

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. C. Röcken)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Entwicklung
eines prädiktiven Biomarker-Score für MET
im Magenkarzinom**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Marie-Luise Metzger
aus Reutlingen

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Christoph Röcken, Institut für Pathologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christiane Pott, Klinik für Innere Medizin II mit
den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

Tag der mündlichen Prüfung: Mittwoch, den 06.11.2019

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 20.07.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Magenkarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie des Magenkarzinoms	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	3
1.1.3 Pathologie des Magenkarzinoms.....	7
1.1.4 Prognose und Therapie des Magenkarzinoms	12
1.2 MET als Rezeptor-Tyrosin-Kinase.....	14
1.2.1 Physiologie der Rezeptor-Tyrosin-Kinase.....	14
1.2.2 Tumorpathologische Bedeutung der RTKs.....	15
1.3 Fragestellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Studienkollektiv	19
2.1.2 Geräte	20
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	20
2.1.4 Kitsysteme	21
2.1.5 Antikörper.....	21
2.1.6 Sonde.....	21
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.8 Software.....	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Immunhistochemie.....	23
2.2.2 Chromogene in situ-Hybridisierung (CISH).....	25
2.2.3 Virtuelle Auswertung mittels Mikroskopie	26
2.2.4 Statistische Auswertung.....	27
3 Ergebnisse.....	28

3.1	Expressionsanalyse von MET im Magenkarzinom	28
3.1.1	Immunhistochemie.....	28
3.1.2	Chromogene in situ-Hybridisierung.....	30
3.2	Korrelation des Patientenüberlebens zwischen <i>MET</i> -amplifizierten und positiven Tumorarealen in der Immunfärbung	32
3.3	Korrelation des MET-Status mit den klinisch-pathologischen Eigenschaften der Patienten	34
3.4	Multivariate Überlebensanalyse (Cox Regression)	38
3.5	MET-Status in Lymphknotenmetastasen.....	38
3.6	Räumliche Lokalisierung von MET-positiven Tumorzellklonen	39
4	Diskussion	40
4.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	40
4.2	Diskussion der Methoden	40
4.2.1	Immunhistochemie.....	40
4.2.2	Chromogene in situ-Hybridisierung.....	41
4.3	Diskussion der Ergebnisse	42
4.3.1	Hintergrund der Untersuchung.....	42
4.3.2	Verwerfung der 10 % Cutoff-Regel.....	42
4.3.3	Tumorheterogenität.....	43
4.3.4	<i>KRAS</i> und <i>PIK3CA</i> als negative prädiktive Marker.....	44
4.3.5	Ausblick.....	44
5	Zusammenfassung	46
6	Literaturverzeichnis	47
7	Anhang.....	52
7.1	Ethikvotum.....	52
8	Publikation.....	53
9	Erklärung	54
10	Danksagung.....	55

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
bcl-2	B-Zell-Lymphom 2
cag	Cytotoxin-assoziiertes Gen
CISH	chromogen in-situ-Hybridisierung
DAB	Diaminobenzidin
DNA	desoxyribonucleid acid (engl.), Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
Erk	Extrazellulär-Signal regulierende Kinase
FGFR2	Fibroblast Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
H. pylori	Helicobacter pylori
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hematoxylin und Eosin
HGF/SF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor/Scatter-Faktor
HNPCC	hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom
HPTS	Heat Pretreatment Solution
Hscore	Histo-Score
IGRF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor
IHC	Immunhistochemie
IR	Insulinrezeptor
KI	Konfidenzintervall
MAPK	Mitogenaktivierte Protein-Kinase
MET	Hepatozyten-Wachstums-Rezeptor
MSS	Mikrosatelliteninstabilität
NaCl	Natrium-Chlorid
PDGFR	Thrombozyten Wachstumsfaktor-Rezeptor
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat 3-Kinase katalytische Untereinheit
PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
RAF	Rat fibrosacroma
RAS	Rat sarcoma

RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SD	Standardabweichung
SSC	Lösung aus Natrium-Chlorid und tri-Natrium Citrat Dihydrat
STAT3	Signalwandler und Aktivator der Transkription 3
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen
ToGA	Trastuzumab für Magenkarzinom
UICC	Union internationalis contra cancrum (lat.)
vacA	Vacuolating Cytotoxin A
VEGFR	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms von 2010 sowie 2017	10
Tabelle 2.	UICC-Stadien des Magenkarzinoms nach Wittekind C. et al.....	11
Tabelle 3.	Korrelation des Patientenüberlebens mit MET-immungefärbten und <i>MET</i> -amplifizierten Tumorbereichen	33
Tabelle 4:	Klinisch-pathologische Patienten-Eigenschaften der Magenkarzinom-Kohorte.....	35

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Epidemiologische Verteilung des Magenkarzinoms weltweit.....	2
Abbildung 2:	Altersstandardisierte Sterberaten je 100.000 Einwohner für Magenkrebs (ICD-10 C16).....	3
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der H. pylori-assoziierten präkanzerösen Kaskade bis hin zum Adenokarzinom.	9
Abbildung 4:	Verteilung der T-Stadien bei Erstdiagnose nach Geschlecht.	12
Abbildung 5:	Schematische Darstellung einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase und die dazugehörige nachgeschaltete Signalübertragung.....	15
Abbildung 6:	Die Expression des Hepatozytenwachstumsfaktor-Rezeptors (MET) im Magenkarzinom.....	29
Abbildung 7:	Wasserfall-Diagramm: Verteilung der MET-Amplifikation und Immunhistochemie des Hepatozytenwachstumsfaktor-Rezeptors (MET) von 55 Patienten.	31
Abbildung 8:	Kaplan-Meier-Kurven, die das Überleben der Patienten darstellen.	33
Abbildung 9:	Her2/neu- und Hepatozytenwachstumsfaktor-Rezeptor (MET)-Überexpression bei einem einzigen Patienten.....	37

1 Einleitung

1.1 Das Magenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie des Magenkarzinoms

Das Magenkarzinom stellt weltweit die vierthäufigste Krebserkrankung dar und liegt weiterhin an zweiter Stelle der krebsbedingten Todesursachen [1]. Dabei zeigen sich vor allem in seiner Inzidenz deutliche geografische Unterschiede. Japan, Korea, China, Südamerika und Russland zählen zu den Ländern mit hoher Inzidenz, Westeuropa und die USA sowie Afrika zu den Ländern mit niedriger Inzidenz (Abbildung 1) [2, 3]. Mit einem klaren Abstand ist sowohl die Erkrankungshäufigkeit als auch die Sterblichkeit in Ostasien am höchsten. In Deutschland beträgt die Inzidenz der Neuerkrankungen ca. 9 (Männer) bzw. 6 (Frauen)/100.000 Einwohner/Jahr. Männer sind dabei im Verhältnis 2:1 im Vergleich zu den Frauen betroffen, wobei das mittlere Erkrankungsalter mit 72 Jahren bei den Männern und 75 Jahren bei den Frauen vergleichsweise hoch liegt [4]. Vergleicht man die internationalen und regionalen Sterbe- und Erkrankungsraten, so zeigt sich ein klares West-Ost-Gefälle nicht nur in Europa und innerhalb Deutschlands, sondern weltweit. Beispielsweise fallen die Erkrankungsraten aller östlichen Bundesländer mit Ausnahme Berlins höher aus als in den westlichen Bundesländern (Abbildung 2) [4]. Bezüglich der Neuerkrankungs- und Sterberaten ist in den letzten Jahren ein Rückgang sowohl in Deutschland als auch in anderen Industrienationen zu verzeichnen. Dies ist vermutlich auf die veränderten Lebens- und Ernährungsgewohnheiten zurückzuführen. Durch eine späte Diagnosestellung und eine nicht hinreichend spezifische Therapieoption begründet das Magenkarzinom jedoch weiterhin eine hohe Sterblichkeitsrate [4].

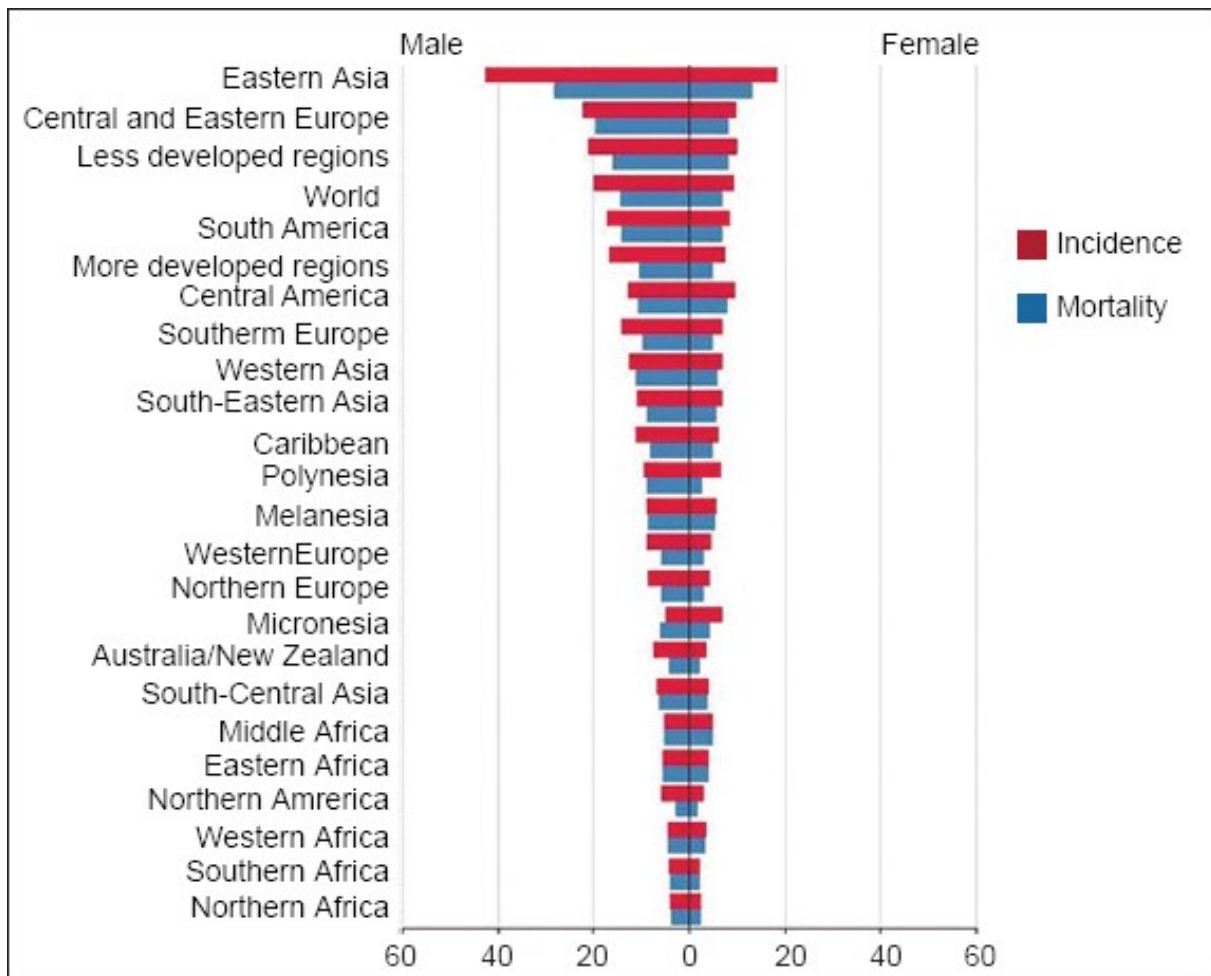


Abbildung 1: Epidemiologische Verteilung des Magenkarzinoms weltweit.
 Gezeigt sind die alterstandarisierten Inzidenzen sowie die Mortalitätsraten des Magenkarzinoms pro 100.000 Einwohner für die ausgewählten Länder im Jahre 2008. *Quelle: Grafik nach Ang et al [2].*

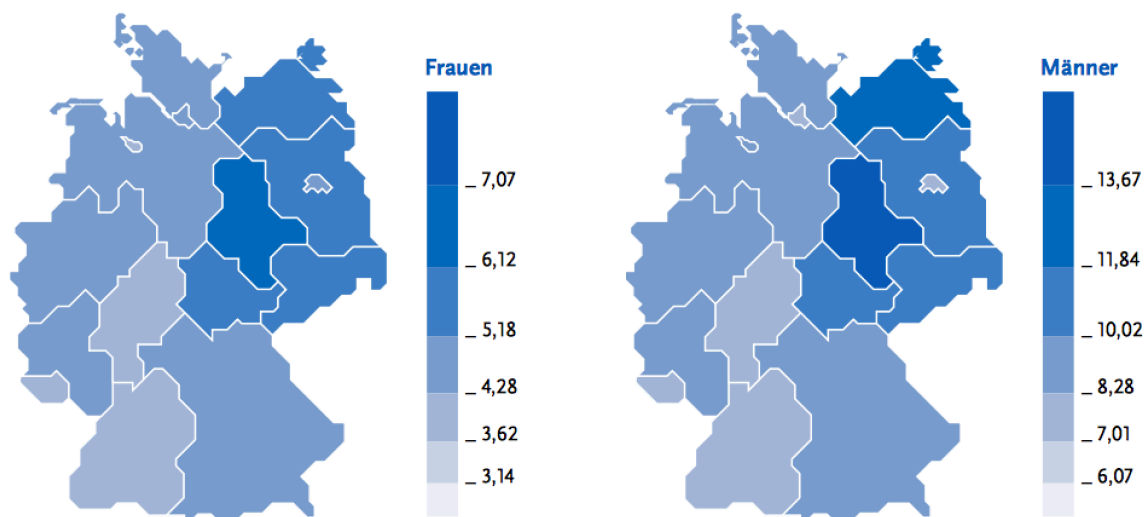


Abbildung 2: Altersstandardisierte Sterberaten je 100.000 Einwohner für Magenkrebs (ICD-10 C16).

Nach Bundesland und Geschlecht in Deutschland, 2012-2014. Statistisches Bundesamt [4]

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Das Magenkarzinom ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung. Allgemein lassen sich die Hauptrisikofaktoren in endogene und exogene Risikofaktoren einteilen. Eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese spielen vor allem Erkrankungen mit erhöhtem Karzinomrisiko, wie beispielsweise eine Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), aber auch Umwelteinflüsse, die Ernährung sowie genetische Faktoren [1, 2, 5, 6].

Erkrankungen mit erhöhtem Karzinomrisiko

Endogene Risikofaktoren

Helicobacter pylori assoziierte Gastritis (Typ B)

Eine chronische, bakterielle Infektion des Magens mit *H. pylori* spielt als Risikofaktor für das Magenkarzinom, vor allem des distalen Anteils (Corpus und Antrum), die wichtigste Rolle. Es handelt sich um ein gramnegatives, mikroaerophiles Stäbchenbakterium, welches den Magen besiedeln kann und die Sekretion von Magensäure verstärkt [1]. Kommt es dadurch zu einer chronischen Entzündung der Magenschleimhaut, liegt im Vergleich zu Nichtinfizierten ein etwa zwei- bis dreifach erhöh-

tes Risiko vor, an Magenkrebs zu erkranken [1]. Aufgrund dessen ist *H. pylori* ein seit 1994 durch die WHO definiertes Karzinogen der Gruppe I.

H. pylori gelangt über einen fäkal-oralen Weg in den Magen, bindet sich durch bestimmte Haftstrukturen an die Epithelzellen der Magenschleimhaut und schafft damit die Voraussetzung für eine Gastritis. Durch die Einnistung in die Magenschleimhaut schützt sich das Bakterium vor der Zerstörung durch die Magensäure. Gleichzeitig produziert *H. pylori* Urease, das die enzymatische Spaltung von Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid katalysiert. Ammoniak hebt den pH-Wert in der unmittelbaren Umgebung an und schafft somit ein neutrales Milieu um den Keim herum. Es entwickelt sich eine chronische Gastritis, gefolgt von Schleimhautatrophie, intestinaler Metaplasie, Dysplasie und führt schlussendlich zur Ausbildung eines Adenokarzinoms, meist des intestinalen Typs. Mit einer Prävalenz von weltweit ca. 50 % ist die *H. pylori*-Infektion eine der häufigsten chronisch bakteriellen Infektionen, wobei die Infektionsrate in Entwicklungsländern sehr viel höher liegt als in den Industrienationen [2]. Nicht jede *H. pylori*-Infektion führt zu einem Magenkarzinom, jedoch haben ca. 80 % aller Patienten mit einem diagnostizierten Magenfrühkarzinom auch eine *H. pylori*-assoziierte Gastritis [1, 6].

Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV, humanes Herpesvirus 4) ist ein humanpathogenes, umhülltes doppelsträngiges DNA-Virus. Es wird vor allem mit dem Burkitt-Lymphom und den Nasopharynx-Tumoren in Zusammenhang gebracht. Jedoch zeigte sich auch eine Assoziation mit dem Magenkarzinom des intestinalen und diffusen Typs [5]. Es wurde von der WHO genau wie das *H. pylori* als Karzinogen der Gruppe I eingestuft. Die Durchseuchung mit EBV ist sehr hoch. Ab dem 40. Lebensjahr findet man es bei ca. 98 % aller Menschen weltweit, da das Virus nach einer Infektion lebenslang im Körper persistiert. Die genaue Karzinogenese der EBV-positiven Magenkarzinome ist bis heute unklar, da es keine Korrelation mit der bcl-2-Expression und der p53-Akkumulation gibt, wie es bei EBV-negativen Karzinomen der Fall ist [5].

