

Aus dem Lehrstuhl für
Experimentelle Medizin und Therapieverfahren
Prof. Dr. med. Christoph Klein
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Genomische Progression von disseminierten Tumorzellen
aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen
vor und nach Manifestation von Metastasen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Annina Karin Greiff

2023

Aus dem Lehrstuhl für
Experimentelle Medizin und Therapieverfahren
Prof. Dr. med. Christoph Klein
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Genomische Progression von disseminierten Tumorzellen
aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen
vor und nach Manifestation von Metastasen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Annina Karin Greiff

2023

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Klein

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Stephan Seitz

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2023

1.	Einleitung	4
1.1	Brustkrebs	4
1.1.1	Epidemiologie	4
1.1.2	Klassifikation	4
1.1.3	Therapie von Brusttumoren	6
1.1.4	Prognose des invasiven Mammakarzinoms	6
1.2	Metastasierung von Brusttumoren	7
1.2.1	Modelle zur Entwicklung von Metastasen	8
1.2.2	Disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark von Brustkrebspatienten	9
1.2.3	Genomische Charakteristika disseminierter Tumorzellen	10
1.3	Ziel der Dissertation	10
2.	Material und Methoden	11
2.1	Kohorte und Probenmaterial	11
2.1.1	Kooperationen	11
2.1.2	Probenmaterial	11
2.1.3	Ethikvotum	11
2.2	Methoden	12
2.2.1	Einzelzellisolation und Genomamplifikation	12
2.2.1.1	Verarbeitung der Knochenmarksproben	12
2.2.1.2	Immunhistochemische Färbung	13
2.2.1.3	Einzelzellisolation	13
2.2.1.4	Whole Genome Amplification	15
2.2.1.5	Qualitäts-Kontroll (QC)-PCR	16
2.2.1.6	Gelelektrophorese	17
2.2.2	Bestimmung von CNVs	18
2.2.2.1	Reamplifikation	18
2.2.2.2	Ampli1 LowPass Sequenzierung	18
2.2.3	Etablierung eines Protokolls für die Kontrollzellfärbung an bereits gefärbten Objektträgern	20
2.2.3.1	Herstellung von PBL-Objektträgern	20
2.2.3.2	Hitzeinduzierte Antigendemaskierung	21

2.2.4	Statistik und Auswertung	21
2.2.4.1	Statistische Tests	21
2.2.4.2	Quantitative Auswertung aberranter CNV-Profile	21
2.2.4.3	Erstellung von Histogrammen mit Progenetix	22
2.3	Materialien	22
2.4	Abkürzungsverzeichnis	25
3.	Ergebnisse	28
3.1	Kohorte	29
3.2	Methodische Ergebnisse	29
3.2.1	Etablierung einer geeigneten Kontrollzellgruppe	29
3.2.1.1	Mögliche Kontrollzellgruppen	29
3.2.1.2	Einfluss der Lasermikrodissektion (LMD) auf die Zell-DNA	30
3.2.2	Bearbeitung des Knochenmarkmaterials	35
3.2.2.1	Isolierung von Kontrollzellen auf CK-gefärbten Cytospins	35
3.2.2.2	Zuverlässige Detektion von CK-positiven DCCs	37
3.3	Genomische Veränderungen der DCCs im Krankheitsverlauf	40
3.3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellfärbung und -isolation von Patienten-Slides	40
3.3.2	LowPass Whole Genome Sequenzierung disseminierter Tumorzellen	43
3.3.2.1	Auswahl der Patientinnen für eine weiterführenden Analyse	43
3.3.2.2	Verarbeitung der Sequenzierungsdaten	44
3.3.3	Analyse von Copy Number Variationen disseminierter Tumorzellen	46
3.3.3.1	DCCs im Knochenmark zwei Jahre vor Entwicklung von Hirnmetastasen	46
3.3.3.2	Starke Heterogenität unter DCCs eines Patienten	47
3.3.3.3	CNV-Vergleich von DCCs rezidivierter und rezidivfreier Patienten	50

4.	Diskussion	52
	4.1 Lasermikrodissektion von DCCs auf tiefgefrorenen Cytospins	53
	4.2 Heterogenität unter DCCs	54
	4.3 Identifizierung progressassoziierter Veränderungen	55
	4.4 Isolation zweier Zelltypen von einem Objektträger	56
	4.5 Limitationen der Arbeit	56
	4.6 Schlussfolgerungen	57
5.	Zusammenfassung	59
6.	Literaturverzeichnis	61
7.	Anhang	66

1. Einleitung

1.1 Brustkrebs

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

In Deutschland ist Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung der Frau. Jährlich werden etwa 69000 Neuerkrankungen und etwa 18000 Todesfälle, die auf Brustkrebs zurückzuführen sind, gezählt. Damit ist Brustkrebs in Deutschland auch die häufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen der Frauen. Jede achte Frau erkrankt in ihrem Leben an Brustkrebs, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 64 Jahren liegt. 30 % der Patientinnen erkranken bereits vor ihrem 55. Lebensjahr. Bei Diagnosestellung befinden sich 59 % der Erkrankten bereits in einem fortgeschrittenen Stadium (UICC-Stadium II-IV). Die Inzidenzraten sind kontinuierlich gestiegen, bis zwischen 2005 und 2009 das Mammographie-Screening eingeführt wurde. Daraufhin kam es zu einem Maximum an Neuerkrankungen. Seit 2009 ist die Inzidenzrate konstant rückläufig (Robert Koch Institute (ed.) and the Association of Population-based Cancer Registries in Germany (ed.), 2020).

Es existieren eine Reihe an Faktoren, die die Entstehung von Brustkrebs beeinflussen können. So erhöht die Einnahme östrogenhaltiger Präparate das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. Zu nennen sind hier besonders Kontrazeptiva und Hormonersatztherapien bei Wechseljahrsbeschwerden. Das Östrogen hat einen stimulierenden Effekt auf Hormonrezeptor (HR) – positive Subtypen (Luminal A und B). Östrogen nimmt über die Östrogenrezeptoren (ER) Einfluss auf die Genexpression und fördert die Proliferation von Zellen. Ein BMI > 25 ist mit einem erhöhten prä- und postmenopausalen Brustkrebsrisiko assoziiert. Im Gegenzug dazu senken eine späte Menarche und eine frühe Menopause das Brustkrebsrisiko, da die Östrogenexposition des Körpers verringert wird. Eine Schwangerschaft, die zu einer Ausdifferenzierung des anfälligen postpubertalen Brustgewebes führt, wirkt protektiv, ebenso wie ein anschließendes Stillen des Säuglings über einen längeren Zeitraum. Lediglich 10 % der Erkrankungsfälle sind auf eine genetisch vererbte Mutation zurückzuführen. Jedoch erhöht sich das Risiko um das Dreifache, sobald ein erstgradiger Verwandter erkrankt. Bei 5-10 % der genetischen Brustkrebsfälle handelt es sich um eine Mutation im BRCA1- und BRCA2-Gen (Rojas and Stuckey, 2016).

1.1.2 Klassifikation

Bei den Brusttumoren werden zunächst invasive von nicht-invasiven unterschieden. Nicht-invasive Tumore halten sich an die anatomische Grenze der Basalmembran. Sie durchbrechen diese nicht und bleiben lokal begrenzt. Man spricht von einem duktalem bzw. lobulären

Carcinoma in situ (DCIS bzw. LCIS). Das LCIS wird nach der achten Auflage des AJCC Cancer Staging Manual als benigne angesehen und stellt keine Krebsvorstufe mehr da (Amin et al., 2017; Malhotra et al., 2010). Je nach histologischem Bild können die invasiven duktaalen Karzinome weiter gruppiert werden in invasiv tubuläre, muzinöse, papilläre und medulläre Karzinome. Ist ein duktales Karzinom keiner der genannten Gruppen zuzuordnen, spricht man von einem invasiv duktaalen Karzinom NST (no special type), welches mit 40-75 % den Hauptteil der invasiven Brusttumoren ausmacht. Die zweitgrößte Gruppe wird von den invasiv lobulären Mammakarzinomen gebildet. Weiter kann der Tumor auf molekularer Ebene anhand der exprimierten Hormonrezeptoren und Oberflächenproteinen klassifiziert werden (Perou et al., 2000). Unterschieden wird die Expression von Östrogen-, Progesteron- und dem transmembranären Tyrosinkinase Rezeptor Her2 (human epidermal growth factor receptor 2). Zusätzlich wird noch der Proliferationsmarker Ki67 miteinbezogen, um insgesamt die vier Subgruppen Luminal A, Luminal B, Her2 positiv und Triple Negativ (TN) zu differenzieren (Fragomeni et al., 2018; Sorlie et al., 2001; Vuong et al., 2014). Die molekularen Subgruppen sind in Tab. 1.1 dargestellt.

Tab. 1.1: Molekulare Subgruppen des Mammakarzinoms

Subtyp	Anteil an invasiven Brusttumoren	Östrogenrezeptor (ER)	Progesteronrezeptor (PR)	Her2	Ki67
Luminal A	30-40 %	+	High (>20 % der Zellen)	-	Low
Luminal B	20-30 %	+	Low (<20 % der Zellen)	-	High
Her2 positiv	12-20 %	-	+/-	+	
TN	15-20 %	-	-	-	

Die pathologische Einteilung erfolgt anhand der üblichen TNM-Klassifikation, in der die Größe des Primärtumors (T1-T4), der Lymphknotenbefall (N0-N3) und die Fernmetastasierung (M0 und M1) miteinbezogen werden. Die jeweilige Stadienzuordnung erfolgt nach der UICC-Einteilung in vier Stadien (I-IV). Eine weitere Einteilung des Tumors erfolgt durch das Grading (G1-G3). Beurteilt werden hier drei Faktoren: die tubuläre Formation der Tumorzellen, der Kernpleomorphismus und die Mitoserate. Je schneller und aggressiver der Tumor wächst und je undifferenzierter die Tumorzellen, desto höher fällt das Grading aus (Amin et al., 2017; Vuong et al., 2014).

1.1.3 Therapie des invasiven Mammakarzinoms

Die Basistherapie nach der S3 Leitlinie des nicht-fortgeschrittenen Mammakarzinoms besteht grundsätzlich aus einer operativen R0-Resektion des Tumors, also einer Resektion im Gesunden. Man kann den Tumor brusterhaltend operieren oder eine Mastektomie mit oder ohne Rekonstruktion der Brust durchführen. Beide Methoden sind bezüglich des Überlebens gleichwertig. Eine Mastektomie ist dann indiziert, wenn eine komplette Entfernung trotz Nachresektion nicht möglich ist, es sich um ein inflammatorisches Mammakarzinom handelt, eine Kontraindikation zur Nachbestrahlung besteht oder die Patientin dies ausdrücklich wünscht. Ebenso wird bei ungünstigem Brust-Tumor-Verhältnis oder multizentrischen Tumoren die komplette Brust reseziert. Das Lymphknoten-Staging, das bei klinisch unauffälligen Lymphknoten durch eine histologische Untersuchung des Wächterlymphknotens erfolgt, ist Bestandteil der operativen Therapie.

Eine Bestrahlung ist immer nach brusterhaltender Operation eines invasiven Karzinoms indiziert. Nach einer Mastektomie wird ebenfalls bestrahlt, wenn der Tumor fortgeschritten ist (pT4 bzw. pT3pN0R0 G3), nicht vollständig reseziert werden konnte (R1/R2) oder mehr als drei axilläre Lymphknoten befallen sind.

Zur Entscheidung über Art und Weise der adjuvanten Chemotherapie werden verschiedene Faktoren hinzugezogen. Dazu zählen der TNM-Status, das Grading, der Hormonrezeptorstatus (ER/PR), der Her2-Status, der Menopausenstatus und das Alter der Frau. Besteht die Indikation zur systemischen Therapie wird diese meist als neoadjuvante Therapie durchgeführt. Indikationen für eine systemische Chemotherapie sind endokrin nicht-sensitive Tumore (ER-/PR-, TN-Tumoren), Her2-positive Tumore und Luminal B-Tumore mit hohem Rezidivrisiko (G3, hoher Ki67, junges Alter, Lymphknotenbefall). Standardmäßig wird für 18-24 Wochen mit einem Taxan und einem Anthrazyklin behandelt. Hormonrezeptor-positive Tumore werden zusätzlich mit dem Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen, der die Hormonwirkung am Brustdrüsengewebe antagonisiert, für mindestens fünf Jahre behandelt. Eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab für ein Jahr ist bei Her2-positiven Tumoren indiziert. Im Anschluss an die Therapie erfolgt die regelmäßige Nachsorge der Patientin über einen Zeitraum von zehn Jahren. (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2021)

1.1.4 Prognose des invasiven Mammakarzinoms

Die Prognose einer Brustkrebspatientin hängt von verschiedenen Faktoren ab. Von Bedeutung sind zunächst auch patientenbezogene Eigenschaften wie das Erkrankungsalter. Verglichen mit

Patientinnen, die im Alter von 50-69 Jahren erkrankten, war die Überlebensrate bei Patientinnen der Altersgruppe der 20-35-Jährigen signifikant niedriger (Fredholm et al., 2009). Junge Erkrankte werden öfter erst in einem späteren Stadium diagnostiziert und haben oft aggressivere ER-negative Tumore (Anders et al., 2008; Fredholm et al., 2009). Auch die Gruppe der älteren Patienten (>65 Jahre) besitzt eine höhere Mortalität, da auch hier die Tumore meist schon fortgeschritten sind und die Erkrankten oft eine hohe Komorbidität aufweisen (Bastiaannet et al., 2010).

Der molekulare Subtyp hat ebenso prognostische Bedeutung. Luminal A Tumore sind mit der besten Prognose assoziiert. Her2 positive Tumore gehen mit einem erhöhten Risiko für ein Lokalrezidiv einher. Das Outcome kann aber mittlerweile durch eine zielgerichtete Antikörpertherapie mit Trastuzumab deutlich verbessert werden. Die schlechteste Prognose haben TN-Tumore. Sie sind ebenfalls mit einem höheren Risiko für ein Lokalrezidiv und Fernmetastasen assoziiert. Ein Rückfall dieser Subgruppe findet am häufigsten innerhalb von 1-3 Jahren nach Erstdiagnose statt (Fragomeni et al., 2018; Howlader et al., 2018). In einer Auswertung von Daten des SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results)-Krebsregisters ergaben sich für die molekularen Subtypen die folgenden 4-Jahres-Überlebensraten: Luminal A 92,5 %, Luminal B 90,3 %, Her2 positiv 82,7 % und triple negativ 77,0 %. Der wichtigste Faktor für das Überleben scheint aber das UICC-Stadium bei Erstdiagnose zu sein. Je weiter fortgeschritten das Stadium, desto geringer war die Überlebensrate aller molekularer Subtypen (Howlader et al., 2018).

1.2 Metastasierung von Brusttumoren

Mit dem Auftreten einer Fernmetastase, also der Versprengung von Tumorgewebe in ein entferntes Organ, befindet sich ein Brustkrebspatient nach der UICC-Klassifikation im finalen Stadium IV der Erkrankung, denn die meisten Patienten sterben an ihren Metastasen und nicht am Primärtumor (Steeg, 2006). Die Metastasierung ist das Ende einer langen Entwicklungskaskade, in der es zunächst zu einer Invasion von Tumorzellen in das umgebende Gewebe des Tumors kommt. In einem weiteren Schritt finden die Tumorzellen Anschluss an ein Blut- oder Lymphgefäß, wodurch ihnen eine systemische Verbreitung im Körper ermöglicht wird. Die Zellen können sich als zirkulierende Tumorzellen (CTC) eine Zeit lang im Blutstrom aufhalten, wo sie den mechanischen Kräften des Blutstroms standhalten und sich gegen das Immunsystem behaupten müssen. Anschließend können sie das Gefäß wieder verlassen, um sich in einem entfernten Organ anzusiedeln (Valastyan and Weinberg, 2011). Man kann beobachten, dass verschiedene Tumorarten Metastasen in jeweils spezifischen Organen

ausbilden (Fidler, 2003). Die bevorzugten Orte einer Metastasierung von Brusttumoren sind in absteigender Reihenfolge das Knochenmark, die Lunge und die Leber. (Weigelt et al., 2005; Wu et al., 2017).

1.2.1 Modelle der Entwicklung von Metastasen

Es existieren zwei Modelle, die die Entwicklung von Metastasen beschreiben (Klein, 2009). In dem auf Leslie Fould beruhenden Modell der linearen Progression stellt die Metastasierung den letzten Schritt der Tumorigenese dar. Entsprechend dieser Annahme entwickeln sich Tumorzellen innerhalb des Primärtumors und durchlaufen eine Reihe von Mutationen, die zu einer Überexpression von Onkogenen und der Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen führen, bis sie ihre volle Malignität erreicht haben (G Klein, 1998). Fearon und Vogelstein beschrieben 1990 durch Beobachtung des kolorektalen Karzinoms, wie in einem linearen Verlauf aus normalem Epithel zunächst ein gutartiges Adenom entsteht, das sich dann zu einem Karzinom weiterentwickelt. Sie stellten fest, dass für eine maligne Entartung vier bis fünf Gene mutiert sein müssen. Die Mutationen häufen sich im Laufe der Zeit in den Adenomzellen an, bis sich die, zur ungehemmten Proliferation fähigen Zellen durch klonale Expansion vermehren (Fearon and Vogelstein, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass der Primärtumor aus sehr heterogenen Zellen besteht, darunter auch Zellvarianten, die das Potenzial haben, Metastasen auszubilden (Fidler and Kripke, 1977). Das Modell der linearen Progression wird auch von der Beobachtung gestützt, dass es eine positive Korrelation zwischen Tumorgröße und der Entstehung von Metastasen gibt (Koscielny et al., 1984).

Einige Beobachtungen sind jedoch nicht mit diesem Modell vereinbar. So können sich Metastasen entwickeln, ohne dass ein primärer Tumor vorhanden sein muss. Die Patienten leiden unter Metastasen, vornehmlich in Leber, Lunge, Pleura oder den Lymphknoten. Ein Primärtumor ist aber durch klinische, laborchemische und bildgeberische Untersuchungen nicht identifizierbar. Man spricht in diesen Fällen von einem CUP-Syndrom („Cancer of unknown primary“). Etwa 4 % der neuen Krebsdiagnosen fallen darunter, die Prognose ist mit einem medianen Überleben von 11 Wochen und einer Ein-Jahres-Überlebensrate von etwa 15 % sehr schlecht (van de Wouw et al., 2002). Hüsemann et al. beobachteten in Brustkrebs-Mausmodellen, dass bereits im sehr frühen, noch benignen Stadium der atypischen duktaalen Hyperplasie disseminierte Tumorzellen (DCC) im Knochenmark detektiert werden können. DCCs besitzen das Potential sich weiterzuentwickeln und zu Metastasen auszuwachsen. Denn eine Resektion der kompletten Milchleiste der Mäuse konnte weder die Metastasenbildung verhindern, noch die Anzahl der Lungenmetastasen verringern. Sie konnten ebenfalls zeigen,

dass das Metastasenwachstum bereits beginnt, wenn der primäre Tumor von einem nicht-invasiven Zustand (CIS) in einen invasiven Zustand übergeht, was bedeutet, dass die DCCs schon sehr früh die primäre Läsion verlassen müssen. Interessant ist ebenfalls, dass Hüsemann et al. keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl an gefundenen DCCs, bzw. deren Genotyp und der Tumorgröße finden konnten. Die Fähigkeit zur metastasierenden Streuung der Tumorzellen ist also nicht auf eine Selektion im Primärtumor zurückzuführen, sondern eher eine Folge der Entwicklung an einem entfernten Ort, wie dem Knochenmark (Hüsemann et al., 2008). Die DCCs von Brustkrebspatienten zeigen deutlich weniger, dafür im Vergleich zum Primärtumor andere, auch sehr heterogene, genetische Aberrationen. Das lässt den Schluss zu, dass die gestreuten Zellen den Tumor früh verlassen haben und sich dafür parallel in der neuen Umgebung weiterentwickelten (Schmidt-Kittler et al., 2003). Diese Beobachtungen sprechen für das von Klein beschriebene Modell der parallelen Tumorprogression. Es wird davon ausgegangen, dass die ersten Tumorzellen schon sehr früh die primäre Läsion verlassen, nämlich wenn der Tumordurchmesser gerade einmal 1-4 mm aufweist. Die DCCs sind zu diesem Zeitpunkt noch unreif und haben noch nicht ihre volle Malignität erlangt. Sie gelangen über die Blutbahn in Lymphknoten und das Knochenmark, wo sie sich an die lokale Umgebung angepasst, parallel zum Primärtumor weiterentwickeln (Klein, 2009, 2013).

