

Aus dem
CharitéCentrum für diagnostische und präventive Labormedizin
Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. Manfred Dietel

Habilitationsschrift

Gewebebasierte Evaluation von Biomarkern am Beispiel von RCCma, MGMT, CXCR4 und HER2

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Pathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Barbara Susanna Ingold Heppner

Eingereicht: August 2015

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. H. H. Kreipe, Medizinische Hochschule Hannover

**2. Gutachter: Herr Prof. Dr. I. Petersen, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum
Jena**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1. Einleitung	3
1.1 Biomarker	3
1.2 Zielstellung und Methodik	5
2. Eigene Arbeiten	12
2.1 Der monoklonale Antikörper RCCma in der Differentialdiagnose Hämangioblastom versus ZNS-Metastase eines hellzelligen Nierenzellkarzinoms	12
2.2 Bestimmung des MGMT-Status in Hirnmetastasen solider Tumoren	22
2.3 CXCR4: Zielmolekül für eine antiangiogenetische Therapie?	30
2.3.1 CXCR4 im Kolonkarzinom	30
2.3.2 CXCR4 im Magenkarzinom	43
2.4 Prävalenz der HER2-Positivität im kolorektalen Karzinom	55
3. Diskussion	65
3.1 Gewebebasierte Evaluation von Biomarkern in der Pathologie	65
3.2 Renal cell carcinoma marker - ein rein diagnostischer Biomarker	65
3.3 Der MGMT-Status in Hirnmetastasen solider Tumoren	66
3.4 CXCR4 - ein Zielmolekül für eine antiangiogenetische Therapie?	68
3.5 Der HER2-Status im kolorektalen Karzinom	69
4. Zusammenfassung	72
5. Literaturangaben	74
Danksagung	78
Eidesstattliche Erklärung	79

Abkürzungen

ASCO/CAP	American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists
BRAF	B-rapidly accelerated fibrosarcoma
CCR5	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
CISH	chromogene in-situ-Hybridisierung
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DNA	desoxyribonucleic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FISH	Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung
Gp200	Glykoprotein 200
GPCR	G-protein coupled receptor
H/E	Hämatoxylin/Eosin
HER	human epidermal growth factor receptor
HER1/2/3/4	human epidermal growth factor receptor 1/2/3/4
HIV	human immunodeficiency virus
ISH	in-situ-Hybridisierung

KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LDH	Laktatdehydrogenase
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-Methyltransferase
MS-PCR	Methylierungs-spezifische Polymerase-Kettenreaktion
NRAS	neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
NZK	Nierenzellkarzinom
OS	overall survival
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIK3CA	Phosphatidylinositol 3 kinase catalytic unit alpha
RCCma	renal cell carcinoma marker
RNA	ribonucleic acid
SDF1	stromal cell derived factor 1
TMA	tissue microarray
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau
WHO	World Health Organisation
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Biomarker

Personalisierte Medizin ist der Begriff, der die heutige Medizin nachhaltig prägt. Dabei hat die personalisierte Medizin weniger mit einer einzelnen individuellen Person zu tun, sondern beschreibt eine stratifizierte Medizin, bei der Patienten in Abhängigkeit von definierten Kriterien in distinkte Subgruppen eingeteilt werden. Individuelle, krankheitsrelevante Biomarker werden dabei zur Prävention, Prognoseabschätzung und Therapieentscheidung herangezogen [1].

1998 wurde der Begriff „Biomarker“ von der *National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group* definiert als ein Parameter, der objektiv messbar ist und einen normalen biologischen Prozess, einen pathologischen Prozess oder ein pharmakologisches Ansprechen auf eine therapeutische Intervention widerspiegelt [2]. Der Begriff Biomarker ist sehr allgemein gefasst und beinhaltet prinzipiell alle messbaren Parameter, welche eine Interaktion zwischen einem biologischen System und der Umwelt reflektieren, angefangen bei Körpertemperatur, Blutdruck, Gewicht, über Einzelzellen oder zelluläre Moleküle wie Proteine, DNA, RNA bis hin zu komplexeren Labortests, welche mehrere Parameter kombinieren [3, 4]. Typischerweise werden Biomarker in folgenden vier Kategorien angewendet [2]:

Diagnose: Diagnostische Biomarker zeigen an, ob eine bestimmte Erkrankung bereits besteht.

Staging: Das Messen von sog. Tumormarkern lässt eine Aussage über das Ausmaß einer Erkrankung zu (beispielsweise LDH bei Keimzelltumoren des Hodens).

Prognose: Prognostische Biomarker lassen eine Aussage über die statistische Wahrscheinlichkeit zu, wie eine Krankheit verlaufen wird.

Prädiktion und Monitoring: Ein prädiktiver Biomarker liefert einerseits als Risikoindikator die Information, ob eine Erkrankung droht. Andererseits handelt es sich um Parameter, welche ein Ansprechen auf eine klinische Intervention anzeigen. Unter bestimmten Bedingungen können sie somit zur Therapiesteuerung verwendet werden.

Vor allem arzneimittelbezogene prädiktive Biomarker stehen im Fokus der aktuellen Forschung. Ziel ist es, mittels sogenannter „companion diagnostic“ oder „companion tests“ einen Marker oder ein ganzes Markerprofil eines Tumors genau zu charakterisieren, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob eine bestimmte Therapie für einen einzelnen Patienten von Erfolg sein wird. Als Beispiel ist die anti-HER2-Therapie mit Trastuzumab, einem gegen den *human epidermal growth factor receptor-2* (HER2)-gerichteten Antikörper, zu nennen. Die Ansprechrate von HER2-positiven Mammakarzinomen liegt bei 34 %, bei HER2-negativen hingegen nur bei 7 % [5].

Die obengenannte Einteilung der Biomarker ist durchaus fließend. Beispielsweise hat die immunhistologische Bestimmung des Östrogenrezeptors beim Mammakarzinom sowohl diagnostische (intrinsischer Subtyp), prognostische wie auch prädiktive Bedeutung (Indikation für eine antihormonelle Therapie) [4].

In der translationalen Forschung hat die Pathologie eine Schlüsselrolle. Da die durchgeführten Untersuchungen größtenteils gewebebasiert sind, schafft sie eine Schnittstelle zwischen Grundlagenforschung und Klinik. Ziel ist es, an Gewebeproben Biomarker zu definieren und zu validieren. Dies wird üblicherweise durch klassische immunhistologische Untersuchungen erreicht, bei denen die

antigenen Eigenschaften von Proteinen genutzt werden, um sie färberisch darzustellen. Verschiedene Gewebe zeichnen sich durch ein unterschiedliches Proteinmuster und damit durch ein immunhistologisch differentes Expressionsprofil aus, welches zum Beispiel bei der Untersuchung von Metastasen bei unklarem Primärtumor herangezogen wird, um entscheidende Hinweise auf den Primarius zu erhalten. Diese Untersuchungen können durch komplexere RNA- oder DNA-basierte Methoden komplettiert werden, welche Veränderungen auf genetischer Ebene detektieren. Mittels in-situ-Hybridisierung (ISH) lassen sich Nukleinsäuresequenzen auf Gewebeschnitten darstellen (FISH: Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung; CISH: chromogene in-situ-Hybridisierung). PCR-basierte Analysen (nach Sanger beispielsweise) werden in der Mutationsanalytik eingesetzt. Zunehmend kommen Hochdurchsatzverfahren zum Einsatz. Sie erlauben eine schnelle und zugleich detaillierte Analyse von genomischer DNA (Genomics), transkribierter mRNA (Transcriptomics) oder der exprimierten Proteine (Proteomics). Daraus lassen sich komplexe Interaktionen ableiten, welche unter dem Begriff „Systembiologie“ zusammengefasst Einblicke in biologische Systeme ermöglichen [6].