Die intestinalen Metaplasien sowie die chronische, atrophische Autoimmungastritis (Typ A-Gastritis), adenomatöse Magenpolypen, die perniziöse Anämie, Morbus

Ménétrier und eine in der Vergangenheit erfolgte Magenteilresektion zählen ebenfalls zu den Erkrankungen mit erhöhter Karzinominzidenz [3].

Genetische Faktoren

Auch genetische Risikofaktoren fördern die Entstehung von Magenkrebs. So haben Verwandte ersten Grades ein zwei- bis dreifach höheres Risiko zu erkranken als die allgemeine Bevölkerung [7]. Allerdings können dafür auch gemeinsame Lebens- und Ernährungsgewohnheiten oder eine in der Familie übertragene *H. pylori*-Infektion verantwortlich sein [1]. Obwohl die meisten Magenkarzinome spontan auftreten, sind in 8–10 % der Fälle familiär oder hereditär auftretende Komponenten dafür verantwortlich [7, 8].

Hereditäre diffuse Magenkarzinome sind autosomal-dominant vererbte Erkrankungen, die sich in der Regel früh manifestieren und mit einem schlecht differenzierten Adenokarzinom mit infiltrativem Wachstum einhergehen. In ca. 30 % der Fälle findet man eine Mutation im *CDH1*-Gen auf Chromosom 16q22. *CDH1*-Mutationen führen im Allgemeinen zu verkürzten Proteinen und als Folge dessen zur Störung der Zelladhäsion und Zellpolarität sowie zur gesteigerten Zellmotilität [7]. Bei dem sogenannten hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC), welches gewöhnlich zu einem Kolorektal-Karzinom führt, kann es jedoch auch zum Magenkarzinom des intestinalen Typs kommen. Dies resultiert aus einem zugrunde liegenden Defekt der DNA-Mismatch-Reparatur, vor allem der *hMLH1*-, *hMSH2*- und *hMSH6*-Gene. Des Weiteren wird über eine Assoziation zwischen Magenkarzinomen und der Blutgruppe A berichtet, wobei es sich dabei vorwiegend um Männer mit diffusem Typ nach Laurén handelt.

Exogene Faktoren

Ernährungsfaktoren

Die Beziehungen zwischen Ernährungsfaktoren und dem Risiko, an einem Magenkarzinom zu erkranken, sind komplex. Mit einem höheren Risiko verbunden ist vor allem eine Ernährung mit wenig pflanzlichen und viel tierischen Bestandteilen. Unter anderem spielt jedoch auch ein hoher Nitratgehalt in der Nahrung, wie beispielsweise in geräucherten und gesalzenen Speisen, eine bedeutende Rolle [1, 2, 5]. Hierbei

kommt es zu einer bakteriellen Umwandlung von Nitraten zu Nitriten und daraus resultierend zur Bildung karzinogener Nitrosamine. Durch einen hohen Salzgehalt entstehen Schleimhautschäden, welche die Möglichkeiten einer anhaltenden Infektion mit *H. pylori* erhöhen. Bei einer Infektion mit *H. pylori* wird die Sekretion von Ascorbinsäure gehemmt, welche als wichtiger Fänger von N-Nitroseverbindungen und freien Sauerstoffradikalen dient [3]. Dahingegen erzeugt der Konsum von mediterraner Kost wie Gemüse und Zitrusfrüchte mit einem hohen Gehalt an Vitamin C eine protektive Wirkung [5]. Vitamin C fängt reaktive Radikale ab und kann die Bildung von Nitrosoverbindungen hemmen. Einen positiven Effekt zeigten unter anderem auch Knoblauch sowie Grün- und Schwarztee [2, 3, 5].

Umwelteinflüsse

Ebenso wie ein gesteigerter Konsum an gesalzenen Speisen spielt ein übermäßiger Konsum an Alkohol und Tabak eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Magenkarzinoms [1]. Rauchen verringert die Prostaglandinsynthese, welche die Magenschleimhaut schützt, und enthält zudem karzinogene Substanzen. Es wurde berichtet, dass Tabakrauch die Entwicklung von Vorläuferläsionen wie beispielsweise einer Gastritis, Ulzerationen und Metaplasien induziert sowie das Wachstum von Magenkarzinomzellen beschleunigt. Des Weiteren neigen Raucher zu einer höheren Inzidenz an *H. pylori*-Infektion als Nicht-Raucher [1].

Weitere Risikofaktoren für Karzinome des gastroösophagealen Übergangs

Es gibt Hinweise darauf, dass chronisches Sodbrennen bzw. die gastroösophageale Reflux-Krankheit das Risiko für bestimmte Tumorformen des gastroösophagealen Übergangs sowie der proximalen Magenkarzinome erhöhen [1]. In diesem Zusammenhang sollte auch Adipositas erwähnt werden. Adipositas fördert den gastroösophagealen Reflux, welcher zu einer Barrett-Dysplasie führen kann und somit eine Präkanzerose der Speiseröhre und des gastroösophagealen Übergangs darstellt [2]. Dabei wurde festgestellt, dass der Body-Mass-Index signifikant mit einer höheren Sterblichkeitsrate bei Männern verbunden ist. Ein niedriger sozioökonomischer Status wird ebenfalls mit einem erhöhten Auftreten an Magenkrebs assoziiert. Letztlich ist es ein Zusammenspiel aus exogenen und endogenen Risikofaktoren, die zur Entstehung eines Magenkarzinoms führen.

1.1.3 Pathologie des Magenkarzinoms

Eine exakte Klassifikation des Magenkarzinoms ist nicht nur essenziell für die Primärdiagnose, sondern auch für das anschließende Therapieverfahren und die Prognosebeurteilung. Neben der genauen Lokalisationsangabe des Primärtumors, entsprechend der anatomischen Magenregion, ist ebenso die Kenntnis der makroskopischen Wachstumstypen sowie die histologische Klassifikation von Bedeutung. Klassifiziert wird nach:

Makroskopische Wachstumsformen

Für eine gezielte Entnahme des Biopsiematerials sowie zur groben Vorbeurteilung der Tumorausdehnung spielen die makroskopischen Typen nach Borrmann I-IV eine wichtige Rolle, auf die an dieser Stelle jedoch nicht genauer eingegangen wird.

Histomorphologie und Ausbreitungstendenz

Die Laurén-Klassifikation ist das im klinischen Alltag gebräuchlichste Klassifikationschema des Adenokarzinoms des Magens. Sie wurde für die hier vorliegende Arbeit herangezogen.

Nach Laurén-Kriterien werden die Adenokarzinome des Magens in zwei große Subtypen unterteilt, den intestinalen und den diffusen Typ. Diese Klassifikation wurde 1965 eingeführt und bleibt derzeit weitgehend überall akzeptiert. Diese zwei histologischen Subtypen weisen eine Reihe unterschiedlicher klinischer und molekularer Eigenschaften auf, wie z.B. in der Zelldifferenzierung, der Epidemiologie, der Ätiologie, der Karzinogenese und der Prognose. Beim intestinalen Typ weisen die Tumorzellen ein adhäsives Wachstumsmuster auf, sind durch ein tubuläres, drüsenartiges Wachstum gekennzeichnet, gut differenziert und eher scharf begrenzt. Häufig werden sie mit einer intestinalen Metaplasie sowie einer lymphatischen oder vaskulären Invasion assoziiert. Der intestinale Typ ist häufig bei älteren, männlichen Patienten zu finden und zeigt eine bessere Prognose. Im Gegensatz hierzu steht beim diffusen Typ ein wenig adhäsives, infiltratives Wachstum mit schlechter Differenzierung und einer somit vergleichsweise ungünstigeren Prognose im Vordergrund. Intrazellulärer Schleim kann den Kern der Zelle beiseite drängen und so das sogenannte Siegel-

ringzellkarzinom bilden. Der diffuse Typ wird mit jüngeren, weiblichen Patientinnen assoziiert [9].

Beide Subtypen teilen sich gemeinsame Ernährungs- und Umweltrisikofaktoren, wobei der intestinale Typ eher mit den Umweltfaktoren wie einer H. pylori-Infektion, Adipositas oder diätischen Faktoren assoziiert ist. Er entsteht hauptsächlich aus präkanzerösen Läsionen wie der Magenschleimhautatrophie und/oder einer intestinalen Metaplasie. Dahingegen deutet der diffuse Typ mit seiner Assoziation zur Blutgruppe A eher auf eine genetische Ursache hin. Darüber hinaus wurde ein Mischtyp beschrieben, welcher die Eigenschaften beider Typen aufweist sowie ein undifferenzierter Typ, der keiner der drei übrigen Formen zugeordnet werden kann [1, 9]. Die Laurén-Klassifikation ist vor allem für das Ausmaß der chirurgischen Therapie, Gastrektomie versus distaler Resektion entscheidend, da der intestinale Typ nach Laurén mit einem geringeren Sicherheitsabstand als der diffuse Typ reseziert werden kann.

Histologie

Die Einteilung der WHO bezieht sich ebenfalls auf das histologische Erscheinungsbild. Das am häufigsten vorkommende Adenokarzinom wird unterteilt in papillär, muzinös oder tubulär wachsend. Das gering kohäsive Magenkarzinom schließt auch das Siegelringzellkarzinom ein, bei dem es durch die Produktion großer Mengen an Schleim zur Verdrängung des Zellkerns an den Rand der Zelle kommt. Das gering kohäsive Karzinom mit und ohne Siegelringzellen hat eine deutlich schlechtere Prognose. Mit einem sehr viel geringeren Anteil sind das adenosquamöse Karzinom, das Plattenepithelkarzinom, kleinzellige Karzinome und undifferenzierte Karzinome zu erwähnen. 2010 kam es zusätzlich zur Einführung des gemischten Adenokarzinoms, des Karzinoms mit lymphoidem Stroma und des hepatoiden Adenokarzinoms [8, 10, 11].

Präkanzerosen und Vorläuferläsionen der Magenschleimhaut

Wie von Correa beschrieben geht man bei der Entstehung eines invasiven Magenkarzinoms, speziell des intestinalen Typs (nach Laurén), von einer schrittweisen Entwicklung aus. Dabei wird eine Kaskade aus sequenziellen histopathologischen Veränderungen wie Vorläuferläsionen und Präkanzerosen der Magenschleimhaut

durchlaufen. Ausgehend von der physiologischen Magenschleimhaut kommt es meist auf dem Boden einer chronischen Entzündung zunächst zu einer nicht-atrophischen Gastritis. Über den Verlust des normalen Drüsengewebes resultiert dies in einer atrophischen Gastritis, welche zu einer intestinalen Metaplasie (komplett und inkomplett) und anschließend zur hochgradigen Epitheldysplasie führt. Am Ende der Kaskade steht das Adenokarzinom [12, 13]. Ob eine durch *H. pylori* induzierte, zunächst nicht-atrophische Gastritis in eine atrophische Form übergeht (in den meisten Fällen multifokal) und anschließend die beschriebene Kaskade auslöst, hängt von Virulenz-Faktoren des Erregers ab. Handelt es sich bei diesen Faktoren um *cagA*-positive *vacA* s1m1-Stämme, sind präkanzeröse Läsionen und die Entwicklung von Magenkarzinomen wahrscheinlich, wohingegen *cagA*-negative *vacA* s2m2-Stämme nicht mit einem erhöhten Karzinomrisiko einhergehen (Abbildung 3) [12].

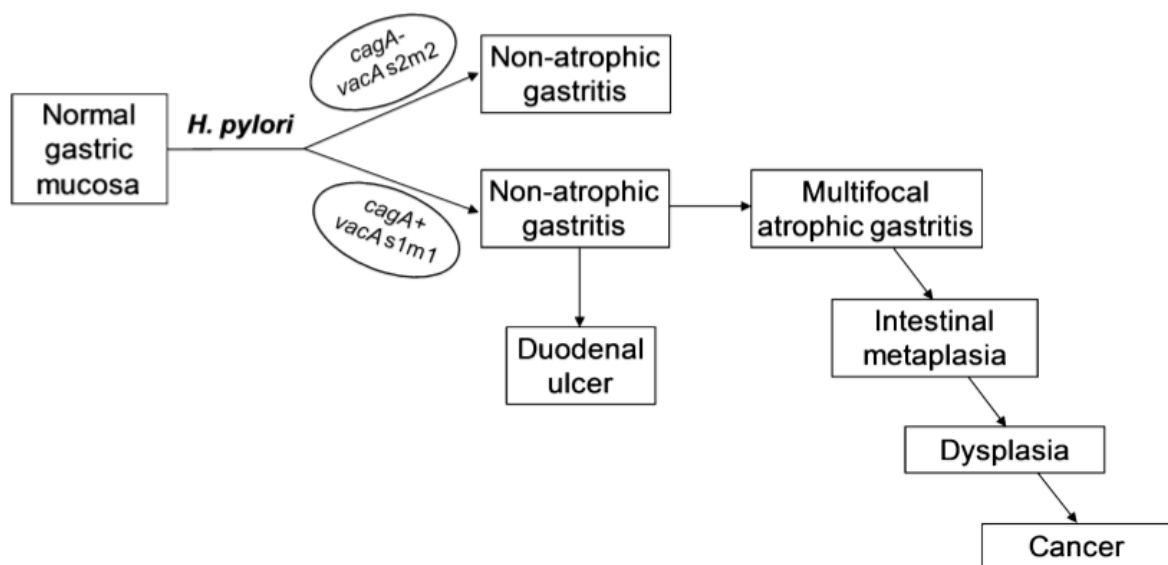


Abbildung 3: Schematische Darstellung der *H. pylori*-assoziierten präkanzerösen Kaskade bis hin zum Adenokarzinom.

Quelle Correa et al. 2012 [12].

Durch die chronische Besiedlung mit *H. pylori* kann es jeweils zu unterschiedlichen Phänotypen einer Gastritis kommen. Man unterscheidet zwischen einer Antrum-prädominanten Gastritis, bei der es zu Magen- und Duodenalulcera kommen kann, einer Korpus-prädominanten Gastritis, welche mit einem deutlich erhöhten Entartungsrisiko verbunden ist und zuletzt der indolenten Gastritis, welche weder zu Ulzera noch zur Entartung tendiert [10].

Staging

TNM-Klassifikation

Im Dezember 2017 wurde von der International Union against cancer (UICC) die achte Ausgabe der TNM-Klassifikation bösartiger Tumoren publiziert. Seit Jahren dient diese als wichtiges Instrument der Prognoseabschätzung und der Therapieplanung des Magenkarzinoms. Bewertet werden die Infiltrationstiefe des Primärtumors (T-Kategorie), das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N-Kategorie) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Kategorie). Handelt es sich um einen postoperativen-histopathologischen Befund, lautet die Schreibweise pTNM. Zusätzlich wird der Differenzierungsgrad (G) mit G1–G4 angegeben, wobei 1 eine hohe und 4 eine fehlende Differenzierung bedeutet (Tabelle 1) [14].

Tabelle 1. TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms von 2010 sowie 2017 [14, 15]

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der Lamina propria, hochgradige Dysplasie
T1	Tumor infiltriert Lamina propria, Muscularis mucosae oder Submukosa
T1a	Tumor infiltriert Lamina propria oder Muscularis mucosae
T1b	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Subserosa
T4	Tumor perforiert Serosa (4a, viszerales Peritoneum) oder infiltriert benachbarte Strukturen (4b)
N – Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 bis 2 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 3 bis 6 regionären Lymphknoten
N3	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
N3a	Metastasen in 7 bis 15 regionären Lymphknoten
N3b	Metastasen in 16 oder mehr regionären Lymphknoten

M – Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Auf dem Boden dieser Kriterien wurde durch die UICC und das AJCC eine Einteilung in Tumorstadien festgelegt, welche vor allem die Prognose der Patienten diskriminieren soll (Tabelle 2). Bei den T-, N- und M-Kategorien gab es gegenüber der in dieser Arbeit verwendeten 7. Auflage keine Änderungen. Allerdings gab es wesentliche Änderungen bei der Stadieneinteilung. Tabelle 2 stellt die UICC-Stadieneinteilung der 7. und 8. Auflage gegenüber.

