der CT-Kolonographie, Kapselendoskopie, immunologischen Stuhltestung und dem fäkalen okkulten Bluttest diverse weitere Vorsorgemethoden zur Verfügung. Die Koloskopie hat sich jedoch aufgrund der gleichzeitig bestehenden Interventionsmöglichkeit, der Nachweismöglichkeit von Adenomen und nicht-blutenden Karzinomen, sowie aufgrund der insgesamt höheren Sensitivität und Spezifität bei der Erkennung von kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu den oben genannten Methoden durchgesetzt (Leitlinienprogramm Onkologie et al. 2014; Lin et al. 2021) .

1.1.2 Klinik

Die Inzidenz von sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinomen ist von aboral zu oral abnehmend. Die häufigste Lokalisation ist das Rektum mit ca. 50%, gefolgt von dem Sigma (etwa 30%). Im Gegensatz hierzu, liegt der Ort der Tumormanifestation bei HNPCC oft im Colon ascendens oder transversum. Symptome treten oft erst bei fortgeschrittenem Tumorwachstum auf. Rechtsseitige Kolonkarzinome treten häufiger durch Fatigue und Eisenmangelanämie klinisch in Erscheinung. Bei linksseitigen Kolonkarzinomen finden sich okkulte Blutungen, Krämpfe und Veränderungen der Stuhlgewohnheiten. Weit fortgeschrittenes Tumorwachstum kann zur Perforation führen.

Prognoseentscheidend sind die in der TNM-Klassifikation erfasste Infiltrationsstiefe und der Lymphknotenstatus. Zudem zeigen Patienten mit einem synchronen Auftreten von Metastasen eine schlechtere Prognose (Adam et al. 2015). Bei einem Großteil der Patienten

ist der Tumor zum Diagnosezeitpunkt regional begrenzt (Stadium 1-3), jedoch entwickeln ca. 50% im Verlauf Metastasen (Kurzrock und Markman 2008).

1.1.3 Therapie

Vor Beginn der Therapie ist eine histologische Sicherung anzustreben. Man spricht von einem kolorektalen Karzinom (in Abgrenzung zu einem Karzinom in situ), wenn die Submukosa infiltriert ist.

Präoperativ ist eine Staging-Untersuchung erstrebenswert. Beim Kolonkarzinom beinhaltet dies die Abdomensonographie, Koloskopie, Tumormarkerbestimmung (CEA, CA 19-9) und Röntgenaufnahme des Thorax. Letztere wird heutzutage oft durch eine CT-Untersuchung aufgrund der höheren Sensitivität ersetzt. Beim Rektumkarzinom sollte die Staging-Untersuchung um eine MRT des Beckens, eine starre Rektoskopie und eine Endosonographie zur Bestimmung der Infiltrationstiefe und des Lymphknotenstatus ergänzt werden. Da der Lymphknotenbefall einen hohen prognostischen Wert hat, ist die Untersuchung von mindestens 12 Lymphknoten anzustreben. Generell empfiehlt sich die Vorstellung des Patienten in einer interdisziplinären Tumorkonferenz, unter Umständen bereits prätherapeutisch. Die kurative Therapie beginnt meist mit einer radikalen chirurgischen Tumorresektion. Eine präoperative Radiochemotherapie kann auch bei weit fortgeschrittenen Rektumkarzinomen eine Kontinenz erhaltene Operationstechnik ermöglichen. Einzelne Metastasen der Leber und Lunge werden operativ entfernt. Ab UICC-Stadium 3 sollte eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden. Bei Stadium 2 ist die Datenlage zur Verbesserung des Überlebens mit adjuvanter Chemotherapie zurzeit unklar, bei zusätzlichen Risikofaktoren (u. A. Perforation, gering differenzierter Tumor, wenige untersuchte Lymphknoten) kann eine Chemotherapie erwogen werden. Gängige Regime kombinieren meist 5-FU mit Oxaliplatin oder Irinotecan (FOLFOX oder FOLFIRI) (Kurzrock und Markman 2008). Die Strahlentherapie beim Rektumkarzinom findet meistens additiv zur Chemotherapie prä- oder postoperativ ihren Einsatz. Kolorektale Karzinome sind nur mäßig strahlensensibel, es sind oft hohe Dosen (>50 Gy) nötig.

1.1.3.1 Therapie des oligometastasierten kolorektalen Karzinoms

Das oligometastasierte kolorektale Karzinom stellt eine besondere Herausforderung an die Therapie. Unter bestimmten Voraussetzungen sind durchaus kurative Ansätze möglich, jedoch ist derzeit noch kein Standard für den adäquaten Weg zur Heilung etabliert. Der Grundsatz, dass vereinzelte Metastasen soweit möglich operativ entfernt werden sollten, ist

relativ unumstritten (Aigner et al. 2017). Jedoch ist selbst nach einer Resektion sicher im Gesunden die Rezidivrate mit etwa 50% in 24 Monaten hoch (de Jong et al. 2009). Durch perioperative Chemotherapien soll diese Quote gesenkt werden (Kornprat et al. 2007; Nordlinger et al. 2007). Sollte es im Rahmen einer präoperativen Chemotherapie zu dem bildmorphologischen Verschwinden der Metastasen kommen, wird zur Reduktion der sonst hohen Rezidivrate trotzdem zu einer operativen Resektion geraten (Kuhlmann et al. 2016).

Jedoch birgt eine neoadjuvante Chemotherapie die Gefahr, durch die hepatotoxischen Chemotherapeutika die Leberfunktion so weit einzuschränken, dass eine Leberteilresektion zur Metastasen Chirurgie nicht mehr durchgeführt werden kann.

1.2 Met und HGF

Die Relevanz der Tyrosinkinase C-Met beginnt bereits bei der Zellmobilität in der Embryogenese (Hayashi et al. 2005). Über eine Vielzahl von Signalkaskaden ist die Tyrosinkinase nach Bindung ihres Liganden HGF an Vorgängen wie Neoangiogenese, Zellmotilität und -proliferation, sowie Gewebsregeneration beteiligt (Miyazawa et al. 1989; Nakamura et al. 1989; Garcia Stéphane et al. 2007). Jedoch findet sich bei einer Vielzahl an soliden Tumoren des Menschen eine Überaktivität der c-Met Signalkaskade (Krause und Van Etten 2005). Diese kann durch Genmutation, Genalteration oder eine vermehrte Proteinexpression bedingt sein.

1.2.1 Physiologie der Metkinase

Das humane MET/HGFR- Gen liegt auf Chromosom 7q21-q31 und wird in einer Vielzahl von Organen und Zelltypen exprimiert. Die Transkription des Genes wird durch Ets, Pax3m AP2 und Tcf-4 reguliert (Epstein et al. 1996; Gambarotta et al. 1996; Boon et al. 2002). Zu den bekannten Repressoren der Met-Transkription gehören die gastrointestinalen Hormone Cholezystokinin, Carbachol und Bombesin (Hoffmann et al. 2006), DAXX (Morozov et al. 2008) und diverse Mikro-RNAs (miR-206 (Sun et al. 2015a), Hsa-miRNA-139-5p (Sun et al. 2015b) und MiR-199a-3p (Fornari et al. 2010)). Nach der Glykosylierung des Met-Vorläuferproteins verbindet sich die 50 kDa. Alpha-Kette über Disulfidbrücken mit der 140 kDa. großen Beta-Kette. Die Beta-Kette durchläuft eine Membraninsertion, die Alpha-Kette liegt extrazellulär. Der fertige Rezeptor hat so eine große extrazelluläre Ectodomain und eine intrazelluläre PTK- Domain. Unter physiologischen Bedingungen findet sich eine c-Met Expression vor Allem in den Endothelzellen von Lymph- und Blutgefäßen, sowie in

Zellen der Hämatopoese (Grant et al. 1993; Ding et al. 2003). Die Interaktion der Met-Kinase mit seinem Liganden HGF spielt eine entscheidende Rolle bei der Proliferation, dem Überleben, der Invasion und Migration von Zellen (Zhu et al. 1994). Diese Interaktionen besitzen eine Schlüsselrolle bei diversen Vorgängen der Embryogenese (Uehara et al. 1995; Uehara et al. 2000), Angiogenese (Silvagno et al. 1995) und der Wundheilung (Chmielowiec et al. 2007).

Die Bindung des Liganden HGF führt zu einer Homodimerisierung des c-Met Rezeptors und der Phosphorylierung der Tyrosinreste Y1234 und Y1235 der katalytischen Schleife der Tyrosinkinasedomain (Rodrigues et al. 1997). Es folgt die Phosphorylierung der Tyrosinreste 1349 und 1356 des C-Terminus, dies führt zur Bildung der eines Met-spezifischen Tandem-SH2- Erkennungsmotiv Y1349VHVX3Y1356VNV (Ponzetto et al. 1994). Nach der Phosphorylierung der Tyrosinreste werden verschiedene Signaleffektoren rekrutiert- zu diesen gehören die Adapterproteine GRB2 (Fixman et al. 1996), SHC (Pelicci et al. 1995) , CRK , CRKL (Sakkab et al. 2000), und die Effektormoleküle PI3K, PLC γ , SRC (Ponzetto et al. 1994), SHIP-2 (Koch et al. 2005), und der Transkriptionsfaktor STAT-3 (Zhang et al. 2002).

1.2.2 MET in Malignomen

Der Nachweis von Mutationen des MET Gens gelang bereits 1997 in Proben von hereditären papillären Nierenkarzinomen (Schmidt et al. 1997). In den folgenden Jahren konnten Aberrationen des Gens und auch Überexpressionen der Kinase in multiplen weiteren Tumorentitäten nachgewiesen werden (Ma et al. 2008). Mittlerweile gilt die Met-Alteration und Überexpression als vielversprechendes Target in der Therapie von unter anderem Neuroendokrinen Tumoren der Lunge (Song et al. 2010), klarzelligem Adenokarzinomen des Ovars (Yamamoto et al. 2012), Gastrointestinalen Stromatumoren (Cohen et al. 2015) und dem kolorektalen Karzinom (Bradley et al. 2016). Die Überexpression von MET in Tumorgewebe wird mit einer erhöhten Zellmotilität, einer verstärkten Neigung zur Invasion und Angiogenese in Verbindung gebracht (Ma et al. 2008). Bei den Adenokarzinomen des Kolons (Takeuchi et al. 2003; Zeng et al. 2008) und Ovars (Sawada et al. 2007), Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopfbereiches (Di Renzo et al. 2000) und dem inflammatorischen Mamma-Karzinom (Garcia S. et al. 2007) zeigte sich eine Assoziation der Met- Überexpression zur Metastasierungsneigung und einer schlechteren Prognose. Jedoch zeigte sich in einer späteren Studie an kolorektalen Karzinomen kein signifikanter

Zusammenhang der Met Überexpression mit dem Differenzierungsgrad, der Infiltrationstiefe, dem Lymphknotenbefall oder dem krankheitsfreien Überleben- lediglich eine erhöhte Rate an Lokalrezidiven konnte festgestellt werden. Diese Studie berücksichtigte allerdings nur die Met Expression, die mittels Immunhistochemie ermittelt werden konnte (Al-Maghrabi et al. 2015).

Dieses kontroverse Bild der Relevanz der Met Kinase in der Onkologie könnte zum Teil der uneinheitlichen Erfassung der Met- Überaktivität geschuldet sein. Daher legt diese Arbeit einen Fokus auf die verschiedenen Methoden zum Nachweis der Met Alteration oder Überexpression zum Nachweis nicht nur einer erhöhten Proteinexpression, sondern auch der Genalteration, vermehrten Transkription und dem Vorkommen von Splice-Varianten.

1.3 PIK3CA

PIK3CA gehört zur Familie der Phosphoinositid-3-Kinasen. Die Signaltransduktion über Phosphoinositid-3-Kinasen spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Immunantwort (Stark et al. 2015), des Zellwachstums, der Migration, der Zelldifferenzierung, des Zellüberlebens und der Zelladhäsion (Cathomas 2014). Phosphoinositid-3-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung an der 3'-OH Position am Inositolring von Phosphatidylinositolen. Nach der Proteindomänenstruktur der katalytischen Untereinheit werden die Phosphoinositid-3-Kinasen in drei funktionelle Klassen eingeteilt (1a, 1b, 2, 3).

PIK3CA gehört zur Untergruppe 1a. Kinasen dieser Untergruppe sind Heterodimere bestehend aus einer p110 katalytischen Untereinheit und einer p85 regulatorischen Untereinheit. Die regulatorische p85 Untereinheit existiert in fünf Varianten (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , p55 γ), die ersten drei sind Splice-Varianten des *Pik3r1*-Gens. Die katalytische p110 Untereinheit lässt sich ebenfalls in drei Varianten einteilen: p110 α , p110 β und p110 δ . Die katalytischen Untereinheiten werden jeweils von unterschiedlichen Genen kodiert. P110 α von *Pik3ca*, p110 β von *Pik3cb* und p110 δ von *Pik3cd*.

Eine PIK3CA Mutation lässt sich bei ca. 10-20% der kolorektalen Karzinomen nachweisen, interessanterweise in abnehmender Inzidenz je weiter aboral der Primärtumor liegt (im proximalen Kolon bis zu 25%, im Rektum ca. 10 %) (Rosty et al. 2013; Ogino et al. 2014). PIK3CA Mutationen finden sich gehäuft bei KRAS mutierten Tumoren, bei BRAF Mutationen hingegen ließ sich keine Häufung nachweisen (Nosho et al. 2008). In einigen Studien zeigte sich bei Patienten mit BRAF Wildtyp und PIK3CA Mutation eine signifikant

verkürzte Überlebenszeit (Rosty et al. 2013), dies scheint insbesondere bei simultanen Mutationen in Exon 9 und 20 zu gelten (Liao et al. 2012). Der prognostische Wert der PIK3CA Mutation ließ sich jedoch in weiteren Studien nicht nachweisen (Eklöf et al. 2013).

1.4 BRAF und KRAS

Der MAPK Signalweg spielt physiologisch eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung, dem Überleben und der Alterung von Zellen (Wellbrock et al. 2004). Mutationen von RAS und RAF können eine Umgehung der Regulation des Signalweges bedingen und sind daher häufig bei Tumorerkrankungen zu finden (Roberts und Der 2007; Schubert et al. 2007)- RAS Mutationen zeigten in Studien eine Prävalenz von über 50% bei metastasierten kolorektalen Karzinomen (Peeters et al. 2015). Zudem spielt RAS in dem durch EGFR und Ras-small-GTPase-Mutationen angestoßenem Signalweg eine Schlüsselrolle (Roberts und Der 2007).

Die häufigste Mutation von BRAF ist mit über 90 % der Austausch eines Thyminrestes an Position 1799 mit Adenin (Tan et al. 2008).

Bei dem kolorektalen Karzinom zeigen sowohl BRAF als auch KRAS mutierte Tumore ein signifikant schlechteres Überleben (Lièvre et al. 2006). BRAF Mutationen finden sich gehäuft bei papillären Schilddrüsenkarzinomen (Xing et al. 2014), bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Sánchez-Torres et al. 2013; Luk et al. 2015), kolorektalen Karzinomen (Thiel et al. 2013), Ovarialkarzinomen (Vang et al. 2009), Melanomen (Fargnoli et al. 2008; Salama und Flaherty 2013) und Prostatakarzinomen (Cho et al. 2006). Bei dem Adenokarzinom der Prostata zeigten Studien bisher jedoch nur bei ostasiatischen Populationen eine signifikante Inzidenz (Köllermann et al. 2010; Ren et al. 2012). Der BRAF und KRAS Mutationsstatus erhält eine besondere Bedeutung bei der Planung des Therapieregiments- mutierte Tumore zeigten in Studien ein signifikant schlechteres Ansprechen auf EGFR-Antikörpertherapien (Gong et al. 2016), sodass derzeit von einer EGFR Antikörpertherapie bei BRAF oder KRAS mutierten Tumoren abgeraten wird (National Comprehensive Cancer Network 2017).

Zudem spielen BRAF Mutationen eine Rolle bei der Pathophysiologie verschiedener syndromaler Erkrankungen und den mit ihnen einhergehenden erhöhten Krebsrisiko: unter anderem dem Noonan Syndrom, Costello Syndrom und dem cardio-fazio-kutanem Syndrom (Tidyman und Rauen 2008; Tartaglia et al. 2011).

1.5 MET als Prognostikator

Die klinische Relevanz der MET-Kinase begründet sich nicht allein in der Möglichkeit des therapeutischen Nutzens, sondern bereits in der prognostischen Bedeutung einer MET-Alteration oder Überexpression.

Der negative Einfluss einer MET-Überexpression konnte bereits in einer Meta-Analyse 2015 unter Einschluss von 11 Einzelstudien belegt werden (Liu et al. 2015). Die bisherigen Studien beschäftigen sich jedoch primär mit dem prognostischen Einfluss des MET-Alterationsstatus des Primarius. Die Rolle der molekularpathologischen Charakteristika der Metastasen eines Tumors fand bisher wenig Beachtung.

Zudem erfolgt selten eine Aufschlüsselung, ob ein Unterschied des prognostischen Einflusses zwischen einer MET-Amplifikation, vermehrten RNA- oder Proteinexpression oder vermehrten Expression durch aktivierende Mutationen besteht. Diese Arbeit legt daher einen Fokus auf den molekularpathologischen Status der Metastasen und untersucht explizit den unterschiedlichen prognostischen Impact der erhöhten Proteinexpression, RNA-Expression oder Gen-Alteration.

