

Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle-Bahat)

**C-MET BEIM MAMMAKARZINOM:
Expression von c-met und HER2/neu im duktalem Carcinoma in situ der
Brust
und
Etablierung einer Doppelfärbungsmethode zur Phänotypisierung
Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark**

Kristina Y. K. Lindemann

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.**

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

- 1. apl. Prof. Dr. N. Harbeck**
- 2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend**

**Die Dissertation wurde am 07.09.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.03.2007 angenommen.**

Meinem Großvater

Justus Heinrich

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 Der Rezeptor c-met	1
1.2. Der Ligand HGF/SF	2
1.3. Funktionen von c-met und HGF/SF	3
1.4. Expression von c-met in Mammatumoren	5
1.4.1 C-met in invasiven Mammatumoren	5
1.4.2 Das duktales Carcinoma in situ (DCIS)	7
1.4.3 C-met und HER2/neu als Beispiele für Tyrosinkinase	9
1.5 Minimale residuale Krebserkrankung	10
1.5.1 Pathologie disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	10
1.5.2 Diagnostik und prognostische Relevanz	14
1.5.3 Phänotypisierung	16
2. ZIELSETZUNG	17
3. MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Patientinnenkollektiv	18
3.2 Material	18
3.2.1 Firmen und Reagenzien	18
3.2.2 Auswertung	19
3.2.3 Puffer und Lösungen	20
3.2.4 Antikörper und Substanzen mit Fluorophoren	20
3.2.5 Zelllinien	21
3.2.6 Zellkultur	21
3.2.7 Zellkultivierung	21
3.3 Methoden	22
3.3.1 Gewinnung und Präparation von Knochenmark	22
3.3.2 Immunhistochemie	23
3.3.3 Färbungen an Gewebeschnitten	24
3.3.4 Färbungen an Einzelzellen	25
3.3.5 Immunfluoreszenz	26
3.3.6 Färbungen an Gewebeschnitten	27
3.3.7 Färbungen an Einzelzellen	27
3.4 Auswertung	30
3.4.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	30
3.4.2 Auswertung der immunfluoreszenten Färbungen	30
3.4.3 Statistische Auswertung	31
4. ERGEBNISSE	32
4.1 Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark	32
4.1.1 Zytokeratin (CK) Färbung im Mischungsexperiment	32

4.1.2 Immunhistochemische c-met-Färbung an Einzelzellen	33
4.1.3 Doppelfärbung auf CK und c-met an MCF-7-Zellen und Knochenmark	36
4.1.4 Methodische Veränderungen	37
4.2 Expression von c-met und HER2/neu im duktalem Carcinoma in situ	38
4.2.1 Verteilung von c-met, HGF/SF und HER2/neu im DCIS	38
4.2.2 Expression von c-met, HGF/SF und HER2/neu im DCIS: Vergleich zweier unabhängiger Methoden	40
4.2.3 Überexpression von c-met, HGF/SF, HER2/neu und andere histopathologische Befunde	42
5. DISKUSSION	44
5.1 Etablierung einer Doppelfärbetechnik	44
5.1.1 Etablierung neuer Techniken zum Nachweis disseminierter Tumorzellen	44
5.1.2 C-met und Zelladhäsion	46
5.2 Untersuchung von c-met, HGF/SF und HER2/neu im duktalem Carcinoma in situ der Brust	49
5.2.1 Vergleichbarkeit zweier Methoden: Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	49
5.2.2 C-met, HGF/SF und HER2/neu im duktalem Carcinoma in situ	52
6. ZUSAMMENFASSUNG	58
7. LITERATURVERZEICHNIS	60
8. DANKSAGUNG	73
9. LEBENS LAUF	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre Desoxiribonukleinsäure
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CK	Zytokeratin
CLSM	Konfokales Laser Scan Mikroskop
DAB	Diaminopeptidase
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DDFS	distant disease free survival
DFS	disease free survival
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	Epitheliales Membran antigen
h	Stunde
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte growth factor
HPV	Humanes Papillomavirus
HTLV-II	Humanes T-Zelllymphozytenvirus II
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDA	kilo Dalton
KS	Kaposi Sarkom
mab	Monoclonaler Antikörper
MACS	Magnetic activated cell sorting
MAPK	Ras-Raf-mitogen-activated protein kinase
min	Minute
mRNA	messanger Ribonukleinsäure
OS	overall survival
PFA	Paraformaldehyd
PCR	polymerase chain reaction
PI-3 Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase

RT-PCR	real time- PCR
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute - Medium
s	Sekunde
SF	scatter factor
STAT	signal transducer and activator of transcription
TNFalpha	Tumornekrosefaktor alpha
uPA	urokinase-type plasminogen activator
uPAR	uPA Rezeptor
VN	Van Nuys

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Schematische Darstellung des c-met-Rezeptors	1
Abb. 1.2	Invasives Wachstum unter physiologischen und pathologischen Bedingungen	13
Abb. 3.1	Schematische Darstellung der immunfluoreszenten Doppelfärbung	26
Abb. 3.2	Definition der regions of interest im Transmissionsbild	31
Abb. 4.1	Immunhistochemische Färbung für Zytokeratin an MCF-7/KM-Zytospins	33
Abb. 4.2	C-met-Färbung der Zelllinie S 114	35
Abb. 4.3	Immunhistochemische Färbung von c-met auf MCF-7/KM-Zytospins	35
Abb. 4.4	Immunfluoreszente Doppelfärbung für c-met und Zytokeratin an MCF-7/KM-Zytospins	36
Abb. 4.5	Immunfluoreszente Färbung von c-met an MCF-7/KM-Zytospins	36
Abb. 4.6	HER2/neu-Expression im DCIS	41
Abb. 4.7	HGF/SF-Färbung im DCIS	42
Abb. 4.8	C-met-Expression im Tumor- und Normalgewebe	43

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1	Pathologische Einteilungen des duktales Carcinoma in situ	8
Tabelle 1.2	Nachweis disseminierter Tumorzellen in soliden Tumoren und deren prognostische Bedeutung	12
Tabelle 1.3	Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen für die prognostische Relevanz CK-positiver Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom	15
Tabelle 3.1	Protokoll der Färbungen an der Frauenklinik der Technischen Universität München	28
Tabelle 3.2	Protokoll der Färbungen am Van Andel Research Institute, Grand Rapids, Michigan (USA)	29
Tabelle 4.1	Ergebnisse der c-met-Färbung an verschiedenen Zelllinien	34
Tabelle 4.2	Verteilung histomorphologischer, klinischer und tumorbiologischer Faktoren bei Patientinnen mit duktales Carcinoma in situ	39
Tabelle 4.3	C-met-Expression im Tumorgewebe im Verhältnis zur Expression im Normalgewebe. Ergebnisse der immunhistochemischen und immunfluoreszenten Methode im Vergleich	41

1. EINLEITUNG

1.1 Der Rezeptor c-met

C-met gehört zur Familie der Tyrosinkinase und ist das Produkt des aktivierten Onkogens *tpv-met*. Der Rezeptor ist für die Transformation normaler Fibroblastenzelllinien verantwortlich (Cooper et al., 1984) und wird als glykosyliertes 170 kDa Vorläuferprotein synthetisiert. Nach proteolytischer Spaltung resultiert ein über Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer aus einer alpha (50 kDa) und einer beta (145 kDa) Untereinheit. Die alpha-Kette ist auf der Zelloberfläche exponiert, während die beta-Kette transmembran von extra- nach intrazellulär ins Zytoplasma reicht.

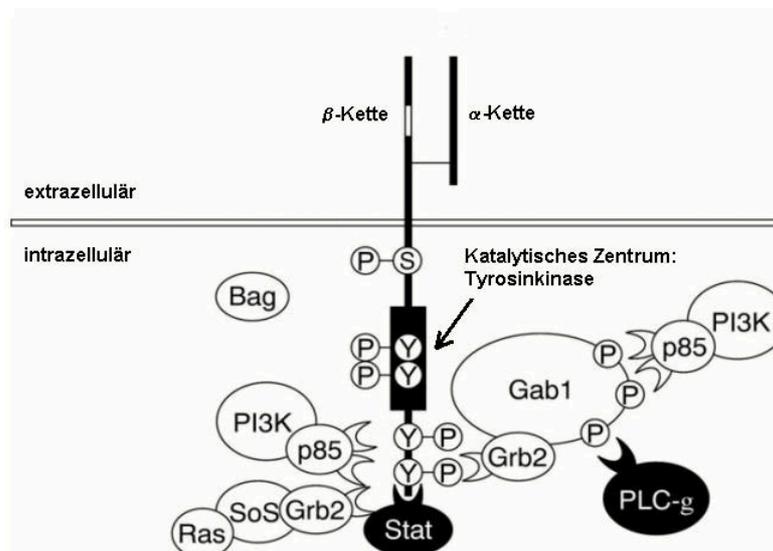


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des c-met-Rezeptors

Die alpha-Kette ist ein extrazelluläres Glykoprotein. Die transmembranäre Untereinheit wird von der beta-Kette gebildet. Zwei phosphorylierte Tyrosinreste sind für die positive Regulation im katalytischen Zentrum verantwortlich. Adapterproteine und Signaltransduktoren werden von verschiedenen Untereinheiten reguliert. Modifiziert nach Trusolino et al., 1998.

C-met wird vor allem auf epithelialen Zellen in unterschiedlichen Geweben exprimiert. In Leber, Magen, Ösophagus, Ovar und Endometrium konnte c-met nachgewiesen werden (Prat et al., 1991). Aber auch andere Zellen wie Melanozyten, endotheliale Zellen, Neurone und Gliazellen exprimieren diesen Rezeptor (Zarnegar et al., 1995). Während für zwei andere Rezeptoren der Tyrosinkinase-Familie, c-sea und Ron, die entsprechenden Liganden noch nicht identifiziert werden konnten, ist der Ligand für den c-met-Rezeptor der Hepatocyte Growth Factor (HGF) oder Scatter Factor (SF) (Naldini et al., 1991a und b).

Die Bindung des Liganden HGF/SF an die extrazelluläre Domäne von c-met führt zur Dimerisierung zweier Rezeptormonomere. Die dadurch ausgelöste Konformationsänderung aktiviert die Tyrosinkinase c-met durch Autophosphorylierung. Das Signal wird dann über eine Kaskade von Adapterproteinen, GTPasen und Enzymen in den Zellkern geleitet. Die Signaltransduktion erfolgt über die Bindung von Phospholipasen an den aktivierten Rezeptor durch zytoplasmatische Signalproteine. Letztere erkennen mit ihrer src-homologen Region 2 (SH2) spezifisch eine Sequenz am Carboxyende des Rezeptors (Koch et al., 1991). Diese tyrosinphosphorylierten Regionen schließen direkt an drei Aminosäuren an und enthalten so genannte YV(H/N)V Motive (Ponzetto et al., 1994). Die Bindung von Signalproteinen an diese Untereinheit stellt möglicherweise eine Variable dar, die von der Bindungsaffinität der jeweiligen SH2-Domäne, der lokalen Konzentration der Signalmoleküle und dem Grad der c-met-Phosphorylierung abhängig ist (Rosen et al., 1994a).

1.2 Der Ligand: HGF/SF

SF wurde als ein von Mesenchymzellen gebildetes Zytokin identifiziert, das zusammenhängende Kolonien epithelialer Zellen in individuelle Zellen aufsprengt und trennt (Stoker et al., 1985). Hepatocyte Growth Factor galt als Mitogen für adulte Hepatozyten (Miyazawa et al., 1989; Nakamura et al., 1989). Erst später fand man heraus, dass SF und HGF identisch sind (Weidner et al., 1991).

SF ist ein Heparin-bindendes Glykoprotein, bestehend aus einer alpha- (60kDa) und einer beta-Kette (30kDa). Beide sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden (Gherardi et al., 1989; Ronsin et al., 1993). Die alpha-Kette besteht aus einer Haarnadel-Schleife (ca. 27 Aminosäuren) und aus vier Kringle-Domänen. Diese vermitteln Protein/Protein- und Protein/Zell-Wechselwirkungen. Obwohl SF zu 38% dieselbe Sequenz wie das Proenzym Plasminogen aufweist, fehlt ihm die Proteaseaktivität. Ursächlich dafür sind zwei substituierte Aminosäuren im katalytischen Zentrum der beta-Kette (Nakamura et al., 1989).

Trotzdem sind die Aktivierungsstellen von proHGF/SF dieselben wie bei Plasminogen, was erklärt, warum uPA (urokinase-type plasminogen activator, Urokinase) beide spalten kann (Naldini et al., 1991b). Ein anderer SF-Aktivator ist eine Serinprotease, dem Gerinnungsfaktor XII verwandt (Miyazawa et al., 1993). Diese spielt vor allem nach Gewebsverletzungen eine wichtige Rolle. SF wird ähnlich wie sein Rezeptor als Vorläuferprotein synthetisiert. Dieses präproSF besteht aus 728 Aminosäuren und wird

intrazellulär zur Einzelkettenform, proSF, gespalten. Die aktive Form, bestehend aus zwei Ketten, geht daraus nach extrazellulärer Spaltung bei ⁴⁹⁴arg-⁴⁹⁵val hervor.

1.3 Funktionen von c-met und HGF/SF

HGF-mRNA findet man in Stromazellen wie Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Mastzellen, Makrophagen, Leukozyten und Megakaryozyten, aber nicht in epithelialen Zellen. Der dazugehörige Rezeptor c-met dagegen wird vor allem auf Epithelzellen exprimiert. Zusammen mit den mitogenen, morphogenen und motogenen Eigenschaften von HGF/SF macht dieses Expressionsmuster deutlich, wie wichtig das Zusammenspiel beider für die Wechselwirkungen zwischen epithelialen und stromalen Abschnitten eines Gewebes ist. Auf parakrinem und autokrinem Wege wirken c-met und HGF/SF auf Entwicklung und Homöostase dieser Gewebe ein, die bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen eine Rolle spielen:

Embryogenese. Vor allem in der frühen embryonalen Entwicklung kommt es zu wechselseitiger Umwandlung von mesenchymalem in epitheliales Gewebe (Rosen et al., 1994a). In der sich entwickelnden Niere werden HGF/SF und sein Rezeptor c-met vor allem zu dem Zeitpunkt exprimiert, wenn Tubulogenese und sich verzweigende Strukturen ihren Anfang nehmen (Santos et al., 1994). 3T3-Mausfibroblasten, die mit HGF/SF und c-met cDNA transfiziert wurden, formen gangartige Strukturen, exprimieren Zytokeratin und verfügen über interzelluläre Kontakte, die denen der Desmosomen ähnlich sind (Tsarfaty et al., 1994). *In vivo* sind Ligand und Rezeptor für die Entwicklung des Nervensystems (Streit et al., 1995), des Muskel- (Bladt et al., 1995), des Brustdrüsen- (Yang et al., 1995) und des Lebergewebes (Schmidt et al., 1995) unabdinglich.

Regeneration von Organen. HGF/SF gilt als wichtiger Baustein bei der Regeneration von Leber- und Nierengewebe (Matsumoto et al., 1993). Nach einer ²/₃-Resektion der Leber findet man 15- bis 25-fache Erhöhungen des HGF-Spiegels im Plasma (Zarnegar et al., 1995). Nicht nur die Hepatozyten alleine sind für diesen Anstieg verantwortlich, sondern auch die Freisetzung von HGF/SF aus der extrazellulären Matrix, sowie die gesteigerte Produktion in anderen Organen (Lunge, Niere, Milz). Neben einem direkt proliferativen Effekt auf das verletzte Gewebe sind inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNFalpha außerdem in der Lage, in Epithel- und Stromazellen mRNA für HGF/SF und c-met zu induzieren (Rosen et al., 1994b; Seslar et al., 1993).

Angiogenese. Sowohl bei der Embryogenese als auch bei der Regeneration von Organen ist HGF/SF als wichtiger Auslöser der Angiogenese entscheidend (Bussolino et al., 1992;

Rosen et al., 1993). Auch in der Genese des Kaposi-Sarkoms (KS), einer Zytokin-abhängigen Neoplasie, die sich vor allem durch ein hohe Maß an Neovaskularisation auszeichnet, wird eine Beteiligung dieses Faktors diskutiert (Naidu et al., 1994). HGF/SF wird von mit HTLV-II infizierten T-Lymphozyten sezerniert und findet sich in Läsionen vom Kaposi-Typ. Außerdem lässt sich das Wachstum von KS-Zellen in Kultur mit einem Antikörper gegen HGF/SF hemmen.

Neoplasie. Nicht nur bei diesen physiologischen zellulären Prozessen, sondern auch in der Entstehung von Tumoren spielt die HGF/SF-c-met Signalkaskade eine wichtige Rolle. C-met wurde ursprünglich als Produkt des humanen Onkogens tpr-met gefunden (Bottaro et al., 1991). Tpr-met kodiert für ein mutiertes c-met-Protein, das im Zytoplasma vorliegt, konstitutive, ligandenunabhängige Tyrosinkinaseaktivität besitzt und Zellen transformieren kann. HGF/SF bewirkt die Wachstumsstimulation und den Differenzierungsverlust verschiedener Zelltypen und stimuliert die Motilität, Invasivität und Angiogenese von Tumorzellen (Stoker et al., 1987; Rosen et al., 1990; Rosen et al., 1991; Rosen et al., 1994c). Mit Hilfe von transfizierten 3T3-Mausfibroblasten konnte gezeigt werden, dass auch das Metastasierungspotential von Tumorzellen erhöht wird (Jeffers et al., 1998). Dieses wird zudem auch von anderen Faktoren beeinflusst. In diesem Zusammenhang ist die Expression von uPA und seinem Rezeptor (uPAR) interessant. Die Expression der Protease uPA wird von HGF/SF-c-met induziert (Jeffers et al., 1996b). Über uPA kommt es zur Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin, was für proteolytische Eigenschaften auf der Zelloberfläche sorgt. Plasmin kann nicht nur direkt, sondern auch über die Aktivierung von Metalloproteasen die extrazelluläre Matrix vermindern. Der Abbau extrazellulärer Matrix mit anschließender Migration der Zellen durch die Basalmembran stellt den entscheidenden Schritt zum invasiven/metastasierenden Phänotyp dar. Eine weitere Wirkung von HGF/SF ist in der Auflösung der interzellulären Verbindungen zwischen epithelialen Zellen zu sehen. Dies konnte *in vitro* nachgewiesen werden (Stoker et al., 1985) und könnte auch bei der Disseminierung von Tumorzellen eine Rolle spielen.

Einzelne Bausteine der c-met-HGF/SF-Signalkaskade wie p85/PI-3-Kinase, Ras, Grb2, Sos1, MAP-Kinase konnten bereits identifiziert werden und dienen möglicherweise als Modulatoren der unterschiedlichen Funktionen (Ried et al., 1999).

1.4 Expression von c-met in Mammatumoren

1.4.1 C-met in invasiven Mammatumoren

Etwa 20% aller primär nodal-negativen Patienten mit Brustkrebs versterben dennoch an einer finalen Metastasierung des Karzinoms (Fisher et al., 1993). Die Suche nach neuen prognostischen Faktoren ist mit dem Wunsch verbunden, diejenigen Patienten identifizieren zu können, die ein erhöhtes Risiko für eine Progredienz der Erkrankung haben. Histologische Kriterien wie Tumorgröße, Nekrosen oder Ploidität in Ergänzung zu einem umfassenden Staging des Tumors wurden auf ihre prognostische Relevanz überprüft. Hinzu kommen Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die durch neue Methoden detektiert werden können. Auf diese Weise wurde die endokrine Therapie zu einer effektiven Methode, die Behandlung von Progesteron- und Östrogenrezeptor-positiven Tumoren zu verbessern (Mason et al., 1983). Außerdem entdeckte man Tumor-assoziierte Gene, die mit einem aggressiveren Tumorwachstum verbunden sind.

In diese Gruppe von Rezeptoren gehört HER2/neu, der als Target die gezielte Antikörpertherapie beim Mammakarzinom initiierte (Slamon et al., 2001). Die Detektion und Charakterisierung solcher Gene erlaubt also eine spezifische Therapie, die sich an den individuellen Eigenschaften des Tumors orientiert. Auf der Suche nach weiteren Rezeptoren stieß man auf c-met, den verschiedene Neoplasien wie Tumoren der Prostata (Humphrey et al., 1995), der Schilddrüse (Di Renzo et al., 1995) oder des Magens (Tsugawa et al., 1998) überexprimieren. In der Brustdrüse wird c-met vom normalen duktalem Epithel exprimiert und spielt sowohl während der embryonalen Entwicklung, als auch in der Differenzierung und im funktionellen Umbau eine Rolle (Niranjan et al., 1995).

Neben diesen physiologischen Funktionen konnten c-met und sein Ligand HGF/SF auch in aggressiven Mammakarzinomen nachgewiesen werden (Yao et al., 1996). In der Arbeit von Yamashita et al. war die Expression von HGF/SF mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert (Yamashita et al., 1994), wobei eine hohe HGF/SF-Konzentration sogar eine höhere prognostische Aussagekraft als der Lymphknotenstatus besaß. Dies wurde sowohl für das rezidivfreie Überleben als auch für das Gesamtüberleben gezeigt. Da Zellen auf HGF/SF als Mitogen reagieren, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass c-met als Rezeptor in diesen Prozessen ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. HGF/SF und c-met sind in benignem und malignem Brustgewebe ko-exprimiert (Jin et al., 1997; Tuck et al., 1996). Im Gegensatz zum benignen Gewebe konnte diese Arbeitsgruppe im malignen Gewebe eine Überexpression feststellen. In einem Kollektiv von 91 invasiven Mammakarzinomen hatte c-met als unabhängige prognostische Variable eine der Tumorgröße und dem Lymphknotenstatus

vergleichbare Aussagekraft. Diese war zugleich relevanter als das Alter, das Grading und die histologische Differenzierung (Ghoussoub et al., 1998). Auch bei nodal-negativen Mammakarzinomen spielt c-met eine wichtige prognostische Rolle. Eine hohe c-met-Expression des Tumors korrelierte bei Camp et al. signifikant mit einer kürzeren Überlebenszeit (Camp et al., 1999).

Trotzdem gibt es in Bezug auf die Bedeutung von c-met bei Progression und Aggressivität von Tumoren widersprüchliche Erkenntnisse. Tsarfaty et al. (Tsarfaty et al., 1992) beobachteten die Expression von c-met an T47D-Zellen, die in Suspension gangartige Strukturen bilden, die Milchgängen ähneln. Die Intensität der c-met-Expression war an den direkt die Gänge begrenzenden Strukturen besonders hoch. Daraufhin untersuchte die Gruppe 50 Biopsien aus Mammakarzinomen. Das Gewebe des Tumors zeigte eine deutlich reduzierte c-met Expression im Vergleich zum umgebenden normalen Gewebe. In einer anderen Arbeit zeigten 40% der Mammatumore einen Verlust der Heterozygotie für c-met, was auf c-met als Suppressorgen hinweist (Bieche et al., 1992). Nagy et al. (Nagy et al., 1995) konnten diese Beobachtung nicht bestätigen, fanden aber auch keine Hinweise auf eine prognostisch ungünstige Relevanz von c-met. Auch eine Korrelation von c-met mit günstigen prognostischen Parametern wie niedrigem Grading und positivem Östrogenrezeptor-Status wurde berichtet (Nakaloupoulou et al., 2000).

Da c-met offensichtlich sowohl vom Normalgewebe, als auch vom Tumorgewebe exprimiert wird und die Erkenntnisse bezüglich der klinischen Bedeutung der c-met-Expression widersprüchlich sind, stellt sich die Frage, ob nicht das Verhältnis von c-met im Normalgewebe im Vergleich zu dessen Expression im Tumorgewebe entscheidend dafür ist, wie sich die Expression von c-met auswirkt. Tsarfaty et al. (Tsarfaty et al., 1999) entwickelten vor diesem Hintergrund einen Algorithmus, der die relative Expression von c-met im Vergleich zwischen Normal- und Tumorgewebe beschreibt. Anhand dieses Algorithmus wurden 182 primäre Mammatumore in Gruppen eingeteilt. Überlebensanalysen der 116 nodal-negativen Patientinnen zeigten, dass nicht nur die höhere c-met-Expression im Tumor, sondern auch die niedrigere Expression im Vergleich zum umgebenden Normalgewebe mit einer schlechteren Prognose korrelierte. In der Gruppe aller 182 Patientinnen konnte die prognostische Signifikanz nur für die Gruppe gezeigt werden, in der der Tumor c-met stärker als das umgebende Normalgewebe exprimiert. Analysiert wurde auch der Effekt der c-met-Regulation hinsichtlich verstärkter und verminderter Expression (Firon et al., 2000). Hohe c-met-Expression war mit erhöhter Invasivität und einem aggressiveren Metastasierungsverhalten von Tumoren ausgehend von der Zelllinie DA3

assoziiert. Die Zelllinie stammte von einem wenig differenzierten Adenokarzinom der Mamma. Dass aber auch niedrige c-met-Expression prognostisch ungünstig sein kann (Tsarfaty et al., 1999), erklärte die Gruppe damit, dass zu niedrige c-met-Level möglicherweise eine vollständige Differenzierung in tubuläre Strukturen verhindern. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe an 40 nodal-positiven Mammakarzinom-Patientinnen zeigte, dass c-met-Überexpression mit Aggressivität und Metastasierungspotential des Tumors korreliert (Lengyel et al., 2005). Im Vergleich mit dem Primärtumor stellten wir eine stärkere und häufigere c-met-Expression in den Lymphknotenmetastasen fest. Auf das Überleben hingegen wirkte sich ein hohes Maß an HGF/SF-Expression und niedrigem c-met günstig aus.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Steuerung der Zellfunktionen zwischen Differenzierung und Tubulogenese einerseits und Invasivität und Metastasierung andererseits in Abhängigkeit von der c-met- und HGF/SF-Expression reguliert zu sein scheint.

1.4.2 Das duktales Carcinoma in situ (DCIS)

Epidemiologische Studien der vergangenen Jahre bestätigen eine ansteigende Inzidenz des Mammakarzinoms. In westlichen Industrienationen ist das Mammakarzinom heutzutage die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau (Manual Mammakarzinom, 2001). Jede zehnte Frau muss im Laufe ihres Lebens mit der Entwicklung eines bösartigen Geschwulsts der Mamma rechnen. Bedingt durch die steigende Inzidenz einerseits und den verstärkten Einsatz von Mammographien als Früherkennungsmaßnahme andererseits kommt es auch zu einem Anstieg der frühen intraduktalen Neoplasien der Mamma im Untersuchungsgut des Pathologen. Diese stellen damit bereits bis zu 20% der beim Mammographiescreening entdeckten Tumore dar (Morrow et al., 1995).