1.2.2 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatienten

Disseminierte Zellen sind gestreute Tumorzellen, die sich in einer Nische wie beispielsweise dem Knochenmark niedergelassen haben und dort in der Lage sind, eine systemische Therapie zu überdauern. Nach Abschluss der empirischen (neo-)adjuvanten Chemotherapie bestehen keine Möglichkeiten, die Erkrankung weiter zu therapieren, bis zur Entstehung von Metastasen. Auch entziehen sich die DCCs adäquater Möglichkeiten der Progresskontrolle. Man spricht von einer minimalen Resterkrankung, da sich auch nach Jahren der Symptombefreiheit eine Metastase entwickeln kann (Aguirre-Ghiso, 2007; Paez et al., 2012). Wie Ring et al. postulieren, könnten die zunehmenden Überlebensraten durch eine Eskalation der adjuvanten Therapie hinderlich in Bezug auf die Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen der minimalen Resterkrankung gewesen sein (Ring et al., 2022). Nach Braun et al. können bei 30-40 % der Brustkrebspatienten Mikrometastasen im Knochenmark gefunden werden. Die Anzahl der DCCs steigt auch mit dem Tumorstadium: Im Stadium I konnten Braun und Kollegen im Mittel fünf DCCs in 2×10^6 Knochenmarkszellen finden, im Stadium II neun DCCs und im Stadium III sogar 86 in 2×10^6 Zellen (Braun et al., 2000). Das krankheitsfreie Überleben und damit auch die generelle Überlebenswahrscheinlichkeit ist bei diesen Patienten geringer. Es besteht eine

signifikante Assoziation zwischen dem Vorhandensein von DCCs im Knochenmark und dem Auftreten von Fernmetastasen. 25 % der Patienten mit DCCs im Knochenmark starben an Brustkrebs, jedoch nur 6 % der Patienten ohne (Braun et al., 2000, 2005). Eine Theorie, die das Überleben der DCCs im Knochenmark erklärt, ist die Theorie der „schlafenden“ Tumorzellen. Hier spielt die Interaktion der Tumorzelle mit der Mikro-Umgebung eine Rolle. In dieser Balance verweilen die Zellen, bis sie in einen proliferativen Zustand übergehen, der die Bildung von Metastasen initiieren kann (Sosa et al., 2014).

1.2.3 Genomische Charakteristika disseminierter Tumorzellen

Die Disseminierung von Krebszellen beginnt in einem frühen Stadium, wie beispielsweise im Rahmen des Carcinoma in situ, in dem noch kein invasives Wachstum stattfindet. Eine hohe Gendiversität für diese gestreuten Zellen ist nachgewiesen (Klein, 2013). Dennoch zeigen gestreute Zellen, die von verschiedenen Microenvironments isoliert wurden, unterschiedliche, aber für die Umgebung charakteristische chromosomale Aberrationen (Klein et al., 2002; Stoecklein et al., 2008).

Schmidt-Kittler et al. konnten zeigen, dass gestreute Tumorzellen in einem frühen Stadium (M0-DCC) signifikant weniger chromosomale Aberrationen aufweisen als DCCs, die in einem bereits metastasierten Stadium isoliert wurden (M1-DCC). Es konnten auch hier jeweils charakteristische Aberrationen gefunden werden. M1-DCCs zeigten gehäuft Amplifikationen in 1q, 8q, 16p, 17q, 20q und Genverluste in 6q, 13q, 14q, 16q, 18q, 8p, 17p. M0-DCCs zeigten hingegen nur vermehrt Amplifikationen in 5cen-5q23.3 und 18q. Davon abgeleitete Berechnungen erlauben, lediglich anhand der Untersuchung einer einzelnen gestreuten Tumorzelle, mit einer Genauigkeit von 85 % das Tumorstadium (M0, M1) vorherzusagen (Schmidt-Kittler et al., 2003). In einem frühen Stadium finden sich DCCs mit sehr heterogenen Aberrationen. Sobald sich aber eine Metastase entwickelt hat, zeigen die gefundenen DCC sehr ähnliche Genome. Es wird angenommen, dass M0-DCCs in der Lage sind, sich durch eine einschneidende evolutionäre Veränderung zu M1-DCCs weiterzuentwickeln. Dieser Übergang mag eine Hürde darstellen, die überwunden werden muss, um das Wachstum von Metastasen zu initiieren (Klein, 2013; Klein et al., 2002).

1.3 Ziel der Dissertation

Disseminierte Tumorzellen spielen eine entscheidende Rolle im Krankheitsverlauf von Brustkrebserkrankungen. Sie haben Einfluss auf die Prognose, das krankheitsfreie und allgemeine Überleben der Patienten. Doch die Frage, wie sich die DCCs im langen Zeitraum der minimalen Resterkrankung entwickeln, ist noch weitgehend ungeklärt. In dieser Arbeit

werden Cytokeratin-positive Zellen aus dem Knochenmark von M0-Brustkrebspatientinnen zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert und als Einzelzelle sequenziert. Cytokeratine sind spezifisch für Epithelzellen und markieren daher im Knochenmark disseminierte Tumorzellen. Es wird versucht, einen Eindruck der Krankheitsprogression der minimalen Resterkrankung zu bekommen, um die Zeit zwischen adjuvanter Therapie und Entwicklung von Metastasen besser zu verstehen. Denn noch existieren keine Therapieansätze, die die Ursache von Metastasen nach der adjuvanten Chemotherapie angreifen, auch weil die Entwicklung der DCCs noch nicht ausreichend verstanden ist. Hier wird die genomische Progression von DCCs im Laufe der Erkrankung der Patientinnen nach adjuvanter Therapie beleuchtet und versucht, mögliche Unterschiede in bestimmten Subgruppen aufzuzeigen.

2. Material und Methoden

2.1 Kohorte und Probenmaterial

2.1.1 Kooperationen

Die Knochenmarksproben wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München in Kooperation mit Prof. Dr. Nadia Harbeck.

2.1.2 Probenmaterial

Als Probenmaterial standen bei -20 °C gelagerte Cytopspins zu Verfügung, die Zellmaterial aus dem Knochenmark (KM) von insgesamt 60 Mammakarzinompatientinnen tragen, das jeweils zu verschiedenen Zeiten während des Krankheitsverlaufs aus dem oberen Beckenkamm entnommen wurde. Die Patienten wurden an der Frauenklinik der LMU in der Maistraße in München für eine Studie zum Einsatz von Bisphosphonaten bei Brustkrebspatienten mit isolierten Tumorzellen rekrutiert und willigten ein, bei Follow-up Untersuchungen eine Knochenmarkspunktion durchführen zu lassen (Rack et al., 2010). Das Material wurde im Zeitraum von 2000 bis 2013 gewonnen. Eingeschlossen wurden Patientinnen mit einem primären Brusttumor in den Stadien pT1-4 pN0-3 M0 und nachgewiesenen disseminierten Tumorzellen im Knochenmark.

2.1.3 Ethikvotum

Von allen Patientinnen lag eine informierte Einwilligung und eine Zustimmung des Ethik-Komitees der Universität Regensburg zur Aufbereitung und Analyse der Knochenmarksproben vor (Ethikvotum Nr. 07/79). Alle Experimente wurden entsprechend der Prinzipien der WMA Declaration of Helsinki gestaltet.

2.2 Methoden

2.2.1 Einzelzellisolation und Genomamplifikation

Für die Isolation von CK-positiven DCCs von Cytospins sind, wie bereits beschrieben (Ghosh, 2021), mehrere Arbeitsschritte notwendig. Die einzelnen Schritte von Färbung, Screening, Lasermikrodissektion und Isolation der Zelle am Mikromanipulator sind in Abb. 2.1 schematisch dargestellt.

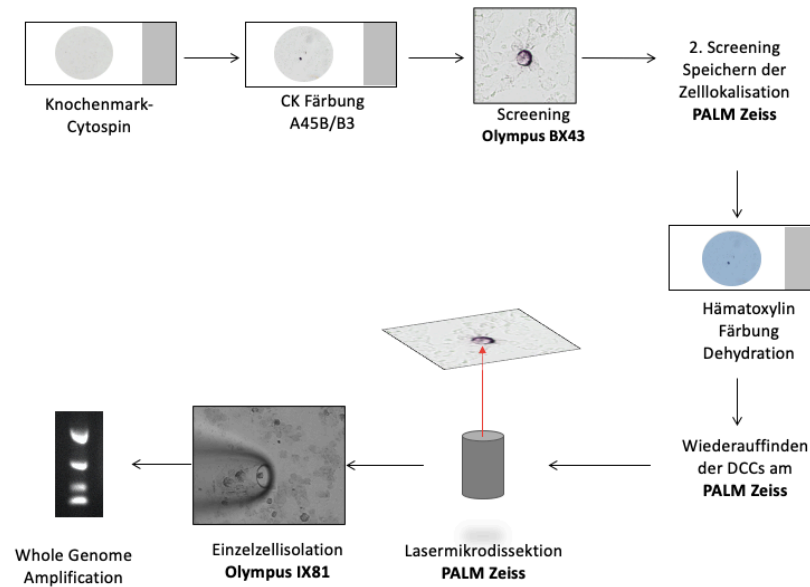


Abb. 2.1: Workflow der CK-positiven Einzelzellisolation

2.2.1.1 Verarbeitung der Knochenmarksproben

Aufgearbeitet wurden die Knochenmarksproben in München nach dem bereits publizierten Protokoll (Braun et al., 2000). Dabei erfolgte die Aspiration von Knochenmark aus beiden vorderen Knochenmarkskämmen unter Allgemeinanästhesie. Bei der Herstellung der Cytospins wurden, wie in der Publikation beschrieben, eine Million, mithilfe des Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten (Dichte 1.077 g/mol) angereicherte mononukleäre Zellen als Suspension auf den Objektträger gegeben und anschließend zentrifugiert. Dadurch entstand ein dichter Zellrasen, der die im folgenden beschriebenen Schritte notwendig machte, um eine Einzelzelle zu isolieren.

2.2.1.2 Immunhistochemische Färbung

Cytokeratin-Färbung

Die Cytospins wurden zunächst, wie bereits beschrieben (Klein et al., 2002), immunhistochemisch mit dem Antikörper A45B/B3 (mouse anti-human) gefärbt, der an die Oberflächenproteine CK 8, 18 und 19 bindet. Dazu wurden die gefrorenen Objektträger für 10 min bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit 10 % AB-Serum/PBS 30 min geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Der Antikörper wurde 1:100 mit 10 % AB-Serum/PBS verdünnt und 200 µl der Lösung auf jede Auftragsfläche gegeben. Nach der 60-minütigen Inkubation folgte nach einem Waschschriff (jeweils drei Minuten in frischer PBS-Lösung) eine weitere Inkubation mit einem AP-Polymer (anti-mouse), 1:10 verdünnt mit 10 % AB-Serum/PBS, für 30 min. Nach einem weiteren Waschschriff wurde zuletzt mit BCIP/NBT, das als Substrat für die an das Polymer gebundene Alkalische Phosphatase (AP) dient, für 12 min entwickelt. Es bildete sich ein bläulicher Niederschlag auf der Zelloberfläche der CK-positiven Zellen. Als Positivkontrolle diente jeweils ein Objektträger mit MCF7-Zellen in PBL oder reine MCF10a-Zellen. Es erfolgte eine Isotypkontrolle mit dem monoklonalen Maus-Antikörper gegen Myelomzellen MOPC21 als Negativkontrolle. Da die initiale Isotypkontrolle der Patientinnen-Kohorte negativ war, konnte auf eine Wiederholung der Kontrolle verzichtet werden. Zudem konnten so die Ressourcen der nur begrenzt zur Verfügung stehenden Cytospins geschont werden. Das Screening auf CK-positive Zellen erfolgte mit dem Mikroskop Olympus BX43. Es wurden zu jedem Zeitpunkt der KM-Punktion zwischen 2×10^6 und 4×10^6 Zellen gescreent. Dazu wurde jeweils ein Tropfen PBS auf die Zellschicht gegeben, mit einem Deckglas versehen und der Objektträger anschließend systematisch nach gefärbten Zellen im Hellfeld gemustert.

Kontrollzellfärbung

Für die Färbung der Kontrollzellen wurde ein monoklonaler mouse anti-human CD68 Antikörper verwendet. Dieser wurde 1:250 mit 10 % AB-Serum/PBS verdünnt und die Objektträger 60 min inkubiert. Entwickelt wurde im Anschluss ebenfalls mit einem AP-Polymer (α -mouse) für 30 min und BCIP/NBT für 12 min.

2.2.1.3 Einzelzellisolation

Lasermikrodissektion

Um die CK-positiven Zellen als Einzelzelle isolieren zu können, mussten zunächst benachbarte Zellen entfernt werden, um eine Kontamination mit Fremd-DNA zu verhindern.

Dies erfolgte mit dem Zeiss PALM MikroBeam System, wie in der Dissertation von Manjusha Ghosh beschrieben (Ghosh, 2021). Nach dem Screening der OTs mussten die CK positiven Zellen am Zeiss Mikroskop erneut gefunden werden. Dort ermöglichte die PALM Robo Software eine Speicherung der Lokalisation der Zellen, sodass sie nach den nächsten vorbereitenden Schritten (HE-Färbung, Dehydrierung und Fixierung) schnell wiedergefunden werden konnten. Vor dem Laser wurden die Zellen dann mit 500 µl Mayer's Hämatoxylin (HE) für zwei Minuten gefärbt und anschließend in PBS in einer Küvette zum Nachdunkeln für 30 min in den Kühlschrank (4 °C) gegeben.

In -20 °C kalten Ethanollösungen (70 %, 90 %, 100 %) wurden die Objektträger jeweils 5 sec dehydriert und abschließend 5 sec lang in Aceton (-20 °C) fixiert. Die Zellen konnten durch die gespeicherte Lokalisation leicht wiedergefunden werden. Die Umgebung der Tumorzelle wurde großzügig mit dem Laser bei einer Vergrößerung von 40x abladiert.

Die Isolation selbst erfolgte am Olympus IX81 durch den Patchman NP2 Mikromanipulator und die CellTram Pumpe, wie beschrieben (Klein et al., 1999). Hierfür wurden die Objektträger erst in PBS rehydriert und für 5 min mit 85 µl einer Rehydrationslösung (siehe unten) inkubiert. Die Zellen wurden mit einer, im Durchmesser 30 µm großen, Glaskapillare vom Objektträger gelöst, aspiriert und in ein separates mit BSA beschichtetes sogenanntes Pickfeld eines 8-Kammer Slides übertragen. Dort wurde die Zelle manuell mit einer Mikropipette in 1 µl PBS in ein 0,2 ml Tube mit 2 µl Proteinkinase-Verdau-Lösung überführt. Als Negativkontrolle diente 1 µl PBS, als Positivkontrolle ein Zellpool in 1 µl PBS. Alle Mengenangaben beziehen sich jeweils auf einen Reaktionsansatz, bzw. bei der Rehydrationslösung auf einen Objektträger (OT).

	Proteinkinase –Verdau (µl)	Rehydrationslösung (µl)
OPA 10x	0,2	10
Tween 10%	0,13	2,6
Igepal 10%	0,13	2,6
Proteinkinase K 10 mg/ml	0,26	-
H ₂ O dest	1,28	69,6

Die Tubes wurden über Nacht im Thermocycler für 15 Stunden bei 42,0 °C inkubiert. Dabei wird die Zellmembran durch die Proteinase K lysiert, um die genomische DNA freizulegen. Das Enzym wurde im Anschluss bei 80 °C für 10 min inaktiviert.

2.2.1.4 Whole Genome Amplification

Die nächsten Schritte der Whole Genome Amplification (WGA) dienen dem Zweck, das globale Genom der Einzelzelle zu amplifizieren. Die Methode wurde bereits publiziert (Klein et al., 1999; Stoecklein et al., 2002) und ist als Ampli1™ WGA Kit zu erwerben.

Die Typ II Restriktionsendonuklease MseI schneidet die freigelegte DNA innerhalb der Sequenz 5' T↓TAA 3', zwischen den beiden Thyminbasen. So entstehen reproduzierbare, nicht zufällige DNA-Fragmente verschiedener Längen, deren 'sticky end' kompatibel mit dem 5'-Überhang der im nächsten Schritt synthetisierten Primer-Komplexe ist.

	MseI-Verdau (µl)
OPA 10x	0,2
MseI (50.000 U/µl)	0,2
H ₂ O dest	1,6

In jedes Reaktionstube wurden 2 µl des MseI-Verdau-Ansatzes zugegeben und für 3 Stunden im Cycler bei 37,0 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms fand bei 65,0 °C für 5 min statt. Der PCR-Adaptor besteht aus einem Dideoxyoligonukleotid (ddMSE11) und einem Primer für die globale Amplifikation (Lib1).

	Preannealing (µl)
OPA 10x	0,5
Lib1 100 µM	0,5
ddMSE11 100 µM	0,5
H ₂ O dest.	1,5

Durch langsames Abkühlen des Reaktionsgemisches von 65 °C auf 15 °C (1 °C pro Minute) können die beiden Oligonukleotide durch Basenpaarung einen doppelsträngigen Adaptor-Komplex bilden.

Die Ligation des Adaptors an die DNA-Fragmente erfolgte bei 15 °C über Nacht. Dazu wurden zu der Preannealing-Reaktionslösung noch jeweils 1 µl ATP (10 mM) und 1 µl T4-Ligase (hochkonzentriert) hinzugefügt und davon 5 µl jedem Einzelzell-Reaktionsansatz zugegeben. Im Anschluss folgte die primäre Amplifikation der DNA-Fragmente.

40 µl des folgenden Ansatzes wurden jedem Reaktionstube beigelegt.

	Primäre PCR (µl)
Expand Long Template Puffer 1	3
dNTPs (10 mM)	2
PolMix	1
H ₂ O dest.	34

Zunächst wird die dsDNA (ddMSE) bei 68 °C für 3 min denaturiert, dann folgen PCR-Zyklen verschiedener Länge und Temperatur im Rahmen derer die Einzelstränge aufgefüllt werden.