1.2 Zielstellung und Methodik

In den nachfolgend vorgestellten Arbeiten untersuchten wir in größeren Patientenkollektiven Biomarker auf deren diagnostische und prognostische Wertigkeit. Dabei lag ein Augenmerk darauf, inwiefern der jeweilige Marker überhaupt eine Rolle in der untersuchten Entität spielt und inwiefern sich bereits etablierte Marker auf andere Tumortypen übertragen lassen. Die nachfolgend dargestellten Resultate mündeten zudem in der Frage, inwiefern den untersuchten

Biomarkern auch eine prädiktive Wertigkeit zukommen könnte. Die Zielstellung wurde größtenteils mittels Immunhistologie bearbeitet, punktuell ergänzt durch DNA-basierte Verfahren, da diese Untersuchungen in der Routine gut umsetzbar sind und dem Praxisalltag entsprechen. Die Proben wurden mittels *tissue microarray* (TMA) Technik aufgearbeitet, die Kandidaten-Biomarker anschließend immunhistologisch überprüft. TMAs wurden unter anderem von Kononen und Kollegen entwickelt, um gewebebasierte Untersuchungen an zahlreichen Proben gleichzeitig durchführen zu können [7, 8]. Zur Herstellung eines TMAs werden Gewebeproben aus Paraffinblöcken - den sogenannten Donorblöcken - gestanzt, um sie anschließend in einer definierten Reihenfolge in einem leeren Empfängerparaffinblock zu platzieren. Je nach Größe der Stanzzylinder (zwischen 0,6 und 2 mm im Durchmesser) können bis zu mehrere hundert Proben in einem Block arrangiert werden. Aus dem daraus entstandenen TMA-Block wiederum, können zahlreiche Leerschnitte (bis zu 200) für weitere Untersuchungen angefertigt werden (siehe Abbildung 1).

Am häufigsten werden TMA-Schnitte für immunhistologische Färbungen verwendet, ISH für DNA und RNA sind ebenfalls möglich. Der große Vorteil von TMAs ist die leichte, schnelle und kostengünstige Überprüfung von Biomarkern in großen Patientenkollektiven. TMAs erlauben bei entsprechendem Studiendesign eine Aussage über die zelluläre Lokalisation des Moleküls, über dessen Prävalenz und, falls klinische Follow-up-Daten vorhanden sind, über die klinische Bedeutung [9]. In sehr heterogenem Gewebe minimiert die Entnahme mehrerer Stanzzylinder aus unterschiedlichen Arealen Stichprobenfehler, die aufgrund der gewebeimmanenten Heterogenität von Tumoren ein grundlegendes Problem bei der Auswertung von Biomarkern darstellt.

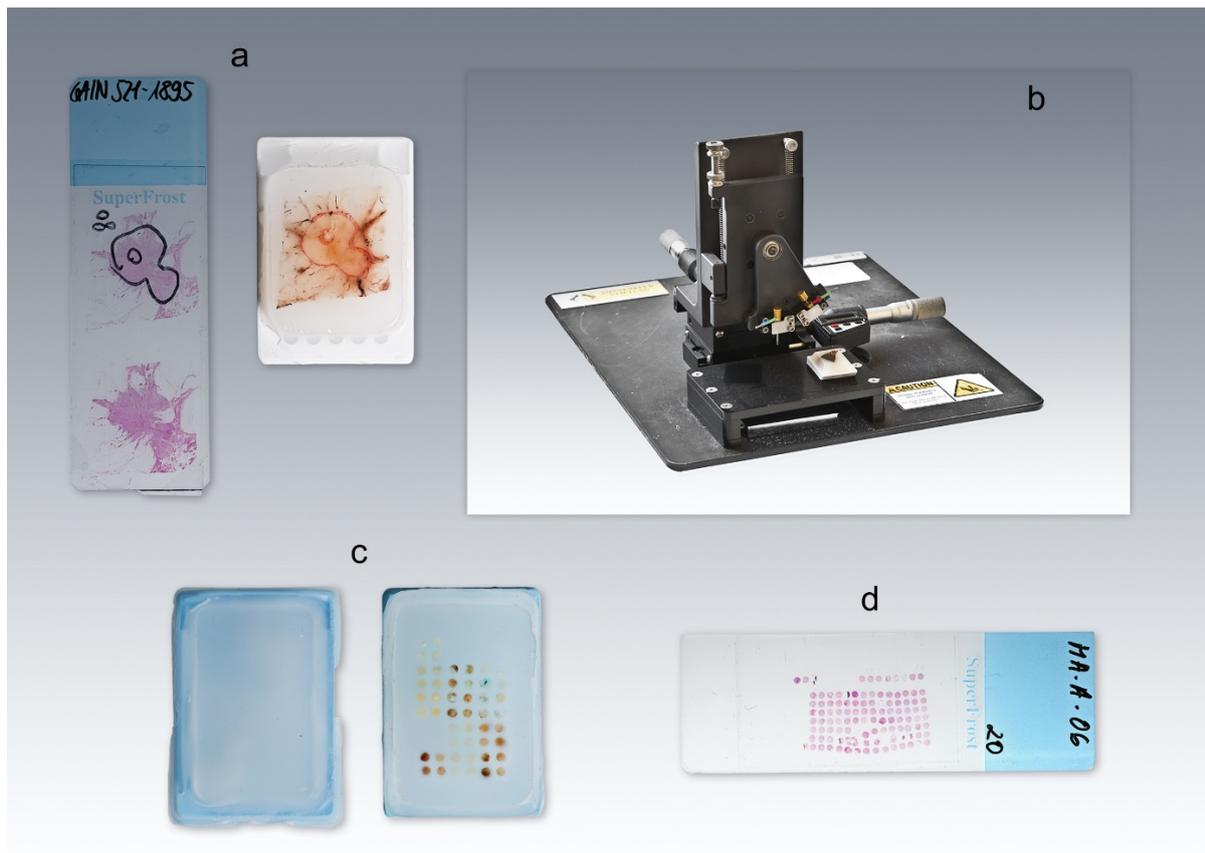


Abb. 1: Prinzip der Herstellung eines tissue microarrays. a) Donorblock und korrespondierender H/E-Schnitt. Tumor- und Stanzareal wird auf dem Schnittpräparat markiert. Die Markierung wird dann auf den Paraffinblock übertragen. b) Stanzgerät (Beecher Instruments, Inc., USA). c) Leerer Empfängerblock sowie fertiggestellter TMA-Block. d) H/E-Schnittpräparat eines TMAs. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Ch. Weber, Institut für Pathologie, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, erstellt.

Die in den eigenen nachfolgend vorgestellten Arbeiten mittels TMA-Technik untersuchten Biomarker sollen im Folgenden kurz erläutert werden:

Renal cell carcinoma marker: Der monoklonale Antikörper *renal cell carcinoma marker* (RCCma) ist gegen ein Glykoprotein gerichtet (gp200), welches im Bürstensaum der renalen proximalen Tubulusepithelien exprimiert wird [10]. Praktisch alle hochdifferenzierten hellzelligen und papillären Nierenzellkarzinome exprimieren den RCCma, während die chromophoben Nierenzellkarzinome,

Sammelrohrkarzinome und Onkozytome keine Immunreaktivität aufweisen [11]. In unserer Arbeit überprüften wir die Sensitivität und Spezifität von zwei unterschiedlichen RCCma-Antikörpern in einem großen Kollektiv verschiedener Nierentumoren. Wir untersuchten zudem, inwiefern der diagnostische Marker bereits etablierte Färbungen in der Differentialdiagnose hellzelliges Nierenzellkarzinom versus Hämangioblastom ergänzt.

O⁶-Methylguanin-Methyltransferase: Die O⁶-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) ist ein ubiquitär exprimiertes DNA-Reparaturenzym. Als Katalysator bewirkt MGMT die Entfernung von Alkylgruppen von der O⁶-Position von Guanin. MGMT wird anschließend ubiquitinyliert und als sogenanntes Suizidenzym abgebaut. DNA-alkylierende Chemotherapeutika wie das Blut-Hirn-Schranken-gängige Temozolomid, induzieren durch die Alkylierung eine gewollte DNA-Schädigung und den Zelltod. MGMT wirkt dieser Schädigung entgegen, was zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Chemoresistenz des behandelten Tumors führt [12].

Die MGMT-Proteinexpression wird über den Promotor des *MGMT*-Gens reguliert. Dieser beinhaltet mehrere sogenannte CpG-Inseln, eine erhöhte Abfolge von Cytosin/Guanin-Dinukleotiden. Durch Hypermethylierung der CpG-Inseln erfolgt eine epigenetische Stilllegung des Promotors. Dies gilt als Hauptursache für eine verminderte MGMT-Expression und damit einer reduzierten DNA-Reparaturfähigkeit [13, 14].