Tabelle 2. UICC-Stadien des Magenkarzinoms nach Wittekind C. et al. [14, 15]

Stadium	Tumorausdehnung		Lymphknotenstatus		Fernmetastasen	
	7. Auflage	8. Auflage	7. Auflage	8. Auflage	7. Auflage	8. Auflage
0	Tis	pTis	N0	pN0	M0	M0
IA	T1	pT1	N0	pN0	M0	M0
IB	T1	pT1	N1	pN1	M0	M0
	T2	pT2	N0	pN0	M0	M0
IIA	T1	pT1	N2	pN2	M0	M0
	T2	pT2	N1	pN1	M0	M0
	T3	pT3	N0	pN0	M0	M0
IIB	T1	pT1	N3	pN3a	M0	M0
	T2	pT2	N2	pN2	M0	M0
	T3	pT3	N1	pN1	M0	M0
	T4a	pT4a	N0	pN0	M0	M0
IIIA	T2	pT2	N3	pN3a	M0	M0
	T3	pT3	N2	pN2	M0	M0
	T4a	pT4a	N1	pN1, pN2	M0	M0
IIIB		pT4b		pN0		M0
	T3	pT1, pT2	N3	pN3b	M0	M0
	T4a	pT3, pT4a	N2	pN3a	M0	M0
	T4b	pT4b	N0, N1	pN1, pN2	M0	M0
IIIC	T4a	pT3, pT4a	N3	pN3b	M0	M0
	T4b	pT4b	N2, N3	pN3a, pN3b	M0	M0
IV	Jedes T	Jedes pT	Jedes N	Jedes pN	M1	M1

1.1.4 Prognose und Therapie des Magenkarzinoms

Zwar hat sich die Prognose des Magenkarzinoms in den letzten Jahren aufgrund neuer Therapiemöglichkeiten verbessert, dennoch stellt es mit einer Fünfjahresüberlebensrate um ca. 30 % weiterhin eine Krebserkrankung mit ungünstiger Prognose dar. Dies mag vermutlich daran liegen, dass ein Großteil der Fälle erst im bereits fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert wird (T3, T4) (Abbildung 4) [4].

Für die Prognoseabschätzung spielt nach wie vor die TNM-Klassifikation eine entscheidende Rolle, aber auch der makroskopische Typ, die Tiefe der Invasion sowie das histologische Wachstumsmuster tragen maßgeblich zur Prognose bei. So sind beispielsweise eine lymphatische und vaskuläre Infiltration zusätzliche Indikatoren einer schlechten Prognose [16]. Häufig korrelieren diese Faktoren miteinander. So ist beispielsweise das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen mit einer tiefen Tumordinfiltration assoziiert. Reicht der Tumor bis in die Submukosa, steigt das Risiko für Lymphknotenmetastasen um 20 % [5, 17]. Der wohl bedeutendste Prognosefaktor ist der Lymphknotenstatus und das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen. So haben Patienten mit 1–6 positiven Lymphknotenmetastasen eine Überlebenschance von 44 %, Patienten mit 7–15 Lymphknotenmetastasen nur noch von 30 %. Der diffuse Typ nach Laurén sowie eine reduzierte E-Cadherin-Expression sind ebenfalls Indikatoren einer schlechten Prognose [5].

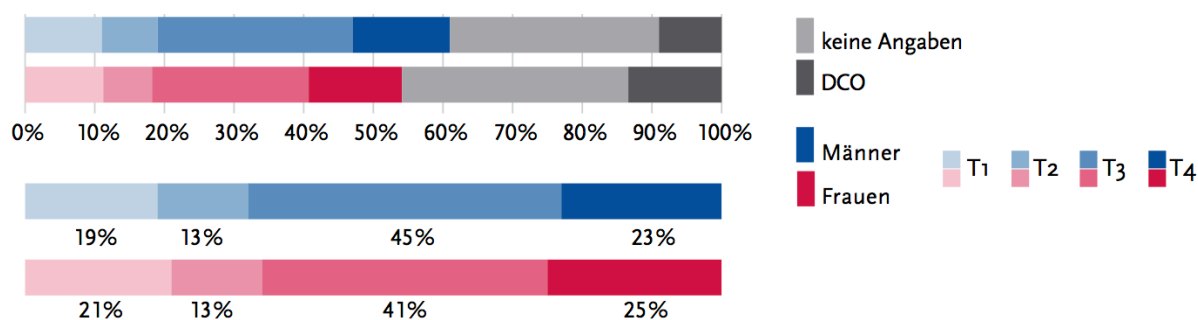


Abbildung 4: Verteilung der T-Stadien bei Erstdiagnose nach Geschlecht. (ICD-10 C16, Deutschland 2011–2012), Krebs in Deutschland 2011/12, Robert-Koch-Institut.

Die Operation stellt derzeit immer noch die einzige kurative Behandlung dar [18].

Leider ist aufgrund der späten Diagnosestellung häufig nur ein geringer Anteil der Patienten einer chirurgischen Therapie zugänglich [17]. Dabei ist eine endoskopische Schleimhautresektion ausschließlich bei Patienten in einem sehr frühen Stadium (Infiltrationsbeschränkung auf die Mukosa, ≤ 2 cm, gut differenziertem histologischen Befund und ohne Hinweis einer Ulzeration) indiziert [17]. Patienten in weiter fortgeschrittenen Stadien ($> T1N0$) benötigen einen multimodalen Behandlungsansatz im Sinne einer deutlich ausgeprägteren, chirurgischen Intervention des Primärtumors (je nach Lokalisation besteht diese aus einer proximalen, distalen, subtotalen oder totalen Gastrektomie mit erweiterter Lymphadenektomie) sowie eine perioperative Chemo- und/oder Radiochemotherapie. Denn selbst nach R0 Gastrektomien kommt es vermutlich aufgrund einer frühen Mikrometastasierung in 40–60 % zu Rezidiven und Metastasen [18]. Es konnte gezeigt werden, dass das Overall-Survival bei Patienten mit resektablen Tumoren durch die Kombination aus neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie plus Operation signifikant verbessert wird [18, 19]. So hat sich in Europa eine perioperative Chemotherapie etabliert, wohingegen sich in Ostasien eine adjuvante Chemotherapie durchgesetzt hat [17, 18]. Nebst der konventionellen Therapie steht auch immer mehr die sogenannte zielgerichtete (engl. targeted) Therapie im Vordergrund. Die Erkenntnis darüber, dass die Patientenprognose sowie die Behandlungsreaktion nicht nur vom Tumorstadium, sondern ebenso von Expression und tumorspezifischen Veränderungen abhängt, steigt kontinuierlich an. Dabei kommt vor allem den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) eine besondere Bedeutung zu. Wie bereits beim Mammakarzinom wurde auch beim Magenkarzinom eine Überexpression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, z.B. Her2/neu, MET und FGFR2, nachgewiesen, was mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Durch Antikörper wie beispielsweise Trastuzumab und Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wie Imatinib können diese Rezeptoren und/oder die Liganden selbst gezielt gehemmt werden [17, 20].

Neben den vielversprechenden Ansätzen der zielgerichteten Therapie sind immer noch insbesondere die Prophylaxe sowie die Früherkennung von Präkanzerosen eine der wichtigsten Bestandteile der aktuellen Therapie.

1.2 MET als Rezeptor-Tyrosin-Kinase

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) sind in der Zellmembran verankerte Transmembranproteine, die über eine ligandenaktivierte Tyrosinkinase verfügen und als Schlüsselfunktion für Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine und andere extrazelluläre Signalmoleküle agieren. Sie übermitteln zahlreiche Signalwege ins Zellinnere, die u.a. bei der Zellproliferation, Differenzierung, dem Überleben der Zelle und der Zellmigration eine entscheidende Rolle spielen [21, 22]. Jeder Rezeptor besteht aus einer extrazellulären ligandenbindende Domäne (N-Terminal), der anhand dieser identifiziert und in seine Unterfamilien (EGFRs, FGFRs, IR, IGRF, PDGFRs, Hepatozyten-Wachstums-Rezeptor, VEGFRs und proto-Onkogene c-KIT) eingeteilt wird. Zusätzlich besitzt jeder dieser Rezeptoren eine transmembrane und eine zytoplasmatische Kinase-Domäne. Kommt es zu Mutationen in der Signaltransduktion, kann dies zu Zelltransformationen führen, welche eine Vielfalt von malignen Erkrankungen zur Folge haben [22].

1.2.1 Physiologie der Rezeptor-Tyrosin-Kinase

Jede RTK wird durch die Bindung eines bivalenten Liganden an die extrazelluläre Domäne dimerisiert, sodass ein Komplex aus zwei Rezeptoren und einem Liganden entsteht [21]. Hierdurch wird die intrazellulär gelegene Tyrosinkinase-Domäne aktiviert und überträgt Phosphatgruppen auf die Tyrosin-Reste. Diese eine aktivierte RTK phosphoryliert dann ein oder mehrere Tyrosin-Reste in der Nähe, im Sinne einer Autophosphorylierung [23]. Die phosphorylierten Tyrosinreste sind Voraussetzung für die anschließenden Signalwege (beispielsweise MAP-Kinase und RAS/RAF-Pathways) bzw. dienen als Erkennungssignal zur Anlagerung der jeweiligen Adapterproteine. Das dadurch aktivierte Ras-Protein induziert die Serin/Threonin-Kinase Raf, welche zunächst Mek1/2 und letztendlich Erk 1/2 phosphoryliert und aktiviert. Des Weiteren aktiviert Raf MAPK3. Neben RAS werden auch PI3K und PLC γ aktiviert [22]. Am Ende dieser Kaskade stehen Proteine, welche alle einen erheblichen Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Zelle übernehmen.

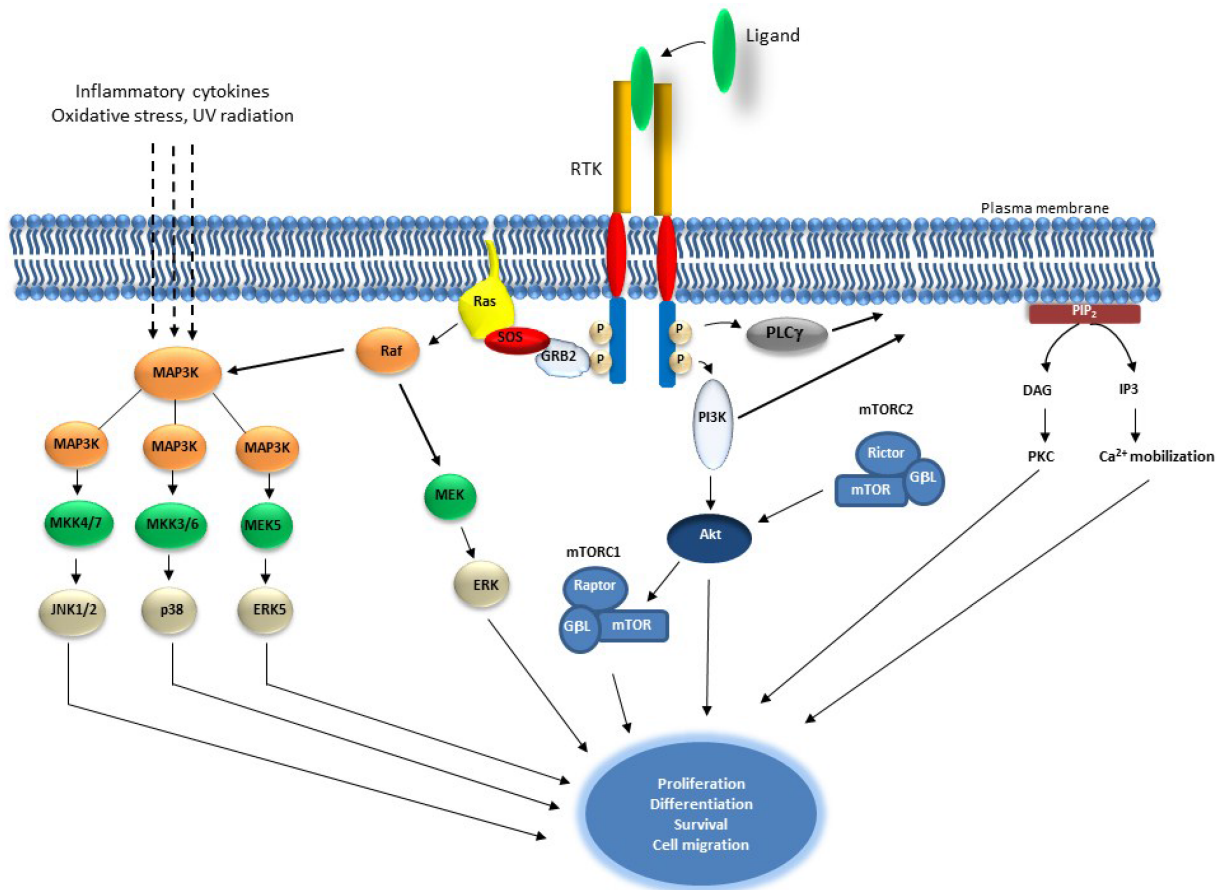


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase und die dazugehörige nachgeschaltete Signalübertragung.

Nach der Ligandenbindung werden RTK automatisch phosphoryliert, was wiederum zur Aktivierung von Ras und zur Induktion der Serin/Threonin-Kinase Raf führt. Diese aktiviert die MAP3K. Durch die Phosphorylierung wird zusätzlich PI3K und PL γC aktiviert. *Quelle: Regad, T. et al. [22].*

1.2.2 Tumorphathologische Bedeutung der RTKs

Seit einigen Jahren sind RTKs Gegenstand intensiver Forschung und werden zunehmend bei der Therapie maligner Tumoren eingesetzt. Mit der ToGA-Studie von Bang et al. wurde erstmals gezeigt, dass Magenkarzinompatienten mit einer HER2-Überexpression von einer Behandlung mit Trastuzumab (monoklonaler Antikörper gegen Her2/neu) profitieren [24, 25]. Dabei muss die Überexpression mithilfe der Immunhistologie (IHC 3+) und/oder in situ-Hybridisierung (zur Darstellung der HER2-Genamplifikation) nachgewiesen werden. Inwiefern sie bei der Tumorentstehung und -wachstum als auch bei der Proliferation und Metastasierung eine Rolle spielen, wird nachfolgend anhand der RTK-MET näher erörtert [26, 27].

Das Onkogen MET

Ein wichtiger Ansatzpunkt in der Therapie des Magenkarzinoms ist das proto-onkogen *MET*, welches für die RTK MET kodiert. MET wird normalerweise von Zellen mit epitheliale Ursprung exprimiert und dient der Embryogenese, der Organregeneration und der Wundheilung [27-29]. Sein einzig bekannter Ligand ist der Hepatozyten-Wachstumsfaktor/Scatter-Faktor (HGF/SF), welcher hauptsächlich aus Zellen mit mesenchymalem Ursprung exprimiert wird [29]. Damit HGF an MET binden kann, muss es zunächst über eine Serin-Protease in seine aktive Form transformiert werden [28]. Über die Aktivierung kommt es zur trans-Autophosphorylierung der Kinase-Reste und Bindung von Adapterproteinen wie z.B. GRB2 und GAB1, was wiederum zur Rekrutierung und Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade (PIK3, PLC γ , STAT3, MAPK) führt [29]. Diese Mechanismen können unter Umständen eine kanzerogene Wirkung entfalten bzw. die Tumorprogression fördern, wobei es zu zellulären Veränderungen in der Transkription verschiedener Gene mit hohem Potenzial zu invasivem Wachstum kommt. Auch bei einer Dysregulation der *MET*-Genexpression kann dies zu malignen Transformationen führen [30]. Dabei sind es betreffend des Magenkarzinoms nicht Mutationen der Kinasedomäne, sondern vielmehr ist es Ursache einer Gen-Amplifikation des Proto-onkogen *MET* [31-33]. Die molekularen Mechanismen, welche die *MET*-Transkription regulieren, sind bis heute nicht genau geklärt [16]. Jedoch zeigten Graziano et al. sowie Lennerz et al. bereits, dass eine Erhöhung der Anzahl an Gen-Kopien von *MET* mit einem höheren Tumorstadium und einem schlechteren Überleben assoziiert ist [31, 34]. Wobei autosomal-dominant vererbte Missense-Mutationen in den für die Tyrosin-Kinase kodierten Sequenzen bei Familien mit papillärem Nierenzellkarzinom nachgewiesen wurden [29, 35]. Diese Mutationen führen zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung der RTK [28]. Ein weiterer Ansatz ist die autokrine Stimulation des Ligand HGF selbst sowie des HGF-Aktivators, welche bei dem Magenkarzinom häufig mit *MET* koexprimiert bzw. in erhöhter Konzentration nachgewiesen wurden [28, 31]. Als weitere Ursache sollte die Korrelation von *MET* mit p53 erwähnt werden. *P53* ist ein Tumorsuppressorgen und nimmt eine der wichtigsten Kontrollinstanzen des Zellwachstums ein. *P53*-Mutationen sind in ca. 60 % aller Tumorerkrankungen nachweisbar. Seol et al. identifizierten bereits 1999 eine p53-Bindungsstelle des *MET*-Promotors, was nahelegt, dass *MET* ein Ziel der p53-Genregulation darstellt. Aller-

dings führt nur der Wildtyp p53 zu einer signifikanten *MET*-Promoter-Verstärkung, nicht aber seine Mutanten. Ein positiver *MET*-Status geht meist mit einem diffusen Typen nach Laurèn, einem fortgeschrittenen Tumorstadium (pT4) und somit einer schlechten Prognose einher [32, 36]. *MET* wurde außerdem als nützlicher Indikator für das Vorhandensein von Lebermetastasen vorgeschlagen [37].