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	68,0 °C	3 min	
2	94,0 °C	40 sec	
3	57,0 °C	30 sec	
4	68,0 °C	1:30 min	Verlängert um 1 s/Zyklus
5			Zurück zu 2, 14 mal
6	94,0 °C	40 sec	
7	57,0 °C	30 sec	Erhöht um 1,0 °C/Zyklus
8	68,0 °C	1:45 min	Erweitert um 1s/Zyklus
9			Zurück zu 6, 8 mal
10	94,0 °C	40 sec	
11	65,0 °C	30 sec	
12	68,0 °C	1:53 min	Verlängert um 1 s/Zyklus
13			Zurück zu 10, 22 mal
14	68,0 °C	3:40 min	
15	4,0 °C	unendlich	

2.2.1.5 Qualitäts-Kontroll (QC)-PCR

Um die Qualität der DNA der isolierten Zellen zu beurteilen, wird der Genome Integrity Index (GII) bestimmt. Hierzu wird eine Multiplex-PCR mit vier Primerpaaren durchgeführt, die vier DNA-Teilsequenzen (CK19, TP53 Ex2/3, D5S2117 und KRAS) auf vier verschiedenen langen Mse-Fragmenten amplifizieren sollen. Die KRAS-Sequenz liegt dabei auf dem kürzesten der vier Fragmente. Wie beschrieben (Polzer et al., 2014), korreliert das Vorhandensein der langen Mse-Fragmente mit einer erfolgreichen microarray-based comparative genomic hybridization (mCGH) und somit einer guten DNA-Qualität. Jeder Probe wird ein Wert zwischen null und vier zugeschrieben, abhängig davon, wie viele der vier Mse-Fragmente vervielfältigt werden konnten.

Für die Multiplex-PCR wurden zu 9 µl des PCR-Mastermix 1 µl der WGA-Probe gegeben.

	Multiplex PCR (µl)
PCR Reaktions-Puffer (mit 20 mM MgCl ₂)	1
dNTPs (FastStart kit)	0,2
Multiplex-Primer	1
BSA (20 mg/ml)	0,2
FastStart Taq Polymerase (5U/µl)	0,1
H ₂ O dest.	6,5

Im Anschluss wurden die vier Mse-Fragmente in folgendem Cyclerprogramm amplifiziert.

Der Multiplex-Primer besteht aus einem Primergemisch und destilliertem H₂O wie in 2.3 unter „Puffer und Lösungen“ gelistet.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95 °C	4 min
2	95 °C	30 sec
3	58 °C	30 sec
4	72 °C	1:30 sec
5	Zurück zu Schritt 2, 32 mal	
6	72 °C	7 min
7	4 °C	unendlich

2.2.1.6 Gelelektrophorese

Um die Fragmente sichtbar zu machen, wurden die Proben mit der amplifizierten DNA auf ein 1,5 %-Agarose-Gel aufgetragen.

Für das Gel wurden 1,5 g Agarose abgewogen und in 100 ml TBE-Puffer in einer Mikrowelle gekocht, bis sich das Pulver vollständig gelöst hat. Die Lösung wurde dann mit 5 µl Ethidiumbromid (EtBr) vermischt, das zwischen den Basen der DNA interkaliert. Das flüssige Gel wurde in die Gelkammer gegossen und nach der Aushärtung mit einem Marker (2log ladder) und den Proben, denen noch 3 µl Ladepuffer (Dye) beigelegt wurden, geladen. Bei 160 V und 400 mA wurden die Fragmente für 45 min nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Gelbanden wurden im UV-Illuminator von Intas sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.2 Bestimmung von CNVs

2.2.2.1 Reamplifikation

Um die Menge der WGA-Fragmente und damit die DNA-Konzentration zu erhöhen, wurden die Proben vor Beginn der Library-Präparation zur Sequenzierung einer Reamplifizierung unterzogen. Dazu wurden 49 µl des Mastermixes in ein 200 µl Tube pipettiert und 1 µl der WGA-Probe hinzugegeben.

	Mastermix (µl)
PCR Reaktions-Puffer (mit 20mM MgCl ₂)	5,00
Lib1 (10 µM)	5,00
dNTPs (10 mM)	1,75
BSA (Roche)	1,25
Pol. Mix	0,50
PCR-H ₂ O	35,50

Die Probe wurde im Anschluss gemäß folgendem Cycloprogramm reamplifiziert.

	Temperatur	Zeit
1	94 °C	1 min
2	60 °C	30 sec
3	68 °C	2 min
4	94 °C	30 sec
5	60 °C	30 sec
6	68 °C	2 min + 20 sec/Zyklus
7	Zurück zu 4, 8 mal	
8	4 °C	unendlich

2.2.2.2 Ampli1 LowPass Sequenzierung

Aufreinigung

Zur CNV-Sequenzierung wurde das „Ampli1™ LowPass Kit - Whole Genome Library preparation for Illumina® platforms“ benutzt. Zunächst wurden 5 µl der Ampli1™ WGA Probe mit 5 µl NGS-Wasser in ein 0,2 ml PCR-Tube gegeben und mit 18 µl SPRIselect Beads (1.8X) nach dem beigelegten Protokoll aufgereinigt. Zunächst inkubieren die magnetischen Beads bei Raumtemperatur für 5 min, während die DNA an die Beads bindet. Mit einem externen

Magneten kann hierdurch die DNA temporär an der Tubewand fixiert und so verbliebene verunreinigende PCR-Reagenzien mit dem Überstand abgenommen werden. Zudem erfolgt in diesem Schritt eine Größenselektion der DNA-Stränge. Es folgen zwei Waschschrte mit 80 %-igem Ethanol für 30 sec und eine Trocknung der Beads im Anschluss für 1-2 min. Zur weiteren Verarbeitung werden die aufgereinigten Produkte in 22 µl NGS-Wasser resuspendiert, 2 min außerhalb des Magneten inkubiert, wobei es zu einer Elution der Beads kommt. Nach erneuter Inkubation im Magneten mit Separation der Beads werden 20 µl des Überstandes abgenommen und in ein neues Tube gegeben.

Ampli1 LowPass Präparation

In zwei Schritten werden gemäß dem User Manual ein jeweils probenspezifischer Barcode zur Identifizierung der Probe mit Hilfe eines universellen Adaptors an das 5'- und 3'-Ende des WGA-Produktes angehängt. In der First Extension Reaktion wird die Probe mit dem Ampli1 D7xx Adapter und in der Second Extension Reaktion mit dem Ampli1 D5xx Adapter gekennzeichnet. Anschließend wird die Library in einem dritten Schritt amplifiziert. Zwischen den drei Schritten und nach der Amplifikation erfolgt jeweils ein Waschvorgang mit Hilfe der magnetischen Beads. Im letzten Waschschrte werden die Library-Produkte in 17 µl TE-Puffer resuspendiert und nach Separation der Beads 15 µl des Überstandes zur weiteren Sequenzierung in ein neues Tube gegeben.

Eine Quantifizierung der Library erfolgte mit dem Qubit Fluorometer 3.0 (Qubit™ dsDNA HS Assaykit von Invitrogen™) sowie dem Agilent 2100 Bioanalyzer (High Sensitivity DNA Kit), die jeweils nach Herstellerangaben verwendet wurden. Die Ober- und Untergrenzen der Bioanalyzer-Analyse wurden auf 300 bp und 3000 bp gesetzt.

Für einen Sequenzierungslauf wurden anschließend maximal 32 Library Proben für einen Miseq Run und maximal 96 Proben für einen Novaseq 6000 Run gepooled, sodass jede Probe in einer Konzentration von 4 nM im Pool vorlag. Im Anschluss wurde jede Zelle mit zwei Softwareprogrammen bearbeitet. Zur Darstellung der Streuung und Einschätzung der Qualität der Zelle wurde eine modifizierte Version der Control-FREEC (Control-Free Copy Number Caller) Software (Menarini Silicon Biosystems) verwendet. Die hier entstandenen Rohdaten enthalten unter anderem Informationen darüber, auf welchem Chromosom Aberrationen vorliegen, mit der Angabe des Start- und End-Basenpaares der Aberration. Außerdem wird für jede Zelle die Derivative Log Ratio Spread (DLRS) angegeben, die verwendet wurde, um die Qualität der untersuchten DNA einordnen zu können.

Die Daten wurden im Anschluss dem „HIENA: Automated CNV-Profile Workflow“ zugeführt, der eine Möglichkeit bietet, die Rohdaten zu filtern, Hintergrundgeräusche zu glätten und damit

die Detektion wahrer Aberrationen zu erleichtern. Der Workflow besteht aus einer Kombination bioinformatischer Tools, die aus den FASTQ-Files aufbereitete $\log_2(\text{ratio})$ -CNV-Profilen erstellen. Dabei werden die Adapter-Sequenzen an den Read-Enden gekürzt, non-humane Reads eliminiert und alignierte Duplikate entfernt. Für die Erstellung der CNV-Profilen wird das Genom in nicht-überlappende Bins mit einer Länge von 500 kb aufgeteilt und für jedes Bin die integer copy number angegeben (Jens Warfsmann et al., unveröffentlicht). Bei den $\log_2(\text{ratio})$ -Profilen entspricht eine copynumber von 3, also eine zusätzliche Kopie des jeweiligen Genabschnitts, dem x-Wert $\log_2(3/2) = 0,585$ (rote Markierung in den Profilen). Einer copynumber von 1, also dem Verlust einer ganzen Kopie, entspricht der x-Wert $\log_2(1/2) = -1$ (blaue Markierung in den Profilen). Mit dem Bioconductor package ACE 1.8.0 wurde die $\log_2(\text{ratio})$ in eine integer, also gerundete, copy number umgewandelt. Für jede Zelle wurde eine Tabelle erstellt, die in 500.000-Basenpaar-Schritten die gerundete copy number jedes Chromosoms angibt.

Dies dient als Grundlage für die Berechnung der Histogramme und dem Vergleich der aberranten Basenpaare (siehe 2.2.4.3).

2.2.3 Etablierung eines Protokolls für die Kontrollzellfärbung an bereits gefärbten Objektträgern

2.2.3.1 Herstellung von PBL-Objektträgern

Für die Testfärbungen zur Etablierung eines Färbeprotokolls für Kontrollzellen auf bereits CK-gefärbten Objektträgern wurden Testobjektträger mit Lymphozyten aus dem peripheren Blut (PBL) benötigt. Als Kontrollzellen wurden CD68-positive Makrophagen verwendet. Diese Zellen finden sich unter den mononukleären Zellen, die aus dem Blut gewonnen werden können.

Hierfür wurden zwei EDTA-Röhrchen Blut aus einer peripheren Vene entnommen. Dieses wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und mit Hanks-Lösung aufgefüllt. Anschließend wurde bei 4 °C und 200 g 10 min lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 15 ml Hanks resuspendiert und vorsichtig auf ein mit 15 ml 60 %- igem Percoll gefülltes neues Tube gegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C und 1000 g für 20 min wurde die Interphase, die sich gebildet hat und mononukleäre Zellen enthält, abgenommen und in ein 50 ml Tube überführt, mit Hanks aufgefüllt und weitere 10 min bei 4 °C und 500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde vom Überstand befreit, in etwas PBS aufgenommen, resuspendiert und in der Neubauer Zählkammer ausgezählt.

Ein Cytospin soll 30000 Zellen tragen. Die Zellsuspension wurde so verdünnt, dass sich 300000 Zellen in einem Milliliter befinden. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden in die Aufsatzöffnung der Schiffchen gegeben und die Cytospins mit 1000 rpm 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und die OTs wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend konnten die OTs bei -20 °C gelagert werden.

2.2.3.2 Hitzeinduzierte Antigendemaskierung

Um bereits CK-gefärbte OTs einer erneuten Färbung zugänglich zu machen, mussten diese einer hitzeinduzierten Antigendemaskierung unterzogen werden.

Dafür wurden die Objektträger für 7 min bei 80 °C in einem Heat-Induced Antigen Retrieval (HIAR)-Puffer inkubiert. Der Puffer besteht aus Sodium Citrate Tribasic Dihydrate (2,1 g in 100 ml destilliertem Wasser). Dieser wurde mit einer Lösung aus Citric Acid Monohydrate (2,9 g in 100 ml destilliertem Wasser) auf pH 6,4 gebracht. Die konzentrierte Pufferlösung wurde vor der Verwendung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und im Wasserbad auf 80 °C erhitzt.

Im Anschluss konnte der Objektträger wie in Punkt 2.2.1.2 erläutert gefärbt werden.

2.2.4 Statistik und Auswertung

2.2.4.1 Statistische Tests

Für den Vergleich der zentralen Tendenzen zweier unabhängiger Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Die statistischen Berechnungen sowie die Erstellung der Diagramme erfolgten in der frei zugänglichen Programmiersoftware R-Studio. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

2.2.4.2 Quantitative Auswertung aberranter CNV-Profile

Um verschiedene Subgruppen hinsichtlich der Anzahl ihrer Aberrationen vergleichen zu können, mussten diese quantifiziert werden. Hierfür wurden für jede Zelle manuell die aberranten Basenpaare addiert. Differenziert wurde zwischen Zugewinnen (integer copy number > 2) und Verlusten (integer copy number < 2). Die Daten wurden der Tabelle entnommen, die durch das ACE package generiert wurde. Die Daten wurden in einer neuen Exceltabelle zusammengeführt, mit R-Studio graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet.

2.2.4.3 Erstellung von Histogrammen mit Progenetix

Für eine Interpretation der Sequenzierungsergebnisse der Zellen und eine anschaulichere Darstellung der Daten erfolgte eine Bearbeitung mit dem öffentlich zugänglichen Auswertungstool Progenetix (Baudis and Cleary, 2001), das die Einzelzellen beliebiger Subgruppen zusammenführt und ein Häufigkeitsdiagramm der CNVs erstellt. Dazu wurden die Rohdaten aus dem ACE package für jede Zelle gesichtet und daraus die Aberrationen mit Angabe des Start- und Endbasenpaars jedes Chromosoms manuell zusammengetragen. Die Tabelle wurde im .tsv-Format auf der Progenetix-Internetseite zur Erstellung der Histogramme hochgeladen.

2.3 Materialien

Chemikalien

1 kb Plus DNA Ladder + Dye	New England Biolabs	N3200S
AB Serum, human	Bio Rad	805-135-MSDS
Aceton	VWR	20066.330 2,5l
Adenosintriphosphat 100 mM	Roche Diagnostics	111409665001
Agarose LE	Anprotec	AC-GN-00009
AP-Polymer anti-mouse	Zytomed Systems	ZUC077-100
AP-Polymer anti-rabbit	Zytomed Systems	ZUC031-006
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Sigma Aldrich	31146-500G
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich	B8667-5ml
Bovines Serumalbumin, 20 mg/ml (WGA)	Roche Diagnostics	10711454001
Citric acid monohydrate	EMSURE	1.00244.0500
dNTP Set 100 mM A, C, G, T 4x 24 µM	GE Healthcare	28-4065-51
EDTA	J.T Baker	B-1073.1000
Ethanol absolut (Dehydration) AnalaR NORMAPUR	VWR	20821.330 2,5l
Ethanol absolut Mol. Bio. Grade (NGS)	VWR	437433T
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Sigma Aldrich	E1510-10ML
Expand Long Template Buffer 1 mit 17,5 mM MgCl ₂ , 10x	Sigma-Aldrich	11759060001
Fetal Calf Serum SeraPlus	PAN Biotech	P30-3702
Hank's balanced salt solution 10x	Biochrom AG	L2045
Igepal CA-630 viscous liquid	Sigma Aldrich	I3021-50ml
Kaliumacetat	VWR	104820
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	1.04873.1000
Magnesiumacetat-Lösung 1M	Sigma-Aldrich	63052-100ML
Mayer's Hematoxylin	Sigma Aldrich	MHS16-500ML
Natriumhydrogenphosphat	Merck	1.06580.1000
NGS-Wasser (aqua ad injectabilia)	Braun	2351744
PCR Reaktions-Puffer mit 20 nM MgCl ₂ , 10x	Sigma Aldrich	4738420001
PCR-Wasser	VWR International GmbH	1.153.331.000
Percoll™	Thermo Fisher Scientific	17089101
Sodium Citrate Tribasic dihydrate	AppliChem	A2403,0500
SPRIselect Beads	Beckman Coulter	B23317
TE Puffer 1x ph 8.0 low EDTA	AppliChem	A8569,0500
Tris ultrapure for Biochemistry	AppliChem	A1086,1000
Trisacetat	Fluka	93297
Trypanblau	Sigma Aldrich	T8154-20ml

TWEEN® 20, for molecule biology, viscous liquid	Sigma Aldrich	P9416-50ml
Wasser, aqua ad iniectabilia (NGS)	Braun	2351744
Wasser, demineralisiert	Aus der Leitung	-

Puffer und Lösungen

BCIP/NBT	1 ml AP Color Development Puffer 24 ml demineralisiertes Wasser 250 µl Color Reagent A 250 µl Color Reagent B 250 µl Levamisol mit dem 45µm Spritzenvorsatzfilter reinigen
dNTPs 10 mM	10 µl dATP 100 µM 10 µl dCTP 100 µM 10 µl dGTP 100 µM 10 µl dTTP 100 µM 60 µl PCR-Wasser
Ethanol 70 %	70 ml Ethanol absolut 30 ml demineralisiertes Wasser
Ethanol 90 %	90 ml Ethanol absolut 10 ml demineralisiertes Wasser
Igepal 10 %	2 ml 100 % Igepal CA-630 18 ml PCR-Wasser
Levamisol	108 mg Levamisol (=Tetramizolhydrochlorid) 1 ml demineralisiertes Wasser
Multiplex-Primer	Jeweils 8 µl folgender Primer in 3' und 5' Richtung Exon 2/3 CK19 D5S2117 KRAS 136 µl PCR-Wasser
One Phor All Puffer (OPA), 10x	5 ml 1 M Trisacetat 5 ml 1 M Magnesiumacetat 1 ml 5 M Kaliumacetat Mit PCR-Wasser auf 1 L auffüllen Steril filtriert
PBS pH7,4 10x	450 g Natriumchlorid 71,65 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) 13,35 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) In 5 l demineralisiertem Wasser lösen
Percoll 100 %	100 ml Percoll™ 9 ml Hank's Lösung Steril filtriert
Percoll 60 %	30 ml Percoll 100 % 20 ml physiologische NaCl-Lösung
TBE-Puffer (Tris/Bor/EDTA)	539 g Tris 275 g Borsäure 37 g EDTA In 5 l demineralisiertem Wasser lösen
Tween 10 %	2 ml 100 % TWEEN® 20 18 ml PCR-Wasser

Enzyme

Proteinase K, rec. PCR grade Solution	Roche Diagnostics GmbH	3115828001
FastStart Taq Polymerase	Roche Diagnostics	4738420001
MseI, rekombinant, conc.; 2500U, 50000 U/μl	New England Biolabs	R0525M
Pol Mix 5 U/μl (Expand Long Template enzyme mix)	Roche Diagnostics	11759060001
T4 DNA Ligase, konz, 500U, 5U/μl	Roche	10799009001

Primer und Oligonukleotide

Name	Basensequenz 5'→3'	Annealing-temperatur	Fragmentlänge
CK 19 3'	TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG	58 °C	621 bp
CK19 5'	GAA GAT CCG CGA CTG GTA C	58 °C	621 bp
D5S2117 3'	ACT GTG TCC TCC AAC CAT GG	58 °C	140 bp
D5S2117 5'	CCA GGT GAG AAC CTA GTC AG	58 °C	140 bp
ddMSE11 100 μM	TAA CTG ACAG ddC	65 °C	-
KRAS 91bp 3'	CTG AAT TAG CTG TAT CGT CAA GG	58 °C	91 bp
KRAS 91bp 5'	ATA AGG CCT GCT GAA AAT GAC	58 °C	91 bp
Lib 1 100μM	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT	65 °C	-
TP53 Exon 2/3 3'	CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA	58 °C	301 bp
TP53 Exon 2/3 5'	GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC	58 °C	301 bp