1.6 Targeted Therapy unter dem Aspekt von Met, KRAS, PIK3ca und BRAF Mutationen

Der therapeutische Erfolg von moderner Antikörpertherapien hängt entscheidend von der vorhergegangenen molekularpathologischen Analyse und der Therapieanpassung ab. Aktuelle Studien legen nahe, dass von einer Wirksamkeit der EGFR- Inhibition nur beim Vorliegen des KRAS-Wildtyps auszugehen ist (De Roock et al. 2011). Die Datenlage zum Einfluss der PIK3CA-Mutation auf die Wirksamkeit einer EGFR Antikörpertherapie ist widersprüchlich (Prenen et al. 2009; Sartore-Bianchi et al. 2009), bei einer neueren Studie an einem deutlich größeren Patientenkollektiv (Vgl. Prenen et al 200 Patienten vs. De Roock et al 1022 Patienten) wurde hingegen sowohl bei BRAF, NRAS als auch PIK3CA Mutation ein geringeres Ansprechen auf eine EGFR Antikörpertherapie nachgewiesen (De Roock et al. 2010).

Bei einem KRAS mutierten Kollektiv erbrachte der Zusatz von Cetuximab zum regulären Chemotherapie Regiment einen deutlichen Überlebensvorteil (Van Cutsem et al. 2011).

Ähnlich bestand nach den Erfolgen in der Behandlung des metastasierten Melanoms mit BRAF- Inhibitoren die Hoffnung eines Therapiefortschrittes in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms (Flaherty et al. 2010). Leider zeigte sich unter anderem in einer

Phase 2 Studie mit Vemurafenib bei Patienten mit BRAF mutierten, metastasierten kolorektalen Karzinom kein signifikanter Therapieerfolg (Kopetz et al. 2015). Aufgrund des Nachweises einer erhöhten Aktivität des PI3K/AKT Signalweges beim metastasierten kolorektalen Karzinoms im Gegensatz zum Melanom, wurden aktivierende Mutationen des PI3K/AKT Signalweges als Ursache des schlechten Ansprechens des kolorektalen Karzinoms auf eine BRAF-Inhibitor Therapie angenommen. In einer Studie an Zelllinien konnte das verminderte Ansprechen von Zellkulturen mit einer vermehrten Aktivität des PI3K/AKT Weges nachgewiesen werden (Mao et al. 2013). Im selben Jahr wurde im Mausversuch die Kombinationstherapie eines PI3K/mTOR- und BRAF- Inhibitors in vivo als wirksam erwiesen (Coffee et al. 2013).

1.7 Varianten der MET-Inhibition

In der personalisierten onkologischen Therapie stehen derzeit verschiedene Substanzen zur MET-Inhibition zur Verfügung. Es kann die Ligand-Rezeptor-Interaktion inhibiert werden, die MET-Tyrosinkinase direkt oder die Signaltransduktion nach Aktivierung der Tyrosinkinase.

Die Ligand-Rezeptor-Interaktion lässt sich entweder durch Einfluss auf den Liganden HGF oder die extrazelluläre Domain des MET-Rezeptors blockieren: HGF- Antagonisten treten mit HGF in Konkurrenz um die MET- Rezeptor- Bindungsstelle, HGF- Antikörper binden den Liganden und verhindern die Interaktion mit dem Rezeptor und MET- Antikörper binden an die extrazelluläre Rezeptorregion und verhindern eine Aktivierung.

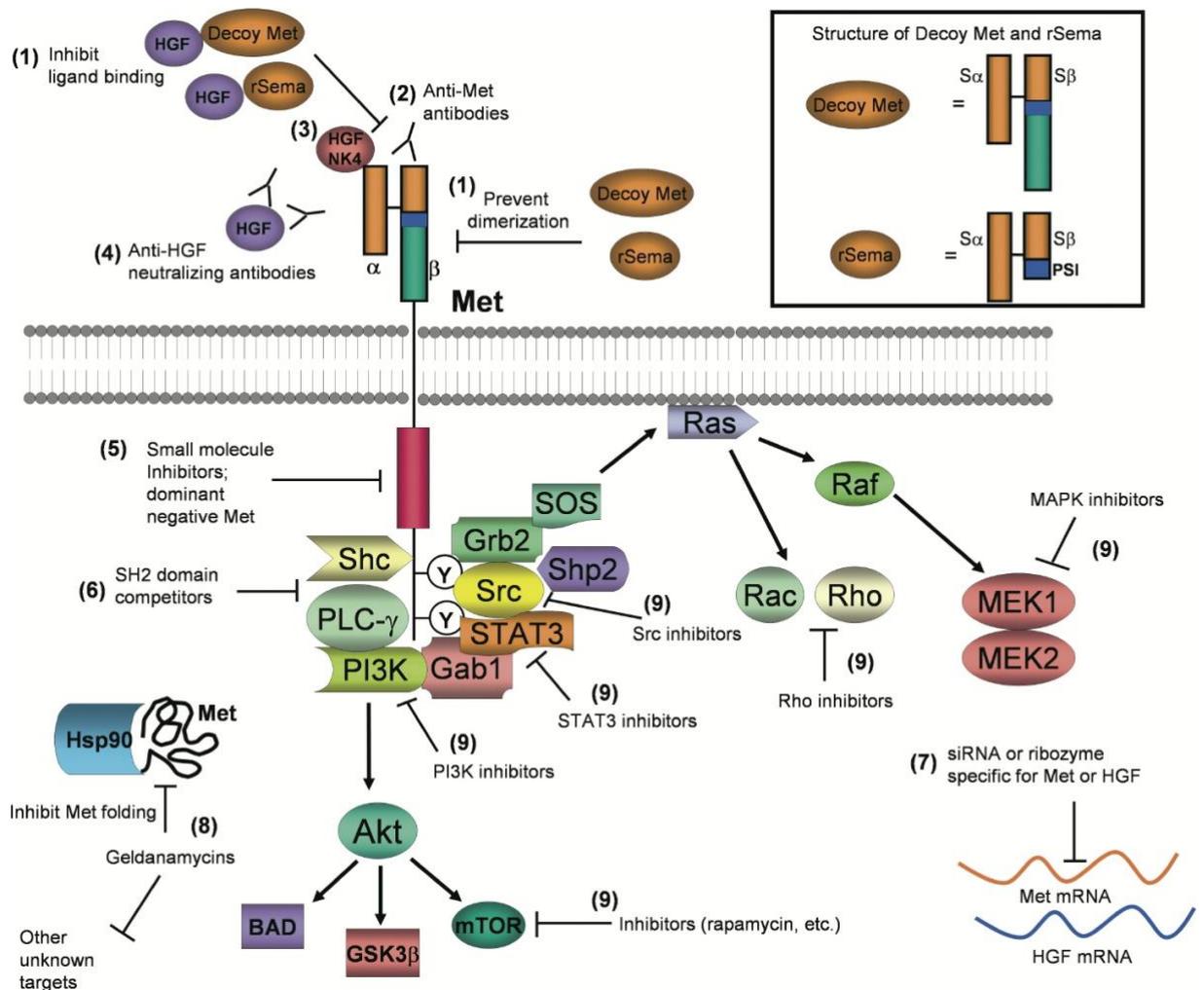


Abbildung 1- MET- Tyrosinkinase- Möglichkeiten der therapeutischen Intervention (Zhang et al. 2004) mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlages

1.7.1 HGF-kompetitive molekulare Analoga/ HGF-Antagonisten

HGF-Antagonisten beeinflussen die Protein-Protein Interaktion zwischen der alpha-Kette des HGF (NK1-Fragment) und der Bindungsstelle der MET-Sema Domain (Winter et al. 2016). In präklinischen Studien wurde eine Hemmung des Tumorwachstums durch die HGF-Analoga NK4 und uncleavable HGF bewiesen (Sawada et al. 2007; Suzuki et al. 2010). NK4 ist ein vollständiger kompetitiver Antagonist an der HGF-Bindungsstelle der MET-Kinase. In vivo wurde sowohl für das Lewis-Lungenkarzinom als auch das B16F10-Melanom eine Reduktion des Tumorwachstums nachgewiesen (Kishi et al. 2009).

Bei uncleavable HGF handelt es sich um ein inaktives Vorläufermolekül, welches mit hoher Affinität an den MET-Rezeptor bindet. Es findet keine proteolytische Aktivierung des uncleavable HGF statt, sodass es nicht zur Homodimerisierung des MET-Rezeptors und zum Anstoß der Signalkaskade kommt.

1.7.2 HGF- Antikörper

HGF-Antikörper binden an den MET-Liganden HGF und können die HGF-induzierte Aktivierung der MET-Kinase dadurch verhindern. Sie wurden in zahlreichen Studien sowohl als Einzel- als auch als Kombinationstherapie auf ihre Sicherheit und Effizienz hin untersucht. Rilotumumab, ein humanisierter IgG-2 monoklonaler Antikörper, erzielte bei Patienten mit Magenkarzinomen oder Karzinomen des ösophagogastralen Überganges eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens, jedoch nur bei den Patienten mit vermehrter MET-Expression in der Immunhistochemie (Zhu et al. 2015). Es besteht zudem begründeter Zweifel daran, ob Rilotumumab eine MET-Aktivierung tatsächlich suffizient inhibiert (Greenall et al. 2016). Ficlaturumab, ein humanisierter IgG-1 monoklonaler Antikörper, erwirkte zwar in pharmakodynamischen Studien eine nachweisbare Reduktion der Aktivität des MET-Signalweges (Tabernero et al. 2014; Kumar et al. 2015), zeigte bisher keine Verbesserung des Überlebens in klinischen Studien (Mok et al. 2016). Ein weiterer humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen HGF ist TAK701. Bei dem nichtkleinzelligen bronchialen Karzinom entwickeln sich im Verlauf einer EGFR-Inhibitoren Therapie oft Resistenzen- die Kombinationstherapie von TAK701 mit dem EGFR-Inhibitor Gefitinib konnte hier eine Inhibition des Wachstums der Tumore in vivo bewirken (Okamoto et al. 2010, S. 7).

1.7.3 MET-Antikörper

Der Großteil der monoklonalen MET-Antikörper verhindert die MET-Aktivierung durch Bindung der extrazellulären Domain des MET-Rezeptors. Eine Ausnahme bildet DN30, dieser Antikörper erzielt seine Wirkung durch die Degradierung des Rezeptors unter Abspaltung der Ektodomain (Petrelli et al. 2006). In präklinischen Studien ließ sich durch die Anwendung von MET-Antikörpern das Tumorwachstum signifikant reduzieren (Martens et al. 2006).

Einer der derzeit gängigsten MET- mAb Onartuzumab , entstand unter Anwendung der Knobs-into-holes-Technik aus dem MET-Agonisten 5D5 (Merchant et al. 2013; Prat et al. 2014). In einigen klinischen Studien zeigte sich unter Therapie mit Onartuzumab eine Verlängerung des Überlebens bei MET-positiven NSCLC (Spigel et al. 2013). In einer neueren Phase 3 klinischen Studie kein Benefit durch die zusätzliche Gabe von Onartuzumab zu Erlotinib bei MET-positiven Stadium IIIB oder IV NSCLC nachweisen (Spigel et al. 2017). Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine Phase 2 Studie an fortgeschrittenen

ösophagogastralen oder gastralen Tumoren 2016- der Zusatz von Onartuzumab zu dem Chemotherapieregiment FOLFOX erbrachte weder in dem kompletten Patientenkollektiv noch in der Immunhistochemie MET-positiven Gruppe einen Überlebensvorteil (Shah et al. 2016). Auch beim HER2-negativen, MET-positiven (bestimmt anhand von Immunhistochemie) Mamma-Karzinom war kein Vorteil der Kombinationstherapie festzustellen (Shah et al. 2017). Zudem sind die nicht unerheblichen Nebenwirkungen einer Therapie zu bedenken- zu den häufigsten zählt eine Ödembildung, weitere Nebenwirkungen sind venöse und arterielle Thrombenbildung, gastrale Perforationen und Hypoalbuminämie (Morley et al. 2015). Bedacht werden muss jedoch, dass der MET-Status in diesen Studien nur durch die Immunhistochemie bestimmt wurde. Eine Untersuchung des Ansprechens auf Onartuzumab in Abhängigkeit des MET-Status in der Immunhistochemie, FISH und des MET-RNA Levels stellte nur die Immunhistochemie als prädiktiven Marker heraus. Zudem blieb der positive Effekt der MET-Antikörpertherapie bei FISH negativen, IHC positiven Fällen erhalten (Koeppen et al. 2014)(Koeppen et al. 2014).

Weitere humanisierte Antikörper mit dem Target c-MET sind ABT-700 (h224G11), LY2875358 (LA480) (Liu et al. 2014; Wang et al. 2016; Yoh et al. 2016) und die beiden bispezifischen MET/EGFR- Antikörper LY3164530 und JNJ-61186372 (Kim und Kim 2017). Für IgG-1 Antikörper ARGX-111 und den monoklonalen humanisierten Antikörper SAIT301 laufen derzeit Phase I klinische Studien (NCT02055066 und NCT02296879).

1.7.4 MET-Decoy Rezeptoren

Der Begriff MET-Decoy Rezeptor beschreibt eine lösliche Form der MET Ektodomain (primär der Sema Domain), die HGF bindet ohne zu einer MET-Homodimerisierung und damit Aktivierung zu führen (Zhang et al. 2004). Es konnte ein vermindertes Tumorwachstum und eine niedrigere Metastasierungsrate in Mausversuchen mit Xenograft nachgewiesen werden (Michieli et al. 2004). Zudem wird auch die Liganden unabhängige MET-Aktivierung durch MET-Decoy Rezeptoren (in dieser Studie rSema- rekombinantes Sema Protein) effektiv vermindert (Kong-Beltran et al. 2004).

1.7.5 MET-Tyrosinkinaseinhibitoren

MET- Tyrosinkinaseinhibitoren lassen sich in zwei Untergruppen einteilen: Typ I Inhibitoren (SU-11274-like) interagieren mit der ATP-Bindungsstelle der aktiven Form der Kinase, während Typ II (AM7-like) nur eine partielle Interaktion mit der ATP-Bindungsstelle aufweisen und primär an einer allosterische Tasche der inaktivierten Kinase

ansetzen (Mughal et al. 2013; Trusolino 2016). In einer Fallstudie zeigte sich bei einem Patienten mit metastasierten NSCLC mit deutlicher MET-Amplifikation und EGFR Exon 19 Deletion ein initial gutes Ansprechen auf die Kombinationstherapie des Typ I Inhibitors Savolitinib mit dem EGFR Inhibitor Osimertinib, jedoch kam es nach 34 Wochen zum erneuten Krankheitsprogress. Eine erneute molekulargenetische Untersuchung erbrachte neben den bereits bekannten Veränderungen eine neue Mutation, die zu einer Alteration der MET-Kinaseregion führte. Nach Untersuchung der Proteinstruktur verdeutlichten die Autoren des Case Reports, dass durch die D1228V-Variante eine Resistenz gegen Typ I Inhibitoren durch eine Mutation der Kinase-aktivierenden Schleife entstanden ist. Unter der Annahme, dass die Bindungsstelle der Typ II Inhibitoren nicht von dieser Veränderung betroffen ist, erfolgte die Therapie mit dem Typ II Inhibitor Cabozantinib in Kombination mit Erlotinib (Bahcall et al. 2016). Der Patient zeigte ein gutes Ansprechen auf den Therapiewechsel.

1.7.6 Inhibitoren der Signaltransduktion und Regulierung der MET-Expression

Die Folge einer MET-Genalteration oder vermehrten Proteinexpression findet sich häufig in der übermäßigen Aktivierung des MET-Signalweges. Zu den zentralen Akteuren der weiteren Signaltransduktion zählen Grb2, Gab1, SHIP-1, SHC, SRC und STAT3. Es besteht die Hoffnung diese in Zukunft als Ansatzpunkte der Therapie für MET-abhängige Tumore nutzen zu können (Giubellino et al. 2007).

Einen weiteren Ansatz stellt die Regulierung der MET-Expression dar. Hier besteht die meiste Erfahrung mit dem Antibiotikum Geldanamycin und seinem Derivat WK88-1. Geldanamycin zeigte an Myelom- und NSCLC-Zelllinien eine Hemmung des Zellwachstums (Jang et al. 2014; Jurczyszyn et al. 2014).

1.8 Zielsetzung

Die Mortalität der Patienten mit kolorektalen Karzinom wird entscheidend von der Metastasierung bestimmt (Lieberman und Atkin 2004; Ang et al. 2011). Durch gezielte Primär- und Sekundärprophylaxe und einer besseren Schulung der Allgemeinbevölkerung konnte in vielen europäischen Ländern eine sinkende Mortalitätsrate des kolorektalen Karzinoms erreicht werden (Ait Ouakrim et al. 2015). Bedauerlicherweise sind zum Zeitpunkt der Primärdiagnose immer noch ca. 20-25 % der Patienten fernmetastasiert (Maringe et al. 2013). Insbesondere Tumore des distalen Kolons neigen zu

synchrone Metastasen- 11,3% der Tumore im distalen Kolon und nur 7,1% der Tumore im proximalen Kolon zeigten in dieser Studie von 2012 synchrone Metastasen (Yoshida et al. 2012). Zudem besteht im Stadium IV bei 85% der Patienten eine inoperable Situation (Nordlinger et al. 2007). Daher ist ein Verständnis der molekulargenetischen Veränderungen der Metastasen in Bezug zum Primarius und daraus resultierende therapeutische Möglichkeiten entscheidend für die Effektivität neuer Therapien. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse zur Bedeutung der MET- Deregulierung bei Metastasierungsprozessen, kommt der Entwicklung von robusten Kriterien zur Selektion der potenziell von einer MET-Inhibition profitierenden Patienten eine entscheidende Rolle zu.