Unter einem duktalem Carcinoma in situ (DCIS) der Mamma werden all jene Karzinome zusammengefasst, die in ihrer Ausdehnung streng intraduktal, d.h. auf die Milchgänge begrenzt, wachsen und keine Invasion in das umliegende Stroma zeigen (The World Health Organization, 1982). Entscheidendes Kriterium hierfür ist das Vorhandensein einer intakten Basalmembran des Milchganges. Im Hinblick auf mögliche Konzepte in der Karzinogenese werden vor allem zwei Standpunkte vertreten: Einerseits sind multiple, genetisch und morphologisch unterschiedliche Wege denkbar (Buerger et al., 1999a und b). Auf der anderen Seite steht die schrittweise Tumorprogression zur Diskussion (Tabar et al., 1992), die als Adenom-Karzinom-Sequenz beim Dickdarm-Karzinom etabliert ist. Im Falle des Mammakarzinoms konnte ein zytogenetisches Modell für diese schrittweise Tumorentwicklung bislang nicht etabliert werden.

Die Diagnose „intraduktales Carcinoma“ ist deshalb von entscheidender Relevanz für das weitere therapeutische Vorgehen, da Tumoreale, die nicht sicher chirurgisch entfernt werden, in ein invasives Karzinom übergehen können, das seinerseits die Fähigkeit zur Metastasierung besitzt. Aber auch eine chirurgische Resektion schließt das Auftreten eines invasiven Karzinoms in der Folgezeit nicht aus (Dupont et al., 1994). Neben anderen möglichen Vorläufern wie dem Fibroadenom oder der duktalem Hyperplasie steht somit das duktales Carcinoma in situ dem invasiven Karzinom am nächsten.

Um die DCIS-Patientinnen, die möglicherweise ein höheres Risiko haben, im Laufe der Zeit ein invasives Karzinom zu entwickeln oder an einem intramammären Rezidiv zu erkranken, besser zu charakterisieren, sind verschiedene Modelle entwickelt worden. Diese Klassifikationssysteme basieren auf morphologischen, biologischen, zytogenetischen und klinischen Faktoren und versuchen nicht nur der Heterogenität gerecht zu werden, sondern auch die Reproduzierbarkeit zu steigern und Aspekte der Karzinogenese mit einzubeziehen.

Tabelle 1.1: Pathologische Einteilungen des duktalem Carcinoma in situ

Kriterien	Einteilung	Literatur
architektonisch/ histopathologisch	Comedo, solide, cribriform, mikropapillär, papillär, clinging, gemischt	Rogers L., 1987
Nucleus, Mitoserate, Apoptoserate	High grade, low grade, intermediate grade	Holland et al., 1994
Non-high grade ohne Nekrosen, Non-high grade mit Nekrosen, High grade mit/ohne Nekrosen	VN Gruppe 1, 2, 3	Silverstein et al., 1996

Die DCIS in unserem Kollektiv wurden nach der Van Nuys-Klassifikation bewertet. Diese bewertet vor allem das Kerngrading und das Vorhandensein von Nekrosen. Patienten der Gruppe 1 und 2 haben signifikant seltenere intramammäre Rezidive als Patientinnen der Gruppe 3 (Silverstein et al., 1996). Das Kerngrading und das Vorhandensein von Nekrosen sind also entscheidende Faktoren in der Progression von in situ-Brusttumoren zur invasiven Erkrankung. Ist die Diagnose DCIS mittels Stanzbiopsie gesichert, so stellt sich die Frage der optimalen Therapie. Als Standardtherapie gilt heute die brusterhaltende Therapie, wobei das

Risiko eines intramammären-invasiven und nicht-invasiven Rezidivs durch postoperative Bestrahlung von 31% auf 13% gesenkt werden konnte (Fisher et al., 1999). Bei ungefähr 40 bis 50% aller Lokalrezidive handelt es sich um invasive Karzinome. Dieser hohe Anteil wurde bislang als Argument für die Mastektomie verwendet, da nur so ein Höchstmaß an Sicherheit gewährleistet war. Unter Berücksichtigung der Histopathologie und des Sicherheitsabstandes wird allerdings heute zumeist ein gezielteres Vorgehen angestrebt. Ein besseres Verständnis der Tumorprogression und –biologie könnte dazu beitragen, die therapeutischen Strategien zu verbessern.

Um die Rolle von c-met und HGF/SF in der Evolution und Progression des Mammakarzinoms besser verstehen zu können, bietet sich das duktales Carcinoma in situ als frühe Läsion an. Da sich die meisten Studien auf die Expression und prognostische Bedeutung beim invasiven Karzinom konzentrieren, ist bislang nur sehr wenig über die Rolle von c-met/HGF/SF beim DCIS bekannt. Lediglich Jin et al. (Jin et al., 1997) haben Ligand und Rezeptor in verschiedenen Läsionen von der benignen Hyperplasie bis zum invasiven Karzinom untersucht. Im DCIS war die Färbung für sowohl c-met, als auch für HGF/SF signifikant stärker als in benignen Läsionen. Letztere wiesen im Vergleich zum Normalgewebe keinen Unterschied in der Färbintensität auf. Die Färbung im DCIS war dagegen weniger ausgeprägt als in invasiven Tumoren.

Da c-met also nicht nur bei den physiologischen, sondern vor allem auch bei den pathologischen Prozessen der Brustdrüse wie der Entstehung von Tumoren eine entscheidende Rolle spielt, bieten alle Stufen der Karzinogenese, von präinvasiven Läsionen wie dem duktalem Carcinoma in situ bis zum metastasierenden Karzinom, Einblicke in Regulationsmöglichkeiten und Funktion von c-met und HGF/SF bei diesen Prozessen. Unsere Arbeitsgruppe hat deren Expression bereits an 40 invasiven Mammakarzinomen untersucht (Lengyel et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt auf den Ergebnissen unserer Beobachtungen an 39 DCIS-Patientinnen.

1.4.3 C-met und HER2/neu als Beispiele für Tyrosinkinase

Tyrosinkinase spielen als Regulatorproteine bei Zellwachstum und in der Differenzierung von normalen Zellen eine wichtige Rolle. Weiterhin sind sie als Proto-Onkogene an der Progression und Metastasierung von Krebszellen beteiligt. Aus diesem Grund ist das Interesse an ihnen als therapeutische Zielstruktur besonders groß. Neben c-met wurde ein weiterer Rezeptor der Tyrosinkinase-Familie bereits erwähnt: HER2/neu. HER2/neu wurde zuerst in chemisch induzierten Neuroglioblastomen bei Ratten identifiziert

(Schechter et al., 1984). Außerdem wurde die Überexpression des Gens in Tumoren der Brust (Slamon et al., 1987), der Ovarien (Slamon et al., 1989), des Magens (Park et al., 1989), des Darms und der Speicheldrüsen (Cohen et al., 1989) festgestellt. Mammatumore, die in 20% der Fälle eine Überexpression des Rezeptors zeigen, sind mit einem kürzeren rezidivfreien- und Gesamt-Überleben korreliert (Slamon et al., 1987) Ein erster monoklonaler Antikörper gegen Her2/neu, Trastuzumab, ist bereits in klinischer Anwendung (Slamon et al., 2001).

In Zusammenhang mit der Erkenntnis, dass c-met mit seinem Liganden HGF/SF eine entscheidende Rolle bei Tumorprogression und Invasion spielt, und der Tatsache, dass nur 20 bis 30% der Mammatumore HER2/neu überexprimieren, stellt sich die Frage, ob die Expression der verschiedenen Tyrosinkinase eine Unterteilung der Tumoren möglich macht. Weiterhin ist daran zu denken, dass eine solche Unterteilung ein individuelleres Patientenmanagement ermöglichen würde. In unserer Studie an 40 nodal-positiven Karzinomen der Brust untersuchten wir sowohl die Expression von c-met, als auch von HER2/neu im Primärtumor und im korrespondierenden Lymphknoten. Als erste Studie stellten wir die Hypothese auf, dass HER2/neu und c-met zwei unterschiedliche Patientengruppen charakterisieren. Tatsächlich exprimierten nur die Hälfte aller c-met-positiven Tumore gleichzeitig HER2/neu (Lengyel et al., 2005). Wir bestätigten damit Erkenntnisse bei Patienten mit Magentumoren, wo abhängig von der c-met-Expression und unabhängig von der HER2/neu-Überexpression diejenigen mit einer schlechten Prognose identifiziert werden können (Nakajima et al., 1999).

Ziel dieser Arbeit ist es, diese Zusammenhänge in der Vorstufe des Mammakarzinoms, dem duktalem Carcinoma in situ, zu untersuchen.

1.5 Minimale residuale Krebserkrankung

1.5.1 Pathologie disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Bei mehr als 45% der Frauen, die sich unter kurativen Gesichtspunkten einer Primärtherapie unterzogen haben, tritt in den ersten 5 Jahren nach Therapie ein Rezidiv auf (Diel et al., 1992). Fernrezidive nach erfolgreicher Tumoresektion im Stadium R0 sind nach heutigem Kenntnisstand auf die bereits prä- oder perioperativ erfolgte systemische Disseminierung von Tumorzellen zurückzuführen. Mehrere Studien konnten zeigen, dass bei ca. 35% der Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Primärtherapie mit den konventionellen Untersuchungsmethoden als metastasenfrem gelten, da bereits vereinzelte zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark nachweisbar sind (Harbeck et al., 1994; Landys et al., 1998; Mansi et al., 1999; Braun et al., 2000). Diese einzelnen, disseminierten Tumorzellen sind mittels

immunzytochemischer und molekularer Methoden nachweisbar und werden beim Mammakarzinom, aber auch bei zahlreichen anderen Karzinomen zunehmend als klinisch relevanter Prognosefaktor angesehen (Tab. 1.2). Auch die Sentinel-Lymphknotendiagnostik macht sich die Detektion einzelner Tumorzellen zu Nutze (Kowolik et al., 2000). Dem direkten Nachweis einer minimalen residualen Krebserkrankung kommt vor allem deswegen ein besonders hoher Stellenwert zu, weil sie die Entscheidung für eine systemische adjuvante Therapie nach chirurgischer Resektion des Primärtumors beeinflussen könnte. Da eine generelle adjuvante Therapie v.a. beim frühen Mammakarzinom nicht zu rechtfertigen ist (Funke et al., 1991; McGuire, 1989), gilt es abseits von statistisch gewonnenen Prognoseindices diejenigen Risikopatientinnen zu identifizieren, die von einer adjuvanten systemischen Therapie profitieren würden.

Tabelle 1.2: Nachweis disseminierter Tumorzellen in soliden Tumoren und deren prognostische Bedeutung

Tumor	Publikation	Anzahl Patienten	Detektionsrate	Marker	Methode	Prognostischer Wert
Ovar	Braun et al., 2001	108	30%	CK 8/18/19	ICC	DFS*
	Marth et al., 2002	73	21%	MOC-31	MACS	-
Zervix	Janni et al., 2003	130	29%	CK	ICC	DDFS*
	Scheungraber et al., 2002	24	25%	HPV	PCR	DFS, OS
Colon	Schlimok et al., 1990	156	27%	CK18	ICC	DFS
	Lindemann et al., 1992	88	32%	CK18	ICC	DFS*
	Soeth et al., 1996	57	35%	CK20	RT-PCR	-
	Gunn et al., 1996	15	40%	CK19/20	RT-PCR	-
	Weitz et al., 1999	14	21%	CK20	RT-PCR	-
	Leinung et al., 2000	145	25%	CK	ICC	DFS*, OS*
	Weihrauch et al., 2002	51	65%	CK	MACX	-
	Werther et al., 2002	41	10%	CK	ICC	-
	Magen	Schlimok et al., 1991	97	35%	CK18	ICC
Jauch et al., 1996		180	53%	CK18	ICC	OS, DFS*
Funke et al., 1996		102	44%	CK18	ICC	-
Heiss et al., 2002		156	62%	CK18/ uPA-R	ICC	OS*, DFS*
De Manzoni et al., 2002		114	29%	CK	ICC	-
Oki et al., 2002		47	57%	CK20	RT-PCR	-
Macadam et al., 2003		74	37%	Ber-EP4	ICC	DFS*, OS*
Jonas et al., 2004		26	31%	CEA	ICC	OS
Ösophagus	Thorban et al., 2000	75	39%	CK	ICC	OS*
	Ryan et al., 2004	106	42-67%	CK18	ICC	-
Lunge	Cote et al., 1995	43	40%	CK18	ICC	DFS
	Pantel et al., 1996a	139	60%	CK18	ICC	DFS*
	Passlick, 2002	139	60%	CK18	ICC	DFS, OS*
	Sugio et al., 2002	58	47%	CK18	ICC	OS

*: statistischer Wert als unabhängiger Parameter durch Multivarianzanalyse bestätigt

CEA: carcinoembryonic antigen; CK: cytokeratin; DFS: disease free survival; DDFS: distant disease free survival; HPV: human papillomavirus; ICC: immunocytochemistry; MACS: magnetic-activated cell sorting; OS: overall survival; PCR: polymerase chain reaction; RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction; uPA-R: urokinase-type plasminogen activator receptor

Nach der modifizierten „seed and soil“-Hypothese von Paget (Paget, 1889) beeinflussen folgende Faktoren das Metastasierungsverhalten von Tumoren:

1. Neoplasien sind heterogen und verfügen über Subpopulationen von Zellen mit verschiedenen angiogenen, invasiven und metastatischen Eigenschaften.
2. Nur Tumorzellen, die die Fähigkeit zur Invasion in die extrazelluläre Matrix, zur Einwanderung in Blutgefäße mit anschließender Extravasation und Invasion in ein anderes Gewebe besitzen, überleben die Metastasierungskaskade.
3. Die Wechselwirkungen zwischen metastatischer Zelle und homöostatischen Mechanismen des Wirtsorganismus sind für den Erfolg der Metastasierung entscheidend.

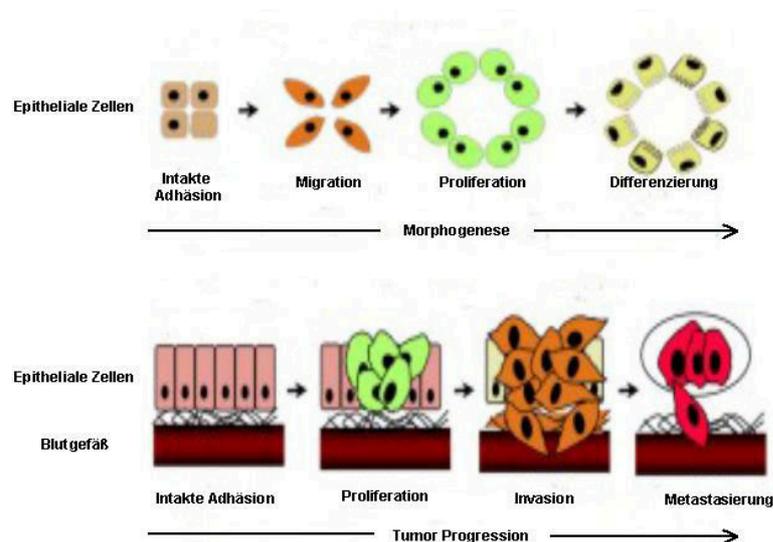


Abbildung 1.2: Invasives Wachstum unter physiologischen und pathologischen Bedingungen
Die biologischen Prozesse des invasiven Wachstums laufen gleichermaßen unter physiologischen und pathologischen Konditionen ab. Lediglich die Endpunkte unterscheiden sich. In der Morphogenese dient invasives Wachstum der Bildung neuer Territorien und der Bildung dreidimensionaler Strukturen. Tumorzellen nutzen dieses Programm, um das umgebende Gewebe zu infiltrieren und Metastasen zu bilden (modifiziert nach Comoglio et al., 2002)

Der erste Schritt dieser Kaskade ist der Verlust der interzellulären Kontakte, die vor allem durch das Cadherin-System aufrechterhalten werden. Eine Störung in dessen Funktion begünstigt einen aggressiven Phänotyp und die Tumorprogression. HGF/SF ist ein Protein, welches durch Phosphorylierung von β -Catenin zu einer Störung dieses Adhäsionssystems führen kann (Hiscox et al., 1999b).

In diesem Zusammenhang ist auch ein weiteres Charakteristikum disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zu sehen. Sie können sogar nach Abschluss einer adjuvanten

systemischen Therapie im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen werden (Mansi et al., 1989; Molino et al., 1999; Janni et al., 2001). Sie verfügen über eine z.T. ausgeprägte Latenzzeit („tumor cell dormancy“), in der sie bis zum Auftreten klinisch manifester Metastasen zu verharren scheinen (Pantel et al., 1993). Daher kommen für die Behandlung der minimalen residualen Krebstherapie vor allem solche Therapieansätze in Frage, die sich sowohl gegen ruhende, als auch gegen proliferierende Zellen richten. C-met und HGF/SF sind Modulatoren der Zell-zu-Zell-Adhäsion, in ihrer Expression unabhängig vom Zellzyklus und daher als therapeutische Zielstrukturen besonders interessant.

1.5.2 Diagnostik und prognostische Relevanz

Die eindeutige zytologische Identifizierung disseminierter Tumorzellen ist mit konventioneller histopathologischer Methodik nicht möglich (Schlimok et al., 1987). Der Nachweis in zytologischen Präparaten anhand von zytomorphologischen Kriterien ist äußerst schwierig und kaum sensitiv. Deshalb wurden sensitivere immunhistochemische und molekulare Nachweisverfahren entwickelt, die sich qualitative Eigenschaften dieser Zellen zu Nutze machen (Osborne et al., 1994; Pantel et al., 1996b; von Knebel Doeberitz et al., 1996).

Ein Merkmal, auf das sich die meisten Studien konzentrierten, sind Zytokeratine (CK). Diese sind nicht nur integrierter Bestandteil des Zytoskeletts epithelialer Zellen, sondern stellen auch ein stabiles Merkmal in Tumorzellen dar (Sloane et al., 1980; Moll et al., 1982). In den mesenchymalen Zellen des Knochenmarks lässt sich dieses Protein des Zytoskeletts dagegen nicht nachweisen (Schlimok et al., 1987). Außerdem lassen sich unter normalen Umständen nur sehr selten Zellen epithelialen Ursprungs im Knochenmark nachweisen, wie Untersuchungen an Patienten ohne nachweisbare maligne Erkrankung zeigen (Pantel et al., 1994; Pantel et al., 1996a und b).

Am Royal Marsden Hospital und dem Ludwigs-Institut konnte schon vor zwanzig Jahren die Präsenz und prognostische Bedeutung epithelialer Zellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen gezeigt werden (Dearnaley et al., 1981; Redding et al., 1983). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bisher die prognostische Relevanz des immunzytochemischen Nachweises disseminierter Tumorzellen durch prospektive klinische Studien bestätigen.

Tabelle 1.3: Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen für die prognostische Relevanz CK-positiver Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom

Publikation	Anzahl Patienten	Detektrionsrate	Marker	Methode	Prognostischer Wert
Braun et al., 2003	4199	30%	A45-B/B3	ICC	OS*
Coombes et al., 1986	269	23%	E29	ICC	DFS
Cote et al., 1995	49	37%	T16, C26, AE-1	ICC	DFS, OS
Courtemanche et al., 1991	50	8%	LICR-LON-M8	ICC	-
Datta et al., 1994	34	26%	CK19	RT-PCR	DFS
Dearnaley et al., 1991	37	33%	EMA	ICC	DFS, OS
Diel et al., 1996	727	43%	2E11	ICC	DFS, OS*
Fields et al., 1996	83	71%	CK19	RT-PCR	DFS
Funke et al., 1996	234	38%	CK18	ICC	n.d.
Gebauer et al., 2001	393	42%	CK/EMA	ICC	DFS*, OS
Gerber et al., 2001	554	31%	CK8, 18, 19	ICC	DFS, OS*
Harbeck et al., 1994	100	38%	E29, Moll, 12H12	ICC	DFS, OS*
Kirk et al., 1990	25	48%	LICR-LON-M8	ICC	-
Landys et al., 1998	128	19%	AE-1, AE-3	ICC	DFS, OS*
Mansi et al., 1999	350	25%	E29	ICC	DFS, OS
Mathieu et al., 1990	93	1%	KL1	ICC	-
Molino et al., 1997	109	38%	Mbr1/8	ICC	-
Porro et al., 1988	159	16%	Mbr1	ICC	-
Salvadori et al., 1990	121	17%	Mbr1	ICC	-
Schlimok et al., 1987	155	18%	CK18	ICC	DDFS
Singletary et al., 1991	71	38%	AE-1, AE-3, MAK 6, 113F1, 260F9, 317G5	ICC	-
Slade et al., 1999	23	61%	CK19	RT-PCR	-
Untch et al., 1999	581	28%	CK18	ICC	-
Vannucchi et al., 1998	33	48%	CK19	RT-PCR	DFS
Wiedswang et al., 2003	817	13%	AE-1, AE-3	ICC	DDFS, OS*

* : statistischer Wert als unabhängiger Parameter durch Multivarianzanalyse bestätigt

CK: cytokeratin; DFS: disease free survival; DDFS: distant disease free survival; EMA: epithel-membrane antigen; ICC: immunocytochemistry; n.d.: not done; OS: overall survival; RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

Trotzdem bleibt die Aussage umstritten, ob disseminierte Tumorzellen tatsächlich von prognostischer Relevanz beim Mammakarzinom sind. Teilweise konnten diese Zusammenhänge nur in Abhängigkeit von der Anzahl der Zytokeratin-positiven Zellen hergestellt werden (Cote et al., 1991). Andere Arbeitsgruppen konnten für nachgewiesene epitheliale Zellen keine prognostische Relevanz beweisen (Kirk et al., 1990; Salvadori et al., 1990; Singletary et al., 1991). Diese Studien sind allerdings nicht uneingeschränkt miteinander vergleichbar, da verwendete Antikörper, Protokolle und Patientenkollektive erheblich divergieren. Immunzytochemische Methoden, morphologische und zytologische Kriterien müssen daher erst standardisiert werden, bevor die Detektion disseminierter Tumorzellen in der klinischen Routine angewendet werden kann (Janni et al., 2005).

1.5.3 Phänotypisierung

Da diese Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark potentiell aggressiv sind und metastatisches Potential besitzen, ist eine nähere Charakterisierung von erheblichem Interesse. Dabei greift man vor allem auf Tumor-assoziierte Eigenschaften zurück. Bisher hat man sich dabei z.B. auf die Expression von Lewis-Y-Blutgruppenvorläuferantigenen, von uPA-R oder *cerbB2*-Onkogen (Müller et al., 1996) konzentriert. Mit Hilfe dieser Doppelfärbungstechniken könnten auch Hinweise darauf zu finden sein, wie sich diese Tumorzellen verhalten und welche Eigenschaften sie besitzen. Der Zustand „dormancy“ könnte demnach darauf zurückzuführen sein, dass diese Zellen nur über sehr geringe Mengen des Proliferationsmarkers Ki-67 verfügen (Pantel et al., 1993). Auch in diesem Zusammenhang ist die Suche nach proliferationsunabhängigen Therapiestrategien zu sehen. Die immunfluoreszenten Färbetechniken könnten dazu beitragen, nicht nur eine qualitative, sondern sogar eine quantitative Aussage über die Expression bestimmter Proteine zu gestatten. Die Phänotypisierung dient somit auch der Suche nach neuen Zielstrukturen in der Krebstherapie.

Verschiedene therapeutische Strategien wurden bereits entwickelt, um die c-met-HGF/SF-Signalkaskade zu unterbrechen. Die Bindung von HGF/SF an seinen Liganden wurde durch HGF/SF-Antikörper verhindert (Cao et al., 2001; Martin et al., 2003), HGF/SF selbst modifiziert (Lokker et al., 1993) und c-met durch dominant-negative Rezeptortypen ersetzt und in seiner Funktion behindert (Furge et al., 2001). Die Wirkungen von c-met hinsichtlich Zellproliferation und Tumorwachstum konnten bisher allerdings nur in der Zellkultur und im Tierversuch an der Maus gezielt unterdrückt werden.

2. ZIELSETZUNG

Die Fragestellung dieser Arbeit nach der Rolle von c-met beim Mammakarzinom machte die Unterteilung in zwei thematische Schwerpunkte sinnvoll:

In einem Teil wurde an einem Kollektiv von 39 Patientinnen mit duktalem Carcinoma in situ (DCIS) die Expression von c-met, HGF/SF und HER2/neu untersucht. Möglicherweise lassen sich in diesem Frühstadium dieselben Expressionsmuster wie beim invasiven Mammakarzinom erkennen. Eine weitere Überlegung war, ob es möglich sei, Patientinnen zu charakterisieren, die ein höheres Risiko haben, ein Rezidiv zu erleiden. Gibt es also Hinweise, die einen Übergang in eine invasive Erkrankung möglicher erscheinen lassen? In diesem Teil stehen folgende Fragen im Mittelpunkt:

- Wird c-met mit seinem Liganden HGF/SF im DCIS exprimiert?
- Wie unterscheidet sich die Expression von c-met und HGF/SF zwischen Normal- und Tumorgewebe in ein und derselben Läsion?
- Korreliert die Expression mit anderen pathologischen oder histologischen Eigenschaften?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Expression von c-met und anderen Tyrosinkinase-Rezeptoren wie HER2/neu?
- Kommen zwei verschiedene immunzytochemische Verfahren, wie Immunhistochemie und Immunfluoreszenz zu vergleichbaren Ergebnissen?

Während das DCIS als Vorstufe der Mammakarzinomerkrankung gilt, sind disseminierte Tumorzellen im Knochenmark bereits potentielle Vorläufer bzw. Ausgangspunkte von Metastasen. Der zweite, stärker experimentell ausgerichtete Teil konzentriert sich auf die Färbung und Phänotypisierung dieser disseminierten Tumorzellen im Knochenmark. Anhand von Mischungsexperimenten konnte eine immunfluoreszente Doppelfärbung für Zytokeratin und c-met etabliert werden. Folgende Fragestellungen mussten dafür bearbeitet werden:

- Lassen sich Zytokeratin-positive Zellen eindeutig im Knochenmark nachweisen?
- Welche Zelllinien eignen sich für die Mischungsexperimente? Mit welchen Zellen ist eine eindeutige Färbung für Zytokeratin und c-met möglich?
- Welche methodischen Verbesserungen sind notwendig, um immunhistochemische Ergebnisse auf die Immunfluoreszenztechnik übertragen zu können?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patientinnenkollektiv

Die Patientinnen wurden in der Frauenklinik der Technischen Universität München behandelt. Die Therapie bestand für alle Patientinnen gleichermaßen in der chirurgischen Resektion des DCIS-Gewebes, entweder durch brusterhaltende Chirurgie oder Mastektomie. Alle Patientinnen unterzogen sich dieser Therapie zwischen 1992 und 1999. Das Alter lag zwischen 37,8 und 85,7 Jahren mit einem Median von 53,8 Jahre. Die Patientinnen gaben zum Zeitpunkt der Operation ihr schriftliches Einverständnis zur Untersuchung von Gewebeproben und Auswertung der Krankheitsdaten für wissenschaftliche Fragestellungen. Zunächst wurden 40 Patientinnen in die Beobachtung aufgenommen. Da es sich aber in einem Fall um ein DCIS mit teilweise invasiven Anteilen handelte, wurde dieser Fall von der Auswertung ausgeschlossen. Bei den restlichen Läsionen handelt es sich um reine DCIS Läsionen ohne invasive Anteile, was der UICC-Klassifikation pTis entspricht. Das Gewebe wurde entsprechend der Van Nuys-Klassifikation eingeteilt (Silverstein et al., 1996). Nach einer Nachbeobachtungszeit von 46,3 Monaten hatte keine der 39 DCIS-Patientinnen ein Rezidiv erlitten. 18 Patienten wurden mastektomiert, 14 wurden brusterhaltend operiert. In 7 Fällen waren keine Daten zur Therapie verfügbar. 9 der brusterhaltend operierten Patienten wurden adjuvant nachbestrahlt. 25 Patienten erhielten keine adjuvante Therapie, während in 5 Fällen keine Informationen zur adjuvanten Behandlung verfügbar waren. Die Tumgröße wurde anhand des größten Durchmessers im chirurgischen Resektat ermittelt. Der Median betrug 1,75 cm (0,1-7,0 cm). HER2/neu und Ki67 wurden immunhistochemisch bestimmt.