Antikörper

A45B/B3, monoklonal mouse anti-human, 100 μg in 500 μl	AS Diagnostik	FAR002A
Anti CD3 Polyklonal, rabbit anti-human	Sigma Aldrich	C7930-.2ML
Anti CD68 Monoklonal, mouse anti-human	Dako	M0814

Verwendete kommerzielle Kits

AP Conjugate Substrate Kit (BCIP/NBT)	BioRad	170-6432
Amplii1™ LowPass Kit for Illumina (Set A und Set B)	Menarini Silicon Biosystems	WGLPAB
Bioanalyzer DNA High Sensitivity Kit	Agilent Technologies	5067-4626
Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics	11759060001 (Sigma Aldrich)
FastStart™ Taq, DNA Polymerase, dNTPack	Roche Diagnostics	4738381001 (Sigma Aldrich)
Qubit® dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32854

Verwendete Geräte

Färbekammer	peqlab	Gelelektrophorese
8-Kanal-Pipette	Gilson	LowPass
Accu-Jet Pipettierhilfe	CLN GmbH	Blutaufbereitung
Aluminiumblock für PCR Gefäße	Häberle Labortechnik	
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies	LowPass
CellTram Air Pumpe	Eppendorf	Einzelzellisolation
Erlenmeyer-Kolben 100 ml	Schott	HIAR
Gelkammer mit Tray und Kämmen	peqlab	Gelelektrophorese
Glas mit Schraubverschluss 100 ml	Schott	Dehydration

Glasküvette	Hartenstein	Immunfärbung
Glaspipette	Cellstar	HE-Färbung
Kunststoffküvette	Schubert & Weiss Omnilab	HIAR
Magnetrührer	VELP Scientifica	
Magnetständer für 0,2 ml Tubes	Nippon Genetics EUROPE	LowPass
Manuelle Pipetten (2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson	
Messzyliner 100 ml	Brand	Dehydration
Mikroskop CX23	Olympus	Zellen zählen
Mikroskop Olympus BX43F	Olympus	Screening
Mikroskop Olympus IX81	Olympus	Einzelzellisolation
Mikrowelle	Micromaxx	Gelelektrophorese
MiSeq	Illumina	LowPass
Nadelziehgerät DMZ Universal Puller	Zeitz	Einzelzellisolation
Neubauer Zählkammer	Brand	Herstellung von Cytospins
Palm Lasermikroskop	Axiovert 200 Zeiss	Lasermikrodissektion
Patchman NP2 Mikromanipulator	Eppendorf	Einzelzellisolation
PCR-Cycler	Genetouch	WGA
PCR-Cycler Lightcycler	Roche	QC PCR
PCR-Workstation UVT-S-AR	Kisker	PCR
pH-Meter PB-11	Sartorius	
Plattenzentrifuge 5430G	Eppendorf	LowPass Library
Power Supply	MP 250N	Gelelektrophorese
Präzisionswaage EtBr Raum	Kern	HIAR
Präzisionswaage EW420-3NM Färbelabor	Kern	Gelelektrophorese
Qubit 3.0 Fluorometer	Life Technologies	2321608396
Schiffchen für Cytos	Hettich	Herstellung von Cytospins
Sterilwerkbank HeraSafe KS18	Thermo Fisher Scientific	Blut aufbereiten
Sterilwerkbank HS18	Thermo	Blut aufbereitung
Tetrad PTC Cycler	MJ Research	DF004406
Tischzentrifuge PCV 2400	Brant bio	PCR
UV-Illuminator intas 6000	Intas	Gelelektrophorese
Vortexer	VELP Scientifica	LowPass
Wasserbad	Memmert	HIAR
Zentrifuge für Cytos	Hettich	Herstellung von Cytospins
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich	Blut aufbereiten
Zentrifuge Rotofix 32	Hettich	Herstellung von Cytospins

Verbrauchsgegenstände

45 µm Spritzenfilter	ROTH	P667.1
8-strip Tubes 0,2 ml	Biozym	710970
Deckgläser	Hartenstein GmbH	DK60
Lab-Tek Chamber Slides, 8 Well	Fisher Scientific	177402
Liquidblocker Stift	Science Service GmbH	N71312
Mikro-Hämatokrit-Kapillare, nicht hep.	Brand GmbH & Co KG	749321
Objektträger SuperFrost Plus	Langenbrinck	03-0060
Pasteurpipette 1 ml	Brand GmbH & Co KG	747720
PCR-Tube 0,2 ml	4titude	4ti-0795
PCR-Tube 0,2 ml low bind	Axygene	PCR-02D-L-C
PCR-Tube 1,5 ml	Greiner Bio-one GmbH	616201
Pipettenfilterspitzen SafeSeal SurePhob	Biozym	VT0200, VT0220, VT0240, VT0270
Pipettenspitzen	CLN GmbH	RT-2100600 und SDT-70.762.002
Safety-Multifly-Set	Sarstedt	85.1638.235
Spritze 50 ml	Beckton Dickinson	Immunfärbung
Zentrifugeneröhrchen 15 ml	Greiner Bio-one GmbH	188271
Zentrifugeneröhrchen 50 ml	Greiner Bio-one GmbH	227261

Software und Websites

2100 Expert Software Version B.02.09SIO725 (SR1)	Agilent Technologies	Bioanalyzer
CellSens Dimension 1.9	Olympus	Mikroskopie
Microsoft Word/Excel/Powerpoint 2019	Microsoft	Datenanalyse, Visualisierung
PubMed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov	Literatursuche
R base 3.6.3	R Foundation for Statistical Computing, 2016	Statistik
R Studio Version 1.2.5042	https://www.rstudio.com/	Statistik
Progenetix User data analysis	https://info.progenetix.org/uploader.html	CNV Häufigkeitsdiagramme
Palm RoboSoftware	Zeiss	Lasermikrodissektion

2.4 Abkürzungsverzeichnis

AB	Antikörperfreies humanes Serum der Blutgruppe AB
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate mit Nitroblue Tetrazolium
BMI	Body-Mass-Index
BP	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CIS	Carcinoma in situ
CK	Cytokeratin
CN	Copy Number
CNV	Copy Number Variation
CTC	Zirkulierende Tumorzelle
CUP	Cancer of unknown Primary
DCC	Disseminierte Tumorzelle
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DLRS	Derivative Log Ratio Spread
DNA	Desoxyribonuklein Acid

dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ER	Östrogenrezeptor
EtBr	Ethidiumbromid, 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	US Food and Drug Association
GII	Genome Integrity Index
HE	Hämatoxylin
Her2	human epidermal growth factor receptor 2
HIAR	Hitzeinduzierte Antigendemaskierung
HR	Hormonrezeptor
IGF	Insulin-like-growth-Faktor
KM	Knochenmark
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
LMD	Lasermikrodissektion
M0	Nicht-metastasiertes Tumorstadium
M1	Metastasiertes Tumorstadium
mCGH	microarray-based comparative genomic hybridization
MG	Mammographie
MRT	Magnetresonanztomographie
NGS	Next Generation Sequencing
OPA	One Phor All Buffer
OT	Objektträger
PBL	Periphere Blut Lymphozyten
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PR	Progesteronrezeptor
QC	Qualitätskontrolle
R0	Resektion im Gesunden
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TN	Triple Negative Tumors (PR ⁻ , ER ⁻ , Her2 ⁻)
TNM	Tumor-Node-Metastasis-System
UICC	Union for international Cancer Control
US	Ultraschalluntersuchung
WGA	Whole Genome Amplification

3. Ergebnisse

Um das Ziel der Arbeit, eine longitudinale Betrachtung molekulargenetischer Veränderungen von DCCs zu realisieren, bedarf es ausgereifter Methoden, die eine sichere Bestimmung und eine anschließende Isolation einer einzelnen Tumorzelle zulassen. Eine entsprechende Methode, die an die spezifischen Herausforderungen der Einzelzellisolation von archivierten Cytospins angepasst ist, wurde bereits publiziert (Ghosh, 2021). Der Einfluss des Lasers auf die DNA und damit auf die gefundenen Aberrationen spielt eine Rolle bei der Interpretation der Ergebnisse und der Etablierung einer geeigneten Kontrollzellgruppe. Der Einfluss des Lasers und die Auswahl der Kontrollzellen sind in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben. Um bei einer begrenzten Anzahl an Probenmaterial auch an ausreichend Kontrollzellen zu gelangen, wurde ein Protokoll zur Isolation von CD68+ Kontrollzellen (Makrophagen) von bereits gefärbten Cytospins etabliert (Kapitel 3.2.2.1). Das Schema in Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die Dissertation.

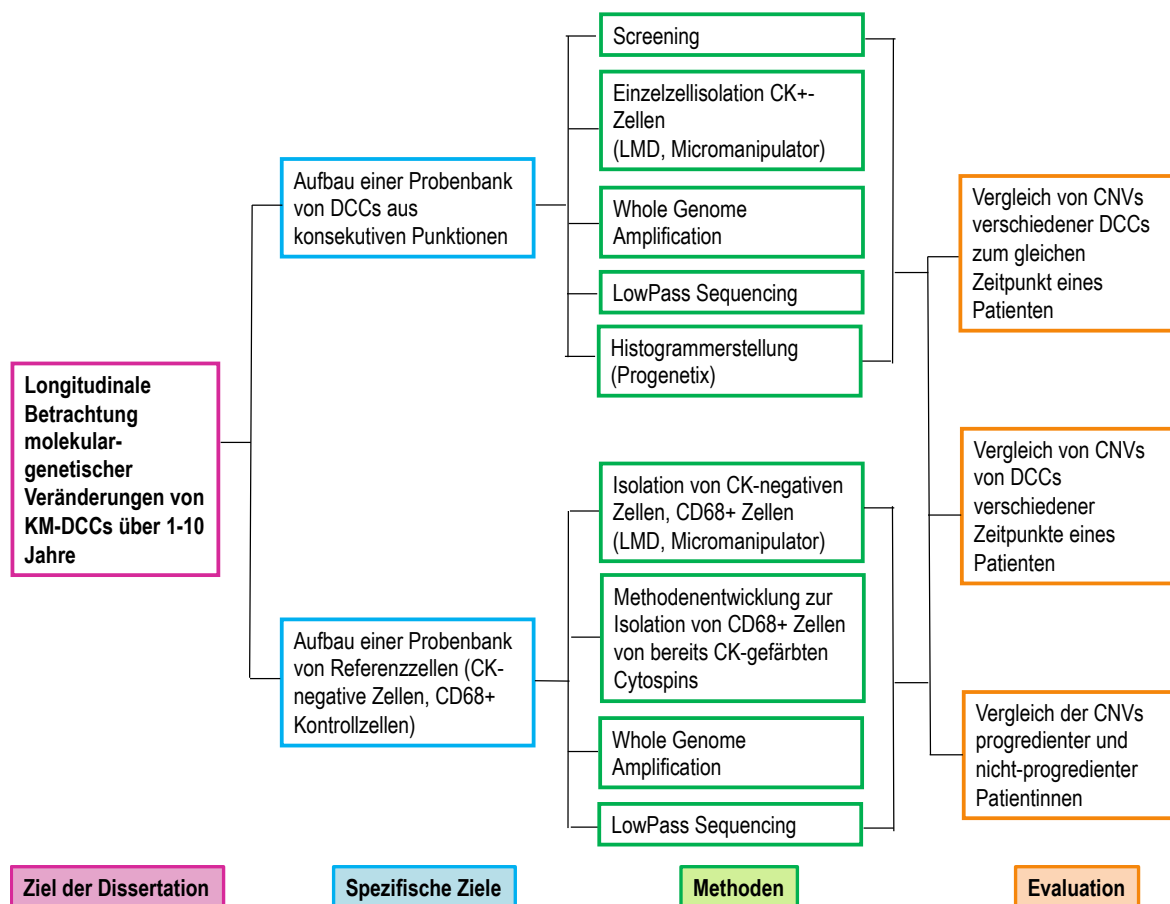


Abb. 3.1: Projektplan der Dissertation

3.1 Kohorte

Die Kohorte bestand aus 60 Patientinnen, die von der ehemaligen Frauenklinik in der Maistraße in München für eine Studie von Brigitte Rack zur Verwendung von Bisphosphonaten bei Brustkrebspatienten rekrutiert wurden (Rack et al., 2010). Die Patientinnen mussten sich in einem nicht-metastasierten Tumorstadium befinden und sechs Monate nach abgeschlossener Operation und adjuvanter Chemotherapie persistierende isolierte CK-positive Tumorzellen im Knochenmark aufweisen. Außerdem mussten sie sich mindestens zweimal einer Knochenmarkspunktion unterzogen haben. Sieben der 60 Patienten erlitten einen Rückfall bis zum letzten Follow-up im Jahre 2018. Von jeder Patientin wurden Cytospins mit mononukleären Zellen aus dem Knochenmark zu verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs zur Verfügung gestellt.

3.2 Methodische Ergebnisse

3.2.1 Etablierung einer geeigneten Kontrollzellgruppe

3.2.1.1 Mögliche Kontrollzellgruppen

Als Referenzgruppe der CK-positiven Tumorzellen kommen drei mögliche Zellgruppen in Frage (Tab. 3.1). Zum einen wurden bei der Isolation von CK-positiven Zellen jeweils CK-negative, also ungefärbte Zellen, vom Rand des Cytospins gesammelt. Diese Zellen konnten aufgrund der dort herrschenden wesentlich geringeren Zelldichte ohne den Schritt der Lasermikrodissektion isoliert werden (Kontrollzellgruppe 1). Zum anderen wurden CK-negative Zellen aus dem dichten Teil des Zellrasens entnommen, die, wie auch die Tumorzellen, mit dem Laser separiert wurden (Kontrollzellgruppe 2). Zudem sind als Kontrollzellgruppe 3 die, gegen CD68-gefärbten Zellen (Makrophagen) zu nennen, die ebenfalls mit dem Laser separiert und anschließend isoliert wurden.

Tab. 3.1: Kontrollzellgruppen

Kontrollzellgruppe	1	2	3
Färbung	CK	CK	CD68
LMD	-	+	+
CNV-Profil	balanciert	aberrant	überwiegend balanciert

Beim Auswerten der Profile sind deutliche Unterschiede in den CNV-Profilen der Referenzzellen aufgefallen. Zusammengefasst zeigen die nicht gelaserten CK-negativen Zellen balancierte Profile, die gelaserten CK-negativen Zellen aberrante Profile mit deutlichen genomischen Veränderungen, wie sie bei Normalzellen nicht zu erwarten sind. Die gelaserten CD68-positiven Zellen wiederum zeigen im Vergleich zu den gelaserten ungefärbten Zellen

wesentlich balanciertere Profile. Der Färbeprozess der CD68-positiven Kontrollzellen entspricht dem der CK-positiven DCCs, wie im Methodenteil in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben. Daher stellt diese Gruppe die zu bevorzugende Kontrollzellgruppe dar (Kontrollzellgruppe 3).

3.2.1.2 Einfluss der Lasermikrodissektion (LMD) auf die Zell-DNA

Eine mögliche Störgröße für die oben dargestellte Beobachtung der aberranten Normalzellprofile ist zum einen der Operator, da je nach Anwender unterschiedlich präzise gearbeitet wird. Zum anderen ist eine mögliche weitere Störgröße der Einfluss des Lasers auf die Zell-DNA.

Aufgrund der hohen Zelldichte des Knochenmarkmaterials ist es unumgänglich die einzelnen Tumorzellen vor der Isolation mit dem hochenergetischen Laser von benachbarten Zellen zu trennen. Der Einfluss des Lasers auf die DNA der Zelle ist von großem Interesse. Mögliche Schäden an der DNA könnten falsch positive Aberrationen bei den DCCs verursachen und somit die Aussagekraft der CNV-Profile einschränken. Zur Untersuchung des Effekts wurden die in Abb. 3.2 dargestellten Zellgruppen im Hinblick auf Aberrationen in Form von Copy Number Variations (CNVs) betrachtet. Um die Ursache der in Kapitel 3.2.1 gesehenen Unterschiede der CNV-Profile der Kontrollzellen herauszufinden, wurde ein Experiment entworfen, um jeweils den Einfluss des Anwenders, des Lasers und der technischen Einstellungen (Vergrößerungsgrad bei der LMD) zu untersuchen. Die Färbungen erfolgten jeweils separat auf einem bisher unbehandelten Patienten-Objektträger. Die Intensität der CD68-Färbungen ist vergleichbar mit der CK-Färbung der DCCs.

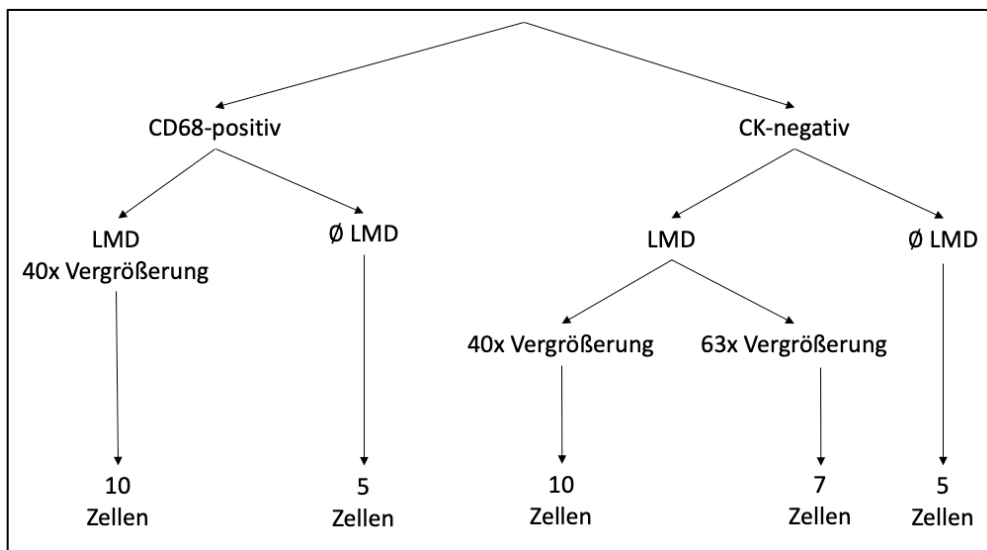


Abb. 3.2: Kontrollzellgruppen

Ungefärbte Zellen, die mit dem Laser separiert wurden zeigten deutlich aberrante Profile, wie bereits beobachtet. Wenn man die ungefärbten Profile betrachtet (Abb. 7.1 a und b) erscheinen

die, bei einer Vergrößerung von 63x, im Vergleich zu den bei 40x separierten Zellen etwas balancierter, wobei es keinen signifikanten Unterschied in der Qualität der Zellen, gemessen an der DLRS machte, ob die LMD bei 40- oder 63-facher Vergrößerung durchgeführt wurde. Auch der Anwender hatte keinen Einfluss auf die Qualität des Sequenzierungsergebnisses (Abb. 3.3).