Auf die vielversprechenden präklinischen Studien zur MET-Inhibition folgte bis jetzt noch nicht der entscheidende Erfolg in den klinischen Studien zu Therapien mit MET-Kinase Inhibitoren und Antikörpern. Diese Arbeit setzt an einem grundlegenden Problem vieler dieser klinischen Studien an:

Welche Tumore sind als ‚MET-positiv‘ zu bewerten?

Reicht die alleinige Untersuchung mit der kostengünstigen Immunhistochemie? Wie korrelieren die Ergebnisse verschiedener molekularpathologischer Untersuchungen miteinander?

Wie viel Prozent der Proben von Lebermetastasen im oligometastasierten Kollektiv zeigen eine MET-Alteration oder Proteinüberexpression?

Ist der prognostische Einfluss der MET-Proteinüberexpression idem zum Einfluss der MET- Gen oder RNA Alteration?

Es ist hervorzuheben, dass in dieser Arbeit nicht der MET-Alterationsstatus des Primarius untersucht wurde, sondern der Status von hepatischen Filiae. Die Effektivität einer systemischen Therapie würde nicht allein auf dem Biomarker-Status des Primarius, sondern auch auf den molekularpathologischen Verhalten der Metastasen beruhen. Sollte sich in der Untersuchung der Metastasen keine MET-Alteration finden, wäre eine MET-Inhibitoren Therapie im Setting eines fernmetastasierten Patienten als wenig erfolgsversprechend anzunehmen.

Zudem erfolgte die Auswertung des Einflusses des MET-Status auf die Prognose der Patienten.

Findet sich eine prognostische Bedeutung der MET-Mutation oder Überexpression in diesem Kollektiv? Ist diese unabhängig von anderen Biomarkern?

2 Material und Methoden

2.1 Material & Probenkollektiv

Diese Arbeit basiert auf der Untersuchung von insgesamt 72 Proben, gewonnen aus hepatischen Filiae kolorektaler Karzinome des Krebsregisters der Universität Göttingen. Die Tumorproben wurden zwischen 2011 und 2014 an dem Universitätsklinikum Göttingen gewonnen. Einige Proben stammen aus unterschiedlichen Metastasen desselben Patienten, sodass die 72 Proben 62 Patienten zugehörig sind. Das Patientenkollektiv zeichnet dadurch aus, dass alle Patienten trotz des fortgeschrittenen Krankheitsstadiums operabel waren und sich im Krankheitsverlauf einer Leberteilresektion mit kurativer Intention unterzogen haben.

2.2 Methoden

2.2.1 Materialblöcke

Die untersuchten Proben wurden aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe gewonnen. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und die Immunhistochemie erfolgte an konventionellen 2 µm dicken Paraffinschnitten. Da in der Auswertung der FISH- und RNA-ISH Schnitte nur vereinzelt eine fokale Met- Genalteration oder Expression auffiel, erfolgte die RNA-in-situ-Hybridisierung an Multiblöcken, auch Tissue Microarrays (TMA) genannt. Die Herstellung der TMAs erfolgte durch 3-4 mm lang Stanzzyylinder, die nach Gewinnung aus Tumorgewebe der Donorblöcke nach einem Lageplan in einen leeren Paraffinblock übertragen wurden. Dieser Empfängerblock wurde mit je 60 Stanzzyindern bestückt, bevor die Herstellung von Schnittpräparaten zur Weiterverwendung erfolgte. Diese Methode ermöglicht eine Einsparung von Reagenzien und ist mit einem insgesamt geringeren Zeitaufwand verbunden.

2.2.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis von Antigenen, z.B. Proteinen in HE-Gewebeschnitten. Auswertbar ist nicht nur das Vorhandensein des Proteins, sondern auch seine Lokalisation in der Zelle.

Es werden zwei Varianten der Immunhistochemie unterschieden: der direkte und der indirekte Nachweis. Bei dem direkten Nachweis bindet ein Primärantikörper spezifisch an ein Epitop des nachzuweisenden Antigens. Der Primärantikörper ist direkt gekoppelt an ein

Enzym oder fluoreszierenden Farbstoff. Bei Substratzugabe kommt es zu einer farbgebenden Enzym-Substrat-Reaktion. Dies wird als Antigennachweis gewertet. Bei der indirekten Methode wird nach dem unkonjugierten Primärantikörper ein Sekundärantikörper genutzt. Der Sekundärantikörper bindet den Komplex aus Primärantikörper und Antigen. Bei dieser Variante ist der Sekundärantikörper mit dem Enzym/Fluorophor konjugiert. Als Indikator für den Antigennachweis gilt auch hier der Substratumsatz durch das Enzym. Der indirekte Nachweis wird generell mit einer stärkeren Signalintensität und dem einfacheren Nachweis großer Epitopmengen verbunden.

Die immunhistochemische Färbung wurde auswärts in einem Institut in Kassel unter standardisierten Automatenbedingungen durchgeführt.

Die Bewertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Göttingen).

Zur Auswertung der mittels Immunhistochemie gefärbten Proben stehen mehrere Schemata zur Verfügung. Im Prinzip unterscheiden die meisten gängigen Verfahren zwischen einer starken, mäßigen, schwachen oder nicht vorhandenen Anfärbung der Tumorzellen. Ein Unterschied liegt in der separaten Bewertung von membranärer und zytoplasmatischer Färbung. Einige Auswertemethoden betrachten die gesamte Färbung der Zelle, sprich die Farbintensität des Zytoplasmas und der Membran simultan, während andere Verfahren die Anfärbbarkeit der verschiedenen Zellkompartimente separat betrachten. Die Ersteinschätzung erfolgte anhand eines Auswerteverfahrens, welches nicht zwischen den Zellkompartimenten unterscheidet. Hierbei fiel jedoch auf, dass sich das Färbeverhalten des Zytoplasmas in einem relevanten Teil der Proben deutlich von dem der membranösen Anfärbbarkeit unterschied. Daher erfolgte die Auswertung der Immunhistochemie für diese Arbeit schlussendlich nach einem bereits von Prof. Rüschoff verwendet Schema, welches das Zusammenspiel von membranärer und zytoplasmatischer Färbung berücksichtigt (Rüschoff et al. 2012). Das System unterteilt zuerst die Färbeintensität in vier Stärken:

Tabelle 1- Färbeintensitätsstufen der Immunhistochemie

a	Ungefärbt
b	Membran klar abgrenzbar, Zytoplasma schwach oder gar nicht gefärbt
c	Membran abgrenzbar, Zytoplasma moderat gefärbt
d	Membran nicht abgrenzbar, Zytoplasma und Membran intensiv gefärbt

Die Färbeintensität c und d müssen bereits bei einer 2,5 – 5- fachen Vergrößerung erkennbar sein. Zur weiteren Beurteilung wird eine bis zu 20-fache Vergrößerung gewählt. Zur Ermittlung des Ergebnisses im vierstufigen System wurde ein Grenzwert bei 50 % verwendet.

Grad 3: $\geq 50\%$ der Zellen mit einer Färbung d

Grad 2: $\geq 50\%$ der Zellen mit Färbung c oder d

Grad 1: $\geq 50\%$ der Zellen mit Färbung b, c oder d

Negativ: $< 50\%$ der Zellen mit Färbung b,c oder d

Die Bedeutung des Färbegrades 1 ist noch nicht gänzlich klar. Aus diesem Grund wurden nur die Grad 2 und 3 Färbungen als immunhistochemisch positiv gewertet.

Nekrotische oder ausgeschwemmte Probenanteile, sowie Proben ohne Tumorgewebe, wurden von der Bewertung ausgeschlossen.

2.2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Bei der In-situ-Hybridisierung handelt es sich um eine Nachweismethode für spezielle Nukleinsäuresequenzen (RNA, DNA) in Zellen, im histologischen Gewebeschnitt oder kompletten Geweben. Nach autoradiographischer, Fluoreszenz- oder Antigen- gekoppelter Darstellung kann nicht nur eine semiquantitative, sondern auch topographische Auswertung erfolgen. Im ersten Arbeitsschritt wird die Doppelhelix der DNA denaturiert, sodass sie als

einsträngig Nukleinsäuresequenz vorliegt. Bei der verwendeten Sonde handelt es sich um künstlich erstellte, ebenfalls einsträngige Nukleinsäuresequenz, die komplementär zur gesuchten Sequenz aufgebaut ist. Zusätzlich ist an die Sonde ein Fluorophor gekoppelt. Bei Zugabe bindet diese an den gesuchten Genabschnitt. Auf diese Weise lassen sich mittels der FISH sowohl numerische, strukturelle als auch lokus-spezifische Aberrationen detektieren. Für die meisten Fragestellungen bietet sich die Verwendung von zweifarbigen Sonden an. Es wurde die fluoreszenzmarkierte Polynukleotid-Sonde ZytoLight SPEC MET/CEN 7 Dual Color Probe (ZytoVision, Bremerhaven, Deutschland) ausgewählt. Die verwendete Sonde detektiert die alpha-Satellitensequenz des Zentromers von Chromosom 7 mithilfe eines rot-markierten Polynukleotids und Sequenzen des humanen Met-Gens mit einem grün markierten. Somit können in den Proben anhand der vorhandenen Hybridisierungssignale die Anzahl an vorhanden Chromosomen 7, Met-Genen und deren Verhältnis zueinander bestimmt werden. Zu erwarten wäre in einem physiologischen Interphase-Kern je zwei Chromosomen und zwei Met-Gene. Eine Erhöhung der Anzahl an Chromosomen spricht für eine Polyploidie, eine Änderung der Genanzahl ist je nach Richtung als Genverlust, beziehungsweise Gengewinn zu werten.

Für diese Arbeit wurden 2µm dicke Paraffinschnitte auf ‚Superfrost‘ Objektträger aufgezogen und die Schnitte bei 56 Grad Celsius über Nacht gefestigt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mittels des VP 2000 Processor der Firma Abott Molecular (Schema im Anhang).

Die Auswertung erfolgte an einem Epifluoreszenz-Mikroskop (DM5500 B TL (BF) + Fluo Mikroskop, Leica, Wetzlar, Deutschland) in bis zu 100-facher Vergrößerung. Zur Darstellung wurden verschiedene Filter verwendet- ein rotgrüner Mischfilter, ein roter und grüner Einzelfilter, sowie ein DAPI.

Die Einteilung der Proben erfolgte anhand eines von Prof. Schildhaus bereits an Lungenkarzinomen etablierten Modells. Dieses beruht auf Erfahrungen, die zuvor mit FISH-Auswertungen anderer Fragestellung (HER2-Neu Aberrationen, EGFR, FGFR1) gewonnen wurden (Schildhaus et al. 2015).

Nach einer kompletten Musterung des Tumorgewebes in 63-facher Vergrößerung erfolgte die Auswahl dreier Hot-Spots, in denen jeweils 20 Zellen im Verbund ausgewertet wurden. So wurden für jede Probe insgesamt 60 Zellkerne hinsichtlich ihrer Anzahl an Centromer 7

und Met-Signalen in 63- bis 100- facher Vergrößerung ausgezählt. Des Weiteren erfolgte die Dokumentation des Prozentsatzes der Zellen mit ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 10 und ≥ 15 Met Signalen, sowie die Berechnung der Ratio Met/Cen7 und die durchschnittliche Met-Genkopienzahl pro Zelle. Jede 10. Probe wurde verblindet von einem weiteren, erfahrenen Pathologen beurteilt. Die diskordanten Fälle wurden separat besprochen.

Die Einteilung der Proben erfolgte anhand folgendem Scoring-System:

Hohes Amplifikationslevel:

MET/CEN7 Ratio ≥ 2 oder durchschnittliche MET-Genkopienzahl pro Zelle ≥ 6 oder $\geq 10\%$ der Tumorzellen enthalten ≥ 15 MET-Signale

Mittleres Amplifikationslevel

$\geq 50\%$ der Zellen enthalten ≥ 5 MET-Signale und die Kriterien für das hohe Amplifikationslevel sind nicht erfüllt

Niedriges Amplifikationslevel

$\geq 40\%$ der Tumorzellen enthalten ≥ 4 MET-Signale und die Kriterien für das hohe/mittlere Amplifikationslevel sind nicht erfüllt

Alle anderen Tumore wurden als negativ klassifiziert.

2.2.4 RNA-in-situ-Hybridisierung

Analog zur FISH zum DNA-Nachweis dient die RNA-in-situ-Hybridisierung dem Nachweis von Ribonukleinsäure in Geweben, Gewebsschnitten oder Zellen. Die RNA-in-situ-Hybridisierung erfolgte ebenfalls an 5µm dicken Paraffinschnitten. Im ersten Arbeitsschritt erfolgt die Entparaffinierung der Schnitte mit Xylol und Alkohol. Das darauffolgende Kochen in der Vorbereitungslösung macht die Ribonukleinsäure für die Sonden zugänglich und erhöht die Zellpermeabilität. Zur Detektion der gesuchten Sequenz wird eine Hybridisierung mit der komplementären Z-Sonde durchgeführt. Nach Hybridisierung mit der doppel-Z-Sonde wird zur Amplifikation eine schrittweise Waschung mit Amplifikations-Sonden, die an die Doppel-Z-Sonde binden benötigt. Im letzten Arbeitsschritt wird die zur Visualisierung ausgewählte Sonde aufgetragen.

Die Ersteinschätzung der Färbung erfolgt bei 20-40-facher Vergrößerung an einem Epifluoreszenz-Mikroskop (DM5500 B TL (BF) + Fluo Mikroskop, Leica, Wetzlar, Deutschland). In dem Tumorgewebe wurde semi-quantitativ die durchschnittliche Anzahl

von Signalen und Signalhäufungen (Clustern) pro Zelle erhoben. Danach erfolgte die Zuordnung zu einem der folgenden fünf Färbegrade:

Negativ: keine Färbung oder weniger als ein Signal pro Zelle (40-fache Vergrößerung)

Niedriges Amplifikationslevel: 1-3 Signale pro Zelle (sichtbar bei 20-40-facher Vergrößerung)

Mittelgradiges Amplifikationslevel: 4-10 Signale pro Zelle. Vereinzelt Cluster. (sichtbar bei 20-40-facher Vergrößerung)

Hochgradiges Amplifikationslevel: > 10 Signale pro Zelle. Weniger als 10% der Zellen haben Signalcluster (sichtbar bei 20-facher Vergrößerung)

Maximales Amplifikationslevel: > 10 Signale pro Zelle. >10% der Zellen mit Signalcluster (in 20-facher Vergrößerung)

Die primäre Beurteilung der RNA-in-situ-Hybridisierung erfolgte wie oben beschrieben an TMAs. Da jedoch vereinzelt Stanzten kein Tumorgewebe aufwiesen und zudem einige Proben in der Immunhistochemie eine fokale Verteilung der Met-Expression aufwiesen, wurden zusätzlich 10 Fälle anhand von konventionellen Schnitten bearbeitet und ausgewertet. Hierbei fiel lediglich bei zwei Schnitten eine fokale Verteilung auf. Diese zeigte jedoch auch bei diesen Schnitten keinen signifikanten Einfluss auf den schlussendlichen Score. Die konventionellen Schnitten wurden zudem auf ihre HGF-Expression mittels Immunhistochemie untersucht. Es zeigte sich in keinem Schnitt eine signifikante HGF-Expression.

2.3 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen dieser Arbeit wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 5$ ($p < 0.05$) festgelegt. Für die Berechnungen wurde ein kommerzielles Statistik Programm (IBM SPSS Statistics) verwendet.

Proben mehrerer Lebermetastasen desselben Patienten wurden für die Berechnung des Gesamt- und Krankheitspezifischen Überlebens eliminiert, sodass die Ereigniszeitanalysen stets auf 62 Proben beruhen. Korrelationen zwischen MET- Alterationsstatus in den verschiedenen untersuchten Verfahren und OS, DFS und EFS wurden mittels Kaplan-

Meier-Kurve aufgetragen und mittels Logrank-Tests auf ihre statistische Signifikanz getestet.

Korrelation zwischen Met-Alteration in der FISH, RNA-Scope und Immunhistochemie wurden mittels Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz hin überprüft. Aufgrund der teils geringeren Anzahl an beobachteten Fällen wurde ein exakter Test nach Fisher angeschlossen.

Mittels *Heatmap* wurden Met-Genexpression per Exon, RNA-Scope Ergebnis und Tumorprozent der Probe anschaulich aufgeschlüsselt. Der Zusammenhang zwischen RNA-Sequenzierung und RNA-ISH Ergebnissen wurde zudem mittels Streudiagramm graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

Es wurden insgesamt 72 Proben auf ihre Met- Expression mittels Immunhistochemie, ihre Met-Genkopienzahl mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und auf ihre RNA-Expression mittels RNA-in-situ-Hybridisierung untersucht. Die Gewinnung der Proben erfolgte wie oben beschrieben aus hepatischen Filiae von 62 Patienten mit kolorektalem Karzinom. Bei vier Patienten (P1129, P2297, P1520, P2846) wurden mehrere Metastasen untersucht. Zudem befindet sich in dem Kollektiv ein Pilotfall (Primärtumor) und ein Kontrollfall mit Normalgewebe.

