

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Reduced membranous MET expression is linked to bladder cancer progression

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Kristina Reynolds
aus Hamburg

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.02.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. S. Loges

1. Zusammenfassende Darstellung der Publikation

1.1. Einleitung

1.2. Material und Methoden

1.2.1. Tissue Microarray (TMA)

1.2.2. Immunhistochemie

1.2.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

1.2.4. Statistik

1.3. Ergebnisse

1.3.1. Technische Aspekte

1.3.2. Immunhistochemie

1.3.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

1.3.4. Assoziation zum Outcome der Erkrankung

1.4. Diskussion

2. Literaturverzeichnis

3. Originalartikel

4. Zusammenfassung in deutscher Sprache

5. Zusammenfassung in englischer Sprache

6. Erklärung des Eigenanteils

7. Danksagung

8. Eidesstattliche Versicherung

9. Lebenslauf

1. Zusammenfassende Darstellung der Publikation

1.1. Einleitung

Das Urothelkarzinom ist der 7. häufigste maligne Tumor in der männlichen Bevölkerung mit etwa 380.000 Neuerkrankungen pro Jahr weltweit (1). Die chirurgischen Behandlungsoptionen invasiv wachsender Urothelkarzinome (pT1-4) variieren von transurethraler Resektion bis hin zur Zystektomie mit dem Risiko, dass durch die Behandlung umfangreiche Komplikationen entstehen können. Deshalb ist es wichtig Biomarker zur frühen Diagnosestellung sowie zur individuellen Prognoseabschätzung bei Patienten mit einem Urothelkarzinom zu identifizieren und somit eine bessere Entscheidungsfähigkeit im individuellen Behandlungsmanagement zu ermöglichen. In den letzten Jahren wurden beim Urothelkarzinom zahlreiche genetische Veränderungen entdeckt, die mit Tumorstadium, Metastasierung und Überleben in Zusammenhang stehen (2-4). Dieses beinhaltet unter anderem Veränderungen in der Anzahl der DNA-Kopien (Deletionen bzw. Amplifikationen) von Tumorsuppressorgenen oder Proto-Onkogenen. Eine wichtige Gruppe von Proto-Onkogenen sind Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK), die viele Zellregulationsprozesse wie Proliferation oder Migration beeinflussen (5). Einige dieser Proto-Onkogene wie z.B. HER2/neu sind gut erforscht (2, 3), aber die Bedeutung der meisten PTKs beim Urothelkarzinom sind noch unzureichend untersucht.

Das c-Met-Gen liegt auf dem Chromosom 7q31 und kodiert einen transmembranen Tyrosinkinase Rezeptor für den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF)). Unter physiologischen Bedingungen spielt die HGF/c-MET Signalkaskade eine Rolle in verschiedensten zellulären Prozessen, wie z.B. Zelldifferenzierung, Zellmotilität, Förderung von Invasion, Schutz vor Apoptose und epithelialer Morphogenese (6, 7). Eine Veränderung des c-Met Genprodukts ist bei Brust- (8), Magen- (9), sowie kolorektalen (10) Karzinomen, aber auch beim Urothelkarzinom (11, 12) beschrieben. Bei diesen Karzinomen vermutet man, dass die c-Met-Überexpression eine Rolle bei der Tumorgenese, sowie Tumorprogression spielt und oft mit kürzerem Überleben, fortgeschrittenen Tumorstadium sowie schlechterer Tumordifferenzierung assoziiert ist (13). Als Ursache der veränderten c-Met Aktivität in Karzinomen wurde eine vermehrte Transkription identifiziert. Diese resultiert aus Überexpression (14), Genamplifikation (15) und Keimbahn- (16, 17)

oder somatischen (18, 19) Mutationen und führt zu einer konstitutiven c-Met Aktivierung sowie einem liganden-abhängigen autokrinen Zyklus (20). Zudem ist die c-Met Inhibition Inhalt vieler Studien, die dies als möglichen Ansatz in der Tumorthherapie untersuchen (21-23).

Für das Urothelkarzinom wurde in vielen Studien eine c-Met Überexpression mittels Immunhistochemie (IHC) nachgewiesen. Außerdem konnte in Studien eine enge Korrelation zwischen hoher c-Met Protein Expression sowie Tumorstadium, Tumordifferenzierung, Invasion, Metastasierung und schlechterem Überleben entdeckt werden (11, 12, 24-27).

Unsere Studie wurde durchgeführt, um die Rolle der c-Met Genamplifikation als Mechanismus für die c-Met Überexpression im Urothelkarzinom beurteilen zu können. Außerdem möchten wir die klinisch-pathologische Bedeutung der c-Met-Expression beim Urothelkarzinom weiter untersuchen. Hierfür wurde ein TMA mit 686 Patientenproben eines Urothelkarzinoms mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung und Immunhistochemie (IHC) analysiert.

1.2. Material und Methoden

1.2.1. Tissue Microarray (TMA)

Es wurde ein bereits existierender TMA mit 686 Proben von Urothelkarzinomen verwendet (28). Das Tumorstadium und der Differenzierungsgrad wurden anhand der UICC- (Union internationale contre le cancer) sowie anhand der WHO-Klassifikation von 1973 bestimmt (30, 31). (Die Tumore wurden nicht anhand der aktuellen WHO Klassifikation von 2004 bestimmt, da die Proben für den TMA bereits vor 2004 untersucht worden waren). Tumoren mit Stromainvasion aber fehlender muskulärer Blasenwand in der Biopsie wurden mindestens als pT1 (pT1-) klassifiziert. Ein papilläres Tumorstadium wurde vermutet, wenn wenigstens eine Papille ein eindeutig zum invasiven Tumorgebiet passende Atypie aufwies.

Bei pTa Tumoren wurde die Zeit bis zum Rezidiv als primärer Endpunkt ausgewählt, bei pT1 Tumoren wurde die Zeit bis zur Progression (zu Stadium pT2 oder höher) als Endpunkt ausgewählt.

Als Rezidiv wurden zystoskopisch sichtbare Tumore definiert. Das Vorhandensein von muskulärer Invasion (Stadium pT2 oder höher) in einer anschließenden Biopsie wurde als Tumorprogress definiert.

1.2.2. Immunhistochemie

Frisch geschnittene TMA-Abschnitte wurden am gleichen Tag analysiert. Zur Vorbehandlung erfolgte eine Erhitzung der Gewebeschnitte in einem Autoklav mit Tris-EDTA-Zitrat Puffer (pH 7,8) für 5 Minuten. Die c-Met Immunfärbung wurde mit einem monoklonalen Antikörper (Klon: EP1454Y, Verdünnung 1:150; Abcam, Cambridge, UK) durchgeführt. Alle TMAs wurden von einem Pathologen analysiert (S.M.). Es wurden nur jene Proben ausgewählt, die eine membranöse Anfärbung zeigten. Sowohl die Anfärbeintensität (0, 1+, 2+, 3+) als auch der Bereich positiver Tumorzellen wurde für jede Gewebeprobe aufgezeichnet. Aus diesen beiden Parametern wurde anhand folgender Bewertungen ein finaler Score gebildet: eine Färbeintensität von 0 wurde als negativ identifiziert, eine Färbeintensität von 1+ in $\leq 70\%$ der Tumorzellen oder eine Färbeintensität von 2+ in $\leq 30\%$ der Tumorzellen wurde als schwach identifiziert, eine Färbeintensität von 1+ in $> 70\%$ der Tumorzellen oder eine Färbeintensität von 2+ in $> 30\%$, aber $\leq 70\%$ der Tumorzellen oder eine Färbeintensität von 3+ in $\leq 30\%$ der Tumorzellen wurden als moderat identifiziert. Als stark wurde eine Färbeintensität von 2+ in $> 70\%$ der Tumorzellen oder eine Färbeintensität von 3+ in $> 30\%$ der Tumorzellen identifiziert. Dies ist ein in unserer Arbeitsgruppe genutztes standardisiertes Scoring System mit dem Zweck eine Gruppe mit hohem Expressionslevel, eine mit niedrigem oder gar keinem Expressionslevel und zwei Gruppen mit mittlerem Expressionslevel zu definieren. In zahlreichen Studien hat sich dieses Scoring System bewährt, um zu untersuchen, ob molekulare Merkmale mit dem Phänotyp des Tumors und dem klinischen Outcome assoziiert sind (32).