In mehreren Studien konnte der positive Zusammenhang zwischen MGMT-Promotor-Methylierung und Ansprechen auf alkylierende Chemotherapeutika belegt werden [13, 15, 16]. Patienten mit einem Glioblastoma multiforme - ein WHO Grad 4 Hirntumor - zeigen ein signifikant besseres Überleben nach einer kombinierten

Radio-Chemotherapie bei nachgewiesenen methyliertem MGMT-Promotor im Tumorgewebe [16].

Hirnmetastasen solider Tumore haben eine außerordentlich schlechte Prognose und hohe Mortalität. Die Therapie besteht im Wesentlichen aus Resektion, Radiochirurgie oder Radiotherapie. Chemotherapie spielt eine untergeordnete Rolle [17]. Dies liegt und anderem daran, dass die meisten systemisch verabreichten Therapeutika die Blut-Hirn-Schranke in zu geringer Menge oder gar nicht passieren [18]. Um zu überprüfen, ob Temozolomid bei Hirnmetastasen eine denkbare Therapieoption wäre, untersuchten wir den MGMT-Status in Hirnmetastasen verschiedener solider Tumoren immunhistologisch und PCR-basiert.

CXCR4 und CXCL12: Chemokine sind eine Gruppe von Signalproteinen, die die Migration unterschiedlicher Zelltypen, z.B. von Leukozyten oder Tumorzellen, bewirken. Sie binden an die korrespondierenden Chemokinrezeptoren, welche in die Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (G-protein coupled receptor, GPCR) gehören und damit die klassischen G-Protein-gekoppelten Signalkaskaden auslösen. Dabei können Chemokine und Chemokinrezeptoren auf unterschiedliche Weise zur Tumorentstehung beitragen, indem sie das lokale Milieu durch Entzündungszellen modulieren oder Tumorzellproliferation, Tumorzellmigration, Metastasierung oder Neoangiogenese induzieren. Tumorzellen wiederum können sowohl Chemokine wie auch Chemokinrezeptoren exprimieren [19].

Unter den ca. 20 bekannten Chemokinrezeptoren spielt CXCR4 eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung [20]. CXCR4 wird auf unterschiedlichen Zelltypen exprimiert, dazu gehören Fibroblasten, Endothelien, Lymphozyten oder hämatopoetische Stammzellen [21]. CXCR4 wird durch den Liganden CXCL12 (auch stromal derived

factor 1, SDF1) aktiviert [20]. Physiologischerweise reguliert CXCR4 die Migration von Stammzellen während der embryonalen Entwicklung von zentralem Nervensystem (ZNS), Knochenmark oder Herz [22, 23]. Des Weiteren ist CXCR4 neben CCR5 ein wichtiger Co-Rezeptor für das HI-Virus (HIV) [24].

Die CXCR4-CXCL12 Achse gilt als essentiell für die Interaktion von Tumorzellen mit dem Organismus. Über diese Signalkaskade wird Zellproliferation und Angiogenese gefördert, Apoptose inhibiert. Häufig von Metastasen betroffene Organe wie Lunge, Leber oder Lymphknoten weisen eine hohe CXCL12-Expression auf. Darüber werden CXCR4-positive Tumorzellen rekrutiert und die Fernmetastasierung initiiert [20].

Zusammengefasst sind CXCR4 und CXCL12 Schlüsselmoleküle in der Tumorentstehung und -progression und deswegen interessante therapeutische Angriffspunkte. Um zu überprüfen, welche Rolle CXCR4 und CXCL12 in Magen- und kolorektalen Karzinomen spielt, untersuchten wir deren Expression immunhistologisch und korrelierten die Resultate mit den klinischen Daten.

HER2: Die Gruppe der humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (HER) besteht aus vier transmembranären Tyrosinkinaserzeptoren, HER1 (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), HER2 (HER2/neu), HER3 (ERBB3) und HER4 (ERBB4). Sie weisen eine extrazelluläre Domäne zur Ligandenbindung sowie eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne auf. Die Bindung eines Liganden führt zu Homo- oder Heterodimerisierung des Rezeptors und damit zur Aktivierung der Kinaseaktivität, welche die proliferationsfördernde Signalkaskade in Gang setzt [25].

HER2 ist ein sogenanntes Onkogen. In ca. 15-20% der Mammakarzinome findet sich eine HER2-Überexpression/-Amplifikation dieses Markers. Diese Tumoren zeigen

einen signifikant aggressiveren und schlechteren Verlauf als beispielsweise Mammakarzinome vom luminalen Subtyp [4]. Durch die adjuvante Gabe des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab, konnte das Überleben von Patientinnen mit frühem oder metastasiertem HER2-positiven Mammakarzinom signifikant verbessert werden [26]. Heutzutage gehört die Antikörper-basierte anti-HER2-Therapie zum Standard. Neuere Medikamente wie Pertuzumab [27] oder Lapatinib, ein sogenannter small molecule Inhibitor, ergänzen die anti-HER2 Therapie [28]. In aktuellen Phase III Studien wird die Wirksamkeit des Antikörper-Zystostatikum-Konjugates Trastuzumab-Emtansine (T-DM1) überprüft, was weitere vielversprechende Behandlungsstrategien eröffnet [29].

In ca. 20% der Adenokarzinome des Magens und des gastro-ösophagealen Überganges lässt sich ebenfalls eine HER2-Überexpression/-Amplifikation detektieren [30]. Dabei weisen gut differenzierte Karzinome oder Karzinome vom intestinalen Typ (nach Laurén) eine höhere Prävalenz auf als schlecht differenzierte Karzinome oder Karzinome vom diffusen Typ (nach Laurén) [31]. Eine anti-HER2-Therapie mit Trastuzumab ist beim metastasierten Adenokarzinom des Magens und des gastro-ösophagealen Überganges mittlerweile zugelassen (<http://www.awmf.org/leitlinien>).

Interessanterweise zeigen auch andere Tumorentitäten wie Harnblasenkarzinome (12.4%), Gallenblasenkarzinome (9.8%) oder Cholangiokarzinome (6.3%) einen relevanten Anteil von HER2-positiven Karzinomen [32]. Bezüglich kolorektaler Karzinome ist die Datenlage uneinheitlich. Wir untersuchten deswegen in unserer Arbeit die Prävalenz und prognostische Bedeutung einer HER2-Positivität in einem Kollektiv kolorektaler Karzinome.

2. Eigene Arbeiten

2.1 Der monoklonale Antikörper RCCma in der Differentialdiagnose

Hämangioblastom versus ZNS-Metastase eines hellzelligen

Nierenzellkarzinoms

Literatur: Barbara Ingold, Peter J. Wild, Antonio Nocito, Mahul B. Amin, Martina Storz, Frank L.

Heppner, Holger Moch. Renal cell carcinoma marker reliably discriminates central nervous system hemangioblastoma from brain metastases of renal cell carcinoma. *Histopathology*; 2008; 52, 674-681 [33].

Die konventionell-morphologische Unterscheidung einer ZNS-Metastase eines hellzelligen Nierenzellkarzinoms (NZK) von einem kapillären Hämangioblastom stellt eine diagnostische Herausforderung dar. Erschwerend kommt hinzu, dass beide Tumorentitäten im Rahmen eines von Hippel-Lindau-Syndroms (VHL-Syndrom) auftreten können. Das VHL-Syndrom ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung aus dem Kreis der sog. Phakomatosen und geht einher mit kapillären Hämangioblastomen der Retina und des ZNS, Zysten des Pankreas und der Nieren sowie Phäochromozytomen oder Nierenzellkarzinomen [34].

Das kapilläre Hämangioblastom ist ein gutartiger Tumor (WHO Grad 1), tritt typischerweise in der Kleinhirnregion auf und wird im Verlauf bildgebend kontrolliert beziehungsweise bei Beschwerden operativ entfernt. Mit Rezidiven ist nur zu rechnen, wenn die Resektion nicht in sano erfolgte [35]. Das Auftreten einer Metastase eines Nierenzellkarzinoms hingegen reduziert das 5-Jahres-Überleben eines Patienten auf < 5% [36].

In einem ersten Schritt untersuchten wir mittels TMA-Methode 498 primäre Nierentumoren immunhistologisch mit zwei verschiedenen Klonen des Antikörpers

RCCma, Klon PN-15 und Klon 66.4C2. Erwartungsgemäß zeigten dabei chromophobe NZK und Onkozytome keine Immunreaktivität, wobei die meisten der hellzelligen und papillären NZK positiv waren (hellzellig: 66 % versus 77 %; papillär: 74 % versus 93 %; Klon: 66.4C2 versus PN-15).