Zielgerichtete Therapien

Zielgerichtete Therapien mit monoklonen Antikörpern oder Tyrosinkinase-Inhibitoren gegen *MET* und HGF/SF sind seit einigen Jahren fester Bestandteil der Forschung und Therapie des Magenkarzinoms. So untersuchen Phase I/II- und III-Studien entweder Antikörper, die direkt gegen HGF/SF (z.B. Onartuzimab, Rilotumumab) gerichtet sind, oder Tyrosinkinase-Inhibitoren (Crizotin, Foretinib, Tivantinib) [34, 38-42]. Allerdings zeigten frühere Studien im Hinblick auf RTKs im Magenkarzinom, dass das jeweilige Ansprechen auf eine Therapie stark von der Patientenauswahl bzw. den individuellen Patientenkriterien abhängt. So konnte gezeigt werden, dass beispielsweise Trastuzumab nur wirksam bei Patienten mit positivem Her2/neu-Status (starker Her2/neu-Protein-Expression oder moderater Her2/neu-Expression in Verbindung mit *HER2*-Amplifikation) ist [24].

1.3 Fragestellung

Wie zuvor beschrieben ist das Magenkarzinom eine Krebserkrankung mit schlechter Prognose und hoher Mortalitätsrate. Das Ziel der vorliegenden Dissertation beruht auf der Hypothese, dass Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie MET und sein Ligand HGF/SF beim Magenkarzinom tumorbiologisch relevant sind und wichtige Ziele der Tumorthherapie darstellen. Hierfür ist es von entscheidender Bedeutung, dass ein einheitlicher Biomarker-Score validiert wird. Dementsprechend sollten anschließend Aussagen und Entscheidungen der Prognose sowie der Therapie getroffen werden.

Die vorliegende Dissertation beruht auf den folgenden drei Hypothesen:

- (1) die Expression von MET weist im Magenkarzinom eine intratumorale Heterogenität auf,
- (2) die Intensität der Immunfärbung von MET korreliert mit dem *MET*-Amplifikationsstatus und
- (3) der prozentuale Anteil des MET-überexprimierten bzw. *MET*-amplifizierten Bereichs korreliert mit dem Überleben des Patienten.

Auf der Grundlage dieser Hypothesen sollte ein potenzieller prädiktiver MET-Biomarker-Score entwickelt werden, der für zukünftige Therapiestudien mit MET-Inhibitoren verwendet werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Studienkollektiv

Grossflächenschnitte von in Formalin fixiertem Gewebe von insgesamt 470 Patienten dienten als Studienkollektiv für die Expressionsanalyse mittels Immunhistochemie und chromogener in situ-Hybridisierung. Das Untersuchungsmaterial stammte aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Kiel. Es wurden alle Patienten herausgesucht, die entweder einer totalen oder partiellen Gastrektomie eines Adenokarzinoms des Magens oder des ösophagogastralen Überganges zwischen 1997 und 2009 (GC-Kohorte) unterzogen worden waren. Davon hatten 335 Patienten einen positiven Lymphknotenstatus. Zum Ein- und/oder Ausschluss der Kohorte wurden die folgenden Kriterien eingesetzt.

Zu den Einschluss-Kriterien zählten: ein histologisch bestätigtes Adenokarzinom des Magens oder des gastroösophagealen-Übergangs sowie das Vorhandensein der Sterbe- und Überlebensdaten. Ausgeschlossen wurden Patienten, bei denen es sich histologisch nicht um ein Adenokarzinom handelte, wenn nach erfolgter Billroth II-Resektion weiterhin Tumorreste bestanden oder die Patienten eine perioperative Chemotherapie erhalten hatten. Folgende klinisch-pathologischen Patientencharakteristika wurden dokumentiert: Art der Operation, Alter bei Diagnosestellung, Geschlecht, Tumorlokalisation, Tumorgröße, histologischer Tumortyp, Differenzierungsgrad, Tiefeninvasion, die Anzahl der reserzierten Lymphknoten sowie die Anzahl der Lymphknoten mit Metastasen (Tabelle 4). Die Sterbedaten der Patienten wurden vom epidemiologischen Krebsregister des Landes Schleswig-Holstein, Deutschland, bezogen. Die Follow-up-Daten der noch lebenden Patienten wurden aus den Krankenhausaufzeichnungen und bei den Hausärzten erfragt. Alle Patienten wurden pseudonymisiert, die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte anonym. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission des UKSH, Campus Kiel, genehmigt (Referenznummer D 453/10, Kopie des Ethikvotums siehe Anhang).

2.1.2 Geräte

Folgende Geräte kamen zum Einsatz: Autostainer BondTM Max System (Leica-Menarini, Berlin, Germany), Leica SCN400 mikroskopischer Voll-Diascanner (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland), Memmert WNB7 Wasserbad (Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland), ThermoBrite Wärmeplatte (Abbott GmbH & Co. KG Wiesbaden Deutschland), Galaxy Mini Zentrifuge C1413V-230EU (VWR International, Wien, Österreich), Eppendorf Research Pipetten 100–1000 µl und 2–20 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), Mikroskop Zeiss, Axioplan 2 (Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Jena, Deutschland), Vortex Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA), Rüttler See saw Rocker SSL4 (Stuart, Cole-Parmer, Stone, Staffordshire, United Kingdom), Inkubationskammer für Objektträger (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland), Mikroskop Leica DM 1000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), handelsüblicher Schnellkochtopf, Labor-Kühlschrank (Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, Deutschland), Rotationsmikrotom Leica RM2245 (Leica Biosystems Nussloch GmbH + Co.KB, Deutschland), Medite COP 30 Cooling Plate (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland), Tissue Flotation Bath TFB 45 (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland), Trocken-/Wärmeschrank (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland).

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Folgende Chemikalien und Reagenzien wurden bei der Durchführung der Versuchsreihen verwendet: Destilliertes Wasser H₂O (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), Äthanol 99 % (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland), Xylol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 %, 250 ml Art-Nr: 8070.2 (Carl Roth GmbH + Co. KB, Karlsruhe, Deutschland). Shandon EZ-MountTM (Thermo Scientific Anatomical Pathology, Runcorn, UK), UltraVision Hydrogen Peroxidase Block (Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo USA), UltraVision Protein Block (Thermo Scientific, Lab Vision Corporation, Fremont USA), Antibody-Diluent (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland), N-Histofine Simple Stain MAX PO Polymer (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan), Hämalaulösung sauer nach Mayer (Dr. K. Hollborn u. Söhne, Leipzig, Deutschland), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), Trizma Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Citratpuffer:

3,78 g Zitonensäure Monohydrat (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland) + 24,21g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Für die Immunhistochemie wurde selbstständig TBS-Puffer angefertigt. Hierfür wurden 60,57 g Trizma Base und 87,66 g NaCl in 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit HCl ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Darüber hinaus wurde EDTA-Puffer hergestellt: 0,375 g EDTA wurden in 100 ml deionisiertem Wasser gelöst und anschließend auf eine Gesamtmenge von 1000 ml aufgefüllt. Durch tropfenweise Zugabe von Natronlauge wurde unter kontinuierlicher elektronischer Messung ein pH-Wert von 9,3 eingestellt.

2.1.4 Kitsysteme

Auf folgende Kitsysteme wurde zurückgegriffen: Unter Zuhilfenahme des Peroxidase Substrat Kit DAB (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) wurde bei der Immunhistochemie (IHC) gearbeitet. Die Analyse der chromogenen in situ-Hybridisierung (CISH) wurde mithilfe des ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland) durchgeführt. Das zuletzt erwähnte Kit beinhaltet folgende Komponenten: Heat Pretreatment Solution EDTA (HPTS), Pepsin Solution, Wash Buffer SSC, 20 x Wash Buffer TBS, Anti-DIG/DNP-Mix, HRP/AP-Polymer-Mix, AP-Red Solution A, AP-Red Solution B, HRP-Green Solution A, HRP-Green Solution B, Nuclear Blue Solution, Mounting Solution.

2.1.5 Antikörper

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde der monoklonale Kaninchen-anti-MET-Antikörper clone SP44 in der Verdünnung 1:50 (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) verwendet.

2.1.6 Sonde

Die folgende Sonde kam bei der CISH zum Einsatz: ZytoDot 2C SPEC MET/CEN7 Probe (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland).

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Bei den Versuchen wurden folgende Verbrauchsmaterialien genutzt: ep T.I.P.S.[®] Pipettenspitzen (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling- Berzdorf, Deutschland) sowie Biosphere Filter Tip Pipettenspitzen, (Ref: 70.760.212, Ref: 70.1116.210) unterschiedlicher Größe (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Deutschland). DARKOPEN (Kisker, Dutscher Group, Steinfurt, Deutschland), Glas- und Plastikküvetten (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland), Fixogum (Marabu GmbH & Co. KG, Tamm, Deutschland), Leica Bond Plus Slides Objektträger (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland), Menzel-Gläser, unterschiedlicher Größe (Thermo Sientific, Waltham, USA), SafeSeal Reagiergefäße unterschiedlicher Größe (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland), Mikrotom-Klinge A22 (Feather Safety Razor Co. LTD, Japan), Reagenzgläser (Schott AG, Mainz, Deutschland).

2.1.8 Software

Folgende Software fand Verwendung: Microsoft[®] Office 2010 Home and Student (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim), SPSS Version 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). MacOS Sierra Version 10.12.6 (Apple Inc., USA). Zur Durchführung der computergestützten Teile der Arbeit wurde ein Viewer-Programm geschrieben, um Bilder des Leica SCN-Dateiformats anzeigen zu können.

2.2 Methoden

2.2.1 Immunhistochemie

Histologie

Alle zur histologischen Begutachtung verwendeten Gewebeproben wurden in 10 % neutral gepuffertem Formalin für mindestens 24 Stunden fixiert, in einem Gewebeeinbettautomaten entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Formalinfixierung war während der Studiendauer standardisiert. Die Abschnitte, welche dem Tumor entnommen wurden, enthielten Anteile der Schleimhautoberfläche, des Tumorzentrums und der Invasionsfront. Entparaffinierte Gewebeschnitte wurden mit Hämomatoxylin und Eosin (HE) gefärbt und gemäß der Laurén-Klassifikation [43] und dem Mucin-Phänotyp [44] klassifiziert. Das Tumorstadium aller Tumoren wurden nach der 7. Ausgabe der Union internationale contre le cancer (UICC) [14] klassifiziert und beruht ausschließlich auf klinisch-pathologischen Untersuchungen.

Grossflächenschnitte

Aufgrund der in vorangehenden Studien bereits gezeigten möglichen Heterogenität für HER/2neu [45] wurden in der vorliegenden Arbeit auch für MET Grossflächenschnitte gefärbt.

Immunhistologisches Färbeprotokoll mittels Peroxidase

Für den immunhistochemischen Nachweis von MET wurden 2 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Diese wurden über Nacht bei 54 °C getrocknet. Am Folgetag erfolgte die Entparaffinierung und Rehydrierung, indem die Paraffinschnitte für 2 x 10 min in Xylol, anschließend 2 x 2 min in 96 %iges Äthanol, 2 x 2 min in 70 %iges Äthanol, 2 x 2 min in 50 %iges Äthanol gestellt und zuletzt 2 x in destilliertem Wasser gewaschen wurden. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in einer mit Citratpuffer befüllten Plastikkuvette in einen Schnellkochtopf mit destilliertem Wasser (zu ca. 1/3 des Volumens befüllt) gestellt. Die Präparate wurden kurz aufgekocht und schließlich mit Leitungswasser abgekühlt. In einem weiteren Waschschriff wurde die Küvette 5 min mit TBS gespült. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden anschließend auf jeden Schnitt zwei bis drei Tropfen Hydrogen Peroxidase Block

gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschschrift für 3 x 5 min mit TBS wurden zur Proteinblockierung 2–3 Tropfen Ultra V Block auf jedes Präparat gegeben, für 5 min bei RT inkubiert und erneut mit TBS für 3 x 2 min gespült. Der Primärantikörper (monoklonaler anti-MET-Antikörper) wurde zuvor mit Antibody-Diluent auf die gewünschte Konzentration von 1:50 verdünnt. Auf jeden einzelnen Schnitt wurden ca. 150 µl der Antikörperlösung pipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Inkubation in einem Kühlschrank bei 4 °C über Nacht fortgesetzt. Das Gewebe wurde vorher mit einem DARKOPEN (hydrophober Stift) markiert. Dabei kam im Anschluss an die manuelle Färbung das Autostainer Bond™ Max-System zum Einsatz. Am darauffolgenden Tag wurden die Präparate 3 x 5 min in TBS gespült. Die Antigendemaskierung erfolgte durch Bedecken des Gewebes mit der ER1-Antigen-Retrieval-Lösung (Polymer Simple Stain MAX PO von Histofine) für 20–30 min. Das hinzugefügte Polymer diente sowohl als Träger des Sekundärantikörpers als auch als Träger der Peroxidase. Nach erneutem Waschgang in TBS wurden nun ca. 150 µl DAB-Substrat pipettiert und für ca. 5–10 min inkubiert. Zum Stoppen des Färbevorgangs wurden die Schnitte in deionisiertem Wasser gespült. Zuletzt wurden die Präparate zur Kernfärbung noch für jeweils 1 min in Hämalaun inkubiert und anschließend 5 min mit fließend warmen Leitungswasser gebläut. Im letzten Schritt erfolgte die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe bis hin zum Xylol und die Konservierung mittels dem Xylol-löslichem Eindeckmittel EZ-Mount.

Auswertungs-Vorgehen der Immunhistochemie

Die Auswertung der Immunreaktion (MET-IHC) erfolgte mithilfe des HistoScore (Hscore) [46]. Der erste Parameter dokumentierte dabei die Intensität der membranären Immunreaktion und reichte von null (keine Immunreaktion, MET-IHC 0) bis drei (starke Immunreaktion, MET-IHC 3+). Der zweite Parameter (P) dokumentierte den Prozentsatz der jeweils angefärbten Zellen, unterteilt in die Intensitäten der Immunreaktionen. Alle prozentual ermittelten Färbeintensitäten mussten insgesamt 100 % ergeben. Die folgende Formel wurde angewendet: $P(\text{MET-IHC } 0) + P(\text{MET-IHC } 1+) + P(\text{MET-IHC } 2+) + P(\text{MET-IHC } 3+) = 100 \%$. Das gesamte Kollektiv wurde durchmikroskopiert und drei repräsentative Fälle für die Färbeintensitäten MET-IHC 1+, 2+ und 3+ als Referenzschnitte ausgewählt (Abbildung 6). Diese Fälle wurden

anschließend als Referenzstandard für die nachfolgende eingehende Bewertung der gesamten Kohorte verwendet. MET-IHC 0 wurde durch das Fehlen jeglicher membranständigen Immunfärbung gekennzeichnet. MET-IHC 1+ war durch eine schwache, MET-IHC 2+ durch eine mittelstarke und MET-IHC 3+ durch eine starke membranäre Färbung gekennzeichnet. Die membranäre Immunfärbung trat fast immer gemeinsam mit einer zytoplasmatischen Färbung auf (Abbildung 6). Die Lokalisierung der membranären Immunfärbung war dabei variabel, wie z.B. lateral, basolateral und zirkumferentiell. Da es sehr große Variabilitäten in einem einzelnen Tumor gab (intratumorale Heterogenität), wurde die Art der membranären Immunreaktion nicht zur Klassifizierung der Immunfärbung oder des MET-Status verwendet.

2.2.2 Chromogene in situ-Hybridisierung (CISH)

Färbeprotokoll

Die chromogene in situ-Hybridisierung nahm zwei Arbeitstage in Anspruch.

An Tag 1 wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt und auf beschichteten Objektträgern für mindestens zwei Stunden im 60 °C warmen Thermobrite getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte zunächst für 2 x 15 min im Xylolbad entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Nachfolgend wurden die Präparate für 5 min in eine bereits vorbereitete 3-%ige Wasserstoffperoxidlösung auf einen Rüttler gestellt. Anschließend erfolgt ein Waschschrift in destilliertem Wasser. Zur Hitzedenaturierung und zum Aufbrechen der DNA in zwei Einzelstränge wurden die Präparate in 95 °C heisses Heat Pretreatment Solution (HPTS) gestellt und 15 min lang gekocht. Es folgte ein Waschschrift in destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Präparate für 5 min in eine feuchte Kammer (37 °C) gelegt und mit jeweils ca. vier bis fünf Tropfen Pepsin bedeckt, gefolgt von einer Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und 5 min Lufttrocknung. Am Ende des ersten Tages wurde ein kleines Deckglas mit ca. 2 x 5 µl Sonde (Zyto Dot 2C, SPEC MET/CEN Probe) auf jeden Schnitt gegeben und mittels Fixogumm abgeschlossen. Über Nacht erfolgt die Inkubation im Thermobrite bei 37 °C.

