Universität Ulm
Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. P. Möller

c-Met als prognostischer Biomarker im *EGFR*-mutierten nichtkleinzelligen Lungenkarzinom

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Anne-Sophie Meyer
aus Augsburg

Ulm 2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1.Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Möller

2.Berichterstatter: Prof. Dr. Lars Bullinger

Tag der Promotion: 16.01.2015

Inhaltsverzeichnis

Berichterstatter……...II
Inhaltsverzeichnis III
Abkürzungsverzeichnis IV

1 Einleitung 1
1.1 Klinischer Hintergrund 1
1.2 *EGFR*-mutierte Subgruppe 2
1.3 Das Protoonkogen *c-Met* 4
1.4 Fragestellung 5

2 Material und Methoden 6
2.1 Kohorte und Gewebeproben 6
2.2 Immunhistochemische Färbung 7
2.2.1 Anfertigen von Gewebeschnitten 7
2.2.2 Vorbehandlung der Gewebeschnitte 7
2.2.3 Primär- und Sekundär-Inkubationen 7
2.3 Auswertung der Immunhistochemie 8
2.3.1 Mikroskopische Analyse 8
2.3.2 ImageJ-basierte Markerquantifizierung 9
2.4 Literaturabgleich 10
2.5 Statistische Auswertung 10

3 Ergebnisse 11
3.1 Klinisch-pathologische Parameter des Gesamtkollektives 11
3.2 Überlebenszeitanalyse im Gesamtkollektiv 12
3.3 TKI-Therapielinie im Gesamtkollektiv 14
3.4 Messgenauigkeit des c-Met-Scoring-Systems 15
3.5 Klinisch-pathologische Parameter in Bezug auf den immunhistochemischen MET-Status 17
3.6 C-Met-Status in Bezug auf die *EGFR*-Mutationstypen 19
3.7 C-Met-Status in Bezug auf die TKI-Therapielinie 20
3.8 Überlebenszeitanalyse und prognostische Bedeutung des c-Met-Status im *EGFR*-mutierten NSCLC 21

4 Diskussion 24

5 Zusammenfassung 34

Literaturverzeichnis 35

Anhang
Danksagung 40
Lebenslauf 40

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
Abb.	Abbildung
ADC	Adenokarzinom der Lunge
bzw	beziehungsweise
ca.	circa
CCCU	Comprehensive Cancer Center Ulm
c-Met	Mesenchymal-epithelialer Transitionsfaktor
CR*	Complete response (Verschwinden der initialen Tumorlast)*
CT	Computer Tomographie
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
FFPE	Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe
HGF	Hepatocyte growth factor
NSCLC	Non-small cell lung cancer
OS	Gesamtüberleben
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD*	Progressive disease (≥20% Tumorwachstum)*
p-Met	Phosphorylierter Mesenchymal-epithelialer Transitionsfaktor
PR*	Partial response (>30% Tumorabnahme)*
Src	Protoonkogen Tyrosin-Proteinkinase Src
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
SD*	Stable disease (≤30% Tumorabnahme, <20% Tumorwachstum)*
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
SCC	Plattenepithelkarzinom der Lunge
UICC	Union for International Cancer Control
WT	Wildtyp

*Prozentangaben beziehen sich auf Veränderungen der Tumorlast unter laufender Therapie im Vergleich zur Tumorlast vor Therapiebeginn und werden mittels Bildgebung ermittelt

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Weltweit zählt Lungenkrebs zu den häufigsten Tumorerkrankungen (Brodowicz et al. 2012). In den entwickelten Ländern bewirkt das Lungenkarzinom knapp ein Drittel aller krebsbedingten Todesfälle, und geschätzte 1,6 Millionen Patienten werden 2014 in den USA an der Erkrankung sterben (Siegel et al. 2014). In den Vereinigten Staaten hat diese Neubildung damit die höchste Inzidenz und Mortalität. Auch in der Bundesrepublik ist sie bei Männern die häufigste, bei Frauen nach Brust- und Darmkrebs die dritthäufigste Krebstodesursache (Ferlay et al. 2007). Ein Grund für diese Verteilung ist der höhere Nikotinkonsum beim männlichen Geschlecht mit der Konsequenz, dass die Tabakrauch-Exposition in Männern verstärkt seine krebsfördernde Wirkung zeigt (Hecht 2002). Trotz dieser Pathogenese ist zu beachten, dass der Begriff Lungenkarzinom eine heterogene Gruppe von Malignomen zusammenfasst, die sich hinsichtlich Ätiologie, Morphologie, Klinik, Therapie und Prognose unterscheiden (Kenfield et al. 2008). Ca. 20% der Lungenkarzinome sind kleinzellige Lungenkarzinome, die aggressiv wachsen und palliativ mit einer Chemotherapie behandelt werden. Die restlichen 80% der Lungenkarzinome sind nichtkleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC). Die Karzinome dieser Gruppe werden den kleinzelligen Karzinomen u.a. aufgrund ihrer besseren Prognose gegenüber gestellt. Diese Karzinomformen sind in niedrigen Stadien (UICC I-IIIA) kurativ behandelbar, werden aber in 60% der Fälle in fortgeschritten Stadien (IIIB/IV) diagnostiziert (Brodowicz et al. 2012, Schiller et al. 2002). Tabelle 1 zeigt die aktuelle UICC-Einteilung der NSCLC (Mirsadraee et al. 2012). In fortgeschrittenen Stadien (Stadium IIIB/IV) besteht die Therapie in einer palliativen Chemotherapie, denn das mediane 1-Jahres Überleben liegt bei unter 12 Monaten (Mok 2011), und das primäre Ziel für diese Patienten ist Lebensverlängerung. Trotz dieses ähnlichen Behandlungs-Regimens unterscheiden sich die NSCLC-Tumoren u.a. pathogenetisch, histomorphologisch sowie klinisch. Die NSCLC untergliedern sich in 3 große Subgruppen: Die großzelligen Karzinome, die Plattenepithelkarzinome und die Adenokarzinome (ADC). In der Karzinogenese der ADC scheinen primär andere Mechanismen als Tabakrauch (Kenfield et al. 2008, Hecht 2002, Hanahan, Weinberg 2011, Hanahan, Weinberg 2000) ursächlich zu sein.

Tabelle 1: Stadieneinteilung des NSCLC nach 7. Auflage der UICC/TNM-Edition

Tumor/Metastase	N0	N1	N2	N3
T1a (≤2cm)	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1b (>2-3cm)	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2a (≤5cm)	IB	IIA	IIIA	IIIB
T2b (>5-7cm)	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3 (>7cm oder Tumor jeder Größe mit Infiltration von Brustwand/Zwerchfell/mediastinaler Pleura/parietalem Perikard;	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4 (Tumor jeder Größe mit Infiltration von Mediastinum/Herz/großen Gefäßen/Trachea/Ösophagus/Wirbelkörper/Carina	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
M1a (Tumor jeder Größe mit malignem Pleura-/Perikarderguss, kontralateraler Lungenbefall)	IV	IV	IV	IV
M1b (Tumor jeder Größe mit Fernmetastasen)	IV	IV	IV	IV

Abkürzungen: NSCLC, nichtkleinzellige Lungenkarzinome; T = Primärtumor; N0 = keine regionären Lymphknotenmetastasen; N1 = regionäre(n) Lymphknotenmetastase(n) in ipsilateral peribronchial und/oder ipsilateral hilären Lymphknoten und intrapulmonale Nodi, einschließlich Beteiligung durch direkte Tumorausdehnung; N2 = Metastase/n in ipsilateral mediastinalen und/oder subcarinalen Lymphknoten; N3 = Metastase/n in kontralateral mediastinalen, kontralateral hilären, ipsilateral oder kontralateral scalenären, oder supraclaviculären Lymphknoten; M = Fernmetastase(n)

Als Folge des abnehmenden Tabakkonsums in der westlichen Gesellschaft hat die Inzidenz dieses Karzinomtyps in den vergangenen 10 Jahren in Relation zu den übrigen Lungenkarzinomformen zugenommen: Momentan ist das ADC mit ca. 40% der NSCLC das häufigste Lungenmalignom, wobei überwiegend Nichtraucher und Frauen erkranken (Kenfield et al. 2008, Mok et al. 2009). An zweiter Stelle steht das Plattenepithelkarzinom, an dritter Stelle das großzellige Lungenkarzinom.

1.2 *EGFR*-mutierte Subgruppe

Im NSCLC wurde durch Identifizierung von aktivierenden *EGFR* Mutationen ein Biomarker etabliert. Der prognostischer Wert für Patienten im Stadium IIIB/IV mit einer betreffenden Mutation des *EGF*-Rezeptors ist ein ca. 6 Monate längeres Gesamtüberleben unter Standardtherapie im Vergleich zu einem repräsentativen *EGFR*-Wildtyp-Kollektiv (Mok et al. 2009, Lynch et al. 2004). Die bisher bekannten Mutationen liegen auf Chromosom 7 im Exonbereich 18-21 des *EGFR*-Gens, der für die Zellmembran-durchspannenden Tyrosinkinasen des Rezeptors kodiert. Die Mutationen führen zu einer dauerhaften Phosphorilierung der Kinasen, was in einer konstitutiven Aktivierung der intrazellulären *EGF*- Signalkaskade resultiert. In Folge ist das Wachstum der betreffenden Tumorzellen abhängig von dem Onkogen *EGFR*, was therapeutisch genutzt werden kann. Sogenannte EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) binden reversibel an die katalytische Domäne der Kinase und inhibieren kompetitiv die ATP-Bindung. Dies unterbricht die intrazelluläre Signaltransduktion, was den proliferationsfördernden Einfluss dieser oncogenic driver-Mutation entzieht.

2009 zeigte eine Phase III Studie (Mok et al. 2009), dass sich das progressionsfreie Überleben in Patienten mit Mutation unter der zielgerichteten Anti-EGFR-Therapie im Vergleich zu Chemotherapie-Protokollen um 4-6 Monate verlängert, was weitere Studien belegen konnten (Kenfield et al. 2008, Sequist et al. 2008, Mok et al. 2009, Maemondo et al. 2010). Das Nebenwirkungsprofil ist unter TKI geringer, das Gesamtüberleben bleibt unverändert (Rosell et al. 2009, Domingo et al. 2010, Rosell et al. 2012, Mok et al. 2009).

Seit 2004 sind die beiden TKI Erlotinib und Gefitinib in den USA als Zweitlinientherapie für Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Lungenkarzinom zugelassen (Cohen et al. 2005), seit 2011 empfiehlt sie die Deutsche Gesellschaft für Pneumologie in ihren Leitlinien als Erstlinientherapie für Patienten mit *EGFR*-Mutation. Der prädiktive Wert der *EGFR*-Mutationen für Patienten im Stadium IIIB/IV ist dabei, das Ansprechen auf die Inhibitoren vorherzusagen, da TKI selektiv das Wachstum von Tumorzellen mit Mutation hemmen. *EGFR*-Mutationen finden sich dabei vermehrt in Patienten (1) mit Nichtraucher-Anamnese, (2) des weiblichen Geschlechts, (3) mit einem ADC und (4) der asiatischen Rasse (Haber et al. 2005, Sharma et al. 2007). Im asiatischen Raum finden sich in knapp 50% der NSCLC eine *EGFR*-Mutation, im kaukasischen Raum bewegt sich die Frequenz je nach Studienlage zwischen knapp 10-17% (Rosell et al. 2009, Sharma et al. 2007). In Europa ist demnach knapp jedes zehnte Lungenkarzinom mutiert. Geographisch unabhängig wird beobachtet, dass nur ca. 90% aller Mutationen primär TKI sensitiv sind. Bei diesen handelt es sich zu knapp 50% um Deletionen im Exon 19 und zu knapp 50% um Punktmutationen im Exon 21 mit Austausch von Thymin zu Guanin, was im Rezeptor zu einem Arginin anstelle von Leucin führt (L858R) (Sharma et al. 2007). Die restlichen 10% der Mutationen entfallen zur Hälfte auf seltene, primär TKI-sensitive Mutationen in den Exons 18-21 und zur anderen Hälfte auf primär TKI-resistente Mutationen (Sharma et al. 2007). Bei primär resistenten Mutationen handelt es sich meist um Exon 20 Insertionen. Eine TKI-Behandlung ist hier wirkungslos (Mok et al. 2009, Sharma et al. 2007).

Auch in Patienten mit primär TKI-sensitiven Mutationen schreitet das Lungenkarzinom unter TKI-Gabe im Mittel nach 6-12 Monaten fort (Mok 2011, Sharma et al. 2007).

Einige der Progressionsmechanismen sind bekannt: in 40-50% der mit TKI behandelten NSCLC finden sich erworbene desensitivierende Mutationen im *EGFR* Gen wie die T790M Mutation im Exon 20, die die Interaktion von Inhibitor und ATP-Bindungstasche abschwächt (Pao et al. 2005, Kobayashi et al. 2005). Weitere 20-30% der Patienten mit erworbener TKI-Resistenz zeigen eine Genamplifikation in *c-MET*, einem verwandten Onkogen (Engelman et al. 2007, Mok 2011, Turke et al. 2010).