Von 55 untersuchten ZNS-Metastasen hellzelliger NZK ließ sich in 50.9 % der Fälle eine Positivität für RCCma (Klon PN-15) nachweisen wohingegen alle kapillären Hämangioblastome (n=77) negativ blieben. In diesem definierten diagnostischen Setting zur Abgrenzung kapilläres Hämangioblastom des ZNS versus ZNS-Metastase eines hellzelligen NZKs, wies der Antikörper RCCma eine Sensitivität von 50.9 %, eine Spezifität von 100 %, einen positiven prädiktiven Wert von 100 % sowie einen negativen prädiktiven Wert von 72.4 % auf. Er ist somit eine wertvolle Ergänzung zu bereits etablierten Markern, wie CD10 oder EMA (epithelial membrane antigene) [37, 38].

Quelle:

Barbara Ingold, Peter J. Wild, Antonio Nocito, Mahul B. Amin, Martina Storz, Frank L. Heppner, Holger Moch. Renal cell carcinoma marker reliably discriminates central nervous system hemangioblastoma from brain metastases of renal cell carcinoma. *Histopathology*; 2008; 52, 674-681

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.03003.x>

2.2 Bestimmung des MGMT-Status in Hirnmetastasen solider Tumoren

Literatur: Barbara Ingold, Peter Schraml, Frank L. Heppner, Holger Moch. Homogeneous MGMT immunoreactivity correlates with an unmethylated MGMT promotor status in brain metastases of various solid tumors. PLOS One; 2009;4(3):e4775 [39].

Hirnmetastasen sind die häufigsten malignen Tumoren im Gehirn und machen ca. 30 % aus. Als Primärtumoren ist am häufigsten das Lungenkarzinom, gefolgt vom Mammakarzinom und dem malignen Melanom zu nennen. Die 1-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 10 % und ist somit sehr schlecht [40]. Abhängig von Lokalisation und Anzahl werden die Metastasen reseziert, radiochirurgisch angegangen, bestrahlt oder chemotherapiert, wobei letzteres sich am Primärtumor orientiert und eine untergeordnete Rolle spielt (Leitlinien ZNS-Metastasen und Meningeosis neoplastica; 2014; Neuro-Onkologische Arbeitsgemeinschaft). Eine Therapie mit dem alkylierenden, Blut-Hirn-Schranken-gängigen Chemotherapeutikum Temozolomid kombiniert mit einer Radiatio zeigte in einigen ersten klinischen Studien zur Behandlung von Hirnmetastasen diskrepante Resultate [41, 42]. Da der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors in malignen Gliomen ein prädiktiver Parameter für das Ansprechen auf alkylierende Substanzen wie Temozolomid [16] ist, dieser in Hirnmetastasen bislang nicht ausführlich untersucht war, bestimmten wir diesen mit einer Methylierungs-spezifischen PCR (MS-PCR) in Hirnmetastasen von Lungen-, Mamma-, Nierenzellkarzinomen und malignen Melanomen. In 29.6 % der Fälle (n=199), war der MGMT-Promotor methyliert (Lunge: 20/43, 46.5 %; Mamma: 13/45, 28.8 %; NZK: 6/30, 20 %; malignes Melanom: 20/81, 24.7 %).

Des Weiteren haben wir die MGMT-Expression immunhistologisch von 285 Hirnmetastasen auf TMAs untersucht. 31.8 % der Fälle zeigten keine

Immunreaktivität. 33.7 % der Metastasen waren homogen positiv während in 34.4 % die Färbung heterogen ausfiel.

Von insgesamt 178 Fällen lagen uns schließlich sowohl der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus wie auch die MGMT-Immunhistologie vor. Dabei war in der Gesamtkohorte eine homogene immunhistologische MGMT-Expression signifikant mit einem unmethylierten MGMT-Promotor assoziiert. Dies bestätigte sich auch in der Subgruppenanalyse für Lungen-, Mamma- und Nierenzellkarzinome. Bei den malignen Melanomen ließ sich ein Trend erkennen.

Insgesamt konnten wir in ca. einem Drittel der untersuchten Hirnmetastasen einen methylierten MGMT-Promotor nachweisen. Unserer Meinung nach wäre eine Therapie mit Blut-Hirn-Schranken-gängigen alkylierenden Medikamenten wie Temozolomid in dieser Subgruppe eine denkbare und zu überprüfende Option. Die Ergebnisse deuteten zudem darauf hin, dass mit Hilfe der Immunhistologie zumindest die Tumoren identifiziert werden können, welche einen unmethylierten MGMT-Promotor aufweisen. Die umgekehrte Aussage ließ sich nicht treffen, sodass weiterhin molekularpathologische Untersuchungen zur abschließenden Bestimmung indiziert sind.

Quelle:

Barbara Ingold, Peter Schraml, Frank L. Heppner, Holger Moch. Homogeneous MGMT immunoreactivity correlates with an unmethylated MGMT promotor status in brain metastases of various solid tumors. PLOS One; 2009;4(3):e4775 [39].

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004775>

2.3 CXCR4: Zielmolekül für eine antiangiogenetische Therapie?

2.3.1 CXCR4 im Kolonkarzinom

Literatur: Barbara Ingold, Stefan Schulz, Jan Budczies, Ulf Neumann, Matthias P.A. Ebert, Wilko Weichert, Christoph Röcken. The role of vascular CXCR4 expression in colorectal carcinoma. *Histopathology*; 2009; 55, 576-586 [43].

Diese Studie befasste sich mit der immunhistologischen Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 im kolorektalen Karzinom. Aus einigen *in vitro* und *in vivo* Studien war bereits bekannt, dass die CXCR4-CXCL12 Achse auch im kolorektalen Karzinom eine Rolle spielt [44]. Insgesamt wurden die Daten jedoch meist nur an kleinen Kollektiven erhoben, sodass wir dies unter Anwendung eines neuen, spezifischen anti-CXCR4 Antikörpers [45, 46] in einem größeren TMA-Kollektiv, bestehend aus 402 primären, nicht vorbehandelten kolorektalen Karzinomen, untersuchten. Des Weiteren überprüften wir die Expression des Liganden CXCL12. Die erhobenen Resultate korrelierten wir mit den korrespondierenden klinischen Daten.

In 31 % der Fälle konnte eine CXCR4 Expression in Tumorzellen nachgewiesen werden. Interessanterweise war diese lediglich mit einer Blutgefäßinvasion assoziiert (V1; $p=0.049$). In 25 % der untersuchten Tumoren war überdies eine kräftige CXCR4-Expression in den peritumoralen Blutgefäßen nachzuweisen. Dieses Färbemuster war statistisch signifikant assoziiert mit einer höheren T- ($p=0.008$), N- ($p=0.009$), M- ($p=0.043$), L- ($p=0.014$) und V- ($p=0.043$) Klassifikation sowie höheren UICC (Union Internationale Contre le Cancer)-Stadien ($p=0.001$).

In zahlreichen Studien ist belegt, dass die CXCR4-CXCL12-Achse eine essentielle Rolle bei der Ausbildung von Gefäßen spielt, sowohl physiologisch wie auch im

pathologischen Setting. Die vaskuläre CXCR4 Expression deutet darauf hin, dass diese Kaskade auch im kolorektalen Karzinom eine wichtige Rolle in der tumoralen Neoangiogenese spielen könnte und möglicherweise ein Angriffspunkt für eine antiangiogenetische Therapie darstellt.

In der Subgruppe der nodalnegativen Patienten (pN0) war die vaskuläre CXCR4 Expression in der multivariaten Analyse (adjustiert für Alter, Grading, T- und M-Klassifikation) ein negativer Prognosefaktor für das Gesamtüberleben (HR: 2.87 [1.31-6.29]; p=0.009).

Quelle:

Barbara Ingold, Stefan Schulz, Jan Budczies, Ulf Neumann, Matthias P.A. Ebert, Wilko Weichert, Christoph Röcken. The role of vascular CXCR4 expression in colorectal carcinoma. *Histopathology*; 2009; 55, 576-586 [43].