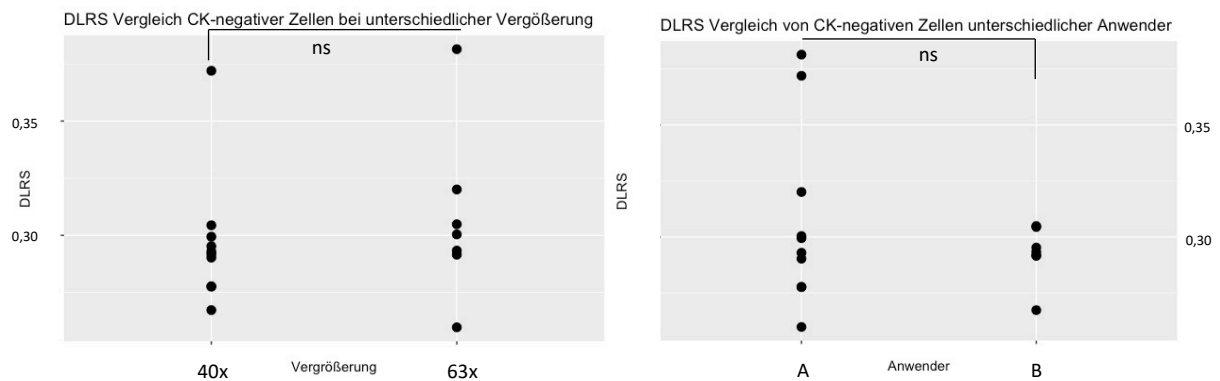


Abb. 3.3: Einfluss des Anwenders und der Vergrößerung während der LMD

a: Die Vergrößerung während der LMD hat keinen signifikanten Einfluss auf die DLRS (Mann-Whitney-U: $p=0,31$) b: Anwender A: Annina Greiff, Anwender B: Manjusha Ghosh. Der Anwender hat keinen signifikanten Einfluss auf die DLRS der Zellen (Mann-Whitney-U: $p=0,88$)

Die Zellen, die keiner LMD unterzogen wurden, zeigten die besten Ergebnisse. Die CNV-Profile stellten sich, wie zu erwarten, balanciert dar.

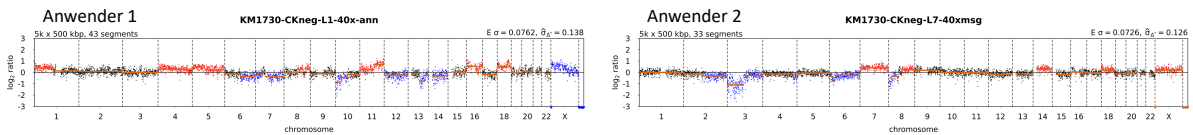
Die CD68-positiven Zellen nach LMD wiesen wiederum größtenteils balancierte Profile auf. Tabelle 3.2 gibt an, wie viele aberrante Kontrollzellprofile bei jedem Workflow gefunden wurden und wie viele Zellen jeweils ausgefallen sind (Verlust der Zelle während des Pickens oder nachträglicher Ausschluss aufgrund unzureichender DNA-Qualität).

Tab. 3.2 Quantifizierung des Kontrollzellexperiments

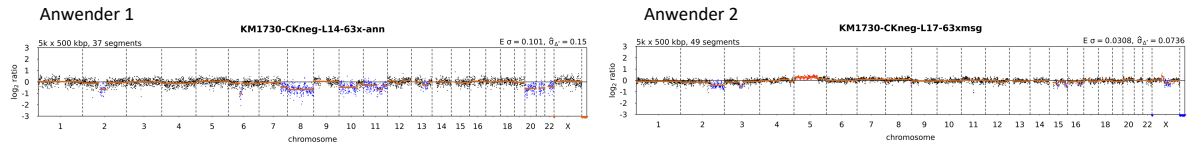
Färbung	LMD	Vergrößerung	Anwender	Isolierte Zellen	Ausfälle	Aberrante Profile
CK-	+	40x	A	6	0	4 (66%)
CK-	+	40x	B	4	1 (25%)	3 (75%)
CK-	+	63x	A	4	1 (25%)	1 (25%)
CK-	+	63x	B	3	2 (66%)	0
CK-	-	40x	A	4	2 (50%)	0
CK-	-	40x	B	4	1 (25%)	0
CD68+	+	40x	A	10	0	2 (20%)
CD68+	-	40x	A	5	2 (40%)	0

In Abb. 3.4 sind exemplarische CNV-Profile jeder Kontrollzellgruppe dargestellt. Die vollständigen Profile finden sich im Anhang (Abb. 7.1).

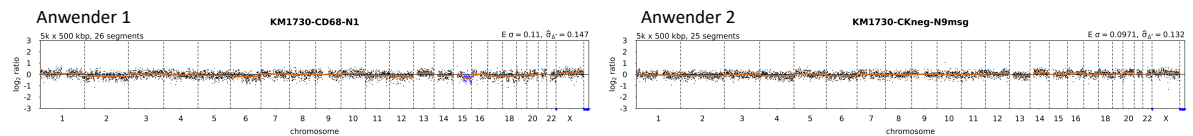
a CK negativ mit LMD bei 40x Vergrößerung



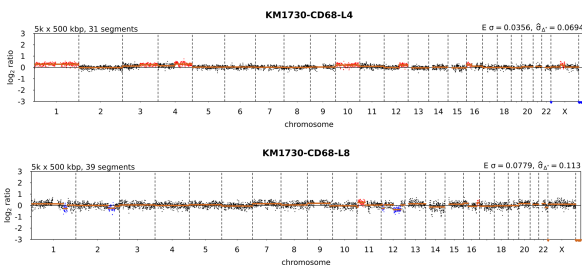
b CK negativ mit LMD bei 63x Vergrößerung



c CK negativ ohne LMD



d CD68 positiv mit LMD bei 40x Vergrößerung (Anwender 1)



e CK positive Tumorzellen der Patientin 10.1 (Anwender 1)

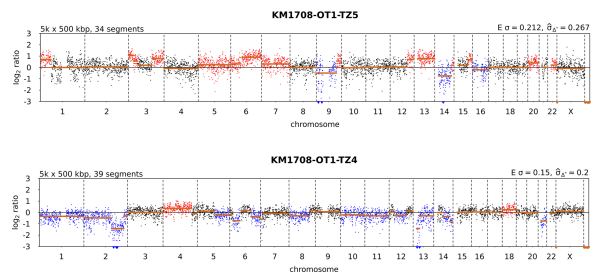


Abb. 3.4: Exemplarische CNV-Profile der einzelnen Kontrollzellgruppen

Dargestellt sind in rot die erkannten Genamplifikationen und in blau die Genverluste als $\log_2(\text{ratio})$. Eine $\log_2(\text{ratio})$ von -1 steht bspw. für eine Copynumber von 1. Eine $\log_2(\text{ratio})$ von 0,58 für eine Copynumber von 3. Auf der x-Achse sind die 22 Chromosomen sowie das X-Chromosom angegeben. Zum Vergleich sind unter e) zwei Tumorzellprofile abgebildet.

Es besteht also der Verdacht, dass die Lasermikrodissektion einen schädigenden Einfluss auf die DNA der Zelle hat, der sich in einem Auftreten falsch positiver Aberrationen widerspiegelt. Eine Färbung der Zelle vor der LMD scheint einen Schutz vor dem Laser zu bieten. Abb. 7.2 im Anhang visualisiert dies mit einer Darstellung der kumulativen CNV-Profile der Zellgruppen. Eine Quantifizierung des Eindrucks gelang, indem die Anzahl der aberranten Basenpaare aus den Rohdaten für jede Zelle addiert und verglichen wurde (Abb. 3.5). Zur besseren Vergleichbarkeit der aberranten Basenpaare wurden in Abb. 3.5 die, bei 63-facher Vergrößerung mit dem Laser behandelten Zellen ausgeschlossen, da standardmäßig alle Zellen bei 40-facher Vergrößerung mit dem Laser behandelt wurden.

Hierbei wiesen die gefärbten Zellen nach LMD, im Vergleich zu den ungefärbten Zellen nach LMD, signifikant weniger Aberrationen auf (Mann-Whitney-U: $p = 0,007$). Der Unterschied in der Anzahl der aberranten Basenpaare der gefärbten, gelaserten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten (CK-negativ, ohne LMD) war nicht signifikant (Mann-Whitney-U: $p = 0,2725$).

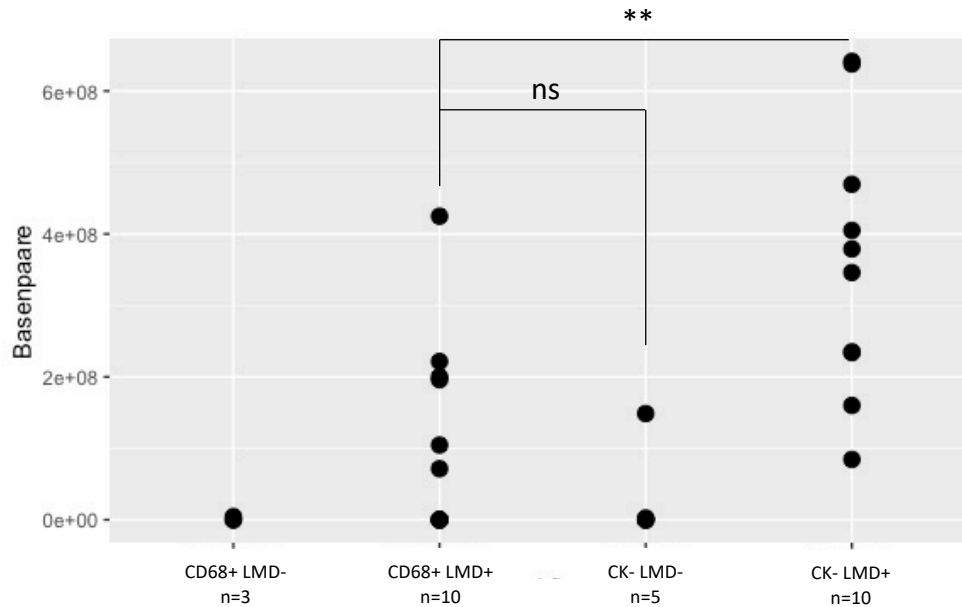


Abb. 3.5: Anzahl aberranter Basenpaare der verschiedenen Kontrollzellgruppen

Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Der p-Wert des Vergleichs CD68+ LMD+ mit CK- LMD- beträgt 0,2725. Der p-Wert des Vergleichs CD68+ LMD+ mit CK-LMD+ beträgt 0,007.

Um die Qualität der Probe zu beurteilen, wurde die Derivative Log Ratio Spread (DLRS) verwendet, die einen Hinweis auf das Ausmaß der Störgeräusche und damit der Interpretationswürdigkeit der Profile gibt. Bei einem hohen Maß an Hintergrundgeräuschen steigt auch die Wahrscheinlichkeit einer Über- oder Unterschätzung der gefundenen Aberrationen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den DLRS-Werten der Zellen mit und ohne Laserbehandlung (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,29$, Abb. 3.6 a). Gleichzeitig wiesen die gefärbten Zellen signifikant niedrigere DLRS-Werte als ungefärbte auf (Mann-Whitney-U-Test $p=0,0025$, Abb. 3.6 b). Ausgenommen werden mussten die Zellen, für die keine DLRS in der Control-FREEC-Software generiert werden konnte.

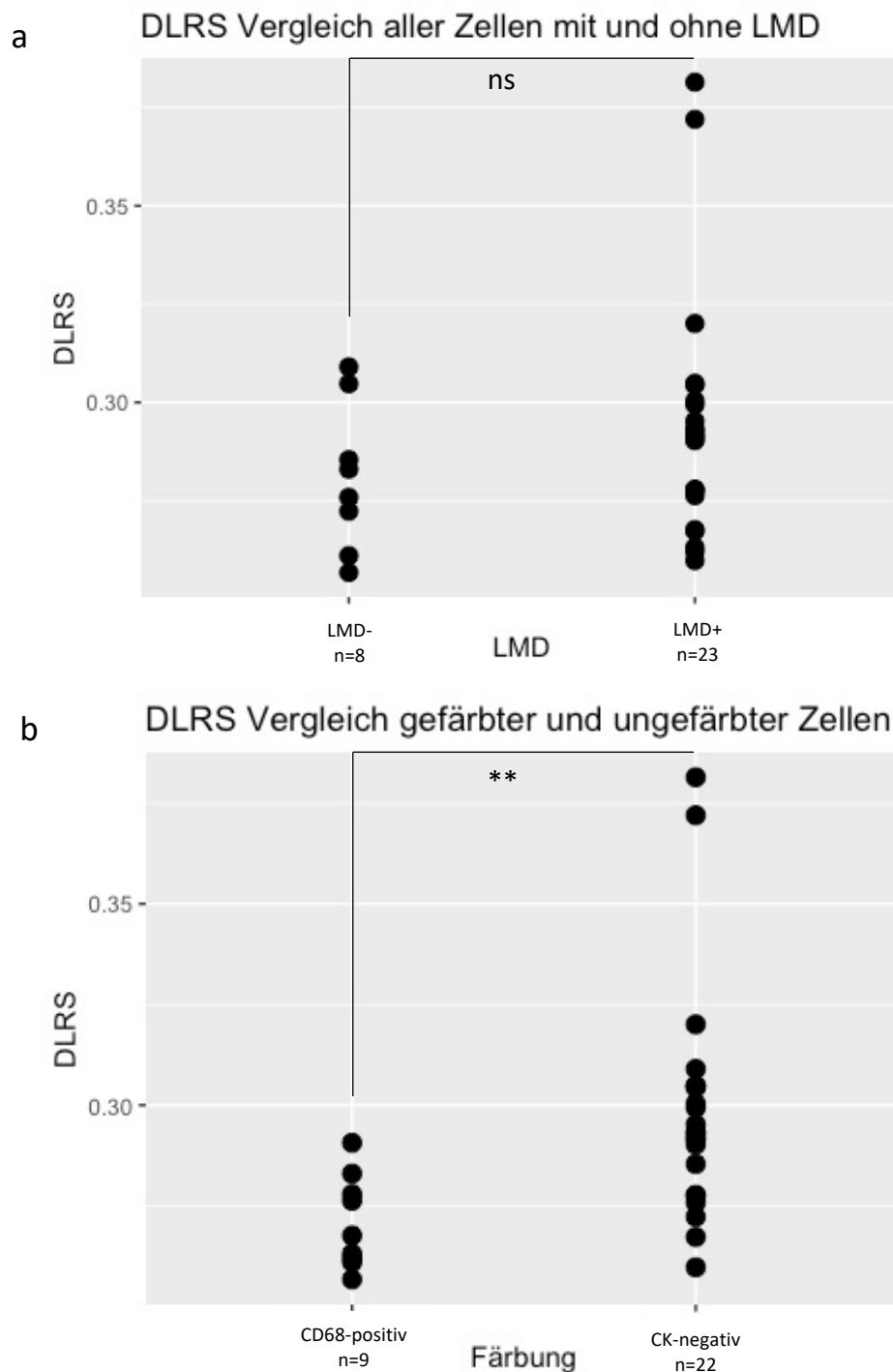


Abb. 3.6: DLRS Vergleich der Kontrollzellen

a: Die DNA-Qualität der Kontrollzellen unterscheidet sich nicht signifikant in Abhängigkeit von der Behandlung der Zellen des Lasers, (Mann-Whitney-U-Test $p=0,29$). b: Die DNA-Qualität gefärbter Zellen ist signifikant besser als die Qualität ungefärbter Zellen. Einbezogen wurden sowohl Zellen mit und ohne LMD-Behandlung (Mann-Whitney-U-Test $p=0,0025$)

Schlussfolgernd kann man annehmen, dass eine Färbung der Zellen gut vor der schädigenden Wirkung des Lasers auf die DNA schützt und gleichzeitig die Qualität der isolierten Zellen durch eine Färbung verbessert werden kann.

3.2.2 Bearbeitung des Knochenmarkmaterials

3.2.2.1 Isolierung von Kontrollzellen auf CK-gefärbten Cytospins

Aufgrund der begrenzten Anzahl an Objektträgern mit Patientenmaterial, wurde eine Methode benötigt, die es ermöglicht, von den Cytospins, die bereits alle Schritte bis zur Isolierung von DCCs durchlaufen hatten, erfolgreich Kontrollzellen in guter Qualität zu isolieren. Dadurch wird verhindert, dass möglicherweise DCCs verloren gehen. Der Verlust musste bei der Kontrollzellfärbung in Kapitel 3.2.1 in Kauf genommen werden. Die während der vorangehenden CK-Färbung erfolgte Behandlung des Cytospins mit Hämatoxylin, Ethanol und Aceton verändert die Epitope der Zelloberflächen, sodass keine Antikörperbindung mehr stattfinden kann. Durch diese Schritte der CK-Färbung war eine anschließende Kontrollzellfärbung behindert. Tabelle 7.1 im Anhang zeigt den Versuchsaufbau an PBL-Testobjektträgern, der die hinderlichen Schritte identifizieren konnte.

Um mögliche Querbrücken zwischen Epitopen der Oberflächenproteine zu lösen, kann der Einbau einer Antigendemaskierung in den Versuchsablauf hilfreich sein. Wie von Denda et al. (Denda et al., 2012) beschrieben, eignet sich für mit Ethanol behandelte Zellrasen eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung (HIAR) auf der Basis von Zitronensäure. Der HIAR-Puffer wurde, wie in Kapitel 2.2.3.2 (Methodenteil) beschrieben, hergestellt und vor der Verwendung 1:10 verdünnt. Der Puffer wurde in eine Kunststoffküvette mit Deckel gefüllt und in einem Wasserbad auf die jeweilige Temperatur erhitzt. In der folgenden Tabelle 3.3 ist der Versuchsaufbau dargestellt, der die optimalen Bedingungen für das beste Färbeergebnis ermitteln konnte.

Tab. 3.3: Bestimmung der optimalen Färbebedingungen

Die PBL Slides wurden alle vor der HIAR entsprechend den Kapiteln 2.2.1.1 und 2.2.1.2 einer CK- und Hämatoxylin-Färbung unterzogen und mit EtOH und Aceton behandelt. Nach der Behandlung mit dem erhitzten Puffer wurden die Slides in PBS getaucht anschließend auf CD68 gefärbt. Die Abstufung der Färbeintensitäten (-, +, ++, +++) sind im Anhang (Abb. 7.3) abgebildet.

	1	2	3	4	5	6
CK-Färbung	+	+	+	+	+	+
Hämatoxylin	+	+	+	+	+	+
EtOH + Aceton	+	+	+	+	+	+
Antigendemaskierung	15 min 37°C	15 min 42°C	15 min 60°C	15 min 70°C	15 min 80°C	7 min 80°C
1° Antikörper 1:250, 1h	CD68	CD68	CD68	CD68	CD68	CD68
Färbeintensität	-	+	++	++	+++	+++

Eine Temperatur von 80 °C zeigte die größte Farbintensität, wobei eine Inkubationszeit von nur 7 min einen besseren Kontrast vorweisen konnte, als eine 15-minütige Inkubation. Die Färbeergebnisse sind in Abb. 7.3 dargestellt. Die Zellen, die bei 80 °C für 7 min behandelt wurden, wiesen dazu eine signifikant bessere, am GII gemessene, DNA-Qualität auf (Mann-Whitney-U-Test $p=0,0005$). Die GII-Ergebnisse für jeden in Tab. 3.1 genannten Workflow sind im Anhang in Abb. 7.4. dargestellt. Zur besseren Isolation der Zellen mit dem Mikromanipulator wurden die Kontrollzellen am Ende des Workflows für 20 sec in – 20 °C kaltem Aceton fixiert.