1.3 Das Protoonkogen *c-Met*

C-Met (mesenchymal-epithelialer Transitionsfaktor) ist ein Protoonkogen, das für den Rezeptor des Hepatocyte growth factor (HGF) kodiert. Der Rezeptor durchspannt die Zellmembran und besitzt eine Tyrosinkinase-Domäne. Sezernieren mesenchymale Zellen HGF, bindet dieses Zytokin auf den c-Met-Rezeptor umliegender epithelialer Zellen, was die c-Met-Kinase-Domäne an zwei intrazellulären Tyrosinresten autophosphoryliert (p-Met). Als Konsequenz aktiviert sich eine intrazelluläre Signalkaskade, die in malignen Zellen über eine veränderte Genexpression invasives Wachstum ermöglicht (Appleman 2011).

Für zahlreiche Karzinome wurde nachgewiesen, dass eine c-Met Aktivierung (Amplifikation, Überexpression, konstitutive Stimulierung) einen negativ prognostischer Marker darstellt (Lennerz et al. 2011, Appleman 2011, Sawada et al. 2007). Die Beobachtung, dass Tumorzellen unter c-Met-Einfluss aggressiver wachsen, ist auch von pharmakologischem Interesse, da c-Met-Inhibitoren existieren (Sierra, Tsao 2011). So ist auch im therapielimitierten NSCLC bekannt, dass eine c-Met Aktivierung eine schlechte Prognose bedingt (Tsuta et al. 2012, Park et al. 2012, Tretiakova et al. 2011, Cai et al. 2011, Go et al. 2010). Nachteil der zitierten Studien ist, dass sie die klinisch differente, EGFR-abhängige Subgruppe nicht explizit berücksichtigen. Zudem wurden sie vorwiegend am asiatischen Patientenkollektiv, in dem die Mutationsrate ca. 40% über dem kaukasischen Durchschnitt liegt, erhoben. Weiterhin fehlen in der *EGFR*-Subgruppe mit erworbener TKI-Resistenz Untersuchungen, ob eine c-MET-Aktivierung als TKI- Resistenzmechanismus *de novo* entsteht oder sich *ab initio* in einem Teil der Tumorpopulation unter den mengenmäßig überlegenden Tumorzellklonen befindet.

1.4 Fragestellung

Ausgehend davon, dass c-Met-aktivierte NSCLC hochaggressiv sind (schlechter prognostischer Marker) (Sequist et al. 2011) und *c-MET* Amplifikation einen Resistenzmechanismus unter TKI-Therapie darstellt (Turke et al. 2010, Trusolino et al. 2010), wobei c-MET auch durch andere Mechanismen als Genamplifikation aktivierbar ist (Trusolino et al. 2010), wird in diesem Projekt der immunhistochemische c-Met-Status in *EGFR*-mutierten Gewebeproben von Patienten mit NSCLC im Stadium IV quantifiziert und hinsichtlich der prognostischen Bedeutung als Biomarker untersucht.

Dazu färbten wir c-Met immunhistochemisch an TKI-nativen Tumorproben und korrelierten den c-Met-Status mit den klinischen Daten sowie dem Gesamtüberleben eines neu erstelltes Ulmer Kollektivs von TKI-behandelten, *EGFR*-mutierten NSCLC. Unsere Ergebnisse zeigen einen prognostischen Trend der c-Met-Aktivierung in diesem Patientenkollektiv, wobei ein positiver c-Met-Status mit einem längeren Gesamtüberleben einhergeht.

2 Material und Methoden

2.1 Kohorte und Gewebeproben

Das Ausgangskollektiv für unsere retrospektive Analyse bildeten NSCLC-Patienten, deren Tumormaterial im Einschlusszeitraum von Januar 2009 bis Juni 2012 am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Ulm auf *EGFR*-Mutation untersucht worden war. Dieses Kollektiv bestand aus internen, am Universitätsklinikum Ulm behandelten, sowie externen Fällen, bei denen das Institut das *EGFR*-Gen im Auftrag kleinerer Pathologien an zugesandtem Tumorgewebe analysiert hatte. Die Patienten einschließlich NSCLC-Subtyp und *EGFR*-Status (Wildtyp (WT)/Mutation) wurden über das institutsinterne Verwaltungs-System DC-Pathos ermittelt. Die *EGFR*-Analysen mittels PCR und Sanger-Sequenzierung detektierten dabei Mutationen in den Exons 18-21 der Tumorzell-DNA. Tumorgewebe wurde prä-analytisch mikrodisseziert, um ein falsch-negatives Ergebnis durch nicht-neoplastische Zellen zu vermeiden.

Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, wenn (1) histologisch oder zytologisch ein NSCLC gesichert war, (2) die Erkrankung zum Diagnosezeitpunkt im Stadium IIIB oder IV war, (3) eine TKI-sensitive *EGFR*-Mutation im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte, (4) ausreichend Tumorgewebe vom Zeitpunkt vor TKI-Gabe für Forschungszwecke zur Verfügung stand, (5) der klinische Verlauf einschließlich Therapielinien und Follow-up bekannt war, (6) eine TKI-Therapie über mindestens drei Wochen erfolgte und (7) das TKI-Ansprechen klinisch gut dokumentiert war, was die CT-metrische Tumorbeurteilung gemäß Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) (Eisenhauer et al. 2009, Nishino et al. 2011, Mozley et al. 2012) unter TKI-Therapie mit einschloss.

Der primäre Endpunkt Gesamtüberleben (OS) wurde definiert vom Zeitpunkt der Primärdiagnose bis zum Tod des Patienten. Bei Patienten mit Rezidiv, dass mindestens 12 tumorfreie Monate nach einem kurativ behandelten NSCLC auftrat, wurde das OS ab dem Zeitpunkt des Rezidivs berechnet.

Die Diagnosezeitpunkte wurden ebenso wie andere klinisch-pathologische Daten (TKI-Therapielinie und-Ansprechen, Histologie, klinischer Verlauf, Raucheranamnese) aus dem klinikinternen Patientenverwaltungssystem SAP übernommen.

Die Sterbedaten interner Patienten wurden über das Comprehensive Cancer Center Ulm (CCCU), die Daten externer Patienten über einen Anruf in der Hausarztpraxis, die im Patientenverwaltungssystem SAP angegebenen war, ermittelt. In Fällen mit unbekanntem Hausarzt wurde dieser in der Pathologie, die die Mutationsanalyse eingefordert hatte, erfragt. Das TKI-Ansprechen wurde gemäß RECIST (Eisenhauer et al. 2009) unterteilt in:
(1) Progressive disease (PD), (2) Stable disease (SD), (3) Partial Response (PR) und (4) Complete response (CR). Das Ende der Follow-up-Periode hinsichtlich OS war Oktober 2013. Patienten, bei denen das primäre Endpunktereignis bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nicht eintrat oder die aus der Studie ausschieden, wurden zensiert.
Alle Patienten wurden pseudorandomisiert. Die Vorgaben des Datenschutzes am Universitätsklinikum Ulm wurden zu jeder Zeit stringent eingehalten.

2.2 Immunhistochemische Färbung

2.2.1 Anfertigen von Gewebeschnitten

Das Tumormaterial lag in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebettet en (FFPE) Gewebeblöcken vor. Mit dem Mikrotom fertigten wir 2µm dicke Schnitte, zogen die Schnitte auf Objektträger und inkubierten die Objektträger über Nacht im Brutschrank.

2.2.2 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Die fixierten Schnitte wurden in Xylol deparaffiniert und in einer Alkohol-Wasser-Reihe rehydriert. Nach Wässerung in physiologischer Kochsalzlösung erfolgte die direkte Vorbehandlung. Dazu wurden die Objektträger für 20 Minuten im 10 milli-molaren Natrium-Citrat-Puffer bei pH 6,0 im Schnellkochtopf inkubiert. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte 20 Minuten in ein Bad aus Methanol und 3% H_2O_2 gestellt und die endogene Peroxidase-Enzymaktivität durch Substratsättigung unterbunden. Die Weiterbehandlung erfolgte nach Spülung in destilliertem Wasser.

2.2.3 Primär- und Sekundär-Inkubationen

Für die immunhistologischen c-Met-Färbungen verwendeten wir einen monoklonalen ‚rabbit-anti-human'-Antikörper (D1C2; Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA) in 1:100 Verdünnung.

Die Objektträger wurden mit der vorverdünnten Lösung mit einem Volumen von 100-150µl je Schnitt für 30 Minuten inkubiert. Die spezifische Bindung des Antikörpers an c-Met sicherten wir durch Negativ-Kontrollen (Sekundär-Antikörper ohne Primär-Antikörper) und Positiv-Kontrollen (Western Blot in c-Met-positiven Zelllinien; Färbung von Ösophagusmucosa).
Die Schnitte wurden in PBS-Puffer gewaschen und für 30 Minuten mit dem Sekundär-Antikörper in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.
Zur Visualisierung verwendeten wir eine Avidin-Biotin-enzymbasierte Substrat-Chromogenlösung, die wir gemäß Herstellerangaben auftrugen (RED; Dako, Hamburg, Deutschland). Nach erneutem Waschen in PBS-Puffer erfolgte eine Hämatoxylin Gegenfärbung (4 min). Zuletzt wurden die Schnitte mit Aquatex (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

2.3 Auswertung der Immunhistochemie

2.3.1 Mikroskopische Analyse

Die initiale Analyse erfolgte an einem Olympus BX51-Lichtmikroskop und Aufnahmen ausgewählter Bildfelder mittels einer angeschlossenen Digitalkamera dokumentiert (.dot slide, Nikon, Düsseldorf, Germany).
Eine zytoplasmatische und/oder membranöse Färbereaktion für c-Met wurde als positiv gewertet. Die Immunreaktion beurteilten wir dabei semiquantitativ über die Fraktion der positiv gefärbten Zellen und deren Farbintensität: 0, 1, 2 und 3 im Fraktions-Score bedeuteten <25%, 25-50% 51-80% und >80% positiv gefärbte Tumorzellen; im Intensitäts-Score galt: (1) keine nachweisbare Färbung in den Tumorzellen (2) schwache Färbung (3) moderate Färbung des gesamten Zytoplasmas und/ oder der Zellmembran und (4) starke Färbung des gesamten Zytoplasmas.
Tumorzellen innerhalb eines Karzinoms reagierten teilweise heterogen auf den c-Met-Antikörper. Daher wurden je Fall drei diagnostische Areale von zwei unabhängigen Beobachtern (JK Lennerz und mir) beurteilt, und der vorherrschende Score determinierte die finale Gruppenzuteilung.
Der Total-Score errechnete sich durch Multiplikation von Fraktion und Intensität, was Werte zwischen 0-12 ergab. In der deskriptiven Analyse werteten wir einen Score von 0-3 als negativ, einen Score zwischen 4-7 als intermediär und einen Score von 8-12 als positiv (Tabelle 4).

Abb. 1 zeigt beispielhaft das Scoring-System für einen negativen, einen intermediären und einen positiven Fall.

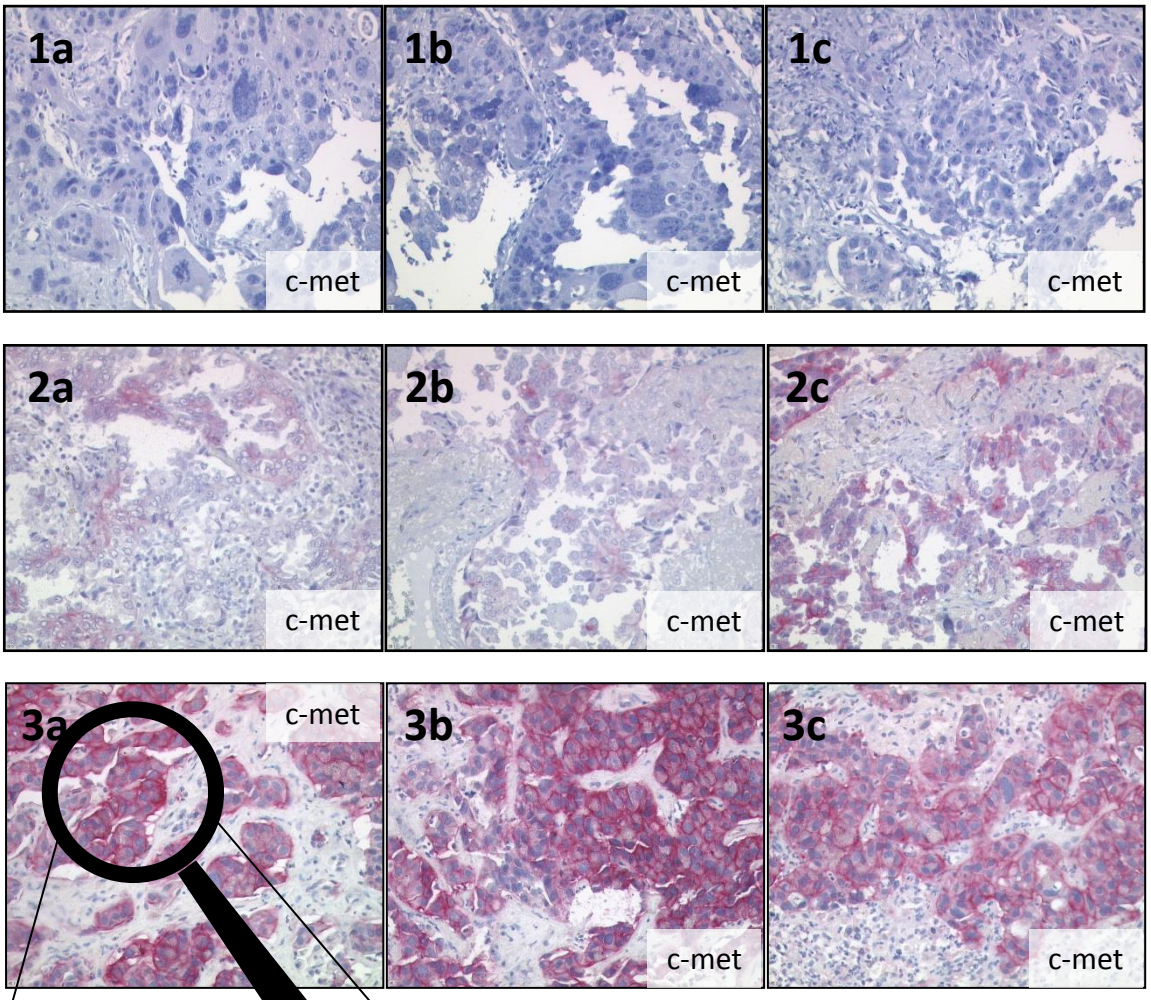

Abbildung 1: c-Met-Score.
Reihe 1 zeigt drei diagnostische Areale eines negativen Falls (1a-1c); Reihe 2 zeigt drei diagnostische Areale eines intermediären Falls (2a-2c); Reihe 3 zeigt drei diagnostische Areale eines positiven Falls (3a-3c) mit Vergrößerung des Bildes 3a in Reihe 4.
Im Bild 4 ist die Fraktion der c-Met-positiven Tumorzellen >80% (Fraktions-Score=3) und die Farbintensität stark (Intensitäts-Score=4). Das Produkt aus Fraktion und Intensität errechnet den total score (3x4=12).