3.1 Ergebnisse der MET-Immunhistochemie

Sämtliche Proben konnten erfolgreich immunhistochemisch für einen MET-Antikörper aufgearbeitet werden. Erfreulicherweise waren sämtliche Schnitte auswertbar (Tabelle 1). Insgesamt MET-immunhistochemisch positiv waren 21 Metastase (29,2 %), davon 19 (26,4%) mit einer mittelgradigen Färbeintensität und zwei mit einer starken Färbung (2,8%).

Tabelle 2- Ergebnis der Immunhistochemie

Immunhistochemie Ergebnis	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Negativ	21	29,2	29,2	29,2
Grad 1	30	41,7	41,7	70,8
Grad 2	19	26,4	26,4	97,2
Grad 3	2	2,8	2,8	100,0
Gesamt	72	100,0	100,0	

Von den zwei hochpositiven Fällen, hatte ein Fall (P3272/14_1) eine BRAF Mutation. Unter den Fällen mit einer mittelstarken Färbung befand sich ebenfalls ein Fall (P5406/12_A1) mit einer BRAF Mutation. In beiden Fällen handelte es sich um einen Aminosäuren Austausch an Stelle 600 von Valin zu Glutaminsäure. Die restlichen in der Immunhistochemie positiven Fälle besaßen einen BRAF Wildtyp. Im gesamten Kollektiv fanden sich drei Patienten mit einer BRAF Mutation. Der letzte Fall mit einer BRAF Mutation zeigte nur eine schwache Anfärbung in der Immunhistochemie und war in der FISH und in der RNA-ISH negativ. So zeigen die Fälle mit einem positiven Ergebnis in der Immunhistochemie deutlich häufiger als das gesamte Kollektiv eine BRAF-Mutation (9,5% der Immunhistochemie positiven Fälle vs. 4,8% im gesamten Kollektiv).

42,9% der Proben mit einem positiven Ergebnis in der Immunhistochemie wiesen eine KRAS Mutation auf, dies lag unter dem Prozentsatz des kompletten Kollektivs (53,4%). Zudem waren PIK3CA Mutationen seltener bei Patienten mit einem positiven Ergebnis in der IHC (5,6% in der IHC, 15% im gesamten Kollektiv).

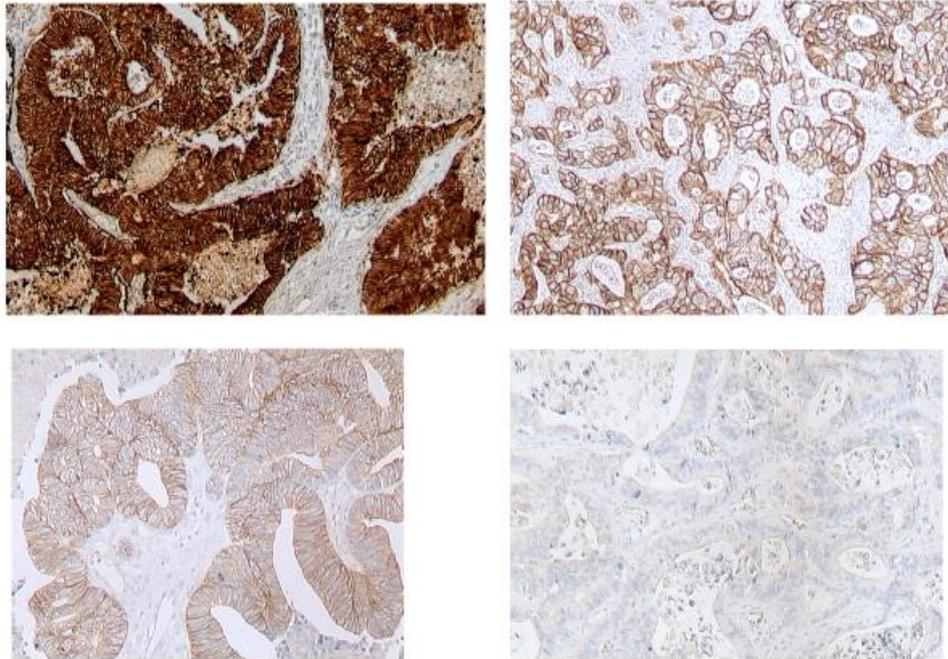


Abbildung 2- Immunhistochemie; von links oben nach unten rechts- high, intermediate, low und negative bewertete Proben

3.2 Ergebnisse der Met-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Met Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung konnte erfolgreich an 70 von 72 Proben durchgeführt werden (Siehe Tabelle 2). Zwei Fälle waren nicht auswertbar, da auch nach wiederholten Färbungen keine Fluoreszenzsignale sichtbar waren.

Unter den 70 ausgewerteten Proben befanden sich zwei Met-FISH positive Fälle. Ein Fall wies ein hohes Amplifikationslevel auf, der zweite Fall ein mittelgradiges. Der Sitz des Primarius war in beiden Fällen das rechte Hemikolon. Es fanden sich in keinem der beiden Fälle BRAF, KRAS oder NRAS Mutationen. Der hochamplifizierte Fall zeigte eine PIK3CA Mutation.

Die Lebermetastase mit hohem Met-Amplifikationslevel (P13320/14-5) wies mehrere MET/CEN 7 Cluster mit über 15 MET-Signalen auf. Die durchschnittliche MET-Signanzahl pro Zellkern lag bei 6,22, die CEN 7- Signanzahl bei 1,98 pro Zellkern, sodass sich eine Ratio von 3,13 ergibt. Damit erfüllt die Probe zwei von drei Kriterien eines hohen

Amplifikationslevels (MET/CEN 7 Ratio ≥ 2 , durchschnittliche MET-Genkopienzahl pro Zelle ≥ 6). Die Zeit von Erstdiagnose bis zum Auftreten der Metastase lag bei 8 Monaten. Es handelte sich um ein ypT3b, ypNo (0/35), ypM1, L0, V1, G3, R0 Tumorstadium.

Die Probe mit dem mittleren Amplifikationslevel (P10792/13-A3) zeigte 5,58 MET-Signale pro Zellkern und 5,13 CEN 7-Signale, sodass sich eine Ratio von 1,09 ergab. Unter den 60 ausgewerteten Zellkernen befand sich nur einer mit ≥ 15 MET-Signalen. Da jedoch insgesamt 68 % der Zellen ≥ 5 MET-Signale zeigten, waren die Kriterien für ein mittelgradiges Amplifikationslevel erfüllt. In diesem Fall lagen zwischen Erstdiagnose bis zur Diagnose der Metastase 18 Monate. Es handelte sich um einen pT3b, pN1b (3/21), pM1, L1, V0, G2, R0 Tumorstadium.

Neun Proben zeigten eine niedriges MET-Amplifikationslevel. In den Proben mit einem niedrigen MET-Amplifikationslevel fanden sich keine Clusteramplifikationen. Die MET/CEN 7 Ratio lag zwischen 0,99-1,43. Die durchschnittliche Anzahl an MET-Signalen pro Zellkern befand sich zwischen 3,13-4,23. Bei allen Proben fanden sich ≥ 40 % Tumorzellen mit ≥ 4 MET-Signalen pro Zellkern.

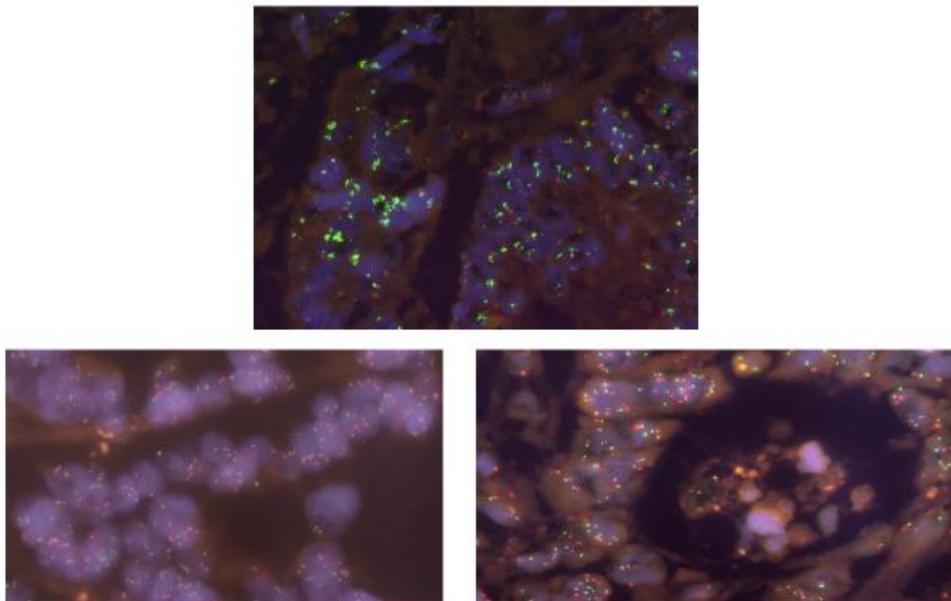


Abbildung 3- Ergebnisse der FISH; oben- Ergebnis „hochgradig“, links unten - Ergebnis „niedrig“, rechts unten- Ergebnis „mittelgradig“

Tabelle 3- Ergebnishäufigkeiten in der FISH

FISH Amplifikationslevel	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozenze	Kumulierte Prozenze
Negativ	59	81,9	84,3	84,3
Niedrig	9	12,5	12,9	97,1
Mittelgradig	1	1,4	1,4	98,6
Hoch	1	1,4	1,4	100,0
Gesamt	70	97,2	100,0	
Fehlend	2	2,8		
Gesamt	72	100,0		

3.3 Ergebnisse der MET-RNA-in-situ-Hybridisierung

Zuerst erfolgte die Färbung von 63 Fällen in *tissue microarrays*. Ein Fall enthielt in beiden Stanzen der TMA kein auswertbares Tumorgewebe. Es erfolgte die Färbung der verbleibenden 9 Fälle und des in der TMA nicht auswertbaren Falles anhand konventioneller histologischer Schnitte. Hierbei erfolgte neben der Einteilung anhand des *staining scores* zusätzlich eine Bewertung hinsichtlich der Heterogenität im Anfärbeverhalten der Schnitte, sowie hinsichtlich der HGF-Expression. Da nur zwei der zehn Schnitte eine deutliche Fokalität aufwiesen und diese als nicht ausgeprägt genug zur Veränderung des Ergebnisses bewertet wurde, erfolgte keine weitere Aufarbeitung aller Fälle in konventionellen Schnitten. Die zehn einzeln gefärbten Fälle wurden zudem hinsichtlich ihrer HGF-Expression beurteilt. Es fand sich in keinem der zehn Schnitte eine erhöhte HGF-Expression.

Unter den 72 Fällen befanden sich neun Fälle mit einer hohen oder sehr hohen RNA Expression (siehe Tabelle 3). Zudem zeigten weitere 14 Fälle eine mittelstarke RNA Expression. Unter den vier Fällen mit einer sehr ausgeprägten RNA-Expression fand sich keiner mit einer BRAF Mutation, jedoch einer mit einer PIK3CA- Mutation (c.1633G>A; p.E545K). Dieser Fall und zwei weitere zeigten zudem eine KRAS Mutation (in zwei Fällen c.34G>A; p.G12S, einer mit c.437C>T; p.A146V).

Tabelle 4- Ergebnisse der RNA-ISH

RNA-Amplifikationslevel	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozepte	Kumulierte Prozepte
Negativ	24	33,3	33,3	33,3
Niedrig	25	34,7	34,7	68,1
Mittelgradig	14	19,4	19,4	87,5
Hochgradig	5	6,9	6,9	94,4
Maximal	4	5,6	5,6	100,0
Gesamt	72	100,0	100,0	

3.4 Korrelation der MET-FISH Ergebnisse und der MET-Immunhistochemie

70 Fälle wurden erfolgreich nach MET-FISH und MET-Immunhistochemie ausgewertet. Insgesamt waren 17 Fälle in beiden Methoden negativ. Die Probe mit einer mittelgradigen Färbung in der FISH zeigte keine Färbung in der Immunhistochemie (IHC negativ). Der im FISH hochgradig amplifizierte Fall zeigte auch in der Immunhistochemie eine starke Anfärbung (P13320). Jedoch erhielt die zweite Probe mit einer ausgeprägten Proteinexpression in der Immunhistochemie nur einen niedrigen FISH-Score.

Tabelle 5- Vergleich der FISH und Immunhistochemie Ergebnisse

		FISH- Amplifikationslevel				Gesamt
		Negativ	Niedrig	Mittelgradig	Hoch	
IHC-Ergebnis	Negativ	17	2	1	0	20
	Grad 1	26	3	0	0	29
	Grad 2	16	3	0	0	19
	Grad 3	0	1	0	1	2
Gesamt		59	9	1	1	70

Die Auswertung mittels Chi-Quadrat-Test zeigt eine exakte Signifikanz nach Fisher (bei 81,3 % der Zellen mit einer erwarteten Häufigkeit unter 5) von 0,028, sodass ein fehlender Zusammenhang von FISH-Score und Immunhistochemie Ergebnis abgelehnt werden kann.

Tabelle 6- CHI- Quadrat und Fisher's Exakt Test für Ergebnisübereinstimmung der FISH und Immunhistochemie

	Wert	d f	Asymptomatische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (einseitig)	Punktwahrscheinlichkeit
Chi- Quadrat nach Pearson	40,82 9	9	0,000	0.014		
<i>Likelihood- Quotient</i>	14,72 5	9	0,099	0.034		
Exakter Test nach Fisher	16,74 6			0,028		
Zusammenhang linear- mit-linear	3,141	1	0,76	0.095	0,054	0.024
Anzahl der gültigen Fälle	70					

In der grafischen Auftragung wird jedoch die große Verteilungsbreite der Ergebnisse und die geringe Anzahl der positiven Fälle in der FISH deutlich.

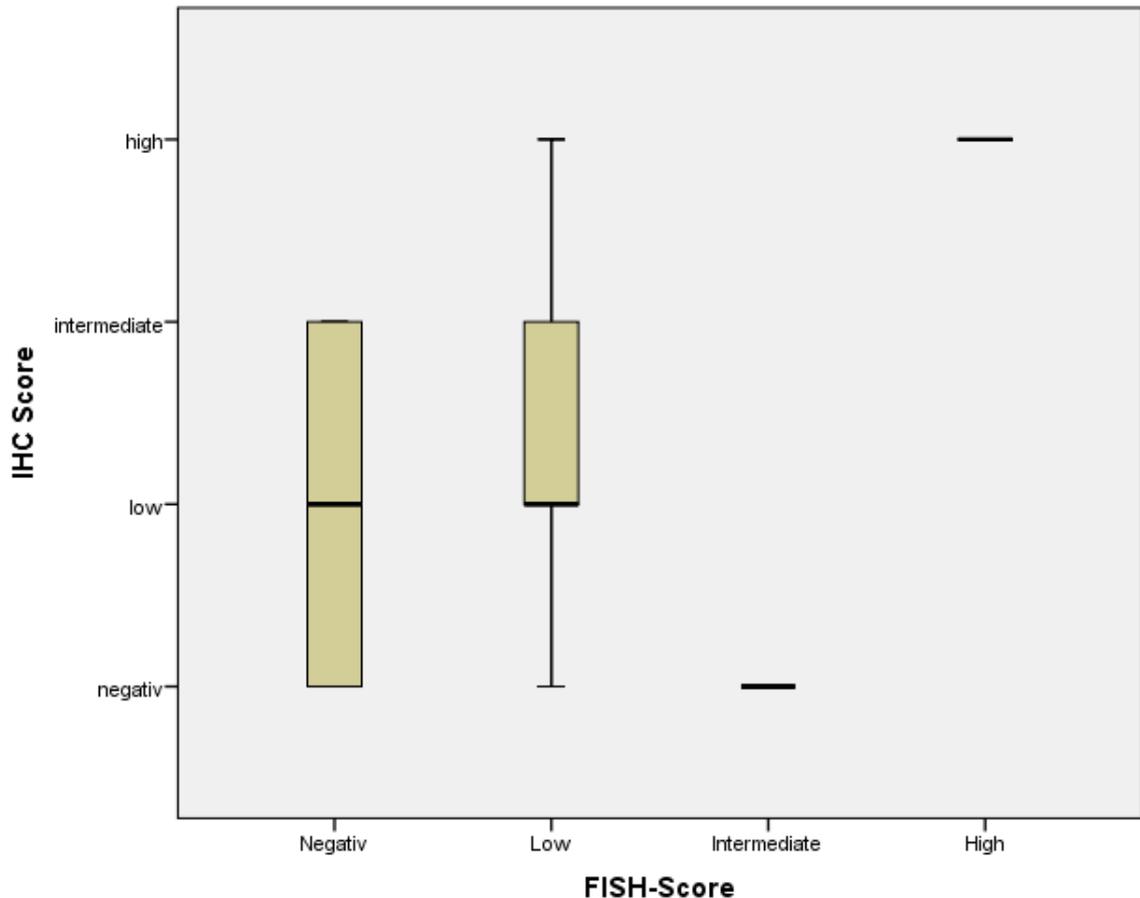


Abbildung 4- Boxplot Auftragung Immunhistochemie und FISH Ergebnisse. IHC score „low“ entspricht Grad 1, „intermediate“ entspricht Grad 2 und „high“ Grad 3. FISH- Score „low“ entspricht einem niedrigen Amplifikationslevel, „intermediate“ einem mittelgradigen und „high“ einem hochgradigen Amplifikationslevel.