1.2.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Für die zweifarbige Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurde eine 4 μm dicker TMA Gewebeschnitt verwendet. Zur proteolytische Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurde kommerzielles Verfahren benutzt (paraffin pretreatment reagent kit; Vysis, Downers Grove, IL, USA). Die TMA Schnitte wurden in 70%igem, 85%igem

und 100%igem Ethanol deparaffiniert, luft-getrocknet und dehydriert. Danach wurden die Schnitte für 5 Minuten bei 74°C in 70%iger Formamid 2x SSC Lösung denaturiert. Es wurde das zweifarbige FISH-Untersuchungs-Set bestehend aus einer orangenen fluoreszierenden direkt-markierten Zentromer 7 Probe sowie einer grünen fluoreszierenden direkt-markierten MET-spezifischen Probe benutzt (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Germany). Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 37°C in einer befeuchteten Kammer durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte mit 0,2 µmol/L 4'-6-diamidino-2-phenylindol gefärbt. Jeder Spot wurde untersucht und das prädominante Verhältnis von Genkopien zu Zentromer-Kopien in den Tumorzellen geschätzt. Vorangegangene Daten unseres Labors haben gezeigt, dass die Diagnose der Amplifikation basierend auf Schätzung der Signalanzahl zuverlässig gestellt werden kann. Ein Tumor wurde als amplifiziert diagnostiziert wenn die Ratio der genspezifischen Signale/Zentromer-Signale ≥ 2 war. In den Fällen, wo die Ratio nicht eindeutig unter- oder oberhalb von 2,0 lag, wurden insgesamt 20 Zellen ausgezählt.

1.2.4. Statistik

Zur statistischen Analyse wurde die JMP 8.0 software (SAS Institute Inc, Cary, NC) benutzt. Es wurden Mehrfeldertabellen erstellt, um die Assoziation zwischen MET Überexpression oder Amplifikation und klinisch-pathologische Variablen zu untersuchen. Der χ^2 (likelihood) Test wurde benutzt, um signifikante Verbindungen zu finden. Überlebenskurven wurden mittels der Kaplan-Meier Methode errechnet und mit dem log-rank test verglichen. Abhängig vom ausgewählten Endpunkt wurden die Patienten entweder zum Zeitpunkt der letzten klinischen Kontrolle, bei der sie keinen Nachweis der Erkrankung zeigten oder dem Zeitpunkt an dem die Zystektomie erfolgte zensiert.

1.3. Ergebnisse

1.3.1 Technische Aspekte

Insgesamt waren 560 (81,6%) und 504 (73,5%) der Tumorproben mittels Immunhistochemie in unserer TMA und FISH Analyse interpretierbar. Ursachen für

nicht auswertbare Fälle waren das komplette Fehlen von Gewebeproben, Fehlen von eindeutigem Tumorgewebe oder ungenügende Hybridisierung (bei FISH).

1.3.2. Immunhistochemie

Die MET Immunfärbung zeigte immer eine eindeutige Membranprädominanz. Eine zytoplasmatische Anfärbung war selten und nur in Verbindung mit einer starken membranösen Anfärbung zu finden. Bei nicht neoplastischem Urothel war in allen Zelllinien eine starke membranöse MET Immunfärbung zu finden. Bei Karzinomen war bei 459 von 560 (82,0%) analysierbaren Fällen eine membranöse MET Immunfärbung sichtbar. Die Anfärbung wurde in 137 (24,5%) Fällen als schwach, in 124 (22,1%) Fällen als moderat und in 198 (35,4%) Fällen als stark bewertet. (Repräsentative Beispiele sind in den Bildern 1B-D zu sehen). Generell zeigte sich bei verminderter Expression ein höheres Tumorstadium ($P < 0,0001$) sowie ein höherer Tumorgrad ($P = 0.001$).

Figure 1

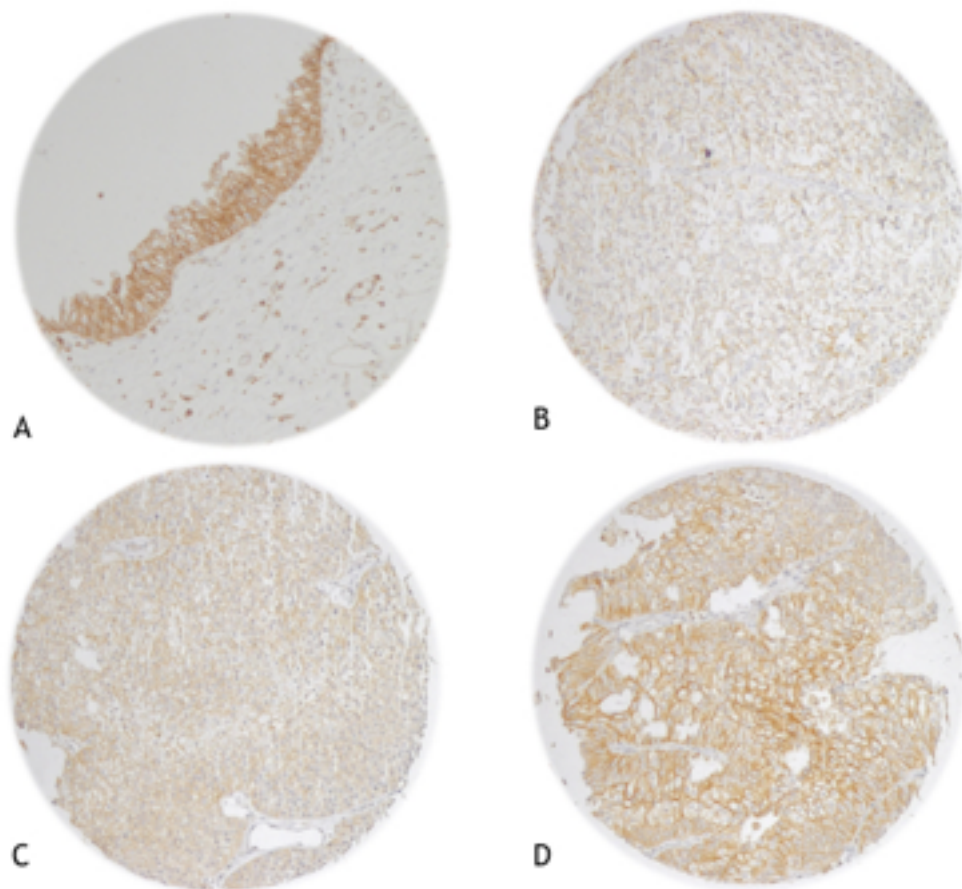


Bild 1 Repräsentative Bilder mit MET-Immunganfärbung. (A) starke Anfärbung bei normalem Urothel, (B) schwache Anfärbung beim Urothelkarzinom, (C) moderate Anfärbung beim Urothelkarzinom, (D) starke Anfärbung beim Urothelkarzinom

1.3.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Nur vier von 504 Karzinomen, die mittels FISH interpretierbar waren (0,8%) zeigten eine MET Amplifikation (Bild 2). Von diesen vier Fällen war einer ein pT1 Tumor und die drei anderen pT 2-4 Tumoren. Die MET Amplifikation zeigte keine Korrelation zur MET Immunfärbung ($P = 0,1599$), es zeigten lediglich zwei Fälle eine schwache Anfärbung und ein Fall sogar überhaupt keine MET Immunfärbung.

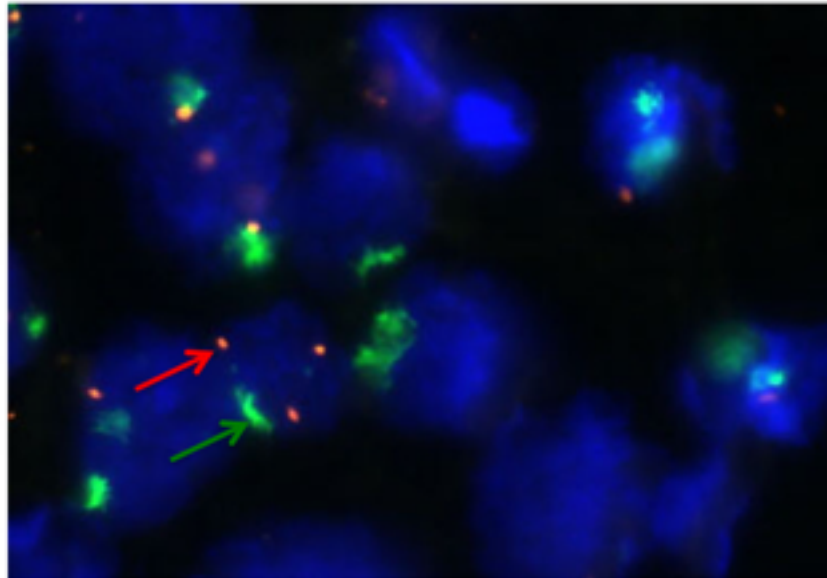


Bild 2 Dual-gelabeltes FISH mit Sonden für das MET Gen (grün) und Zentromer 7 (rot). Das Bild zeigt Beispiele von MET Amplifikationen in „Clustern“ (grüner Pfeil: MET Gen, roter Pfeil: Zentromer 7).