2.3.2 ImageJ-basierte Markerquantifizierung

Die Resultate der c-Met-Auswertung wurden mit ImageJ (Version 2.0.0-beta1), einem öffentlich zugänglichen Bild-Prozessierungs-Programm, validiert:
Je Fall wurden in den drei mikroskopisch analysierten Arealen die Pixel des immunhistochemischen Signals mittels Color-Threshold-Funktion extrahiert.

Fläche und Dichte des Signals wurden gemessen und die Mittelwerte des immunhistochemischen Signals nach Histogramm-Erstellung errechnet.
Anhand von cut-off-Werten unterteilten die Mittelwerte die Kohorte in 3 Gruppen hinsichtlich c-Met-Signal: (1) negativ (2) intermediär und (3) positiv. Die Grenzwerte bestimmten wir, indem wir die ImageJ-Werte, die die Kohorte mit der Trennschärfe auf höchstem Signifikanzniveau unterteilten, im t-Test ermittelten. Im Anschluss wurde das c-Met-Resultat pro Fall aus beiden Messungen verglichen, um anhand der digitalen ImageJ-Einteilung das Score-System der mikroskopischen Analyse zu überprüfen. In divergierenden Fällen arbeiteten wir mit der c-Met-Einteilung der mikroskopischen Analyse.

2.4 Literaturabgleich

Wir führten eine Meta-Analyse der Literatur über das Gesamtüberleben
sowie die c-Met-Proteinverteilung von bzw. in *EGFR*-mutierten NSCLC-Patienten durch und verglichen die Angaben mit den Ergebnissen unserer Kohorte.

2.5 Statistische Auswertung

Für die Kontingenzanalysen arbeiteten wir mit dem Fisher exact-Test (Assoziation von c-Met-Status mit dichotomen Faktoren sowie), chi-square-Test (Assoziation von c-Met-Status mit >2 Kategorien) und dem student's t-Test (Vergleich von Mittelwerten).
Korrelationen berechneten wir mit dem Pearson Korrelationskoeffizienten.
Für die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeiten nutzten wir die Kaplan-Meier-Methode. Univariate Überlebenszeitanalysen erfolgten mit dem log rank-Testverfahren. Subgruppen-Analysen verglichen das OS hinsichtlich c-Met-Status in Bezug auf Geschlecht, NSCLC-Histologie, Exonbereich der *EGFR*-Mutation, TKI-Therapielinie, Zeitraum von Diagnosestellung bis TKI-Beginn sowie Raucheranamnese. Nichtraucher wurde definiert als Never-Smoker oder ≥10 Jahre Nikotinabsenz. Signifikanz wurde definiert als $p < 0{,}05$. Die Auswertung erfolgten mit Microsoft Excel Version 2010 (Microsoft Inc., Seattle, Washington, USA) sowie der Statistiksoftware Prism 6.0 (GraphPad Software Inc. San Diego, Kalifornien, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Klinisch-pathologische Parameter des Gesamtkollektives

Das Flowchart in Abb.2 zeigt das Entstehen des Ulmer Kollektivs von TKI-sensitiven *EGFR*-mutierten NSCLC. Die Mutationsfrequenz der 812 untersuchten NSCLC lag bei 9 %.

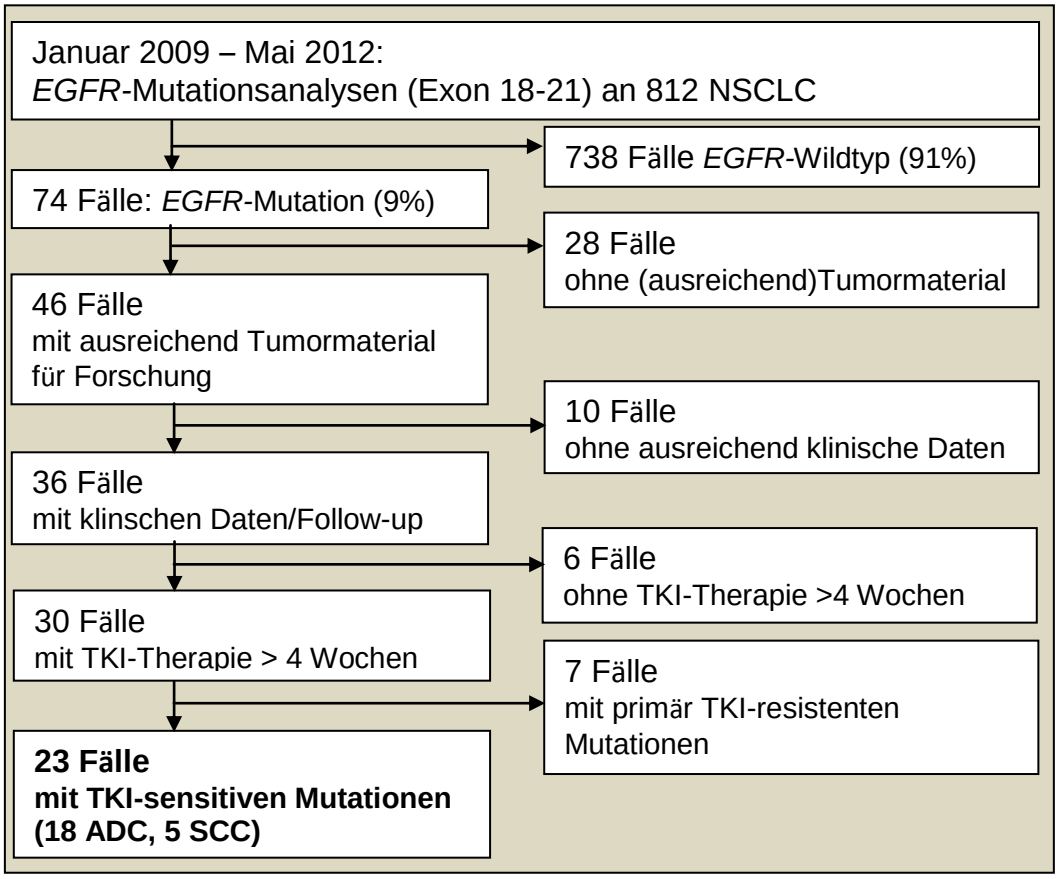

Abbildung 2: Consort-Diagramm der Ulmer NSCLC-Kohorte.
Abkürzungen: *EGFR*, Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; NSCLC, Non-small cell lung cancer ; TKI, Tyrosinkinase-Inhibitor; ADC, Adenokarzinom der Lunge; SCC, Plattenepithelkarzinom der Lunge;

Das Tumormaterial für die der Mutationsanalyse und c-Met-Färbung bestand zu 18 % aus Pleurapunktaten, zu 9% aus Metastasen und zu 65 % aus Lungenbiopsien. In den drei Rezidiv-Patienten unserer Kohorte wurde die Mutationsanalyse am resezierten Material des Primärtumors durchgeführt. Das mediane Alter des Kollektivs zum Diagnosezeitpunkt betrug 71 Jahre mit einer Spannbreite zwischen 46 und 87 Jahren. Der dominierende histologische Typ war mit 18 Fällen das Adenokarzinom (78%), in fünf Fällen handelte es sich um Plattenepithelkarzinome (22%).

Insgesamt waren 7 Fälle männlich und 16 weiblich, wobei sich unter den Adenokarzinomen 78% und unter den Plattenepithelkarzinomen 40% weibliche Patientinnen fanden. 46% waren Nichtraucher, 40% Raucher, in 3 Fällen war der Raucherstatus unbekannt. Die 11 Fälle mit Nichtraucher-Anamnese waren zu 100% Adenokarzinome.

Zum Diagnosezeitpunkt waren alle Patienten im Stadium IIIB/IV, zu Beginn der TKI-Behandlung hatten alle Patienten Metastasen (Stadium IV). 52% der Mutationen waren Deletionen im Exon 19, 43% Punktmutationen im Exon 21. Ein Adenokarzinom hatte eine seltene Missense-Mutation im Exon 20 mit Substitution eines Leucins durch Prolin an Position 792. In der Literatur fand sich kein Konsens über die TKI-Sensitivität dieser Mutation, da Patienten mit dieser Substitution uneinheitlich auf eine Anti-EGFR-Therapie angesprochen hatten (Tsao et al. 2005, Bronte et al. 2010, Appleman 2011, Riely et al. 2006). Eine Mutationsbeschreibung findet sich in Tabelle 2. Die Mutationsverteilung entspricht ebenso wie die übrigen, typischen Charakteristika den Angaben der Literatur. Tabelle 3 charakterisiert die demographischen und klinischen Daten unserer Kohorte.

Tabelle 2: ***EGFR*-Mutationen**

	Adenokarzinom (n=18)	Plattenepithelkarzinom (n=5)
Exon 19	p.E746_A750de (9, *39*) p.L747_E749del (1, *4*) p.E746_A750del + p.T751I (1, *4*)	
Exon 20	p.L792P (1, *4*)	
Exon 21	p.L858R (5, *26*)	p.E872D (1, *4*) X868>Z (1, *4*) p.L858R (3, *13*)

Abkürzungen: *EGFR*, Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; n= Anzahl, in Klammern hinter der Mutation ist die Anzahl der Fälle je Mutation mit entsprechendem Prozentsatz in *kursiv* angegeben (n, *%*)

3.2 Überlebenszeitanalyse im Gesamtkollektiv

Es wurden acht der 23 Patienten zensiert, das minimale Überleben lag bei 3, das maximale bei 71 Monaten. In der Überlebenskurve nach Kaplan-Meier (Abb. 3) ist festzustellen, dass das mediane Gesamtüberleben unserer Kohorte 28 Monate beträgt. Damit liegt das Gesamtüberleben bis zu 10 Monate über dem Gesamtüberleben, das in der Literatur für ein vergleichbares asiatisches Kollektiv beschrieben wird (Mok et al. 2009, Sequist et al. 2011, Tsao et al. 2005).

Zeitgleich stimmt das mediane Gesamtüberleben mit den Zeiten der größten europäischen Studie von Rosell et alii aus dem Jahre 2009, in der bei 350 *EGFR*-mutierten NSCLC Patienten ein medianes Gesamtüberleben von 28 Monaten beschrieben wurde (Rosell et al. 2009, Rosell et al. 2012), überein.

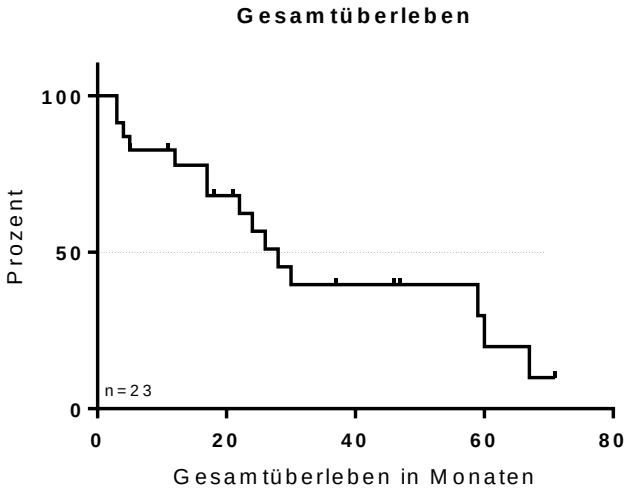

Abbildung 3: Gesamtüberleben der Studienkohorte. Gesamtüberleben wurde definiert als Zeitintervall zwischen Diagnose und Tod. Abkürzungen: n, Anzahl Patienten

Stratifizierte man das Kollektiv nach der Exonverteilung der *EGFR*-Mutationen, unterschieden sich die Gruppen signifikant im medianen Gesamtüberleben (Abb. 3) mit p=0,014 im log rank-Test. Patienten mit Exon 19 Deletion zeigten dabei mit 59 Monaten ein längeres medianes Gesamtüberleben als Patienten mit Punktmutationen auf Exon 20 oder 21 (22 Monate).