3.5 Korrelation der MET-Immunhistochemie und der MET-RNA-ISH

Alle 72 Fälle waren sowohl in der Immunhistochemie als auch in der RNA-ISH auswertbar. 16 der ausgewerteten Fälle waren in beiden Färbemethoden negativ. Ein Fall (auch hier P13320) erreichte in beiden Methoden den maximalen Score. Jedoch findet sich auch jeweils ein Fall der in der Immunhistochemie (oder respektive in der RNA-ISH) eine sehr starke Färbung aufwies und in der anderen Färbemethode negativ war. Insgesamt erreichten von den 21 in der Immunhistochemie positiven Fällen (Färbegrad 2 und 3) 13 eine Amplifikationslevel von \geq mittelgradig in der RNA-ISH (62 %). Von den 23 in der RNA-ISH positiven Fällen zeigten 13 ein als positiv gewertetes Färbeverhalten in der Immunhistochemie (57 %). Hervorzuheben ist, dass das geringfügige Anfärben, welches in dieser Arbeit als negativ gewertet wurde, in beiden Methoden in der jeweils anderen

Methode eine weite Streuung von komplett negativ bis zum mittleren Färbestärke (Grad 2 in der IHC, hochgradiges Amplifikationslevel im RNA-ISH) aufwies.

Tabelle 7- Vergleich der Ergebnisse Immunhistochemie und RNA-ISH

		Immunhistochemie				Gesamt
		Negativ	Grad 1	Grad 2	Grad 3	
RNA-ISH Amplifikationsl evel	Negativ	16	6	1	1	24
	Niedrig	4	15	6	0	25
	Mittelgradig	0	6	9	0	15
	Hoch	0	3	1	0	4
	Maximum	1	0	2	1	4
Gesamt		21	30	19	2	72

Die Auswertung mittels Chi-Quadrat-Test zeigt, dass von Korrelation der beiden Methoden miteinander auszugehen ist. Der P-Wert im exakten Test nach Fisher liegt mit 0,000 unter dem Signifikanzniveau von Alpha= 0,05.

Tabelle 8- CHI-Quadrat und Fisher's Exakt Test: Immunhistochemie vs. RNA-ISH

	Wert	d f	Asymptomatische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (einseitig)	Punktwahrscheinlichkeit
Chi- Quadrat nach Pearson	43,57 3	1 2	0,000	0,001		
<i>Likelihood-</i> Quotient	45,64 3	1 2	0,000	0,000		
Exakter Test nach Fisher	39,23 7			0,000		
Zusammenhang linear- mit-linear	18,24 5	1	0,000	0,000	0,000	0,000
Anzahl der gültigen Fälle	72					

Die grafische Aufzeichnung der Ergebnisse im Boxplot zeigt jedoch auch hier eine große Verteilungsbreite der Ergebnisse.

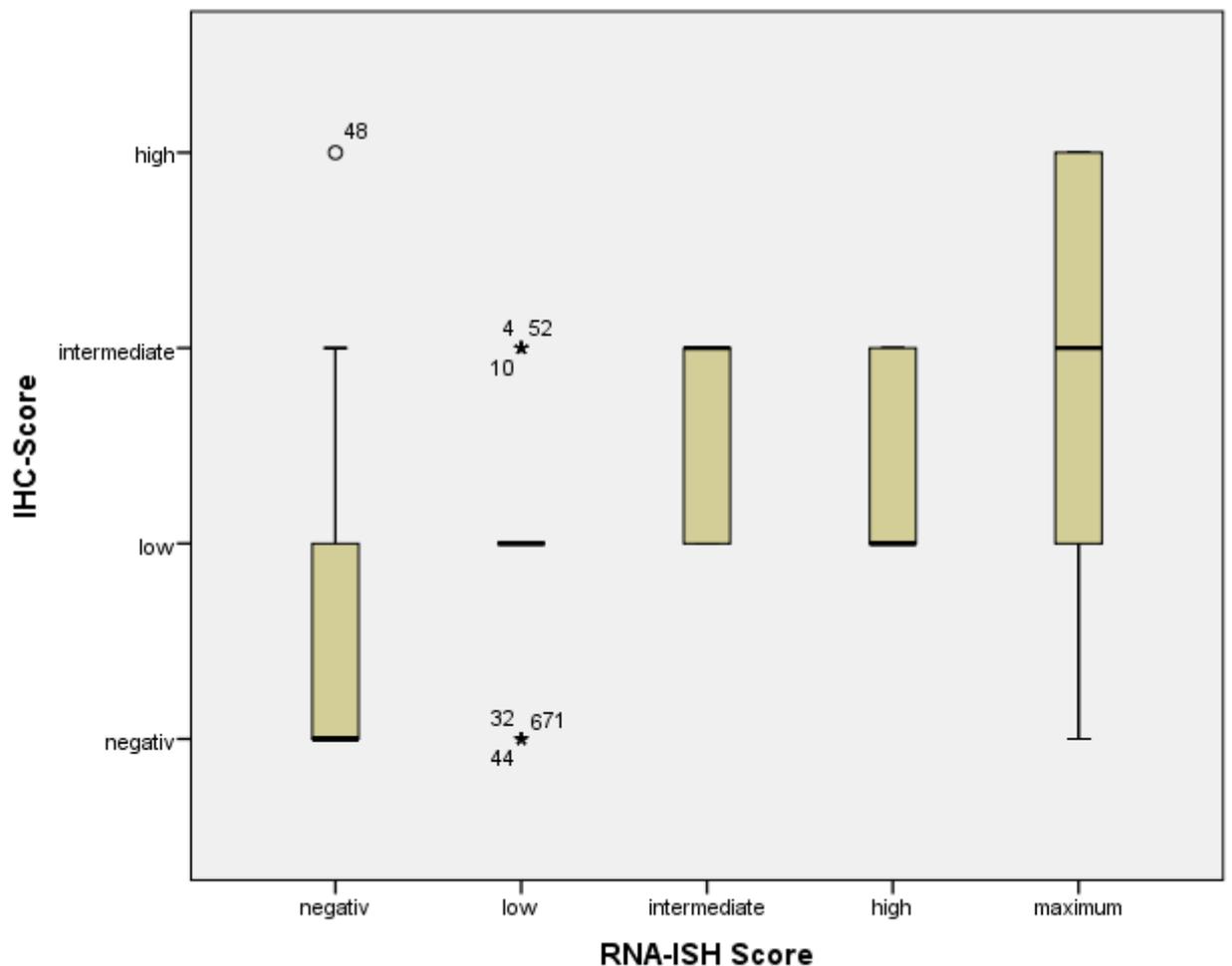


Abbildung 5- Boxplot Auftragung- Ergebnisse der RNA-ISH im Vergleich zu Immunhistochemie Ergebnissen. Auch hier entspricht IHC-score „low“ Grad 1, „intermediate“ Grad 2 und „high“ Grad 3. Im RNA-ISH Score entspricht „low“ einem niedrigen, „intermediate“ einem mittelgradigen, „high“ einem hohen und „maximum“ einem maximalen Amplifikationslevel.

3.6 Korrelation der MET-FISH und MET-RNA-Scope Ergebnisse

Von den 72 zur Verfügung stehenden Proben waren zwei auch nach mehrfacher Färbung nicht in der FISH auswertbar. Diese beiden Proben sind in den folgenden Tabellen nicht mit aufgeführt.

19 Fälle waren in beiden Methoden negativ, 40 weitere Fälle zeigten keine MET-Genaberration, jedoch ein aberrantes Färbeverhalten im RNA-ISH. 21 Fälle sind auch im RNA-ISH noch als negativ zu werten, da nur ein niedriger RNA-ISH Score erreicht wurde. 11 im FISH-negativer Fälle erreichten einen mittleren, fünf sogar einen hohen und drei einen maximalen Score in der RNA-ISH Auswertung.

Die Verteilung der neun FISH-Fälle mit einem geringen Score (damit negativ), erfolgt gleichmäßig im RNA-ISH vom mittelgradigen bis zum negativen Amplifikationslevel.

Zwei Fälle erreichten einen positiven FISH-Score: der erste zeigte eine mittelgradiges Amplifikationslevel in der FISH und war im RNA-ISH mit einem Score ‚niedrig‘ negativ, während der zweite positive Fall in beiden Methoden den maximalen Score erreichte.

Tabelle 9- Ergebnisübersicht der FISH und RNA- ISH

			FISH-Score				Gesamt	
			Negativ	Niedrig	Mittelgradig	Hoch		
RNA-ISH Ergebnis	Negativ	Anzahl	19	3	0	0	22	
		Erwartete Anzahl	18,5	2,8	,3	,3	22,0	
	Niedrig	Anzahl	21	3	1	0	25	
		Erwartete Anzahl	21,1	3,2	,4	,4	25,0	
	Mittelgradig	Anzahl	11	3	0	0	14	
		Erwartete Anzahl	11,8	1,8	,2	,2	14,0	
	Hoch	Anzahl	5	0	0	0	5	
		Erwartete Anzahl	4,2	,6	,1	,1	5,0	
	Maximum	Anzahl	3	0	0	1	4	
		Erwartete Anzahl	3,4	,5	,1	,1	4,0	
	Gesamt		Anzahl	59	9	1	1	70
			Erwartete Anzahl	59,0	9,0	1,0	1,0	70,0

Der Zusammenhang dieser beiden Methoden stellt sich in der Auswertung im Chi-Quadratstest als zufällig dar. Bei 85 % der Zellen mit einer Häufigkeit unter 5 erfolgt die Beurteilung anhand des exakten Tests nach Fisher und erbringt eine Signifikanz von 0,476 und liegt damit über dem festgelegten Signifikanzniveau von Alpha= 0,05.

Tabelle 10- CHI-Quadrat-Test und Fisher's Exakt Test: FISH vs. RNA-ISH

	Wert	d f	Asymptomatische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (einseitig)	Punktwahrscheinlichkeit
Chi- Quadrat nach Pearson	20,53 5	1 2	0,058	0,144		
<i>Likelihood-</i> Quotient	11,03 5	1 2	0,526	0,345		
Exakter Test nach Fisher	13,03 1			0,476		
Zusammenhang linear- mit-linear	1,549	1	0,213	0,228	0,133	0,034
Anzahl der gültigen Fälle	70					

Der Boxplot visualisiert die hohe Verteilungsbreite der Fälle insbesondere mit negativem Ergebnis in der FISH und verdeutlicht die statistische Schwäche aufgrund der wenigen positiven Ergebnisse in der FISH.

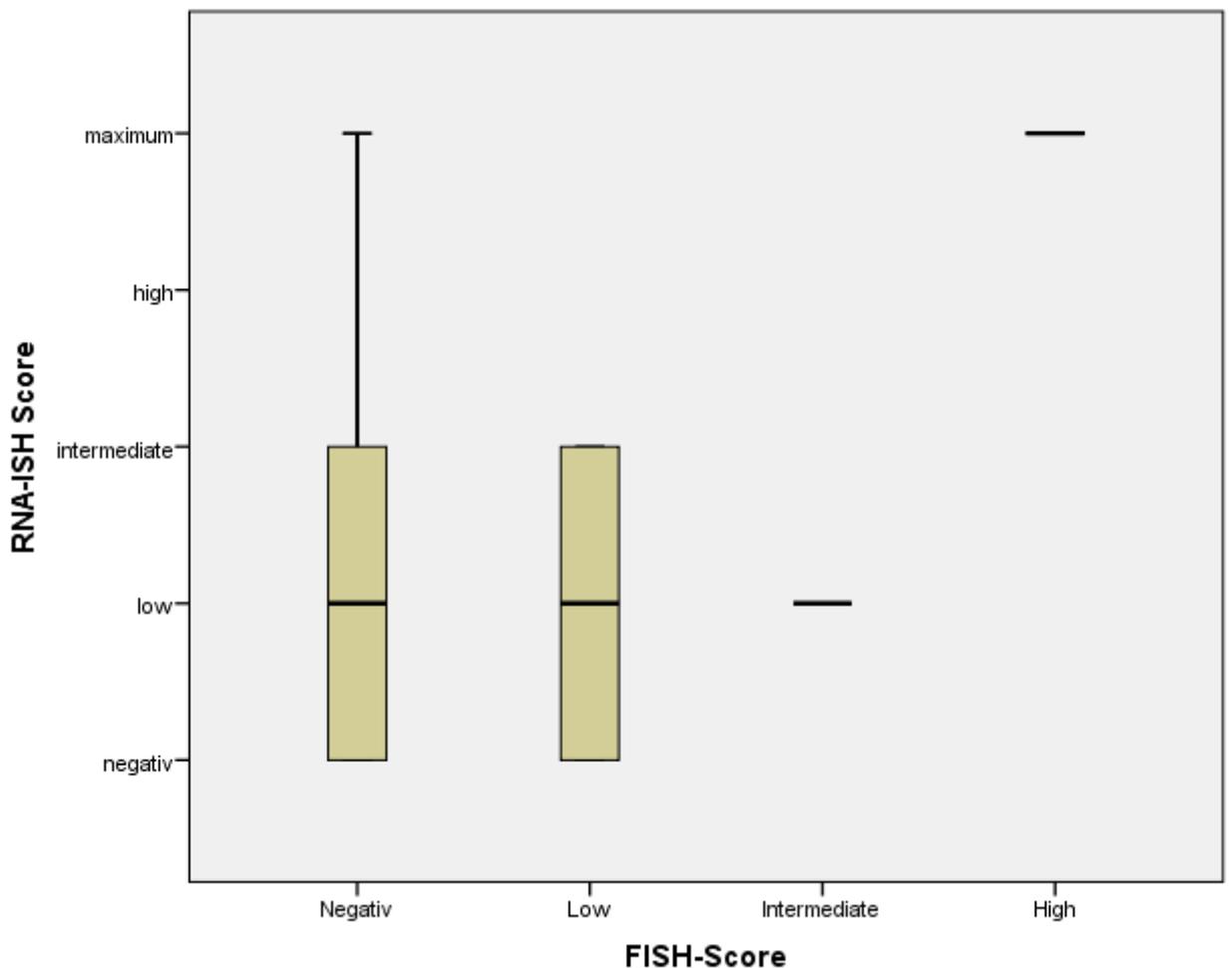


Abbildung 6- Grafische Auftragung der Ergebnisse der FISH und RNA-ISH. „Low“ entspricht in beiden Scores einem niedrigen Amplifikationslevel, „intermediate“ einem mittelgradigen, „high“ einem hohen und „maximum“ im RNA-ISH einem maximalen Amplifikationslevel.

3.7 Ergebnisse der MET-Immunhistochemie, RNA-ISH und FISH im Vergleich

Der Vergleich der drei Methoden untereinander zeigt, dass Fälle mit einem negativen Ergebnis in der RNA-ISH (Amplifikationsgrad negativ) auch im FISH nicht mehr als eine niedrige Anfärbung erbrachten (Score negativ oder niedrig), während sie in der Immunhistochemie bis zur mittelstarken Anfärbung reichten.

Die Verteilung der Fälle mit einem niedrigen Score in der RNA-ISH (Niedriges Amplifikationslevel, n = 25) in der FISH und der Immunhistochemie deckte jeweils das Spektrum von negativ bis zur mittleren Färbestärke ab. Dabei stellte sich der größte Prozentsatz der Fälle in der FISH mit einem negativen Score (n= 21 , 84%) dar. Drei weitere Fälle mit einem niedrigen Score wurden ebenfalls als negativ gewertet, sodass insgesamt 96 % der Fälle mit einem niedrigen RNA-ISH Score auch in der FISH negativ waren. In der

Immunhistochemie waren 19 Fälle, 76 %, negativ (4 Score negativ, 15 Score niedrig), jedoch waren 6 Fälle und damit 24 % mit einer mittelgradigen Anfärbung positiv.

Alle Fälle (n= 14) mit dem Score „mittelgradig“ in der RNA-ISH waren im FISH negativ (negatives oder niedriges Amplifikationslevel), während in der Immunhistochemie sechs negativ waren (alle Score „niedrig“, 43 %) und acht positiv (Score „mittelgradig“, 57 %).

Von den fünf Fällen mit einem RNA-ISH Ergebnis von „hochgradig“ waren sämtliche im FISH negativ, drei waren ebenfalls in der Immunhistochemie negativ, zwei waren mit einem Score „mittelgradig“ positiv.

Vier Fälle erreichten den maximalen Score in der RNA-ISH. Drei von diesen waren im FISH negativ. In der Immunhistochemie war einer negativ und drei positiv (zwei mit dem Score „mittelgradig“, einer mit dem Score „hochgradig“). Ein Fall (P13320) zeigte in allen drei Methoden den maximalen Score.

Die beiden Fälle mit einem positiven FISH Score hatten beide jeweils ein negatives und ein positiv zu wertendes Ergebnis in den anderen beiden Methoden. Beide Fälle jedoch zeigten weder eine KRAS, noch eine BRAF Mutation. Es handelte sich bei beiden um metachrone Metastasen.