3.2 Material

3.2.1 Firmen und Reagenzien

- Biomed, Foster City, USA: Aqueous Mounting Medium with Anti-Fading Agents; Mausantikörper gegen Pan-Zytokeratin II (Nr. V1148), Primary Antibody Diluting Buffer (Nr. M35)
- DAKO, Glostrup, Dänemark: ChemMate Detektionskit APAAP Maus (Nr. K 5000); Peroxidase/DAB, Kaninchen/Maus (Nr. K 500); Hydrogen Peroxid (Nr. K0673), Fettstift (Nr. S 2002); Incubation Container for Microwave Oven (Nr. S2030); Kaninchenantikörper gegen c-erbB-2 (Nr. A 0485)
- Falcon/Becton Dickinson, Plymouth, England. Gewebekulturflaschen T75
- Gibco BRL Life Technology, Karlsruhe, Deutschland: Fötales Kälberserum (Nr. 10270-106); HEPES; DMEM; L-Glutamin (Nr. 25030-024); PBS;

- 1640 RPMI (+Phenolrot)
- Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland: Liquemin N25000
 - Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA: Esel-anti-Kaninchen IgG, Sekundärantikörper, Rhodamin-gekoppelt; Esel-anti-Maus IgG, Sekundärantikörper, Fluoreszin-gekoppelt; Esel Normalserum
 - Marabuwerke GmbH&Co, Tamm, Deutschland: Fixogum
 - Marienfeld, Deutschland; Neubauerzählkammer
 - Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland: Eukitt (Nr. PER-30 000)
 - Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland; Objektträger (Nr. 02-1102)
 - Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; Methanol, Ethanol, Isopropanol
 - Micromet, Martinsried, Deutschland: A45-B/B3, monoklonaler Mausantikörper gegen Zytokeratin 8, 18 und 19
 - Molecular Probes, Eugene, USA: Alexa Fluor 488, Ziege-anti-Maus IgG, Sekundärantikörper; Alexa Fluor 568, Ziege-anti-Kaninchen IgG, Sekundärantikörper
 - Oncogene, Cambridge, USA: c-neu, monoklonaler Mausantikörper gegen c-neu
 - PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich: Lymphozyten Separationsmedium
 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA: C-28, polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen c-met
 - Seromed Biochrom KG: Ficoll separating solution (Nr. L6113), EDTA; Penicillin/Streptomycin
 - Serva, Heidelberg, Deutschland: Paraformaldehyd (Nr. 31628)
 - Shandon, Pittsburgh, USA; Cytospin 2
 - Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland: Citric Acid, Lot 77H0029; Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Trizma-Base (Nr. T-1530); Tween-20 (Nr. P-2287); Zentrifuge 4K15
 - Zeiss, Thornwood, USA: ZEISS 310 konfokales Laser Scan Mikroskop

3.2.2 Auswertung

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit Hilfe des Image Pro (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) ausgewertet. Die Quantifizierung der fluoreszenten Signale erfolgte mit Hilfe der Optimas 4.0 Image Analysis Program Software (Optimas, Bothell, USA). Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Zeiss 310 konfokalen Mikroskop angefertigt. Dieses verfügt über einen 25 mW Argon-Krypton Laser und wurde so

konfiguriert, dass die Fluoreszin- und Rhodamin-Exzitation bei 488nm und 568nm gemessen werden konnte.

3.2.3 Puffer und Lösungen

Citratpuffer	2,1g Citric Acid (Sigma, Deisenhofen) ad 1000ml Aqua bidest.; pH 6,0
EDTA-Lösung	95 ml PBS 5 ml EDTA (20%)
PBS	7,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl; pH 7,2
PFA	2,0g Paraformaldehyd 60 ml PBS 2N NaOH 2N HCL; pH 7,4 Lösung mit PBS auf 100 ml auffüllen
Tris-Puffer (Stocklösung)	60,5 g Trizma Base (Sigma, Deisenhofen) 90g NaCl (Merck, Darmstadt) pH 7,6 einstellen ad 1000ml Aqua bidest. Gebrauchslösung 1:10

3.2.4 Antikörper und Substanzen mit Fluorophoren

Anti-hHGF	polyklonaler Kaninchen-Antikörper (mab, D1, Van Andel Research Institute, Grand Rapids, Michigan, USA)
A45-B/B3	monoklonaler Maus-Antikörper gegen Zytokeratin 8, 18, 19 (Micromet, München)
c-neu	monoklonaler Mausantikörper gegen c-neu (Oncogene, Cambridge, USA)
h-met (C-28)	polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, USA)
Pan CK-II	monoklonaler Maus-Antikörper gegen Zytokeratin 4, 6, 8, 10, 13, 18 (Biomedica, Foster City, USA)
Alexa 488	Ziege-anti-Maus IgG (Molecular Probes, Eugene, USA)

Alexa 568	Ziege-anti-Kaninchen IgG (Molecular Probes, Eugene USA)
Esel-anti-Kaninchen IgG	Rhodamin gekoppelt (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA)
Esel-anti-Maus IgG	Fluoreszin (FITC) gekoppelt (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA)

3.2.5 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet: MCF-7, MDA-231, MDA-435S, T47D. Die Zelllinie S114 wurde von James Resau, MD (Van Andel Research Institute, Grand Rapids, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um die mit humanem c-met und humanem HGF/SF stabil transfizierte Mausfibroblasten-Zelllinie NIH 3T3 (Rong et al., 1993).

3.2.6 Zellkultur

Medien und Lösungen

Komplettmedium

MDA-231/435S	500 ml DMEM 55 ml fötales Kälberserum 5,5 ml HEPES 5,5 ml Penicillin/Streptomycin 5,5 ml L-Glutamin
MCF-7	800 ml 1640 RPMI (+Phenolrot) 50 ml fötales Kälberserum 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml L-Glutamin
T47D	500ml 1640 RPMI 50 ml fötales Kälberserum 5ml Penicillin/Streptomycin 5ml L-Glutamin

3.2.7 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Jeden zweiten bzw. dritten Tag wurden die Zellen passagiert. Zu diesem Zweck wurde das Kulturmedium zunächst abgesaugt, die Zellen daraufhin einmal mit sterilem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 2 bzw. 4 ml EDTA-Lösung für 2-3 Minuten im Brutschrank angedaut, um dann als abgelöste Zellen im Komplettmedium resuspensiert zu werden.

Am Versuchstag wurden die Zellen von der Zellkulturflasche gelöst. Nach anschließender Resuspension erfolgte die Überführung in ein Falconröhrchen und die

Zentrifugation bei 300 x g und 4°C für 5 min. Anschließend wurden die Zellen zweimal in sterilem PBS gewaschen. Der Überstand wurde wieder abgesaugt, das Pellet in 1ml PBS aufgenommen und mit 1ml 2% PFA für 30 min fixiert. Danach erfolgte eine erneute fünfminütige Zentrifugation bei 300 x g und Raumtemperatur. Die Zellen wurden nun noch ein letztes Mal in PBS gewaschen und standen dann für weitere Arbeitsschritte zur Verfügung.

3.3 Methoden

3.3.1 Gewinnung und Präparation von Knochenmark

Als Mischungsexperiment diente das Vermischen von Tumorzellen und peripheren Blutlymphozyten einer gesunden Versuchsperson. Die Doppelfärbung wurde außerdem an Spikes durchgeführt, die aus Knochenmark von gesunden Spendern hergestellt wurden. Als Negativkontrolle diente Material von Patientinnen mit benignen Läsionen der Mamma. Zu diesem Zweck wurde das Knochenmark von Patientinnen der Frauenklinik Rechts der Isar gewonnen und die isolierten mononukleären Zellen als Zytospins auf Objektträger aufgebracht (Hocke, 2005). Dies erfolgte mit Hilfe spezieller Trichter, die die Zellen in Form von 0,5 cm großen Spots auf gereinigte Objektträger aufbrachten. Auf diese Weise war eine verlässliche Aussage über die Anzahl der aufgebrachten Zellen möglich. Außerdem konnten Zytospins von Tumor- und Knochenmarkszellen in einem vorher festgelegten Mischungsverhältnis angefertigt werden.

Durchführung

Die Knochenmarksproben wurden Patientinnen entweder präoperativ in Allgemeinnarkose entnommen oder ambulant in Lokalanästhesie (Hocke, 2005). Zu diesem Zweck wurden alle Patientinnen über Verwendungszweck, Art, Durchführung und Risiken des Eingriffs informiert und ihre Einverständniserklärung schriftlich eingeholt. Als Punktionsstelle diente zunächst die Spina iliaca posterior superior unilateral, wobei unter streng aseptischen Bedingungen gearbeitet wurde. Später wurde das Aspirat aus beiden Cristae iliaca entnommen. Für die Qualität des Untersuchungsmaterials ergab sich dadurch kein Unterschied. Das entnommene Aspirat wurde in heparinisierte Spritzen aufgenommen und anschließend auf mit 2,5 ml Heparin gefüllte Falconröhrchen verteilt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt (max. 1 h). Die weitere Verarbeitung des Knochenmarks erfolgte nach der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll. Auf diese Weise war es möglich mit Hilfe der unterschiedlichen Dichten, selektiv mononukleäre Zellen zu

isolieren. Zur Überprüfung der Qualität des Aspirats wurde ein Teil davon von Hämatologen der III. Medizinischen Klinik der TU München begutachtet und auf seinen Knochenmarksgehalt überprüft.

Das Knochenmark wurde zunächst mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt. Hiermit wurden die mit 7 ml Ficoll gefüllten Röhrchen langsam überschichtet. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 400 x g und 4°C konnte die Interphase der mononukleären Zellen mit einer kurzen Pasteurpipette isoliert werden. Zweimaliges Waschen erfolgte in 3 ml PBS und 7 min Zentrifugation bei 250 x g und 4°C. Das Pellet an gereinigten Zellen wurde danach in 1000 µl PBS aufgenommen und mit 1000 µl PFA 30 min fixiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 300 x g und Raumtemperatur für 5 min konnte der Überstand an überschüssigem PFA abgenommen und der verbleibende Rest mit 3 ml PBS aufgefüllt werden. Danach wurden die Zellen erneut in der Zentrifuge gewaschen. Die Zellen wurden in 1:100 in PBS aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (Pantel et al., 1997). Danach wurden die Zellen in Form von Zytospins mit 200.000 Zellen pro Spot auf Objektträger aufgebracht und bei 450 U/min und Raumtemperatur 5 min zentrifugiert. Die fertigen Objektträger mussten über Nacht luftgetrocknet werden, bevor sie für die immunzytochemischen Färbungen zur Verfügung standen.

Für die Mischungsexperimente mit Tumorzellen und peripheren Blutlymphozyten betrug das Mischungsverhältnis 1:100. 1.000 MCF-7-Zellen wurden mit 100.000 peripheren Blutlymphozyten gemischt. Die Aufbereitung erfolgte identisch.

3.3.2 Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie ist es möglich, Proteine im histologischen Gewebeschnitt spezifisch darzustellen. Dabei kann man unter anderem eine Aussage über die Lokalisation dieses Proteins im Gewebsverbund treffen. Nicht nur an Gewebeschnitten, sondern besonders bei der Färbung von Einzelzellen, lässt die Verteilung der Färbung auf der einzelnen Zelle Rückschlüsse darauf zu, ob das Protein vermehrt im Zytoplasma oder auf der Membran exprimiert wird.

Um die Demaskierung von Antigenen zu erreichen, können die Gewebeschnitte zuvor in einem Dampfkochtopf bzw. Mikrowellengerät vor der Inkubation mit dem Primäantikörper erhitzt werden (Shi et al., 2001). Zur Detektion der resultierenden Antigen-Antikörperkomplexe werden indirekte Methoden wie die Avidin-Biotin-Peroxidase- bzw. die Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode (Cordell et al., 1984) verwendet. Die hohe Sensitivität der Avidin-Biotin-Methode gründet sich auf die hohe Affinität der Reagenzien untereinander und sterischen Besonderheiten des Avidin-Moleküls.

Außerdem kann man mit dieser Technik unspezifische Hintergrundfärbung weitgehend vermeiden. Sie ist einfacher und schneller durchzuführen als die vierstufige Peroxidasetechnik, die als einzige Färbemethode als noch sensitiver einzustufen ist (Naritoku et al., 1982).

3.3.3 Färbungen an Gewebeschnitten

Durchführung

Die Gewebeschnitte wurden jeweils für c-met und seinen Liganden HGF/SF gefärbt. Zunächst wurden die Schnitte zwischen 37°C und 58°C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte das Entparaffinieren über eine absteigende Alkoholreihe.

Diese Schritte gliedern sich wie folgt:

4x5 min in frisches Xylol

2x5 min in Isopropylalkohol (100%)

2x5 min in Ethanol (96%)

2x5 min in Ethanol (70%)

2x5 min in Aqua bidest. spülen

3x5 min in Tris-Puffer spülen

Zur Demaskierung der Antigene wurden die entparaffinierten und in Tris-Puffer gespülten Schnitte in Citratpuffer gekocht. Dies geschah für die c-met-Färbung für 20 min in der Mikrowelle (750W). Schnitte, die für die HGF-Färbung vorbereitet wurden, wurden 4 min im Dampfkochtopf gekocht. Anschließend folgte das dreimalige Spülen der Schnitte mit frischem Tris-Puffer. Um keine falsch positiven Ergebnisse zu erhalten, wurde eine etwaige endogene vorhandene Peroxidaseaktivität des Gewebes durch eine Inkubation der Schnitte für 30 min in 3% Wasserstoffperoxid in Methanol geblockt. Die Schnitte wurden wiederum dreimal mit Tris-Puffer abgespült und in die feuchte Kammer eingestellt. Um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern, wurden die Schnitte mit 4% Magermilchpulver sowie mit Normalserum von der Ziege in der Verdünnung 1:100 für weitere 30 min inkubiert. Danach folgte das Auftragen des entsprechenden Primärantikörpers. Die Inkubationszeit betrug jeweils 1h bei Raumtemperatur. Die Verdünnung für h-met betrug 1:300, für Anti-hHGF ebenfalls 1:300. Nach Spülen mit Tris-Puffer wurde der biotinylierte Sekundärantikörper aufgetragen. Die Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers erfolgte mittels eines Detektionskits (DAKO ChemMate Detection Kit). Mit Mayer's Hämatoxylin wurde in 30 s die blaue Gegenfärbung der Zellkerne durchgeführt. Die abschließende Dehydratation der

Schnitte erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

Als Positivkontrolle diente in beiden Fällen die Zelllinie NIH 3T3 hHGF, hmet. Diese Zelllinie verfügt über endogenes HGF/SF und ist stabil mit dem c-met-Rezeptor transfiziert (Rong et al., 1994). Eine Kontrolle der Spezifität erfolgte durch Weglassen des Primärantikörpers.

3.3.4 Färbungen an Einzelzellen

Für die Färbungen an Einzelzellen wurden die entsprechenden Zellverbände zunächst in Form von Zytospins mit 200.000 Zellen auf Objektträger aufgebracht. Dabei wurden einerseits die oben genannten Zelllinien verwendet, andererseits wurden auch Mischungsexperimente mit MCF-7-Zellen und unauffälligen Knochenmark bzw. peripheren Blutlymphozyten im Verhältnis 1:100 durchgeführt.

c-met- und HGF/SF-Färbung

Die Zytospins wurden für beide Färbungen zunächst im Dampfkochtopf für 4 min in Citratpuffer gekocht. Danach wurde der Zytospin-Spot mit einem Fettstift umkreist, um ein besseres Auftragen der Reagenzien zu gewährleisten. Das Protokoll unterscheidet sich in folgenden Arbeitsschritten von dem an Gewebeschnitten:

1. Zum Blocken der endogenen Peroxidase wurde Hydrogenperoxid für 5 min aufgetragen.
2. Auf die Vorbehandlung mit Magermilchpulver wurde verzichtet.
3. Die Verdünnung für h-met betrug 1:100. Diese Verdünnung diente auch als Grundlage für die im Folgenden beschriebene Immunfluoreszenzfärbung.

Zytokeratin-Färbung

Für diese Färbung wurde die APAAP-Methode verwendet, die ebenfalls eine indirekte Detektionsmethode ist. Dabei wird nach dem Sekundärantikörper ein Immunkomplex aufgetragen (APAAP Immunkomplex). Zur Detektion des gebundenen Antikörpers dient dann als Chromogen Neu-Fuchsin in Verbindung mit einem AP-Substratpuffer. Alle Reagenzien wurden in Form eines Detektionskits verwendet (DAKO ChemMate APAAP, Maus).

Die Zytospins auf den Objektträgern wurden mit einem Fettstift umkreist, bevor sie zweimal mit Tris-Puffer gewaschen wurden. Danach wurden sie in die feuchte Kammer

eingestellt und der Primärantikörper A45-B/B3 in der Verdünnung 1:1000 aufgetragen. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug 1h. Danach wurden die Objektträger mit Tris-Puffer gewaschen, bevor der Brückenantikörper für 30 min aufgetragen wurde. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte mit Hilfe des APAAP-Detektionskits. Mit Mayer's Hämatoxylin wurde in 30 s die blaue Gegenfärbung der Zellkerne durchgeführt. Die abschließende Dehydratation der Schnitte erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

3.3.5 Immunfluoreszenz

Die Morphologie ist einer der wichtigsten Aspekte der pathologischen Diagnostik. Um aber die Morphologie mikroskopisch untersuchen zu können, muss man zunächst spezifische intra- und extrazelluläre Strukturen darstellen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz und der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) ist es heutzutage nicht nur möglich, Aussagen über die Morphologie zu treffen, sondern außerdem Lokalisation und sogar Quantität eines bestimmten Proteins zu untersuchen. Auch in diesem Fall macht man sich die Eigenschaft von Antikörpern zunutze, bestimmte Moleküle zu erkennen und sich gezielt an diese zu binden. Zur Detektion dieses Primärantikörpers wird ein Sekundärantikörper verwendet, der wiederum an einen fluoreszierenden Farbstoff gebunden ist. Abhängig von diesem Farbstoff werden die gebundenen Komplexe durch einen Laserstrahl angeregt, ihrerseits Licht einer bestimmten Wellenlänge auszusenden. Auf diese Weise entsteht im Fluoreszenzmikroskop ein leuchtendes Bild.

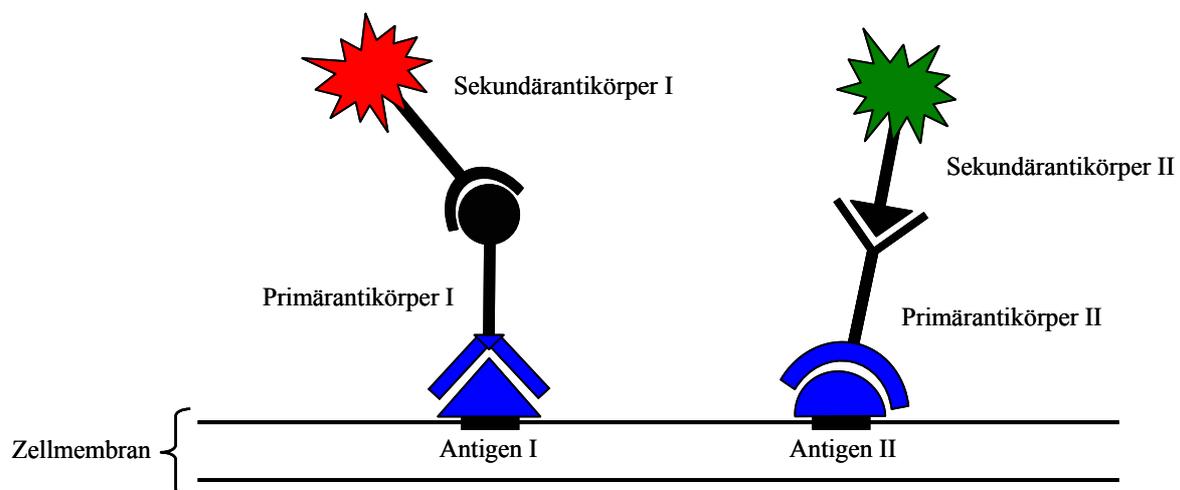


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der immunfluoreszenten Doppelfärbung

Im Gegensatz zu dieser indirekten Methode besteht auch die Möglichkeit, direkt den Primärantikörper mit dem fluoreszierenden Farbstoff zu labeln. Da diese Art von direkt markierten Antikörpern für unsere Fragestellungen nicht zur Verfügung stand, wurde die indirekte Methode verwendet.

3.3.6 Färbungen an Gewebeschnitten

Durchführung

Die Gewebeschnitte wurden für c-met und HER2/neu gefärbt. Diese Färbungen wurden am Van Andel Research Institute, Grand Rapids, Michigan (USA) durchgeführt und ausgewertet (Kooperationspartner James Resau, MD).

Die Schnitte wurden zunächst für 30 min im Brutschrank bei 60°C inkubiert. Danach erfolgte das Entparaffinieren über eine absteigende Alkoholreihe. Diese Schritte gliedern sich wie folgt:

3x3 min. in Americlear

2x3 min in Isopropylalkohol (100%)

2x3 min in Ethanol (95%)

3 min in Ethanol (70%)

Waschen mit destilliertem Wasser

Danach wurden die entparaffinierten Schnitte zum Blocken unspezifischer Bindungen für 30 min mit 1% bovinem Serumalbumin und 5% Eselnormals serum in PBS inkubiert. Beide Primärantikörper wurden gleichzeitig aufgetragen, die Schnitte in die feuchte Kammer eingestellt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Antikörper kamen zur Anwendung: h-met (Santa Cruz Biotechnology) in der Verdünnung 1:50 und c-neu (Oncogene) in der Verdünnung 1:20. Nach dreimaligem Spülen mit PBS/Tween-20 (Sigma) für jeweils 5 min wurden beide Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:100 für 1 h bei Raumtemperatur aufgetragen. Diese Sekundärantikörper waren Esel-anti-Kaninchen IgG, Rhodamin gekoppelt bzw. Esel-anti-Maus IgG, FITC-gekoppelt. Danach wurden die Schnitte erneut mit PBS/Tween-20 gewaschen und mit destilliertem Wasser ab gespült. Abschließend erfolgte das Eindecken mit Aqueous Mounting Medium (Biomedex, Foster City, USA) (Tsarfaty et al., 1992).

3.3.7 Färbungen an Einzelzellen

Die Färbungen an Einzelzellen wurden nur zum Teil im Forschungslabor an der Frauenklinik der Technischen Universität München durchgeführt. Die Abbildungen sind zum Teil am

Van Andel Research Institute, Grand Rapids, Michigan (USA) entstanden, so dass auch die Färbungen nach dem dort modifizierten Protokoll durchgeführt wurden.

Durchführung

Die Zytospins wurden zunächst für 4 min in Citratpuffer (pH 6,0) im Dampfkochtopf gekocht und anschließend mit Tris-Puffer gewaschen. Dieses dreimalige Waschen musste zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wiederholt werden. Danach wurden die Objektträger in die feuchte Kammer eingestellt und zunächst der Primärantikörper A45-B/B3 in der Verdünnung 1:100 für 1h aufgetragen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexa 488 für 30 min. Bevor nun der zweite Antikörper h-met aufgetragen werden konnte, mussten zunächst unspezifische Bindungen mit Normalserum von der Ziege in der Verdünnung 1:100 für 10 min geblockt werden. Auch in diesem Fall wurden die Zellen für 1h mit dem Primärantikörper h-met in der Verdünnung 1:100 und danach mit dem Sekundärantikörper Alexa 568 für 30 min inkubiert.

Tabelle 3.1: Protokoll der Färbungen an der Frauenklinik der Technischen Universität München

Erster Primär-AK 1h	Erster Sekundär-AK 30 min	Zweiter Primär-AK 1h	Zweiter Sekundär-AK 30 min
A45-B/B3 1:100	Alexa 488 Goat anti-mouse 1:100	h-met 1:100	Alexa 568 Goat-anti-rabbit 1:100

Während des gesamten Vorgangs wurde die Umgebung möglichst dunkel gehalten, um ein vorzeitiges Ausbleichen der fotosensiblen Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Außerdem wurde durch die Durchführung in der feuchten Kammer ein Austrocknen der Präparate verhindert. Nach den drei letzten Waschschrritten wurden die Zellspots in etwa 10 µl PBS unter einem Deckgläschen eingeschlossen, die Abschlussränder mit Fixogum luftdicht versiegelt und die Präparate bis zur Untersuchung unter dem CLSM im Kühlschrank aufbewahrt. Um die Standardisierung der Fluoreszenzintensität zu gewährleisten, wurde ein Aufbewahrungszeitraum von fünf Tagen nicht überschritten.

Das Protokoll der Doppelfärbung für Zytokeratin und c-met, das in den USA durchgeführt wurde, unterscheidet sich vor allem in den folgenden Punkten:

1. Auf eine Vorbehandlung im Dampfkochtopf wurde verzichtet.
2. Als Primärantikörper für Zytokeratin wurde nicht A45-B/B3, sondern Pan CK-II (Biomedica, Foster City, USA) verwendet.
3. Die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper waren:
Esel-anti-Kaninchen IgG, Rhodamin gekoppelt und Esel-anti-Maus IgG, Fluoreszin (FITC) gekoppelt (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA).