[http://dx.doi.org/ 10.1111/j.1365-2559.2009.03426.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.2009.03426.x)

2.3.2 CXCR4 im Magenkarzinom

Literatur: Barbara Ingold, Eva Simon, Ute Ungethüm, Ralf-Jürgen Kuban, Berit M. Müller, Amelie Lupp, Ulf Neumann, Matthias P.A. Ebert, Carsten Denkert, Wilko Weichert, Stefan Schulz, Christoph Röcken. Vascular CXCR4 expression - a novel antiangiogenic target in gastric cancer? PLOS One; 2010;5(4):e10087 [47]. Geteilte Erstautorenschaft B.I. und E.S.

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) regulieren lebenswichtige Abläufe in unserem Körper. Sie kontrollieren Funktionen wie Proliferation, Migration und Angiogenese, welche im pathologischen Setting entscheidend sind für Tumorprogression und Metastasierung [48]. Zudem sind GPCRs medikamentös gut manipulierbar, was sich darin widerspiegelt, dass ca. 60 % der zugelassenen Medikamente auf diese einwirken. Zusammenfassend erscheinen GPCRs erfolgsversprechende Biomarker für die Tumorforschung. Deswegen untersuchten wir zunächst mittels Gen-Microarrays die differentielle Genexpression mit Fokus auf GPCRS in drei nodalnegativen und drei nodalpositiven intestinalen Magenkarzinomen. Insgesamt identifizierten wir 52 differentiell exprimierte GPCRS, unter denen auch CXCR4 zu finden war. CXCR4 war hierbei in den nodalpositiven Magenkarzinomen überexprimiert.

In einem nächsten Schritt untersuchten wir 347 Magenkarzinome mittels TMA-Technik auf deren immunhistologische Expression von CXCR4 und CXCL12. 17 % der Fälle zeigten eine tumorale CXCR4-Positivität, die, nach Korrelation mit den vorhandenen klinisch-pathologischen Daten, nur mit der lokalen Tumorausdehnung (T-Stadium) signifikant assoziiert war ($p=0.030$). Hingegen fanden wir - wie bereits zuvor bei den kolorektalen Karzinomen - eine vaskuläre Expression von CXCR4 in 29 % der untersuchten Magenkarzinome. Diese war wiederum assoziiert mit einer höheren T-Klassifikation ($p=0.0001$) sowie fortgeschrittenen UICC-Stadien

($p=0.0059$). Dies bestätigte sich auch in der Subgruppenanalyse: in der Gruppe der Magenkarzinome vom intestinalen Typ (nach Laurén) korrelierte die vaskuläre CXCR4 Expression mit T-Kategorie ($p=0.004$) und UICC-Stadien ($p=0.020$), in der Gruppe der Magenkarzinome vom diffusen Typ (nach Laurén) mit der T-Klassifikation ($p=0.030$). In Analogie zur vorangegangenen Arbeit im kolorektalen Karzinom, scheint die CXCR4-CXCL12 Achse auch beim Magenkarzinom bei der Tumor-Neoangiogenese eine Rolle zu spielen und stellt möglicherweise einen anti-angiogenetischen Angriffspunkt dar.

Hingegen hatten weder die CXCR4- noch die CXCL12-Expression einen Einfluss auf das Überleben der Patienten.

Quelle:

Barbara Ingold, Eva Simon, Ute Ungethüm, Ralf-Jürgen Kuban, Berit M. Müller, Amelie Lupp, Ulf Neumann, Matthias P.A. Ebert, Carsten Denkert, Wilko Weichert, Stefan Schulz, Christoph Röcken.

Vascular CXCR4 expression - a novel antiangiogenic target in gastric cancer? PLOS One;

2010;5(4):e10087 [47]. Geteilte Erstautorenschaft B.I. und E.S.

[http://dx.doi.org/ 10.1371/journal.pone.0010087](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010087)

2.4 Prävalenz der HER2-Positivität in kolorektalen Karzinomen

Literatur: Barbara Ingold Heppner, Hans-Michael Behrens, Katharina Balschun, Jochen Haag, Sandra Krüger, Thomas Becker, Christoph Röcken. HER2/neu testing in primary colorectal carcinoma. British Journal of Cancer; 2014; 111, 1977-1984 [49].

Die anti-HER2 Therapie ist beim Mammakarzinom gut etabliert und gehört zur Standardtherapie bei HER2-Positivität. Auch beim Magenkarzinom ist eine anti-HER2 Therapie bei fortgeschrittenen metastasierten, HER2-positiven Tumoren indiziert. Bei kolorektalen Karzinomen sind bezüglich HER2-Status heterogene Resultate publiziert. Deswegen haben wir in unserer Untersuchung mittels TMA retrospektiv den HER2-Status von 1645 primären kolorektalen Karzinomen gemäß den aktuellen Leitlinien für Magen- und Mammakarzinome überprüft [50-53]. Insgesamt waren dabei 1.6 % der untersuchten Fälle positiv (26/1645). Interessanterweise zeigten korrespondierende Lymphknotenmetastasen einen identischen HER2-Status (n=29).

In einem weiteren Schritt korrelierten wir den HER2-Status mit den vorhandenen klinisch-pathologischen Daten. Ein positiver HER2-Status war statistisch signifikant mit einem positiven Nodalstatus ($p=0.029$) und höheren UICC-Stadien ($p=0.017$) assoziiert. In der Subgruppen-Analyse zeigte sich dies auch in der Gruppe der Sigma- und Rektumkarzinome. HER2-positive kolorektale Karzinome hatten, wenn auch statistisch nicht signifikant, die Tendenz zu einem schlechteren Gesamtüberleben.

Obwohl die Prävalenz HER2-positiver kolorektaler Karzinome mit 1.6 % gering erscheint, sind es doch vorwiegend fortgeschrittene, nodalpositive Karzinome,

welche HER2-positiv sind. In dieser Subgruppe erscheint uns die Testung sinnvoll und die anti-HER2-Therapie sollte eine zu überprüfende Therapiestrategie sein.

Vergleicht man die in verschiedenen Studien publizierten Raten HER2-positiver kolorektaler Karzinome, so sind die Resultate deutlich diskrepant. Dies liegt unter anderem daran, dass unterschiedliche Scoringsysteme und unterschiedliche Definitionen einer HER2-Positivität verwendet wurden. Unsere Daten zeigen, wie wichtig es ist, diagnostische Techniken und Scoringsysteme, gerade im Rahmen sogenannter companion tests, zu standardisieren und mit Ringversuchen kontinuierlich zu überprüfen.

Quelle:

Barbara Ingold Heppner, Hans-Michael Behrens, Katharina Balschun, Jochen Haag, Sandra Krüger, Thomas Becker, Christoph Röcken. HER2/neu testing in primary colorectal carcinoma. *British Journal of Cancer*; 2014; 111, 1977-1984 [49].

<http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2014.483>

3. Diskussion

3.1 Gewebebasierte Evaluation von Biomarkern in der Pathologie

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten haben wir definierte Biomarker an Gewebeproben solider Tumoren untersucht. In allen Studien handelte es sich um retrospektiv gesammelte Proben und Follow-up Daten. Das primäre Ziel war, im Sinne einer Hypothesengenerierung die tumorspezifische Prävalenz des jeweiligen Zielmoleküls zu überprüfen. Korreliert mit klinischen Daten, ließen sich erste Hinweise auf deren klinische und prognostische Bedeutung ziehen. Inwiefern sich daraus therapeutische Strategien ableiten lassen, muss in weiterführenden prospektiven Untersuchungen validiert werden.

3.2 Renal cell carcinoma marker - ein rein diagnostischer Biomarker

In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass der monoklonale Antikörper RCCma in der Differentialdiagnose einer Metastase eines hellzelligen NZK versus eines Hämangioblastoms eine wertvolle Ergänzung zu bereits etablierten Färbungen darstellt [33, 37, 38].

RCCma wurde 1989 zum ersten Mal beschrieben [10]. Der Antikörper galt als sehr sensitiv und spezifisch, insbesondere zur immunhistologischen Sicherung metastasierter Nierenzellkarzinome. Nachfolgende Studien zeigten allerdings auf, dass RCCma auch in diversen anderen Tumorentitäten wie Mammakarzinom oder Keimzelltumoren eine signifikante Positivität aufweist [54]. In metastasierten Nierenzellkarzinomen liegt zusammenfassend die Spezifität zwischen 48 % und

100 %, die Sensitivität zwischen 27 % und 90 %. Zur Untermauerung der jeweiligen Diagnosen sollte RCCma mit anderen Markern kombiniert werden. Er hat bislang keine prognostische oder prädiktive Bedeutung.