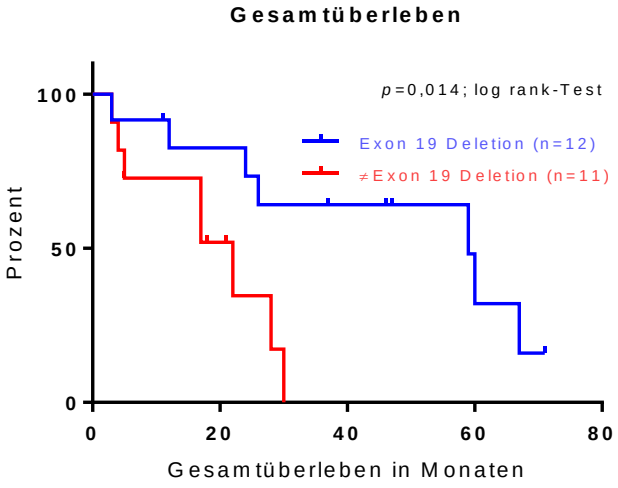

Abbildung 4. Gesamtüberleben der Studienkohorte nach Mutationen auf Exon 19 oder Exon 20/21 (≠Exon 19). Gesamtüberleben wurde definiert als Zeitintervall zwischen Diagnose und Tod. Abkürzungen: n, Anzahl Patienten

Unser Fall der Exon 20 Missense-Mutation mit unklarer TKI-Sensitivität zeigte unter Anti-EGFR-Therapie einen Progress der Erkrankung.
Nach Ausschluss dieses Falls betrug das mediane Überleben in der Gruppe der Exon 21 Mutationen unverändert 22 Monate und die Signifikanz im log rank-Test lag bei p=0,025.
Es fand sich kein Unterschied im Gesamtüberleben in Bezug auf Geschlecht (p=0,92), Histologie (p=0,39) oder Raucheranamnese(p=0,34).

3.3 TKI-Therapielinie im Gesamtkollektiv

Die 23 Patienten des Kollektivs wurden gemäß den aktuellen Therapieprotokollen behandelt (Brodowicz et al. 2012), was eine palliative Chemotherapie und Bestrahlung mit einschließt. Da die Leitlinien zur Therapie des fortgeschrittenen NSCLC laufend an neueste Studienerkenntnisse angepasst werden, war die Behandlung unseres Kollektivs nicht einheitlich. Vorherrschende Erstlinientherapie war eine platinhaltige Polychemotherapie (n=13). In 39% war die Anti-EGFR-Therapie Erstlinientherapie als erste pharmakologische Wahl nach Diagnosestellung. Weitere 39% erhielten den TKI nach einer Chemotherapie als Zweitlinientherapie. Für 22 % der Patienten war die personalisierte Therapie die dritte bzw. vierte Option als Dritt- oder Viertlinien-Therapie im Anschluss an zwei bzw. drei vorangegangene Chemotherapie-Schemata (≥TKI-Drittlinientherapie). Das mediane Gesamtüberleben der Patienten, die den TKI als Erst- bzw. Zweitlinientherapie erhalten hatten, betrug 24 bzw. 26 Monate. Das mediane Gesamtüberleben der Patienten aus der ≥TKI-Drittlinientherapiegruppe, die im Anschluss an mindestens zwei vorangegangene Chemotherapie-Schemata mit dem TKI behandelt wurden, lag bei 67 Monaten. Damit war es im Vergleich zu den Zeiten der Patienten mit TKI-Erst- und TKI-Zweitlinientherapie signifikant länger (p=0,024; log rank Test). Verglich man das mediane Überleben der TKI-Erstlinien-Subgruppe mit den Patienten, die mit dem TKI als zweite oder ≥dritte Therapieoption behandelt worden waren, erreichte der p-Wert 0,020 (Abb. 4). Es bestand eine signifikant positive Korrelation zwischen TKI-Therapielinie und dem Gesamtüberleben (Pearson Korrelationskoeffizient r=0,73; p zweiseitig <0,0001).
Konsequenterweise achteten wir auch auf eine Assoziation zwischen der Zeitspanne von Diagnose bis zum TKI-Start mit weiteren Charakteristika unserer Kohorte.

In Hinblick auf die TKI-Therapie bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem Zeitraum, der zwischen Diagnosestellung und dem Beginn der TKI-Gabe verging, mit dem Gesamtüberleben.

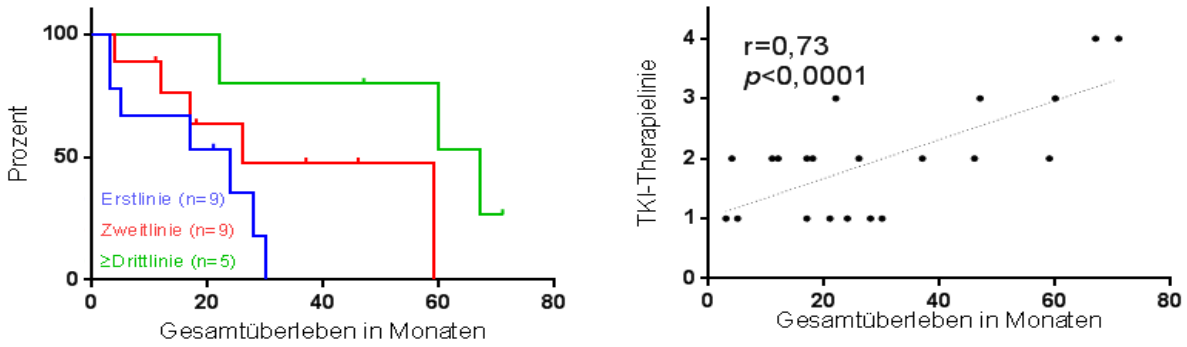

Abbildung 5: Einfluss der TKI-Therapielinie auf das Gesamtüberleben.
4a) Kaplan-Meier-Kurven unseres Kollektivs stratifiziert nach TKI-Therapielinie. Der log rank-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen jeder der drei Gruppen von *p*=0,02. Gesamtüberleben wurde definiert als Zeitintervall zwischen Diagnose und Tod.
4b) Korrelation von Gesamtüberleben mit der TKI-Therapielinie, Fallzahl n=23.
Abkürzungen: TKI; Tyrosinkinase-Inhibitor; r; Pearson Korrelationskoeffizient;

Die TKI-Erstlinientherapie korrelierte positiv mit der Dauer von Diagnose zu TKI-Start (Pearson Korrelationskoeffizient *r*=0,67; *p* zweiseitig =0,0005).

Unter TKI erreichten 22% der Patienten eine PR, 48% eine SD und 30% einen Progress.

3.4 Messgenauigkeit des c-Met-Scoring-Systems

Die Interobserver-Variabilität bei der mikroskopischen Analyse der c-Met-Färbung in Bezug auf den finalen c-Met-Status betrug 0%. Die Konkordanz zwischen mikroskopisch bestimmtem und ImageJ-basiertem Status lag bei 96%. Der Vergleich unserer Ergebnisse mit Veröffentlichungen über immunhistochemische c-Met-Färbungen im (*EGFR*-mutierten) NSCLC (Tretiakova et al. 2011, Park et al. 2012, Tsuta et al. 2012, Cai et al. 2011) ergab eine vergleichbare Proteinverteilung in den Kohorten.

Tabelle 3: **Klinischpathologische Daten des Gesamtkollektives**

Charakteristika	Anzahl der Patienten	(n = 23) %
Alter in Jahren		
Median	71	
Spannbreite	46-87	
< 65 Jahre	5	22
≥ 65 Jahre	18	78
Geschlecht		
Männlich	7	30
Weiblich	16	70
Histologie		
ADC	18	78
SCC	5	22
Rasse		
Kaukasisch	23	100
Raucheranamnese		
Nichtraucher	11	48
Raucher	9	39
unbekannt	3	13
Primär-/Rezidivdiagnose*		
Primärdiagnose	20	87
Rezidivdiagnose	3	13
Stadium zum TKI-Beginn		
IV	23	100
TKI		
Erlotinib	12	52
Gefitinib	11	48
TKI-Therapielinie		
Erst	9	39
Zweit	9	39
≥Dritt	5	22
Best response auf TKI		
CR	0	0
PR	5	22
SD	11	48
PD	7	30
c-Met Status		
Negativ[#]	7	30
Intermediär[#]	8	35
Positiv	8	35

Abkürzungen: n= Anzahl; ADC, Adenokarzinom der Lunge; SCC, Plattenepithelkarzinom der Lunge; TKI, Tyrosinekinase-Inhibitor; CR, Complete response; PR, Partial response; SD, Stable disease; PD, Progressive disease; * Rezidiv bezeichnete per definitionem ein NSCLC, das frühestens 12 Monate ohne Tumornachweis nach einem kurativ behandelten NSCLC auftrat; c-Met-Status gemäß Resultat der mikroskopischen Analyse der Immunohistochemie; [#] Die c-Met-negative und c-Met-intermediäre Gruppe wurden für die statistische Analyse in einer gemeinsamen Gruppe zusammengefasst.

3.5 Klinisch-pathologische Parameter in Bezug auf den immunhistochemischen MET-Status

Die mikroskopische Auswertung der c-Met-Färbung der Kohorte zeigte 7 (30%) negative, 8 intermediäre und 8 positive Fälle (jeweils 35%). Bei einer Fallzahl von n=23 entschieden wir uns gegen eine Stratifizierung in drei Gruppen: Für die statistische Auswertung fassten wir die negativen und intermediären Fälle zur Gruppe „c-Met-Status negativ“ zusammen. Diese stellten wir der eindeutig positiven „c-Met-Status positiv“-Gruppe gegenüber.

Tabelle 4 fasst das Scoring-System der c-Met-Färbung und die finale Gruppenbildung zusammen.

Tabelle 4: Interpretation des c-Met-Score für den finalen c-Met-Status

Score (Fraktion x Intensität)	Mikroskopische Analyse	c-Met-Status	Anzahl
0-3	negativ	negativ	15
4-7	intermediär	negativ	
8-12	positiv	positiv	8

Das mediane Erkrankungsalter der c-Met-negativen Gruppe lag bei 71 und das der positiven Gruppe bei 68,5 Jahre. Im t-Test ergab sich hierbei kein signifikanter Unterschied (p=0,15).

Auch die Verteilung der Patienten, die bei Diagnose jünger als 65 Jahren waren, wies im Fisher-Test mit p=0,3 keinen signifikanten Zusammenhang in Bezug auf den c-Met-Status auf: der deutlich größere Anteil beider Fraktionen hat das 65. Lebensjahr bei Erstdiagnose bereits erreicht (c-Met-negativ = 87% versus c-Met-positiv = 62%).

Auch bei der Geschlechterverteilung innerhalb der zwei nach c-Met-Status stratifizierten Subgruppen fand sich kein signifikanter Unterschied. Weiterhin fand sich keine signifikanter Unterschied hinsichtlich c-Met-Status für den histologischen Typ oder Raucheranamnese (Tabelle 5).

Tabelle 5: Kontingenztabelle nach immunhistologischem c-Met-Status

Charakteristika	c-Met negativ (n=15)	%	c-Met positiv (n=8)	%	p-Wert
Alter in Jahren					
Median	71		68,5		
Spannbreite	49-87		46-83		0,15
< 65 Jahre	2	13	3	38	0,3
≥ 65	13	87	5	62	
Geschlecht					
Männlich	6	40	1	13	0,35
Weiblich	9	60	7		
Histologie					
ADC	10	67	8	100	0,12
SCC	5	33	0	0	
Raucheranamnese					
Nichtraucher	6	40	5	62	0,37
Raucher	7	47	2	25	
unbekannt	2	13	1	13	
Primär-/Rezidivdiagnose*					
Primärdiagnose	12	80	8	100	0,53
Rezidivdiagnose	3	20	0	0	
TKI					
Erlotinib	6	40	6	75	0,19
Gefitinib	9	60	2		
TKI-Therapielinie					
Erst	8	53	1	13	0,14
Zweit	5	33	4	50	
≥Dritt	2	13	3	37	
Best response auf TKI					
PR	5	33	0	0	0,10
SD	5	33	6	75	
PD	5	33	2	25	

Abkürzungen: n= Anzahl; TKI, Tyrosinekinase-Inhibitor; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease; *, Rezidiv bezeichnete per definitionem ein NSCLC, das frühestens 12 Monate ohne Tumornachweis nach einem kurativ behandelten NSCLC auftrat; die p-Werte wurden je nach Bedarf mit dem t-Test oder dem Fisher-exact-Test berechnet

3.6 C-Met-Status in Bezug auf die *EGFR*-Mutationstypen

Die *EGFR*-Mutationen unserer Kohorte wurden nach Exonverteilung (19/20/21) eingeteilt (Tabelle 6). Zwei nicht-typische Punktmutationen im Exon 21 wurden dabei berücksichtigt und separat gewertet (≠ L858R). Wir untersuchten, ob es einen Zusammenhang zwischen c-Met-Status und *EGFR*-Mutationstyp gab. Hypothese war, dass sich die Tumorzellen nicht im c-Met-Status unterscheiden, da die 23 Fälle TKI-sensitiv waren. Im Hinblick auf die Exonverteilung zeigte sich jedoch, dass in der c-Met-negativen Gruppe die Mutation vom Typ L858R auf Exon 21 und in der c-Met-positiven Gruppe die Exon 19 Deletionen dominierten. Betrachtet man isoliert die 12 Deletionen auf Exon 19 und die 8 Mutationen vom Typ L858R, die mit 87% in unserer Kohorte und 90% in der Literatur die häufigsten Mutationen sind, ergibt sich ein p=0,01 (Fisher´s exact Test). Tabelle 6 fasst die Zusammenhänge zwischen c-Met-Status, *EGFR*-Mutation und Histologie zusammen. Auch wenn die c-Met-Negativität der Plattenepithelkarzinome im Fisher-exact-Test nicht signifikant war, lagen die mit ImageJ-ermittelten Werte des c-Met-Signals in der Plattenepithelkarzinom-Gruppe signifikant unter den Werten der Adenokarzinome (p=0,04, Student´s t-Test).