Die Zytospins wurden zunächst für 5 min in destilliertem Wasser eingestellt. Danach wurden unspezifische Bindungen mit 1%BSA/PBS und 5% Eselnormals Serum geblockt. Das Auftragen der beiden Primärantikörper erfolgte zeitgleich, bevor die Objektträger über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert wurden. Als Primärantikörper wurden verwendet: Pan CK-II (Biomedica, Foster City, USA) in der Verdünnung 1:100 und h-met 1:50 in antibody diluent (Biomedica, Foster City, USA) verdünnt. Die Waschschrte wurden dreimal mit Tween-20 für jeweils 5 min durchgeführt. Anschließend wurden beide Sekundärantikörper in einer 1:100 Verdünnung für 1h bei Raumtemperatur aufgetragen: Zur Detektion des an c-met gebundenen Primärantikörpers wurde an Rhodamin gekoppeltes Esel-anti-Kaninchen IgG verwendet. Im Falle von Zytokeratin, diente an Fluoreszin gebundenes Esel-anti-Maus IgG als Sekundärantikörper.

Anschließend wurden wieder drei Waschrte zu 5 min mit Tween-20 durchgeführt, die Zellspots mit destilliertem Wasser gespült und mit aqueous mounting medium eingedeckt. Dieses Medium besitzt zum Schutz der Fluoreszenz Anti-Fade-Substanzen.

Tabelle 3.2: Protokoll der Färbungen am Van Andel Research Institute, Grand Rapids, Michigan (USA)

Erster und zweiter Primär-AK über Nacht	Erster und zweiter Sekundär-AK 1h
Pan CK-II 1:100	FITC-gekoppeltes IgG 1:100
h-met 1:50	Rhodamin-gekoppeltes IgG 1:100

3.4 Auswertung

3.4.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte im Fall der c-met-Färbung semiquantitativ durch zwei Pathologen (T.R., J.R.). Beurteilt wurde die Intensität der Färbung, wobei eine Skala von 1-3 in halben Schritten verwendet wurde. Da die c-met-Färbung im Normalgewebe mit der des Tumors verglichen werden sollte, wurde in diesem Fall eine semiquantitative Art der Auswertung verwendet. Bei der Auswertung der HGF/SF-Färbung wurde nicht nur die relative Farbstärke, sondern auch der Prozentsatz an positiven Zellen insgesamt erfasst (Remmele et al., 1987). Anhand des Prozentsatzes erfolgte die Einteilung in vier Gruppen: $\leq 10\% = 1$, $\leq 40\% = 2$, $\leq 70\% = 3$, $>70\% = 4$. Die Intensität wurde mit 0 (keine Färbung) bis 3 (intensive Färbung) bewertet. Mittels Multiplikation der Intensität mit der Positivität der Zellen wurde der Remmele Score (0 bis 12) errechnet. Ein cut-off von 3 wurde zur Unterscheidung von starker und schwacher Intensität verwendet.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen HER2/neu-Färbung wurden ebenfalls semiquantitativ von 0 bis 3+, analog zum DAKO HercepTestTM, bewertet. Konnte keine Färbung nachgewiesen werden oder war eine membranständige Färbung in weniger als 10% aller Tumorzellen nachweisbar, wurde der Tumor als 0 klassifiziert. 1+ wurde der Tumor gewertet, wenn eine schwache oder nur teilweise ausgeprägte membranständige Färbung in mehr als 10% der Zellen nachweisbar war. Färbte sich bei über 10% aller Tumorzellen die gesamte Membran mittelstark an, so wurde der Fall mit 2+ bewertet. 3+ kennzeichnete die Fälle, in denen mehr als 10% der Zellen eine starke vollständige membranständige Reaktion zeigten. Nur diese als 3+ bewerteten Fälle wurden als Überexpression gewertet.

3.4.2 Auswertung der immunfluoreszenten Färbungen

Die Auswertung der immunfluoreszenten Färbungen der Gewebeschnitte erfolgte am Van Andel Research Institute, Grand Rapids, Michigan (USA). Die Aufnahmen entstanden an einem konfokalen Laser Scan Mikroskop (Zeiss). Um neben einer Aussage über die Morphologie der Zellen auch eine strukturelle Orientierung auf der Fluoreszenzaufnahme zu erreichen, wurde zunächst ein Transmissionsbild angefertigt. Dieses basiert auf dem differentiellen Interferenzkontrast und wird auch DIK- bzw. Nomarski-Aufnahme genannt. Auf diesem Transmissionsbild werden zunächst solche Abschnitte aufgesucht, die eindeutig zelluläre Strukturen enthalten. Mit Hilfe der Computermaus werden diese ROI's (region of interest) abgefahren und so von anderen Strukturen wie z.B. Lumina abgegrenzt und als Maske gespeichert (Makro). Gleichzeitig kann auf diese Weise zwischen Tumor- und

Normalgewebe unterschieden werden. Diese Maske wird dann mit Hilfe spezieller Software (Image Pro, Media Cybernetics) über die Fluoreszenzaufnahme gelegt. Nur in dem sich nun überschneidenden Bereich wird die Fluoreszenz berechnet, d.h. sie enthält nur informative zelluläre Komponenten.

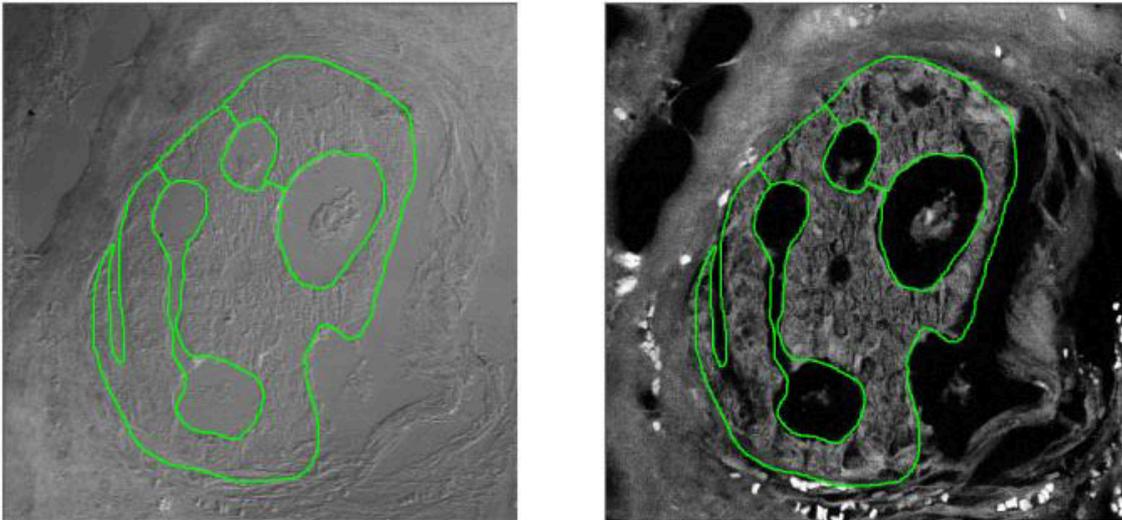


Abbildung 3.2: Definition der regions of interest im Transmissionsbild

Diese Daten werden von einer weiteren Software (Optimas 4.0 Image Analysis Program Software, USA) in Form eines Histogramms exportiert. Die x-Achse des Histogramms besteht aus den Grauschattierungen von 0-255, wobei 0 die dunkelste Schattierung darstellt. Die y-Achse beschreibt, wie viele Pixel der jeweiligen Intensität gemessen wurden. Um eine genaue Quantifizierung zu erreichen, wurde die Anzahl der Pixel mit der Intensität im Quadrat (Ratio= # Pixels x I^2) multipliziert. Für Normalgewebe und Tumorgewebe erhielt man also:

$$\text{Normal} = \sum [\text{pixels} \times \text{intensity}^2]$$

$$\text{Tumor} = \sum [\text{pixels} \times \text{intensity}^2]$$

3.4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Patientendaten wurde mit der SPSS Version 10.0 (SPSS Inc., Chicago IL) durchgeführt. Kontinuierliche Variablen wurden mit dem Spearman rank-Test korreliert. Für Assoziationen zwischen kontinuierlichen und kategorialen Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test und für Korrelationen zwischen zwei kategorialen Variablen der asymptotische Pearson Chi-Quadrat-Test angewendet. Das Konfidenzintervall wurde auf 95% festgelegt, d.h. nur Wahrscheinlichkeitswerte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

4. ERGEBNISSE

4.1 Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im KM

4.1.1 Zytokeratin (CK)-Färbung im Mischungsexperiment

Die Mischungsexperimente an Spikes aus MCF-7-Zellen und peripheren Blutlymphozyten zeigten, dass der Nachweis CK-positiver Zellen bis zu einem Verhältnis von 1:10⁶ möglich ist. Die Zytokeratin Färbung wurde außerdem an Präparaten bestehend aus der Zelllinie MCF-7- und Knochenmarkszellen durchgeführt. Die angefärbten Tumorzellen zeigten eine leuchtend rote Färbung. Dadurch waren sie eindeutig von blau gegengefärbten Knochenmarkszellen zu unterscheiden. In Präparaten, die nur aus Knochenmarkszellen bestanden, detektierten wir keine roten, für CK gefärbten Zellen.

Negativkontrollen wurden durchgeführt, indem die Objektträger ohne Primärantikörper inkubiert wurden. In keiner dieser Kontrollen konnte eine Färbung nachgewiesen werden.

In der Immunfluoreszenz wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet, da diese Färbungen zusätzlich am Van Andel Research Institute durchgeführt wurden: A45-B/B3 und Pan CK-II. Bei beiden handelt es sich um monoklonale Mausantikörper. Lediglich das Spektrum der detektierten Zytoskelettkomponenten unterscheidet sich. A45-B/B3 färbt vor allem CK8, 18 und 19, während Pan CK-II die Zytokeratine 4, 5, 6, 8, 10, 13 und 18 detektiert. Auch die verwendeten Sekundärantikörper waren nicht identisch, sondern wurden entsprechend dem im jeweiligen Labor üblichen Protokoll verwendet. Alexa 488 Ziege-anti-Maus wurde als Sekundärantikörper zum A45-B/B3 verwendet. Die am Van Andel Research Institute durchgeführten Färbungen verwendeten an FITC-gekoppeltes Esel-anti-Maus IgG. Beide Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Licht der Wellenlänge zwischen 488 und 490 nm angeregt. Das dadurch emittierte Licht hat die Wellenlänge 525nm. Die emittierte Fluoreszenz ist immer von längerer Wellenlänge, da die Emission über ein niedrigeres Energieniveau verfügt. Das Energieniveau verhält sich also genau umgekehrt zur Wellenlänge. Mittels beider Färbemethoden konnten wir die MCF-7-Zellen eindeutig von Knochenmarkszellen unterscheiden. Nur die Tumorzellen zeigten sichtbare grüne Fluoreszenz. An reinen Knochenmarkspräparaten konnte keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Negativkontrollen, jeweils ohne Primärantikörper, zeigten ebenfalls keine Fluoreszenz. Mit zwei unabhängigen Methoden konnten also Tumorzellen in Spikepräparaten von Knochenmarkszellen unterschieden und eindeutig detektiert werden.

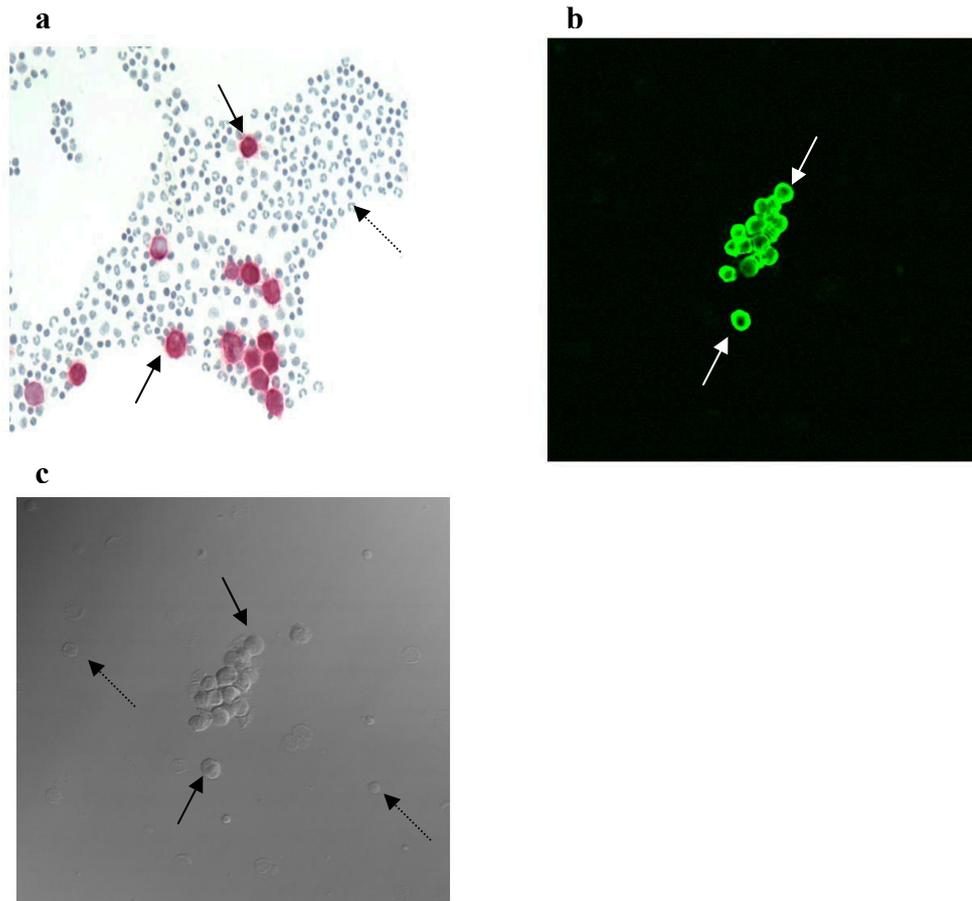


Abbildung 4.1 Immunhistochemische Färbung für Zytokeratin an MCF-7/KM-Zytospins

- a, Immunhistochemische Färbung mit A45-B/B3. MCF-7-Zellen (Pfeile) sind rot gefärbt, KM-Zellen blau gegengefärbt (gestrichelter Pfeil), x200
 b, Immunfluoreszenz Färbung mit Pan CKII, FITC gekoppelt. MCF-7-Zellen zeigen grüne Fluoreszenz (Pfeil), KM-Zellen nicht, x1000
 c, Nomarski Aufnahme mit MCF-7- (Pfeile) und Knochenmarkszellen (gestrichelte Pfeile), x1000

4.1.2 Immunhistochemische c-met Färbung an Einzelzellen

Um die Versuche zur Doppelfärbung vorzubereiten, mussten zwei Bedingungen erfüllt sein:

1. Die Färbung musste an Präparaten bestehend aus der Zelllinie und Knochenmarkszellen etabliert werden. Die immunhistochemischen Färbungen dienten dabei als Vorbereitung für die Immunfluoreszenz.
2. Es musste mit einer Zelllinie gearbeitet werden, an der wir beide Eigenschaften, die CK- und die c-met-Expression, optimal detektieren können.

Die immunhistochemische Färbung für c-met wurde zunächst an der Fibroblastenzelllinie S114 durchgeführt. Diese entstand aus den mit dem c-met-Rezeptor und HGF/SF transfizierten NIH 3T3-Zellen (Rong et al., 1993). Diese Zelllinie wurde auch als

Positivkontrolle für die c-met-Färbungen an Gewebeschnitten verwendet. Weiterhin standen folgende Zelllinien zur Verfügung, die c-met exprimieren: MCF-7 (Jiang et al., 2001), MDA 231 (Hiscox et al., 2000), MDA 435S (Beviglia et al., 1997), T47D (Keydar et al., 1979). Alle Zelllinien zeigten eine positive Reaktion auf die c-met-Färbung, wobei sich die Ergebnisse qualitativ unterschieden.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der c-met Färbung an verschiedenen Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung (Ursprungsgewebe, Eigenschaften)	Immunhistochemische Färbung c-met
S-114	Mausfibroblasten, c-met transfiziert	+++ zytoplasmatisch, vereinzelt membranständig
MCF-7	Mamma-Ca, mäßig differenziert, Östrogenrezeptor positiv	++, zytoplasmatisch, teils deutlich membranständig
MDA 231	Mamma-Ca, wenig differenziert, Östrogenrezeptor negativ	++, zytoplasmatisch
MDA 435S	Mamma-Ca, wenig differenziert, Östrogenrezeptor negativ	++, zytoplasmatisch, Abgrenzung der einzelnen Zellen nur schlecht möglich
T47D	Mamma-Ca, mäßig differenziert	+, zytoplasmatisch, vereinzelt membranständig

Alle Zelllinien wurden zusätzlich in der Immunfluoreszenz gefärbt, um die Ergebnisse mit denen der Immunhistochemie vergleichen zu können. Zufriedenstellende Färbungen konnte nur an den Zelllinien MCF-7 und T47D erreicht werden. Die Zelllinie S114 war für die Versuche der Doppelfärbung auf c-met und Zytokeratin nicht geeignet, weil sie kein humanes Zytokeratin exprimiert. Aufgrund der ausführlicheren Beschreibung in der Literatur und den besseren Eigenschaften in der Zellkultur, entschieden wir uns für die Zelllinie MCF-7.

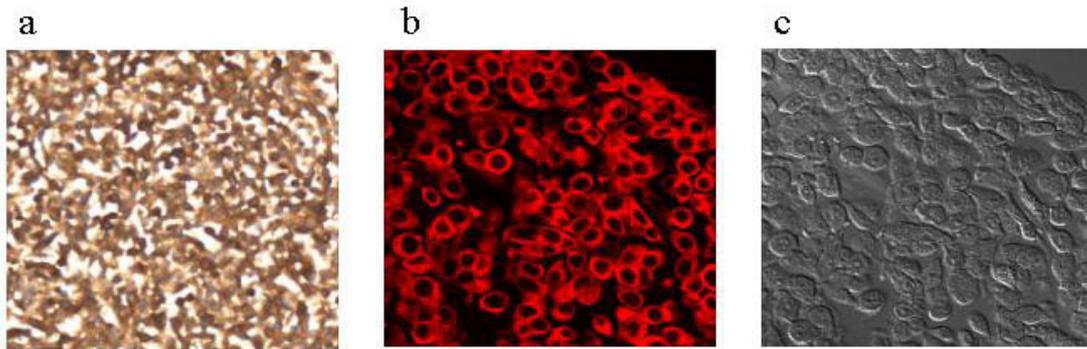


Abbildung 4.2: C-met-Färbung der Zelllinie S 114
Die Zelllinie S 114 zeigt eine deutlich positive Reaktion auf den Antikörper h-met. Die Färbung ist vor allem in der Immunfluoreszenztechnik membranständig lokalisiert.
a, Immunhistochemische Färbung mit blau gefärbten Kernen, x200. b, Immunfluoreszenz mit Rhodamin gekoppeltem h-met, x1000. c, Nomarski-Aufnahme, x1000.

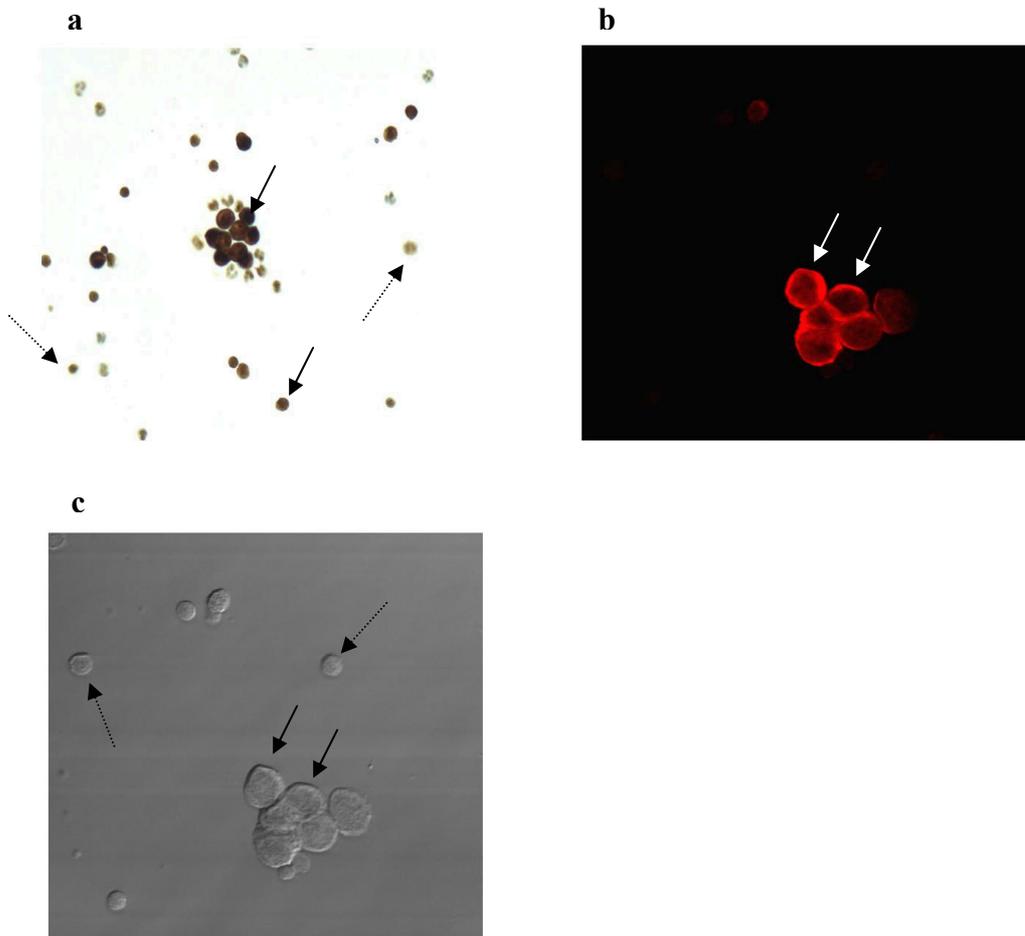


Abbildung 4.3: Immunhistochemische Färbung von c-met auf MCF-7/K- Zytospins
a, MCF-7-Zellen zeigen deutliche Reaktion auf c-met (Pfeile), geringe Mitreaktion der KM-Zellen (gestrichelte Pfeile), x200. b, Immunfluoreszenz mit Rhodamin-gekoppeltem h-met. Nur Färbung der MCF-7-Zellen (Pfeile), x1000. c, Nomarski Aufnahme, MCF-7-Zellen (Pfeile) und KM-Zellen (gestrichelte Pfeile), x1000.

4.1.3 Doppelfärbung auf CK und c-met an MCF-7-Zellen und Knochenmark

Nachdem die Einzelfärbung auf CK und c-met optimiert werden konnte, führten wir die Doppelfärbung zunächst an der Zelllinie und anschließend an künstlich mit MCF-7-Zellen kontaminierten Knochenmarksaspiraten durch. Die Zellen konnten schon auf der Nomarski-Aufnahme deutlich aufgrund der Morphologie und Größe der Knochenmarkszellen unterschieden werden. Die Aufnahme zweier verschiedener Färbungen wird dadurch ermöglicht, dass die Sekundärantikörper von Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt werden und das emittierte Signal auf verschiedenen Kanälen verarbeitet und sichtbar gemacht werden kann. Der an CK gebundene Antikörper war seinerseits an FITC gekoppelt, c-met wurde mit dem Fluoreszin Rhodamin sichtbar gemacht. Die Fluoreszenzaufnahmen der Doppelfärbung ergaben, dass die Antikörper gegen CK als auch gegen c-met ausschließlich an MCF-7-Zellen gebunden waren. An vereinzelt Knochenmarkszellen konnte nur für c-met eine positive Reaktion nachgewiesen werden. Diese Reaktion konnte nur in den immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen werden, sie fehlte in der Immunfluoreszenz. CK konnte vor allem zytoplasmatisch nachgewiesen werden, c-met dagegen war membranständig lokalisiert. Übersichtsaufnahmen, in denen beide Signale sichtbar waren, und Scan Aufnahmen der gesamten Zelle zeigten diese unterschiedliche Lokalisation besonders deutlich.

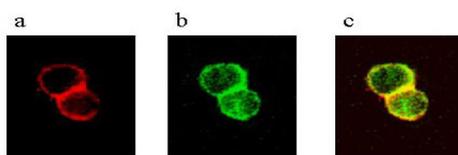


Abbildung 4.4: Doppelfärbung für c-met und Zytokeratin an MCF-7/KM-Zytospins, x1000
a, Rhodamin gekoppeltes h-met.
b, FITC-gekoppeltes Pan CKII. c, Doppelfärbung, CK vor allem zytoplasmatisch, c-met hauptsächlich membranständig lokalisiert.

Die Immunfluoreszenz zeigte außerdem besonders dort starke Signale auf die c-met Färbung, wo MCF-7-Zellen im Verbund vorlagen. An den Zell-zu-Zell-Kontakten war wiederum eine stärkere Fluoreszenz zu beobachten als an Strukturen, die keinen Kontakt zu anderen Zellen hatten.

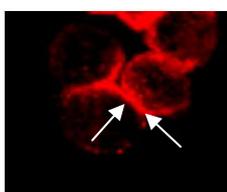


Abbildung 4.5: Immunfluoreszenz Färbung von c-met an MCF-7/KM-Zytospins, x1000
Die immunfluoreszenten Signale sind in Bereichen der Zell-zu-Zell-Kontakte besonders ausgeprägt (Pfeile).

Negativkontrollen unter Weglassen des Primärantikörpers zeigten keine messbare Fluoreszenz.

4.1.4 Methodische Veränderungen

In den immunhistochemischen Färbungen haben wir Detektionssysteme verwendet, die auf Peroxidase reagieren. Das Chromogen kann allerdings nicht unterscheiden, ob die Peroxidase endogen enthalten ist oder nachträglich zugegeben wurde. Vor allem Erythrozyten, Leukozyten, Dünndarm- und Nervengewebe haben einen hohen Anteil an endogener Peroxidase. Aus diesem Grund mussten wir diese zunächst effektiv blocken, um methodische Fehler bei der Detektion von c-met zu vermeiden. Die Funktion von Peroxidase besteht darin, Wasserstoffionen unter Bildung von freiem Wasser auf H_2O_2 zu übertragen. Indem wir das Substrat H_2O_2 schon vorher zufügten, wurde die Reaktion der endogenen Peroxidase vorweg genommen. Wir verwendeten H_2O_2 entweder als gebrauchsfertige Lösung oder in Aqua dest. bzw. Methanol. Die Objektträger wurden zwischen 5 und 30 min in diesen Lösungen inkubiert. Ein besseres Färbeergebnis konnte durch diese Möglichkeiten nicht erreicht werden, so dass wir im Protokoll die endogene Peroxidase mit Hydrogenperoxid für 5 min geblockt haben.

Um die Mitreaktion des Knochenmarks zu vermeiden, wurden verschiedene Antikörperversünnungen ausgetestet. Auch bei Verhältnissen von 1:300, 1:250 oder 1:200 konnte diese nicht verhindert werden, ohne dass nicht auch die Färbung der Tumorzelllinie verloren ging. In der Verdünnung 1:100 konnte dagegen mit beiden Methoden ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch auf Knochenmarkszellen c-met exprimiert wird. Wir konnten es vor allem mit der immunhistochemischen Färbung dort nachweisen. Auch die Immunfluoreszenz bewies zumindest an einzelnen Knochenmarkszellen eine positive Reaktion. Vor allem Zellen der Granulopoese färbten sich mit dem Antikörper gegen c-met positiv. Der Antikörper für die immunhistochemische Färbung wurde allerdings auch in einer niedrigeren Verdünnung (1:100 vs. 1:50) verwendet.