3.3 Der MGMT-Status in Hirnmetastasen solider Tumoren

Die systemische Therapie von Hirnmetastasen solider Tumoren ist bislang wenig etabliert [55]. Das liegt unter anderem daran, dass es nicht ausreichend Studien gibt, die aufzeigen, ob und in welcher Konzentration systemisch verabreichte Medikamente die Blut-Hirnschranke im Menschen passieren [17, 18].

Die Ganzhirnbestrahlung weist eine erhebliche Neurotoxizität auf, operative Verfahren sind aufgrund der anatomischen Gegebenheiten im ZNS oft nur eingeschränkt möglich. Deswegen sollten chemotherapeutische Strategien intensiver überprüft werden. Mit Temozolomid steht ein alkylierendes Chemotherapeutikum mit ausreichender Blut-Hirn-Schranken Passage zur Verfügung. Die Wirksamkeit ist abhängig von der Aktivität des DNA-Reparaturenzyms MGMT [16, 56]. Beim Glioblastoma multiforme, einem hochmalignen primären ZNS-Tumor (WHO Grad 4), hat der MGMT-Status einen prädiktiven Wert für den Therapieerfolg von Temozolomid [16]. Bei älteren Patienten (ab 65-70 Jahre) ist die MGMT-Bestimmung deswegen als therapieweisend in den Leitlinien verankert (<http://www.awmf.org/leitlinien.html>). Das bedeutet, dass nur Patienten mit einer MGMT-Promotor-Methylierung mit Temozolomid, ggf. kombiniert mit einer Strahlentherapie behandelt werden.

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass 29.6 % der untersuchten Hirnmetastasen einen methylierten MGMT-Promotor aufwiesen. In der Subgruppenanalyse wiesen

Lungenkarzinommetastasen die häufigste (46.5 %), Nierenzellkarzinommetastasen die niedrigste Frequenz auf (20 %). Diese Resultate deuten darauf hin, dass alkylierende Substanzen wie Temozolomid eine therapeutische Option zur systemischen Behandlung von Hirnmetastasen darstellen könnten. Diese Möglichkeit wurde bereits in einigen Studien überprüft. Die von Zhu und Kollegen in einem Übersichtsartikel zusammengefassten Resultate fielen allerdings moderat aus [57]. Die Temozolomid-Monotherapie zeigte kaum einen Effekt. Die Kombination Temozolomid/Radiatio führte zu Ansprechraten zwischen 0.176 und 0.959 mit einem OS (overall survival) zwischen 4.1 und 12 Monaten. Die Kombination Temozolomid/Chemotherapie erzielte etwas höhere Ansprechraten [57]. In allen der 21 zitierten Studien erfolgte die Temozolomid-Gabe jedoch ohne Bestimmung des MGMT-Status am Tumorgewebe. Sollte dieser, ähnlich wie beim malignen Gliom, in Hirnmetastasen ebenso einen prädiktiven Wert für einen Temozolomid-Benefit haben, dürfte gemäß unseren Daten max. ein Drittel der behandelten Patienten davon profitieren. In einer experimentellen Arbeit von Palmieri und Kollegen wurde dieser Ansatz erstmals ausführlicher untersucht. In einem murinen Hirnmetastasen-Modell verkleinerten sich die Metastasen nach Temozolomid-Gabe nur, wenn die Tumorzellen kaum oder gar keine MGMT-Aktivität aufwiesen [58]. Diese Daten stützen unsere Hypothese. Klinische Studien, in denen die Wirksamkeit von Temozolomid zur Behandlung von Hirnmetastasen in Abhängigkeit des MGMT-Status untersucht wurde, gibt es unseres Wissens aktuell nicht.

3.4 CXCR4 - ein Zielmolekül für eine antiangiogenetische Therapie?

CXCR4 und CXCL12 sind Schlüsselmoleküle in der Interaktion von Tumorzellen und deren Mikromilieu. Sie regulieren für das Tumorwachstum wichtige Prozesse wie Proliferation, Angiogenese, Invasion und Metastasierung [59]. Ihre vielfältigen Funktionen machen sie zu vielversprechenden therapeutischen Zielmolekülen.

Unsere Untersuchungen in Magen- und kolorektalen Karzinomen zeigten, dass die Tumorzellen in einem signifikanten Anteil eine CXCR4-Positivität aufwiesen. Dieser betrug beim Magenkarzinom 17 %, beim kolorektalen Karzinom 31 %. Interessanterweise waren in ca. einem Viertel der untersuchten Tumoren CXCR4-positive peritumorale Blutgefäße zu detektieren (Magenkarzinom: 29 %; kolorektales Karzinom: 25 %). In beiden Entitäten war die vaskuläre CXCR4-Positivität statistisch signifikant assoziiert mit lokal fortgeschrittenen Karzinomen und höheren UICC-Stadien, was die tumorbiologische Relevanz und insbesondere die proangiogenetischen Effekte der CXCR4-CXCL12-Achse in diesen Tumoren untermauert [60].

Mit Plerixafor, einem sogenannten small molecule, steht ein CXCR4-Inhibitor zur Verfügung, welcher ursprünglich zur Behandlung von HIV eingesetzt wurde. 2008 wurde das Medikament von der FDA für die Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen vor Stammzelltransplantation für Patienten mit Hodgkin Lymphom oder multiplem Myelom zugelassen [61]. Die Behandlung von soliden Tumoren mit CXCR4-Inhibitoren ist bislang nur marginal untersucht. Erste präklinische Studien zeigen aber durchaus interessante Resultate [59]. So konnte beispielsweise durch Gabe von Plerixafor die Ausbildung von Lungenmetastasen eines malignen Melanoms in Mäusen reduziert werden [62]. Mehrere klinische Studien wurden

inzwischen initiiert, so werden z.B. die Wirksamkeit und das Nebenwirkungsprofil von Plerixafor in metastasierten Pankreas- und Kolonkarzinomen sowie in high grade serösen Ovarialkarzinomen (NCT02179970) im Rahmen einer Phase I Studie überprüft [59]. Die in unseren Studienkollektiven erhobenen Daten weisen darauf hin, dass die CXCR4-CXCL12-Achse in Magen- und kolorektalen Karzinomen eine tumorbiologisch wichtige Funktion hat, deren Inhibierung eine interessante Strategie in der Krebstherapie wäre.

3.5 Der HER2-Status im kolorektalen Karzinom

Monoklonale Antikörper haben bei der Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms einen hohen Stellenwert. Mit Cetuximab und Panitumumab stehen zwei Medikamente zur Verfügung, die gezielt den EGFR- (epidermal growth factor receptor) - Signalweg angreifen, welchem eine tumorbiologische Schlüsselrolle zukommt [63]. Die Ansprechrate hängt davon ab, ob andere Moleküle des Signalweges - KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) und NRAS (neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) - Mutationen tragen, welche die Wirksamkeit inhibieren. Dies ist im Rahmen von companion tests zu überprüfen [64]. 35 % bis 45 % der KRAS/NRAS Wildtyp metastasierten kolorektalen Karzinome sprechen jedoch nicht auf die Antikörpertherapie an [65]. Da EGFR nicht nur via Rezeptor-Homo- sondern auch über -Heterodimerisierung mit anderen Mitgliedern der HER-Familie aktiviert werden kann [65], wird dieser Weg als möglicher Resistenzmechanismus diskutiert [66]. Experimentelle Daten untermauern diese Hypothese [67]. Sie zeigen auch, dass die EGFR-/HER2-Doppelblockade die Tumorreduktion verbessert. Da zum HER2-Status im kolorektalen Karzinom sehr

unterschiedliche Daten publiziert waren, untersuchten wir diesen in einem Kollektiv von 1645 primären Fällen. Die Bestimmung erfolgte anhand der aktuellen Leitlinien für das Mamma- und Magenkarzinom [51, 53]. Erstaunlicherweise war die Prävalenz der HER2-Positivität in unserem Kollektiv mit 1.6 % gering, war sie doch in zahlreichen anderen Studien als deutlich höher, nämlich zwischen 2.7 % [68] und 47.7 % [69] angegeben. Nach eingehender Betrachtung der jeweils angewandten Methodik zeigte sich, dass in den zitierten Publikationen verschiedene Scoringsysteme [70, 71] angewendet wurden und somit die HER2-Positivität different definiert war. Die Anwendung verschiedener anti-HER2 Antikörper erschweren die Vergleichbarkeit der Studien zusätzlich [69-72]. Unsere Untersuchungen zeigen die Notwendigkeit einer Standardisierung für Gewebeaufarbeitung, Färbeprotokolle und Scoringsysteme auf. Eine solche ist bislang nur für wenige Biomarker etabliert [53, 73]. Für einige Biomarker besteht zumindest die Möglichkeit der externen Qualitätssicherung im Rahmen von Ringversuchen (<http://www.dgp-berlin.de/index.php/menu-ringversuche>). Eine Standardisierung ist essentiell zur Etablierung von Biomarkern im klinischen Setting.