Eine Kontrollzellfärbung an einem CK-gefärbten Patienten-Objektträger konnte erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 3.7 a). Um festzustellen, wie sich die DNA-Qualität der Zellen nach HIAR verändert, wurden von zwei CK-gefärbten Patienten-Cytospins Zellen vor und nach der Behandlung isoliert. Die Isolation der Zellen erfolgte ohne LMD. Da hier reichlich CD68-positive Zellen vorlagen und eine Zerstörung der Zelle durch eine mechanische Trennung der Zelle von benachbarten Zellen in Kauf genommen werden konnte, wurde hier auf den zeitintensiven Schritt der LMD verzichtet. Abb. 3.7 b zeigt die Gelelektrophorese-Banden (GII) der Kontrollzellen von einem der beiden Cytospins. Die DNA-Qualität der Kontrollzellen nach HIAR, hier gemessen anhand des GII, unterscheidet sich nicht signifikant von der DNA-Qualität von Zellen, die vor diesem Schritt isoliert wurden (Mann-Whitney-U-Test $p=0,11$). Es existiert nun eine erfolgreiche Methode (Abb. 3.7 c), um von den wenigen Objektträgern sowohl DCCs als auch Kontrollzellen in guter Qualität zu isolieren.

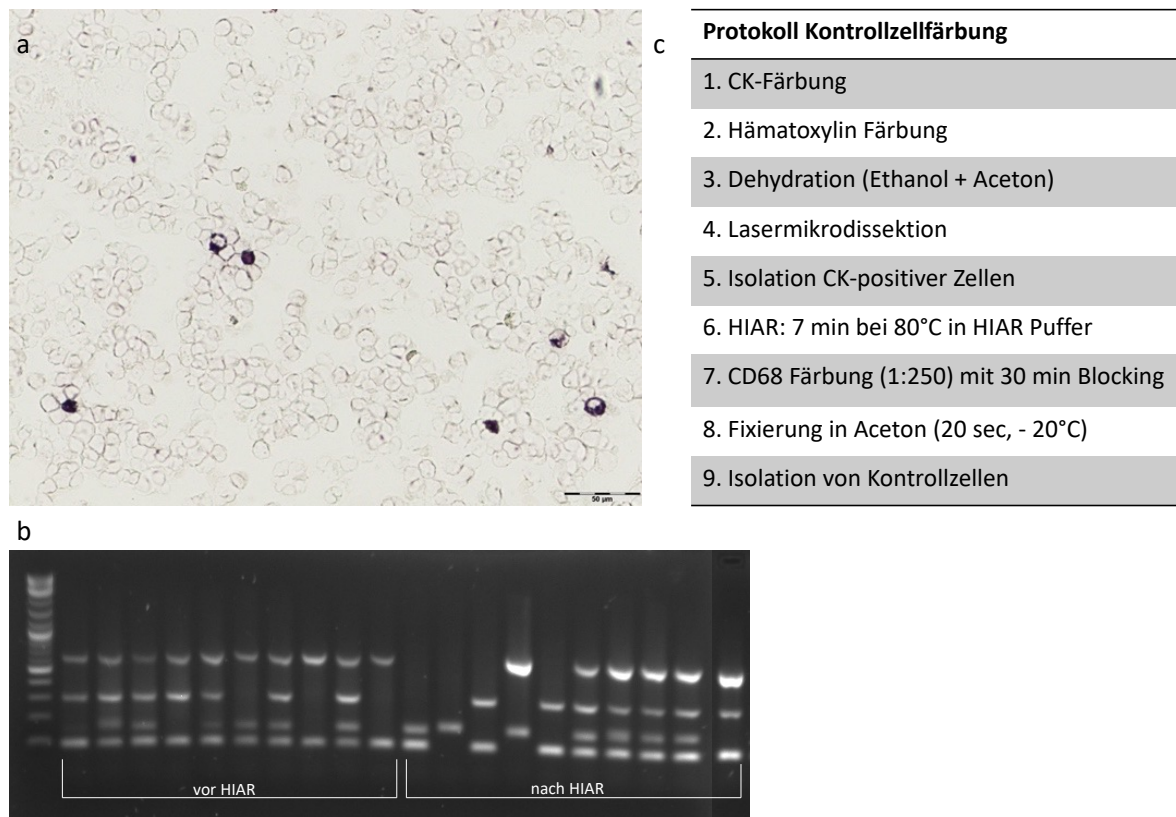


Abb. 3.7: Kontrollzellfärbung auf einem CK-gefärbten Patientenobjektträger

a: Färbergebnis auf einem Patientenobjektträger. Vergrößerung: 20x; b: Gelelektrophoresebanden von Kontrollzellen, die vom gleichen Patienten-Cytospin (3.6.2) isoliert wurden. Vor HIAR-Zellen entsprechen CK-negativen Zellen, die vor dem Schritt der HIAR isoliert wurden. c: Protokoll der Kontrollzellfärbung

3.2.2.2 Zuverlässige Detektion von CK-positiven DCCs

Bei der Isolation von Einzelzellen von gefrorenen Cytospins ergaben sich Probleme, die die im Methodenteil beschriebenen Arbeitsschritte notwendig machen (Methodenteil Abb. 2.1). Durch die Zentrifugation der mononukleären Zellen bei der Herstellung von Cytospins bildet sich ein sehr dichter Zellrasen, der eine direkte Isolation der Zelle mit dem Mikromanipulator, ohne sicher ausschließbare Kontamination durch benachbarte Zellen, unmöglich macht. Daher ist es notwendig, die disseminierte Tumorzelle mit dem Laser von benachbarten Zellen zu trennen. Dieser Schritt wiederum benötigt eine vorhergehende Anfärbung der Zellen mit Hämatoxylin, um die Absorption und damit die Wirksamkeit des Lasers zu erhöhen. Eine anschließende Dehydration verhindert eine Ausbreitung der vom Laser verursachten Hitze und damit eine Schädigung der Zielzelle. Die DNA-Qualität der Genomampifizierungsprodukte ist gut: 77 % der isolierten DCCs weisen einen GII ≥ 2 auf und qualifizieren sich damit für eine anschließende Sequenzierung. Diese Arbeitsschritte wurden von Manjusha Ghosh etabliert und in ihrer Dissertation beschrieben (Ghosh, 2021). Damit bietet sich eine Möglichkeit

Einzelzellen in guter Qualität von gefrorenen Cytospins zu isolieren und diese im Anschluss einer Sequenzierung zuzuführen.

Mit der Gruppe der CD68-positiven Zellen nach LMD existiert eine Kontrollgruppe, die nach dem gleichen Verfahren wie auch die DCCs behandelt wurden. Die isolierten Kontrollzellen, in diesem Fall Makrophagen, zeigen überwiegend balancierte Sequenzierungsprofile, wie es von normalen Körperzellen zu erwarten ist.

Die LowPass-Sequenzierung der CK-positiven Zellen konnte bestätigen, dass es sich bei den angefärbten Zellen um Tumorzellen handelt. Die DCCs zeigen deutlich aberrante CNV-Profile mit chromosomalen Zugewinnen und Verlusten.

Die DCCs unterscheiden sich in ihrem CNV-Profil deutlich von den CD68-positiven Kontrollzellen. Vergleicht man die Anzahl der aberranten Basenpaare CD68-positiver Zellen mit DCCs, finden sich bei den DCCs deutlich mehr Aberrationen (Mann-Whitney-U $p=0,0015$). Dieser Zusammenhang wird in Abb. 3.8 veranschaulicht.

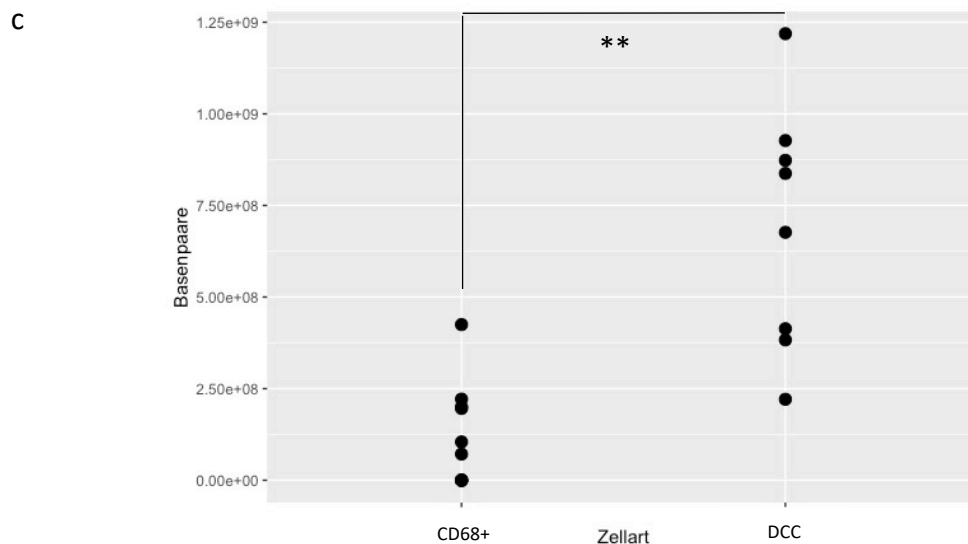
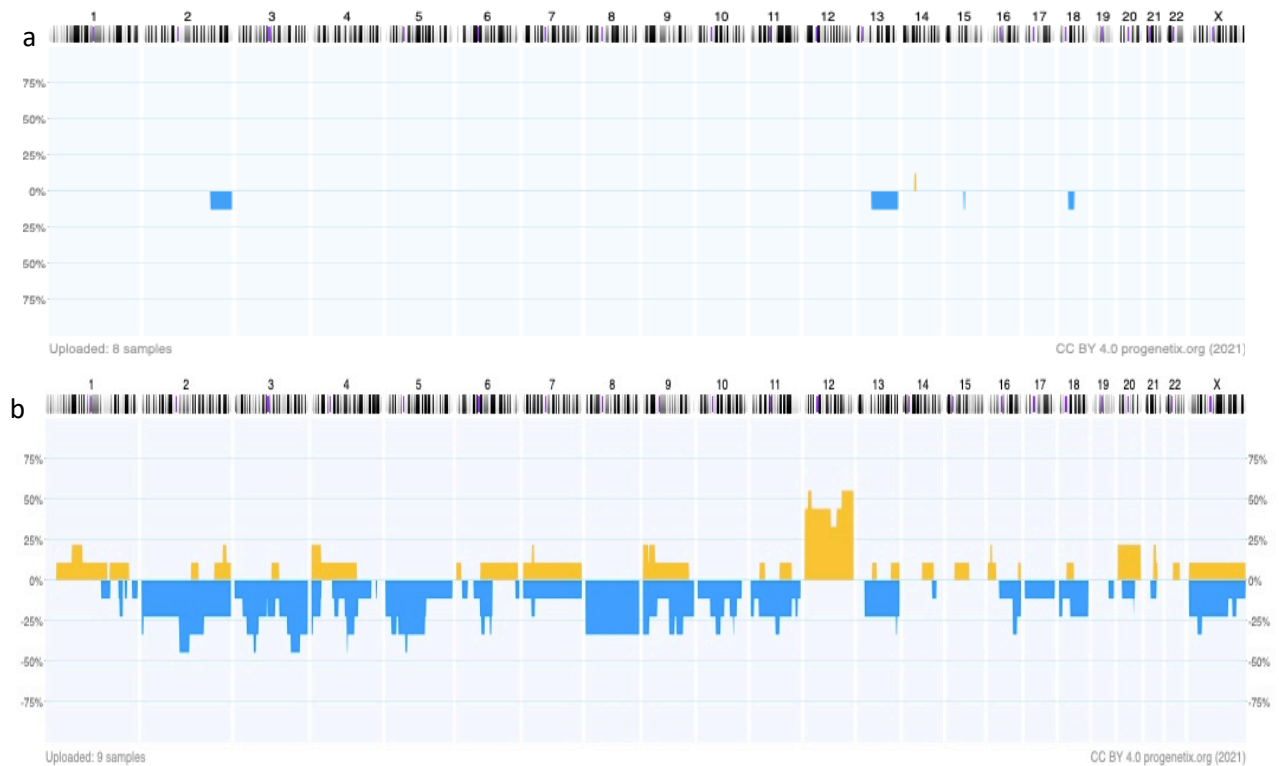


Abb. 3.8: Kumulative Betrachtung der Aberrationen CD68-positiver Kontrollzellen im Vergleich zu DCCs der gleichen Patientin

a: CD68-positive Kontrollzellen. b: DCCs. Die für die Darstellung verwendeten Zellen wurden alle von der Patientin 10.1 isoliert. c: Vergleich der Anzahl aberranter Basenpaare DC68-positiver Kontrollzellen und DCCs (Mann-Whitney-U: $p=0,0015$)

Damit konnte eine zuverlässige Methode gefunden werden CNVs zu detektieren, die eine klare Trennung zwischen Kontroll- und Tumorzellen ermöglicht.

3.3 Genomische Veränderungen der DCCs im Krankheitsverlauf

3.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellfärbung und -isolation von Patienten-Slides

Von den 60 Patienten wurden 54 bearbeitet, bei 37 Patienten wurden CK-positive Tumorzellen im Knochenmark gefunden (69 %). Da eines der Eingangskriterien der Nachweis von DCCs im Knochenmark war, verwundert diese Diskrepanz zunächst. Diese ist aber vor allem auf die Qualität der Cytospins zurückzuführen, die teilweise seit über 15 Jahre eingelagert waren und sich nicht immer gut bearbeiten ließen. Es ergaben sich Probleme, die eine Detektion und Isolation von DCCs trotz funktionierender Färbung schwierig machten. Einige Objektträger zeigten eine sich von der Oberfläche des Objektträgers lösende Zellschicht, die zum einen eine Detektion CK-positiver Zellen im Hellfeld erschwerte, da die Zellen teilweise übereinander zu liegen kamen. Zum anderen machte es auch eine Isolation der Zellen unmöglich, sodass diese Objektträger meist verworfen werden mussten. Auch waren Objektträger vorhanden, die nur sehr wenige Zellen trugen oder die Zellengrenzen kaum mehr zu erkennen waren und das Zellmaterial nur noch als eine geleeartige homogene Substanz zu sehen war. Auch hier war es unmöglich DCCs zu isolieren. Als letzte Schwierigkeit sind Verunreinigungen des Zellrasens zu nennen, die das Screenen der Objektträger sehr mühsam, jedoch nicht unmöglich machten. Abb. 3.9 (S. 41) zeigt die Schritte der Isolation einer CK-positiven Tumorzelle.

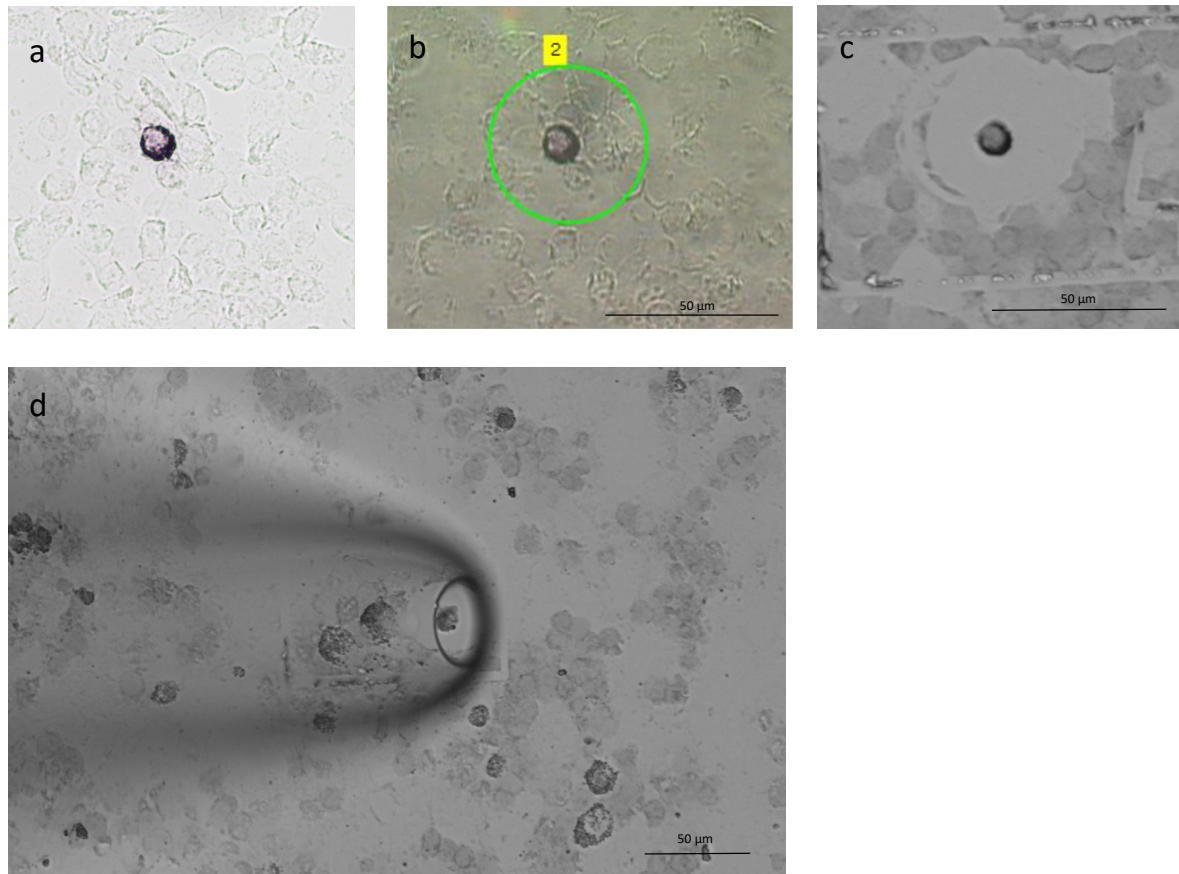


Abb. 3.9: Isolation einer CK-positiven Zelle

a: Die CK-positive Zelle ist durch ihre blaue Färbung deutlich von umgebenden Zellen zu unterscheiden. Die gleiche Tumorzelle wurde fotografiert mit dem PALM Zeiss Mikroskop (b) und dem Olympus Mikroskop nach der LMD (c). d: Exemplarisches Bild für die Einzelzellisolation mit dem Mikromanipulator

Im Median konnte auf jedem positiven Objektträger eine disseminierte Tumorzelle gefunden werden. Es gab einen Ausreißer, bei dem sich auf zwei Objektträgern eines Zeitpunktes jeweils knapp 100 DCCs fanden. Bei 17 Patientinnen konnten DCCs von mindestens zwei verschiedenen Zeitpunkten isoliert werden, was diese Patienten besonders interessant für eine vergleichende Analyse macht. Drei der 17 Patientinnen haben in ihrem Krankheitsverlauf Metastasen entwickelt. Tabelle 3.4 gibt einen Überblick über die Färbeergebnisse und die Qualität der isolierten DCCs.