1.3.4 Assoziation zum klinischen Krankheitsverlauf der Erkrankung

Um den prognostischen Wert der MET Immunanfärbung zu untersuchen wurden die klinisch relevantesten Endpunkte ausgewählt. Diese beinhalteten gesamtes sowie tumorspezifisches Überleben von muskel-invasiven Karzinomen (pT2-4), Tumorprogression von pT1 Karzinomen sowie Rezidive von pTa Tumoren. Generell konnte keine Assoziation zwischen MET Immunanfärbung und diesen Endpunkten gefunden werden (Bild 3A-D; P jeweils $> 0,01$). Ein statistisch signifikanter Wert konnte lediglich für Rezidive von pTa Tumoren entdeckt werden (Bild 3C; $P = 0,0152$). Dieses Ergebnis resultierte allerdings aus den sehr unterschiedlichen Verläufen der beiden mittelstark gefärbten Gruppen (schwach und moderat), was auch die Möglichkeit eines statistischen Artefakts zulässt. Die MET Amplifikation zeigte keine Assoziation zum Outcome der Erkrankung, was bei der niedrigen Anzahl von Fällen ($n = 4$) nicht überrascht.

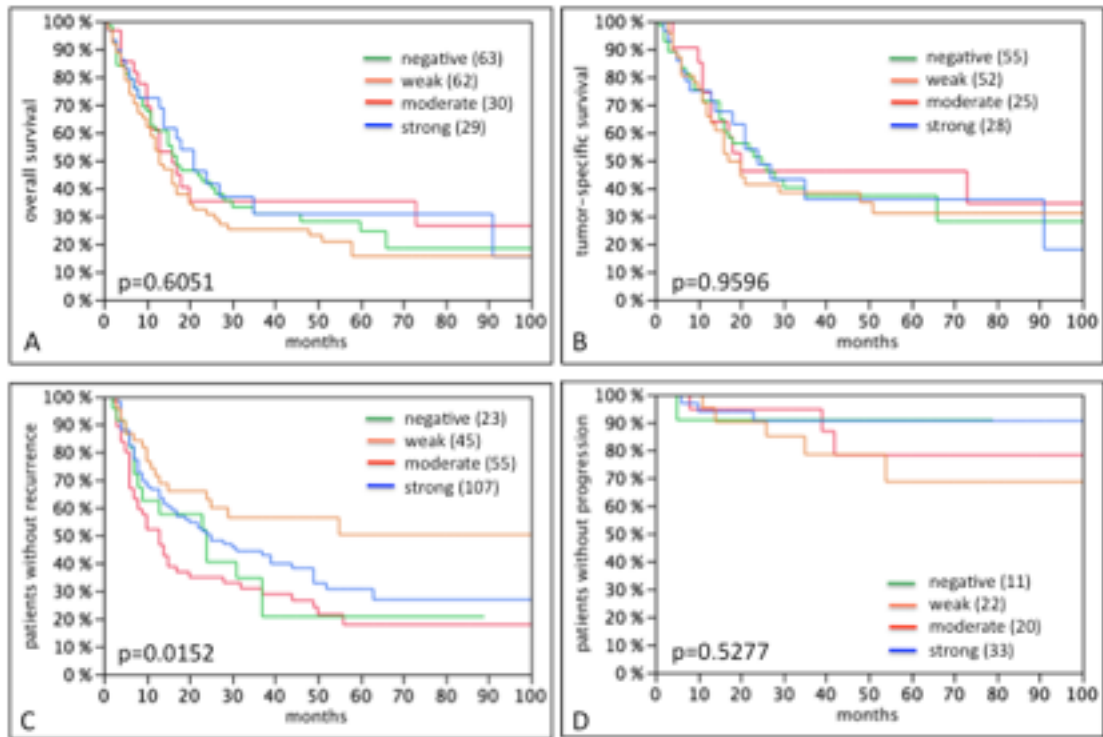


Bild 3 MET Expression und (A) Gesamtüberleben bei pT2-4 Karzinomen, (B) tumorspezifisches Überleben bei pT2-4 Karzinomen, (C) rezidivfreies Überleben bei pTa Karzinomen und (D) progressionsfreies Überleben bei pT1 Karzinomen. Die Anzahl der Tumore jeder Kategorie sind in Klammern bei „negative“, „weak“, „moderate“, „strong“ angegeben

1.4. Diskussion

Das Hauptziel dieser Studie war es eine Verbindung zwischen MET Alterationen und Phänotyp des Tumors sowie klinischem Outcome aufzuzeigen. Die Analyse von mehr als 400 Karzinomen unter hochstandardisierten Bedingungen in einem TMA Format zeigte eine negative Korrelation zwischen MET Expression und Tumor Phänotyp, also Tumorstadium und Tumorgrad, und keine Assoziation zum klinischen Verlauf der Erkrankung. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu acht vorherigen Studien, die die MET Proteinexpression mittels Immunhistochemie in 4 bis 173 Urothelkarzinomen analysiert haben (11, 12, 24-27, 34, 35). In diesen Studien wurde eine MET Expression von 27,5% bis 100% gefunden. Diese zeigte eine positive Korrelation zu Tumorgrad, Tumorstadium, Tumordinvasion, Metastasierung und vermindertem Überleben (11, 12, 24-27). Diese Studien haben gemeinsam, dass entweder eine zytoplasmatische oder eine stark zyttoplasmatische und membranöse Anfärbung vorlag. Wir testeten verschiedene kommerziell verfügbare Antikörper und nur der Antikörper, der in dieser Studie genutzt wurde zeigte eine spezifische membranöse Anfärbung, wie sie für einen Rezeptor an der Zelloberfläche, wie MET, erwartet wird. Die Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und denen der vorherigen Studien könnte daher durch Nutzung verschiedener Antikörper und

Analyse verschiedener Zellkompartimente erklärt werden. Keine der vorherigen Studien nutzte den in unserer Studie genutzten Antikörper (Klon: EP1454Y, Abcam, Cambridge, UK). Eine fluoreszenzbasierte Immunhistochemie-Studie an 583 Kolon-Karzinom Patienten zeigte, dass eine verminderte Verteilung von MET in der Membran, relativ zum Zytoplasma, einen Prediktor für schlechtes Outcome in Stadium I und II Kolon-Karzinom Patienten darstellen könnte (36). Dies passt zu unseren Ergebnissen mit einer schwächeren membranösen Anfärbung bei high-grade Tumoren und Tumoren mit fortgeschrittenem Stadium.

Als Ursache der veränderten c-Met Aktivität in Karzinomen wurde eine vermehrte Transkription identifiziert. Diese resultiert aus Überexpression (14), Genamplifikation (15) und Keimbahn- (16, 17) oder somatischen (18, 19) Mutationen und führt zu einer konstitutiven c-Met Aktivierung sowie einem ligandenabhängigen autokrinen Zyklus (20).

Obwohl viele Studien zur MET Überexpression existieren, wurden Veränderungen in der Anzahl der Genkopien beim Urothelkarzinom mittels FISH bisher nicht untersucht. Die TMA-Methode ist besonders geeignet, um die Anzahl der Genkopien mit der Proteinexpression zu vergleichen, da die Analyse auf das gleiche Areal beschränkt ist, wenn konsekutive Schnitte verwendet werden. Dies schließt jeglichen Einfluß von Tumorheterogenität auf das Ergebnis aus. Dass wir nur vier Fälle (0,8%) mit MET Amplifikation gefunden haben ist ein weiteres Argument dafür, dass MET keine besondere onkogenetische Rolle beim Urothelkarzinom spielt. Dieser geringe Anteil an MET Amplifikation stimmt mit kürzlich veröffentlichten Ergebnissen der The Cancer Genome Atlas (TCGA) Arbeitsgruppe überein. In dieser Arbeitsgruppe haben vier verschiedene Studiengruppen insgesamt 349 Urothelkarzinome untersucht und nur zwei Fälle mit MET-Amplifikation gefunden (37, 38). Es erscheint möglich, dass die MET Amplifikationen bei unseren vier Karzinomen nicht zu einer messbaren Überexpression führte, da das Gen während des Karzinomprogresses auf ein Level herunterreguliert wurde, bei dem auch eine Amplifikation nicht zu einer signifikanten Reaktivierung der Gene führen würden. Nakazawa et al. haben das gleiche Phänomen bei intrahepatischen Gallengangskarzinomen gesehen. Hier war eine MET Überexpression (21,4%) nicht mit einer Genamplifikation assoziiert (39).