Unsere Untersuchungen zum HER2-Status im kolorektalen Karzinom zeigten, dass fortgeschrittene, nodalpositive Tumoren signifikant häufiger positiv waren. Eine HER2-Testung in dieser Subgruppe erscheint uns deswegen sinnvoll und eröffnet möglicherweise eine zusätzliche Therapiestrategie. Die anti-HER2 Therapie in dieser Tumorentität ist bislang limitiert auf einzelne Berichte mit geringen Fallzahlen [74, 75]. Eine erste Phase II Studie wurde nun in Italien initiiert. Die HERACLES Studie (HER2 Amplification for Colorectal Cancer Enhanced Stratification) randomisiert Patienten mit therapierefraktärem, KRAS Wildtyp und HER2-positivem metastasierten kolorektalen Karzinom in zwei Behandlungsarme. Dabei werden die

Kombinationen Trastuzumab/Lapatinib versus Trastuzumab/Pertuzumab verglichen [76]. Die Resultate bleiben abzuwarten.

4. Zusammenfassung

Der Begriff „personalisierte Medizin“ ist ein Schlagwort der heutigen Medizin. In der Tumorforschung und –Therapie geht es darum, individuelle tumorbiologische Merkmale zu erkennen und zu definieren, um daraus Erkenntnisse für die Diagnostik, Prognose und/oder einer Therapiestrategie zu gewinnen. Die Pathologie kann dabei als Schnittstelle zwischen Grundlagenforschung und Klinik fungieren. Wie wir in den vorgestellten Arbeiten aufzeigten, sind gewebebasierte Untersuchungen wie die Immunhistologie ein hilfreiches Werkzeug, um Biomarker-Hypothesen an Tumormaterial zu überprüfen. So konnten wir zeigen, dass der RCCma wertvolle Zusatzinformationen in der Differentialdiagnose metastasiertes hellzelliges Nierenzellkarzinom versus Hämangioblastom im ZNS liefert [33]. Des Weiteren identifizierten wir in einem signifikanten Anteil von Hirnmetastasen solider Tumoren einen methylierten MGMT-Promotor als mögliche Basis zur Prädiktion eines Benefits mit alkylierenden Chemotherapeutika wie Temozolomid [39]. Wir konnten zeigen, dass der Chemokinrezeptor CXCR4 eine tumorbiologische Relevanz in Magen- und kolorektalen Karzinomen hat [43, 47]. Insbesondere die in beiden Tumorentitäten augenfällige vaskuläre Expression könnte auf einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt im Sinne einer Antiangiogenese hinweisen. In unseren Untersuchungen zum HER2-Status im kolorektalen Karzinom wiesen nur 1.6% der Fälle eine HER2-Positivität und somit die Grundlage für eine potentielle anti-HER2-Therapie auf. Da diese aber signifikant mit fortgeschrittenen, nodalpositiven Karzinomen assoziiert war, erachten wir gerade diese Subgruppe als testenswert [49].

Der Weg eines Biomarkers von der Grundlagenforschung in die klinische Anwendung ist ein langer. Dafür ist eine verstärkte interdisziplinäre Zusammenarbeit für die Zukunft unabdingbar. Die Pathologie wird dabei eine zentrale Rolle spielen.

5. Literatur

1. Siegmund-Schultze, N., *Personalisierte Medizin in der Onkologie: Fortschritt oder falsches Versprechen?* Deutsches Ärzteblatt, 2011. **37**: p. 1904-09.
2. Biomarkers Definitions Working, G., *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework.* Clin Pharmacol Ther, 2001. **69**(3): p. 89-95.
3. Strimbu, K. and J.A. Tavel, *What are biomarkers?* Curr Opin HIV AIDS, 2010. **5**(6): p. 463-6.
4. Denkert, C., et al., *[Molecular pathology for breast cancer : Importance of the gene expression profile].* Pathologie, 2015. **36**(2): p. 145-53.
5. Vogel, C.L., et al., *Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer.* J Clin Oncol, 2002. **20**(3): p. 719-26.
6. Moch, H., et al., *Pathologie: Aufgaben und Methoden.* Pathologie, 4. Auflage, ed. W. Böcker, et al. 2008.
7. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens.* Nat Med, 1998. **4**(7): p. 844-7.
8. Wan, W.H., M.B. Fortuna, and P. Furmanski, *A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously.* J Immunol Methods, 1987. **103**(1): p. 121-9.
9. Ilyas, M., et al., *Guidelines and considerations for conducting experiments using tissue microarrays.* Histopathology, 2013. **62**(6): p. 827-39.
10. Yoshida, S.O. and A. Imam, *Monoclonal antibody to a proximal nephrogenic renal antigen: immunohistochemical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded human renal cell carcinomas.* Cancer Res, 1989. **49**(7): p. 1802-9.
11. Avery, A.K., et al., *Use of antibodies to RCC and CD10 in the differential diagnosis of renal neoplasms.* Am J Surg Pathol, 2000. **24**(2): p. 203-10.
12. Gerson, S.L., *MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(4): p. 296-307.
13. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents.* N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1350-4.
14. Wick, W., et al., *MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment.* Nat Rev Neurol, 2014. **10**(7): p. 372-85.
15. Jaeckle, K.A., et al., *Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study.* J Clin Oncol, 1998. **16**(10): p. 3310-5.
16. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.* N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
17. Lukas, R.V., et al., *Treatment of brain metastases.* Oncology, 2014. **87**(6): p. 321-9.
18. Muldoon, L.L., et al., *Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignancy: a reality check.* J Clin Oncol, 2007. **25**(16): p. 2295-305.
19. Rollins, B.J., *Inflammatory chemokines in cancer growth and progression.* Eur J Cancer, 2006. **42**(6): p. 760-7.
20. Vandercappellen, J., J. Van Damme, and S. Struyf, *The role of CXC chemokines and their receptors in cancer.* Cancer Lett, 2008. **267**(2): p. 226-44.
21. Guyon, A., *CXCL12 chemokine and its receptors as major players in the interactions between immune and nervous systems.* Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 65.
22. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9448-53.
23. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1.* Nature, 1996. **382**(6592): p. 635-8.

24. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. *Science*, 1996. **272**(5263): p. 872-7.
25. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(2): p. 127-37.
26. Ross, J.S., et al., *The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine*. *Oncologist*, 2009. **14**(4): p. 320-68.
27. Moya-Horno, I. and J. Cortes, *The expanding role of pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer*. *Breast Cancer* (Dove Med Press), 2015. **7**: p. 125-32.
28. Hannesdottir, L., et al., *Lapatinib and doxorubicin enhance the Stat1-dependent antitumor immune response*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(10): p. 2718-29.
29. Van den Mooter, T., et al., *Trastuzumab emtansine in advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer*. *Expert Opin Biol Ther*, 2015. **15**(5): p. 749-60.
30. Bang, Y.J., et al., *Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial*. *Lancet*, 2010. **376**(9742): p. 687-97.
31. He, C., et al., *Correlation of human epidermal growth factor receptor 2 expression with clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer*. *World J Gastroenterol*, 2013. **19**(14): p. 2171-8.
32. Yan, M., et al., *HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients*. *Cancer Metastasis Rev*, 2015. **34**(1): p. 157-64.
33. Ingold, B., et al., *Renal cell carcinoma marker reliably discriminates central nervous system haemangioblastoma from brain metastases of renal cell carcinoma*. *Histopathology*, 2008. **52**(6): p. 674-81.
34. Kim, W.Y. and W.G. Kaelin, *Role of VHL gene mutation in human cancer*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(24): p. 4991-5004.
35. Wind, J.J. and R.R. Lonser, *Management of von Hippel-Lindau disease-associated CNS lesions*. *Expert Rev Neurother*, 2011. **11**(10): p. 1433-41.
36. Flanigan, R.C., et al., *Metastatic renal cell carcinoma*. *Curr Treat Options Oncol*, 2003. **4**(5): p. 385-90.
37. Kuroda, N., et al., *Recent advances of immunohistochemistry for diagnosis of renal tumors*. *Pathol Int*, 2013. **63**(8): p. 381-90.
38. Mentrikoski, M.J., S.M. Wendroth, and M.R. Wick, *Immunohistochemical distinction of renal cell carcinoma from other carcinomas with clear-cell histomorphology: utility of CD10 and CA-125 in addition to PAX-2, PAX-8, RCCMa, and adipophilin*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2014. **22**(9): p. 635-41.
39. Ingold, B., et al., *Homogeneous MGMT immunoreactivity correlates with an unmethylated MGMT promoter status in brain metastases of various solid tumors*. *PLoS One*, 2009. **4**(3): p. e4775.
40. McKeever, P.E., *The brain, spinal cord and meninges*. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, ed. S.E. Mills. 2010: LWW.
41. Antonadou, D., et al., *Phase II randomized trial of temozolomide and concurrent radiotherapy in patients with brain metastases*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(17): p. 3644-50.
42. Peereboom, D.M., *Chemotherapy in brain metastases*. *Neurosurgery*, 2005. **57**(5 Suppl): p. S54-65; discussion S1-4.
43. Ingold, B., et al., *The role of vascular CXCR4 expression in colorectal carcinoma*. *Histopathology*, 2009. **55**(5): p. 576-86.
44. Schimanski, C.C., et al., *Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(5): p. 1743-50.
45. Stumm, R.K., et al., *A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-*

- dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia.* J Neurosci, 2002. **22**(14): p. 5865-78.
46. Kolodziej, A., et al., *Tonic activation of CXC chemokine receptor 4 in immature granule cells supports neurogenesis in the adult dentate gyrus.* J Neurosci, 2008. **28**(17): p. 4488-500.
 47. Ingold, B., et al., *Vascular CXCR4 expression - a novel antiangiogenic target in gastric cancer?* PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10087.
 48. Dorsam, R.T. and J.S. Gutkind, *G-protein-coupled receptors and cancer.* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(2): p. 79-94.
 49. Ingold Heppner, B., et al., *HER2/neu testing in primary colorectal carcinoma.* Br J Cancer, 2014. **111**(10): p. 1977-84.
 50. Hofmann, M., et al., *Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study.* Histopathology, 2008. **52**(7): p. 797-805.
 51. Ruschoff, J., et al., *HER2 testing in gastric cancer: a practical approach.* Mod Pathol, 2012. **25**(5): p. 637-50.
 52. Hanna, W.M., et al., *HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity.* Mod Pathol, 2014. **27**(1): p. 4-18.
 53. Wolff, A.C., et al., *Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update.* J Clin Oncol, 2013. **31**(31): p. 3997-4013.
 54. Bakshi, N., et al., *Expression of renal cell carcinoma antigen (RCC) in renal epithelial and nonrenal tumors: diagnostic Implications.* Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2007. **15**(3): p. 310-5.
 55. Walbert, T. and M.R. Gilbert, *The role of chemotherapy in the treatment of patients with brain metastases from solid tumors.* Int J Clin Oncol, 2009. **14**(4): p. 299-306.
 56. Tolcher, A.W., et al., *Marked inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity with protracted temozolomide schedules.* Br J Cancer, 2003. **88**(7): p. 1004-11.
 57. Zhu, W., et al., *Temozolomide for treatment of brain metastases: A review of 21 clinical trials.* World J Clin Oncol, 2014. **5**(1): p. 19-27.
 58. Palmieri, D., et al., *Profound prevention of experimental brain metastases of breast cancer by temozolomide in an MGMT-dependent manner.* Clin Cancer Res, 2014. **20**(10): p. 2727-39.
 59. Weitzenfeld, P. and A. Ben-Baruch, *The chemokine system, and its CCR5 and CXCR4 receptors, as potential targets for personalized therapy in cancer.* Cancer Lett, 2014. **352**(1): p. 36-53.
 60. Liekens, S., D. Schols, and S. Hatse, *CXCL12-CXCR4 axis in angiogenesis, metastasis and stem cell mobilization.* Curr Pharm Des, 2010. **16**(35): p. 3903-20.
 61. Fruehauf, S., *Current clinical indications for plerixafor.* Transfus Med Hemother, 2013. **40**(4): p. 246-50.
 62. D'Alterio, C., et al., *Inhibition of stromal CXCR4 impairs development of lung metastases.* Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(10): p. 1713-20.
 63. McIntire, M. and M. Redston, *Targeted therapies and predictive markers in epithelial malignancies of the gastrointestinal tract.* Arch Pathol Lab Med, 2012. **136**(5): p. 496-503.
 64. Custodio, A. and J. Feliu, *Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: beyond KRAS mutations.* Crit Rev Oncol Hematol, 2013. **85**(1): p. 45-81.
 65. Lee, M.S. and S. Kopetz, *Current and Future Approaches to Target the Epidermal Growth Factor Receptor and Its Downstream Signaling in Metastatic Colorectal Cancer.* Clin Colorectal Cancer, 2015.
 66. Yonesaka, K., et al., *Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab.* Sci Transl Med, 2011. **3**(99): p. 99ra86.

67. Bertotti, A., et al., *A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer*. *Cancer Discov*, 2011. **1**(6): p. 508-23.
68. Marx, A.H., et al., *Heterogenous high-level HER-2 amplification in a small subset of colorectal cancers*. *Hum Pathol*, 2010. **41**(11): p. 1577-85.
69. Park, D.I., et al., *HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor in colorectal cancer*. *Int J Colorectal Dis*, 2007. **22**(5): p. 491-7.
70. Kluffinger, A.M., et al., *Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer*. *Surg Oncol*, 1992. **1**(1): p. 97-105.
71. Drebber, U., et al., *beta-catenin and Her2/neu expression in rectal cancer: association with histomorphological response to neoadjuvant therapy and prognosis*. *Int J Colorectal Dis*, 2011. **26**(9): p. 1127-34.
72. Kavanagh, D.O., et al., *Is overexpression of HER-2 a predictor of prognosis in colorectal cancer?* *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 1.
73. Hammond, M.E., et al., *American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(16): p. 2784-95.
74. Ramanathan, R.K., et al., *Low overexpression of HER-2/neu in advanced colorectal cancer limits the usefulness of trastuzumab (Herceptin) and irinotecan as therapy. A phase II trial*. *Cancer Invest*, 2004. **22**(6): p. 858-65.
75. Sorscher, S.M., *Marked response to single agent trastuzumab in a patient with metastatic HER-2 gene amplified rectal cancer*. *Cancer Invest*, 2011. **29**(7): p. 456-9.
76. Marsoni, S., A. Bertotti, and A. Sartore-Bianchi, *Dual anti-HER2 treatment of patients with HER2-positive metastatic colorectal cancer: The HERACLES trial (HER2 Amplification for Colo-rectal Cancer Enhanced Stratification)*. *J Clin Oncol*, 2013. **31** (suppl).

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Holger Moch, der meine während der Doktorarbeit geweckte wissenschaftliche Neugierde aufgriff, förderte und mir die Unterstützung gab, in einem inspirierenden Umfeld eigene Ideen zu entwickeln.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Christoph Röcken für sein bis heute andauerndes großes wissenschaftliches Engagement, seine ansteckende Begeisterung für die Pathologie und seine enorme Motivationsfähigkeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Dietel, der in seinem Institut den Freiraum schafft, der wissenschaftliches Arbeiten überhaupt möglich macht. Danken möchte ich auch Dr. Stefan Pahl und Prof. Dr. Carsten Denkert für die vielen anregenden Diskussionen, die einen immer wieder einen Schritt weiter führen.

Dr. Berit Pfitzner: ich danke Dir für „being my partner in crime“. Ein Hoch auf das Turmzimmer!

Und natürlich meine kleine Familie: Frank, Mia und Juli, Danke für eure immerwährende bedingungslose Unterstützung.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Unterschrift