Insgesamt waren die Patienten mit einer in der FISH, Immunhistochemie oder in der RNA-ISH nachgewiesenen MET-Alteration fast sechs Jahre älter zum Zeitpunkt der Metastasenresektion als Patienten mit unauffälligem MET-Status (69,23 zu 63,77). Patienten mit einem positiven Ergebnis in der Immunhistochemie oder der RNA-ISH waren überproportional häufig männlich (81 %, 71,4 % der positiven vs. 66 % im Allgemeinkollektiv).

Tabelle 11- Übersicht der Ergebnisse der drei Methoden im Vergleich

RNA-ISH			Immunhistochemie				Gesamt
			Negativ	Niedrig	Mittelgradig	Hoch	
Negativ	FISH	Negativ	13	5	1	0	19
		Niedrig	2	0	0	1	3
	Gesamt		15	5	1	1	22
Niedrig	FISH-SCR	Negativ	3	13	5		21
		Niedrig	0	2	1		3
		Mittelgradig	1	0	0		1
	Gesamt		4	15	6		25
Mittelgradig	FISH-SCR	Negativ		5	6		11
		Niedrig		1	2		3
	Gesamt			6	8		14
Hoch	FISH-SCR	Negativ		3	2		5
	Gesamt			3	2		5
Maximum	FISH-SCR	Negativ	1		2	0	3
		Hoch	0		0	1	1
	Gesamt		1		2	1	4
Gesamt	FISH-SCR	Negativ	17	26	16	0	59
		Niedrig	2	3	3	1	9
		Mittelgradig	1	0	0	0	1
		Hoch	0	0	0	1	1
	Gesamt		20	29	19	2	70

3.8 Prognostischer Wert von MET-Aberrationen

Wie in der Einleitung erwähnt, gibt es wenige Analysen, die explizit betrachten, ob es einen Unterschied des prognostischen Einflusses zwischen vermehrter Protein-, RNA-Expression oder Gen-Alteration gibt. Ein Teil dieser Arbeit ist die detaillierte Analyse des Einflusses der Ergebnisse der verschiedenen Methoden auf das Überleben der Patienten.

Es zeigte sich bei allen drei Methoden ein deutlicher Trend zu einem kürzeren Überleben bei positivem Ergebnis. Die fehlende statistische Signifikanz könnte sich in der Größe des untersuchten Kollektivs erklären.

Zudem zeigte sich, dass sich ein positives Ergebnis in einer der drei Methoden gehäuft bei metachronen Metastasen auftrat (46,8 % der gesamten Proben stammten von metachronen

Metastasen; 100 % der positiven Proben in der FISH, 60 % der positiven Proben in der RNA-ISH und 50 % der positiven Proben der Immunhistochemie waren metachrone Metastasen).

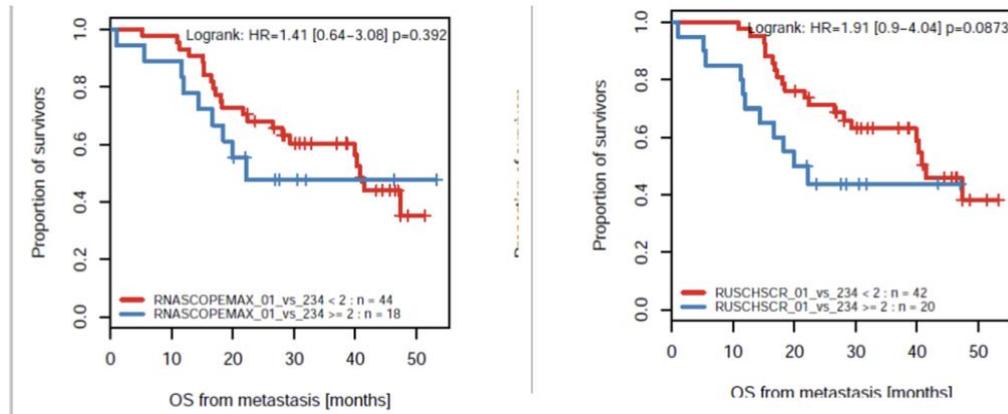


Abbildung 7- Einfluss eines positiven Ergebnisses in RNA-ISH oder Immunhistochemie auf das Gesamtüberleben in Monaten. Die rechte Grafik vergleicht das Überleben der Patienten mit einem IHC Ergebnis von negativ und Grad 1 mit den Patienten mit einem positiven Ergebnis (Grad 2 und 3, blauer Graph). Die linke Grafik veranschaulicht das Gesamtüberleben der Patienten mit negativem RNA-ISH Ergebnis (roter Graph) im Vergleich zu Patienten mit positivem Ergebnis (blauer Graph). Statistische Signifikanz wird in beiden Fällen nicht erreicht (p 0,09, p 0,39).

4 Diskussion

Durch die hohe Anzahl der Patienten mit kolorektalen Karzinom, die erst im metastasierten Stadium diagnostiziert werden, gewinnen zwei wichtige Aspekte zur Verbesserung der Prognose an Relevanz: Einerseits wird eine flächendeckende, effiziente Primär- und Sekundärprophylaxe benötigt und andererseits effektive Therapieoptionen für Patienten im fortgeschrittenem Tumorstadium. Durch den Erkenntnisgewinn der physiologischen Rolle der Met-Kinase, sowie die Bedeutung für die Onkogenese wurde die Verwendung von Met-Inhibitoren in der Krebstherapie ermöglicht. In der Therapie des kolorektalen Karzinoms sind Met-Inhibitoren aktuell noch nicht fest etabliert. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die MET/HGF-Achse ein potenzielles therapeutisches Target in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms ist. Da hinsichtlich der Erfassung und prognostischen Bedeutung von Alterationen dieses Signalweges Uneinigkeit herrscht, erfolgte die Analyse unterschiedlicher Ebenen dieser Signalkaskade. Die Met-Genkopienzahl wurde mittels Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung ermitteln, die RNA-Expression in einer RNA-in-situ Hybridisierung erfasst und schlussendlich die Proteinexpression mittel Immunhistochemie bestimmt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sammeln Hinweise darauf, dass ein relevanter Anteil der Patienten mit kolorektalem Karzinom eine Met-Alteration oder vermehrte Proteinexpression aufweist. Der Einfluss der gefundenen Alterationen auf die Prognose der Patienten, sowie die Konkordanz der verschiedenen diagnostischen Optionen wurden in dieser Arbeit analysiert.

Ein grundsätzliches Problem ist derzeit, dass klinischen Studien zu MET-Inhibitoren keine einheitlichen Einschlusskriterien zu Grunde liegen. Nicht nur die Wahl der Methode ist uneinheitlich, sondern auch die Positivitätskriterien für die Immunhistochemie und FISH variieren in den unterschiedlichen Studien. So wurden in der Phase 2 Studie Go27827 Patienten mit einer moderaten oder starken Anfärbung von > 50 % der Zellen in der IHC als positiv definiert, die MET- Positivität war hier jedoch nicht Einschlusskriterium der Studie sondern ist im Verlauf nach Randomisierung der Patienten erhoben worden (Bendell et al. 2017). In anderen Studien war schon eine membranäre Färbung von > 25 % der Zellen egal welcher Intensität ausreichend für einen positiven MET-Score (Zhu et al. 2015). Eine weitere Phase 1 Studie zur Dosisescalation bei SAR125844, einem selektiven MET-Tyrosinkinaseinhibitor, schloss hingegen nur Patienten mit einer membranären, moderaten

oder starken Färbung von > 50 % der Zellen in der Immunhistochemie oder aber einer MET-Amplifikation in der FISH von > 4 MET-Genkopien pro Zelle oder einer t-MET/CEP7 Ratio > 2 ein. Diese Studie schloss explizit auch Patienten ohne MET-Amplifikation in der FISH ein, solange sie eine hohe Proteinexpression aufwiesen (Angevin et al. 2017).

Es gibt keine ausreichende Studiengrundlage zu der Frage welcher Biomarker die beste prognostische Aussagekraft zur Effektivität von Anti-MET-Therapien aufweist. Insbesondere wirft diese Arbeit die Frage auf, wie mit Patienten mit diskordanten Resultaten in den verschiedenen Methoden klinisch umgegangen werden soll. In dem untersuchten Kollektiv von 72 Proben fanden sich 20 mit deutlich erhöhter MET-Proteinexpression bei negativem Ergebnis in der FISH. Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen zeigte eine Phase 2 Studie, dass MET-IHC positive, FISH negative Patienten weiterhin von dem MET-mAB Onartuzumab profitieren (Koeppen et al. 2014). Ähnliche Studien fehlen zu diesem besonderen Kollektiv bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms. Des weiteren ist die kleine Gruppe der Patienten mit Genalteration ohne vermehrte Proteinexpression nicht hinreichend auf ihr klinisches Ansprechen auf eine Anti-MET-Therapie untersucht. In den Analysen dieser Arbeit wies ein Patient eine MET-Genkopienzahl von 5,58/Zelle mit > 50 % der Zellen mit ≥ 5 MET-Genkopien auf ohne, dass sich eine vermehrte Proteinexpression in der IHC fand.

Es ist vorstellbar, dass die Patienten mit Genalteration ohne vermehrte Proteinexpression nicht von einer Anti-MET-Therapie profitieren würden, da die genetische Aberration durch andere regulierende Einflüsse bereits ihre Effizienz im Sinne der vermehrten Proteinexpression eingebüßt hat. Es fehlen jedoch die Studien zum Beweis dieser Annahme.

In dieser Arbeit konnte eine durch MET-Alterationen negativ beeinflusste Prognose nachgewiesen werden- dieser in allen *survival-plots* darstellbarer Trend war jedoch nur in einigen Subgruppen statistisch signifikant. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Analysen zeigten ein signifikant schlechteres CSD vom Zeitpunkt der Metastasierung bei Patienten mit einem positiven RNA-ISH Ergebnis ($p= 0,02$), sowie positiven IHC-Score ($P= 0,001$). Es ließ sich jedoch kein statistisch signifikanter Einfluss des FISH-Scores finden. Bei Bronchialkarzinomen ist auch die FISH-Analyse als prognostisch relevant beschrieben worden. Bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnte eine Meta-Analyse unter Einschluss von 21 Studien einen deutlichen negativen Einfluss auf die Prognose bei erhöhter Genkopienzahl von Met nachweisen (Kim et al. 2018). Die fehlende statistische Signifikanz

der Prognoseverschlechterung bei erhöhter Genkopienzahl in dieser Arbeit könnte mit der niedrigen Anzahl der FISH-positiven Fälle zusammenhängen. Insgesamt zeigten nur 2 Proben- und damit deutlich weniger als in den anderen beiden untersuchten Methoden und der genannten Studie bei NSCLC- ein positives Ergebnis in dieser Methode. Studien mit größerer Fallzahl könnten nachweisen, ob die MET-Genkopienzahl beim kolorektalen Karzinom einen geringeren Einfluss auf die Prognose nimmt als das Ergebnis der RNA-ISH oder IHC oder ob die fehlende Signifikanz in dieser Arbeit der geringen Fallzahl geschuldet ist.

Studien zur prognostischen Relevanz von MET-Alterationen bei kolorektalem Karzinom beziehen jedoch oft nur auf die Ergebnisse der Immunhistochemie. Eine kürzliche Studie an einem Kollektiv von 255 Patienten mit CRC (hiervon hatten 39 Patienten ein positives Ergebnis in der MET-IHC) wies ein nachweislich kürzeres PFS bei Patienten mit positivem IHC Ergebnis nach (Lee et al. 2018). In dieser Studie wurde der MET-Alterationsstatus jedoch nur mittels Immunhistochemie und am Gewebe des Primarius untersucht.

In einer Biomarker-Analyse aus dem Jahr 2014 an NSCLC unter Onartuzumab Therapie wurde ein signifikanter prognostischer Einfluss der MET-Proteinexpression auf das Therapieansprechen nachgewiesen, während weder der FISH-Score, noch MET-mRNA Level einen prognostischen Einfluss zeigten. Hervorzuheben ist, dass der Therapie-Benefit des Onartuzumabs bei Patienten mit negativem FISH-score, aber positivem IHC Score erhalten blieb (Koeppen et al. 2014).

Außerdem wurde die Korrelation der verschiedenen molekularpathologischen Untersuchungen analysiert. Eine besondere Signifikanz kommt hierbei dem Fall P13330, der in allen drei untersuchten Methoden den maximalen Score erreichte.

Die Bedeutung eines niedrig- oder mittelgradig amplifizierten Ergebnisses in der Fluoreszenz- in-Situ Hybridisierung, sowie in der RNA-in-Situ Hybridisierung und der Immunhistochemie benötigt aufgrund der in dieser Arbeit nachgewiesenen großen Streubreite Untersuchungen an einem größeren Kollektiv. Die uneinheitliche Auffassung in aktuellen Studien über den *cut-off* ab wann eine Met-Alteration als positiv zu werten ist bietet einen Erklärungsansatz für die widersprüchlichen Studienergebnisse.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit liefert deutliche Hinweise darauf, dass ein suffizienter Anteil der hepatischen Filiae von Patienten mit oligometastasierten kolorektalen Karzinom einen aberranten MET-Status aufweist. Die Auswertung legt zudem nahe, dass für die vollständige Erfassung der Patienten mit einer Aberration der MET-Achse die Verwendung mehrerer molekularpathologischen Methoden in Kombination benötigt wird.

Die Korrelation unterschiedlicher molekularpathologischer Untersuchungen zur MET-Alteration beim kolorektalen Karzinom ist derzeit noch unzureichend untersucht. Diese Arbeit erzielte eine vollständige Aufarbeitung des Patientenkollektivs mittels FISH, Immunhistochemie und RNA-ISH.

Ziel dieser Arbeit war die Evaluation der MET-HGF Signalkaskade als potenzielles therapeutisches *Target* für das oligometastasierte, potenziell kurable resezierte kolorektale Karzinom. Hierfür wurden die verschiedenen Ebenen der MET-HGF Achse mit Hilfe der FISH, ISH und RNA-ISH untersucht. Die Met-Amplifikation als etabliertes therapeutisches Target setzt klare Definition von Positivitätskriterien voraus. Die Schwierigkeiten in der Interpretation von grenzwertigen Ergebnissen in der Immunhistochemie, der gängigsten Methode, macht zudem eine weitere Untersuchung der Relevanz der FISH und RNA-ISH wünschenswert.

Des Weiteren wird MET als Therapieansatz derzeit noch von der rapiden Entwicklung von Resistenz gegen *small-molecule inhibitors* gebremst (Andres et al. 2019). Doch gerade diese bekannte Problematik wirft Licht auf MET Inhibitoren als potenzielle *rescue therapy* der häufig genutzten EGFR Inhibitoren. Stammzellforschung bezüglich erworbener Resistenz von kolorektalen neoplastischen Zellen gegenüber einer EGFR Inhibitor Therapie zeigte, dass eine Aktivierung des HGF/MET *pathways* eine komplette EGFR Inhibition überwinden kann (Joosten et al. 2019). Dies lässt die Hoffnung aufkommen, dass bei Auftreten einer EGFR Inhibitor Resistenz eine begleitende Therapie mit MET Inhibitoren Erfolg versprechen könnte.

Doch nicht nur die Zweitlinientherapie bei Resistenzentwicklung ist ein potenzieller Nutzen der MET Inhibition: Im fernmetastatierten Stadium bieten sich für das Kolonkarzinom unter

Anderem lokale Metastasentherapie (TACE, Radiofrequenzablation) an. Radiofrequenzablation zeigt jedoch auf unbetroffene Hepatozyten einen kanzerogenen Effekt. Hier wird ein Zusammenhang mit einer Aktivierung der MET/HGF Achse und Interleukin 6 *pathway* angenommen. Eine simultane MET Inhibitor Therapie zeigte geringere Proliferationsindices nach Radiofrequenzablation. (Liao et al. 2019)

Diese Arbeit liefert einen ersten Ansatz dafür, unter welchen Bedingungen MET als Prognosefaktor Beachtung finden sollte. Die begrenzte Anzahl der Fälle mit einem positiven Ergebnis in dieser Arbeit, insbesondere in der FISH, zeigt jedoch die Notwendigkeit von Analysen an einem größeren Kollektiv auf.

Aufgrund der zu erwartenden zukünftigen ökonomischen Belastung durch personalisierte Medizin in der Krebstherapie ist es erforderlich zu bestimmen, welche biochemischen Untersuchung zur Selektion der Patienten mit zu erwartendem Ansprechen auf eine *targeted therapy* notwendig sind. Eine effiziente und effektive Selektion der Patienten ist nötig, um den flächendeckenden Einsatz der *targeted therapy* zu ermöglichen.

Personalisierte Medizin in der Onkologie mag in Zusammenhang mit Antikörpertherapien auch meinen, das zu testende Patientenkollektiv sorgsam auszuwählen. Ein aberrantes Verhalten der MET/HGF- Achse ist signifikant häufiger vertreten unter Patienten mit Resistenzentwicklung gegenüber einer EGFR- Inhibitor Therapie und könnte hier ein vielversprechendes therapeutisches Target darstellen (Ai et al. 2018).

Bei Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen zeigt sich zudem, dass MET- Alterationen den Erfolg anderer Antikörpertherapien mitbestimmen können. Crizotinib, ein Multi-Tyrosinkinase Inhibitor dessen *targets* unter anderem c-MET und ALK sind, zeigt ein deutlich häufigeres objektives Therapieansprechen, wenn bei dem Patienten nicht nur eine ALK Mutation sondern auch eine c-Met Mutation nachgewiesen wurde (86.7% Therapieansprechen vs 59.4%) (Chen et al. 2018).