MET wurde als potentiell Ziel für die Krebstherapie bekannt und eine Vielzahl von entsprechenden klinischen Studien laufen noch (13). Es ist unklar, ob alle potentiellen MET Veränderungen als Prädiktor für therapeutischem Ansprechen

gesehen werden können. Es wurde gezeigt, dass MET Genveränderungen ein starker Prädiktor für das Ansprechen vom Tyrosinkinase Inhibitor PHA-665752 in gastrischen Zelllinien ist (40). Außerdem wurde gezeigt, dass der MET Kinase Inhibitor PF-02341066 eine unterschiedliche Aktivität gegen verschiedene Mutationsformen von MET hat (41). Cheng et al. haben 40 Harnblasenkarzinome untersucht und keinen Beweis für eine Punktmutation im MET Gen gefunden (11). In unserer Studie haben wir gezeigt, dass obwohl die Mehrheit der Urothelkarzinome eine membranöse Anfärbung zeigt, nur ein Bruchteil der Tumoren eine Genamplifikation gezeigt hat. Erfahrungen mit EGFR Tyrosinkinase Inhibitoren haben gezeigt, dass das Level der Expression des Rezeptors kein relevanter Biomarker für die Patientenselektion darstellt. Außerdem wurde gezeigt, dass nur eine kleine Gruppe von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinomen genetische Veränderung für EGFR zeigen, die für die Therapie sensitiv sind (42-44). Im Fall von MET ist es daher höchst unsicher, ob eine MET Inhibition erfolgreich für die Behandlung des Urothelkarzinoms sein kann.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Studie, dass eine membranöse MET Expression sowohl bei normalem Urothel als auch bei Urothelkarzinomen häufig vorkommt, wohingegen eine Amplifikation des MET Gens sehr selten beim Urothelkarzinom vorkommt. Verminderte Expressionslevel von membranösem MET sind beim Urothelkarzinom mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium sowie high-grade Tumoren assoziiert. Der Nutzen von anti-MET Therapien beim Urothelkarzinom bleibt zu prüfen.

2. Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61:69e90.
2. Quek ML, Quinn DI, Daneshmand S, et al. Molecular prognostication in bladder cancer: a current perspective. Eur J Cancer 2003;39:1501e1510.
3. Buscarini M, Quek ML, Gill P, et al. Molecular prognostic factors in bladder cancer. BJU Int 2005;95:739e742.
4. Rink M, Cha EK, Green D, et al. Biomolecular predictors of urothelial cancer behavior and treatment outcomes. Curr Urol Rep 2012;13:122e135.
5. Pusztai L, Lewis CE, Lorenzen J, et al. Growth factors: regulation of normal and neoplastic growth. J Pathol 1993;169: 191e201.

6. Brinkmann V, Foroutan H, Sachs M, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J Cell Biol* 1995;131: 1573e1586.
7. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, et al. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:915e925.
8. Gastaldi S, Comoglio PM, Trusolino L. The Met oncogene and basal-like breast cancer: another culprit to watch out for? *Breast Cancer Res* 2010;12:208.
9. Graziano F, Galluccio N, Lorenzini P, et al. Genetic activation of the MET pathway and prognosis of patients with high-risk, radically resected gastric cancer. *J Clin Oncol* 2011;29: 4789e4795.
10. De Oliveira AT, Matos D, Logullo AF, et al. MET is highly expressed in advanced stages of colorectal cancer and indicates worse prognosis and mortality. *Anticancer Res* 2009;29: 4807e4811.
11. Cheng HL, Trink B, Tzai TS, et al. Overexpression of c-met as a prognostic indicator for transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a comparison with p53 nuclear accumulation. *J Clin Oncol* 2002;20:1544e1550.
12. Cheng HL, Liu HS, Lin YJ, et al. Co-expression of RON and MET is a prognostic indicator for patients with transitional-cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 2005;92:1906e1914.
13. Goetsch L, Caussanel V. Selection criteria for c-Met-targeted therapies: emerging evidence for biomarkers. *Biomark Med* 2010;4:149e170.
14. Di Renzo MF, Olivero M, Ferro S, et al. Overexpression of the c- MET/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. *Onco- gene* 1992;7:2549e2553.
15. Houldsworth J, Cordon-Cardo C, Ladanyi M, et al. Gene amplification in gastric and esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1990;50:6417e6422.
16. Schmidt L, Duh FM, Chen F, et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1997;16:68e73.
17. Lee JH, Han SU, Cho H, et al. A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. *Oncogene* 2000;19: 4947e4953.
18. Park WS, Dong SM, Kim SY, et al. Somatic mutations in the kinase domain of the Met/hepatocyte growth factor receptor gene in childhood hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1999; 59:307e310.
19. Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, et al. Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene* 2000;19: 1547e1555.
20. Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, et al. Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res* 1997;57:5391e5398.
21. Koga F, Tsutsumi S, Neckers LM. Low dose geldanamycin inhibits hepatocyte growth factor and hypoxia-stimulated invasion of cancer cells. *Cell Cycle* 2007;6:1393e1402.
22. Karkoulis PK, Stravopodis DJ, Margaritis LH, et al. 17- Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces downregulation of critical Hsp90 protein clients and results in cell cycle arrest and apoptosis of human urinary bladder cancer cells. *BMC Cancer* 2012;10:481.
23. Todeschini AR, Dos Santos JN, Handa K, et al. Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD82/cMet-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1925e1930.

24. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, et al. Profiling bladder cancer using targeted antibody arrays. *Am J Pathol* 2006;168:93e103.
25. Joseph A, Weiss GH, Jin L, et al. Expression of scatter factor in human bladder carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:372e377.
26. Miyata Y, Sagara Y, Kanda S, et al. Phosphorylated hepatocyte growth factor receptor/c-Met is associated with tumor growth and prognosis in patients with bladder cancer: correlation with matrix metalloproteinase-2 and -7 and E-cadherin. *Hum Pathol* 2009;40:496e504.
27. Wu TF, Wu H, Wang YW, et al. Prohibitin in the pathogenesis of transitional cell bladder cancer. *Anticancer Res* 2007;27: 895e900.
28. Wild PJ, Kunz-Schughart LA, Stoehr R, et al. High-throughput tissue microarray analysis of COX2 expression in urinary bladder cancer. *Int J Oncol* 2005;27:385e391.
29. Bubendorf L. High-throughput microarray technologies: from genomics to clinics. *Eur Urol* 2001;40:231e238.
30. Mostofi F, Sobin L, Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumours. International classification of tumours. Geneva: World Health Organization; 1973.
31. Union for International Cancer Control (UICC). TNM Classification of malignant tumors. 4th ed. Berlin: Springer; 1992.
32. Dancau AM, Simon R, Mirlacher M, et al. Tissue microarrays. *Methods Mol Biol* 2010;576:49e60.
33. Marx AH, Zielinski M, Kowitz CM, et al. Homogeneous EGFR amplification defines a subset of aggressive Barrett's adenocarcinomas with poor prognosis. *Histopathology* 2010;57: 418e426.
34. Yeh CY, Shin SM, Yeh HH, et al. Transcriptional activation of the Axl and PDGFR- α by c-Met through a ras- and Src- independent mechanism in human bladder cancer. *BMC Cancer* 2011;11:139.
35. Li B, Kanamaru H, Noriki S, et al. Differential expression of hepatocyte growth factor in papillary and nodular tumors of the bladder. *Int J Urol* 1998;5:436e440.
36. Ginty F, Adak S, Can A, et al. The relative distribution of membranous and cytoplasmic met is a prognostic indicator in stage I and II colon cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14: 3814e3822.
37. Guo G, Sun X, Chen C, et al. Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nat Genet* 2013;45:1459e1463.
38. Iyer G, Al-Ahmadie H, Schultz N, et al. Prevalence and co-occurrence of actionable genomic alterations in high-grade bladder cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:3133e3140.
39. Nakazawa K, Dobashi Y, Suzuki S, et al. Amplification and overexpression of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, and c-met in biliary tract cancers. *J Pathol* 2005;206:356e365.
40. Smolen GA, Sordella R, Muir B, et al. Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2316e2321.
41. Zou HY, Li Q, Lee JH, et al. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive anti-tumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res* 2007;67:4408e4417.

42. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350: 2129e2139.
43. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497e1500.
44. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13306e13311.