4.2 Expression von c-met und HER2/neu im duktalem Carcinoma in situ

4.2.1 Verteilung von c-met, HGF/SF und HER2/neu im DCIS

Tumorzellen und das benachbarte Brustdrüsengewebe zeigten für c-met eine positive Reaktion. Hierbei konnten wir deutliche Unterschiede zwischen der Expression im DCIS und den benachbarten, normal erscheinenden Milchgängen ausmachen. Es wurde nicht zwischen membranständiger und/oder zytoplasmatischer Färbung differenziert. Kein Tumor zeigte eine eindeutig membranständige Färbung. Das das Drüsengewebe umgebende Stroma zeigte nur wenig bis gar keine Reaktion auf den c-met-Antikörper. Die Interpretation immunhistochemischer Färbungen von Proteinen, die im Bindegewebe produziert werden, im Serum zirkulieren und an Rezeptoren in sowohl epithelialen Zellen, als auch in Zellen im Stroma binden, ist schwierig. Aufgrund der Intensität und qualitativen Aspekten der Färbung konnten wir die positive Reaktion auf HGF/SF im normalen duktalem Epithel, in Tumorzellen und Zellen des Stromas, wie Fibroblasten, glatten Muskelzellen und endothelialen Zellen beobachten. Auffallend war, dass das direkt dem Tumor benachbarte Stroma nur sehr wenig bis gar keine positive Reaktion zeigte. Allerdings handelt es sich nicht um konfokale Aufnahmen, so dass eine genaue intrazelluläre Lokalisation nicht möglich war. Kerne und Zytoplasma konnten mit dem Antikörper gegen HGF/SF positiv gefärbt werden. Expression von HER2/neu konnte im Gegensatz zum normalen Brustdrüsengewebe nur im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Dort war die Färbung membranbetont.

Tabelle 4.2: Verteilung histomorphologischer, klinischer und tumorbiologischer Faktoren bei Patientinnen mit duktalem Carcinoma in situ (N=39)*

Faktoren	Anzahl Patientinnen	%
VN	39	
1	10	25,6
2	14	35,9
3	15	38,5
Menopausenstatus	39	
Prä-/perimenopausal	15	40,5
Postmenopausal	24	59,5
Her2/neu	39	
0	1	2,6
1+	3	7,7
2+	15	38,5
3+	20	51,3
c-met Tumorgewebe	39	
≤ 1	23	59,0
≤ 2	7	17,9
>2	9	23,1
c-met Normalgewebe	38	
≤ 1	29	76,3
≤ 2	7	18,4
>2	2	5,3
HGF/SF	37	
≤ 3	20	54,1
>3	17	45,9
Steroidhormonrezeptor Status (ER und PR)	24	
positiv (ER und/oder PR positiv)	18	75
negativ (ER und PR positive)	6	25
Ki67	38	
≤ 10	33	86,8
>10	5	13,2

*Einige Faktoren konnten nicht in allen Tumoren ermittelt werden.

4.2.2 Expression von c-met, HGF/SF und HER2/neu im DCIS:

Vergleich zweier unabhängiger Methoden

Mit der immunhistochemischen Färbemethode für c-met zeigte das DCIS-Gewebe eine intensive Reaktion. In Tumoren, die eine vergleichsweise hohe c-met-Expression zeigten, konnte gleichzeitig eine verstärkte Reaktion des den Tumor umgebenden Normalgewebes nachgewiesen werden ($p < 0,001$). Diese Korrelation konnte auch mit der Immunfluoreszenz als signifikant ($p < 0,001$) bestätigt werden. Mit zwei unterschiedlichen Methoden konnte gezeigt werden, dass der Tumor und angrenzendes Normalgewebe dasselbe Expressionsmuster für c-met besitzen. D.h. je höher die Expression von c-met im Normalgewebe, desto höher ist sie auch im Tumor. Beim Vergleich der c-met-Intensitäten im Tumor konnte zwischen den beiden Methoden keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Dasselbe galt für die Expression im Normalgewebe.

Wir untersuchten außerdem die c-met-Expression im Zusammenhang mit der HER2/neu-Überexpression des Tumors. Der Mann-Whitney-Test ergaben keine Korrelation zwischen diesen beiden Tyrosinkinase Rezeptoren. Von 20 DCIS Läsionen, die HER2/neu 3+ gewertet wurden, konnte nur bei 5 Fällen eine hohe c-met-Expression ($> 1,5$) festgestellt werden.

Neben der c-met-Expression im Tumor alleine wurde die Färbung im DCIS-Gewebe der Färbung des umgebenden normal erscheinenden Gewebes gegenüber gestellt. In einem Fall konnte das Normalgewebe nicht ausgewertet werden. Folgende drei Gruppen wurden gebildet: In Gruppe 1 ($N > T$) exprimierte das Normalgewebe deutlich mehr c-met als der Tumor. In Gruppe 2 ($N = T$) zeigten Normalgewebe und DCIS eine gleich intensive Reaktion, während in Gruppe 3 ($N < T$) die Reaktion im Normalgewebe deutlich geringer als im Tumor ausfiel. Von unserem Kollektiv konnten mit der immunhistochemischen Methode 29 Fälle (76,3%) der Gruppe 3 zugeordnet werden. In einem Großteil der Fälle zeigte also der Tumor eine erhöhte c-met-Expression als das ihn umgebende Normalgewebe. Nur in einem Fall (2,6%) fanden wir dagegen eine geringere Reaktion der normal erscheinenden Milchgänge und Lobuli im Vergleich zum DCIS-Gewebe. In 8 Fällen (21,1%) konnte eine stärker positive Reaktion des Normalgewebes nachgewiesen werden. Die Daten der Immunfluoreszenz ergaben eine andere Verteilung. Mit dieser Technik konnten 24 Fälle (61,5%) der Gruppe 2 zugeordnet werden. Die Mehrzahl der Fälle exprimierten also c-met in gleichem Ausmaß im benigne erscheinenden Gewebe wie im DCIS. 14 Fälle (35,9%) im Tumor eine intensivere Reaktion, während in nur einem Fall (2,6%) das Normalgewebe sich stärker auf c-met anfärbte. Mit beiden Methoden konnte also nur ein Fall der Gruppe 1 zugeordnet werden.

Tabelle 4.3: C-met-Expression im Tumorgewebe im Verhältnis zur Expression im Normalgewebe. Ergebnisse der immunhistochemischen und immunfluoreszenten Methode im Vergleich.

	Immunhistochemie (N=38)	Immunfluoreszenz (N=39)
Gruppe 1 N>T	1 (2,6%)	1 (2,6%)
Gruppe 2 N=T	8 (21,1%)	24 (61,5%)
Gruppe 3 N<T	29 (76,3%)	14 (35,9%)

Eine HER2/neu-Überexpression konnte für 20 Fälle (51,3%) festgestellt werden. 19 der 39 Fälle (48,7%) dagegen wurden als 0, 1+ oder 2+ gewertet. Das den Tumor umgebende normal erscheinende Gewebe zeigte in keinem der Fälle eine positive Reaktion. Mit der Immunfluoreszenz wurden positive Signale des DCIS und des umgebenden Normalgewebes gemessen. Als Überexpression konnte nur gelten, wenn der Tumor eine deutlichere Intensität zeigte. Dies beobachteten wir in 17 von 39 Fällen (43,6%).

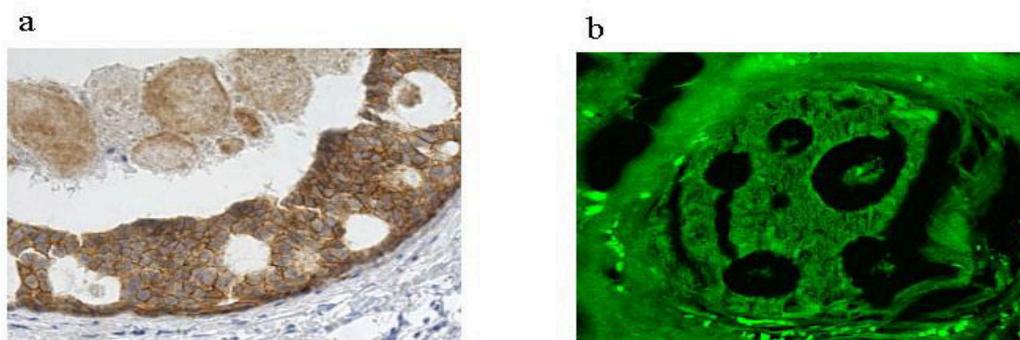


Abbildung 4.6: HER2/neu Expression im DCIS
a, Immunhistochemische Färbung mit anti-c-erbB-2. Die Membranständigkeit der Färbung bedeutet Überexpression von HER2/neu, x200.
b, Immunfluoreszenzfärbung mit FITS-gekoppeltem c-neu, x1000.

Als cut-off zwischen starker und schwacher Expression von HGF/SF wurde ein Score von 3 festgelegt. Dieser entspricht dem Wert, den wir auch für die Auswertung der 40 invasiven nodal-positiven Mammakarzinome verwendet haben (Lengyel et al., 2005). Für HGF/SF zeigten 17 der 39 Fälle (43,5%) eine hohe Expression, während bei 20 Fällen (51,3%) niedrigere Expressionswerte gefunden wurden. Gleichzeitig wurde deutlich, dass das den Tumor umgebende Stroma nur sehr schwach auf die Färbung gegen HGF/SF reagierte.



Abbildung 4.7: Färbung mit anti-HGF im DCIS (cribriform), x200. Das Stroma (Pfeil) zeigt eine geringere Reaktion als das DCIS-Gewebe (gestrichelter Pfeil). Dies weist auf nur wenig parakrine Sekretion von HGF/SF hin.

4.2.3 Überexpression von c-met, HGF/SF, HER2/neu und andere histopathologische Befunde

Die Korrelation zwischen c-met- bzw. HER2/neu-Immunreaktivität und anderen klinisch-pathologischen Charakteristika wurde überprüft. Als klinische Daten standen Tumorgroße, Alter der Patientinnen, Menopausenstatus, Hormonrezeptorstatus, Van Nuys Grading und Ki 67 zur Verfügung. Auch für diese Daten wurde die Korrelation mit den Ergebnissen der Färbungen mittels Immunfluoreszenz und Immunhistochemie analysiert.

Die Expression von c-met wurde mittels einem Fluoreszenz markierten Antikörper bestimmt. Die Intensität im DCIS-Gewebe korrelierte signifikant mit dem Van-Nuys-Grading des Tumors ($p < 0.012$). Je höher die Färbeintensität des DCIS-Gewebes, desto höher das VN-Grading. Mit der immunhistochemischen Färbung konnten wir diese Beobachtung nicht bestätigen, sondern stellten lediglich eine annähernd signifikante Korrelation zwischen der c-met-Expression im Tumor und dem Van Nuys-Grading fest ($p = 0.081$). Da wir mit der immunhistochemischen Färbung keinen direkten Zusammenhang zwischen der absoluten c-met-Intensität und dem Van Nuys-Grading des Tumors fest stellen konnten, untersuchten wir die Fälle, die Unterschiede in der c-met-Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe aufwiesen. Dabei fassten wir Gruppe 1 und 3 als eine Gruppe zusammen, die durch die unterschiedliche Expression von c-met im DCIS und Normalgewebe charakterisiert war. 14 der 15 Fälle, die als VN3 klassifiziert waren, wiesen Differenzen in der c-met-Expression zwischen DCIS und umgebendem Normalgewebe auf. Dies bedeutete wiederum in 13 der 14 Fälle eine höhere Intensität der neoplastischen im Vergleich zu normalen Zellen. Nur in einem Fall, der als VN3 beschrieben werden konnte, exprimierten Normal- und Tumorgewebe c-met in gleichem Maße. Die Analyse der Immunfluoreszenz bestätigte diese Beobachtungen. 13 der als VN3 eingestuften Fälle exprimierten c-met im DCIS höher oder niedriger als im Normalgewebe. Um diese Verhältnisse aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten, wurden die Gruppe 1 und 3 auf ihr VN-Grading überprüft. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung ergab in der Gruppe 1 und 3 für 46,7% der Fälle die

VN-Klassifizierung 3, während es in der Gruppe 2 (N=T) nur 12,5% waren. Diese Tendenz war in der Immunfluoreszenz noch ausgeprägter. Dort waren 86,7% der Fälle in Gruppe 1 und 3 VN3, während nur 8,3% der Fälle in Gruppe 2 das höchste VN-Grading zeigten.

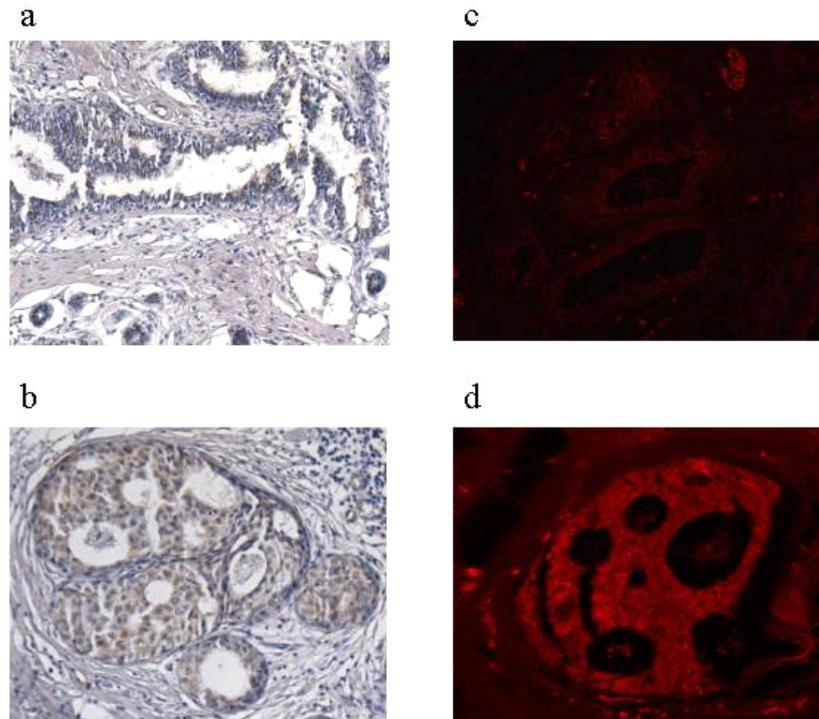


Abbildung 4.8: C-met-Expression im Tumor- und Normalgewebe

Der Großteil der Tumoren, die als VN3 klassifiziert wurden, weist gleichzeitig Differenzen in der c-met-Expression zwischen DCIS und umgebendem Normalgewebe auf. Die gepaarten Aufnahmen zeigen jeweils Normal- (a, c) und DCIS-Gewebe (b, d). Beide Methoden zeigen dasselbe Expressionsmuster.

a, b, Immunhistochemische Färbung mit h-met. Das DCIS-Gewebe zeigt eine deutlich stärkere Expression als das umgebende Normalgewebe, x100.

c, d Konfokale Immunfluoreszenz Technik mit Rhodamin-gekoppeltem h-met. Dieselben Expressionsunterschiede zeigen sich auch mit dieser Technik, x1000.

Die unterschiedliche c-met-Expression im DCIS und umgebenden Normalgewebe hatte keinen Zusammenhang mit Alter der Patientinnen, Tumorgröße, Hormonrezeptorstatus, HGF- oder Ki 67-Expression. In Bezug auf diese klinischen Variablen konnte weder für die HER2/neu Expression, noch die c-met-Expression eine Korrelation beobachtet werden.

Ki 67 korrelierte signifikant zum HGF-Score ($p=0,032$) und der Tumorgröße ($p=0,008$).

5. DISKUSSION

5.1 Etablierung einer Doppelfärbetechnik von c-met und Zytokeratin (CK)

5.1.1 Etablierung neuer Techniken zum Nachweis disseminierter Tumorzellen

Die Mischungsexperimente können als Imitation der Situation im Knochenmark des Patienten gesehen werden. Daher sind sie die *in vitro*-Bedingungen für die immunzytochemische Analyse disseminierter Tumorzellen. Wir konnten Zytokeratin-positive MCF-7-Zellen mit zwei voneinander unabhängigen Methoden eindeutig von normalen Knochenmarkszellen unterscheiden und dadurch detektieren. Selbst in einem Mischungsverhältnis von 1:10⁶, welches annähernd die Dimensionen im Patientenmaterial widerspiegelt, war dies möglich. Der Nachteil dieser Methode ist vor allem ihr großer zeitlicher Aufwand. Daher ist es z.Zt. nicht möglich, sie als Screeningmethode routinemäßig einzusetzen. Gerade die mikroskopische Analyse einer großen Anzahl zytologischer Präparate kostet viel Zeit. Ein automatisches Analysesystem, welches gefärbte Objektträger durchscant, könnte diese Arbeit erheblich erleichtern. Auch der geringen Anzahl der Tumorzellen, teilweise nur 1 Zytokeratin-positive Zelle pro 2 x 10⁶ mononukleäre Knochenmarkszellen (Braun et al., 2000), könnte auf diese Weise begegnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass automatisierte Techniken dieselbe Sensitivität aufweisen wie manuelle Verfahren (Borgen et al., 2001). Außerdem ist die Reliabilität erheblich höher und die Ergebnisse sind nicht nur von Tag zu Tag reproduzierbar, sondern auch geräteunabhängig (Kraeft et al., 2000). Es bleibt die Tatsache, dass pro Patient mindestens 2 x 10⁶ Zellen untersucht werden müssten, um eine zufriedenstellende Sensitivität zu erreichen. Die Sensitivität ist auch in unserem Ansatz zu diskutieren, da solche Mischungsexperimente die Wirklichkeit nur unzureichend abbilden. Während die verwendete Tumorzelllinie aus einander sehr ähnlichen, homologen Zellen besteht, können die in Patientenmaterial zu detektierenden Zellen sehr heterogen sein. Diese Heterogenität kann die Sensitivität einer Methode erheblich beeinflussen.

Problematisch sind auch die kleinen Probevolumina. Um diese zu umgehen, könnten die Tumorzellen angereichert werden. Neben der Zellkultur kommen physikalische Trennmethode in Betracht. Es ist möglich, Tumorzellen über magnetbeladene Beads (antikörperbeladene magnetische Partikel) zu detektieren und sie dann in einem Magnetfeld anzureichern. Hierbei kann man eine Anreicherung über mehrere Logarithmuseinheiten erreichen (Naume et al., 1998). Eine hohe Sensitivität und Spezifität in der Detektion von Tumorzellen konnte für mit dem monoklonalen Antikörper Ber-EP4 beladene Magnetbeads bewiesen werden (Nekarda et al., 1999). Die klinische Bedeutung dieser

Anreicherungsverfahren ist noch unzureichend belegt (Martin et al., 1998; Naume et al., 1997; Racila et al., 1998; Otte et al., 2000).

Außerdem sind als Alternative zu immunzytochemischen Nachweisverfahren biochemische Methoden denkbar. Ein Enzymimmunoassay (ELISA), der monoklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope des CK-19 verwendet, konnte bereits etabliert werden (Hoechtlen-Vollmer et al., 1997). Dieser detektiert 10 Zellen der Kolonkarzinom-Zelllinie HAT-29 in 5×10^6 peripheren Blutlymphozyten. Die Tatsache, dass die nachzuweisende Zellzahl wahrscheinlich unter diesem Wert liegt, könnte allerdings ein Hindernis darstellen.

Auch molekulare Nachweisverfahren sind immer bedeutender geworden. Mit Hilfe der PCR-Technik lassen sich auch kleinste Mengen cDNA disseminierter Tumorzellen nachweisen (von Knebel-Doeberitz et al., 1996). Entscheidend dafür ist selbstverständlich ein abweichendes mRNA-Muster von dem, der sie umgebenden hämatopoetischen Zellen. Außerdem muss der entsprechende Primärtumortyp genotypisiert werden, um geeignete Primer herstellen zu können. Auch dieses Verfahren sprengt z.Zt. noch den Rahmen klinischer Routine. In Kenntnis tumorspezifischer DANN-Abschnitte, z.B. von Tumormarkern, ließe sich die mRNA der Zellen mittels der reversen Transkriptase in cDNA umschreiben und diese in der anschließenden PCR-Reaktion vervielfachen (Gribben et al., 1991; Harris et al., 1993; Hayashi et al., 1994; Riethmüller et al., 1994). Hier ist bislang noch die Spezifität problematisch, da mit der PCR auch die mRNA der im Überschuss vorhandenen hämatopoetischen Zellen vorliegt. Diese kann leicht zu falsch positiven Resultaten führen. Quantitative RT-PCR-Methoden, die die Anzahl der vorliegenden Genkopien bestimmen, könnten hier Abhilfe schaffen. Auf diese Weise wird ein Grenzwert ermittelt, der die Unterscheidung zwischen malignen und nicht-malignen Zellen zulässt (Slade et al., 1999). Mit Hinblick auf die prognostische Bedeutung ist es dann auch von Bedeutung, diejenigen mRNA-Marker auszuwählen, die z.B. mit der Aggressivität des Tumors zusammen hängen und nicht nur solche, die lediglich das Vorliegen einzelner Tumorzellen beweisen (Varangot et al., 2005).

Durchflusszytometrische Methoden wurden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen bei Lymphom- und Leukämiepatienten verwendet (Jennings et al., 1997; Ciudad et al., 1998). Auch hier ist die niedrige nachzuweisende Zellzahl ein methodisches Problem, so dass eventuell zusätzliche Anreicherungsverfahren benötigt werden. Die Untersuchung der klinischen Bedeutung dieses Verfahrens für epitheliale Tumoren steht bislang noch aus.

5.1.2 C-met und Zelladhäsion

Die Untersuchungen an Knochenmark von Brustkrebspatientinnen ergaben, dass sich Mikrometastasen auch dann schon nachweisen lassen, wenn die Krankheit noch in einem niedrigen Stadium ist (Braun et al., 1998). Weiterhin befindet sich ein Großteil der disseminierten Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus, so dass die Wirksamkeit einer systemischen Chemotherapie hinsichtlich dieser nicht proliferierenden Zellen reduziert ist. Das macht sie als Ziel für eine Antikörpertherapie interessant, da diese gezielt auf bestimmte Eigenschaften der Zelle ausgerichtet ist und unabhängig vom Proliferationsstadium wirkt.

C-met könnte als Tyrosinkinase-Rezeptor ein mögliches Ziel in der Antikörpertherapie sein. Die Phänotypisierung von disseminierten CK-positiven Zellen dient dem Ziel, festzustellen, ob sie über weitere Eigenschaften verfügen, die sie von den mesenchymalen Zellen des Knochenmarks unterscheiden, und ob diese Eigenschaften einen Rückschluss auf ihr Verhalten zu lassen. Außerdem macht sie potentielle therapeutische Zielstrukturen auf diesen disseminierten Zellen sichtbar. Unsere Ergebnisse zeigen, dass MCF-7-Zellen nicht nur aufgrund ihres epithelialen Ursprungs identifiziert werden können, sondern dass auch die Expression von c-met mit zwei verschiedenen Methoden nachgewiesen werden kann. Zwar legen die immunhistochemischen Verfahren nahe, dass auch Knochenmarkszellen geringe Mengen c-met exprimieren, dennoch zeigen die MCF-7-Zellen eine stärkere Intensität und deutlichere Membranständigkeit. Gerade vor diesem Hintergrund kommt der Etablierung einer Doppelfärbung besondere Bedeutung zu, um mit Hilfe der Zytokeratin-Färbung den epithelialen Ursprung der Zellen zu bestätigen. Zieht man jedoch eine therapeutische Anwendung in Betracht, gilt es, auch die physiologischen Funktionen von c-met/HGF/SF zu bedenken, die dadurch möglicherweise ebenfalls inhibiert werden. In der immunfluoreszenten Färbung ließen sich MCF-7-Zellen eindeutig als CK- und c-met-positiv von Knochenmarkszellen unterscheiden. Weiterhin machten wir die Beobachtung, dass das Signal auf die c-met-Färbung vor allem an Zell-zu-Zell-Kontakten besonders ausgeprägt ist. Dies wurde vor allem mit der immunfluoreszenten Technik deutlich. Da es sich in der konfokalen Analyse um Aufnahmen in einer definierten Ebene handelt, die weniger als 0,5 µm beträgt, kann weitestgehend ausgeschlossen werden, dass es sich um Überlagerungsphänomene von Zellmembranen handelt. Ebenso kann die Expression von c-met nicht durch endogen im Knochenmark gebildetes HGF/SF verstärkt worden sein, weil die Zellen vor dem Mischungsexperiment fixiert wurden. Mit der Immunhistochemie konnten wir die Membranständigkeit des Rezeptors zeigen. Damit bestätigen wir die Beobachtungen, dass c-met vor allem in Regionen der interzellulären Adhäsion exprimiert wird (Tsukita et al.,

1991). Da MCF-7-Zellen nicht nur c-met exprimieren, sondern auch E-Cadherin-positiv sind, wurden mögliche Wechselwirkungen von beiden untersucht (Hiscox et al., 1999a). Immunfluoreszente Färbungen zeigten, dass beide sich in der Zellperipherie befanden und dort ko-lokalisiert waren. Außerdem konnten E-Cadherin und β -Catenin in c-met-Immunpräzipitaten nachgewiesen werden, was ebenfalls die physikalische Verbundenheit der drei Moleküle bestätigte. In MCF-7-Zellen ist also die c-met mit der Expression von E-Cadherin und β -Catenin assoziiert.

Um die Zellmorphologie und die Integrität des Gewebes aufrecht zu erhalten, ist eine intakte Adhäsion des Zellverbandes erforderlich. Diese macht die Verbindung von E-Cadherin mit dem Aktin-Zytoskelett unabdingbar, was durch Proteine der Familie der Catenine (α , β , γ und p120) gewährleistet wird (Aberle et al., 1997). C-met scheint die Phosphorylierung von β -Catenin nicht über eine separate Kaskade, sondern allein über intrinsische Kinase Aktivität zu beeinflussen. Die Stimulation von c-met durch seinen Liganden HGF/SF hat die Phosphorylierung von β -Catenin und damit den Verlust der Zell-zu-Zell-Adhäsion zur Folge (Hiscox et al., 1999b). β -Catenin interagiert seinerseits mit der membranständigen Protein-Tyrosin-Phosphatase PTP μ (Brady-Kalnay et al., 1998). Diese wiederum reguliert die Phosphorylierung verschiedener Zellproteine. Sie könnte über diesen Weg die Phosphorylierung und damit die Aktivität von c-met selbst steuern.