Zusammenfassend stellt sich c-MET als ein vielversprechender weiterer Baustein in der personalisierten Krebstherapie vor. Die relativ geringe Prävalenz von MET-Alterationen bei Patienten mit kolorektalen Karzinom bedingt die Notwendigkeit von Studien an einem größeren Kollektiv. Die hier aufgezeigte Tendenz zur Prognosebeeinflussung und Eröffnung weiterer Therapiemöglichkeiten beweist dennoch die Attraktivität weiterer Studien in diesem Gebiet.

6 Anhang

6.1 Protokoll der Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die hier beschriebene Aufbereitung der FISH Präparate erfolgte über zwei Arbeitstage und in weiten Teilen automatisiert mit Hilfe des VP 2000 Prozessor (Abott Molecular, Wiesbaden, Deutschland).

1. 2 µm dicke Paraffinschnitte herstellen und auf „Superfrost +“ Objektträgern aufziehen, Trocknen bei 56°C
2. Objektträger in Halterung des VP 2000 Prozessors einsetzen, starten des Programms

Programmablauf:

1. 3x 10 min Xylol
 2. 2x 5 min 100% Ethanol
 3. 1 min 96% Ethanol
 4. 1 min 80% Ethanol
 5. 1 min 70% Ethanol
 6. 5 min bei 37°C Lufttrocknen
 7. 20 min 0,2 M HCl
 8. 3 min Aqua dest
 9. 3 min 2x SSC-Waschpuffer
 10. 30 min Pretreatment Solution bei 80°C
 11. 1 min Aqua dest.
 12. 2 x 5 min 2x SSC-Waschpuffer
 13. 90 min Protease I bei 37°C
 14. 2 x 5 min 2x SSC-Waschpuffer
 15. 10 min 4,5% gepuffertes Formalin
 16. 2 x 5 min 2x SSC-Waschpuffer
 17. 1 min Aqua dest
 18. 5 min bei 37°C lufttrocknen
3. Auftragen der Sonde (verdünnt: 7µl Hybridisierungspuffer, 2µl Aqua dest., 1µl Sonde)
 4. 3-15µl Sonde auf den Schnitt geben, Deckgläschen auflegen und mit Fixogum umschließen
 5. Denaturierung im Hybridizer (Hybridisierung über Nacht bei 37°C)

6. Fixogum vom Objektträger entfernen, Deckgläschen abhebeln
7. Programm VP Prozessor 2000
 1. 2 min 2x SSC + 0,3% NP40 Waschpuffer bei 72°C
 2. 1 min 2x SSC-Waschpuffer bei Raumtemperatur
 3. 1 min A.dest bei Raumtemperatur
 4. 1 min 96% Ethanol
 5. 5 min Lufttrocknen
8. Schnitte mit ca. 15µl DAPI und 24x32mm Deckgläschen eindecken und im Kühlschrank lagern

6.2 Protokoll der Immunhistochemie

Indirekte-2-Schritt-Methode:

- 1) 3-4 µm dicke Paraffinschnitte herstellen, auf Objektträger (X-tra® Slides, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) ziehen und über Nacht bei 60 °C trocknen lassen
- 2) Entparaffinieren mit 2 x 100 % Xylol für 10 Min.
- 3) Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe (2 x 100 % Ethanol 10 Min., 1 x 96 % Ethanol 5 Min., 1 x 80 % Ethanol 5 Min., 1 x 70 % Ethanol 5 Min.)
- 4) Waschen mit einem Puffer (*Tris buffered saline & Tween 20*)
- 5) Vorbehandlung entsprechend dem Antikörper mit EDTA oder Citrat
- 6) Inkubation der Schnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration für 30 Min. bei Raumtemperatur
- 7) 5 Min. Hydrogen-Peroxid-Behandlung
- 8) Spülen mit Waschpuffer
- 9) Inkubation mit dem *Enhancer/Verstärker (post antibody blocking for BrightVision plus)* für 10 Min.
- 10) Spülen mit Waschpuffer
- 11) 15 Min. Inkubation mit Polymer Poly-HRP-GAM/R/RIgG
- 12) 8 Min. Inkubation mit DAB (Substrat/Chromogen)
- 13) Spülen mit Waschpuffer
- 14) 2 Min. Hämalaun einwirken lassen
- 15) Spülen mit Waschpuffer und anschließend mit Wasser
- 16) Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydrieren
- 17) Eindecken der Objektträger mit einem Deckglas

7 Literaturverzeichnis

- Adam R, de Gramont A, Figueras J, Kokudo N, Kunstlinger F, Loyer E, Poston G, Rougier P, Rubbia-Brandt L, Sobrero A, et al. (2015): Managing synchronous liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus. *Cancer Treat Rev* 41, 729–741
- Ai X, Guo X, Wang J, Stancu AL, Joslin PMN, Zhang D, Zhu S (2018): Targeted therapies for advanced non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 9, 37589–37607
- Aigner F, Pratschke J, Schmelzle M (2017): Oligometastatic Disease in Colorectal Cancer - How to Proceed. *Visc Med.* 33, 23–28
- Ait Ouakrim D, Pizot C, Boniol Magali, Malvezzi M, Boniol Mathieu, Negri E, Bota M, Jenkins MA, Bleiberg H, Autier P (2015): Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *BMJ* 351
- Al-Maghrabi J, Emam E, Gomaa W, Saggaf M, Buhmeida A, Al-Qahtani M, Al-Ahwal M (2015): c-MET immunostaining in colorectal carcinoma is associated with local disease recurrence. *BMC Cancer* 15
- Andres F, Iamele L, Meyer T, Stüber JC, Kast F, Gherardi E, Niemann HH, Plückthun A (2019): Inhibition of the MET Kinase Activity and Cell Growth in MET-Addicted Cancer Cells by Bi-Paratopic Linking. *Journal of Molecular Biology*
- Ang C-S, Phung J, Nice EC (2011): The discovery and validation of colorectal cancer biomarkers. *Biomed Chromatogr* 25, 82–99
- Angevin E, Spitaleri G, Rodon J, Dotti K, Isambert N, Salvagni S, Moreno V, Assadourian S, Gomez C, Harnois M, et al. (2017): A first-in-human phase I study of SAR125844, a selective MET tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumours with MET amplification. *Eur J Cancer* 87, 131–139
- Bahcall M, Sim T, Paweletz CP, Patel JD, Alden RS, Kuang Y, Sacher AG, Kim ND, Lydon CA, Awad MM, et al. (2016): Acquired METD1228V Mutation and Resistance to MET Inhibition in Lung Cancer. *Cancer Discov* 6, 1334–1341
- Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, Wolf U (2016): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. <https://edoc.rki.de/handle/176904/3264>; Zugriff am 15.04.2022
- Bendell JC, Hochster H, Hart LL, Firdaus I, Mace JR, McFarlane JJ, Kozloff M, Catenacci D, Hsu JJ, Hack SP, et al. (2017): A Phase II Randomized Trial (GO27827) of First-Line FOLFOX Plus Bevacizumab with or Without the MET Inhibitor Onartuzumab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist* 22, 264–271
- Boon EMJ, van der Neut R, van de Wetering M, Clevers H, Pals ST (2002): Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase met in colorectal cancer. *Cancer Res* 62, 5126–5128

- Bradley CA, Dunne PD, Bingham V, McQuaid S, Khawaja H, Craig S, James J, Moore WL, McArt DG, Lawler M, et al. (2016): Transcriptional upregulation of c-MET is associated with invasion and tumor budding in colorectal cancer. *Oncotarget* 7, 78932–78945
- Cathomas G (2014): PIK3CA in Colorectal Cancer. *Front Oncol* 4
- Chen RL, Zhao J, Zhang XC, Lou NN, Chen HJ, Yang X, Su J, Xie Z, Zhou Q, Tu HY, et al. (2018): Crizotinib in advanced non-small-cell lung cancer with concomitant ALK rearrangement and c-Met overexpression. *BMC Cancer* 18, 1171
- Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, Wehland J, Birchmeier C, Birchmeier W (2007): c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol* 177, 151–162
- Cho NY, Choi M, Kim B-H, Cho YM, Moon KC, Kang GH (2006): BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 119, 1858–1862
- Coffee EM, Faber AC, Roper J, Sinnamon MJ, Goel G, Keung L, Wang WV, Vecchione L, de Vriendt V, Weinstein BJ, et al. (2013): Concomitant BRAF and PI3K/mTOR blockade is required for effective treatment of BRAF(V600E) colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 19, 2688–2698
- Cohen NA, Zeng S, Seifert AM, Kim TS, Sorenson EC, Greer JB, Beckman MJ, Santamaria-Barria JA, Crawley MH, Green BL, et al. (2015): Pharmacological Inhibition of KIT Activates MET Signaling in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Res* 75, 2061–2070
- de Jong MC, Pulitano C, Ribero D, Strub J, Mentha G, Schulick RD, Choti MA, Aldrighetti L, Capussotti L, Pawlik TM (2009): Rates and patterns of recurrence following curative intent surgery for colorectal liver metastasis: an international multi-institutional analysis of 1669 patients. *Ann Surg* 250, 440–448
- De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, et al. (2010): Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 11, 753–762
- De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S (2011): KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 12, 594–603
- Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, Stefani AD, Valente G, Giordano S, Cortesina G, Comoglio PM (2000): Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene* 19, 1547–1555

- Ding S, Merkulova-Rainon T, Han ZC, Tobelem G (2003): HGF receptor up-regulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis in vitro. *Blood* 101, 4816–4822
- Eklöf V, Wikberg ML, Edin S, Dahlin AM, Jonsson B-A, Öberg Å, Rutegård J, Palmqvist R (2013): The prognostic role of KRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN in colorectal cancer. *Br J Cancer* 108, 2153–2163
- Epstein JA, Shapiro DN, Cheng J, Lam PY, Maas RL (1996): Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 4213–4218
- Fargnoli Maria Concetta, Fargnoli Maria Concetia, Pike K, Pfeiffer RM, Tsang S, Rozenblum E, Munroe DJ, Golubeva Y, Calista D, Seidenari S, et al. (2008): MC1R variants increase risk of melanomas harboring BRAF mutations. *J Invest Dermatol* 128, 2485–2490
- Fixman ED, Fournier TM, Kamikura DM, Naujokas MA, Park M (1996): Pathways downstream of Shc and Grb2 are required for cell transformation by the tpr-Met oncoprotein. *J Biol Chem* 271, 13116–13122
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB (2010): Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363, 809–819
- Gambarotta G, Boccaccio C, Giordano S, Andö M, Stella MC, Comoglio PM (1996): Ets up-regulates MET transcription. *Oncogene* 13, 1911–1917
- Garcia S., Dalès J-P, Jacquemier J, Charafe-Jauffret E, Birnbaum D, Andrac-Meyer L, Lavaut M-N, Allasia C, Carpentier-Meunier S, Bonnier P, Charpin-Taranger C (2007): c-Met overexpression in inflammatory breast carcinomas: automated quantification on tissue microarrays. *Br J Cancer* 96, 329–335
- Garcia Stéphane, Dales J-P, Charafe-Jauffret E, Carpentier-Meunier S, Andrac-Meyer L, Jacquemier J, Andonian C, Lavaut M-N, Allasia C, Bonnier P, Charpin C (2007): Overexpression of c-Met and of the transducers PI3K, FAK and JAK in breast carcinomas correlates with shorter survival and neoangiogenesis. *Int J Oncol* 31, 49–58
- Giubellino A, Gao Y, Lee S, Lee M-J, Vasselli JR, Medepalli S, Trepel JB, Burke TR, Bottaro DP (2007): Inhibition of tumor metastasis by a growth factor receptor bound protein 2 Src homology 2 domain-binding antagonist. *Cancer Res* 67, 6012–6016
- Gong J, Cho M, Fakih M (2016): RAS and BRAF in metastatic colorectal cancer management. *J Gastrointest Oncol* 7, 687–704
- Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, Polverini P, Rosen EM (1993): Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1937–1941

- Greenall SA, Adams TE, Johns TG (2016): Incomplete target neutralization by the anti-cancer antibody rilotumumab. *MAbs* 8, 246–252
- Harada S, Morlote D (2020): Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Adv Anat Pathol* 27, 20–26
- Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Tahara M, Yamamoto T, Okamoto Y, Minekawa R, Isobe A, Ohmichi M, Tasaka K, Murata Y (2005): Up-regulation of c-met protooncogene product expression through hypoxia-inducible factor-1alpha is involved in trophoblast invasion under low-oxygen tension. *Endocrinology* 146, 4682–4689
- Hoffmann KM, Tapia JA, Berna MJ, Thill M, Braunschweig T, Mantey SA, Moody TW, Jensen RT (2006): Gastrointestinal hormones cause rapid c-Met receptor down-regulation by a novel mechanism involving clathrin-mediated endocytosis and a lysosome-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281, 37705–37719
- Inger DB (1999): Colorectal cancer screening. *Prim Care* 26, 179–187
- Jang W-J, Jung S-K, Kang J-S, Jeong J-W, Bae M-K, Joo SH, Park GH, Kundu JK, Hong Y-S, Jeong C-H (2014): Anti-tumor activity of WK88-1, a novel geldanamycin derivative, in gefitinib-resistant non-small cell lung cancers with Met amplification. *Cancer Sci* 105, 1245–1253
- Joosten SPJ, Mizutani T, Spaargaren M, Clevers H, Pals ST (2019): MET Signaling Overcomes Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition in Normal and Colorectal Cancer Stem Cells Causing Drug Resistance. *Gastroenterology* 157, 1153-1155.e1
- Jurczyszyn A, Zebzda A, Czepiel J, Perucki W, Bazan-Socha S, Cibor D, Owczarek D, Majka M (2014): Geldanamycin and Its Derivatives Inhibit the Growth of Myeloma Cells and Reduce the Expression of the MET Receptor. *J Cancer* 5, 480–490
- Kim JH, Kim HS, Kim BJ (2018): Prognostic value of MET copy number gain in non-small-cell lung cancer: an updated meta-analysis. *J Cancer* 9, 1836–1845
- Kim K-H, Kim H (2017): Progress of antibody-based inhibitors of the HGF–cMET axis in cancer therapy. *Exp Mol Med* 49, e307
- Kishi Y, Kuba K, Nakamura Takahiro, Wen J, Suzuki Y, Mizuno S, Nukiwa T, Matsumoto K, Nakamura Toshikazu (2009): Systemic NK4 gene therapy inhibits tumor growth and metastasis of melanoma and lung carcinoma in syngeneic mouse tumor models. *Cancer Sci* 100, 1351–1358
- Koch A, Mancini A, El Bounkari O, Tamura T (2005): The SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP)-2 binds to c-Met directly via tyrosine residue 1356 and involves hepatocyte growth factor (HGF)-induced lamellipodium formation, cell scattering and cell spreading. *Oncogene* 24, 3436–3447
- Koeppen H, Yu W, Zha J, Pandita A, Penuel E, Rangell L, Raja R, Mohan S, Patel R, Desai R, et al. (2014): Biomarker analyses from a placebo-controlled phase II study

- evaluating erlotinib±onartuzumab in advanced non-small cell lung cancer: MET expression levels are predictive of patient benefit. *Clin Cancer Res* 20, 4488–4498
- Köllermann J, Albrecht H, Schlomm T, Huland H, Graefen M, Bokemeyer C, Simon R, Sauter G, Wilczak W (2010): Activating BRAF gene mutations are uncommon in hormone refractory prostate cancer in Caucasian patients. *Oncol Lett* 1, 729–732
- Kong-Beltran M, Stamos J, Wickramasinghe D (2004): The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. *Cancer Cell* 6, 75–84
- Kopetz S, Desai J, Chan E, Hecht JR, O'Dwyer PJ, Maru D, Morris V, Janku F, Dasari A, Chung W, et al. (2015): Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 33, 4032–4038
- Kornprat P, Jarnagin WR, Gonen M, DeMatteo RP, Fong Y, Blumgart LH, D'Angelica M (2007): Outcome after hepatectomy for multiple (four or more) colorectal metastases in the era of effective chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 14, 1151–1160
- Krause DS, Van Etten RA (2005): Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 353, 172–187
- Kuhlmann K, van Hilst J, Fisher S, Poston G (2016): Management of disappearing colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 42, 1798–1805
- Kumar D, Kandl C, Hamilton CD, Shnayder Y, Tsue TT, Kakarala K, Ledgerwood L, Sun XS, Huang HJ, Girod D, Thomas SM (2015): Mitigation of Tumor-Associated Fibroblast-Facilitated Head and Neck Cancer Progression With Anti-Hepatocyte Growth Factor Antibody Ficlaturuzumab. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 141, 1133–1139
- Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J: Robbins & Cotran: Pathologic Basis of Disease. 8.; Elsevier, Philadelphia 2009
- Kurzrock R, Markman M: Targeted cancer therapy. Springer Science & Business Media 2008
- Lee SJ, Lee J, Park SH, Park JO, Lim HY, Kang WK, Park YS, Kim ST (2018): c-MET Overexpression in Colorectal Cancer: A Poor Prognostic Factor for Survival. *Clin Colorectal Cancer*
- Leitlinienprogramm Onkologie, AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe (Hrsg.) (2014): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1.
- Liao H, Ahmed M, Markezana A, Zeng G, Stechele M, Galun E, Goldberg SN (2019): Thermal Ablation Induces Transitory Metastatic Growth by Means of the STAT3/c-Met Molecular Pathway in an Intrahepatic Colorectal Cancer Mouse Model. *Radiology* 294, 464–472
- Liao X, Morikawa T, Lochhead P, Imamura Y, Kuchiba A, Yamauchi M, Nosho K, Qian ZR, Nishihara R, Meyerhardt JA, et al. (2012): Prognostic role of PIK3CA mutation