Am zweiten Tag wurden die sondenbedeckten Schnitte in eine Glasküvette mit SSC gestellt, und anschließend vorsichtig vom Fixogumm gelöst. Es folgte ein Waschgang in SSC auf dem Rüttler, bis die Deckgläser abgefallen waren. Daraufhin wur-

den die Schnitte für 5 min in auf 77 °C erhitztes SSC gestellt. Gefolgt von einem 1-minütigem Waschgang in destilliertem Wasser wurden die Schnitte anschließend für 1 min in TBS-Puffer verbracht. Anschließend wurde der Primärantikörper (DIG/DNP-Mix) mit 3–4 Tropfen auf jeden Schnitt aufgetragen, 15 min bei 37 °C inkubiert und 3 x 1 min. in TBS gewaschen. Schließlich wurde der polymerisierte Sekundärantikörper (HRP/AP Mix) mit 3–4 Tropfen auf die Schnitte getropft und erneut 15 min. bei 37 °C inkubiert. Nach dem Spülen in TBS (3 x 1 min.) folgte die Inkubation mit dem vorbereiteten AP Red für 10 min in einer schwarzen Kammer. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Schnitte mit HRP Green beträufelt und für 7 min in der schwarzen Kammer bei RT inkubiert. Zur Gegenfärbung wurden anschließend pro Schnitt ca. 200 µl Nuclear Blue Solution aufgetropft. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte für 2 min unter fließendes Leitungswasser gehalten, in aufsteigendem Alkohol und Xylol dehydriert und abschließend mit 24 x40 mm Deckgläsern und Mounting Solution eingedeckelt.

Auswertungs-Vorgehen der CISH

Für die Auswertung der CISH wurde jeweils der gesamte Gewebeschnitt begutachtet, um ggf. auch die innerhalb des Tumors auftretenden Heterogenitäten des *MET*-Status zu erfassen (z.b. amplifizierte und nicht-amplifizierte Tumorareale). Anschließend wurden in den invasiven Regionen die *MET*- und Zentromer-7-Signale in mindestens 20 repräsentativen, benachbarten Tumorzellkernen gezählt. Die Genzahl wurde errechnet, indem die Anzahl der *MET*-Gensignale (grüne Farbe) durch die Anzahl der Zentromer-7-Signale (rote Farbe) dividiert wurde. Als Grundlage diente dabei der vorangehende Algorithmus der HER2-Testung. Um einen positiven *MET*-Status/Amplifikation handelte es sich nur dann, wenn der *MET*/Zentromer-7-Quotient > 2,2 betrug. Vierzig Kerne wurden gezählt, wenn der *MET*-/Zentromer-7-Quotient zwischen 1,8 und 2,2 lag. Das Vorliegen von *MET*-Clustern wurde dokumentiert.

2.2.3 Virtuelle Auswertung mittels Mikroskopie

Die Gewebeschnitte wurden mithilfe eines Leica SCN400 Slidescanner (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) in einer maximalen, nominell x 40 vergrößerten Oberfläche gescannt. In den gescannten Bildern betrug der Pixel-zu-Pixel-Abstand 0,26 µm. Die Bilder wurden anschließend aus dem Scannersystem in Dateien des

Leica SCN-Formats exportiert. Für die Durchführung der computergestützten Anteile der Studie wurde ein spezielles Programm geschrieben, welches die Bilder des Leica-SCN-Dateiformats sichtbar macht [47]. Dies ermöglichte die Flexibilität, das Bildschirmlayout, die Benutzerinteraktion, das Hilfswerkzeug und die Berechnungsroutinen zu erstellen, die für die Studie benötigt wurden.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgte durch SPSS, Version 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Bei kontinuierlichen Variablen wurden die Fälle durch Trennung im Medianwert in zwei Gruppen unterteilt. Der Median des Gesamtüberlebens der Patienten wurde mithilfe des Log-Rank-Tests ausgewertet und durch die Kaplan-Meier-Methode grafisch dargestellt. Zu Vergleichszwecken wurden die mediane Überlebenszeit, seine Standardabweichung (SD) und ein Konfidenzintervall (KI) von 95 % berechnet. Um die prognostische Bedeutung zu untersuchen, wurden alle Variablen mit $p < 0,10$ in einem Cox-Regressionsmodell eingeschlossen und die Rückwärts-logistische Regressions-(LR)-Methode ($P_{in} = 0,05$ und $P_{out} = 0,10$) verwendet, um das Modell auf die unabhängigen Variablen zu reduzieren. Der Fisher's exact-Test wurde verwendet, um die Korrelation zwischen klinisch-pathologischen Patientencharakteristika und Biomarkerdaten auszudrücken. Für die Parameter der ordinalen Skala (T- Kategorie, N-Kategorie, Tumorstadium) wurde stattdessen der Kendall-Tau-Test angewendet. P-Werte unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Um Auswirkungen von Mehrfachprüfungen zu berücksichtigen, wurde das explorative Simes (Benjamini-Hochberg)-Verfahren angewendet. Die P-Werte wurden nicht angepasst, sondern dort markiert, wo sie unter der explorativen Simes-Prozedur an Bedeutung verlieren.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse von MET im Magenkarzinom

3.1.1 Immunhistochemie

Mittels IHC wurde die Expression von MET im Magenkarzinom aller Patienten evaluiert. Verglichen wurden u.a. die Genexpression im Tumorgewebe selbst als auch in den dazugehörigen Lymphknotenmetastasen. In 470 Magenkarzinomen war MET immunhistochemisch nachweisbar. Eine schwache Immunfärbung (MET-IHC 1+) fand sich in 184 (39,1 %), eine mittelstarke (MET-IHC 2+) in 51 (10,9 %) und eine starke (MET-IHC 3+) in 27 (5,7 %) Fällen. Immunnegative Tumorzellen (MET-IHC 0) wurden in 460 (97,9 %) Fällen gefunden. Der prozentuale Anteil der vier Immunfärbekategorien, d.h. MET-IHC 0, 1+, 2+ und 3+, reichte von 0 % bis 100 % (Abbildung 6). Die Kombination der Färbekategorien variierte in jedem einzelnen Fall. So waren beispielsweise 272 (57,9 %) der Magenkarzinome vollständig immunnegativ für MET. Wohingegen ein Fall eine 100 %ige, starke MET Expression (MET-IHC 3+) zeigte. Bei 197 fand sich eine Kombination von zwei oder drei Färbeintensitäten, d.h. MET-IHC 0/1+ [143 Fälle (30,4 %)], 0/2+ [2 (0,4 %)], 1+/2+ [2 (0,4 %)], 0/3+ [1 (0,2 %)], 2+/3+ [4 (0,9 %)], 0/1+/2+ [24 (5,1 %)], 0/1+/3+ [2 (0,4 %)], 0/2+/3+ [6 (1,3 %)], 1+/2+/3+ [3 (0,6)] oder 0/1+/2+/3+ 10 (2,1)] (siehe Abbildung 7).

Diese Daten zeigen, dass die Expression von MET, sprich die Kombination der Intensität der Immunfärbung und die Menge der immunpositiven Tumorgebiete im Magenkarzinom einer heterogenen Verteilung unterliegen, einschließlich "Graustufen" und "schwarz-weiß" Immunfärbungen (Abbildung 6 und 7).

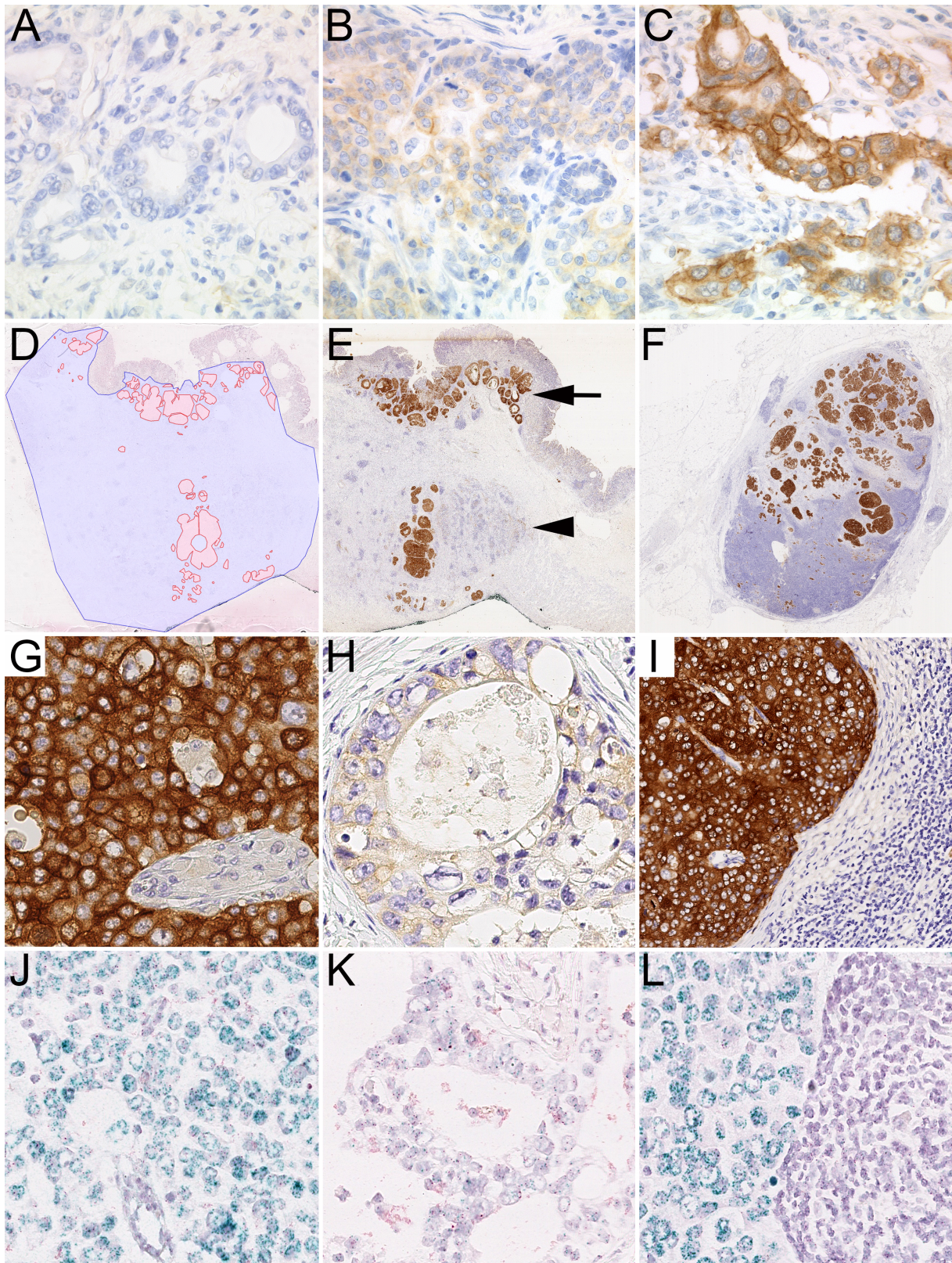


Abbildung 6: Die Expression des Hepatozytenwachstumsfaktor-Rezeptors (MET) im Magenkarzinom.

Die Expression von MET wurde durch Immunhistochemie (IHC) (A-C, E-I) und chromogene in situ-Hybridisierung (D, J-L) untersucht. Die gesamte Magenkrebskohorte wurde gescreent und drei repräsentative Fälle wurden für MET-IHC 0 (A), 1+ (B), 2+ (C) und 3+ (G) ausgewählt. Mit einem Vier-

wer-Programm mit einer Polygon-Linienzeichnungsfunktion wurden manuell die Umrisse des gesamten Tumorgewebebereichs (blau) und des MET-amplifizierten Tumorbereichs (rot, D) umzeichnet. Dies veranschaulicht die Heterogenität der MET-Expression und der MET-Amplifikation. Weniger als 10 % des gesamten Tumorbereichs zeigten MET-IHC 3+ (E, G), während andere Bereiche MET-IHC 0 oder 1+ (H) waren. MET wurde verstärkt (J) oder nicht (K). Eine entsprechende Lymphknotenmetastase des gleichen Patienten zeigte MET-IHC 3+ (F, I) und MET-Amplifikation der metastatischen Tumorzellen (L). Die räumliche Verteilung der MET-Status-positiven Tumorzellklone ist auch in (E) dargestellt. Die Immunfärbung wurde sowohl an der Zellmembran als auch im Cytoplasma lokalisiert. MET-positive Tumorzellklone wurden in der Nähe der Schleimhautoberfläche (Pfeil) und im Tumorzentrum (Pfeilspitze E) gefunden. *Quelle: Metzger et. al. [48].*

3.1.2 Chromogene in situ-Hybridisierung

Alle Fälle (n = 55), die in der IHC entweder mit MET-IHC 2+ und/oder MET-IHC 3+ bewertet wurden, wurden anschließend noch mittels CISH bearbeitet. Davon wurden insgesamt 25 von 55 (45,5 %) Fällen als positiv gewertet. 19 von 27 (70,4 %) Fällen mit MET-IHC 3+, sechs von 28 (21,4 %) Fällen mit MET-IHC 2+ und ohne MET-IHC 3+ Expression zeigten eine *MET*-Amplifikation (Abbildung 7). Der Genquotient reichte dabei von 2,07 bis 6,26 (Median 3,82), die Genzahl von 4,55 bis 14,10 (Median 8,70). Zusätzlich wurden in 24 Fällen *MET*-Gencluster gefunden. Zusammenfassend zeigten 5,3 % der gesamten Magenkarzinom-Kohorte eine *MET*-Amplifikation (25 von 470 Fällen).

Die Verteilung der Genamplifikation war wie in der IHC heterogen (siehe unten), da amplifizierte und nichtamplifizierte Tumorgebiete auf Zell-zu-Zell-Basis voneinander abgegrenzt werden konnten (Abbildung 6). Die Amplifikation korrelierte räumlich mit den MET-IHC 3+ oder MET-IHC 2+ Bereichen, wohingegen in MET-IHC 0 oder MET-IHC 1+ Tumorbereichen keine *MET*-Amplifikation gefunden wurden (Abbildung 6).

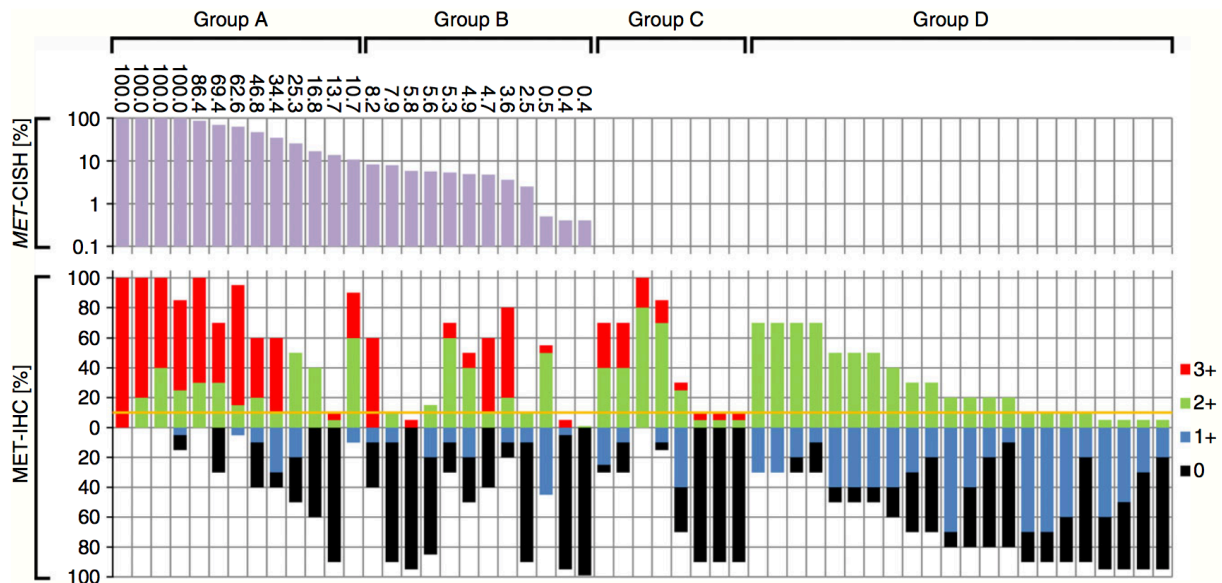


Abbildung 7: Wasserfall-Diagramm: Verteilung der MET-Amplifikation und Immunhistochemie des Hepatozytenwachstumsfaktor-Rezeptors (MET) von 55 Patienten.