Reduced membranous MET expression is linked to bladder cancer progression

Martina Kluth^{a,1}, Kristina Reynolds^{a,1}, Michael Rink^b, Felix Chun^b,
Roland Dahlem^b, Margit Fisch^b, Wolfgang Höppner^c, Walter Wagner^d,
Ousman Doh^e, Luigi Terracciano^f, Ronald Simon^a, Guido Sauter^a,
Sarah Minner^{a,*}

^a Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ^b Department of Urology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ^c Department of Urology, Clinical Center Itzehoe, Itzehoe, Germany; ^d Department of Urology, German Armed Forces Hospital, Hamburg, Germany; ^e Department of Urology, Regio Clinic Wedel, Wedel, Germany; ^f Institute of Pathology, University of Basel, Basel, Switzerland

The MET protein is involved in the malignant progression of different tumors. This study aimed to analyze the relationship of MET expression with tumor phenotype and clinical outcome in bladder cancer and the role of gene amplification for MET overexpression. A bladder cancer tissue microarray containing 686 bladder cancers was analyzed by immunohistochemistry and by fluorescence in situ hybridization. MET immunostaining was seen in normal urothelium and was recorded in 459 of 560 analyzable urothelial carcinomas (82.0%). Low MET staining was associated with a more unfavorable tumor phenotype. MET staining was seen in 89.8% of 266 pTa, 81.1% of 132 pT1, and 69.4% of 160 pT2–4 cancers ($P < 0.0001$). MET staining was detectable in 92.4% of 66 grade 1, 85.6% of 257 grade 2, and 75.1% of 237 grade 3 cancers ($P = 0.001$). MET expression status was not associated with overall or tumor-specific survival in muscle-invasive cancers (pT2–4), tumor progression in pT1 cancers, or recurrences in pTa tumors. Only four of the analyzed tumors (0.8%) showed amplification of the *MET* gene. We conclude that MET is not overexpressed in urothelial cancer but rather downregulated in a fraction of cancers. Accordingly, rare amplification of the genomic area including the *MET* gene was not associated with MET protein overexpression.

Keywords Bladder cancer, MET, tissue microarray, prognosis, immunohistochemistry

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Bladder cancer is the seventh most-common cancer in males, with an estimated incidence of about 380,000 cases worldwide (1). Invasively growing bladder cancers (pT1–4) have a significant cancer-related mortality, and surgical treatment options vary from transurethral resection to cystectomy with the risk of substantial treatment-associated morbidity. Therefore, it is important to identify biomarkers that are useful for early diagnosis and exact assessment of individual patient prognosis and thus enable better decision-making in the

individual treatment of bladder cancer patients. In recent years, numerous genetic alterations were found and linked to tumor growth, metastasis, and survival in bladder cancer (2–4). These include DNA copy number alterations that often pinpoint the localization of important tumor suppressor genes or proto-oncogenes in cancers. A major class of proto-oncogenes are protein tyrosine kinases (PTK) that are involved in various cell regulatory processes, such as proliferation and migration (5). Some of these proto-oncogenes, such as *HER2/neu*, are well-known (2,3). But the role of most PTKs in bladder cancer is insufficiently clarified.

The *MET* gene, located on chromosome 7q31, encodes a transmembrane tyrosine kinase receptor for the hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF). Under physiological conditions, the HGF/MET signaling plays a role in various cellular processes, such as cell differentiation, cell motility, promotion of invasion, cell survival, and epithelial

Received October 29, 2013; received in revised form March 15, 2014; accepted March 17, 2014.

* Corresponding author.

E-mail address: s.minner@uke.de

¹ Both authors contributed equally to this work and both are considered first author.

morphogenesis (6,7). The *MET* gene product has been found to play an oncogenic role in a variety of different human cancers such as breast (8), gastric (9), colorectal (10), and bladder cancer (11,12). In these cancers, *MET* overexpression is suspected to play a role in tumorigenesis and cancer progression and is often associated with shortened survival, advanced tumor stage, and high tumor grade (13). Aberrant activation of *MET* in cancer has been found to be due to transcriptional upregulation resulting in overexpression (14), gene amplification (15), germline mutations (16,17), or somatic mutations (18,19) leading to constitutive *MET* activations and ligand-dependent autocrine loops (20). Furthermore, *MET* inhibition is also investigated as a potential target for cancer treatment (21–23).

In bladder cancer, several studies using immunohistochemistry (IHC) have described *MET* overexpression, and some studies described a strong relationship between high *MET* protein expression and tumor grade, tumor stage, invasion, metastasis, and decreased survival (11,12,24–27). This study was undertaken to assess the role of *MET* gene amplification as a mechanism for *MET* overexpression in bladder cancer. In addition, we intended to further investigate the clinicopathological associations of *MET* protein expression levels in bladder cancer. For this purpose, an urothelial bladder cancer tissue microarray (TMA) containing samples from 686 patients was analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH) and IHC.

Materials and methods

Bladder cancer tissue microarray

A preexisting bladder cancer TMA containing 686 urothelial bladder cancer samples was used (28). One 0.6-mm tissue core had been punched out from each case and transferred into a tissue microarray (TMA) format as described previously (29). Tumor stage and grade were defined according to Union for International Cancer Control (UICC) and earlier World Health Organization (WHO) classification (30,31). (The tumors were not classified according to the current 2004 WHO classification, since the tumors for the TMA construction were reviewed before 2004.) Cancers with stromal invasion but absence of muscular bladder wall in the biopsy were classified as at least pT1 (pT1). A papillary tumor growth was assumed if at least one unequivocal papilla with similar atypia to the invasive tumor area was present. Time to recurrence was selected as the study endpoint for pTa tumors, and time to progression (to stage pT2 or higher) was selected as the study endpoint for pT1 cancers. Recurrences were defined as cystoscopically visible tumors. Tumor progression was defined as the presence of muscle invasion (stage pT2 or higher) in a subsequent biopsy.

Immunohistochemistry

Freshly cut TMA sections were analyzed on the same day in a single experiment. High temperature pretreatment of slides was done in an autoclave in Tris-EDTA-citrate buffer, pH 7.8, for 5 minutes. *MET* immunostaining was performed using a

monoclonal antibody (clone EP1454Y, dilution 1:150; Abcam, Cambridge, UK). The TMAs were evaluated by one pathologist (S.M.). Only membranous staining was considered. The staining intensity (0, 1+, 2+, 3+) and the fraction of positive tumor cells were recorded for each tissue spot. A final score was built from these two parameters according to the following scores: Negative scores had a staining intensity of 0; weak scores had a staining intensity of 1+ in 70% or less of the tumor cells or a staining intensity of 2+ in 30% or less of the tumor cells; moderate scores had a staining intensity of 1+ in more than 70% of the tumor cells, a staining intensity of 2+ in more than 30% and 70% or less of the tumor cells, or a staining intensity of 3+ in 30% or less of the tumor cells; and strong scores had a staining intensity of 2+ in more than 70% of the tumor cells or a staining intensity of 3+ in more than 30% of the tumor cells. This is a standardized scoring system used by our group with the purpose of defining a group with high expression level, a group with low or absent expression, and two intermediate groups. In our experience, this system works well to define whether molecular features are associated with tumor phenotype and clinical outcome (32).

Fluorescence in situ hybridization

A 4- μ m TMA section was used for dual-color FISH. For proteolytic slide pretreatment, a commercial kit was used (Vysis paraffin pretreatment reagent kit; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). TMA sections were deparaffinized, air-dried, and dehydrated in 70%, 85%, and 100% ethanol, followed by denaturation for 5 minutes at 74°C in 70% formamide 2 $\times$ SSC solution. The dual-color FISH probe set consisting of an orange fluorochrome direct-labeled centromere 7 probe and a green fluorochrome direct-labeled *MET*-specific probe was used (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Germany). Hybridization was done overnight at 37°C in a humidified chamber, and slides were washed and counterstained with 0.2 μ mol/L 4'-6-diamidino-2-phenylindole in an antifade solution. Each spot was evaluated, and the predominant gene and centromere copy numbers in tumor cells were estimated by one experienced technician. Data from our laboratory have previously shown that diagnosis of amplification based on signal number estimation is highly reliable (33). A tumor was considered amplified if the ratio of gene-specific signals/centromere signals was ≥ 2.0 . In cases in which the ratio was not clearly below or above 2.0, a total of 20 cells were scored.

Statistics

For statistical analysis, the JMP 8.0 software (SAS Institute Inc, Cary, NC) was used. Contingency tables were calculated to study the association between *MET* overexpression or amplification and clinicopathological variables, and the χ^2 (likelihood) test was used to find significant relationships. Survival curves were calculated by the Kaplan–Meier method and compared with the log-rank test. Depending on the selected endpoint, patients were censored at the time of last clinical control at which they showed no evidence of disease or at the date when cystectomy was performed.

Results

Technical issues

A total of 560 (81.6%) and 504 (73.5%) tumor samples were interpretable for immunohistochemistry in our TMA analysis and FISH analysis, respectively. Reasons for noninformative cases included complete lack of tissue samples, absence of unequivocal cancer tissue, or insufficient hybridization (for FISH) in the TMA section.