- in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Clin Cancer Res* 18, 2257–2268
- Lieberman DA, Atkin W (2004): Review article: balancing the ideal versus the practical-considerations of colorectal cancer prevention and screening. *Aliment Pharmacol Ther* 19 Suppl 1, 71–76
- Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile J-F, Côté J-F, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, et al. (2006): KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66, 3992–3995
- Lin JS, Perdue LA, Henrikson NB, Bean SI, Blasi PR (2021): Screening for Colorectal Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA* 325, 1978
- Liu L, Zeng W, Wortinger MA, Yan SB, Cornwell P, Peek VL, Stephens JR, Tetreault JW, Xia J, Manro JR, et al. (2014): LY2875358, a neutralizing and internalizing anti-MET bivalent antibody, inhibits HGF-dependent and HGF-independent MET activation and tumor growth. *Clin Cancer Res* 20, 6059–6070
- Liu Y, Yu X-F, Zou J, Luo Z-H (2015): Prognostic value of c-Met in colorectal cancer: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 21, 3706–3710
- Ma PC, Tretiakova MS, MacKinnon AC, Ramnath N, Johnson C, Dietrich S, Seiwert T, Christensen JG, Jagadeeswaran R, Krausz T, et al. (2008): Expression and Mutational Analysis of MET in Human Solid Cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 1025–1037
- Mao M, Tian F, Mariadason JM, Tsao CC, Lemos R, Dayyani F, Gopal YNV, Jiang Z-Q, Wistuba II, Tang XM, et al. (2013): Resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutant colon cancer can be overcome with PI3K inhibition or demethylating agents. *Clin Cancer Res* 19, 657–667
- Maringe C, Walters S, Rachet B, Butler J, Fields T, Finan P, Maxwell R, Nedrebø B, Pählman L, Sjövall A, et al. (2013): Stage at diagnosis and colorectal cancer survival in six high-income countries: a population-based study of patients diagnosed during 2000-2007. *Acta Oncol* 52, 919–932
- Martens T, Schmidt N-O, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K (2006): A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. *Clin Cancer Res* 12, 6144–6152
- Merchant M, Ma X, Maun HR, Zheng Z, Peng J, Romero M, Huang A, Yang N, Nishimura M, Greve J, et al. (2013): Monovalent antibody design and mechanism of action of onartuzumab, a MET antagonist with anti-tumor activity as a therapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E2987–E2996
- Michieli P, Mazzone M, Basilico C, Cavassa S, Sottile A, Naldini L, Comoglio PM (2004): Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. *Cancer Cell* 6, 61–73

- Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, Takahashi K, Okigaki M, Arakaki N, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, Takahashi K (1989): Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 163, 967–973
- Mok TSK, Geater SL, Su W-C, Tan E-H, Yang JC-H, Chang G-C, Han M, Komarnitsky P, Payumo F, Garrus JE, et al. (2016): A Randomized Phase 2 Study Comparing the Combination of Ficlaturumab and Gefitinib with Gefitinib Alone in Asian Patients with Advanced Stage Pulmonary Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 11, 1736–1744
- Morley R, Cardenas A, Hawkins P, Suzuki Y, Paton V, Phan S-C, Merchant M, Hsu J, Yu W, Xia Q, et al. (2015): Safety of Onartuzumab in Patients with Solid Tumors: Experience to Date from the Onartuzumab Clinical Trial Program. *PLoS ONE* 10, e0139679
- Morozov VM, Massoll NA, Vladimirova OV, Maul GG, Ishov AM (2008): Regulation of c-met expression by transcription repressor Daxx. *Oncogene* 27, 2177–2186
- Mughal A, Aslam HM, Sheikh A, Khan AMH, Saleem S (2013): c-Met inhibitors. *Infect Agent Cancer* 8, 13
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S (1989): Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342, 440–443
- Nordlinger B, Van Cutsem E, Rougier P, Köhne C-H, Ychou M, Sobrero A, Adam R, Arvidsson D, Carrato A, Georgoulas V, et al. (2007): Does chemotherapy prior to liver resection increase the potential for cure in patients with metastatic colorectal cancer? A report from the European Colorectal Metastases Treatment Group. *Eur J Cancer* 43, 2037–2045
- Nosho K, Kawasaki T, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Zepf D, Yan L, Longtine JA, Fuchs CS, Ogino S (2008): PIK3CA Mutation in Colorectal Cancer: Relationship with Genetic and Epigenetic Alterations. *Neoplasia* 10, 534–541
- Ogino S, Lochhead P, Giovannucci E, Meyerhardt JA, Fuchs CS, Chan AT (2014): Discovery of Colorectal Cancer PIK3CA Mutation as Potential Predictive Biomarker: Power and Promise of Molecular Pathological Epidemiology. *Oncogene* 33, 2949–2955
- Okamoto W, Okamoto I, Tanaka K, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Yamaguchi H, Arai T, Nishio K, Fukuoka M, et al. (2010): TAK-701, a humanized monoclonal antibody to hepatocyte growth factor, reverses gefitinib resistance induced by tumor-derived HGF in non-small cell lung cancer with an EGFR mutation. *Mol Cancer Ther* 9, 2785–2792
- Peeters M, Kafatos G, Taylor A, Gastanaga VM, Oliner KS, Hechmati G, Terwey J-H, van Krieken JH (2015): Prevalence of RAS mutations and individual variation patterns among patients with metastatic colorectal cancer: A pooled analysis of randomised controlled trials. *Eur J Cancer* 51, 1704–1713

- Pelicci G, Giordano S, Zhen Z, Salcini AE, Lanfrancone L, Bardelli A, Panayotou G, Waterfield MD, Ponzetto C, Pelicci PG (1995): The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. *Oncogene* 10, 1631–1638
- Petrelli A, Circosta P, Granziero L, Mazzone M, Pisacane A, Fenoglio S, Comoglio PM, Giordano S (2006): Ab-induced ectodomain shedding mediates hepatocyte growth factor receptor down-regulation and hampers biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5090–5095
- Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM (1994): A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 261–271
- Prat M, Oltolina F, Basilico C (2014): Monoclonal Antibodies against the MET/HGF Receptor and Its Ligand: Multitask Tools with Applications from Basic Research to Therapy. *Biomedicines* 2, 359–383
- Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, De Roock W, Biesmans B, Claes B, Lambrechts D, Van Cutsem E, Tejpar S (2009): PIK3CA Mutations Are Not a Major Determinant of Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 15, 3184–3188
- Ren G, Liu X, Mao X, Zhang Y, Stankiewicz E, Hylands L, Song R, Berney DM, Clark J, Cooper C, Lu Y-J (2012): Identification of frequent BRAF copy number gain and alterations of RAF genes in Chinese prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 51, 1014–1023
- Riede U-N, Werner M, Schäfer H-E (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2004
- Roberts PJ, Der CJ (2007): Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291–3310
- Rodrigues GA, Park M, Schlessinger J (1997): Activation of the JNK pathway is essential for transformation by the Met oncogene. *EMBO J* 16, 2634–2645
- Roock WD, Vriendt VD, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S (2011): KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *The Lancet Oncology* 12, 594–603
- Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Sanderson K, Walters RJ, Parry S, Jenkins MA, Win AK, Southey MC, et al. (2013): PIK3CA Activating Mutation in Colorectal Carcinoma: Associations with Molecular Features and Survival. *PLoS One* 8
- Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, Hofmann M, Osamura RY, Penault-Llorca F, van de Vijver M, Viale G (2012): HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Modern Pathology* 25, 637–650

- Sakkab D, Lewitzky M, Posern G, Schaeper U, Sachs M, Birchmeier W, Feller SM (2000): Signaling of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF) to the small GTPase Rap1 via the large docking protein Gab1 and the adapter protein CRKL. *J Biol Chem* 275, 10772–10778
- Salama AKS, Flaherty KT (2013): BRAF in melanoma: current strategies and future directions. *Clin Cancer Res* 19, 4326–4334
- Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, Di Nicolantonio F, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, et al. (2009): PIK3CA Mutations in Colorectal Cancer Are Associated with Clinical Resistance to EGFR-Targeted Monoclonal Antibodies. *Cancer Research* 69, 1851–1857
- Sawada K, Radjabi AR, Shinomiya N, Kistner E, Kenny H, Becker AR, Turkyilmaz MA, Salgia R, Yamada SD, Vande Woude GF, et al. (2007): c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion. *Cancer Res* 67, 1670–1679
- Schildhaus H-U, Schultheis AM, Rüschoff J, Binot E, Merkelbach-Bruse S, Fassunke J, Schulte W, Ko Y-D, Schlesinger A, Bos M, et al. (2015): MET Amplification Status in Therapy-Naïve Adeno- and Squamous Cell Carcinomas of the Lung. *Clin Cancer Res* 21, 907–915
- Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M, et al. (1997): Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 16, 68–73
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G (2007): Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 295–308
- Shah MA, Cho J-Y, Tan IB, Tebbutt NC, Yen C-J, Kang A, Shames DS, Bu L, Kang Y-K (2016): A Randomized Phase II Study of FOLFOX With or Without the MET Inhibitor Onartuzumab in Advanced Adenocarcinoma of the Stomach and Gastroesophageal Junction. *Oncologist* 21, 1085–1090
- Shah MA, Bang Y-J, Lordick F, Alsina M, Chen M, Hack SP, Bruey JM, Smith D, McCaffery I, Shames DS, et al. (2017): Effect of Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin With or Without Onartuzumab in HER2-Negative, MET-Positive Gastroesophageal Adenocarcinoma: The METGastric Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 3, 620–627
- Silvagno F, Follenzi A, Arese M, Prat M, Giraudo E, Gaudino G, Camussi G, Comoglio PM, Bussolino F (1995): In vivo activation of met tyrosine kinase by heterodimeric hepatocyte growth factor molecule promotes angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1857–1865
- Song J, Li M, Tretiakova M, Salgia R, Cagle PT, Husain AN (2010): Expression patterns of PAX5, c-Met, and paxillin in neuroendocrine tumors of the lung. *Arch Pathol Lab Med* 134, 1702–1705

- Spigel DR, Ervin TJ, Ramlau RA, Daniel DB, Goldschmidt JH, Blumenschein GR, Krzakowski MJ, Robinet G, Godbert B, Barlesi F, et al. (2013): Randomized phase II trial of Onartuzumab in combination with erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 31, 4105–4114
- Spigel DR, Edelman MJ, O’Byrne K, Paz-Ares L, Mocci S, Phan S, Shames DS, Smith D, Yu W, Paton VE, Mok T (2017): Results From the Phase III Randomized Trial of Onartuzumab Plus Erlotinib Versus Erlotinib in Previously Treated Stage IIIB or IV Non-Small-Cell Lung Cancer: METLung. *J Clin Oncol* 35, 412–420
- Stark AK, Sriskantharajah S, Hessel EM, Okkenhaug K (2015): PI3K inhibitors in inflammation, autoimmunity and cancer. *Curr Opin Pharmacol* 23, 82–91
- Sun C, Liu Z, Li S, Yang C, Xue R, Xi Y, Wang L, Wang S, He Q, Huang J, et al. (2015a): Down-regulation of c-Met and Bcl2 by microRNA-206, activates apoptosis, and inhibits tumor cell proliferation, migration and colony formation. *Oncotarget* 6, 25533–25574
- Sun C, Sang M, Li S, Sun X, Yang C, Xi Y, Wang L, Zhang F, Bi Y, Fu Y, et al. (2015b): Hsa-miR-139-5p inhibits proliferation and causes apoptosis associated with down-regulation of c-Met. *Oncotarget* 6, 39756–39792
- Suzuki Y, Sakai K, Ueki J, Xu Q, Nakamura Takahiro, Shimada H, Nakamura Toshikazu, Matsumoto K (2010): Inhibition of Met/HGF receptor and angiogenesis by NK4 leads to suppression of tumor growth and migration in malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer* 127, 1948–1957
- Tabernero J, Elez ME, Herranz M, Rico I, Prudkin L, Andreu J, Mateos J, Carreras MJ, Han M, Gifford J, et al. (2014): A pharmacodynamic/pharmacokinetic study of ficlatuzumab in patients with advanced solid tumors and liver metastases. *Clin Cancer Res* 20, 2793–2804
- Takeuchi H, Bilchik A, Saha S, Turner R, Wiese D, Tanaka M, Kuo C, Wang H-J, Hoon DSB (2003): c-MET expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases. *Clin Cancer Res* 9, 1480–1488
- Tan YH, Liu Y, Eu KW, Ang PW, Li WQ, Salto-Tellez M, Iacopetta B, Soong R (2008): Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. *Pathology* 40, 295–298
- Tartaglia M, Gelb BD, Zenker M (2011): Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25, 161–179
- Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, Korhonen M, Kytölä S, Mecklin J-P, Orpana A, Peltomäki P, Ristimäki A (2013): BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch* 463, 613–621
- Tidyman WE, Rauen KA (2008): Noonan, Costello and cardio-facio-cutaneous syndromes: dysregulation of the Ras-MAPK pathway. *Expert Rev Mol Med* 10, e37

- Trusolino L (2016): Oncogenic MET as an Effective Therapeutic Target in Non–Small Cell Lung Cancer Resistant to EGFR Inhibitors: The Rise of the Phoenix. *Cancer Discov* 6, 1306–1308
- Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N (1995): Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702–705
- Uehara Y, Mori C, Noda T, Shiota K, Kitamura N (2000): Rescue of embryonic lethality in hepatocyte growth factor/scatter factor knockout mice. *Genesis* 27, 99–103
- Van Cutsem E, Köhne C-H, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, et al. (2011): Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 29, 2011–2019
- Vang R, Shih I-M, Kurman RJ (2009): Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol* 16, 267–282
- Wang J, Goetsch L, Tucker L, Zhang Q, Gonzalez A, Vaidya KS, Oleksijew A, Boghaert E, Song M, Sokolova I, et al. (2016): Anti-c-Met monoclonal antibody ABT-700 breaks oncogene addiction in tumors with MET amplification. *BMC Cancer* 16, 105
- Weinberg RA: *The Biology of Cancer*. 2.; Garland Science, New York 2013
- Wellbrock C, Karasarides M, Marais R (2004): The RAF proteins take centre stage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 875
- Winter A, Sigurdardottir AG, DiCara D, Valenti G, Blundell TL, Gherardi E (2016): Developing Antagonists for the Met-HGF/SF Protein-Protein Interaction Using a Fragment-Based Approach. *Mol Cancer Ther* 15, 3–14
- Xing M, Liu R, Liu X, Murugan AK, Zhu G, Zeiger MA, Pai S, Bishop J (2014): BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. *J Clin Oncol* 32, 2718–2726
- Yamamoto S, Tsuda H, Miyai K, Takano M, Tamai S, Matsubara O (2012): Accumulative copy number increase of MET drives tumor development and histological progression in a subset of ovarian clear-cell adenocarcinomas. *Mod Pathol* 25, 122–130
- Yoh K, Doi T, Ohmatsu H, Kojima T, Takahashi H, Zenke Y, Wacheck V, Enatsu S, Nakamura T, Turner K, Uenaka K (2016): A phase I dose-escalation study of LY2875358, a bivalent MET antibody, given as monotherapy or in combination with erlotinib or gefitinib in Japanese patients with advanced malignancies. *Invest New Drugs* 34, 584–595

- Yoshida D, Ikeda Y, Waki K, Shirabe K, Kakeji Y, Tsujitani S, Maehara Y (2012): Different incidence of synchronous liver metastasis between proximal and distal colon cancer. *Surg Today* 42, 426–430
- Zeng Z-S, Weiser MR, Kuntz E, Chen C-T, Khan SA, Forslund A, Nash GM, Gimbel M, Yamaguchi Y, Culliford AT, et al. (2008): c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases. *Cancer Lett* 265, 258–269
- Zhang YW, Wang LM, Jove R, Vande Woude GF (2002): Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. *Oncogene* 21, 217–226
- Zhang YW, Graveel C, Shinomiya N, Woude GFV (2004): Met decoys: Will cancer take the bait? *Cancer Cell* 6, 5–6
- Zhu H, Naujokas MA, Park M (1994): Receptor chimeras indicate that the met tyrosine kinase mediates the motility and morphogenic responses of hepatocyte growth/scatter factor. *Cell Growth Differ* 5, 359–366
- Zhu M, Tang R, Doshi S, Oliner KS, Dubey S, Jiang Y, Donehower RC, Iveson T, Loh EY, Zhang Y (2015): Exposure-response analysis of rilotumumab in gastric cancer: the role of tumour MET expression. *Br J Cancer* 112, 429–437
- National Comprehensive Cancer Network.
<https://www.nccn.org/patients/guidelines/colon/files/assets/common/downloads/files/colon.pdf>; Zugriff am 26.11.2017

Danksagung

Mein Weg zu dieser Arbeit war mehr ein Marathon als ein Sprint. Ich möchte mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Ströbel bedanken für den Abschluss meiner Arbeit.

Dank gebührt auch den medizinisch-technischen Assistenten im molekularen Labor des Instituts der Pathologie in Göttingen. Ohne die unermüdliche Arbeit von Sara Hugo und ihren Kolleginnen wäre meine Dissertation nicht möglich gewesen.