Die Wasserfall-Darstellung zeigt von Fall zu Fall die Ergebnisse der chromogenen in situ-Hybridisierung (MET-CISH, logarithmische Datenpräsentation) und Immunhistochemie (MET-IHC, lineare Datenpräsentation) für Patienten der Gruppe A ($\geq 10\%$ MET-Amplifikation) und Gruppe D (MET-IHC 2+ ohne MET-Amplifikation), Gruppe B ($< 10\%$ MET-Amplifikation), Gruppe C (MET-IHC 3+ ohne MET-Amplifikation). Zu beachten ist, dass die verschiedenen Farben die jeweils verschiedenen Färbeintensitäten veranschaulichen: MET-IHC 3+ (rot), MET-IHC 2+ (grün), MET-IHC 1+ (blau) und MET-IHC 0 (schwarz). Die Summe aller Färbeintensitäten, die in einem einzigen Fall gefunden wurden, wurde immer zu einem Gesamt-HistoScore (Hscore) von 100 % gemäß der folgenden Formel hinzugefügt: $P(\text{MET-IHC } 0) + P(\text{MET-IHC } 1+) + P(\text{MET-IHC } 2+) + P(\text{MET-IHC } 3+) = 100\%$. Die gelbe Linie markiert eine 10 %-Schneidung, die zum Beispiel verwendet wird, um Her2/neu als positiv (oben) oder negativ (unten) zu klassifizieren. *Quelle: Metzger, et al. [48].*

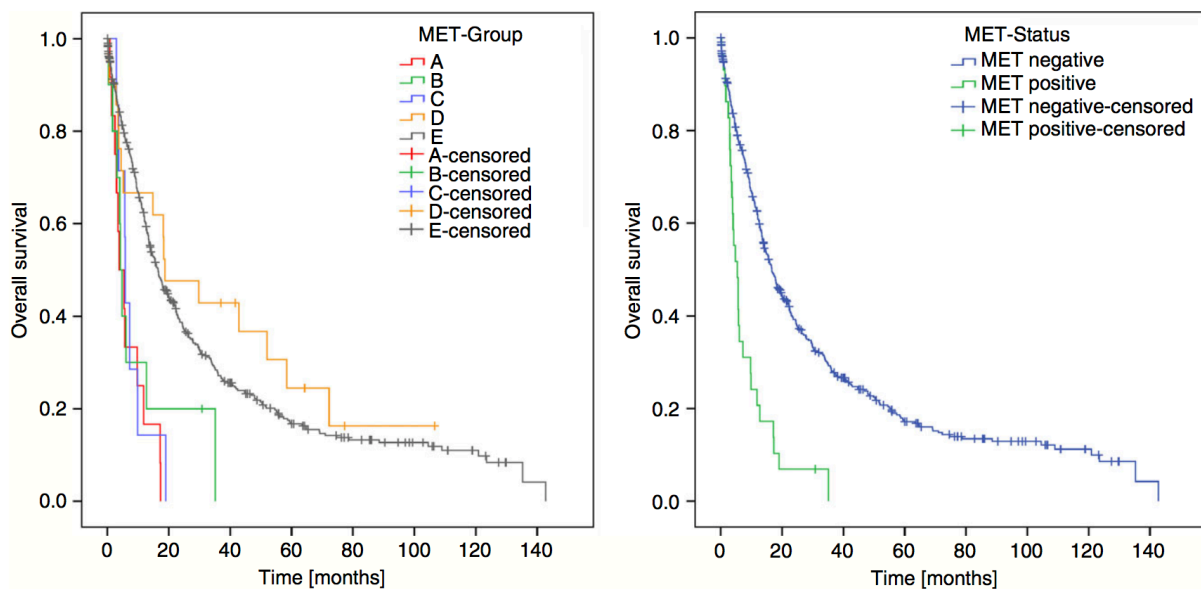
3.2 Korrelation des Patientenüberlebens zwischen *MET*-amplifizierten und positiven Tumorarealen in der Immunfärbung

Schließlich sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der *MET*-Expression und dem Patientenüberleben untersucht werden. Deshalb testeten wir die Hypothese, dass der prozentuale Bereich der *MET*-amplifizierten Tumorzellen und die Intensität der *MET*-Immunfärbung mit dem Überleben der Patienten korreliert. Zu diesem Zweck wurden die CISH-markierten, tumortragenden Gewebeabschnitte, welche *MET*-Amplifikationen (Verhältnis $\geq 2,0$) beinhalteten, mit einem mikroskopischen Ganzschieberscanner eingescannt. Mithilfe eines Viewer-Programms, welches über eine Polygon-Linienzeichnungsfunktion verfügt, konnten die Umrisse des gesamten Tumorgewebebereichs und des *MET*-amplifizierten Tumorbereichs dargestellt werden. Dieser wurde scharf von den nichtamplifizierten Tumorbereichen (auf Zell-zu-Zell-Basis) abgegrenzt (Abbildung 6D). Der Prozentsatz der *MET*-amplifizierten Tumorphäche wurde daraufhin berechnet und reichte von 0,4 % bis 100,0 % (Abbildung 7). Anschließend wurden die Magenkarzinome in fünf Gruppen kategorisiert: ≥ 10 % *MET*-amplifizierte Tumorphäche (Gruppe A, Abbildung 7), < 10 % *MET*-amplifizierte Tumorphäche (Gruppe B), *MET*-IHC 3+ ohne *MET*-Amplifikation (Gruppe C), *MET*-IHC 2+ ohne *MET*-Amplifikation (Gruppe D) und *MET*-IHC 1+ oder *MET*-IHC 0 (Gruppe E, Tabelle 3). Interessanterweise zeigte das mediane Überleben der Gruppen A, B und C keine signifikanten Unterschiede voneinander (A versus B: $p = 0,438$; A versus C: $p = 0,463$; B gegenüber C: $p = 0,811$). Im Gegensatz hierzu lebten die Patienten der Gruppe D im Vergleich zu den Patienten der Gruppen A ($p = 0,001$), B ($p < 0,035$) oder C ($p = 0,031$) signifikant länger. Das mediane Überleben zwischen den Gruppen D und E unterschied sich nicht signifikant. So ist also unabhängig von der *MET*-amplifizierten Tumorphäche jede *MET*-Amplifikation und *MET*-IHC 3+ ohne Amplifikation prognostisch deutlich ungünstiger. Die Kaplan-Meier-Plots veranschaulichen ferner das Überleben der verschiedenen Patientengruppen (Abbildung 8, Tabelle 3) und die Wirkung, die jeder prozentuale Bereich der *MET*-Amplifikation auf das Überleben des Patienten hat.

Tabelle 3. Korrelation des Patientenüberlebens mit MET-immungefärbten und MET-amplifizierten Tumorbereichen

Finaler MET-Status	Gruppe	Immunohistochemie	Chromogen in situ-Hybridisierung	Anzahl der Patienten	Medianes Überleben ± SD [months]	95 %CI
Positiv	A	MET-IHC 2+ und/oder 3+	MET-amplifizierter Bereich ≥ 10 %	13	3,81± 1,71	0,47-7,16
Positiv	B	MET-IHC -2+ und/oder 3+	MET-amplifizierter Bereich < 10 %	12	4,27± 0,57	3,15-5,39
Positiv	C	MET-IHC 3+	MET-unamplifiziert	8	5,85± 6,27	5,43-6,27
Negativ	D	MET-IHC 2+	MET-unamplifiziert	22	18,76±8,82	147-36,05
Negativ	E	MET-IHC 1+ oder 0	MET-unamplifiziert	415	16,53±1,45	13,69-19,37

MET, Hepatozytenwachstumsfaktor-Rezeptor; IHC, Immunhistochemie; CISH, Chromogene in situ-Hybridisierung; KI, Konfidenz-Intervall; SD, Standardabweichung.

**Abbildung 8. Kaplan-Meier-Kurven, die das Überleben der Patienten darstellen.**

Die Patienten wurden in fünf Hepatozytenwachstumsfaktor-Rezeptor (MET)-Gruppen (links) kategorisiert: ≥10 % MET-amplifizierter Tumorbereich (Gruppe A), < 10 % MET-amplifizierter Tumorbereich (Gruppe B), MET-IHC 3+ und -nichtamplifiziert (Gruppe C), MET-IHC 2+ und nicht-amplifiziert (Gruppe D) und MET-IHC 1+ oder MET-IHC 0 (Gruppe E). Anschließend wurden die Gruppen A-C als MET-positiv und die Gruppen D-E als MET-negativ (rechts) klassifiziert. *Quelle: Metzger et al. [48].*

3.3 Korrelation des MET-Status mit den klinisch-pathologischen Eigenschaften der Patienten

Als Nächstes wurde der MET-Status mit den verschiedenen klinisch-pathologischen Patientencharakteristika korreliert. Zu diesem Zweck und auf der Grundlage der bereits genannten Ergebnisse wurden alle Patienten der Gruppen A–C als MET-positiv, und alle Magenkarzinome der Gruppen D und E als MET-negativ (Tabelle 3) kategorisiert. Hierdurch wurde der 10 % Cutoff-Wert, welcher für das Her2/neu-Scoring [24] dient, verworfen.

Der MET-Status korrelierte signifikant mit der Lymphgefäßinvasion, dem Nodal-Status (N-Kategorie), dem Lymphknoten-Verhältnis, dem UICC-Tumorstadium, dem Tumorgrad und dem R-Status (Tabelle 4). Dabei konnten MET-positive Magenkarzinome bei Männern, bei gemischtem histologischem Typ und lokal fortgeschrittenen Tumoren (8,2 % pT3/4 gegenüber 2,6 % pT1/2, Tabelle 4) nur unwesentlich häufiger beobachtet werden. Magenkarzinome mit Gefäßinvasion zeigten deutlich häufiger eine MET-Überexpression, verglichen mit Magenkarzinomen ohne Gefäßinvasion. Es konnte weder eine Korrelation zwischen dem MET-Status und einer *H. pylori*-Infektion noch mit dem EBV gefunden werden. Interessanterweise zeigten alle MET-positiven Magenkarzinome eine Mikrosatellitenstabilität (MSS) und waren sowohl vom *KRAS*- als auch vom *PIK3CA*-Wildtyp.

Mit Ausnahme eines einzigen Falles, der sowohl eine *MET*- als auch eine *HER2*-Amplifikation in räumlich unterschiedlichen Tumorbereichen zeigte (Abbildung 9), schlossen sich der *MET*- und *HER2*-Status gegenseitig aus.

- Anschließend wurde der *MET*-Status mit dem Patientenüberleben korreliert, wobei eine signifikant schlechtere Prognose bei *MET*-positiven Magenkarzinomen zu beobachten war (Tabelle 4, Abbildung 8). Die Patientenprognose hing dabei auch sehr stark vom Patientenalter, dem Lauren-Phänotyp, dem Tumorgrad, der T-Kategorie, der N-Kategorie, dem Lymphknotenverhältnis, dem R-Status sowie der UICC-Stadium ab (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4: Klinisch-pathologische Patienten-Eigenschaften der Magenkarzinom-Kohorte

	Anzahl (n)	Nicht vorliegend (n)		Gesamt (n)	MET-negative [n (%)]	MET-positive [n (%)]	p-Wert
Geschlecht	470	0	Männer	291	265 (91,1)	26 (8,9)	0,041 ¹⁾
			Frauen	179	172 (96,1)	7 (3,9)	
Alter	470	0	< 68 Jahre	233	214 (91,8)	19 (8,2)	0,371 ¹⁾
			≥ 68 Jahre	237	223 (94,1)	14 (5,9)	
Lokalisation	470	0	Proximaler Magen	143	128 (89,5)	15 (10,5)	0,075 ¹⁾
			Distaler Magen	327	309 (94,5)	18 (5,5)	
Laurén Phänotyp	470	0	Intestinal	241	228 (94,6)	13 (5,4)	0,060 ¹⁾
			Diffus	147	137 (93,2)	10 (6,8)	
			Gemischt	31	25 (80,6)	6 (19,4)	
			Unklassifiziert	51	47 (92,2)	4 (7,8)	
Muzin Phänotyp	412	58	Intestinal	117	113 (96,6)	4 (3,4)	0,237 ¹⁾
			Gastrisch	62	57 (91,9)	5 (8,1)	
			Gemischt	169	153 (90,5)	16 (9,5)	
			Unklassifiziert	64	60 (93,8)	4 (6,2)	
pT-Kategorie	470	0	pT1a/b	59	57 (96,6)	2 (3,4)	0,043 ²⁾
			pT2	56	55 (98,2)	1 (1,8)	
			pT3	184	170 (92,4)	14 (7,6)	
			pT4a/b	171	155 (90,6)	16 (9,4)	
pN-Kategorie	469	1	pN0	134	131 (97,8)	3 (2,2)	0,004 ²⁾
			pN1	65	64 (98,5)	1 (1,5)	
			pN2	85	74 (87,1)	11 (12,9)	
			pN3 (a/b)	185	167 (90,3)	18 (9,7)	
Lymphknoten-Verhältnis	468	2	< 0,189	229	221 (96,5)	8 (3,5)	0,004 ¹⁾
			≥ 0,189	239	214 (89,5)	25 (10,5)	
Stadium (7. Auflage UICC)	470	0	IA	46	45 (97,8)	1 (2,2)	< 0,001 ²⁾
			IB	36	36 (100,0)	0 (0,0)	
			IIA	55	54 (98,2)	1 (1,8)	
			IIB	46	43 (93,5)	3 (6,5)	
			IIIA	55	51 (92,7)	4 (7,3)	
			IIIB	80	73 (91,2)	7 (8,8)	
			IIIC	64	58 (90,6)	6 (9,4)	
			IV	88	77 (87,5)	11 (12,5)	

	Anzahl (n)	Nicht vorliegend (n)		Gesamt (n)	MET-negative [n (%)]	MET-positive [n (%)]	p-Wert
Lymphatische Invasion	455	15	pL0	221	214 (96,8)	7 (3,2)	0,003 ¹⁾
			pL1	234	210 (89,7)	24 (10,3)	
Venöse invasion	454	16	pV0	403	379 (94,0)	24 (6,0)	0,068 ¹⁾
			pV1	51	44 (86,3)	7 (13,7)	
Tumorgraduierung	469	1	G1/G2	112	110 (98,2)	2 (1,8)	0,010 ¹⁾
			G3/G4	357	326 (91,3)	31 (8,7)	
R-Status	470	0	pR0	410	387 (94,4)	23 (5,6)	0,005 ¹⁾
			pR1	60	50 (83,3)	10 (16,7)	
Überleben	455	15	Total	455	425 (93,4)	30 (6,6)	< 0,001 ³⁾
			Verstorben	354	325 (91,8)	29 (8,2)	
			Median [Monate ± SD; 95 %CI]		16,69 ± 1,42 [13,90-19,48]	5,42 ± 0,97 [3,53-7,32]	
H. pylori	402	68	Positiv	60	56 (93,3)	4 (6,7)	0,769 ¹⁾
			Negativ	342	322 (94,2)	20 (5,8)	
EBV	453	17	Positiv	17	15 (88,2)	2 (11,8)	0,356 ¹⁾
			Negativ	436	405 (92,9)	31 (7,1)	
KRAS	470	0	Wildtyp	453	420 (92,7)	33 (7,3)	0,622 ¹⁾
			Mutant	17	17 (100,0)	0	
PIK3CA	470	0	Wildtyp	450	417 (92,7)	33 (7,3)	0,384 ¹⁾
			Mutant	20	20 (100,0)	0 (0,0)	
MSI Status	441	29	MSS	407	376 (92,4)	31 (7,6)	0,155 ¹⁾
			MSI-high	34	34 (100,0)	0	
HER2	443	27	Positiv	36	35 (97,2)	1 (2,8)	0,497 ¹⁾
			Negativ	407	377 (92,6)	30 (7,4)	

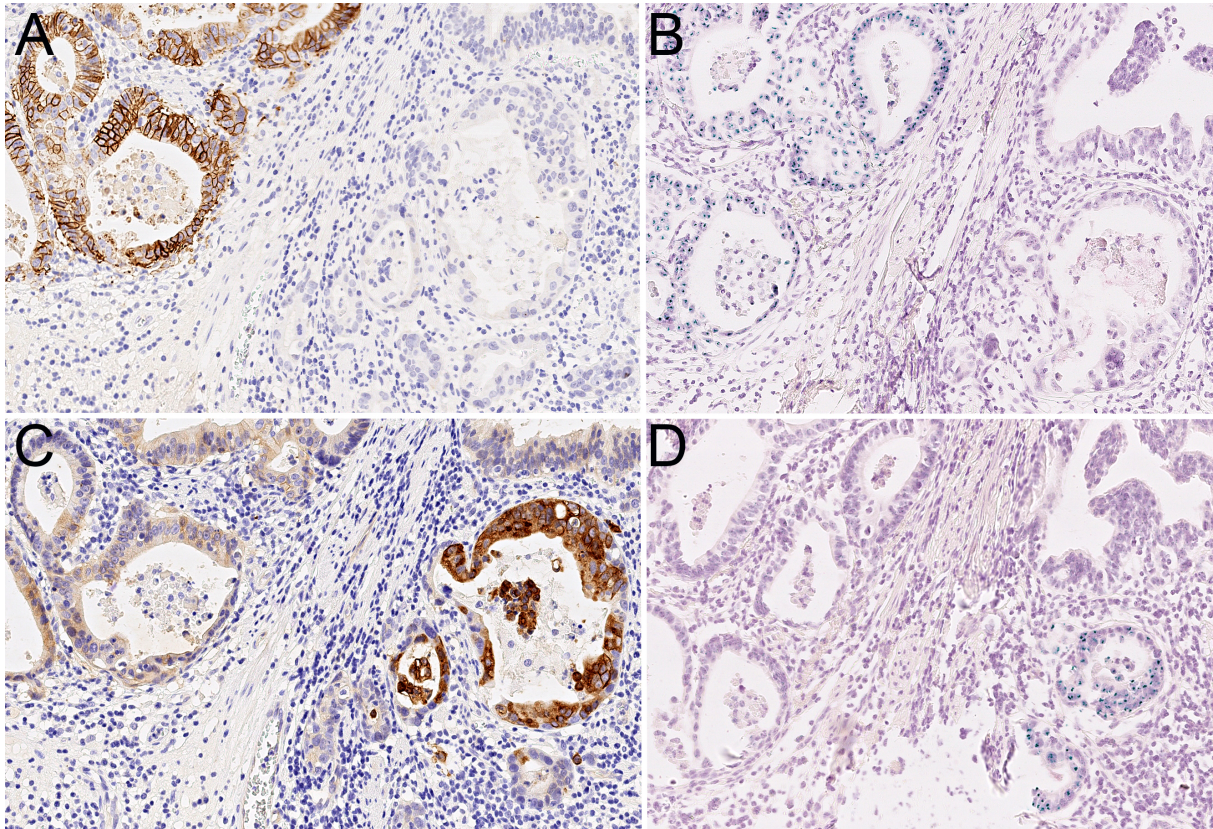


Abbildung 9. Her2/neu- und Hepatozytenwachstumsfaktor-Rezeptor (MET)-Überexpression bei einem einzigen Patienten.