Tabelle 6: c-Met-Status nach *EGFR*-Mutation und Therapielinie des TKI.

	c-Met negativ				**c-Met positiv**					
	ADC		SCC		ADC		SCC		Vergleich von	*P*-Wert
	n	%	n	%	n	%	n	%	c-Met +/-	Fisher-Test
Exon 19 Deletion	5	33	0	0	7	88	0	0	19 Del/≠19Del	0,03
Exon 20	0	0	0	0	1	12	0	0	L858R/≠L858R	0,02
Exon 21 L858R	5	33	3	20	0	0	0	0	Exon 21/≠Exon 21	0,003
Exon 21 ≠L858R	0	0	2	13	0	0	0	0		
TKI-Erstlinie	4	27	4	27	1	12	0	0	Erst-/Zweitlinie	0,29
TKI-Zweitlinie	5	33	0	0	4	50	0	0	Erst-/≠Erstlinie	0,09
TKI-Drittlinie	1	7	1	7	3	38	0	0	Dritt-/≠Drittlinie	0,3

Abkürzungen: TKI, Tyrosinkinase-Inhibitor; ADC, Adenokarzinom der Lunge; SCC, Plattenepithelkarzinom der Lunge; n= Anzahl;+, positiv; -, negativ; Del, Deletion

3.7 C-Met-Status in Bezug auf die TKI-Therapielinie

Da sich Tumorzellen unter Chemotherapie verändern und möglicherweise vorhandene c-Met-positive Tumorzellklone in verstärktem Maße dem Zelltod anheim fallen oder selektiert werden, beachteten wir die heterogene Behandlung unsers Kollektivs durch eine Subgruppenanalyse der Therapielinien hinsichtlich c-Met-Status. Der t-Test zeigte, dass der TKI bei c-Met-negativen Patienten eine signifikant niedrigere Therapielinie als bei c-Met-positiven Patienten darstellte (p=0,03). Dieser Unterschied bestätigte sich nicht, als wir die Patienten nach TKI-Therapielinie stratifiziert im Fisher-exact-Test überprüften (Tabelle 6): Bei den 14 Patienten, die den TKI nicht als Erstlinientherapie erhalten hatten, zeigte sich im Fisher-exact-Test mit p=0,09 ein Trend zu einem positivem c-Met-Status. Im Vergleich des c-Met-Status der Patienten, die den TKI als dritte oder vierte Pharmakotherapie erhalten hatten, zum c-Met-Status der Erst-/Zweitlinien-Gruppe lag der p-Wert bei 0,3.

Es bestand eine Assoziation zwischen der Zeitspanne bis zum TKI-Start und c-Met-Status, und der t-Test zeigte mit p=0,02 einen signifikanten Unterschied im c-Met-Status. Bei den Patienten mit c-Met-negativen Tumorzellen war die TKI-Behandlung im Mittel nach 4, bei Patienten mit c-Met-positiven Tumoren nach 18 Monaten begonnen worden. Nach Ausschluss eines Ausreißers unter den positiven Fällen (Dauer bis zum TKI-Start 65 Monate), relativierte sich die Zeitspanne von Diagnose bis TKI-Beginn in der c-Met-positiven Subgruppe auf 11 Monate und die Signifikanz lag bei p=0,03.

Die drei Rezidiv-Patienten unseres Kollektivs hatten einen c-Met-negativen Status. Hier fand sich im Vergleich zu den Patienten mit Primärdiagnose kein signifikanter Unterschied (p=0,53).

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass sich die klinischpathologischen Parameter der c-Met-negativen und c-Met-positiven Subgruppen nicht in Bezug auf Alter, Geschlecht, Histologie oder Raucher-Status unterschieden, wobei der TKI in c-Met-positiven Patienten als spätere Therapielinie als in c-Met-negativen Patienten rezeptiert wurde.

3.8 Überlebenszeitanalyse und prognostische Bedeutung des c-Met-Status im *EGFR*-mutierten NSCLC

Die Kaplan-Meier-Kurven (Abbildung 3) zeigen, dass die c-Met-negativen Patienten im beobachteten Zeitraum hinsichtlich des Gesamtüberlebens einen aggressiveren Verlauf (22 Monate medianes Gesamtüberleben, Spannbreite 3-60 Monate) als die Patienten aus der positiven Gruppe (67 Monate medianes Gesamtüberleben, Spannbreite 3-71 Monate) aufwiesen**.**

Mit einem *p*=0,05 im log rank-Test war dieser Unterschied nicht signifikant.

Unser Fall der Exon 20 Missense-Mutation mit unklarer TKI-Sensitivität zeigte unter Anti-EGFR-Therapie einen Progress der Erkrankung. Nach Ausschluss dieses c-Met-positiven Falls betrug das mediane Überleben in dieser Subgruppe unverändert 67 Monate und die Signifikanz im log rank-Test lag bei *p*=0,017.

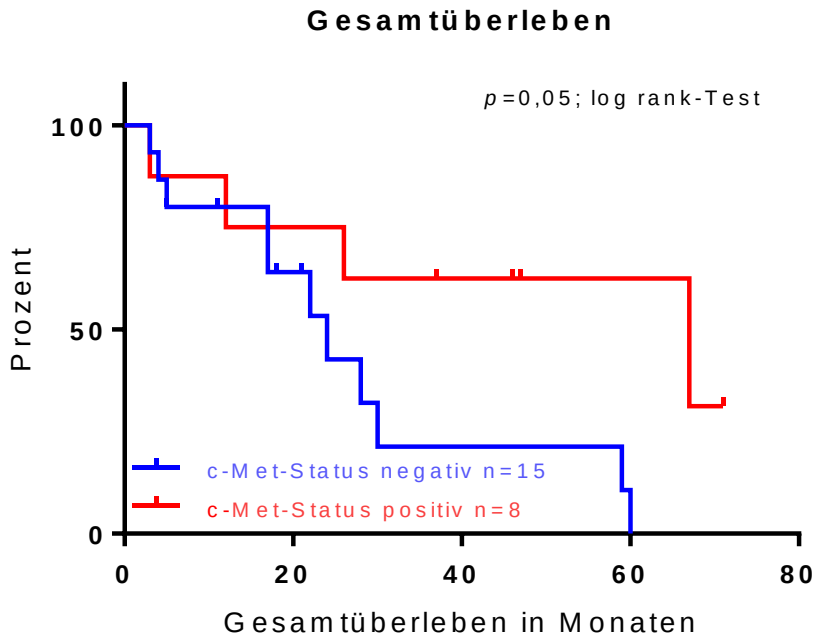

Abbildung 3: Gesamtüberleben der Studienkohorte nach c-Met-Status. Gesamtüberleben wurde definiert als Zeitintervall zwischen Diagnose und Tod. Abkürzungen: n, Anzahl Patienten

In der Überlebenszeitanalyse beachteten wir die beiden Subgruppen mit signifikant unterschiedlichen Merkmalen im c-Met Status und betrachteten das Gesamtüberleben nach c-Met-Status gesondert für Mutationstyp und der Therapielinie des TKI bzw. Zeitraum von Diagnosestellung bis Beginn der *EGFR*-Inhibitor-Therapie.

Um die signifikant unterschiedliche Mutationsverteilung innerhalb der beiden c-Met-Gruppen zu berücksichtigen, stratifizierten wir die c-Met-negative und c-Met–positive Gruppe in je zwei Untergruppen: (1) Mutation auf Exon 19 und (2) Mutation nicht auf Exon 19 (≠Exon 19).

Patienten mit Exon 19 Deletion zeigten mit 59 Monaten (c-Met-negativ) bzw. 67 Monaten (c-Met-positiv) ein längeres medianes Gesamtüberleben als Patienten mit Punktmutationen auf Exon 20 oder 21 (c-Met-negativ: 19,5 Monate; c-Met-positiv:3 Monate). Der Unterschied war im log rank-Test signifikant (p=0,001) und blieb auch nach Ausschluss der Exon 20 Mutation bestehen (p=0,048).

Wir unterteilten die c-Met-positiven und c-Met-negativen Patienten nach der Therapielinie des TKI (Erst-/Zweit-/Drittlinie) und vergleichen das Gesamtüberleben zwischen den Gruppen. Innerhalb der c-Met-Gruppen ordneten wir die Patienten der TKI-Zweitlinienbehandlung dabei der Erst- oder ≥Drittlinien-Gruppe zu.

In dieser Stratifizierung testeten wir die Überlebenswahrscheinlichkeiten der zwei zusammen gefassten Therapielinien gegen die Gruppe der noch verbliebenen Therapielinien-Gruppe. Patienten, bei denen der TKI als Erstlinien-Therapie rezeptiert worden war, hatten sowohl in der c-Met-negativen als auch der c-Met-positiven Gruppe das kürzeste mediane Gesamtüberleben (Tabelle 7).

Nach Ausschluss der fraglich TKI-sensitiven Exon 20 Mutation, die der einzige Erstlinienfall der c-Met-positiven Gruppe war, blieb dieser Unterschied bestehen (p=0,04; log rank-Test).

Tabelle 7: medianes Gesamtüberleben in Monaten nach c-Met-Status und der Therapielinie des TKI

TKI-Therapielinie	**c-Met negativ**		**c-Met-positiv**		Vergleich von	*p*-Wert
	Medianes OS	n (%)	Medianes OS	n (%)	c-Met+/c-Met-	log rank-Test
Erstlinie	24	8 (35)	3 *0*	1 (4) *0*	Erst-/≠Erstlinie	0,0008 *0,04*
Zweitlinie	59	5 (22)	36	4 (17)	Dritt-/≠Drittlinie	0,07 *0,04*
Drittlinie	41	2 (9)	69	3 (13)		

Abkürzungen: OS, medianes Gesamtüberleben in Monaten; TKI, Tyrosinkinase-Inhibitor; n= Anzahl; +, positiv; -, negativ; die *kursiven* Werte beziehen sich Berechnungen ohne den fraglich TKI-sensitiven Fall mit Exon 20 Mutation, wobei die Prozentangaben nicht angepasst wurden

Bei der Bivarianzanalyse des Gesamtüberlebens hinsichtlich c-Met-Status und Dauer des Diagnosezeitpunkts bis zum Beginn der TKI-Gabe stratifizierten wir unser Kollektiv zusätzlich zum c-Met-Status in zwei Gruppen:

(1) Patienten, bei denen die TKI-Therapie <3 Monate nach Diagnosestellung initiiert worden war und (2) Patienten, bei denen von Diagnose bis zum TKI-Beginn ≥3 Monate vergangen waren. Es fand sich kein signifikanter Unterschied (p=0,11). Auch variable Subgruppen-Einteilungen hinsichtlich der Dauer von Diagnose zur TKI-Gabe ergaben keinen Unterschied zwischen c-Met-Status und Gesamtüberleben.

Zusammenfassend konnten wir folgende Assoziation von c-Met-Status und Gesamtüberleben beobachten: in unserem Kollektiv an *EGFR*-mutierten NSCLC zeigten die c-Met-positiven Patienten mit p=0,05 den Trend zum längeren Gesamtüberleben.

4 Diskussion

Bei der Analyse unseres Kollektivs untersuchten wir 23 nichtkleinzellige Lungenkarzinome mit *EGFR*-Mutationen, von denen 35% einen positiven c-Met-Status hatten. Unsere Daten zeigten drei signifikante Unterschiede im c-Met-Status hinsichtlich klinischpathologischen Parametern: (1) In der c-Met-positiven Gruppe war die Frequenz an Exon 19 Deletionen höher (p=0,03; Fisher-exact-Test), (2) der TKI-Therapie war im Vergleich zu c-Met-negativen Patienten häufiger ≥ eine Chemotherapie(n) vorausgegangen (p=0,03; t-Test), und (3) dabei war die Zeit zwischen Diagnosestellung und Beginn der TKI-Gabe in der c-Met-positiven Gruppe länger (p=0,02; t-Test). Das mediane Gesamtüberleben der c-Met-positiven Gruppe lag mit 67 Monaten deutlich über dem Gesamtüberleben der c-Met-negativen Patienten (24 Monate). Dieser Unterschied verfehlte das Signifikanzniveau knapp (p=0,05; log rank-Test). Nach Ausschluss eines Falls mit fraglich TKI-resistenter Mutation, der den prognostischen c-Met-Einfluss unserer Kohorte möglicherweise verfälschte, verschärfte sich der Unterschied auf p=0,017. Somit zeichnete sich der Trend ab, dass der c-Met-Status insbesondere in der Gruppe der TKI-sensitiven mutierten NSCLC ein Potential als prognostischer Biomarker haben könnte.