Tab. 3.4: Übersicht über die Färbeergebnisse und Qualitätskontrolle

Bearbeitete Patientinnen	DCC-positive Patientinnen	Patientinnen mit ≥ 2 DCC-positiven Zeitpunkten	Isolierte DCCs	DCCs [GII ≥ 2]	DCCs [GII ≥ 2] von Patientinnen mit ≥ 2 DCC-positiven Zeitpunkten
56	37	17	281	217	156

Patient	2.16	4.3	4.5	4.6	5.7	6.3	7.1	7.3	7.4	7.5	7.6	7.7	8.1	9.1	9.2	10.1	11.1
Zeitpunkte mit Anzahl der isolierten DCCs mit GII ≥ 2	3	1	23	1	3	1	1	2	2	3	1	3	1	3	1	2	1
	1	1	1	4	6	3	1	3	1	1	1	1	1	1	23	10	2
				1			1	1	4	1		9		4		2	1
									5					1		9	
									3					1			
total	156																

Die Färbung CK-positiver Zellen konnte zeigen, dass DCCs sowohl bei Patientinnen, die in ihrem späteren Verlauf ein Rezidiv erlitten, bei Patientinnen, die bereits metastasiert waren, als auch bei Patientinnen die kein Rezidiv erlitten, nachweisbar sind. Als Rezidiv wurden Narbenrezidive, ein lokales Rezidiv oder eine Fernmetastase angesehen.

Sieben der 31 Patientinnen mit vorliegendem Follow-up aus dem Jahre 2018 entwickelten ein Rezidiv. Obwohl initial alle Patientinnen DCCs im Knochenmark aufwiesen (Einschlusskriterium für die Rekrutierung), konnten nur noch bei fünf von sechs gescreenten M1-Patientinnen DCCs im Knochenmark nachgewiesen werden. Bei den im Follow-up rezidivfreien Patienten konnten bei 75 % der gescreenten Patienten DCCs gefunden werden.

Anders ausgedrückt entwickelten nicht alle Patienten dieser Kohorte mit DCC-positivem Knochenmark Metastasen.

3.3.2 LowPass Whole Genome Sequenzierung von DCCs ausgewählter Patienten

3.3.2.1 Auswahl der Patientinnen für eine weiterführende Analyse

Von den 17 möglichen Patientinnen, die für eine vergleichende Analyse in Frage kommen, wurden fünf ausgewählt. Dabei wurden folgende Kriterien betrachtet:

1. Die Anzahl der DCC-positiven Zeitpunkte
Möglichst viele DCCs von mehreren Zeitpunkten machen eine Analyse interessant.
2. Der Zeitraum zwischen den einzelnen KM-Punktionen
Bestenfalls lagen die Daten der KM-Punktionen mehr als ein Jahr auseinander, um eine mögliche Veränderung besser beurteilen zu können.
3. Qualität der isolierten DCCs
Die isolierten Zellen müssen einen GII von mindesten zwei aufweisen, um einer LowPass Sequenzierung zugeführt werden zu können. Zusätzlich wurden auch die einzelnen Zellbilder vor und nach der Lasermikrodissektion betrachtet und Zellen ausgeschlossen, die während dieses Schrittes beschädigt wurden, auch wenn der GII in Ordnung war.
4. M0 und M1 Patienten
In die Analyse wurden sowohl metastasierte als auch nicht-metastasierte Patienten mit einbezogen, um auch hier einen Vergleich ziehen zu können.

Von den Patientinnen, die wie oben beschrieben ausgewählt wurden, wurden alle DCCs, welche die folgenden Kriterien erfüllten sequenziert:

- $GII \geq II$
- Eine Färbung der Zelle durch eine Verunreinigung ist sicher auszuschließen
- Zellgrenzen unter dem Mikroskop erkennbar
- Die Zelle wurde nicht im Rahmen der LMD partiell beschädigt
- Es handelt sich um Einzelzellen und nicht um Zellcluster

Die Patientinnen wurden mit einem System aus drei Ziffern gekennzeichnet, wobei die erste Ziffer die Anzahl der KM-Punktionen angibt, die zweite Zahl die Patientennummer darstellt und die dritte Zahl den betrachteten Zeitpunkt angibt. Diese Systematik wird in den folgenden Kapiteln verwendet.

Die ausgewählten Patientinnen werden in Tabelle 3.5 bezüglich ihres Krankheitsverlauf und den Tumoreigenschaften kurz vorgestellt.

Tab. 3.5: Tumoreigenschaften und Krankheitsverlauf der fünf ausgewählten Patientinnen

Da die Patientinnen in München rekrutiert und erfasst wurden, fehlen einige Daten, die in der Tabelle mit einem Strich markiert sind. Die fehlenden Daten waren im Nachhinein nicht mehr herauszufinden.

Patient	4.6	5.7	7.4	9.1	10.1
Erstdiagnose	1989	2000	2005	1996	2001
Alter bei Erstdiagnose	46	41	69	59	65
Tumortyp	Duktal-invasiv	Duktal-invasiv	Duktal-invasiv	Duktal-invasiv	Lobulär-invasiv +LCIS
TNM	pT1cpN2M0	pT1cpN1M0	pT1apN0pM0	pT1apN0M0	pT1cpN2pM0
Grading	2	2	3	-	2
Hormon-rezeptorstatus	-	HR+	HR-	-	-
Her2	-	Her2-	Her2+	-	-
Rezidiv	2008	2013/2015	Nein	Nein	-
Rezidivart	Lokalrezidiv	Narben-rezidiv Leber-, Knochen- metastasen	-	-	-
Tod	Nein	Ja (2016)	Nein	Nein	Ja

3.3.2.2 Verarbeitung der Sequenzierungsdaten

Von den fünf Patientinnen wurden 81 Zellen sequenziert, darunter 32 DCCs und 49 Kontrollzellen.

Die CNV-Profile der Rohdaten sind zum Teil von Hintergrundgeräuschen überlagert, sodass es in manchen Fällen schwer fiel die wahren Aberrationen von Artefakten zu unterscheiden. Eine Aufbereitung der Daten mit gefilterter Darstellung der CNVs konnte mit dem HIENA-Workflow durchgeführt werden. Das Prinzip des Workflows ist im Methodenteil im Kapitel 2.2.2.2 beschrieben. Für zwei der Zellen konnte aufgrund einer zu geringen Read-Anzahl kein Profil generiert werden.

Es stellte sich bei einigen Sequenzierungsprofilen die Frage, welche Ploidität die Zellen aufweisen. Der Verdacht auf Polyploidität ergab sich bei Zellen, die Aberrationen aufwiesen mit einem Chromosomensatz von $2+0,5 \cdot x$. Zur Überprüfung wurden für jede Zelle auch die berechneten CNV-Profile der Ploidität drei und vier zum Vergleich betrachtet. Eine weitere Beobachtung erschwert die Interpretation der Daten: Bei einigen Zellen kommt es zu Schwankungen um die „Nulllinie“. Dies ist sowohl bei DCCs als auch in abgeschwächter Form

bei Kontrollzellen zu beobachten. Diese Schwankungen betreffen auch die Ausschläge der chromosomalen Verluste und Zugewinne und können somit auch eine mögliche Polyploidität vortäuschen. Die Schwankungen sind insbesondere in den Profilen der Rohdaten sichtbar, weshalb diese mit in die Entscheidung über die Ploidität einbezogen werden. Abb. 3.10 zeigt diese Problematik exemplarisch. Zur Auswahl der Profile, die für eine weitere Analyse geeignet waren, wurde jede Zelle im Detail mit Giancarlo Feliciello und Bernhard Polzer diskutiert. Ein Ausschluss der Zelle konnte nicht an einem bestimmten DLRS oder SD-Wert festgemacht werden, da auch Zellen mit einer DLRS $> 0,35$ eine gute SD aus dem HIENA-Workflow sowie glaubhafte Aberrationen aufweisen konnten. Bei der Entscheidungsfindung wurden die oben genannten Probleme mitbetrachtet.

Zusammenfassend wurden folgende Punkte bei der Entscheidungsfindung beachtet:

- Die SD und die DLRS
- Die Geräuschigkeit der Profile, die nicht immer mit einer schlechten SD oder DLRS einhergehen mussten
- Die Schwankungen um die Nulllinie, die wenn sie stark ausgeprägt sind, eine Interpretation der Aberrationen behindern können
- Die einzelnen Aberrationen selbst, die jeweils auf ihre Glaubwürdigkeit geprüft wurden

Schlussendlich wurden zwei Tumorzellen von der Analyse ausgeschlossen. Die eine Zelle eindeutiger Weise aufgrund einer zu großen Streuung mit einem DLRS von 0,95 (KM3891-OT3-TZ1) und die andere Zelle aufgrund ausgeprägter Schwankungen um die Nulllinie, die keine sichere Aussage zu wahren Aberrationen zuließen. Die Zelle ist in Abb. 3.10 a im zweiten Profil dargestellt (KM3166-OT2-TZ3).

Die vom HIENA-Workflow erkannten Aberrationen der Tumorzellen wurden als glaubhaft angesehen und für die weitere Auswertung übernommen, da die Normalzellen nach der Filterung überwiegend balancierte Profile aufwiesen und somit gezeigt werden konnte, dass die falsch positiven Aberrationen der CD68-positiven Kontrollzellen und damit auch der Tumorzellen durch die gute Filterung des Workflows auf ein Minimum reduziert werden konnten.

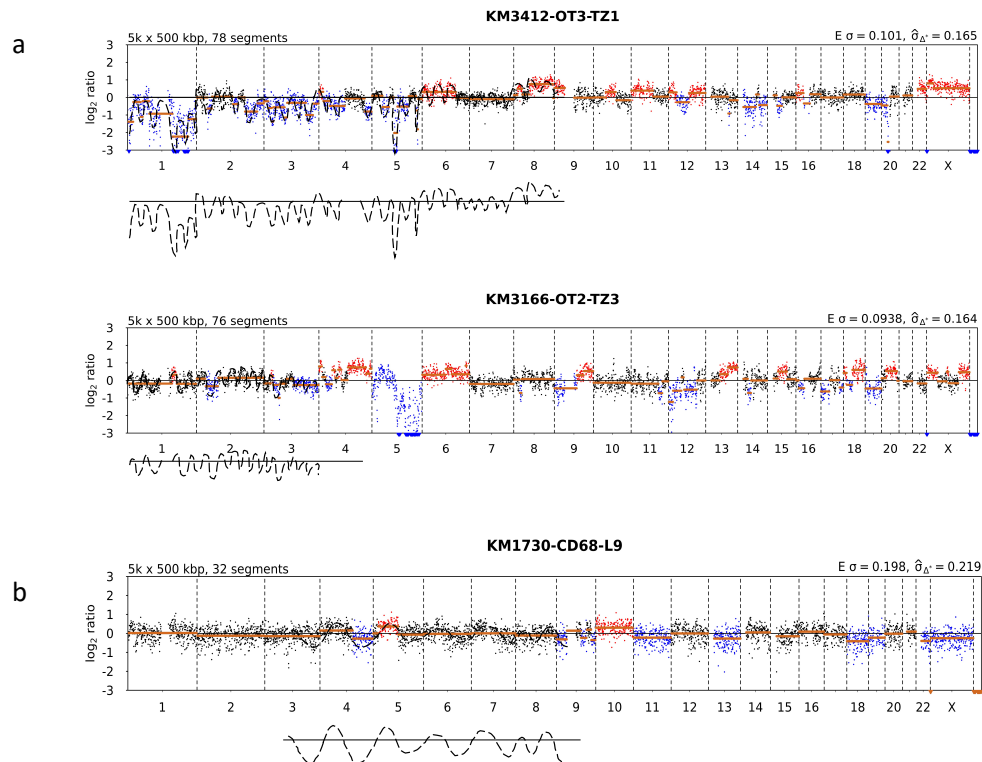


Abb. 3.10: Schwankungen um die Nulllinie der Sequenzierungsprofile

a: Exemplarische Abbildung von zwei DCC-Profilen, die die wellenhaften Schwankungen exemplarisch verdeutlichen. b: Sequenzierungsprofil einer CD68-positive Kontrollzelle, die die Schwankungen ebenfalls in abgeschwächter Form aufweist.

Im Konsens wurde für die weitere Bearbeitung der Daten, unter Zusammenschau der oben genannten Daten, für alle Zellen ein diploider Chromosomensatz angenommen, da eine Polyploidität in keinem der Fälle eindeutig festgestellt werden konnte.

3.3.3 Analyse von Copy Number Variationen disseminierter Tumorzellen

3.3.3.1 DCCs im Knochenmark zwei Jahre vor Entwicklung von Hirnmetastasen

Die Patientin 7.2 sticht aus dem Kollektiv hervor, da im Knochenmark vom Mai 2002 etwa 100 DCCs pro Objektträger gefunden wurden. Bei den anderen Patientinnen konnte im Median nur eine DCC gefunden werden. Von der Patientin ist bekannt, dass sie im Jahre 2004 Hirnmetastasen entwickelt hat. Bedauerlicherweise wiesen die restlichen Objektträger aus den Jahren 2002-2004 Zellen in sehr schlechter Qualität auf, sodass nur von dem einen Zeitpunkt Zellen isoliert werden konnten. Insgesamt wurden von zwei der Objektträger 43 DCCs isoliert. Da die Patientin nicht für einen Vergleich in Frage kommt, wurde lediglich eine DCC sequenziert, um zu zeigen, dass es sich nicht um ein Färbeartefakt handelt. Das CNV-Profil ist in Abb. 3.11 dargestellt.

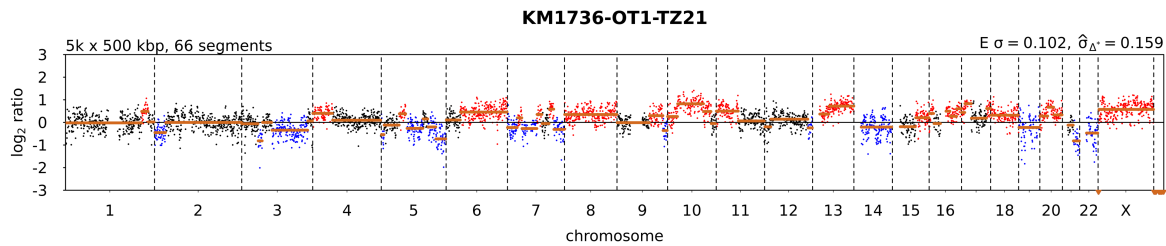


Abb. 3.11: DCC der Patientin 7.2 (05/2002)

Bei der isolierten Zelle handelt es sich eindeutig um eine Tumorzelle mit Genverlusten in den Chromosomen 3q, 5q, 7, 14, 19, 22 und Amplifikationen in den Chromosomen 4p, 6, 8, 9q, 10, 11, 13, 15q, 16, 18, 20 und dem X-Chromosom. Diese Aberrationen überschneiden sich nur teilweise mit den häufigsten, in Gehirnmastasen von Brustkrebs gefunden Aberrationen, die aber generell eher einen hohen Grad an Mutationen und dabei sehr heterogene Aberrationsmuster aufweisen (Wikman et al., 2012). Übereinstimmungen zwischen der untersuchten DCC und Gehirnmastasen gibt es bei den Amplifikationen in den Chromosomen 8q, 10p, 11p, 15q, 18 und 20. Bei den Genverlusten sind keine Überschneidungen zu finden. Bedauerlicherweise stand kein Material der Hirnmastasen zum Vergleich zur Verfügung.

3.3.3.2 Starke Heterogenität unter DCCs eines Patienten

Bei vergleichender Betrachtung der Sequenzierungsprofile der ausgewählten Patientinnen fiel auf, dass die CNVs von DCCs einer Patientin sehr heterogene Aberrationsmuster aufweisen. Sowohl die Profile von Zellen, die vom selben Zeitpunkt der KM-Punktion stammen, als auch Zellen der verschiedenen Zeitpunkte zeigten kaum übereinstimmende Aberrationen in gleichen Genabschnitten. Die Beobachtung konnte unabhängig davon gemacht werden, ob die Patientin im Krankheitsverlauf rezidierte oder nicht. Abb. 3.12 zeigt die Sequenzierungsprofile der rezidivfreien Patientin 7.4, die die Heterogenität repräsentativ darstellen. Die CNV-Profile der restlichen Patientinnen sind im Anhang zu finden (Abb. 7.5 – 7.8).

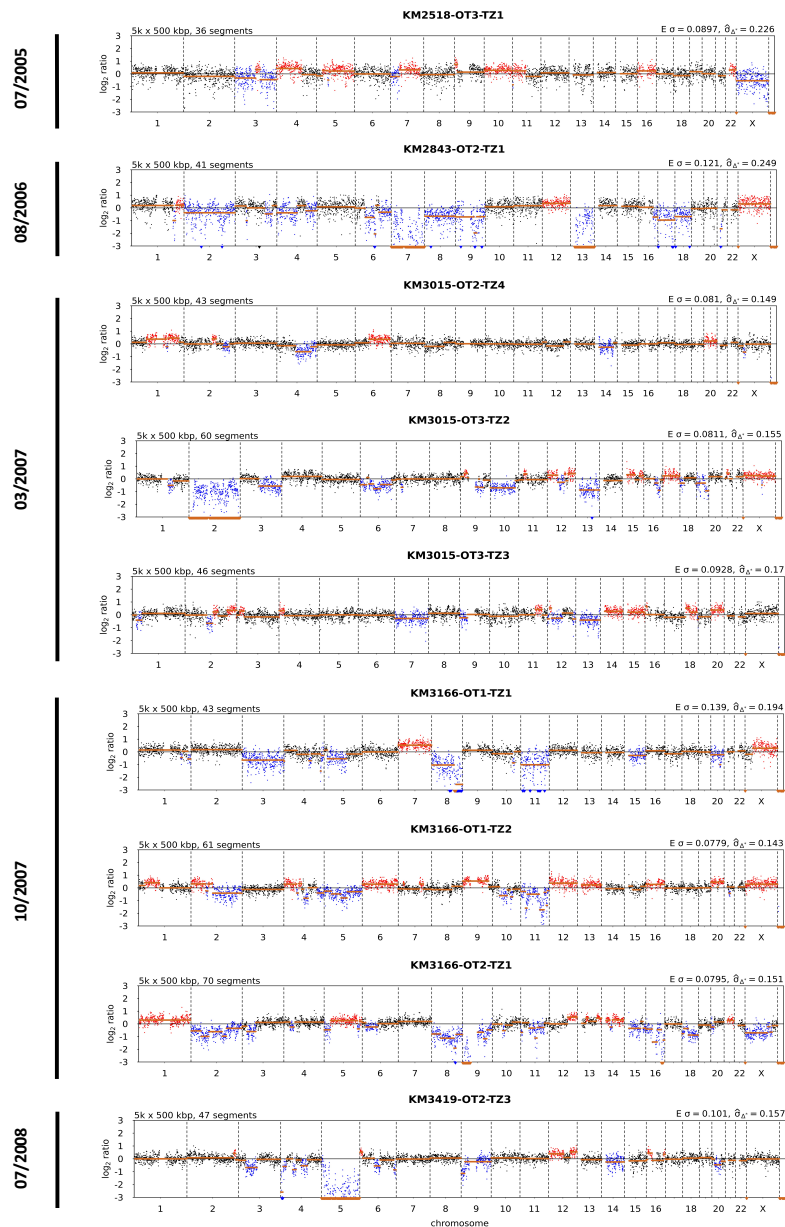


Abb. 3.12: Sequenzierungsprofile der DCCs der Patientin 7.4 im zeitlichen Verlauf

Dargestellt sind in rot die Genamplifikationen und in blau die Genverluste als $\log_2(\text{ratio})$. Eine $\log_2(\text{ratio})$ von -1 steht bspw. für eine Copynumber von 1. Eine $\log_2(\text{ratio})$ von 0,58 für eine Copynumber von 3. Am linken Rand ist jeweils das Datum der Knochenmarkspunktion angegeben, auf der x-Achse die 22 Chromosomen sowie das X-Chromosom.