Ein einzelner Patient zeigte eine Überexpression von Her2/neu (A, B) und MET (C, D) in räumlich getrennten Tumorbereichen. Vier serielle Schnitte wurden immunhistochemisch (A, C) und durch chromogene in situ-Hybridisierung (B, D) gefärbt. Zu beachten sind die unterschiedlichen Immunreaktionen von Her2/neu und MET. Her2/neu zeigte eine charakteristische, zarte basolaterale Färbung der Zellmembran, während die MET-Immunfärbung auch im Zytoplasma stark war. *Quelle: Metzger et al. [48].*

3.4 Multivariate Überlebensanalyse (Cox Regression)

Eine Cox-Regression wurde an all denjenigen Parametern durchgeführt, bei denen sich ein $p < 0,100$ in der univariaten Überlebensanalyse gezeigt hatte. Dazu gehörten der Lauren-Phänotyp, die T-Kategorie, die N-Kategorie, das UICC-Stadium, das Lymphknoten-Verhältnis sowie die Lymph- und Blutgefäßinvasion, der R-Status und der MET-Status.

Vier Parameter blieben im Cox-Modell, nachdem die Rückwärts-LR-Methode mit $P_{in} = 0,05$ und $P_{out} = 0,10$ durchgeführt wurde. Dabei handelte es sich um den R-Status [Hazard Ratio (HR) = 2.208 (1.573–3.099); $p < 0,001$], den MET-Status [HR = 2.126 (1.386–3.261); $p = 0,001$], das Lymphknotenverhältnis [HR = 1,633 (1,197–2,228); $P = 0,002$] und das UICC-Stadium [HR = 1,055 (95 % CI: 1,034–1.077); $p < 0,001$].

3.5 MET-Status in Lymphknotenmetastasen

Anschließend wurde der MET-Status in den jeweiligen Lymphknotenmetastasen der MET-positiven Magenkarzinome untersucht, d.h. alle diejenigen, die eine MET-IHC 2+ und/oder 3+ mit *MET*-Amplifikation oder MET-IHC 3+ ohne *MET*-Amplifikation (Gruppen A-C) zeigten. Dabei waren von 26 (78,8 %) MET-positiven Fällen Lymphknotenmetastasen verfügbar.

Wie in dem bereits untersuchten Tumorgewebe selbst, wies sowohl die MET-Immunhistochemie als auch die *MET*-Amplifikation der Lymphknotenmetastasen ebenfalls eine Heterogenität mit MET-IHC 0, 1+, 2+ und 3+ sowie in den *MET*-amplifizierten und *MET*-nichtamplifizierten Tumorzellklonen innerhalb des gleichen Lymphknotens auf. Ein Vergleich der Primärtumoren mit den entsprechenden Lymphknotenmetastasen zeigte in 15 (58 %) Fällen einen konkordanten MET-Status (Abbildung 6 E und F). In 11 (42 %) Fällen waren die Lymphknotenmetastasen MET-negativ. Das Gesamtüberleben zwischen den konkordanten ($n = 15$) und diskordanten ($n = 11$) Fällen war nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,280$).

In Fällen mit MET-positiven Lymphknotenmetastasen korrelierte das Lymphknotenverhältnis, d.h. die Anzahl der MET-positiven Lymphknotenmetastasen dividiert durch die Gesamtzahl der Lymphknotenmetastasen, nicht mit dem Gesamtüberleben ($p = 0,079$). Schließlich wurde der MET-Status noch in allen Lymphknotenmetasta-

sen der MET-negativen Magenkarzinome (Gruppe D) getestet. Hierfür standen die Lymphknotenmetastasen aus 18 (81,8 %) MET-negativen Fällen zur Verfügung. In keinem der Fälle konnte eine MET-positive Lymphknotenmetastase beobachtet werden.

3.6 Räumliche Lokalisierung von MET-positiven Tumorzellklonen

In einer palliativen Situation könnten eventuell nur Tumorbiopsien für die Prüfung eines prädiktiven Biomarkers zur Verfügung stehen, weshalb schließlich die räumliche Verteilung der MET-positiven Tumorzellklone im Primärtumor untersucht wurde. Dabei befanden sich in 26 (78 %) Fällen die MET-positiven Tumorzellen in der Nähe der Schleimhautoberfläche (Abbildung 6 D). In 7 (21 %) Fällen wurden MET-positive Tumorzellklone nur im Tumorzentrum oder in der Nähe der Invasionsfront lokalisiert.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Die MET-positiven Magenkarzinome definieren eine kleine, aggressive Untergruppe von Magenkarzinomen mit einer sehr schlechten Prognose. Eine Kombination aus MET-Immunfärbung und in situ-Hybridisierung eignet sich zur Beurteilung des jeweiligen MET-Status. Hinsichtlich der Verwendung von MET als prädiktiven Biomarker sollten prospektive Studien auf eine ausreichende Gewebeprobe achten, die vorangegangenen Cutoff-Werte für Tumorbereiche ignorieren und die *KRAS*- und *PIK3CA*-Genotypen als negative prädiktive Marker betrachten.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Immunhistochemie

Wie in vielen anderen Studien wurden auch in dieser Forschungsarbeit die tumorbiologischen und klinisch-pathologischen Eigenschaften von MET-positiven Magenkarzinomen untersucht. Zur Durchführung des experimentellen Teils der hier vorliegenden Arbeit kam zunächst die Immunhistochemie zum Einsatz. Die Expression von MET wurde durch Immunhistochemie bereits in mehreren Studien untersucht [25, 26, 32, 36, 40, 49-59]. Die Anzahl der MET-IHC-positiven Magenkarzinome reichte dabei von 3,8 % [49] bis 85 % [16]. In unserer Kohorte wurde jede Immunfärbung von MET (MET-IHC 1+ bis 3+) in 192 (42,1 %) der Fälle gefunden. Dieser breite Bereich der immunpositiven Fälle beruht auf der Verwendung unterschiedlicher Arten von Antikörpern und unterschiedlichen, nicht standardisierten Scoring-Systemen. Sieben andere Studien verwendeten ebenfalls den in unserer Studie angewendeten monoklonalen SP44-Antikörper des Kaninchens, welcher als der zuverlässigste Antikörper angesehen wurde [25, 26, 50, 52, 53, 55, 56]. Die Positivitätsrate war zwar dadurch homogener, reichte jedoch noch von 9 % [52] bis 41 % [50]. Dieser Umstand ist durch die unterschiedlichen Scoring-Systeme und Cutoff-Werte begründet, die in den verschiedenen Studien angewendet wurden. Allerdings lieferte keine dieser Studien eine rationale Erklärung für die Anwendung eines bestimmten Cutoff-Wertes oder Scoring-Systems. Bisher wurde die Bedeutung der vielfältigen Scoring-Systeme nicht

systematisch erforscht. In dieser Arbeit wurde die erste systematische Analyse über die MET-Expression und Herangehensweise mit dem HScore durchgeführt. Das Ergebnis war eine wesentliche intra- und intertumorale Variabilität der MET-Immunfärbung, vor allem im Hinblick auf die Kombination von Färbeintensitäten (MET-IHC 0, 1+, 2+, 3+) und den Prozentsätzen positiver Tumorbereiche (siehe Abbildung 7 und 8). Im Hinblick auf eine Anwendung der Immunfärbung als prädiktiven Biomarker macht es dieses Ergebnis besonders schwierig [47]. Ferner konnte gezeigt werden, dass Pathologen zwar eine gute Fähigkeit besitzen, die Verhältnisse von klar abgegrenzten Gebieten zu schätzen, jedoch behinderten die Gradienten in den Färbeintensitäten (wie beispielsweise eine Kombination von zwei oder drei verschiedenen immungefärbten Intensitäten in einem einzigen Fall) die reproduzierbare, visuelle Abgrenzung von positiven Tumorgebieten [47].

4.2.2 Chromogene in situ-Hybridisierung

Für HER2/neu in Brust- und Magenkarzinomen konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Kombination von Immunhistochemie und in situ-Hybridisierung die Spezifität des biologisch prädiktiven Biomarkers verbessern kann. Bei der Durchführung der CISH in der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass nur 5,3 % der untersuchten Magenkarzinome *MET*-amplifiziert sind. Diese niedrige Prävalenz entspricht in etwa früheren Befunden, wobei die Anzahl der *MET*-amplifizierten Magenkarzinome von 1,3 % bis 12 % reichte [25, 26, 31, 34, 39, 40, 53, 56, 60].

Insgesamt ist die *MET*-Amplifikation in Magenkarzinomen also selten und unterliegt einer heterogenen Verteilung mit amplifizierten und nicht-amplifizierten Tumorzellklonen, welche in ein und demselben primären Magenkarzinom auftraten. Dies wurde in der Vergangenheit zwar gelegentlich berichtet [25, 61], jedoch niemals systematisch untersucht.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Hintergrund der Untersuchung

Die weiterhin schlechte Prognose bei Erstdiagnose eines Magenkarzinoms nimmt bis heute einen hohen Stellenwert der gastrointestinalen Onkologie und Forschung ein. Somit kommt der Suche nach prognostischen und diagnostischen Markern eine große Bedeutung zu. Speziell die Gruppe der RTKs spielt dabei eine wesentliche Rolle, da sie als potenzielle Angriffspunkte einer individualisierten Krebstherapie dienen. Der Hepatozytenwachstumsfaktor-Rezeptor MET ist ein RTK mit pleiotropen Effekten. Er ist u.a. wichtig für die embryonale Entwicklung und Regeneration, die Plazenta- und Leberentwicklung, sowie die Leberregeneration und Wundheilung. MET wird bei der Tumorentstehung auf unterschiedliche Wege aktiviert, z.B. durch HGF/SF-Überexpression, autokrine Signalgebung, *MET*-Mutation oder -Amplifikation. Dieser Rezeptor induziert somit die Proliferation, das Überleben, die Motilität, die Zellstreuung, die Angiogenese und Tubulogenese und treibt den epithelial-mesenchymalen Übergang sowie die Invasion an [29, 38]. Deng et al. [62] zeigten, dass 37 % der Magenkarzinome RTK-Gen-Amplifikationen für *EGFR*, *FGFR2*, *HER2* und *MET* enthalten. Die Transkripte dieser Amplifikationen stellen vielversprechende therapeutische Ziele dar [21, 24]. MET wird seit einiger Zeit für die Behandlung des Magenkarzinoms erforscht [34, 38-42, 63]. Dabei kann die zielgerichtete Therapie von MET von seinem mittels Immunhistochemie und/oder CISH untersuchten Expressionsmuster abhängen [38].

4.3.2 Verwerfung der 10 % Cutoff-Regel

Bisher wurden Magenkarzinome auf der Grundlage des HER2-Scoring-Systems als Her2/neu-positiv eingestuft, wenn ≥ 10 % des Tumorbereichs eine starke Immunfärbung (3+) für Her2/neu oder eine moderate Immunfärbung (2+) in Verbindung mit einer *HER2*-Amplifikation (Verhältnis $\geq 2,0$) aufwiesen. Dabei wurde diese Cutoff-Regel auch auf die MET-Scoring-Methode angewendet [25, 49, 50, 56]. Diese Tatsache wurde als Anlass genommen, in dieser Arbeit auch die vermeintliche Signifikanz der Cutoff-Werte zu hinterfragen. Hierfür wurde mithilfe der virtuellen Mikroskopie die prozentuale Fläche der MET-positiven Tumorzellen objektiviert und mit großer Genauigkeit bestimmt. Gezeigt wurde, dass selbst eine kleine Subpopulation (0,4 %)

von MET-amplifizierten Tumorzellen bereits mit einer schlechten Prognose einhergeht. Zudem lieferte diese Arbeit weitere Belege dafür, dass die Patientenprognose verwendet werden kann, um eine rationale Klassifikation des MET-Status – d.h. positiv oder negativ – zu testen und zu entwickeln. Dies kann erreicht werden, indem erstens eine Kombination aus Immunfärbung und CISH verwendet und zweitens jeglicher Grenzwert für positive Tumorbereiche verworfen wird.

Darüber hinaus scheint die Verwendung des Patientenüberlebens als äquivalenter Marker für die Entwicklung eines prädiktiven Biomarkers sinnvoll, da die therapeutische Wirksamkeit der zielgerichteten Therapie an Hand der Verbesserung des Patientenüberlebens beurteilt wird [24, 63].

4.3.3 Tumorheterogenität

Die vorliegende Arbeit unterstützt außerdem die Aussage, dass die Tumor-Heterogenität ebenso ein wichtiges Thema bei der Analyse des MET-Status im Magenkarzinom ist. Wie in einer früheren Studie gezeigt werden konnte, besteht aufgrund eines Stichprobenfehlers das Risiko der Erhebung eines falsch positiven und falsch negativen HER2 -Status im Magenkarzinom [45]. Die vorliegende Arbeit bestätigt nun auch die sehr variable, räumliche Verteilung der MET-Expression, was kürzlich von Choi et al. diskutiert wurde [64]. In der vorliegenden Arbeit wurden bei sieben (21 %) Fällen MET-positive Tumorzellklone ausschließlich im Tumorzentrum oder nahe der Invasionsfront gefunden, sodass bei einer rein oberflächlichen Tumorbioptie das Risiko eines falsch negativen Testergebnisses besteht (Abbildung 6). Diese Erkenntnis wiederum erklärt möglicherweise die geringe Prävalenz der *MET*-Amplifikation in Studien mit Verwendung von Biopsien (2 %) [34] oder Tissuearrays (1,3–3,4 %) [25, 56]. Die bisherige Bewertung des MET-Status entspricht also dem gleichen Risiko, falsch positive und negative Bewertungen aufgrund eines Stichprobenfehlers zu erhalten, wie es schon für HER2 gezeigt wurde [45, 65].

Dieses Ergebnis galt nicht nur für den Primärtumor, sondern auch für die untersuchten Lymphknotenmetastasen. So unterliegt der MET-Status zwischen den Lymphknotenmetastasen desselben Patienten einem heterogenen Verteilungsmuster. Während keine MET-positiven Lymphknotenmetastasen in MET-negativen, primären Ma-

genkarzinomen gefunden wurden, lagen für 11 % der MET-positiven, primären Magenkarzinome MET-negative Lymphknotenmetastasen vor.

Abschließend lässt sich festhalten, dass es sich bei der Tumorheterogenität um ein diagnostisch relevantes Problem innerhalb der Magenkarzinome mit RTK-Gen-Amplifikationen handelt.

4.3.4 *KRAS* und *PIK3CA* als negative prädiktive Marker

In den letzten Jahren zeigte die Genomsequenzierung und das umfassende molekulare Profiling von 100 untersuchten Magenkarzinomen, dass spezifisch Magenkarzinome mit RTK-Genamplifikationen bevorzugt in einer Untergruppe der chromosomal instabilen Magenkarzinome angereichert sind. Darüber hinaus zeigten sie eine zusätzliche Aktivierung im RAS-Signalweg [66, 67]. Aufgrund dessen entsprechen die Ergebnisse dieser Arbeit den jüngsten Erkenntnissen der Molekularbiologie des Magenkarzinoms. Interessanterweise haben sich *MET*-Amplifikation und *KRAS*/*PIK3CA*-Mutationen in der hier vorliegenden Kohorte gegenseitig ausgeschlossen. Die *MET*-Signalgebung wird primär durch die RAS-mitogen-aktivierte extrazelluläre Kinase (MAPK) und Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K)-Protein-Kinase B (Akt) vermittelt. Dieses Wissen führt zu dem Konzept, dass sich RTK-Amplifikation und *RAS*/*PIK3CA*-Mutationen gegenseitig ausschließen können. Dazu passend konnte bereits gezeigt werden, dass auch Magenkarzinome mit *KRAS*-Mutation (analog zu den MET-positiven Fällen) eine schlechtere Prognose haben als *KRAS*-Wildtyp-Tumoren ($3,5 \pm 3,1$ gegenüber $12,7 \pm 0,7$ Monaten) [68].

4.3.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit gefunden Zusammenhänge zwischen der Evaluierung des MET-Status und dem Patientenüberleben sowie *MET*-amplifizierten Magenkarzinomen und *KRAS*-Mutationen, als einzigartige Untergruppe mit sehr schlechter Prognose geben wichtige Hinweise darauf, dass bereits ein geringer Prozentsatz an Amplifikationen und/oder Mutationen bei MET maßgeblich die Biologie des Magenkarzinoms beeinflussen. Dabei ist vor allem in Hinblick auf eine individualisierte, zielgerichtete Therapie auf die Entwicklung eines einheitlichen Scoring-System und die Tumorhe-

terogenität zu achten, sodass mögliche falsch positive oder falsch negative Ergebnisse verhindert werden können.