Immunohistochemistry

MET immunostaining always showed distinct membrane predominance. Cytoplasmic staining was rare and seen only in association with strong membranous staining. In nonneoplastic urothelium, strong membranous MET immunostaining was almost always present across all cell layers (Figure 1A). In cancers, membranous MET immunostaining was recorded in 459 of 560 analyzable cases (82.0%). Staining was considered weak in 137 (24.5%), moderate in 124 (22.1%), and strong in 198 (35.4%) of cancers. Representative images are given in Figure 1B–D. The relationship between MET immunostaining and tumor phenotype is depicted in Table 1. In general, expression decreased with increasing tumor stage ($P < 0.0001$) and tumor grade ($P = 0.001$).

Fluorescence in situ hybridization

Only four of 504 cancers interpretable by FISH (0.8%) showed MET amplification (Figure 2). Of these four cases, one tumor was stage pT1 and the other three were pT2–4 tumors. MET amplification was unrelated to MET immunostaining ($P = 0.1599$), as two cases showed weak and one case even negative MET immunostaining.

Association with disease outcome

To investigate the prognostic role of MET immunostaining, the clinically most relevant endpoints in bladder cancer were selected. These included overall and tumor-specific survival in muscle-invasive cancers (pT2–4), tumor progression in pT1 carcinomas, and recurrences in pTa tumors. Significant associations were generally not found between MET immunostaining and these endpoints (Figure 3A–D; $P > 0.01$ each). A statistically significant value was obtained only for recurrence in pTa tumors (Figure 3C, $P = 0.0152$). However, this result was due to particularly extreme outcomes of the two intermediate staining groups (weak and moderate), raising the possibility of a statistical artifact. MET amplification was unrelated to disease outcome (data not shown), which was not surprising given the low number of cases ($n = 4$).

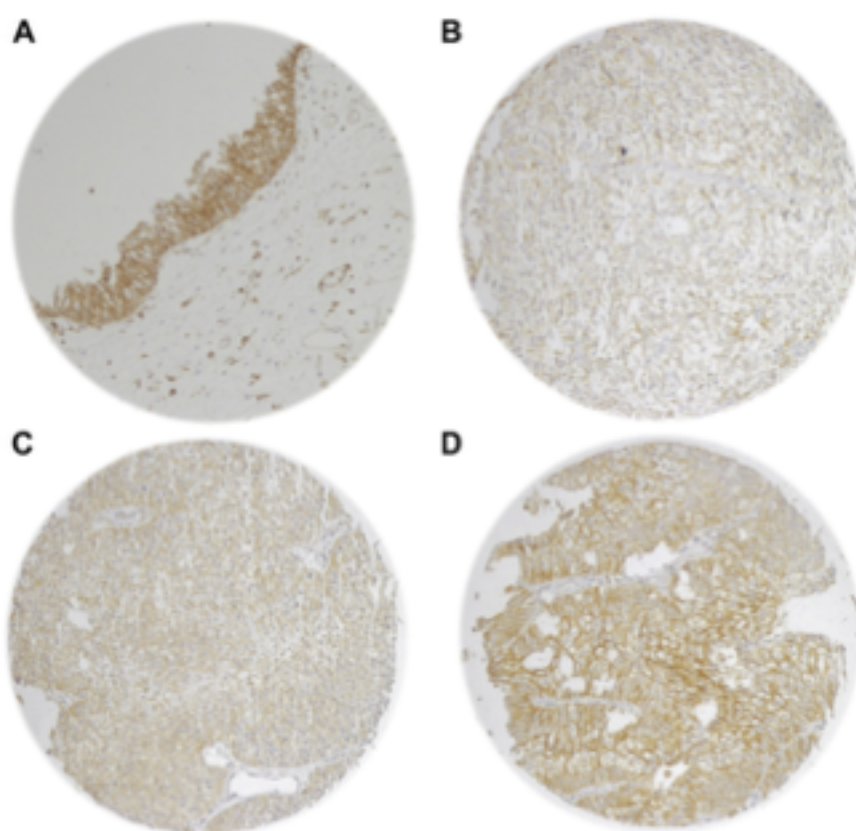


Figure 1 Representative images of MET immunostaining. The images show (A) strong MET immunostaining in normal urothelium, (B) weak MET immunostaining in urothelial cancer, (C) moderate MET immunostaining in urothelial cancer, and (D) strong MET immunostaining in urothelial cancer.

Table 1 MET immunostaining and tumor phenotype

	MET immunohistochemistry						P value
	On TMA, n	Analyzable, n	Negative, %	Weak, %	Moderate, %	Strong, %	
Histology							
urothelial	686	560	18.0	24.5	22.1	35.4	
Stage							
pTa	315	266	10.2	20.3	24.8	44.7	<0.0001
pT1	160	132	18.9	22.0	22.7	36.4	
pT1–	4	2	0	100	0	0	
pT2–4	207	160	30.6	32.5	17.5	19.4	
Grade							
G1	82	66	7.6	19.7	27.3	45.4	0.001
G2	300	257	14.4	23.0	23.7	38.9	
G3	304	237	24.9	27.4	19.0	28.7	
Stage and grade							
pTa G1	82	66	7.6	19.7	27.3	45.4	0.0026
pTa G2	185	162	10.5	20.4	23.4	45.7	
pTa G3	48	38	13.2	21.0	26.3	39.5	
pT1 G2	70	62	19.4	19.4	33.8	27.4	
pT1 G3	94	72	18.1	26.4	12.5	43.0	
pT2–4 G2	45	33	24.2	42.4	6.1	27.3	
pT2–4 G3	162	127	32.3	29.9	20.5	17.3	

Discussion

The main purpose of this study was to determine the relationship between *MET* alterations and tumor phenotype, as well as clinical outcome. The analysis of more than 400 cancers under highly standardized circumstances in a TMA format revealed an inverse correlation between *MET* expression and tumor phenotype, that is, tumor stage and tumor grade, no association was found with disease outcome. This finding is in contrast to eight previous studies analyzing *MET* protein expression by immunohistochemistry in 4 to 173 bladder cancers (11,12,24–27,34,35). In these studies, *MET* expression was found in 27.5% to 100% and was associated with tumor grade, tumor stage,

invasion, metastasis, and decreased survival (11,12,24–27). These studies have in common that the staining was either cytoplasmic or strongly cytoplasmic and membranous. We tested various commercially available antibodies, and only the antibody used in this study revealed a specific membranous staining as expected for a cell surface receptor such as *MET*. The discrepancy between our findings and those of previous studies could therefore be due to different antibodies used and different cellular compartments analyzed. None of these previous studies utilized the antibody (clone: EP1454Y, Abcam, Cambridge, UK) used in this study. A fluorescent-based immunohistochemistry study on 583 colon cancer patients showed that a lower distribution of *MET* in the membrane, relative to the cytoplasm, might be a predictor of poor outcome in stage I and stage II colon cancer patients (36). This fits with our finding of lower membranous staining in high stage and high grade bladder tumors.

Aberrant activation of *MET* in cancer has been found to be due to transcriptional upregulation resulting in overexpression (14), gene amplification (15), germline mutations (16,17) or somatic mutations (18,19) leading to constitutive *MET* activations and ligand-dependent autocrine loops (20). Although several studies exist on *MET* overexpression, gene copy number alterations have not yet been analyzed in urothelial cancer by FISH. The TMA method is particularly suited to compare gene copy number with protein expression, since the analysis is limited to identical tumor areas if consecutive sections are used. This excludes any possible impact of tumor heterogeneity on the results. Given that we found only four cases (0.8%) with *MET* amplification further argues against a particular oncogenic role of *MET* in bladder cancer. This low proportion of *MET* amplification is in concordance with recent results generated by The Cancer Genome Atlas (TCGA) consortium. Within this consortium, four different study groups analyzed a total of 349 urothelial bladder cancers and found only two cases with *MET*

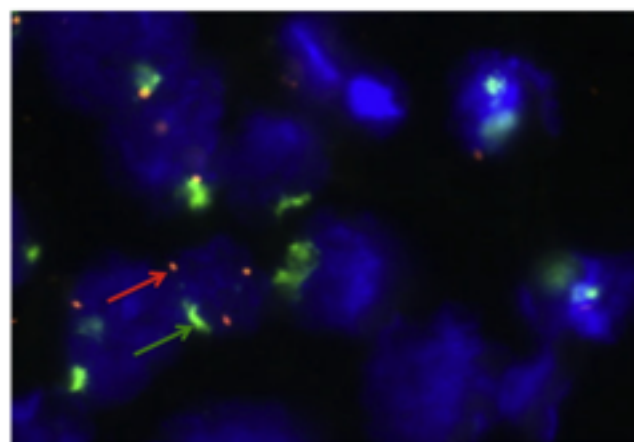


Figure 2 Dual-labeling FISH with probes for the *MET* gene (green) and centromere 7 (red). The image shows an example of *MET* amplification in "clusters" (green arrow: *MET* gene, red arrow: centromere 7).