Nicht nur *in vitro*, sondern auch an Patientenmaterial wurde der Zusammenhang zwischen c-met-Expression und Zelladhäsionsmolekülen untersucht. In invasiven Tumoren der Brust konnte die Korrelation von c-met- und β -Catenin-Expression gezeigt werden (Nakapoulou et al., 2000). Genauso wie Jones et al. (Jones et al., 1996) beobachteten sie außerdem die Korrelation vom vollständigen oder teilweisen Verlust der E-Cadherin und β -Catenin-Expression mit dem Vorkommen von Lymphknotenmetastasen.

Die Tatsache, dass der Verlust des intakten Zell-zu-Zell-Kontaktes den ersten Schritt zur Invasion und Metastasierung darstellt und c-met entscheidend an der Regulation dieses Geschehens beteiligt ist, macht die Untersuchung von c-met an disseminierten Tumorzellen im Knochenmark besonders interessant. Unsere Methode, c-met auf MCF-7-Zellen in Mischungspräparaten zu detektieren und seine Lokalisation an Stellen der Zelladhäsion zu bestätigen kann als Anfang zu weiteren Untersuchungen gesehen werden.

Wir haben bereits den c-met-Status von Primärtumoren und ihren Lymphknotenmetastasen analysiert (Lengyel et al., 2005). Die Ergebnisse bestätigten ebenfalls die Beobachtung, dass sich die Überexpression von c-met im Primärtumor auch in der korrespondierenden Lymphknotenmetastase wieder findet. Denkbar wäre die

Untersuchung von Primärtumoren im noch nicht metastasierten Stadium und die gleichzeitige Analyse möglicherweise schon zu diesem Zeitpunkt verstreuter Tumorzellen im Knochenmark. Die Immunfluoreszenz erlaubt uns nicht nur eine qualitative Aussage über die Expression bestimmter Proteine, sondern könnte auch dazu beitragen, die Expression von c-met und anderen Antigenen zu quantifizieren (Tsarfaty et al., 1999). Unsere Untersuchungen am duktalem Carcinoma in situ implizieren ebenfalls, dass es möglicherweise vom Expressionsmuster abhängt, wie sich das Vorhandensein von c-met auf Progression und Invasion eines Tumors auswirkt. Weiterhin müssten die Interaktionen von c-met, seinem Liganden HGF/SF und Adhäsionsmolekülen der Cadherin/Catenin-Familie näher untersucht werden. Neben immunzytochemischen Methoden, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt wurden, ist sicherlich die Anwendung molekularbiologischer Methoden sinnvoll. Neben der Standardisierung der Nachweisverfahren sollte die Reproduzierbarkeit und Objektivierbarkeit der Ergebnisse im Vordergrund stehen. Mit der möglichen Quantifizierung der Signale in der Immunfluoreszenz wäre zumindest die Forderung nach objektivierbaren Ergebnissen erfüllt.

Die unterschiedlichen Funktionen, die c-met und HGF/SF während Tumorentstehung, Progression, Invasion und Metastasierung übernehmen können, sind noch lange nicht vollständig geklärt. Mammatumore in den verschiedenen Stadien, von der in situ-Läsion bis zur metastasierten Brustkrebserkrankung, stellen eine Entität dar, die Rückschlüsse auf die Rolle von c-met und seinem Liganden in dieser Entwicklung zulässt. Vergleichende Untersuchungen in den unterschiedlichen Stadien stehen noch aus. Die Methode, die in dieser Doktorarbeit entwickelt und angewendet wurde, macht diese Untersuchungen möglich.

5.2 Untersuchung von c-met, HGF/SF und HER2/neu im duktalem Carcinoma in situ der Brust

5.2.1 Vergleichbarkeit zweier Methoden: Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Wir haben die Expression von c-met und HER2/neu mittels zweier unterschiedlicher Methoden überprüft. Die meisten unserer Ergebnisse mit der immunhistochemischen Technik wurden von der konfokalen Immunfluoreszenzanalyse bestätigt. Mit beiden Methoden konnten wir zeigen, dass die DCIS-Komponente und das umgebende Normalgewebe bei der Expression von c-met korrespondieren. Je stärker sich die neoplastischen Zellen färbten, desto größer war auch die Reaktion des umgebenden Gewebes. Außerdem bewiesen beide Techniken, dass die DCIS, die als besonders aggressiv - nämlich als VN3 - eingestuft worden sind, Differenzen in der c-met-Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe aufweisen. Dabei zeigte sich in der Mehrzahl der Fälle eine stärkere Reaktion des Tumors im Vergleich zum Normalgewebe. Mit beiden Methoden beobachteten wir, dass c-met unabhängig von HER2/neu exprimiert wird und beide Rezeptoren keine nachweisbare Korrelation zeigen.

Neben diesen korrespondierenden Ergebnissen kamen wir abhängig von der Methode aber auch zu unterschiedlichen Ergebnissen. Betrachteten wir nur die c-met-Expression im Tumor mit den beiden Methoden, konnte keine Korrelation festgestellt werden. Dasselbe galt für die Intensitäten des normalen Gewebes. Auch die Verteilung auf die Gruppen, abhängig von Differenzen in der Expression zwischen DCIS und normal erscheinenden Zellen, war nicht identisch. Mit der immunhistochemischen Färbung beobachteten wir in den meisten Fällen eine stärkere Expression des Tumors, während die Immunfluoreszenz zu dem Ergebnis kam, dass ein Großteil der DCIS c-met in gleicher Intensität wie das Normalgewebe exprimiert.

Zunächst ist festzustellen, dass beide Techniken mit Antikörpern arbeiten, um ein bestimmtes Protein, den Rezeptor, zu detektieren. Dabei sind diese Antikörper an Substrate gekoppelt, die sichtbar gemacht werden können. In der Immunhistochemie haben wir die DAB-Färbung verwendet, die Immunfluoreszenz arbeitet mit Antikörpern, die an FITC und Rhodamin gekoppelt sind. Hinsichtlich der Entstehung des optischen Bildes und bei der anschließenden Interpretation der Ergebnisse ist den systemimmanenten Besonderheiten Rechnung zu tragen.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Methoden liegt in dem Ausschnitt, der für die Auswertung der Färbung betrachtet wird. Die immunhistochemische Färbung ist dabei die Summe der Färbung auf dem gesamten Schnitt. Die Intensität nimmt also mit dem Volumen an Gewebe zu. Einzelne Komponenten der Zelle können bis auf die Zellmembranen

und den Hintergrund nicht unterschieden werden. Mit der CLSM-Technik ist die Ebene exakter definiert. Mit der definierten Ebene „Z“ ist ein sehr viel geringeres Volumen von ca. 0,5 μm beschrieben. Die gemessenen Emissionen sind auf diesen Ausschnitt beschränkt. Außerdem ist die CLSM-Aufnahmetechnik mit einer höheren Vergrößerung verbunden. Diese ist meist 40fach, während die immunhistochemische Färbung bei einer zehnfachen Vergrößerung begutachtet wird. Die gemessenen Intensitäten hängen weiterhin von der Wellenlänge des verwendeten Lasers, der Ausleuchtung, der gewählten Ebene und anderen technischen Parametern ab. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Immunfluoreszenz zu erzielen, müssen diese Bedingungen standardisiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte dies für sämtliche Aufnahmen gewährleistet werden. Unsere unterschiedlichen Ergebnisse, die c-met-Expression im Tumor und im Normalgewebe betreffend, könnten auf diese Unterschiede in der optischen Ebene zurückzuführen sein. Trotzdem kommen beide Methoden zu dem Ergebnis, dass Tumor und das umgebende Normalgewebe dasselbe Expressionsmuster zeigen. Diese Ergebnisse können auf verschiedene Weise interpretiert werden. Möglicherweise ist die Ausprägung von c-met im DCIS abhängig von dessen Expression im Normalgewebe bzw. vice versa. Dies würde die Untersuchungen von Jin et al. (Jin et al., 1997) bestätigen, der dies bereits für infiltrative Brusttumore zeigen konnte. Auch dort exprimieren normal erscheinende Milchgänge und Lobuli neben infiltrativen Tumoranteilen deutlich mehr c-met als dieselben Gewebeabschnitte innerhalb benigner Läsionen. Diese Beobachtungen legen die Annahme nahe, dass es eine Form der Interaktion zwischen dem Tumor und dem ihn umgebenden Gewebe gibt. Tatsächlich werden von Tumorzellen Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF-alpha gebildet, die die c-met-Expression regulieren (Moghul et al., 1994). Diese vom Tumorgewebe freigesetzten Faktoren können zu einer höheren Expression von c-met im umgebenden Gewebe führen. Die Tatsache, dass die einzelnen Expressionswerte des Normal- bzw. Tumorgewebes nicht korrelieren, das Verhältnis der Expression zwischen Tumor und Normalgewebe auf demselben Schnitt dagegen schon, könnte aber auch in der Methode begründet liegen. Die Beobachtung, dass die c-met-Expression im Normalgewebe mit der Expression im Tumor korreliert, bezieht sich schließlich auf Schnitte, die nach dem gleichen Prinzip behandelt wurden. Da aber ein Tumor, der immunhistochemisch eine hohe c-met-Expression zeigt, und dies nicht unbedingt auch in der immunfluoreszenten Färbung zutrifft, macht einen systematischen Fehler wahrscheinlich. Das Anwenden manueller Färbetechniken mit manuell ausgeführten Waschschritten unterstützt das Auftreten systematischer Fehler.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Methoden, der zu eingeschränkter Vergleichbarkeit der Ergebnisse führt, liegt in der Vorbehandlung des Gewebes. Um die Intensität und Reproduktion der Färbung zu steigern, wurden verschiedene Methoden zur Vorbehandlung etabliert. Diese wurden vor dem Hintergrund entwickelt, dass jede Form der Fixierung die Detektion von Antigenen beeinflusst. Diese Maskierung rückgängig zu machen, war das Ziel des „Antigen Retrieval“. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt, so dass der praktische Nutzen sich allein daraus ableitet, die Fixierung umzukehren. Neben dem Andauen durch Enzyme, stellt das Erhitzen der Schnitte die einfachste Methode dar. Da das Vorgehen leicht zu standardisieren ist und die Ergebnisse sich als reproduzierbar erwiesen, griffen wir bei den histochemischen Färbungen darauf zurück. Dies gilt sowohl für die Färbungen an Gewebeschnitten wie auch an Einzelzellen. Bei den immunfluoreszierenden Färbungen verzichteten wir auf diese Methoden des Antigen-Retrievals. Unterschiede in der Bewertung der Färbung könnten also darauf zurückzuführen sein, dass c-met und HER2/neu in beiden Methoden nicht gleichermaßen frei liegen. Dennoch wurden alle Schnitte einer Färbung gleich behandelt, so dass die Ergebnisse innerhalb der beiden Methoden vergleichbar bleiben.

Eine ebenso wichtige Rolle kommt den verwendeten Antikörpern zu. Im Fall von c-met handelt es sich in beiden Techniken um den polyklonalen Antikörper h-met, C-28. Zur Detektion der HER2/neu-Expression wurden dagegen verschiedene Primärantikörper verwendet. Für die immunhistochemischen Färbungen diente der polyklonale Antikörper anti-c-erbB-2, während die immunfluoreszierenden Färbungen mit dem an FITC gekoppelten monoklonalen c-neu-Antikörper durchgeführt wurden. Monoklonale Antikörper erkennen per definitionem nur einen Bruchteil der Antigene, die ein polyklonaler detektiert. Für die immunfluoreszierenden Färbungen war außerdem kein positiver und negativer Standard für HER2/neu definiert. In der Immunhistochemie verwendeten wir als Positivkontrolle Gewebe eines invasiven Mammakarzinoms, dessen Her2/neu-Überexpression bekannt war. Um die Vergleichbarkeit der Methoden zu optimieren, müsste dasselbe Vorgehen wie für c-met gewählt werden. Die Zelllinie NIH 3T3 wurde mit dem Gen transfiziert, das für c-met kodiert. Es entstand die in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle verwendete Zelllinie S114 (Rong et al., 1993). Diese wurde auf dieselbe Weise präpariert und fixiert, so dass ein Vergleich mit den Gewebeschnitten möglich war. In der vorliegenden Arbeit wurde als Negativkontrolle Gewebe verwendet, das unter Weglassen des Primärantikörpers gefärbt worden war. Um diese Negativkontrolle zu optimieren, müsste mit einem Peptid gearbeitet

werden, das c-met nachweisbar blockiert (Tsarfaty et al., 1992). Nur so wäre eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers sicher auszuschließen.

Um zu einer Einteilung in die Gruppen 1 ($N>T$), 2 ($N=T$) und 3 ($N<T$) zu gelangen, musste zunächst festgelegt werden, welche Unterschiede als solche gewertet werden sollten. In der Immunhistochemie galt dies als gegeben, wenn der Quotient aus $T/N \neq 1$ war. Diese Ergebnisse sind also untersucherabhängig, entsprechend empfindlich für Fehler. Die Immunfluoreszenz berechnete die Differenz nach einem von Tsarfaty et al. (Tsarfaty et al., 1999) etablierten Algorithmus. Dieser Index (Dv) basiert zwar auch auf dem Quotienten von Tumor- und Normalgewebe (Ratio), setzt aber Differenzen von mindestens zwei Standardabweichungen vom Mittelwert dieser Ratios voraus. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen ergab nur wenige Fälle, in denen Tumor- und Normalgewebe in gleichem Maße c-met exprimieren. Die Immunfluoreszenz sah dagegen den Großteil der Fälle in dieser Gruppe. Übereinstimmend fanden beide Methoden nur einen Tumor, der c-met schwächer als das umgebende Normalgewebe exprimiert. Eigentlich liegt die Vermutung nahe, dass ein rechnergestütztes Programm geringere Unterschiede in der Expression wahrnimmt als das menschliche Auge. Die Definition des beschriebenen Index hilft, zu kleine Unterschiede nicht als solche zu erkennen. Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen liegt ein entsprechender Index bislang nicht vor. Beide Methoden kamen zu dem Ergebnis, dass vor allem die als VN3 klassifizierten DCIS Differenzen in der c-met-Expression aufwiesen. Für die Immunfluoreszenz traf dies in 86,7% der Fälle zu. Dagegen waren nur 46,7% der Fälle mit unterschiedlicher immunhistochemischer Expression von c-met VN 3 zuzuordnen. Die mit Hilfe des Index festgestellten Ratios haben also eine höhere Aussagekraft bezüglich des VN-Gradings als die mit dem menschlichen Auge festgestellten Unterschiede in der Expression. Dieses Ergebnis macht deutlich, wie wichtig die Definition einer Standardabweichung ist, wenn es um die Untersuchung der Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe geht. Die Verwendung molekularbiologischer Methoden bei der Beurteilung der Expression ist dem immunhistochemischen Nachweis sicherlich zusätzlich überlegen.

5.2.2 C-met, HGF/SF und HER2/neu im duktalem Carcinoma in situ

Die c-met-Färbung im DCIS war zu jeweils gleichen Teilen im Zytoplasma und membranständig lokalisiert. Eine charakteristische Verteilung der Färbung, wie wir sie bei invasiven Mammatumoren beobachteten, konnten wir nicht nachweisen. Dort beobachteten wir in den Tumorzellen eine zum Teil deutliche Membranständigkeit der Färbung. Dies traf

auf 28% der invasiven Tumore zu. Diese Verteilung hatte auch prognostische Bedeutung, da diese Tumoren aggressiver waren und das rezidivfreie Überleben der Patientinnen deutlich kürzer war. Signifikant wurde der Unterschied allerdings erst, wenn wir die Gesamtintensität, also Membran und Zytoplasma, beurteilten. Die Tumore, die sowohl in der Membran also auch im Zytoplasma c-met überexprimierten, hatten eine signifikant schlechtere Prognose (Lengyel et al., 2005). Die Tatsache, dass das duktales Carcinoma in situ eine andere Verteilung der Färbung und insgesamt eine niedrigere Intensität der Färbung zeigt, kann an sich schon als wichtiger Unterscheid zu den invasiven Tumoren gerechnet werden. Möglicherweise ist das Expressionsmuster entscheidend dafür, welche Rolle c-met für Progression und Invasivität des Tumors spielt. Unsere Beobachtung an den Einzelzellen, dass die c-met-Färbung besonders an Zell-zu-Zell-Kontakten ausgeprägt ist, und die Tatsache, dass c-met dort mit Adhäsionsmolekülen der Cadherin/Catenin-Familie interagiert (Hiscox et al., 1999b), könnte auf eine besondere Funktion von membranständigem c-met bei der Invasion und Progression eines Tumors spielen. Die von HGF/SF vermittelte Autophosphorylierung führt ausserdem zu der gestörten Funktion von Cadherinen, die das invasive Wachstum supprimieren (Shibamoto et al., 1994). Die fehlende Invasivität des duktales Carcinoma in situ ist möglicherweise zum Teil im Fehlen der c-met-Membranständigkeit begründet.

Die Untersuchung der c-met-Expression im Tumorgewebe ergab mit der konfokalen Immunfluoreszenztechnik eine signifikante Korrelation mit ungünstigen pathologischen Eigenschaften des Tumors, wie die Einstufung als VN3 verdeutlicht. Diese wenig differenzierten Tumoren haben ein höheres Risiko zu rezidivieren. Mit konventioneller Immunhistochemie konnten wir diese Korrelation nicht bestätigen. In unserer Studie an 40 nodal-positiven Mammatumoren hatten die Patientinnen die schlechteste Prognose, deren Tumor hohe Level an c-met exprimierten (Lengyel et al., 2005). Tsarfaty et al. (Tsarfaty et al., 1999) beobachteten an 182 Mammakarzinompatientinnen ebenfalls, dass diejenigen hinsichtlich Gesamt- und Rezidivfreien-Überleben die schlechteste Prognose hatten, deren Tumor c-met stärker als das ihn umgebende Gewebe exprimierte. Aber es gibt auch Anhaltspunkte dafür, dass sich niedrige c-met-Expression negativ auswirkt. So erhöht z.B. beim papillären Schilddrüsenkarzinom die niedrige bis fehlende c-met-Expression das Risiko für Fernmetastasen (Belfiore et al., 1997). In der Untersuchung von nodal-negativen Brusttumoren hatte die Gruppe, in der der Tumor weniger c-met als das ihn umgebende Gewebe exprimiert, eine signifikant kürzere Überlebenszeit. Um herauszufinden, ob die hohe und/oder niedrige c-met-Expression mit anderen pathobiologischen Eigenschaften des Tumors korrelierten und welche Rolle das Verhältnis der Expression zwischen DCIS und

Normalgewebe spielte, bildeten wir Untergruppen, die diese Differenzen repräsentieren. Da wir in unserem Kollektiv keine Rezidive hatten, konnten wir die Aggressivität der DCIS-Tumore nur anhand der histopathologischen Kriterien beschreiben. Mehrheitlich unter denen, die eine unterschiedliche Expression von c-met zwischen Tumor und Normalgewebe aufwiesen, fanden sich Tumore, die gleichzeitig als Van Nuys 3 klassifiziert waren. Beide immunzytochemischen Untersuchungen kamen zu diesem Ergebnis, wobei diese Tendenz bei Auswertung der immunfluoreszenten Färbungen noch eindeutiger war. Diese Beobachtung bestätigt die Hypothese, dass jede Imbalance in der c-met-Expression zu einer geringeren Differenzierung und höheren proliferativen Aktivität des Tumors führt (Firon et al., 2000).

An Tumorzellen mit hoher c-met-Expression konnte nicht nur fehlreguliertes Wachstum und geringere Differenzierung (Firon et al., 2000), sondern auch größeres Invasivitäts- und Metastasierungspotential (Rong et al., 1992; Jeffers et al., 1996a; Beviglia et al., 1997) nachgewiesen werden. Vor allem die ersten beiden Eigenschaften sind in der Gruppe T>N überrepräsentiert und charakterisieren somit einen besonders aggressiven Phänotypen des DCIS. Weiterhin gibt es Hinweise, dass c-met sich auch in niedriger Expression nachteilig auswirken kann, gerade weil es für die weitere Differenzierung essentiell ist. Ist c-met also nicht in ausreichender Quantität exprimiert, ist eine vollständige Differenzierung der Zellen nicht möglich (Tsafarty et al., 1997). Möglicherweise wirken sich niedrige c-met-Level nur solange negativ auf die Differenzierung der Zellen aus, wie die interzellulären Kontakte noch intakt sind. Nur dann wird die Kaskade hin zu vollständiger Differenzierung unterbrochen. Sind diese Zell-zu-Zell-Kontakte bereits gestört und unterbrochen, führen hohe c-met-Level zu gesteigerter Invasivität und Metastasierung (Vande Woude et al., 1997).

Neben der Balance in der c-met-Expression zwischen dem Tumor und seiner Umgebung gibt es Hinweise, dass sich c-met auch mit seinem Liganden HGF/SF in einer dynamischen Beziehung befindet und beide einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorzellprogression ausüben (Beviglia et al., 1997). Solange beide in einem Gleichgewicht sind, kann die Differenzierung der Zellen ungestört ablaufen. Auf diese Weise wird eine intakte Histologie und Architektur des Gewebes aufrechterhalten. Auch die Morphogenese des Mammagewebes, die mit Epithelproliferation, Bildung der Milchgänge und Invasion des umgebenden Bindegewebes verbunden ist, verläuft auf diese Weise kontrolliert und reguliert. Wird dieses Gleichgewicht gestört, gewinnen andere von c-met und seinem Liganden ebenfalls gesteuerte Vorgänge die Überhand: Mitose und Motilität. Diese Eigenschaften sind Voraussetzungen für Tumorstadium, -verbreitung und -invasion. Auch in unserer Studie an

invasiven Mammakarzinomen war die gleichzeitige Überexpression von c-met und HGF/SF prognostisch ungünstig (Lengyel et al., 2005). HGF/SF wird von Tumorzellen exprimiert und es gibt Hinweise, dass HGF/SF als Ligand die c-met-Expression steuert (Rahimi et al., 1996). Die gleichzeitige Expression von Ligand und Rezeptor ist also ein selektiver Vorteil in der Progression zu noch aggressiveren Zellen, da diese Zellen dann unabhängig von der HGF/SF-Sekretion des umgebenden Gewebes sind.

Die Beobachtung, dass sich in diesem Kollektiv die Überexpression von HGF/SF bei gleichzeitig niedriger c-met-Expression prognostisch günstig auswirkt, könnte mit den unterschiedlichen Signaltransduktionswegen zusammenhängen, die der Phosphorylierung von c-met folgen. Die Überexpression von c-met führt über die Aktivierung der MAPK-Kaskade zu mitogenen Effekten. Bei niedriger c-met-Expression dagegen aktiviert HGF/SF die Signaltransduktion über STAT, was wiederum zu Differenzierung und Tubulogenese führt. Diese Charakteristika wirken sich eher prognostisch günstig aus.

Neben der autokrinen Regulation, wird HGF/SF auch vom umgebenden Stroma sezerniert. Diese parakrine Sekretion könnte ein entscheidender Faktor für das Entstehen von Metastasen sein. Interessanterweise sind besonders zwei Organe Ort hoher Inzidenz an Fernmetastasen solider Tumoren: Die Lunge und die Leber. Beide weisen hohe Level an HGF/SF auf (Zarnegar et al., 1993). Die Spezifität von humanem c-met für humanes HGF/SF reduziert bzw. unterdrückt die Fähigkeit von c-met-transfizierten Tumorzellen, tatsächlich Tumoren im Tierversuch zu induzieren (Rong et al., 1992). Dies kann als weiterer Anhaltspunkt für eine notwendige parakrine Sekretion des umgebenden Gewebes gelten (Jeffers et al., 1996). Die epithelialen Drüsenzellen der Brust weisen eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber den mitogenen Effekten von HGF/SF auf (Rubin et al., 1991), was auf dessen Rolle bei der Entstehung von Mammatumoren deuten könnte.

Ein weiterer Faktor, entscheidend für die Invasivität von Tumoren, ist uPA. Diese Protease ist für die proteolytisch aktive Oberfläche verantwortlich, indem sie Zell-assoziiertes Plasminogen zu Plasmin aktiviert. Plasmin und aktivierte Metalloproteasen bauen Komponenten des Tumorstromas (Fibrin, Fibronectin usw.) ab und führen über weitere Zwischenschritte zum Abbau von Kollagen Typ IV, einem wesentlichen Bestandteil der Basalmembran. Dies ist das entscheidende Merkmal von Invasivität und Metastasierungspotential. HGF/SF induziert die Expression von uPA (Jeffers et al., 1996b) und dessen zellulärem Rezeptor uPAR. uPA kann seinerseits HGF/SF mittels enzymatischer Spaltung aktivieren (Naldini et al., 1991b). Das Charakteristikum des duktales Carcinoma in situ ist aber, dass es keine Zeichen der Invasivität zeigt. Ganz im Gegensatz ist eine intakte

Basalmembran ein entscheidendes diagnostisches Kriterium. Wir konnten in unseren Fällen eine HGF/SF-Färbung des Tumors nachweisen, wobei der Großteil nur niedrige Level aufwies. Im Gegensatz zu den von uns untersuchten invasiven Brusttumoren, die in 66% der Fälle hohe HGF/SF-Expression zeigten (Lengyel et al., 2005), fanden wir dies in nur 43,5% der DCIS-Fälle. Außerdem konnten wir nur eine geringe Reaktion des umgebenden Stromas beobachten. Eine intensive Stroma-Tumor-Reaktion ließ sich im Hinblick auf die HGF/SF-Expression nicht nachweisen. Damit scheint nicht nur die autokrine Sekretion von HGF/SF im DCIS niedrig zu sein, sondern auch die parakrine. Die Tatsache, dass HGF/SF das Metastasierungsverhalten von Tumoren beeinflusst und dessen parakrine Sekretion ausgehend vom umgebenden Stroma möglicherweise entscheidend zur Invasivität beiträgt, macht es wahrscheinlich, dass genau diese Eigenschaften im DCIS fehlen, und die fehlende Invasivität und Metastasierung dieser Entität mitbegründen.