Im NSCLC identifizieren *EGFR*-Mutationen eine klinisch relevante Subgruppe, da *EGFR*-mutierte Patienten unter Standardtherapie eine bessere Prognose haben und zudem die Option einer Anti-EGFR-Therapie besteht (Lynch et al. 2004, Sharma et al. 2007, Mok et al. 2009). Der Typ der *EGFR*-Mutation lässt auf das Profitieren von einer Anti-EGFR-Therapie schließen (Sharma et al. 2007): 90% der bekannten Mutationen sind TKI-sensitiv, 10% primär TKI-resistent. Die TKI-sensitiven Mutationen bedeuten für die Patienten unter TKI-Therapie ein verlängertes progressionsfreies Überleben bei unverändertem Gesamtüberleben (Mok 2011). Ein Grund hierfür ist die nahezu immer eintretende Entwicklung von TKI- Resistenzmechanismen der Tumorzellen. Das Auftreten der Resistenzen im Therapieverlauf ist variabel und die Variabilität des Ansprechens innerhalb der primär TKI-sensitiven Subgruppe tritt unabhängig von der Exonverteilung der Mutationen auf (Rosell et al. 2009, Rosell et al. 2012).

Des Weiteren scheint auch der angewandten TKI-Therapielinie, also Chemotherapie in beliebiger Anzahl vor TKI versus TKI-Gabe vor Chemotherapie, keine Rolle für die Ansprechrate zu spielen (Tsao et al. 2005).

Dementsprechend ist das Gesamtüberleben der NSCLC-Patienten mit TKI-sensitiver Mutation in der Literatur unabhängig von Exonverteilung oder TKI-Therapielinie, und unser Kollektiv verhält sich hier nicht einheitlich. Trotz der typischen *EGFR*-Mutationsverteilung in unserer Kohorte dürfen wir bei einer Fallzahl von n=23 von einer Einzelfallbeobachtung ausgehen. Wir nehmen an, dass der beobachtete Unterschied im Gesamtüberleben zwischen Patienten mit Exon 19 Deletionen und Patienten, deren *EGFR*-Mutation ungleich einer Exon 19 Deletion war, nicht repräsentativ ist.

Der Unterschied im Gesamtüberleben in Bezug auf die TKI-Therapielinie, wonach Patienten, die vor TKI-Gabe mit ≥ einer Chemotherapie behandelt worden waren, ein längeres Gesamtüberleben aufwiesen, könnte folgendermaßen relativiert werden: Seit 2004 sind TKI im fortgeschrittenem NSCLC nach Scheitern einer Erstlinien-Chemotherapie als ≥Zweitlinien-Therapie zugelassen. Das biologische Verständnis für *EGFR*-Mutation entwickelte sich parallel und wurde im Verlauf in die Leitlinien integriert. In der Bundesrepublik wird die Anti-EGFR-Therapie seit 2011 offiziell als Erstlinientherapie im EGFR-abhängigen NSCLC empfohlen. Somit ist bei einem Patientenkollektiv, deren *EGFR*-Mutationen von 2005 bis 2012 detektiert worden waren, eine gewisse Heterogenität in der Abfolge der TKI-basierten Therapielinien nachvollziehbar. Je weiter die Diagnose eines Patienten unseres Kollektivs in der Vergangenheit lag, desto höher die Wahrscheinlichkeit, den TKI nicht als Medikament erster Wahl zu erhalten. Die Tatsache, dass bei diesen Patienten in Relation zur TKI-Erstlinien-Gruppe mehr Zeit zwischen Tumordiagnose und TKI-Beginn verstreichen musste, fließt in die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeiten nach der Kaplan-Meier-Methode ein. Als Störfaktor lässt sie die Wahrscheinlichkeiten signifikant unterschiedlich werden. Festzuhalten bleibt, dass das mediane Gesamtüberleben unseres Kollektivs deutlich über dem Überleben von NSCLC ohne *EGFR*-Mutation lag, was den prognostischen Stellenwert der Mutation für die Patienten unterstreicht.

Das Protoonkogen *c-Met* vermittelt als Rezeptor-Tyrosinkinase nach Bindung des Liganden HGF über eine veränderte Genexpression das Wachstum epithelialer Zellen.

Die Expression und Aktivierung des Proteins führen in Tumorzellen zu verlängertem Überleben, vermehrter Proliferation, Invasivität sowie Angiogenese und sind in diversen Karzinomen mit einer schlechten Prognose assoziiert (Lennerz et al. 2011, Appleman 2011, Arriola et al. 2011).

Auch im NSCLC geht eine c-Met-Aktivierung mit einem verkürzten Gesamtüberleben einher (Chen et al. 2011, Sierra, Tsao 2011). Der Stellenwert als Biomarker in der *EGFR*-mutierten Subgruppe, die im Vergleich zum Wildtyp NSCLC ein ca. 6 Monate längeres Gesamtüberleben aufweist und von einer *EGFR*-Inhibitor-Therapie profitiert, ist jedoch unklar. Da eine c-Met-Aktivierung aber für bis zu 30% der sekundär erworbenen TKI-Resistenzen verantwortlich gemacht wird(Engelman et al. 2007, Okamoto et al. 2010, Bonanno et al. 2011) und somit an der Progression der Tumorerkrankung beteiligt ist, kann ein Zusammenhang zwischen c-Met-Status und TKI-Ansprechen bzw. Gesamtüberleben vermutet werden. Die bisher veröffentlichten Studien über c-Met als Biomarker im fortgeschrittenem NSCLC berücksichtigen die *EGFR*-mutierte Subgruppe einschließlich TKI-Therapie nicht explizit und wurden zum Großteil im asiatischen Raum, in dem die Frequenz der *EGFR*-Mutationen mindestens doppelt so häufig ist wie in kaukasischen Patienten, durchgeführt. Aktuell finden sich verschiedene Angaben über den Stellenwert von c-Met im EGFR-abhängigen Kollektiv:

Die Arbeitsgruppe um Shiu-Feng Huang hat die *c-Met*-Amplifiaktion an 43 *EGFR*-mutierten Patienten im Stadium IIIB/IV untersucht und fand dabei eine höhere Anzahl c-Met-Genkopien in den Fällen, die bereits vor der Analyse der *c-Met*-Amplifiaktion mit einer Chemotherapie behandelt worden waren. Sie vermuteten, dass eine c-Met-Amplifikation im Zusammenhang mit einer Chemotherapie-Resistenz steht. Zum Gesamtüberleben dieser Subgruppe wurden keine Angaben gemacht (Chen et al. 2011). Unter der Annahme, dass die c-Met-Amplifikation in einer vermehrten Protein-Translation resultiert, decken sich unsere Befunde hinsichtlich Zusammenhang zwischen c-Met-Status und TKI-Therapielinie mit den Daten von Chen et alii (Chen et al. 2011).

2011 prüften Yan Liu et alii mögliche Assoziation zwischen immunhistochemischem c-Met-Status und klinischpathologischen Parametern an 150 NSCLC (21%*EGFR*-mutiert) im Stadium I – IIIA, wobei sie den c-Met-Status nicht in Bezug auf das Gesamtüberleben untersuchen.

Ein Ergebnis war, dass ein positiver c-Met-Status im Adenokarzinom mit Exon 19 Deletionen assoziiert ist. Die Arbeitsgruppe verwendete dabei ein ähnliches Scoring-System für den c-Met-Status, allerdings graduierten sie die Proteinexpression mit vier anstatt zwei Graden feiner als wir (Cai et al. 2011). Dennoch deckt sich dieser Zusammenhang mit unseren Beobachtungen, wonach Exon 19 Deletionen mit einem positiven c-Met-Status einhergehen. Weitere Studien werden nötig sein, um diese Assoziation auch im Hinblick auf die NSCLC-Histologie zu bestätigen.

Eine Studie der Arbeitsgruppe um Ravi Salgia untersuchte 2011 die prognostische Bedeutung des Proteins c-Met und seines phosphorylierten Zustands p-Met in 129 Patienten mit Lungenkarzinom, hierunter 28% kleinzellige Karzinome, 37% Stadium IIIB/IV und 63% kaukasische Patienten. Mögliche *EGFR*-Mutationen wurden nicht berücksichtigt. In diesem inhomogenen Kollektiv zeigten p-Met-positive Patienten ein kürzeres Gesamtüberleben, was die Relevanz von c-Met als Biomarker im Lungenkarzinom unterstreicht. Hervorzuheben ist folgende Beobachtung der Autoren zwischen prognostischem Potential des p-Met-Status und der Rasse der Patienten: Unter den kaukasischen Patienten war der Unterschied im Gesamtüberleben in der p-Met-positiven und p-Met-negativen Subgruppe besonders ausgeprägt, wohingegen kein Unterschied in der afroamerikanischen Gruppe nachweisbar war. Da die Assoziation zwischen Biomarker und Rasse signifikant war, ist zu bedenken, ob dem c-Met-Status in kaukasischen, *EGFR*-mutierten Patienten eine größere Relevanz zukommt als in anderen Bevölkerungen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich die größte Rate an *EGFR*-Mutationen im NSCLC in Asien findet und die Mutationsfrequenz in den restlichen Teilen der Welt bei ca. 10% liegt. Dies relativiert die Ungleichheit des c-Met-Status zwischen den kaukasischen und afroamerikanischen Patienten, zeugt jedoch vom Einfluss der Ethnie auf das biologische Verhalten der Tumorzellen.

Hinsichtlich des prognostischen Stellenwerts des c-Met-Status in unserer Kohorte ist festzuhalten, dass ein positiver c-Met-Status mit einem längeren Gesamtüberleben einherging und dieser Unterschied fast statistische Signifikanz erreichte. Der deutliche Trend, dass c-Met-positive Patienten im *EGFR*-mutierten NSCLC ein längeres Gesamtüberleben zeigten, steht im Gegensatz zur c-Met-Bedeutung im Wildtyp NSCLC.

Sowohl für nicht-solide Neoplasien als auch für epitheliale Tumoren ist bekannt, dass eine c-Met-Aktivierung in gewissen Krankheiten ein positiv prognostischer Faktor sein kann (Gisterek et al. 2011, Xu et al. 2012). 2012 zeigte Lydia Visser in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Ulm, dass eine *c-Met*-Onkogen Expression im klassischen Hodgkin Lymphom eine exzellente Prognose hat.

Da die Tumorzellen im klassischen Hodgkin Lymphom nur ca. 1% neben dem Begleitinfiltrat stellen und die Prognose im Vergleich zu anderen Tumoren gut ist, unterscheidet sich die biologische c-Met-Funktion hier vermutlich von der eines epithelialen Tumors. Ein Karzinom, in dem c-Met mit einer besseren Prognose vergesellschaftet ist, scheint der Brustkrebs zu sein. Eine polnische Arbeitsgruppe beobachtete über einen 5-Jahres-Zeitraum an 302 Mammakarzinom- Patientinnen in den immunhistochemisch c-Met-positiven Tumoren ein längeres Gesamtüberleben (Gisterek et al. 2011). Dabei betonten die Autoren die Homogenität ihres Kollektivs hinsichtlich klinischpathologischer Daten.

Es ist daher vorstellbar, dass das Onkogen *c-Met* in der klinisch distinkten, *EGFR*-mutierten Subgruppe eine andere biologische Bedeutung hat als im Wildtyp NSCLC und die c-Met-positiven, EGFR-abhängigen Tumorzellen in anderer Dynamik proliferieren oder sich weniger aggressiv verhalten. Sollte sich das positiv prognostische Potential von c-Met in einer unabhängigen Validierungskohorte bestätigen, hätten c-Met-positive NSCLC Patienten mit TKI-sensitiver *EGFR*-Mutation im Stadium IIIB/IV unter den bekannten NSCLC-Subgruppen im fortgeschrittenen Stadium die beste zu erwartende Überlebenschance.

Die hier vorgestellte Biomarkerstudie ist in ihrer Aussagekraft begrenzt: Das retrospektive Studiendesign mit kleiner Fallzahl limitiert die Aussage, dass c-Met-positive Patienten im *EGFR*-mutierten NSCLC den Trend zum längeren Überleben zeigen.

Zudem konnten wir die Verteilung von Merkmalen mit mehr als zwei Ausprägungen in unserer Kohorte nicht verlässlich mit dem Chi-square-Test analysieren, da dieser Test erst mit einer größeren Fallzahl anwendbar wird. Trichotome Variablen fassten wir in je zwei Gruppen zusammen und testeten mit dem Fisher-exact-Test, ob ein signifikanter Unterschied in der Verteilung vorlag.

Der Fisher-Test arbeitet wie der Chi-Square-Test mit Kontingenztabellen, erlaubt den korrekten Vergleich von Merkmalsausprägungen innerhalb einer Gruppe aber auch bei kleiner Fallzahl.

Es ist zu beachten, dass der Endpunkt Gesamtüberleben in der retrospektiven Analyse ebenso wie das Ende der Follow-up-Periode vor Studienbeginn definiert wurden. Weiterhin handelt es sich bei den *EGFR*-mutierten Patienten, die ca. 10% aller NSCLC in Europa ausmachen, um ein seltenes Patientengut. Unter diesem Aspekt scheint die Fallzahl von n=23 mit detaillierten klinischen Daten für den knapp bemessenen Einschlusszeitraum beachtlich.