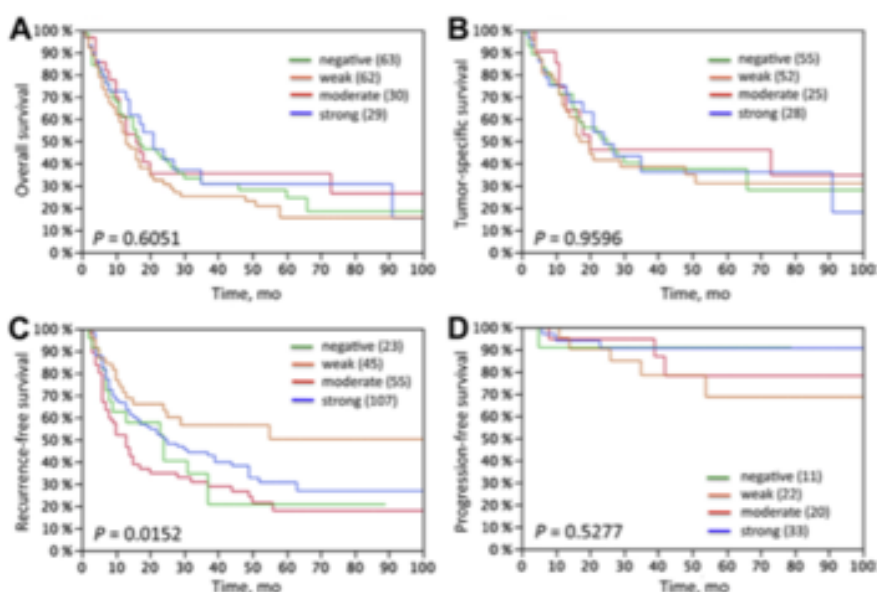


Figure 3 MET expression and (A) overall survival in pT2–4 cancers, (B) tumor-specific survival in pT2–4 cancers, (C) recurrence-free survival in pTa cancers, and (D) progression-free survival in pT1 cancers. The number of tumors in each category is given in parentheses following the labels “negative”, “weak”, “moderate” and “strong”.

amplification (37,38). It appears possible that *MET* amplifications do not result in a measurable overexpression in our four advanced urothelial cancers, because the gene has been downregulated during cancer progression to a level at which even amplification would not result in a significant reactivation of the gene. Nakazawa et al. observed the same phenomenon in intrahepatic bile duct carcinomas, where *MET* overexpression (21.4%) was not associated with gene amplification (39).

MET has emerged as a potential target for cancer therapy, and a multitude of respective clinical trials are ongoing (13). It is unclear, however, whether all potential *MET* alterations can be seen as predictors of therapeutic responsiveness. *MET* gene amplification has been shown to be a strong predictor of responsiveness to the tyrosine kinase inhibitor PHA-665752 in gastric cell lines (40). In addition, it has been shown that the *MET* kinase inhibitor PF-02341066 has differential activity against different mutant forms of *MET* (41). Cheng et al. analyzed 40 cases of bladder cancer and found no evidence of point mutation of the *MET* gene (11). In our study, we show that although the majority of urothelial cancers display membranous staining, only a fraction of tumors show gene amplification. Experience with EGFR tyrosine kinase inhibitors has demonstrated that the level of expression of the receptor is not the relevant biomarker for patient selection, and it has been shown that only a small subset of patients with non-small-cell lung cancers display genetic alterations for *EGFR* that are sensitive to that therapy (42–44). In the case of *MET*, it is therefore highly uncertain whether *MET* inhibitors will be successful in the treatment of urothelial cancer.

In summary, the data of this study show that membranous *MET* expression is common in normal urothelium and in bladder cancer, whereas amplification of the *MET* gene is a rare event in urothelial bladder cancer. Decreased levels of membranous *MET* are associated with advanced tumor

stage and high grade in urothelial bladder cancer. The utility of anti-*MET* therapies in bladder cancer remains to be tested.

Acknowledgment

We thank Silvia Schnöger, Sascha Eghtessadi, and Christina Koop for their excellent technical support.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69–90.
2. Quek ML, Quinn DI, Daneshmand S, et al. Molecular prognostication in bladder cancer—a current perspective. *Eur J Cancer* 2003;39:1501–1510.
3. Buscarini M, Quek ML, Gill P, et al. Molecular prognostic factors in bladder cancer. *BJU Int* 2005;95:739–742.
4. Rink M, Cha EK, Green D, et al. Biomolecular predictors of urothelial cancer behavior and treatment outcomes. *Curr Urol Rep* 2012;13:122–135.
5. Pusztai L, Lewis CE, Lorenzen J, et al. Growth factors: regulation of normal and neoplastic growth. *J Pathol* 1993;169:191–201.
6. Brinkmann V, Foroutan H, Sachs M, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J Cell Biol* 1995;131:1573–1586.
7. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, et al. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:915–925.
8. Gastaldi S, Comoglio PM, Trusolino L. The *Met* oncogene and basal-like breast cancer: another culprit to watch out for? *Breast Cancer Res* 2010;12:208.
9. Graziano F, Galluccio N, Lorenzini P, et al. Genetic activation of the *MET* pathway and prognosis of patients with high-risk, radically resected gastric cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:4789–4795.

10. De Oliveira AT, Matos D, Logullo AF, et al. MET is highly expressed in advanced stages of colorectal cancer and indicates worse prognosis and mortality. *Anticancer Res* 2009;29:4807–4811.
11. Cheng HL, Trink B, Tzai TS, et al. Overexpression of c-met as a prognostic indicator for transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a comparison with p53 nuclear accumulation. *J Clin Oncol* 2002;20:1544–1550.
12. Cheng HL, Liu HS, Lin YJ, et al. Co-expression of RON and MET is a prognostic indicator for patients with transitional-cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 2005;92:1906–1914.
13. Goetsch L, Caussanel V. Selection criteria for c-Met-targeted therapies: emerging evidence for biomarkers. *Biomark Med* 2010;4:149–170.
14. Di Renzo MF, Olivero M, Ferro S, et al. Overexpression of the c-MET/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 1992;7:2549–2553.
15. Houldsworth J, Cordon-Cardo C, Ladanyi M, et al. Gene amplification in gastric and esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1990;50:6417–6422.
16. Schmidt L, Duh FM, Chen F, et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1997;16:68–73.
17. Lee JH, Han SU, Cho H, et al. A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. *Oncogene* 2000;19:4947–4953.
18. Park WS, Dong SM, Kim SY, et al. Somatic mutations in the kinase domain of the Met/hepatocyte growth factor receptor gene in childhood hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1999;59:307–310.
19. Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, et al. Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene* 2000;19:1547–1555.
20. Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, et al. Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res* 1997;57:5391–5398.
21. Koga F, Tsutsumi S, Neckers LM. Low dose geldanamycin inhibits hepatocyte growth factor and hypoxia-stimulated invasion of cancer cells. *Cell Cycle* 2007;6:1393–1402.
22. Karkoulis PK, Stravopodis DJ, Margaris LH, et al. 17-Allyl-17-demethoxygeldanamycin induces downregulation of critical Hsp90 protein clients and results in cell cycle arrest and apoptosis of human urinary bladder cancer cells. *BMC Cancer* 2012;10:481.
23. Todeschini AR, Dos Santos JN, Handa K, et al. Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD62/cMet-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1925–1930.
24. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, et al. Profiling bladder cancer using targeted antibody arrays. *Am J Pathol* 2008;168:93–103.
25. Joseph A, Weiss GH, Jin L, et al. Expression of scatter factor in human bladder carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:372–377.
26. Miyata Y, Sagara Y, Kanda S, et al. Phosphorylated hepatocyte growth factor receptor/c-Met is associated with tumor growth and prognosis in patients with bladder cancer: correlation with matrix metalloproteinase-2 and -7 and E-cadherin. *Hum Pathol* 2009;40:496–504.
27. Wu TF, Wu H, Wang YW, et al. Prohibitin in the pathogenesis of transitional cell bladder cancer. *Anticancer Res* 2007;27:895–900.
28. Wild PJ, Kunz-Schughart LA, Stoeckl R, et al. High-throughput tissue microarray analysis of COX2 expression in urinary bladder cancer. *Int J Oncol* 2005;27:385–391.
29. Bubendorf L. High-throughput microarray technologies: from genomics to clinics. *Eur Urol* 2001;40:231–238.
30. Mostofi F, Sobin L, Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumours. International classification of tumours. Geneva: World Health Organization; 1973.
31. Union for International Cancer Control (UICC). TNM Classification of malignant tumors. 4th ed. Berlin: Springer; 1992.
32. Dancau AM, Simon R, Mirlacher M, et al. Tissue microarrays. *Methods Mol Biol* 2010;576:49–60.
33. Marx AH, Zielinski M, Kowitz CM, et al. Homogeneous EGFR amplification defines a subset of aggressive Barrett's adenocarcinomas with poor prognosis. *Histopathology* 2010;57:418–426.
34. Yeh CY, Shin SM, Yeh HH, et al. Transcriptional activation of the Axl and PDGFR- α by c-Met through a ras- and Src-independent mechanism in human bladder cancer. *BMC Cancer* 2011;11:139.
35. Li B, Kanamaru H, Noriki S, et al. Differential expression of hepatocyte growth factor in papillary and nodular tumors of the bladder. *Int J Urol* 1998;5:436–440.
36. Ginty F, Adak S, Can A, et al. The relative distribution of membranous and cytoplasmic met is a prognostic indicator in stage I and II colon cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:3814–3822.
37. Guo G, Sun X, Chen C, et al. Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nat Genet* 2013;45:1459–1463.
38. Iyer G, Al-Ahmadie H, Schultz N, et al. Prevalence and co-occurrence of actionable genomic alterations in high-grade bladder cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:3133–3140.
39. Nakazawa K, Dobashi Y, Suzuki S, et al. Amplification and overexpression of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, and c-met in biliary tract cancers. *J Pathol* 2005;206:356–365.
40. Smolen GA, Sordella R, Muir B, et al. Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2316–2321.
41. Zou HY, Li Q, Lee JH, et al. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive anti-tumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res* 2007;67:4408–4417.
42. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129–2139.
43. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497–1500.
44. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13306–13311.