Unsere Daten bestätigen, dass HER2/neu in duktalem Carcinoma in situ häufiger überexprimiert ist als in invasiven Tumoren. Einige Tumoren zeigen dieselbe Her2/neu-Überexpression sowohl in den in situ, wie auch den invasiven Anteilen. Es scheint, als ob bei einigen Tumoren diese Eigenschaft während der Progression vom in situ zum invasiven Stadium erhalten bleibt, während andere sie verlieren. Wiederum andere Karzinome entstehen möglicherweise *de novo*, unabhängig von der Her2/neu Expression. Her2/neu negative Tumoren könnten dann z.B. aus atypischen duktalem Epithelhyperplasien hervorgehen (Allred et al., 1992). Interessanterweise zeigt diese, zur Mastopathie Grad III gehörende, Entität keine Überexpression von Her2/neu, jedoch positive Reaktion auf c-met (Jin et al., 1997). Sowohl HER2/neu, als auch c-met, spielt folglich in der Tumorentwicklung und -progression eine wichtige Rolle. Das Konzept, diese Tyrosinkinase-Rezeptoren zu blockieren, wurde bereits erfolgreich umgesetzt. Ein Antikörper gegen HER2/neu, Trastuzumab, ist bereits beim metastasierten und seit kurzem auch beim frühen Mammakarzinom in klinischer Anwendung (Slamon et al., 2001; Piccart-Gebhart et al., 2005). Die Analyse anderer Rezeptoren derselben Familie auch vor dem Hintergrund, neue Targets zu charakterisieren, war Mittelpunkt unserer Studien. Die Untersuchungen an invasiven Karzinomen zeigten die signifikante Bedeutung von c-met für die Aggressivität des Tumors unabhängig von HER2/neu. Das duktalem Carcinoma in situ war als Vorläuferläsion Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Auch in diesem Tumor konnten wir keine signifikante Korrelation von c-met und Her2/neu-Überexpression nachweisen, was darauf hinweist, dass die beiden Tyrosinkinase-Rezeptoren unabhängig voneinander exprimiert werden. HER2/neu gehört sicherlich zu den Faktoren, die Mutationen und Tumorentstehung beeinflussen. Diese

unterscheiden sich aber möglicherweise von denen, die das invasive Potenzial von Tumoren kontrollieren. Es spielt in der Progression vom duktalem Carcinoma in situ zum invasiven Tumor vielleicht gar nicht die entscheidende Rolle (Latta et al., 2003). Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Balance zwischen der c-met-Expression im Tumor und dem umgebenden normal erscheinenden Gewebe, sowie die parakrine HGF/SF-Sekretion Faktoren sein könnten, die dieses invasive Potenzial prägen. Die Identifikation von besonders aggressiven DCIS, die zu lokalen Rezidiven oder zum Übergang in ein invasives Stadium neigen, könnte zur Modifikation therapeutischer Strategien beitragen. Obwohl kurativ, würde die Mastektomie aller Frauen mit diagnostizierten DCIS eine Übertherapie bedeuten. Durch die adjuvante Bestrahlung kann das Risiko eines intramammären invasiven und nicht-invasiven Rezidivs von 31% auf 13% gesenkt werden (Fisher et al., 1999). Eine andere Studie beobachtete eine Risikoreduktion von 40% (invasiver) bzw. 35% (nicht-invasiver) für Rezidive (Julien et al., 2000). Insgesamt bleibt jedoch das Risiko gegenüber der Mastektomie erhöht. Die Entwicklung von Risikoprofilen anhand biologischer Eigenschaften des Tumors, wie z.B. der c-met-Expression, könnte Tumoren identifizieren, die trotz allem von der Mastektomie, von größeren Resektionsrändern oder einer adjuvanten Therapie profitieren. In fernerer Zukunft wird sich zeigen, ob die Entwicklung von Inhibitoren von c-met/HGF/SF eine therapeutische Bedeutung für diese Patientinnen hat.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Dissertation war die Untersuchung der Expression von c-met beim duktalem Carcinoma in situ und die Etablierung einer Doppelfärbungsmethode zur Phänotypisierung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark.

Das duktale Carcinoma in situ der Mamma ist eine frühe intraduktale Neoplasie, die bis zu 20% der beim Screening entdeckten Tumore darstellt. Die Mechanismen, die zum Übergang in eine invasive Erkrankung führen, sind bislang noch ungeklärt. In dieser Arbeit haben wir die Expression der Tyrosinkinase c-met und des Liganden HGF/SF in einem Kollektiv von 39 Patientinnen mit duktalem Carcinoma in situ untersucht. Die Korrelation mit der HER2/neu-Expression und anderen histopathologischen Eigenschaften stand dabei im Mittelpunkt. Es wurden zur Färbung immunzytochemische Methoden wie Immunhistochemie und Immunfluoreszenz verwendet. In 76,3% der untersuchten Fälle exprimierte der Tumor deutlich mehr c-met als das umgebende Normalgewebe. Sowohl die Expression von c-met im Tumor als auch die ungleiche Verteilung von c-met zwischen Tumor und Normalgewebe korrelierte zum Teil signifikant mit ungünstigen prognostischen Eigenschaften wie dem Van Nuys-Grading. Die Imbalance in der c-met-Expression führt also möglicherweise zu einer geringeren Differenzierung und höheren proliferativen Aktivität des Tumors. Insgesamt konnten wir eine niedrigere c-met-Expression im DCIS als in früher untersuchten invasiven Tumoren feststellen. Auch die Membranständigkeit von c-met war weniger ausgeprägt. Nur 43,5% der DCIS Fälle wiesen hohe HGF/SF-Level auf im Gegensatz zu 66% bei den invasiven Tumoren. Das Expressionsmuster von c-met scheint also von entscheidender Bedeutung für die Invasivität des Tumors zu sein. Gleichzeitig spielt möglicherweise die parakrine Sekretion von HGF/SF eine Schlüsselrolle in der Invasion der Basalmembran. Die Beobachtung, dass HER2/neu und c-met nicht dasselbe Patientinnenkollektiv charakterisieren, bestätigt frühere Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe an invasiven Karzinomen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Steuerung der c-met- und HGF/SF-Expression mitentscheidend für das invasive Potenzial eines Tumors sind. Die Erkenntnis, dass c-met unabhängig von HER2/neu exprimiert wird, macht weitere Grundlagen orientierte Untersuchungen und klinische Studien unabdinglich.

Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark sind möglicherweise für Rezidive nach einer kurativen Primärtherapie eines Mammakarzinoms verantwortlich. Diese sind mittels immunzytochemischer Methoden nachweisbar, wobei Zytokeratine das Nachweiskriterium

sind. Um diese Tumorzellen besser zu charakterisieren und sie proliferationsunabhängigen Therapiestrategien zugänglich zu machen, hat man versucht, diese zu phänotypisieren. Wir konnten mit Mischungsexperimenten von MCF-7- und Knochenmarkszellen eine immunfluoreszente Doppelfärbungsmethode etablieren, mit der wir nicht nur disseminierte Zytokeratin-positive Zellen eindeutig im Knochenmark detektieren, sondern diese auch phänotypisieren können. Der Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen war bis zu einem Verhältnis von 1:10⁶ möglich, was den Dimensionen im Patientenmaterial entspricht. In der immunhistochemischen Färbung wiesen zwar auch einzelne Knochenmarkszellen eine positive Reaktion für c-met auf, sie waren aber durch die Verwendung der Doppelfärbung aufgrund der fehlenden Zytokeratin-Färbung zu unterscheiden. In der Immunfluoreszenz fehlte nicht nur die c-met-Reaktion der Knochenmarkszellen, sondern diese Technik erlaubt über Scan Aufnahmen auch eine Quantifizierung des Antigens. Wir konnten zeigen, dass MCF-7-Zellen c-met auf ihrer Oberfläche exprimieren und diese Expression vor allem in Bereichen der Zell-zu-Zell-Adhäsion besonders ausgeprägt ist. Wir wissen, dass der Verlust interzellulärer Kontakte der erste Schritt der Metastasierungskaskade ist und dass sich die Expression von c-met auch in korrespondierenden Lymphknotenmetastasen beim primären Mammakarzinom wiederfindet. Vor diesem Hintergrund ist c-met und seine Funktion in diesen Prozessen besonders interessant. Möglicherweise kennzeichnet die Expression von c-met eine Untergruppe von Tumoren, die besonders deshalb zur Invasivität und Metastasierung neigen, weil c-met und sein Ligand HGF/SF das Adhäsionssystem der Cadherine/Catenine in seiner Funktion beeinträchtigen. Diese Erkenntnis bestätigt, dass c-met als therapeutisches Target sinnvoll und vielversprechend ist.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R. β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16 (1997) 3797-3804
- Allred, D.C., Clark, G.M., Tandon, A.K., Molina, R., Torney, D.C., Osborne, C.K., Gilchrist, K.W., Mansour, E.G., Abeloff, M., Eudey, L. Her-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 10 (1992) 599-605
- Belfiore, A., Gangemi, P., Costantino, A., Russo, G., Santonocito, G.M., Ippolito, O., Di Renzo, M.F., Comoglio, P., Fiumara, A., Vigneri, R. Negative/low expression of the Met/hepatocyte growth factor identifies papillary thyroid carcinomas with high risk of distant metastases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 2322-2328
- Beviglia, L., Matsumoto, K., Lin, C.S., Ziober, B.L., Kramer, R.H. Expression of the c-Met/HGF receptor in human breast Carcinoma: Correlation with tumor progression. *Int. J. Cancer* 74 (1997) 301-309
- Bieche, I., Champeme, M.H., Matifas, F., Hacene, K., Callahan, R., Lidereau, R. Loss of heterozygosity on chromosome 7q and aggressive primary breast cancer. *Lancet* 339 (1992) 139-143
- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., Birchmeier, C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376 (1995) 768-771
- Borgen, E., Naume, B., Nesland, J.M., Nowels, K.W., Pavlak, N., Ravkin, I., Goldbard, S. Use of automated microscopy for the detection of disseminated tumor cells in bone marrow samples. *Cytometry* 46 (2001) 215-221
- Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Faletto, D.L., Chan, A.M.L., Kmieciak, T.E., Vande Woude, G.F., Aaronson, S.A. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251 (1991) 802-804
- Brady-Kalnay, S.M., Mourton, T., Nixon, J.P., Pietz, G.E., Kinch, M., Chen, H., Brackenbury, R., Rimm, D.L., Del Vecchio, R.L., Tonks, N.K. Dynamic interaction of PTPmu with multiple cadherins in vivo. *J. Cell. Biol.* 141 (1998) 287-96
- Braun, S., Müller, M., Hepp, F., Schlimok, G., Riethmüller, G., Pantel, K. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J. Nat. Cancer Inst.* 90 (1998) 1099-1101
- Braun, S., Pantel, K., Müller, P., Janni, W., Hepp, F., Kantenich, C.R.M., Gastroph, S., Wischnik, A., Dimpfl, T., Kindermann, G., Riethmüller, G., Schlimok, G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 342 (2000) 525-533
- Braun, S., Schindlbeck, C., Hepp, F., Janni, W., Kantenich, C., Riethmüller, G., Pantel, K. Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J. Clin. Oncol.* 19 (2001) 368-375
- Braun, S., Vogl, F.D., Schlimok, G., Diel, I.J., Janni, W., Gerber, B., Gebauer, G., Coombes, R.C., Pierga, J-Y., Naume, B., Pantel K. Pooled analysis of prognostic impact of bone marrow micrometastases: 10 year survival 4199 breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* (2003) 67a
- Buerger, H., Otterbach, F., Simon, R., Schafer, K.L., Poremba, C., Diallo, R., Brinkschmidt, C., Dockhorn-Dworniczak, B., Boecker, W. Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast: evidence of multiple genetic pathways. *J. Pathol.* 187 (1999a) 396-402
- Buerger, H., Otterbach, F., Simon, R., Schafer, K.L., Poremba, C., Diallo, R., Brinkschmidt, C., Dockhorn-Dworniczak, B., Boecker, W. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J. Pathol.* 189 (1999b) 521-526

- Bussolino, F., Di Renzo, M., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffey, A., Comoglio, P.M. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J. Cell. Biol.* 119 (1992) 629-641
- Camp, R.L., Rimm, E.B., Rimm, D.L. *Met* expression is associated with poor outcome in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 86 (1999) 2259-2265
- Cao, B., Su, Y., Oskarsson, M., Zhao, P., Kort, E.J., Fisher, R.J., Wang, L.M., Vande Woude, G.F. Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 7443-7448
- Cohen, J.A., Weiner, D.B., More, K.F., Kokai, Y., Williams, W.V., Maguire, H.C. Jr, LiVolsi, V.A., Greene, M.I. Expression pattern of the neu (NGL) gene-encoded growth factor protein (p185neu) in normal and transformed epithelial tissues of the digestive tract. *Oncogene* 4 (1989) 81-88
- Comoglio, P.M., Trusolino, L. Invasive growth: from development to metastasis. *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 857-862
- Coomes, R.C., Berger, U., Mansi, J., Redding, H., Powles, T.J., Neville, A.M., McKinna, A., Nash, A.G., Gazet, J.C., Ford, H.T. Prognostic significance of micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer. *NCI Monogr* (1986) 51-53
- Cooper, C.S., Park, M., Blair, D.G., Tainsky, M.A., Huebner, K., Croce, C.M., Vande Woude, G.F. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311 (1984) 29-33
- Cordell, J.L., Falini, B., Erber, W.N., Ghosh, A.K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., Pulford, K.A., Stein, H., Mason, D.Y. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP) complexes. *J. Histochem. Cytochem.* 21 (1984) 219-229
- Cote, R.J., Rosen, P.P., Lesser, L.M., Old, L.J., Osborne, M.P. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J. Clin. Oncol.* 9 (1991) 1749-1756
- Cote, R.J., Beattie, E.J., Chaiwun, B., Shi, S.R., Harvey, J., Chen, S.C., Sherrod, A.E., Groshen, S., Taylor, C.R. Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. *Ann. Surg.* 222 (1995) 415-423
- Courtemanche, D.J., Worth, A.J., Coupland, R.W., MacFarlane, J.K. Detection of micrometastases from primary breast cancer. *Can. J. Surg.* 34 (1991) 15-19
- Ciudad, J., San Miguel, J.F., Lopez-Berges, M.C., Vidriales, B., Valverde, B., Ocqueteau, M., Mateos, G., Caballero, M.D., Hernandez, J., Moro, M.J., Mateos, M.V., Orfao, A. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 16 (1998) 3774-3781
- Datta, Y.H., Adams, P.T., Drobyski, W.R., Ethier, S.P., Terry, V.H., Roth, M.S. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Oncol.* 12 (1994) 475-82
- Dearnaley, D.P., Ormerod, M.G., Sloane, J.P. Micrometastases in breast cancer: long-term follow-up of the first patient cohort. *Eur. J. Cancer* 27 (1991) 236-39
- de Manzoni, G., Pelosi, G., Pavanel, F., Di Leo, A., Pedrazzani, C., Durante, E., Cordiano, C., Pasini, F. The presence of bone marrow cytokeratin-immunoreactive cells does not predict outcome in gastric cancer patients. *Br. J. Cancer* 86 (2002) 1047-1051
- Di Renzo, M.F., Olivero, M., Serini, G., Orlandi, F., Pilotti, S., Belfiore, A., Costantino, A., Vigneti, R., Angeli, A., Pienotti, M.A. Overexpression of the c-Met /HGF receptor in human thyroid carcinomas derived from the follicular epithelium. *J. Endocrinol. Invest.* 18 (1995) 134-139

- Diel, I.J., Kaufmann, M., Goerner, R., Costa, S.D., Kaul, S., Bastert, G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *J. Clin. Oncol.* 10 (1992) 1534-1539
- Diel, I.J., Kaufmann, M., Costa S.D., Holle, R., von Minckwitz, G., Solomayer, E.F., Kaul, S., Bastert, G. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J. Natl. Cancer Inst.* 88 (1996) 1652-58
- Dupont, W.D., Page, D.L., Parl, F.F., Vnencak-Jones, C.L., Plummer, W.D. Jr, Rados, M.S., Schuyler, P.A. Long term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. *N. Engl. J. Med.* 331 (1994) 10-15
- Fields, K.K., Elfenbein, G.J., Trudeau, W.L., Perkins, J.B., Janssen, W.E., Moscinski, L.C. Clinical significance of bone marrow metastases as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol.* 14 (1996) 1868-76
- Firon, M., Shaharabany, M., Altstock, R.T., Horev, J., Abramovici, A., Resau, J.H., Vande Woude, G.F., Tsarfaty, I. Dominant negative Met reduces tumorigenicity-metastasis and increases tubule formation in mammary cells. *Oncogene* 19 (2000) 2386-2397
- Fisher, E.R., Costantino, J., Fisher, B., Redmond, C. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol 4). Discriminants for 15-year survival. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Investigators. *Cancer* 71 (1993) 2141-2150
- Fisher, E.R., Dignam, J., Tan-Chiu, E., Costantino, J., Fisher, B., Paik, S., Wolmark, N. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) eight-year update of Protocol B-17: intraductal carcinoma. *Cancer* 86 (1999) 429-38
- Funke, I., Fries, S., Jauch, K.W. Tumorzellnachweis im Knochenmark: Entscheidungshilfe zur adjuvanten Therapie bei nodal-negativen Patientinnen mit Mammakarzinom *Chirurg* 62 (1991) 805-809
- Funke, I., Fries, S., Rolle, M., Heiss, M.M., Untch, M., Bohmert, H., Schildberg, F.W., Jauch, K.W. Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer. *Int. J. Cancer* 65 (1996) 755-61
- Furge, K.A., Kiewlich, D., Le, P., Vo, M.N., Faure, M., Howlett, A.R., Lipson, K.E., Woude, G.F., Webb, C.P. Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (2001) 10722-10727
- Gebauer, G., Fehm, T., Merkle, E., Beck, E.P., Lang, N., Jager, W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J. Clin. Oncol.* 19 (2001) 3669-74
- Gerber, B., Krause, A., Muller, H., Richter, D., Reimer, T., Makovitzky, J., Herrnring, C., Jeschke, U., Kundt, G., Friese, K. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J. Clin. Oncol.* 19 (2001) 960-71
- Gherardi, E., Gray, J., Stoker, M., Perryman, M., Furlong, R. Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein which modulates epithelial interactions and movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 5844-5848
- Ghoussoub, R.A., Dillon, D.A., D'Aquila, T., Rimm, E.B., Fearon, E.R., Rimm, D.L. Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. *Cancer* 82 (1998) 1513-1520
- Gribben, J.G., Freedman, A.S., Neuberger, D., Roy, D.C., Blake, K.W., Woo, S.D., Grossbard, M.L., Rabinowe, S.N., Coral, F., Freeman, G.J. et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 325 (1991) 1525-1533

- Gunn, J., McCall, J.L., Yun, K., Wright, P.A. Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by K19 and K20 reverse-transcription polymerase chain reaction. *Lab. Invest.* 75 (1996) 611–616
- Harbeck, N., Untch, M., Pache, L., Eiermann, W. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br. J. Cancer* 69 (1994) 566–571
- Harris, C.C., Hollstein, M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N. Engl. J. Med.* 329 (1993) 1318–1327
- Hayashi, N., Arakawa, H., Nagase, H., Yanagisawa, A., Kato, Y., Ohta, H., Takano, S., Ogawa, M., Nakamura, Y. Genetic diagnosis identifies occult lymph node metastases undetectable by the histopathological method. *Cancer Res.* 54 (1994) 3853–3856
- Heiss, M.M., Simon, E.H., Beyer, B.C., Gruetzner, K.U., Tarabichi, A., Babic, R., Schildberg, F.W., Allgayer, H. Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow. *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 2005–2016
- Hiscox, S., Jiang, W.G. Association of the HGF/SF Receptor, c-met, with the cell-surface adhesion molecule, E-cadherin, and catenins in human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261 (1999a) 406–11
- Hiscox, S., Jiang, W.G. Hepatocyte growth factor/scatter factor disrupts epithelial tumour cell-cell adhesion: involvement of beta-catenin. *Anticancer Res.* 19 (1999b) 509–517
- Hiscox, S., Parr, C., Nakamura, T., Matsumoto, K., Mansel, R.E., Jiang, W.G. Inhibition of HGF/SF-induced breast cancer cell motility and invasion by the HGF/SF variant, NK4. *Breast Cancer Res. Treat.* 59 (2000) 245–254
- Hochtlen-Vollmar, W., Gruber, R., Bodenmuller, H., Felber, E., Lindemann, F., Passlick, B., Schlimok, G., Pantel, K., Riethmuller, G. Occult epithelial tumor cells detected in bone marrow by an enzyme immunoassay specific for cytokeratin 19. *Int. J. Cancer* 70 (1997) 396–400
- Hocke, S. Phänotypisierung zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom und klinische Nachbeobachtung. Dissertation, Frauenklinik und Poliklinik der Universität München, Klinikum Rechts der Isar, 2005
- Holland, R., Peterse, J.L., Millis, R.R., Eusebi, V., Faverly, D., van de Vijver, M.J., Zafrani, B. Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification. *Sem. Diagn. Pathol.* 11 (1994) 167–180
- Humphrey, P.A., Zhu, X., Zarnegar, R., Swanson, P.E., Ratliff, T.L., Vollmer, R.T., Day, M.L. Hepatocyte growth factor and its receptor (c-Met) in prostatic carcinoma. *Am. J. Pathol.* 147 (1995) 386–396
- Janni, W., Hepp, F., Rjosk, D., Kantenich, C., Strobl, B., Schindlbeck, C., Hantschmann, P., Sommer, H., Pantel, K., Braun, S. The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence. *Cancer* 92 (2001) 46–53
- Janni, W., Hepp, F., Strobl, B., Rack, B., Rjosk, D., Kantenich, C., Schindlbeck, C., Hantschmann, P., Pantel, K., Sommer, H., Braun, S. Patterns of disease recurrence influenced by hematogenous tumor cell dissemination in patients with cervical carcinoma of the uterus. *Cancer* 97 (2003) 405–411
- Janni, W., Rack, B., Lindemann, K., Harbeck, N. Detection of micrometastatic disease in bone marrow: is it ready for prime time? *Oncologist* 10 (2005) 480–92
- Jauch, K.W., Heiss, M.M., Gruetzner, U., Funke, I., Pantel, K., Babic, R., Eissner, H.J., Riethmueller, G., Schildberg, F.W. Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J. Clin. Oncol.* 14 (1996) 1810–1817
- Jeffers, M., Rong, S., Vande Woude, G.F. Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis. *J. Mol. Med.* 74 (1996a) 505–513

- Jeffers, M., Rong, S., Vande Woude, G.F. Enhanced tumorigenicity and invasion-metastasis by hepatocyte growth factor/scatter factor-met signalling in human cells concomitant with induction of the urokinase proteolysis network. *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996b) 1115-1125
- Jeffers, M., Fiscella, M., Webb, C.P., Anver, M., Koochekpour, S., Vande Woude, G.F. The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 (1998) 14417-14422
- Jennings, C.D., Foon, K.A. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 90 (1997) 2863-2892
- Jiang, W.G., Grimshaw, D., Lane, J., Martin, T.A., Abounader, R., Lathera, J., Mansel, R.E. A hammerhead ribozyme suppresses expression of hepatocyte growth factor/scatter factor receptor c-Met and reduces migration and invasiveness of breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 2555-2562
- Jin, L., Fuchs, A., Schnitt, S.J., Yao, Y., Joseph, A., Lamszus, K., Park, M., Goldberg, I.D., Rosen, E.M. Expression of scatter factor and c-met receptor in benign and malignant breast tissue. *Cancer* 79 (1997) 749-760
- Jonas, S., Weinrich, M., Tullius, S.G., Al-Abadi, H., Steinbrich, R., Radke, C., Klupp, J., Neuhaus, P. Microscopic tumor cell dissemination in gastric cancer. *Surg. Today* 34 (2004) 101-106
- Jones, J.L., Royall, J.E., Walker, R.A. E-cadherin relates to EGFR expression and lymph node metastasis in primary breast carcinoma. *Br. J. Cancer* 74 (1996) 1237-1241
- Julien, J.P., Bijker, N., Fentiman, I.S., Peterse, J.L., Delle Donne, V., Rouanet, P., Avril, A., Sylvester, R., Mignolet, F., Bartelink, H., Van Dongen, J.A. Radiotherapy in breast-conserving treatment for ductal carcinoma in situ: first results of the EORTC randomised phase III trial 10853. EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group. *Lancet* 355 (2000) 528-33
- Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F.R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S., Brenner, H.J. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur. J. Cancer* 15 (1979) 659-670
- Kirk, S.J., Cooper, G.G., Hoper, M., Watt, P.C., Roy, A.D., Odling-Smee, W. The prognostic significance of marrow metastases in women with early breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 16 (1990) 481-485
- Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C., Pawson, T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signalling proteins. *Science* 252 (1991) 668-674
- Kowolik, J.H., Kuhn, W., Nährig, J., Werner, M., Obst, T., Avril, N., Schmitt, M., Graeff, H. Detection of micrometastases in sentinel lymph nodes of the breast applying monoclonal antibodies AE1/AE3 to pancytokeratins. *Oncol. Rep.* 7 (2000) 745-749
- Kraeft, S.K., Sutherland, R., Gravelin, L., Hu, G.H., Ferland, L.H., Richardson, P., Elias, A., Chen, L.B. Detection and analysis of cancer cells in blood and bone marrow using a rare event imaging system. *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 434-442
- Landys, K., Persson, S., Kovarik, J., Hultborn, R., Holmberg, E. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res. Treat.* 49 (1998) 27-33
- Latta, E.K., Tjan, S., Parkes, R.K., O'Malley, F.P. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod. Pathol.* 15 (2002) 1318-1325
- Leinung, S., Wurl, P., Weiss, C.L., Roder, I., Schonfelder, M. Cytokeratin-positive cells in bone marrow in comparison with other prognostic factors in colon carcinoma. *Langenbecks Arch. Surg.* 385 (2000) 337-343

- Lengyel, E., Prechtel D., Resau J.H., Gauger K., Welk A., Lindemann K., Salanti G., Richter T., Knudsen B., Vande Woude G.F., Harbeck N. C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu. *Int. J. Cancer* 113 (2005) 678-82
- Lindemann, F., Schlimok, G., Dirschedl, P., Witte, J., Riethmuller, G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 340 (1992) 685-689
- Lokker, N.A., Godowski, P.J. Generation and characterization of a competitive antagonist of human hepatocyte growth factor, HGF/NK1. *J. Biol. Chem.* 262 (1993) 17145-17150
- Macadam, R., Sarela, A., Wilson, J., MacLennan, K., Guillou, P. Bone marrow micrometastases predict early post-operative recurrence following surgical resection of oesophageal and gastric carcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* 29 (2003) 450-454
- Mansi, J.L., Easton, D., Berger, U., Gazet, J.C., Ford, H.T., Dearnaley, D., Coombes, R.C. Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up. *Eur. J. Cancer* 27 (1991) 1552-1555
- Mansi, J.L., Berger, U., McDonnell, T., Pople, A., Rayter, Z., Gazet, J.C., Coombes, R.C. The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 7 (1989) 445-9
- Mansi, J.L., Gogas, H., Bliss, J.M., Gazet, J.C., Berger, U., Coombes, R.C. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long- term follow-up study. *Lancet* 354 (1999) 197-202
- Manual Mammakarzinome. W. Zuckschwerdt Verlag, München, 2001, 8. Auflage
- Marth, C., Kistic, J., Kaern, J., Trope, C., Fodstad, O. Circulating tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with ovarian carcinoma do not predict prognosis. *Cancer* 94 (2002) 707-712
- Martin, V.M., Siewert, C., Scharl, A., Harms, T., Heinze, R., Ohl, S., Radbruch, A., Miltenyi, S., Schmitz, J. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp. Hematol.* 26 (1998) 252-264
- Martin, T.A., Parr, C., Davies, G., Watkins, G., Lane, J., Matsumoto, K., Nakamura, T., Mansel, R.E., Jiang, W.G. Growth and angiogenesis of human breast cancer in a nude mouse tumor model is reduced by NK4, a HGF/SF antagonist. *Carcinogenesis* 24 (2003) 1317-1323
- Mason, B.H., Holdaway, I.M., Mullins, P.R., Yee, L.H., Kay, R.G. Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer. *Cancer Res.* 43 (1983) 2985-2990
- Mathieu, M.C., Friedman, S., Bosq, J., Caillou, B., Spielmann, M., Travagli, J.P., Contesso, G. Immunohistochemical staining of bone marrow biopsies for detection of occult metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 15 (1990) 21-26
- Matsumoto, K., Nakamura, T. Roles of HGF as a pleiotropic factor in organ regeneration. *In* *Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor and the c-Met Receptor*. Goldberg, I.D., Rosen E.M. (Hrsg), Birkhauser-Verlag, Basel, 1993, 225-250
- McGuire, W.I. Adjuvant Therapy of Node-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 320 (1989) 525-527
- Miyazawa, K., Shimimura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., Kitamura, N. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 10024-10028
- Miyazawa, K., Tsubouchi, H., Naka, D., Takahashi, K., Okigaki, M., Arakaki, N., Nakayama, H., Hirono, S., Sakiyama, O., Gohda, E., Daikuhara, Y., Kitamura, N. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163 (1989) 967-973