Die Auswertung der Überlebenszeiten nach Kaplan-Meier zeigte Unterschiede hinsichtlich des c-Met-Status, was kritisch zu betrachten ist: Zwar sahen wir, dass c-Met-positive Patienten den klaren Trend zum längeren Gesamtüberlegen zeigten. Ebenso sahen wir ein signifikant längeres Überleben in der Gruppe der Exon 19 Deletionen im Vergleich zu Patienten, deren *EGFR*-Mutation nicht auf Exon 19 lag, sowie ein längeres Überleben in der Gruppe der Patienten, bei denen die TKI-Gabe nicht die Erstlinientherapie darstellte, im Vergleich zur Gruppe der TKI-Erstlinientherapie.

Daher deutet die Beobachtung, dass in der Gruppe der c-Met-positiven Patienten sowohl die Häufigkeit an Exon 19 Deletionen als auch von Patienten, die den TKI nicht als Erstlinientherapie erhalten hatten, signifikant höher lag, auf einen Störfaktor. Als konfundierende Variable darf hier insbesondere die TKI-Gabe in Reihenfolge vor oder nach Chemotherapie vermutet werden: Das Gesamtüberleben in der ≠TKI-Erstlinientherapie-Gruppe unserer Studienkohorte war signifikant länger als das Gesamtüberleben der TKI-Erstlinientherapie-Gruppe.

Bezüglich der Exon 19 Deletionen verhielt es sich ähnlich und die Patienten mit Exon 19 Deletion unserer Gesamt-Studienkohorte zeigten ein signifikant längeres Gesamtüberleben als Patienten anderer TKI-sensitiver Mutationen. Da in der Literatur weder die Assoziation von c-Met-Status noch die Überlegenheit der Exon 19 Deletionen im Vergleich zu den fast ebenso häufig vorkommenden Exon 21Missense-Mutationen vom Typ L858R bezüglich des Gesamtüberlebens beschrieben ist, bedarf diese Beobachtung weiterer Untersuchungen. Dabei wird sich zeigen, ob Tumorzellen mit Exon 19 Deletionen vermehrt c-Met-exprimieren und diese Patienten (daher) ein längeres Gesamtüberleben aufweisen.

Der Effektstärke der Einflussgrößen c-Met-Status, *EGFR*-Mutationstyp und TKI-Therapielinie auf die Überlebenswahrscheinlichkeiten hätte auch mit dem Hazards´ Regressionsmodell nach Cox ermittelt werden können. Dies war aber aufgrund der geringen Fallzahl nicht möglich. Weiterhin setzt die Hazard-Funktion des Cox-Modells die zeitliche Konstanz der einflussübenden Größen auf die Zielvariable voraus, was in unserer Studie aufgrund der Abhängigkeit von TKI-Therapielinie und Krankheitsdauer bzw. Therapieverlauf nicht garantiert werden kann.

In Anbetracht der Bedeutung von c-Met für die mesenchymale-epitheliale Transition in Karzinomzellen hätten wir die c-Met-Verteilung unserer Kohorte auch in Hinblick auf morphologische Assoziationen untersuchen können: Zeichen der Anaplasie (Nukleolenprominenz, erhöhte Kern-Plasma-Relation, Kernhyper-chromasie), Proliferation (erhöhte Rate an atypischen Mitosen, gesteigerter Zellverlust (Apoptose, Nekrose)) oder Tumorangiogenese hätten auf die Aggressivität der Karzinome hinweisen können. Dies hätte uns eventuell einen Rückschluss auf das Wachstumsverhalten der *EGFR*-mutierten Karzinome in Abhängigkeit des c-Met-Status ermöglicht. Nur in 13% der Fälle stand uns Resektionsmaterial und somit ausreichend Tumorzellen im Gewebeverband für die c-Met-Färbung zur Verfügung. In den restlichen 87% (Zytozentrifugate, Biopsien) hätten wir die Tumormorphologie nicht auswerten können. Weiterhin arbeiteten wir mit einer zerebralen Metastase. Da der Einfluss der Blut-Liquor-Schranke auf eine zytotoxische Therapie und eventuelle c-Met-Selektion unbekannt ist, ist eine histomorphologische Analyse im Micronenvironmet des zentralen Nervensystems kritisch zu sehen.

Ein weiterer Kritikpunkt ist die Gliederung unserer Kohorte in nur zwei Gruppen nach c-Met-Status. Eine detaillierte Unterteilung, beispielsweise nach Score der mikroskopischen Analyse, hätte die c-Met-Färbung besser graduiert. Zum einen berücksichtigten wir die c-Met-Hierarchie durch den Einsatz der ImageJ-Messwerte bei möglichen Korrelationen zwischen c-Met-Status mit weiteren Faktoren. Zum anderen ist die Zwei-Gruppen-Einteilung in Relation zu der begrenzten Fallzahl zu bewerten: Eine multivariate Analyse ist bei 23 Fällen statistisch nicht seriös durchführbar.

Auf biologischer Ebene wäre es interessant gewesen, die Überlebenszeiten nicht nur nach dem c-Met-Proteinnachweis in der Immunhistochemie zu stratifizieren, sondern zusätzlich nach weiteren Aktivierungswegen des c-*Met*-Protoonkogens aufzuschlüsseln. Ein solcher Aktivierungsweg wäre beispielsweise auf Genomebene die *c-Met*-Amplifikation. Diese ist im NSCLC mit einer schlechten Prognose assoziiert und limitiert in der *EGFR*-mutierten Subgruppe eine Anti-EGFR-Therapie (Park et al. 2012, Engelman et al. 2007). Zwar wäre eine solche Amplifikation anhand einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zu erheben gewesen, wäre aber in dem Großteil unserer Kohorte aufgrund von fehlendem Material nicht realisierbar gewesen.

Weiterhin hätten wir die c-Met-Aktivierung auf Proteinebene durch eine Immunhistochemie von phosphoryliertem p-Met nachweisen können. Dies hätte neben der *c-Met*-Genexpression auch die direkte Vermittlung der aggressiven Wachstumsstimuli über die c-Met-Signalkaskade zum Zellkern vermuten lassen (Appleman 2011). Nach Trans-Auto-Phosphorylierung liegen im p-Met-Zustand des Rezeptors zwei intrazelluläre Tyrosinreste am C-terminalen Ende phosphryliert vor (Tretiakova et al. 2011). An diese Phosphatreste binden Proteine mit Src Homologie 2 -Domänen, deren Rekrutierung zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege führt. Es stehen Antikörper, die an die betreffenden Tyrosinreste binden, käuflich zur Verfügung. Nachteil ist die variable Demaskierung der Antikörper-Bindestellen in p-Met, so dass eine stabile und konsistente Detektion des Proteins nicht garantiert werden kann. Weiterhin sind die Tyrosinreste im phosphoryliertem Zustand nur begrenzte Zeit stabil. Zum einen lässt dies eine p-Met-Konservierung in Formalin fragwürdig erscheinen, zum anderen darf angezweifelt werden, ob p-Met in acht Jahre altem Resektatmaterial nach Deparaffinierung und Antigen-Demaskierung repräsentativ nachweisbar ist.

Aufgrund dieser Argumente entschieden wir uns in Anbetracht der teilweise knappen Materialmenge für eine c-Met-Färbung. Neben dem Vorteil, dass der c-Met-Proteinnachweis im FFPE-Material zuverlässig und reproduzierbar möglich ist, arbeiteten die meisten Studien bezüglich c-Met im NSCLC mit einer c-Met-Immunhistochemie, wobei die Arbeitsgruppen über die Proteinmenge auf die Signaltransduktion rückschlossen (Cai et al. 2011, Tsuta et al. 2012, Park et al. 2012).
Die Daten unseres Kollektivs werteten wir in Anlehnung an die Ergebnisse dieser Studien aus, sodass eine primäre c-Met-Färbung sinnvoll erschien.
Es gelang uns dabei mit dem immunhistochemischen c-Met-Status nicht, eine sichere Prognose für die *EGFR*-mutierten Patienten zu benennen, was die klinische Relevanz limitiert. Gleichzeitig wurde durch unsere Studie ein möglicher Biomarker aufgedeckt, der mit Hilfe der Immunhistochemie simpel, schnell und kostengünstig zu erheben wäre.

Zusammengefasst konnten wir in einem klinisch gut dokumentierten Kollektiv von seltenen *EGFR*-mutierten NSCLC-Patienten in 35% immunhistochemisch einen positiven c-Met-Status nachweisen. Ein positiver c-Met-Status ging mit einem verlängerten Gesamtüberleben einher, was trotz der kleinen Fallzahl fast Signifikanz erreichte. Dabei sind positive Korrelationen eines positiven c-Met-Status mit Charakteristika, die in unserem Kollektiv mit dem längsten Gesamtüberleben einhergingen (Frequenz von Exon 19 Deletionen, TKI-Therapielinie) als mögliche Störfaktoren zu bedenken.
Um das prognostische Potential von c-Met in der untersuchten Subgruppe zu bestätigen, werden weitere Studien in größerer Fallzahl notwendig sein. Die unverändert hohe Mortalität des NSCLC und die pharmakologische Option, c-Met-aktivierte und *EGFR*-mutierte Tumorzellen durch kombinierte EGFR/c-Met-Inhibitoren zu therapieren (Blumenschein et al. 2012), zwingt uns in Anbetracht der Banalität einer Immunhistochemie zu diesem Beitrag für die personalisierte Medizin.
Ausblickend ist zu erwähnen, dass bis zum heutigen Zeitpunkt kein prädiktiver Biomarker etabliert werden konnte, um die progressionsfreie Zeit unter TKI in der *EGFR*-mutierten Subgruppe zuverlässig zu ermitteln (Murray et al. 2012).

Die Resistenzmechanismen auf molekularer Ebene der *EGFR*-mutierten Tumorzellen sind teilweise verstanden, und die *c-Met*-Amplifikation wurde dabei als Progressionsmechanismus identifiziert.

Eine Theorie wäre, dass eine c-Met-Aktivierung die mutierten Tumorzellen in geringerem Maße vom *EGFR*-Onkogen abhängig werden lässt, und ihnen eine vermehrte Wachstumsautonomie ermöglicht. In Folge könnten die c-Met-positiven Tumorzellen den onkogenen Schock (Mok 2011) der Anti-EGFR-Therapie durch die bereits aktivierte Wachstumsalternative der c-Met-Kaskade schneller kompensieren und somit eine TKI-Resistenz erwerben. Eine Hypothese in Bezug auf c-Met wäre also, dass seine Aktivierung das progressionsfreie Überleben der *EGFR*-mutierten Patienten unter TKI verkürzt und die TKI-Antwort limitiert. Dies wäre invers zum hier beobachteten prognostischen Effekt.

Weitere Studien werden zeigen, ob c-Met Potential als gewebebasierter Biomarker hat, um Krankheitsverlauf, Therapieansprechen und Prognose der TKI-behandelten Patienten besser vorhersagen. Hierbei könnte eine unabhängige und idealerweise prospektive Studie helfen, bei der nach c-Met-Aktivierung stratifizierte Patienten mit *EGFR*-mutierten NSCLC bezüglich Therapie und Gesamtüberleben miteinander verglichen werden. Von Vorteil an diesem Studiendesign wäre, dass lediglich ein Gewebeschnitt des Tumormaterials der *EGFR*-Mutationsanalyse für die Erhebung des c-Met-Status nötig wäre.

5 Zusammenfassung

Mutationen des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors *(EGFR)* im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom bedeuten für die Patienten im Vergleich zum Wildtyp ein ca. 6 Monate längeres Gesamtüberleben und sind die Grundvoraussetzung für das Therapieansprechen auf Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI). Im Verlauf erwerben die Tumorzellen eine TKI-Resistenz, wobei in bis zu 30% das Protoonkogen *c-Met* aktiviert wird. C-Met-Aktivierung im NSCLC ist mit einer schlechten Prognose assoziiert, jedoch ist die Bedeutung in der *EGFR*-mutierten Subgruppe unklar. Hier untersuchten wir den Einfluss des c-Met-Status im TKI-behandelten, *EGFR*-mutierten NSCLC auf das Gesamtüberleben.

Die retrospektive Studie von Januar 2009 bis Mai 2012 hatte folgende Einschlusskriterien: TKI-sensitive *EGFR*-Mutation, NSCLC im Stadium IIIB/IV, klinisches Follow-up, TKI-Therapie für mindestens 4 Wochen und ausreichend Material für eine immunhistochemische c-Met-Färbung. Endpunkt war das Gesamtüberleben, ein $p<0.05$ galt als statistisch signifikant.

Von 812 auf *EGFR*-Mutationen untersuchten NSCLC Patienten hatten 74 (9%) eine Mutation im Exon 18-21 und 23 erfüllten die Einschlusskriterien. Darunter waren 78% Adenokarzinome, 70% Frauen und 48% gesicherte Nichtraucher. Je 48% Mutationen fanden sich im Exon 19 und 21, eine Mutation im Exon 20. Ein positiver c-Met-Status fand sich in 8 Fällen (35%). In der c-Met-positiven Subgruppe war die Frequenz an Exon 19 Deletionen höher als in den c-Met-negativen Fällen (p=0,03; Fisher exact-Test). Die TKI-Therapie war in der c-Met-positiven Gruppe im Vergleich zur c-Met-negativen Gruppe 14 Monate später nach Diagnosestellung begonnen worden (p=0,02; t-Test) und stellte in der c-Met-positiven Subgruppe eine höhere Therapielinie dar (p=0,03; t-Test). Das mediane Überleben betrug 28 Monate; in der c-Met-positiven Gruppe lag es bei 67, in der c-Met-negativen Gruppe bei 24 Monaten. Im Vergleich zur c-Met-negativen Gruppen hatten c-Met-positive Patienten einen Trend zum längeren Gesamtüberleben (p=0,05; log rank-Test).