Aufgrund dieser Ergebnisse sind weitere, umfassende Untersuchungen an MET und möglicherweise auch anderer RTKs gerechtfertigt, um die Evaluierung mutmaßlicher prädiktiver Biomarker noch näher eingrenzen zu können.

5 Zusammenfassung

Das Magenkarzinom stellt weltweit eine der häufigsten krebsbedingten Todesursachen dar. Aufgrund der meist erst sehr spät gestellten Diagnose wird dem Magenkarzinom eine außerordentlich schlechte Prognose zugeschrieben. So kommt der Identifikation neuer diagnostischer und therapeutischer Zielstrukturen eine große Bedeutung zu. Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapieoptionen repräsentieren Rezeptor-Tyrosin-Kinasen eine vielversprechende Gruppe. In der vorliegenden Arbeit sollte das Expressions- und Amplifikationsverhalten von MET im Magenkarzinom validiert sowie ein mutmaßlich neuer prädiktiver Biomarker entwickelt werden.

Im Rahmen der Validierung wurde eine Kohorte von insgesamt 470 Patienten mit Magenkarzinom zunächst mittels Immunhistochemie unter Verwendung des Histo-Scores untersucht, wobei sich ein eindeutig heterogenes Expressionsmuster zeigte. Die im Anschluss daran erfolgte chromogene in situ-Hybridisierung von 55 Fällen ($n = 55$), welche in der IHC entweder mit MET-IHC 2+ und/oder MET-IHC 3+ bewertet wurden, bestätigten dieses Muster. So auch die jeweils zugehörigen Lymphknotenmetastasen. Zusammenfassend zeigten 5,3 % der gesamten Magenkarzinom-Kohorte eine *MET*-Amplifikation (25 von 470 Fällen). Die Korrelation des prozentualen Bereichs der *MET*-amplifizierten Tumorzellen und der Intensität der MET-Immunfärbung mit dem Überleben der Patienten mittels mikroskopischem Gewebescanner kam zu dem Ergebnis, dass unabhängig von der *MET*-amplifizierten Tumorphäche jede *MET*-Amplifikation und MET-IHC 3+ ohne Amplifikation prognostisch deutlich ungünstiger ist. Der Prozentsatz der MET-amplifizierten Tumorphäche reichte dabei von 0,4 % bis 100,0 %. Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte das in der Vergangenheit für MET verwendete HER2-Scoring mit einer ≥ 10 % Cutoff-Regel verworfen werden.

Das hier herausgearbeitete Scoring-System ließe sich nun auf prospektive Therapiestudien anwenden. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass MET-positive Tumoren eine sehr schlechte Prognose haben und bereits sehr frühzeitig getestet und in Therapiestudien eingeschlossen werden müssten.

6 Literaturverzeichnis

1. Nagini, S., *Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention*. World J Gastrointest Oncol, 2012. **4**(7): p. 156-69.
2. Ang, T.L. and K.M. Fock, *Clinical epidemiology of gastric cancer*. Singapore Med J, 2014. **55**(12): p. 621-8.
3. Crew, K.D. and A.I. Neugut, *Epidemiology of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(3): p. 354-62.
4. Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, C. et al *Krebs in Deutschland 2011/2012. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 10 ed. 2015, Berlin: Robert Koch-Institut.
5. Carl-McGrath, S.E., M., Röcken, C., *Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis*. . Cancer therapy, 2007. **5**: p. 1-17.
6. Zhang, X.Y., P.Y. Zhang, and M.A. Aboul-Soud, *From inflammation to gastric cancer: Role of Helicobacter pylori*. Oncol Lett, 2017. **13**(2): p. 543-548.
7. Vanags, A., et al., *The first evidence of hereditary and familial gastric cancer in Latvia: implications for prevention*. Medicina (Kaunas), 2012. **48**(6): p. 317-23.
8. Hu, B., et al., *Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology*. J Gastrointest Oncol, 2012. **3**(3): p. 251-61.
9. Ma, J., et al., *Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer*. Oncol Lett, 2016. **11**(5): p. 2959-2964.
10. Röcken, C., *Schwerpunkt: Tumore und Tumorstufen des Magens*. 2017, Pathologie 2017: Springer 75-86.
11. Rocken, C. and V. Warneke, *[Molecular pathology of gastric cancer]*. Pathologie, 2012. **33 Suppl 2**: p. 235-40.
12. Correa, P. and M.B. Piazuelo, *The gastric precancerous cascade*. J Dig Dis, 2012. **13**(1): p. 2-9.
13. Ming, S.C., *Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: A critical review*. Gastric Cancer, 1998. **1**(1): p. 31-50.
14. Wittekind, C., *Union for International Cancer Control (UICC) TNM Klassifikation maligner Tumoren*, ed. 8. 2017: Wiley-VCH.
15. Wittekind, C. and A. Tannapfel, *The current TNM system for gastrointestinal tumors part I, 7th edition*. Pathologie, 2010. **31**(5): p. 344-7.

16. Drebber, U., et al., *The overexpression of c-met as a prognostic indicator for gastric carcinoma compared to p53 and p21 nuclear accumulation*. *Oncol Rep*, 2008. **19**(6): p. 1477-83.
17. Jain, V.K., D. Cunningham, and S. Rao, *Chemotherapy for operable gastric cancer: current perspectives*. *Indian J Surg Oncol*, 2011. **2**(4): p. 334-42.
18. Yang, Y., et al., *Perioperative chemotherapy more of a benefit for overall survival than adjuvant chemotherapy for operable gastric cancer: an updated Meta-analysis*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 12850.
19. Cunningham, D., et al., *Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(1): p. 11-20.
20. Mayr, M., et al., *Phase I study of imatinib, cisplatin and 5-fluoruracil or capecitabine in advanced esophageal and gastric adenocarcinoma*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 587.
21. Morishita, A., J. Gong, and T. Masaki, *Targeting receptor tyrosine kinases in gastric cancer*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(16): p. 4536-45.
22. Regad, T., *Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2015. **7**(3): p. 1758-84.
23. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. *Cell*, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
24. Bang, Y.J., et al., *Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial*. *Lancet*, 2010. **376**(9742): p. 687-97.
25. Nagatsuma, A.K., et al., *Expression profiles of HER2, EGFR, MET and FGFR2 in a large cohort of patients with gastric adenocarcinoma*. *Gastric Cancer*, 2015. **18**(2): p. 227-38.
26. Liu, Y.J., et al., *HER2, MET and FGFR2 oncogenic driver alterations define distinct molecular segments for targeted therapies in gastric carcinoma*. *Br J Cancer*, 2014. **110**(5): p. 1169-78.
27. Sierra, J.R. and M.S. Tsao, *c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer*. *Ther Adv Med Oncol*, 2011. **3**(1 Suppl): p. S21-35.
28. Appleman, L.J., *MET signaling pathway: a rational target for cancer therapy*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(36): p. 4837-8.
29. Graveel, C.R., D. Tolbert, and G.F. Vande Woude, *MET: a critical player in tumorigenesis and therapeutic target*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(7).
30. Lee, K.E., et al., *Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer*. *Jpn J Clin Oncol*, 2003. **33**(4): p. 173-9.

31. Graziano, F., et al., *Genetic activation of the MET pathway and prognosis of patients with high-risk, radically resected gastric cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(36): p. 4789-95.
32. Nakajima, M., et al., *The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas*. Cancer, 1999. **85**(9): p. 1894-902.
33. Tsugawa, K., et al., *Amplification of the c-met, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor gene in human gastric cancers: correlation to clinical features*. Oncology, 1998. **55**(5): p. 475-81.
34. Lennerz, J.K., et al., *MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophagogastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib*. J Clin Oncol, 2011. **29**(36): p. 4803-10.
35. Schmidt, L., et al., *Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas*. Nat Genet, 1997. **16**(1): p. 68-73.
36. Huang, T.J., et al., *Overexpression of the c-met protooncogene in human gastric carcinoma--correlation to clinical features*. Acta Oncol, 2001. **40**(5): p. 638-43.
37. Amemiya, H., et al., *c-Met expression in gastric cancer with liver metastasis*. Oncology, 2002. **63**(3): p. 286-96.
38. Hack, S.P., J.M. Bruey, and H. Koeppen, *HGF/MET-directed therapeutics in gastroesophageal cancer: a review of clinical and biomarker development*. Oncotarget, 2014. **5**(10): p. 2866-80.
39. Jardim, D.L., et al., *MET aberrations and c-MET inhibitors in patients with gastric and esophageal cancers in a phase I unit*. Oncotarget, 2014. **5**(7): p. 1837-45.
40. Kang, Y.K., et al., *A phase II trial of a selective c-Met inhibitor tivantinib (ARQ 197) monotherapy as a second- or third-line therapy in the patients with metastatic gastric cancer*. Invest New Drugs, 2014. **32**(2): p. 355-61.
41. Shah, M.A., et al., *Phase II study evaluating 2 dosing schedules of oral foretinib (GSK1363089), cMET/VEGFR2 inhibitor, in patients with metastatic gastric cancer*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e54014.
42. Teng, L. and J. Lu, *cMET as a potential therapeutic target in gastric cancer (Review)*. Int J Mol Med, 2013. **32**(6): p. 1247-54.
43. T., L., *The two histologic main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma adenocarcinoma*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. , 1965. **64**: p. 31-49.

44. Namikawa, T. and K. Hanazaki, *Mucin phenotype of gastric cancer and clinicopathology of gastric-type differentiated adenocarcinoma*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(37): p. 4634-9.
45. Warneke, V.S., et al., *Her2/neu testing in gastric cancer: evaluating the risk of sampling errors*. Ann Oncol, 2013. **24**(3): p. 725-33.
46. McCarty, K.S., Jr., et al., *Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies*. Arch Pathol Lab Med, 1985. **109**(8): p. 716-21.
47. Behrens, H.M., et al., *Reproducibility of Her2/neu scoring in gastric cancer and assessment of the 10% cut-off rule*. Cancer Med, 2015. **4**(2): p. 235-44.
48. Metzger, M.L., et al., *MET in gastric cancer--discarding a 10% cutoff rule*. Histopathology, 2016. **68**(2): p. 241-53.
49. Betts, G., et al., *FGFR2, HER2 and cMet in gastric adenocarcinoma: detection, prognostic significance and assessment of downstream pathway activation*. Virchows Arch, 2014. **464**(2): p. 145-56.
50. Fuse, N., et al., *Prognostic impact of HER2, EGFR, and c-MET status on overall survival of advanced gastric cancer patients*. Gastric Cancer, 2016. **19**(1): p. 183-91.
51. Guo, T., et al., *Expression of MACC1 and c-Met in human gastric cancer and its clinical significance*. Cancer Cell Int, 2013. **13**(1): p. 121.
52. Ha, S.Y., et al., *HER2-positive gastric cancer with concomitant MET and/or EGFR overexpression: a distinct subset of patients for dual inhibition therapy*. Int J Cancer, 2015. **136**(7): p. 1629-35.
53. Ha, S.Y., et al., *MET overexpression assessed by new interpretation method predicts gene amplification and poor survival in advanced gastric carcinomas*. Mod Pathol, 2013. **26**(12): p. 1632-41.
54. Kubicka, S., et al., *p53 mutation pattern and expression of c-erbB2 and c-met in gastric cancer: relation to histological subtypes, Helicobacter pylori infection, and prognosis*. Dig Dis Sci, 2002. **47**(1): p. 114-21.
55. Kurokawa, Y., et al., *Prognostic impact of major receptor tyrosine kinase expression in gastric cancer*. Ann Surg Oncol, 2014. **21 Suppl 4**: p. S584-90.
56. Lee, H.E., et al., *MET in gastric carcinomas: comparison between protein expression and gene copy number and impact on clinical outcome*. Br J Cancer, 2012. **107**(2): p. 325-33.
57. Li, Y., et al., *Abnormal expression of E-cadherin in tumor cells is associated with poor prognosis of gastric carcinoma*. J Surg Oncol, 2012. **106**(3): p. 304-10.

58. Toiyama, Y., et al., *Co-expression of hepatocyte growth factor and c-Met predicts peritoneal dissemination established by autocrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling in gastric cancer*. *Int J Cancer*, 2012. **130**(12): p. 2912-21.
59. Wu, J.G., et al., *Expressions and clinical significances of c-MET, p-MET and E2f-1 in human gastric carcinoma*. *BMC Res Notes*, 2014. **7**: p. 6.
60. Lee, J., et al., *Impact of MET amplification on gastric cancer: possible roles as a novel prognostic marker and a potential therapeutic target*. *Oncol Rep*, 2011. **25**(6): p. 1517-24.
61. Catenacci, D.V., et al., *RON (MST1R) is a novel prognostic marker and therapeutic target for gastroesophageal adenocarcinoma*. *Cancer Biol Ther*, 2011. **12**(1): p. 9-46.
62. Deng, N., et al., *A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets*. *Gut*, 2012. **61**(5): p. 673-84.
63. Shah, M.A., et al., *Effect of Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin With or Without Onartuzumab in HER2-Negative, MET-Positive Gastroesophageal Adenocarcinoma: The METGastric Randomized Clinical Trial*. *JAMA Oncol*, 2017. **3**(5): p. 620-627.
64. Choi, J., et al., *Evaluation of Intratumoral and Intertumoral Heterogeneity of MET Protein Expression in Gastric Cancer*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2017.
65. Watson, S., et al., *Combined HER2 analysis of biopsies and surgical specimens to optimize detection of trastuzumab-eligible patients in eso-gastric adenocarcinoma: a GERCOR study*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(12): p. 3035-9.
66. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. *Nature*, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
67. Wang, K., et al., *Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer*. *Nat Genet*, 2014. **46**(6): p. 573-82.
68. Warneke, V.S., et al., *Prognostic and putative predictive biomarkers of gastric cancer for personalized medicine*. *Diagn Mol Pathol*, 2013. **22**(3): p. 127-37.

7 Anhang

7.1 Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Prof. Dr. Christoph Röcken
Institut für Pathologie
Arnold-Heller-Straße 3, Haus 14
24105 Kiel

EINGEGANGEN
01. Nov. 2010

Schwanenweg 20
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-18 31

Datum: 22.10.2010

AZ.: D 453/10 (bitte stets angeben)

Studienplan: **Prädiktive Biomarker des Magenkarzinoms**
Anschreiben mit Studienplan

Antragsteller: **Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie, UKSH,
Campus Kiel**

Datum des Antrages: **29.09.2010 (Eingang 01.10.2010)**

Sehr geehrter Herr Kollege Röcken,

vielen Dank für Ihren obengenannten Antrag. Nach Durchsicht des Antrages durch die Geschäftsstelle und durch mich als stellvertretenden Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch
Stellv. Vorsitzender der Ethik-Kommission

Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

8 Publikation

28.05.2015 Artikel: MET in gastric cancer – discarding a 10 % cutoff rule

Marie-Luise Metzger, Hans-Michael Behrens, Christine Boeger, Jochen Haag, Sandra Kruüger & Christoph Röcken, Department of Pathology, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht. Ich versichere, dass ich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mich in einem entsprechenden Verfahren befinde. Ich versichere, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. Ich bin damit einverstanden, dass meine Promotionsarbeit in der Bibliothek der Christian-Albrechts-Universität ausgestellt wird.

Datum, Ort

Unterschrift

10 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Christoph Röcken, Direktor und Leiter des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Professor Röcken stellte mir das Thema dieser Arbeit zur Verfügung und ermöglichte mir darüber hinaus hervorragende Arbeitsbedingungen in den Räumlichkeiten der Pathologie. Seine engagierte professionelle Betreuung haben mich sowohl während der methodischen als auch der wissenschaftlichen Phase dieser Arbeit stets begleitet.

Für Rat und Tat im Labor, insbesondere bezüglich der Themenkomplexe Immunhistochemie und Chromogen in situ-Hybridisierung, möchte ich Frau Sandra Krüger und Herrn Dr. rer. nat. Jochen Haag herzlich danken. Beide waren mir sowohl während der Färbevorgänge, als auch bei der schriftlich-theoretischen Arbeit eine große Hilfe. Ferner danke ich Herrn Dipl.-Phys. Hans-Michael Behrens für die Unterstützung der statistischen Arbeit sowie Frau Dr. Christine Böger für die wissenschaftliche Zusammenarbeit.

An dieser Stelle will ich mich ganz besonders bei allen denjenigen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben:

Ein ganz besonderer Dank gilt dabei meinen Eltern, Frau Dr. med. vet. Ursula Wilgenbus und Herrn Dr. med. vet. Dietrich Metzger, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mich stets begleiteten. So standen sie mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu liebevoll und unterstützend zur Seite.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinem Partner Gianluca Rizzi sowie meinen Freunden Herrn Dr. Christian Ohm und Frau Francisca Diehl von ganzem Herzen bedanken. Sie alle waren mir während der gesamten Zeit, in der ich mich mit der vorliegenden Arbeit beschäftigt habe, eine große moralische und fachliche Stütze.