- Moghul, A., Lin, L., Beedle, A., Kanbour-Shakir, A., DeFrances, M.C., Liu, Y., Zarnegar, R. Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones: evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript. *Oncogene* 9 (1994) 2045-52
- Molino, A., Pelosi, G., Turazza, M., Sperotto, L., Bonetti, A., Nortilli, R., Fattovich, G., Alaimo, C., Piubello, Q., Pavanel, F., Micciolo, R., Cetto, G.L. Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Res. Treat.* 42 (1997) 23-30
- Molino, A., Pelosi, G., Micciolo, R., Turazza, M., Nortilli, R., Pavanel, F., Cetto, G.L. Bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 58 (1999) 123-30
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.I., Geiger, B., Krepler, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31 (1982) 11-24
- Morrow, M., Schmidt, R., Hassett, C. Patient selection for breast conservation therapy with magnification mammography. *Surgery* 118 (1995) 621-626
- Müller, P., Weckermann, D., Riethmüller, G., Schlimok, G. Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 88 (1996) 8-16
- Nagy, J., Clark, J.S., Cooke, A., Campbell, A.M., Connor, J.M., Purushotham, A.D., George, W.D. Expression and loss of heterozygosity of c-met proto-oncogene in primary breast cancer. *J. Surg. Oncol.* 60 (1995) 95-99
- Naidu, Y.M., Rosen, E.M., Zitnik, R., Goldberg, I., Park, M., Naujokas, P., Polverini, P.J., Nickoloff, B.J. Role of scatter factor in the pathogenesis of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 5282-5285
- Nakajima, M., Sewada, H., Yamada, Y., Watanabe, A., Tatsumi, M., Yamashita, J., Matsuda, M., Sakaguchi, T., Hirao, T., Nakano, H. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer* 85 (1999) 1894-1902
- Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., Shimizu, S. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342 (1989) 440-443
- Nakopoulou, L., Gakiopoulou, H., Keramopoulos, A., Giannopoulou, I., Athanassiadou, P., Mavrommatis, J., Davaris, P.S. C-met tyrosine kinase receptor expression is associated with abnormal beta-catenin expression and favourable prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Histopathology* 36 (2000) 313-325
- Naldini, L., Vigna, E., Narsimhan, R., Gaudino, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K., Comoglio, P.M. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6 (1991a) 501-504
- Naldini, L., Weidner, K.M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R.P., Hartmann, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K., Birchmeier, W., Comoglio, P.M. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* 10 (1991b) 2867-2878
- Naritoku, W.Y., Taylor, C.R. A comparative study of the use of monoclonal antibodies using three different immunohistochemical methods: an evaluation of monoclonal and polyclonal antibodies against human prostatic acid phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* 30 (1982) 253-60
- Naume, B., Borgen, E., Beiske, K., Herstad, T.K., Ravnas, G., Renolen, A., Trachsel, S., Thrane-Steen, K., Funderud, S., Kvalheim, G. Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood. *J. Hematother.* 6 (1997) 103-114

- Naume, B., Borgen, E., Nesland, J.M., Beiske, K., Gilen, E., Renolen, A., Ravnås, G., Qvist, H., Kåresen, R., Kvalheim, G. Increased sensitivity for detection of micrometastases in bone-marrow/peripheral blood stem-cell products from breast-cancer patients by negative immunomagnetic separation. *Int. J. Cancer* 78 (1998) 556-560
- Nekarda, H., Geß, C., Stark, M., Mueller, J.D., Fink, U., Schenck, U., Siewert, J.R. Immunocytochemically detected free peritoneal tumor cells (FPTC) are a strong prognostic factor in gastric carcinoma. *Br. J. Cancer* 79 (1999) 611-619
- Niranjan, B., Buluwela, L., Yant, J., Perusinghe, N., Atherton, A., Phippard, D., Dale, T., Gusterson, B., Kamalati, T. HGF/SF: a potent cytokine for mammary growth, morphogenesis and development. *Development* 121 (1995) 2897-2908
- Oki, E., Maehara, Y., Tokunaga, E., Shibahara, K., Hasuda, S., Kakeji, Y., Sugimachi, K. Detection of disseminated cancer cells in bone marrow of gastric cancer using real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Cancer Lett.* 188 (2002) 191-198
- Osborne, M., Rosen, P.P. Detection and Management of bone marrow micrometastases in breast cancer. *Oncology* 8 (1994) 2510-2513
- Otte, M., Deppert, K., Ebel, S., et al. Immunomagnetic enrichment of disseminated tumor cells from bone marrow of carcinoma patients. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 41 (2000) 390
- Paget, S. The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet* 1 (1889) 571-573
- Pantel, K., Schlimok, G., Braun, S., Kutter, D. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Institute* 85 (1993) 1419-1424
- Pantel, K., Schlimok, G., Angstwurm, M., Weckermann, D. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J. Hematother.* 3 (1994) 165-173
- Pantel, K., Izbicki, J., Passlick, B., Angstwurm, M., Haussinger, K., Thetter, O., Riethmüller, G. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 347 (1996a) 649-653
- Pantel, K., Riethmüller, G. Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213 (1996b) 1-18
- Pantel, K., Von Knebel Doeberitz, M., Izbicki, J.R., Riethmüller, G. [Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies]. *Chirurg* 68 (1997) 1241-1250
- Park, J.B., Rhim, J.S., Park, S.C., Kimm, S.W., Kraus, M.H. Amplification, overexpression, and rearrangement of the erbB-2 protooncogene in primary human stomach carcinomas. *Cancer Res.* 49 (1989) 6605-6609
- Passlick, B. Micrometastases in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 34 (2001) 25-29
- Piccart-Gebhart, M.J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, C.H., Steger, G., Huang, C.S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Lang, I., Nitz, U., Iwata, H., Thomssen, C., Lohrisch, C., Suter, T.M., Ruschhoff, J., Suto, T., Gnant, V., Ward, C., Straehle, C., McFadden, E., Dolci, M.S., Gelber, R.D. Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 16 (2005) 1659-72
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G., Comoglio, P.M. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77 (1994) 261-271

- Porro, G., Menard, S., Tagliabue, E., Orefice, S., Salvadori, B., Squicciarini, P., Andreola, S., Rilke, F., Colnaghi, M.I. Monoclonal antibody detection of carcinoma cells in bone marrow biopsy specimens from breast cancer patients. *Cancer* 61 (1988) 2407-11
- Prat, M., Narsimhan, R.P., Crepaldi, T., Nicotra, M.R., Natali, P.G., Comoglio, P.M. The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors. *Int. J. Cancer* 49 (1991) 323-328
- Racila, E., Euhus, D., Weiss, A.J., Rao, C., McConnell, J., Terstappen, L.W., Uhr, J.W. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 4589-4594
- Rahimi, N., Tremblay, E., McAdam, L., Park, M., Schwall, R., Elliot, B. Identification of a hepatocyte growth factor autocrine loop in a murine mammary carcinoma. *Cell Growth Differ.* 7 (1996) 263-270
- Redding, H.W., Coombes, R.C., Monaghan, P., Clink, H.M., Imrie, S.F., Dearnaley, D.P., Ormerod, M.G., Sloane, J.P., Gazet, J.C., Powles, P.J., Neville, A.M. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 2 (1983) 1271-1274
- Remmele, W., Stegner, H.E. Immunohistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptoren (Er-ICA) im Mammakarzinomgewebe, Vorschlag zur einheitlichen Bewertung des Untersuchungsbefundes. *Der Frauenarzt* 2 (1987) 41-43
- Ried, S., Jager, C., Jeffers, M., Vande Woude, G.F., Graeff, H., Schmitt, M., Lengyel, E. Activation mechanisms of the urokinase-type plasminogen activator promoter by hepatocyte growth factor/scatter factor. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 16377-16386
- Riethmuller, G., Schneider-Gadicke, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Pichlmaier, H., Hirche, H., Pichlmayr, R., et al. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet* 343 (1994) 1177-1183
- Rogers, L. Carcinoma in situ. *Diagnostic histopathology of the breast.* Page D, Anderson T. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1987, 157-192
- Rong, S., Bodescot, M., Blair, D., Dunn, J., Nakamura, T., Mizuno, K., Park, M., Chan, A., Aaronson, S., Vande Woude, G.F. Tumorigenicity of the met proto-oncogene and the gene for hepatocyte growth factor. *Mol. Cell Biol.* 12 (1992) 5152-8
- Rong, S., Oskarsson, M., Faletto, D., Tsarfaty, I., Resau, J.H., Nakamura, T., Rosen, E., Hopkins, R.F. 3rd, Vande Woude, G.F. Tumorigenesis induced by coexpression of human hepatocyte growth factor and the human met protooncogene leads to high levels of expression of the ligand and receptor. *Cell Growth Differ.* 4 (1993) 563-569
- Rong, S., Segal, S., Anver, M., Resau, J.H., Vande Woude, G.F. Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 4731-4735
- Ronsin, C., Muscatelli, F., Mattei, M.G., Breathnach, R. A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the met family. *Oncogene* 8 (1993) 1195-1202
- Rosen, E.M., Meromsky, L., Setter, E., Vinter, D.W., Goldberg, I.D. Purified scatter factor stimulates epithelial and vascular endothelial cell migration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195 (1990) 34-43
- Rosen, E.M., Goldberg, I.D., Liu, D., Setter, E., Donovan, M.A., Bhargava, M., Reiss, M., Kacinski, B.M. Tumor necrosis factor stimulates epithelial tumor cell motility. *Cancer Res.* 51 (1991) 5315-5321
- Rosen, E.M., Grant, D.S., Kleinman, H.K., Goldberg, I.D., Bhargava, M.M., Nickoloff, B.J., Kinsella, J.L., Polverini, P. Scatter factor (hepatocyte growth factor) is a potent angiogenesis factor in vivo. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 47 (1993) 227-234

- Rosen, E.M., Nigam, S.K., Goldberg, I.D. Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. *J. Cell. Biol.* 127 (1994a) 1783-1787
- Rosen, E.M., Joseph, A., Jin, L., Rockwell, S., Elias, J.A., Knesel, J., Wines, J., McClellan, J., Kluger, M.J., Goldberg, I.D. Regulation of scatter factor production via a soluble inducing factor. *J. Cell. Biol.* 127 (1994b) 225-234
- Rosen, E.M., Knesel, J., Goldberg, I.D., Jin, L., Bhargava, M., Joseph, A., Zitnik, R., Wines, J., Kelley, M., Rockwell, S. Scatter factor modulates the metastatic phenotype of the EMT6 mouse mammary tumor. *Int. J. Cancer* 57 (1994c) 706-704
- Rubin, J.S., Chan, A.M., Bottaro, D.P., Burgess, W.H., Taylor, W.G., Cech, A.C., Hirschfield, D.W., Wong, J., Miki, T., Finch, P.W., et al. A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 88 (1991) 415-9
- Ryan, P., McCarthy, S., Kelly, J., Collins, J.K., Dunne, C., Grogan, L., Breathnach, O., Shanahan, F., Carey, P.D., Walsh, T.N., O'Sullivan, G.C. Prevalence of bone marrow micrometastases in esophagogastric cancer patients with and without neoadjuvant chemoradiotherapy. *J. Surg. Res.* 117 (2004) 121-126
- Salvadori, B., Squicciarini, P., Rovini, D., Orefice, S., Andreola, S., Rilke, F., Barletta, L., Menard, S., Colnaghi, M.I. Use of monoclonal antibody MBr1 to detect micrometastases in bone marrow specimens of breast cancer patients. *Eur. J. Cancer* 26 (1990) 865-867
- Santos, O.F., Barros, E.J., Yang, X.M., Matsumoto, K., Nakamura, T., Park, M., Nigam, S.K. Involvement of hepatocyte growth factor in kidney development. *Dev. Biol.* 163 (1994) 525-529
- Schechter, A.L., Stern, D.F., Vaidyanathan, L., Decker, S.J., Drebin, J., Greene, M.I., Weinberg, R.A. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 213 (1984) 513-516
- Scheungraber, C., Muller, B., Kohler, C., Possover, M., Leistriz, S., Schneider, A., Durst, M. Detection of disseminated tumor cells in patients with cervical cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 128 (2002) 329-335
- Schlimok, G., Funke, I., Holzmann, B., Göttinger, G., Schmidt, G., Hauser, H., Swierkot, S., Warnecke, H.H., Schneider, B., Koprowski, H., Riethmüller, G. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: In-vitro-detection with anti-cytokeratin and in-vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Akad. Sci.* 84 (1987) 8672-8676
- Schlimok, G., Funke, I., Bock, B., Schweiberer, B., Witte, J., Riethmuller, G. Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance. *J. Clin. Oncol.* 8 (1990) 831-837
- Schlimok, G., Funke, I., Pantel, K., Strobel, F., Lindemann, F., Witte, J., Riethmuller, G. Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur. J. Cancer* 27 (1991) 1461-1465
- Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, F., Birchmeier, C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373 (1995) 699-702
- Seslar, S.P., Nakamura, T., Byers, S.W. Regulation of fibroblast hepatocyte growth factor/scatter factor expression by human breast carcinoma cell lines and peptide growth factors. *Cancer Res.* 53 (1993) 1233-1238
- Shi, S.R., Cote, R.J., Taylor, R.T. Antigen Retrieval Immunohistochemistry and Molecular Morphology in the year 2001. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 9 (2001) 107-116
- Silverstein, M.J., Lagios, M.D., Craig, P.H., Waisman, J.R., Lewinsky, B.S., Colburn, W.J., Poller, D.N. A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 77 (1996) 2267-2274
- Singletery, S.E., Larry, L., Tucker, S., Spitzer, G. Detection of micrometastatic tumor cells in bone marrow of breast carcinoma patients. *J. Surg. Oncol.* 47 (1991) 32-36

- Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Oku, N., Miyazawa, K., Kitamura, N., Takeichi, M., Ito, F. Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes. Commun.* 1 (1994) 295-305
- Slade, M.J., Smith, B.M., Sinnett, H.D., Cross, N.C., Coombes, R.C. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 117 (1999) 870-79
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGiure, W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene. *Science* 235 (1987) 177-182
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., et al. Studies of Her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244 (1989) 707-712
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *NEJM* 344 (2001) 783-792
- Sloane, J.P., Ormerod, M.G., Neville, A.M. Potential pathological application of immunocytochemical methods to the detection of micrometastases. *Cancer Res.* 40 (1980) 3079-3082
- Soeth, E., Roder, C., Juhl, H., Kruger, U., Kremer, B., Kalthoff, H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int. J. Cancer* 69 (1996) 278-282
- Stoker, M., Perryman, M. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J. Cell. Sci.* 77 (1985) 209-223
- Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M., Gray, J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 327 (1987) 239-42
- Streit, A., Stern, C.D., They, C., Ireland, G.W., Aparicio, S., Sharpe, M.J., Gherardi, E. A role for HGF/SF in neural induction and its expression in Hensen's node during gastrulation. *Development* 121 (1995) 813-824
- Sugio, K., Kase, S., Sakada, T., Yamazaki, K., Yamaguchi, M., Ondo, K., Yano, T. Micrometastasis in the bone marrow of patients with lung cancer associated with a reduced expression of E-cadherin and beta-catenin: risk assessment by immunohistochemistry. *Surgery* 131 (2002) 226-231
- Tabar, L., Fagerberg, G., Day, N.E., Duffy, S.B., Kitchin, R.M. Natural history of breast cancer. *Lancet* 339 (1992) 1108
- The World Health Organization histological typing of breast tumors-second edition. *Am. J. Clin. Pathol.* 78 (1982) 806-816
- Thorban, S., Rosenberg, R., Busch, R., Roder, R.J. Epithelial cells in bone marrow of oesophageal cancer patients: a significant prognostic factor in multivariate analysis. *Br. J. Cancer* 83 (2000) 35-39
- Trusolino, L., Pugliese, L., Comoglio, P.M. Interactions between scatter factors and their receptors: hints for therapeutic applications. *FASEB J.* 12 (1998) 1267-80
- Tsarfaty, I., Resau, J.H., Rulong, S., Keydar, I., Faletto, D.L., Vande Woude, G.F. The met proto-oncogene receptor and lumen formation. *Science* 257 (1992) 1258-1261
- Tsarfaty, I., Rong, S., Resau, J.H., Rulong, S., da Silva, P.P., Vande Woude, G.F. The Met proto-oncogene mesenchymal to epithelial cell conversion. *Science* 263 (1994) 98-101

- Tsarfaty, I., Alvord, W.G., Resau, J.H., Altstock, R.T., Lidereau, R., Bieche, I., Bertrand, F., Horev, J., Klabansky, R.L., Keydar, I., Vande Woude, G.F. Alteration of Met protooncogene product expression and prognosis in breast carcinomas. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 21 (1999) 397-408
- Tsugawa, K., Yonemura, Y., Hirono, Y., Fushida, S., Kaji, M., Miwa, K., Miyazaki, I., Yamamoto, H. Amplification of the c-met, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor gene in human gastric cancers: correlation to clinical features. *Oncology* 55 (1998) 475-481
- Tsukita, S., Oishi, K., Akiyama, T., Yamanashi, Y., Yamamoto, T., Tsukita, S. Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J. Cell Biol.* 113 (1991) 867-879
- Tuck, A.B., Park, M., Sterns, E.E., Boag, A., Elliott, B.E. Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 148 (1996) 225-232
- Untch, M., Kahlert, S., Funke, I. Detection of cytokeratin (CK) 18 positive cells in the bone marrow of breast cancer patients - no prediction of bad outcome. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 18 (1999) 693a
- Vande Woude, G.F., Jeffers, M., Corner, J., Alvord, G., Tsarfaty, I., Resau, J. Met-HGF/SF: Tumorigenesis, invasion, and metastasis. CIBA Foundation Symposium 212: Plasminogen-related growth factors. Edited by GRB Goode. West Sussex, England, John Wiley & Sons, 1997, 119-132
- Vannucchi, A.M., Bosi, A., Glinz, S., Pacini, P., Linari, S., Saccardi, R., Alterini, R., Rigacci, L., Guidi, S., Lombardini, L., Longo, G., Mariani, M.P., Rossi-Ferrini, P. Evaluation of breast tumour cell contamination in the bone marrow and leukapheresis collections by RT-PCR for cytokeratin-19 mRNA. *Br. J. Haematol.* 103 (1998) 610-17
- Varangot, M., Barrios, E., Sonora, C., Aizen, B., Pressa, C., Estrugo, R., Lavigna, R., Muse, I., Osinaga, E., Berois, N. Clinical evaluation of a panel of mRNA markers in the detection of disseminated tumor cells in patients with operable breast cancer. *Oncol. Rep.* 14 (2005) 537-45
- von Knebel Doeberitz, M., Gebert, J., Herfarth, C.H. Der Einfluß molekularer Diagnostikverfahren auf die chirurgische Therapie maligner Erkrankungen. *Chirurg* 67 (1996) 967-979
- Wiedswang, G., Borgen, E., Karesen, R., Kvalheim, G., Nesland, J.M., Qvist, H., Schlichting, E., Sauer, T., Janbu, J., Harbitz, T., Naume, B. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 21 (2003) 3469-78
- Weidner, K.M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vandekerckhove, J., Weingart, S., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida, T., Daikuhara, Y., Birchmeier, W. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 (1991) 7001-7005
- Weihrauch, M.R., Skibowski, E., Draube, A., Geller, A., Tesch, H., Diehl, V., Bohlen, H. Immunomagnetic enrichment and detection of isolated tumor cells in bone marrow of patients with epithelial malignancies. *Clin. Exp. Metastasis* 19 (2002) 617-621
- Weitz, J., Kienle, P., Magener, A., Koch, M., Schrodell, A., Willeke, F., Autschbach, F., Lacroix, J., Lehnert, T., Herfarth, C., von Knebel Doeberitz, M. Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 1830-1836
- Werther, K., Normark, M., Brunner, N., Nielsen, H.J. Cytokeratin-positive cells in preoperative peripheral blood and bone marrow aspirates of patients with colorectal cancer. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 62 (2002) 49-57
- Yamashita, J., Ogawa, M., Yamashita, S., Nomura, K., Kuramoto, M., Saishoji, T., Shin, S. Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res.* 54 (1994) 1630-1633

- Yang, Y., Spitzer, E., Meyer, D., Sachs, M., Niemann, C., Hartmann, G., Weidner, K.M., Birchmeier, C., Birchmeier, W. Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *J. Cell. Biol.* 131 (1995) 1-12
- Yao, Y., Jin, L., Fuchs, A., Joseph, A., Hastings, H.M., Goldberg, I.D., Rosen, E.M. Scatter factor protein levels in human breast cancers: clinicopathological and biological correlations. *Am. J. Pathol.* 149 (1996) 1707-1717
- Zarnegar, R., DeFrances, M.C. Expression of HGF-SF in normal and malignant human tissues. *EXS.* 65 (1993) 181-99
- Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J. Cell. Biol.* 129 (1995) 1177-1180

DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. Nadia Harbeck danke ich für die Betreuung dieser Arbeit. Dabei denke ich nicht nur an den experimentellen Teil, der mein Interesse an medizinischer Forschung geweckt hat, sondern auch die langwierige Zeit der Auswertung und der Korrektur. Trotz unserer meist großen räumlichen Distanz und einiger erschwerender Lebensumstände konnte ich diese Arbeit dank ihres unermüdlichen Einsatzes fertig stellen. Frau Prof. Dr. Kiechle danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit an ihrer Klinik durchführen zu können und Herrn Prof. Dr. Schmitt für die Mitarbeit in seiner Forschergruppe und deren Labors.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des FACS Labors der Frauenklinik der TU München. Anita Welk und Daniela Hellmann bin ich für ihre stetige Mithilfe bei den Experimenten und ihrer aufmerksamen Betreuung während dieser sehr dankbar. Auch in der Nachbereitung der Experimente standen mir beide mit Informationen und Ratschlägen zur Seite. Stephan Hocke danke ich für die Einarbeitung im Labor.

Am Institut für Pathologie hat mir Dr. Jörg Nährig vor allem bei der Aufnahme und Bearbeitung des Bildmaterials sehr geholfen. Ihm danke ich für sein spontanes Einspringen für einen Kollegen und seine Geduld trotz knapp bemessener Zeit.

Die statistischen Auswertungen sind dank der Mithilfe von Juliane Schäfer entstanden. Auch ihr danke ich auf diesem Wege für ihre Unterstützung.

Einen ganz besonderen Dank spreche ich den Mitarbeitern des Van Andel Research Instituts in Grand Rapids, Michigan aus. Allen voran Jim Resau, der mir meinen Aufenthalt dort ermöglichte und ihn nicht zuletzt durch zahlreiche Ausflüge unvergesslich gemacht hat. Ihm danke ich für die intensive Betreuung meiner Publikation und seine gedankliche Inspiration. Weiterhin gilt mein Dank Eric Kort, Bree Berghuis, Eric Hudson und Brandon Leeser, die die Experimente vor Ort betreuten und auswerteten. Eric Hudson danke ich für seine fernmündliche Unterstützung bei der Installation des lsm-Programms.

Meinen Eltern, Bodo und Monika Lindemann, bin ich für die Ermöglichung meines Studiums dankbar, ohne welches es diese Arbeit nicht gegeben hätte. Ihnen danke ich besonders für die bedingungslose Unterstützung meiner Pläne auch über das Studium hinaus.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Kristina K. Lindemann
Adresse:	Christies Gate 30B 0557 Oslo Norwegen
Telefon:	+47-21 64 37 36
E-mail:	kristina.lindemann@ahus.no
Geburtsdatum/-ort:	11.01.1979/ Hamburg
Familienstand:	Ledig

Schulbildung und Studium

Gymnasium Oberalster, Hamburg	1997	Abitur, Note 1,2
Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg	1998-2000	Medizinstudium
Ludwig-Maximilians-Universität, München	2000-2005	Medizinstudium, Note 1,8

Berufserfahrung

Famulaturen

Wien, Österreich	2000-2003, insgesamt 5 Monate	Intensivmedizin
Mahé, Seychellen		Innere Medizin
Chur, Schweiz		Gynäkologie und Geburtshilfe
Kristiansand, Norwegen		Anästhesie
Praxis Dr. Pötsch, Hechendorf		Allgemeinmedizinische Praxis

Praktisches Jahr

Universitätsklinikum Nord- Norwegen, Tromsø, Norwegen	2004, 6 Monate	Viszeralchirurgie, Urologie Nephrologie
Bristol Royal Infirmary, University of Bristol, England	2004, 2 Monate	Kardiologie
Kantonsspital St. Gallen, Schweiz	2004/2005, 4 Monate	Gynäkologie und Geburtshilfe

Facharztausbildung

Akershus Universitetssykehus Oslo, Norwegen	ab Juni 2005	Gynäkologie und Geburtshilfe
--	--------------	------------------------------

Außeruniversitäres Engagement

Tamil Nadu, Indien	1997, 3 Monate	Projektarbeit Entwicklungshilfe
Heidelberger Club für Wirtschaft und Kultur e.V., Heidelberg	1999-2000	Mitglied im Organisationsteam „Symposium 2000“
Biotechnologische Studenteninitiative e.V., München	2001	Projektleiterin der Firmenkontaktmesse „ScieCon 2001 München“
Van Andel Institut, Grand Rapids, Michigan, USA	2001, 4 Wochen	Forschungsaufenthalt
Amgen GmbH, München	2003, 6 Monate	Studentische Aushilfe, Key Account Management
Lexington Consulting, Berlin	2003, 2 Monate	Praktikum Unternehmensberatung, Geschäftsfeld Healthcare