4. Zusammenfassung in deutscher Sprache

Ziele

C-Met gehört zu einer Unterfamilie der Tyrosin Kinase Rezeptoren und ist an maligner Progression vieler verschiedener Tumoren, u.a. des Urothelkarzinoms beteiligt. Das Ziel dieser Studie war es die Verbindung zwischen der C-Met Expression und dem Phänotyp des Tumors sowie dem klinischen Outcome des Urothelkarzinoms darzustellen. Des Weiteren wurde die Rolle der Genamplifikation in der C-Met Überexpression untersucht.

Methoden

Es wurde ein Tissue Mikroarray mit Proben von 686 Urothelkarzinomen sowohl immunhisochemisch für die c-Met Expression sowie mittels Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) zur Bestimmung der Anzahl von Veränderungen der c-Met Genkopien untersucht.

Ergebnisse

Eine membranöse Immunfärbung war in allen Proben normalen Urothels sowie in 459 (82%) der 560 analysierbaren Urothelkarzinome nachweisbar. Proben mit niedriger c-Met Expression waren mit einem ungünstigem Tumorphänotyp assoziiert. Die C-Met Anfärbung war in 89,9% von 266 pTa Tumoren, 81,1% von 132 pT1 Tumoren sowie 69,4% von 160 pT2-4 Tumoren ($p < 0,0001$) positiv. Bezogen auf das Tumorigradung war eine c-Met-Anfärbung bei 92,4% von 66 Grad 1 Tumoren, bei 85,6% von 257 Grad 2 Tumoren sowie bei 75,1% von 237 Grad 3 Tumoren ($p = 0,001$) positiv. Der Status der c-Met-Expression war weder eindeutig mit dem gesamt- oder tumorspezifischen Überleben in muskel-invasiven Karzinomen (pT2-4) noch mit der Tumorprogression in pT1 Tumoren oder Rezidiven bei pTa Tumoren assoziiert. Nur 4 (0,8%) der Tumore zeigte eine Amplifikation des c-Met Gens.

Schlussfolgerung

Basierend auf unseren Ergebnissen schlussfolgern wir, dass c-Met in Urothelkarzinomen nicht überexprimiert, sondern in einem Teil der Karzinome eher herab reguliert ist. Dementsprechend war eine niedrige Amplifikation des Genom-Bereichs inklusive des c-Met Gens nicht mit einer signifikant höheren Expression des c-Met Proteins in unseren Urothelkarzinomen assoziiert.

5. Zusammenfassung in englischer Sprache

The MET protein is involved in the malignant progression of different tumors. This study aimed to analyze the relationship of MET expression with tumor phenotype and clinical outcome in bladder cancer and the role of gene amplification for MET overexpression. A bladder cancer tissue micro-array containing 686 bladder cancers was analyzed by immunohistochemistry and by fluorescence in situ hybridization. MET immunostaining was seen in normal urothelium and was recorded in 459 of 560 analyzable urothelial carcinomas (82.0%). Low MET staining was associated with a more unfavorable tumor phenotype. MET staining was seen in 89.8% of 266 pTa, 81.1% of 132 pT1, and 69.4% of 160 pT2e4 cancers ($P < 0.0001$). MET staining was detectable in 92.4% of 66 grade 1, 85.6% of 257 grade 2, and 75.1% of 237 grade 3 cancers ($P \geq 0.001$). MET expression status was not associated with overall or tumor-specific survival in muscle-invasive cancers (pT2e4), tumor progression in pT1 cancers, or recurrences in pTa tumors. Only four of the analyzed tumors (0.8%) showed amplification of the MET gene. We conclude that MET is not overexpressed in urothelial cancer but rather downregulated in a fraction of cancers. Accordingly, rare amplification of the genomic area including the MET gene was not associated with MET protein overexpression.

6. Erklärung des Eigenanteils

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter Betreuung von Prof. Dr. med. Guido Sauter durchgeführt.

Die Konzeption der Forschungsarbeit erfolgte durch Prof. med. Guido Sauter, Herrn Ronald Simon oder Frau Dr. Sarah Minner.

Die Analyse und Auswertung der FISH sowie immunhistochemischen Daten habe ich durch Unterstützung von Martina Kluth und Sarah Minner durchgeführt.

Die Erstellung der Datenbank und die Analyse der statistischen Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Michael Rink, Felix Chun, Ronald Dahlem, Margit Fisch, Wolfgang Höppner, Walter Wagner, Ousman Doh, Luigi Terracciano.

Die Literaturrecherche zum MET Protein habe ich durchgeführt, die Erstellung des Manuskripts erfolgte erneut in Zusammenarbeit mit Sarah Minner, Martina Kluth, Ronald Simon und Guido Sauter.

7. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei Prof. Dr. Guido Sauter bedanken, der es mir ermöglichte diese Dissertation im Institut für Pathologie anzufertigen. Besonders danke ich Sarah Minner für die wundervolle und lehrreiche Betreuung.

Mein Dank gilt ebenfalls Ronald Simon sowie Martina Kluth für Ihre Unterstützung bei der Analyse der Daten.

Außerdem möchte ich meiner Familie und Julia Buchmann danken, die mich mein ganzes Studium und die Zeit danach, insbesondere bei der Realisierung meiner sportlichen und beruflichen Pläne unterstützt haben.

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'K. P.', is written over a horizontal line.

Unterschrift:

9. LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Kristina Joana Reynolds
Geburtsdaten:	18. Februar 1984, Hamburg
Eltern:	Karin Fürst, Studienrätin Michael Reynolds, Tennistrainer
Geschwister:	Kimberly Reynolds, Schifffahrtskauffrau Maike Reynolds, Bürokauffrau

AUSBILDUNG

1990 – 1994	Grundschule Barsbüttel
1994 – 1996	Matthias – Claudius – Gymnasium
1996 – 2003	Charlotte – Paulsen – Gymnasium
06/2003	Abitur
06/2003 – 06/2004	Vorbereitung Junioreneuropameisterschaft
07/2004 – 09/2004	Pflegepraktikum Michaelis-Krankenhaus
10/2004 – 06/2012	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
08/2006	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2012	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

BERUFLICHE LAUFBAHN

Seit 11/2012	Assistenzärztin in der I. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
--------------	---

PUBLIKATIONEN

- 2014 Cancer Genetics; „Reduced membranous MET expression is linked to bladder cancer progression“; 2014 Apr;207(4), 147-52; Kluth M, Reynolds K, Rink M, Chun F, Dahlem R, Fisch M, Höppner W, Wagner W, Doh O, Terracciano L, Simon R, Sauter G, Minner S
- 2016 Der Internist; Kasuistik „Multiple Abszesse nach Südamerikakreuzfahrt“; K. Reynolds, N. Schofer, E. Zengin, A.W. Lohse, S. Faiss, S. Schmiedel; Band 57, Heft 3, März 2016