Um das Potential von c-Met als prognostischen und prädiktiven Biomarker im TKI-behandelten, *EGFR*-mutierten NSCLC zu erarbeiten, sind Studien in größerer Fallzahl notwendig. Aufgrund der seltenen Mutationsrate in unserer Bevölkerung sind größere Kohorten über längerfristige Einschlusszeiträume zu etablieren, wozu unser gut dokumentiertes Kollektiv einen Beitrag leisten kann.

Literaturverzeichnis

1. Appleman L J: MET signaling pathway: a rational target for cancer therapy. J.Clin.Oncol., 29: 4837-4838 (2011)

2. Arriola E, Canadas I, Arumi-Uria M, Domine M, Lopez-Vilarino J A, Arpi O, Salido M, Menendez S, Grande E, Hirsch F R, Serrano S, Bellosillo B, Rojo F, Rovira A, Albanell J: MET phosphorylation predicts poor outcome in small cell lung carcinoma and its inhibition blocks HGF-induced effects in MET mutant cell lines. Br.J.Cancer, 105: 814-823 (2011)

3. Blumenschein G R,Jr, Mills G B, Gonzalez-Angulo A M: Targeting the hepatocyte growth factor-cMET axis in cancer therapy. J.Clin.Oncol., 30: 3287-3296 (2012)

4. Bonanno L, Jirillo A, Favaretto A: Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and new therapeutic perspectives in non small cell lung cancer. Curr.Drug Targets, 12: 922-933 (2011)

5. Brodowicz T, Ciuleanu T, Crawford J, Filipits M, Fischer J R, Georgoulias V, Gridelli C, Hirsch F R, Jassem J, Kosmidis P, Krzakowski M, Manegold C, Pujol J L, Stahel R, Thatcher N, Vansteenkiste J, Minichsdorfer C, Zochbauer-Muller S, Pirker R, Zielinski C C, Central European Cooperative Oncology Group (CECOG): Third CECOG consensus on the systemic treatment of non-small-cell lung cancer. Ann.Oncol., 23: 1223-1229 (2012)

6. Bronte G, Rizzo S, La Paglia L, Adamo V, Siragusa S, Ficorella C, Santini D, Bazan V, Colucci G, Gebbia N, Russo A: Driver mutations and differential sensitivity to targeted therapies: a new approach to the treatment of lung adenocarcinoma. Cancer Treat.Rev., 36 Suppl 3: S21-9 (2010)

7. Cai Y R, Zhang H Q, Qu Y, Mu J, Zhao D, Zhou L J, Yan H, Ye J W, Liu Y: Expression of MET and SOX2 genes in non-small cell lung carcinoma with EGFR mutation. Oncol.Rep., 26: 877-885 (2011)

8. Chen Y T, Chang J W, Liu H P, Yu T F, Chiu Y T, Hsieh J J, Chen Y T, Chen Y R, Wu H D, Huang S F: Clinical implications of high MET gene dosage in non-small cell lung cancer patients without previous tyrosine kinase inhibitor treatment. J.Thorac.Oncol., 6: 2027-2035 (2011)

9. Cohen M H, Johnson J R, Chen Y F, Sridhara R, Pazdur R: FDA drug approval summary: erlotinib (Tarceva) tablets. Oncologist, 10: 461-466 (2005)

10. Domingo G, Perez C A, Velez M, Cudris J, Raez L E, Santos E S: EGF receptor in lung cancer: a successful story of targeted therapy. Expert Rev.Anticancer Ther., 10: 1577-1587 (2010)

11. Eisenhauer E A, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz L H, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J: New response evaluation criteria in solid

tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur.J.Cancer, 45: 228-247 (2009)

12. Engelman J A, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park J O, Lindeman N, Gale C M, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes A J, Rogers A M, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson B E, Cantley L C, Janne P A: MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. Science, 316: 1039-1043 (2007)

13. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P: Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann.Oncol., 18: 581-592 (2007)

14. Gisterek I, Lata E, Halon A, Matkowski R, Szelachowska J, Biecek P, Kornafel J: Prognostic role of c-met expression in breast cancer patients. Rep.Pract.Oncol.Radiother., 16: 173-177 (2011)

15. Go H, Jeon Y K, Park H J, Sung S W, Seo J W, Chung D H: High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. J.Thorac.Oncol., 5: 305-313 (2010)

16. Haber D A, Bell D W, Sordella R, Kwak E L, Godin-Heymann N, Sharma S V, Lynch T J, Settleman J: Molecular targeted therapy of lung cancer: EGFR mutations and response to EGFR inhibitors. Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol., 70: 419-426 (2005)

17. Hanahan D, Weinberg R A: Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144: 646-674 (2011)

18. Hanahan D, Weinberg R A: The hallmarks of cancer. Cell, 100: 57-70 (2000)

19. Hecht S S: Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. Lancet Oncol., 3: 461-469 (2002)

20. Kenfield S A, Wei E K, Stampfer M J, Rosner B A, Colditz G A: Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. Tob.Control, 17: 198-204 (2008)

21. Kobayashi S, Boggon T J, Dayaram T, Janne P A, Kocher O, Meyerson M, Johnson B E, Eck M J, Tenen D G, Halmos B: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N.Engl.J.Med., 352: 786-792 (2005)

22. Lennerz J K, Kwak E L, Ackerman A, Michael M, Fox S B, Bergethon K, Lauwers G Y, Christensen J G, Wilner K D, Haber D A, Salgia R, Bang Y J, Clark J W, Solomon B J, Iafrate A J: MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophagogastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib. J.Clin.Oncol., 29: 4803-4810 (2011)

23. Lynch T J, Bell D W, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto R A, Brannigan B W, Harris P L, Haserlat S M, Supko J G, Haluska F G, Louis D N,

Christiani D C, Settleman J, Haber D A: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N.Engl.J.Med., 350: 2129-2139 (2004)

24. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T, North-East Japan Study Group: Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. N.Engl.J.Med., 362: 2380-2388 (2010)

25. Mirsadraee S, Oswal D, Alizadeh Y, Caulo A, van Beek E J: The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. World J.Radiol., 4: 128-134 (2012)

26. Mok T S: Personalized medicine in lung cancer: what we need to know. Nat.Rev.Clin.Oncol., 8: 661-668 (2011)

27. Mok T S, Wu Y L, Thongprasert S, Yang C H, Chu D T, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang J J, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield E L, Watkins C L, Armour A A, Fukuoka M: Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N.Engl.J.Med., 361: 947-957 (2009)

28. Mozley P D, Bendtsen C, Zhao B, Schwartz L H, Thorn M, Rong Y, Zhang L, Perrone A, Korn R, Buckler A J: Measurement of tumor volumes improves RECIST-based response assessments in advanced lung cancer. Transl.Oncol., 5: 19-25 (2012)

29. Murray S, Karavasilis V, Bobos M, Razis E, Papadopoulos S, Christodoulou C, Kosmidis P, Fountzilas G: Molecular predictors of response to tyrosine kinase inhibitors in patients with Non-Small-Cell Lung Cancer. J.Exp.Clin.Cancer Res., 31: 77 (2012)

30. Nishino M, Guo M, Jackman D M, DiPiro P J, Yap J T, Ho T K, Hatabu H, Janne P A, Van den Abbeele A D, Johnson B E: CT tumor volume measurement in advanced non-small-cell lung cancer: Performance characteristics of an emerging clinical tool. Acad.Radiol., 18: 54-62 (2011)

31. Okamoto W, Okamoto I, Tanaka K, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Yamaguchi H, Arao T, Nishio K, Fukuoka M, Janne P A, Nakagawa K: TAK-701, a humanized monoclonal antibody to hepatocyte growth factor, reverses gefitinib resistance induced by tumor-derived HGF in non-small cell lung cancer with an EGFR mutation. Mol.Cancer.Ther., 9: 2785-2792 (2010)

32. Pao W, Miller V A, Politi K A, Riely G J, Somwar R, Zakowski M F, Kris M G, Varmus H: Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. PLoS Med., 2: e73 (2005)

33. Park S, Choi Y L, Sung C O, An J, Seo J, Ahn M J, Ahn J S, Park K, Shin Y K, Erkin O C, Song K, Kim J, Shim Y M, Han J: High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients. Histol.Histopathol., 27: 197-207 (2012)

34. Riely G J, Politi K A, Miller V A, Pao W: Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. Clin.Cancer Res., 12: 7232-7241 (2006)

35. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez J M, Porta R, Cobo M, Garrido P, Longo F, Moran T, Insa A, De Marinis F, Corre R, Bover I, Illiano A, Dansin E, de Castro J, Milella M, Reguart N, Altavilla G, Jimenez U, Provencio M, Moreno M A, Terrasa J, Munoz-Langa J, Valdivia J, Isla D, Domine M, Molinier O, Mazieres J, Baize N, Garcia-Campelo R, Robinet G, Rodriguez-Abreu D, Lopez-Vivanco G, Gebbia V, Ferrera-Delgado L, Bombaron P, Bernabe R, Bearz A, Artal A, Cortesi E, Rolfo C, Sanchez-Ronco M, Drozdowskyj A, Queralt C, de Aguirre I, Ramirez J L, Sanchez J J, Molina M A, Taron M, Paz-Ares L, Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Francais de Pneumo-Cancerologie and Associazione Italiana Oncologia Toracica: Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol., 13: 239-246 (2012)

36. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, Majem M, Lopez-Vivanco G, Isla D, Provencio M, Insa A, Massuti B, Gonzalez-Larriba J L, Paz-Ares L, Bover I, Garcia-Campelo R, Moreno M A, Catot S, Rolfo C, Reguart N, Palmero R, Sanchez J M, Bastus R, Mayo C, Bertran-Alamillo J, Molina M A, Sanchez J J, Taron M, Spanish Lung Cancer Group: Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. N.Engl.J.Med., 361: 958-967 (2009)

37. Sawada K, Radjabi A R, Shinomiya N, Kistner E, Kenny H, Becker A R, Turkyilmaz M A, Salgia R, Yamada S D, Vande Woude G F, Tretiakova M S, Lengyel E: c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion. Cancer Res., 67: 1670-1679 (2007)

38. Schiller J H, Harrington D, Belani C P, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J, Johnson D H, Eastern Cooperative Oncology Group: Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. N.Engl.J.Med., 346: 92-98 (2002)

39. Sequist L V, Martins R G, Spigel D, Grunberg S M, Spira A, Janne P A, Joshi V A, McCollum D, Evans T L, Muzikansky A, Kuhlmann G L, Han M, Goldberg J S, Settleman J, Iafrate A J, Engelman J A, Haber D A, Johnson B E, Lynch T J: First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. J.Clin.Oncol., 26: 2442-2449 (2008)

40. Sequist L V, von Pawel J, Garmey E G, Akerley W L, Brugger W, Ferrari D, Chen Y, Costa D B, Gerber D E, Orlov S, Ramlau R, Arthur S, Gorbachevsky I,

Schwartz B, Schiller J H: Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer. J.Clin.Oncol., 29: 3307-3315 (2011)

41. Sharma S V, Bell D W, Settleman J, Haber D A: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nat.Rev.Cancer., 7: 169-181 (2007)

42. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A: Cancer statistics, 2014. CA Cancer.J.Clin., 64: 9-29 (2014)

43. Sierra J R, Tsao M S: c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. Ther.Adv.Med.Oncol., 3: S21-35 (2011)

44. Leslie H. Sobin L H, Gospodarowicz M K, Wittekind C: The TNM Classification of Malignant Tumours 7th edition, ISBN: 978-1-4443-3241-4 (2010)

45. Tretiakova M, Salama A K, Karrison T, Ferguson M K, Husain A N, Vokes E E, Salgia R: MET and phosphorylated MET as potential biomarkers in lung cancer. J.Environ.Pathol.Toxicol.Oncol., 30: 341-354 (2011)

46. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio P M: MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. Nat.Rev.Mol.Cell Biol., 11: 834-848 (2010)

47. Tsao M S, Sakurada A, Cutz J C, Zhu C Q, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Shepherd F A: Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. N.Engl.J.Med., 353: 133-144 (2005)

48. Tsuta K, Kozu Y, Mimae T, Yoshida A, Kohno T, Sekine I, Tamura T, Asamura H, Furuta K, Tsuda H: c-MET/phospho-MET protein expression and MET gene copy number in non-small cell lung carcinomas. J.Thorac.Oncol., 7: 331-339 (2012)

49. Turke A B, Zejnullahu K, Wu Y L, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, Toschi L, Rogers A, Mok T, Sequist L, Lindeman N I, Murphy C, Akhavanfard S, Yeap B Y, Xiao Y, Capelletti M, Iafrate A J, Lee C, Christensen J G, Engelman J A, Janne P A: Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. Cancer.Cell., 17: 77-88 (2010)

50. Xu C, Plattel W, van den Berg A, Ruther N, Huang X, Wang M, de Jong D, Vos H, van Imhoff G, Viardot A, Moller P, Poppema S, Diepstra A, Visser L: Expression of the c-Met oncogene by tumor cells predicts a favorable outcome in classical Hodgkin's lymphoma. Haematologica, 97: 572-578 (2012)

Anhang

Danksagung und Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.