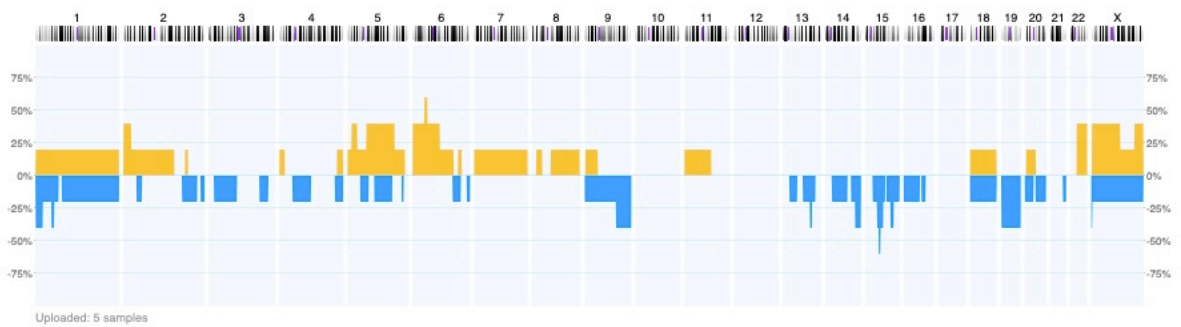
Zur besseren Anschaulichkeit wurden kumulative CNV-Profile von jeder Patientin mit der Progenetix Plattform erstellt. Dadurch sollte ermöglicht werden, in mehreren Zellen vorkommende, übereinstimmende Aberrationen zu finden. Auch hier waren keine eindeutigen klonalen Veränderungen ersichtlich. Lediglich bei Patientin 7.4 sticht die Amplifikation auf dem Chromosom zwölf hervor, die knapp die Hälfte aller neun eingeschlossenen Zellen betrifft. Die restlichen Profile wiesen Aberrationen in weiten Teilen des Genoms auf, ohne dass sich

eine Lokalisation herauskristallisieren würde. Abb. 3.13 zeigt die Progenetix-Profile aller fünf Patientinnen.

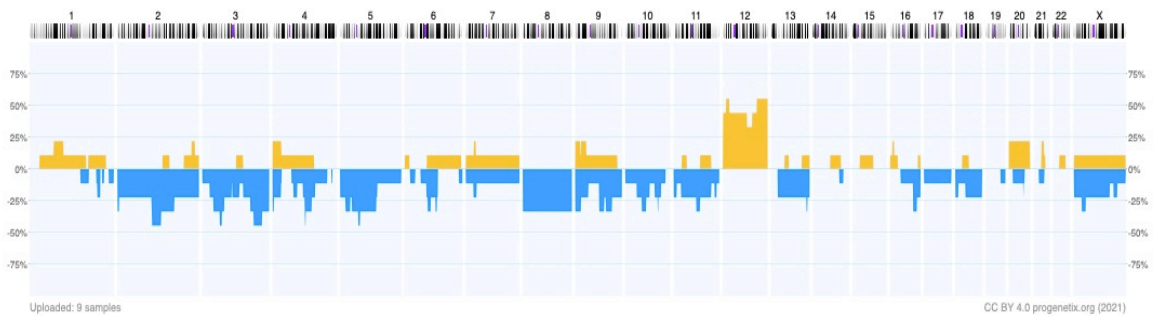
Patientin 4.6



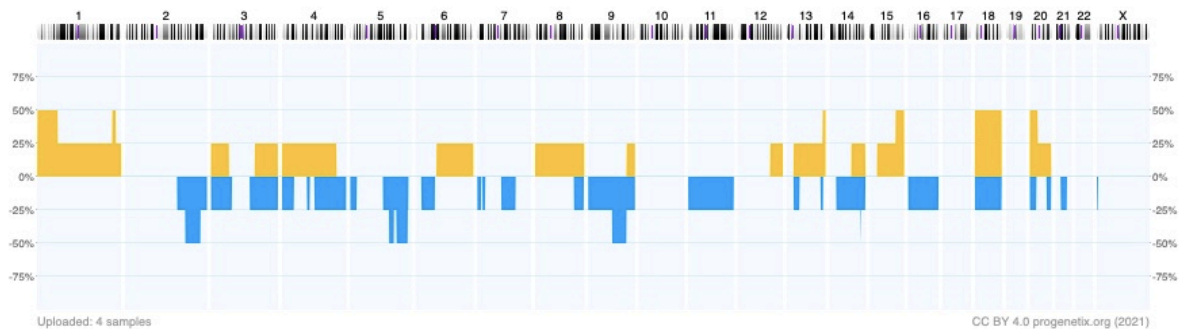
Patientin 5.7



Patientin 7.4



Patientin 9.1



Patientin 10.1



Abb. 3.13: Kumulative CNV-Profile der fünf ausgewählten Patientinnen

Die Patientinnen 4.6 und 5.7 erlitten ein Rezidiv im Laufe der Erkrankung. Gelbe Balken repräsentieren die chromosomalen Zugewinne, blaue Balken die Verluste. Die y-Achse gibt den Prozentsatz an, wie viele der betrachteten DCCs an der jeweiligen Stelle eine Amplifikation aufweisen. Die x-Achse zeigt die 22 Chromosomen und das X-Chromosom.

3.3.3.3 CNV-Vergleich von DCCs rezidivierter und rezidivfreier Patientinnen

Bei den sehr heterogenen DCCs stellt sich die Frage, ob sich als Gruppe betrachtet, ein Unterschied zwischen den Zellen von metastasierten Patientinnen (M1) im Vergleich zu nicht-metastasierten Patientinnen (M0) erkennen lässt.

Dazu wurden die in Abb. 3.14 (a, b) dargestellten kumulative CNV-Profile angefertigt. Die Patientin 10.1, von der keine Follow-up Daten bezüglich eines Rezidivs bestehen, wurde von dem Vergleich ausgenommen. Die sichtbare Tendenz, dass M0-Patientinnen im Vergleich zu M1-Patientinnen mehr Genverluste zeigen bleibt statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U $p=0,058$). Für diese Quantifizierung wurden aus den Rohdaten des HIENA-Workflows für jede einzelne Zelle die aberranten Basenpaare addiert und jeweils für M0- und M1-Patientinnen die Verluste und Amplifikationen gegenübergestellt. Dieser Zusammenhang wird in Abb. 3.14 (c, d) gezeigt. Auch bezüglich der Anzahl an amplifizierten Basenpaaren ergab sich kein statistischer Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen (Mann-Whitney-U $p=0,56$).

Bei diesen Fallzahlen lässt sich also keine Aussage zu Unterschieden in den Aberrationen zwischen M0- und M1-Patientinnen machen.

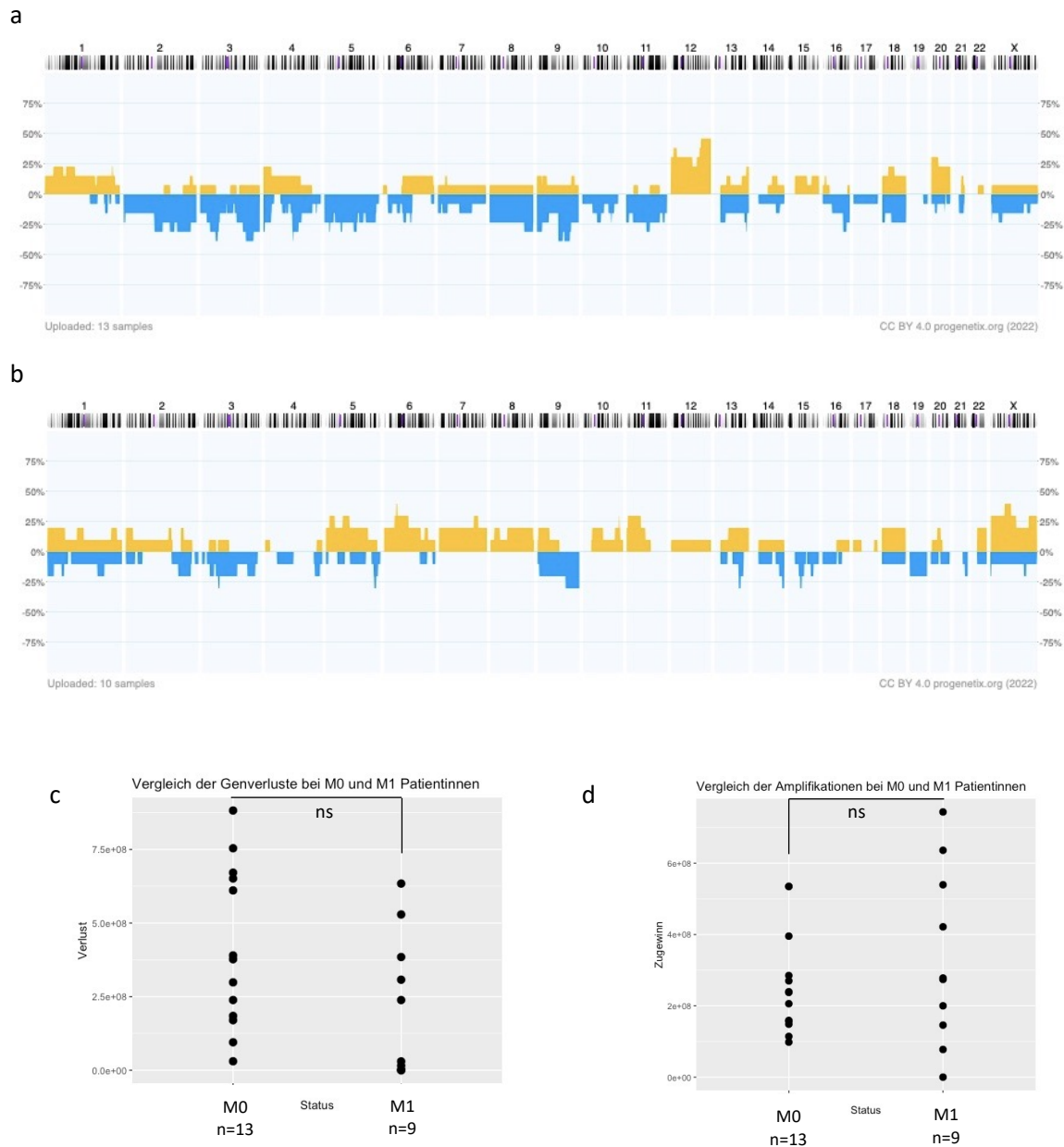


Abb. 3.14: CNV-Vergleich DCCs aus dem Knochenmark von M0 und M1 Patienten

a: kumulatives CNV-Profil der M0 Patienten (Patientin 7.4 und 9.1); b: kumulativen CNV-Profil der M1 Patienten (Patientin 4.6, 5.7, 7.2). Da von der Patientin 10.1 keine Follow-up Daten vorliegen, wurde die Patientin von diesem Vergleich ausgenommen; c und d: Vergleich der Größen des Genverlustes und der Genamplifikationen von M0- und M1-Patientinnen gemessen an der Anzahl der aberranten Basenpaare. Ein Punkt stellt jeweils eine DCC dar. Zu c: Mann-Whitney-U $p=0,058$, zu d: Mann-Whitney-U $p=0,56$

4. Diskussion

Disseminierte Tumorzellen spielen eine entscheidende Rolle im Krankheitsverlauf von Krebserkrankungen. Sie haben Einfluss auf die Prognose, das krankheitsfreie und allgemeine Überleben der Patienten und sind assoziiert mit einem erhöhten Risiko Metastasen zu entwickeln (Braun et al., 2000, 2005; Riethdorf et al., 2008). Im BALB-NeuT-Mausmodell entstanden 80 % der Metastasen aus DCCs (Hosseini et al., 2016). Oft kommt es aber insbesondere bei Brustkrebserkrankungen erst Jahre bis Jahrzehnte nach der Erstdiagnose zu einer Entwicklung von Metastasen. Und auch mit einer nachweisbaren minimalen Resterkrankung erleiden nur 40-60 % der Patientinnen ein Rezidiv. Die DCCs müssen also in der Lage sein, längere Zeit im Knochenmark zu überdauern um noch nach Jahren die Fähigkeit zur Proliferation erlangen zu können (Bany-Paluchowski et al., 2020; Braun et al., 2005).

Die Frage, wie sich die DCCs im langen Zeitraum der minimalen Resterkrankung entwickeln, ist noch weitgehend ungeklärt. In dieser Arbeit war es dank einem einzigartigen Kollektiv von 60 Brustkrebspatientinnen aus München, die bereit waren, sich mehrmals im Laufe ihrer Erkrankung einer Knochenmarkspunktion zu unterziehen, möglich, einzelne disseminierte Tumorzellen zu verschiedenen Zeitpunkten ab der Primärtumorentfernung zu isolieren. Die Patientinnen wurden für eine Studie der Frauenklinik München rekrutiert, in der untersucht wurde, wie sich die Gabe des Bisphosphonates *Zoledronat* auf die Entwicklung von Knochenmetastasen bei Brustkrebspatientinnen auswirkt (Rack et al., 2010). Die Proben stammen aus den Jahren 2000 bis 2013. Aus dem Follow-up aus dem Jahre 2018 geht hervor, dass die Mehrheit der Patientinnen keine Metastasen entwickelt hat.

Ziel der Arbeit war es, die genomischen Veränderungen der DCCs aufzuzeigen, die Evolution der DCCs im Laufe der Zeit zu untersuchen, sowie einen molekularen Vergleich von DCCs im Verlauf rezidivierter mit DCCs rezidivfreier Patientinnen anzustellen. Hierzu wurden die Tumorzellen als Einzelzellen isoliert und anschließend sequenziert. Es wurden die CNVs der Zellen analysiert und die Anzahl der Aberrationen der Subgruppen verglichen.

4.1 Lasermikrodissektion von DCCs auf tiefgefrorenen Cytospins

Die Lasermikrodissektion ist ein sehr wertvolles Mittel, um aus heterogenem Gewebe die interessanten Zielzellen herauszulösen und hat große Bedeutung bei der Analyse von genetischen Subgruppen von Tumoren. Dass die Probenpräparation, Färbung, Fixierung und Lagerung die Erfolge der Lasermikrodissektion beeinflussen, ist bekannt (Ahmed, 2006; Espina et al., 2007; Vogel et al., 2007). Die archivierten, hier verwendeten Cytospins wurden nicht wie üblich mit einer Polyethylenphthalat-(PEN)-Folie präpariert, die das Gewebe und die zelluläre DNA vor den Einflüssen des Lasers schützt. Die Beschichtung der Glasobjektträger mit PEN reduziert die Energie des Lasers und sorgt für eine optimierte Hitzeverteilung, wodurch Schäden in der Umgebung verringert werden können. Auch wird ein Teil der UV-Strahlen absorbiert und dadurch die Integrität des Gewebes geschützt. Zellen mit geringerer Färbeintensität erfordern höhere Laser-Energien, um präzise Schneiden zu können, wodurch sich aber auch zwangsläufig das Risiko von Zellschäden erhöht (Vogel et al., 2007). In Übereinstimmung mit der oben genannten Literatur weisen in dieser Arbeit mit dem Laser abladierte, ungefärbte Einzelzellen, also Zellen mit geringer Färbeintensität, ein aberrantes CNV-Profil auf (Kapitel 3.2.1, Abb. 7.1 a-c). Für diese Beobachtung kann es mehrere Ursachen geben. Es ist möglich, dass es sich um falsch-negativ gefärbte Tumorzellen handelt, dass die Zellen durch vom Laser versprengtes Gewebe kontaminiert wurden oder dass die DNA der Zellen Schaden durch den hochenergetischen Laser genommen hat. Da die Kontrollzellen nach vorhergehender Färbung gegen CD68 trotz sonst identischer Behandlung ein weitgehend balanciertes Profil tragen, ist davon auszugehen, dass die Aberrationen durch den Laser verursacht wurden. Es scheint also wichtig zu sein, die Zellen vor der LMD mit einer möglichst intensiven Farbe anzufärben, um die Induktion falsch positiver Aberrationen zu minimieren. Gleichzeitig weisen die isolierten, gefärbten Zellen eine bessere DNA-Qualität auf, die sich möglicherweise durch eine präzisere Ablation der umgebenden Zellen erklären lässt. Durch die Färbung sind die Zellränder besser abzugrenzen und ermöglichen eine exaktere Ablation der Nachbarzellen.

Trotzdem sind Artefakte bei den Kontrollzellen zu finden, weswegen davon auszugehen ist, dass nicht alle Aberrationen der DCC-Rohdaten wahre Aberrationen sind. Eine kritische Betrachtung der Aberrationen und sorgfältige Überprüfung, ob es sich um glaubhafte Aberrationen handelt, ist deshalb unabdingbar. Hilfestellung zur Einordnung der einzelnen Aberration geben die generelle Geräuschigkeit des CNV-Profiles (DLRS und SD) und die beobachteten Schwankungen um die Nulllinie. In dieser Arbeit wurden die vom HIENA-Workflow als aberrant deklarierten Genabschnitte auch als solche wahrgenommen, da die in

gleicher Weise präparierten CD68-positiven Normalzellen überwiegend balancierte Profile aufwiesen. Damit ist gezeigt, dass die Methode in der Lage ist, die meisten falsch positiven Aberrationen herauszufiltern.

Bei den verbleibenden Aberrationen der CD68+ Kontrollzellen ist eine weitere Möglichkeit der Entstehung die Phagozytose von DNA, die eine wesentliche Aufgabe der Makrophagen darstellt.

Rückblickend erscheinen CD3+ Zellen (Lymphozyten) möglicherweise als geeignetere Kontrollzellgruppe.

Ein weiterer Aspekt, der zu falsch positiven Aberrationen führen kann, ist das Alter der Zelle. Insgesamt weisen die Zellen trotz der Lagerungsbedingungen (bis zu 20 Jahren bei -20 °C) in der Regel eine gute DNA-Qualität auf, wie sich in den balancierten CNV-Profilen der CK-negativen ungelaserten und der CD68-positiven gelaserten Zellen zeigen lässt (Abb. 7.1 c, d). Es bestehen also gute Voraussetzungen für die Analyse der Tumorzellen. Zusammengefasst gehören zu diesen Voraussetzungen eine valide Kontrollzellgruppe, eine sichere Methode zur Detektion und Isolation von Tumor- sowie Kontrollzellen und letztendlich eine gute DNA-Qualität der isolierten Zellen, die eine weitere Analyse überhaupt erst zulässt.

4.2 Heterogenität unter DCCs

Copy Number Variationen (CNVs), also Verluste oder Zugewinne von DNA in bestimmten Genen, sind typische Veränderungen im Genom von Krebszellen und haben Einfluss auf die Progression des Tumors (Baudis, 2007; Cahill et al., 1999). Da die mit dem Antikörper A45-B/B3 angefärbten Zellen deutliche CNVs in ihrem Genom aufweisen, die sich in ihrer Häufung signifikant von den CD68-positiven Kontrollzellen unterscheiden, kann man davon ausgehen, dass es sich bei den isolierten Zellen auch tatsächlich um Tumorzellen handelt (Kapitel 3.2.2.2, Abb. 7.4 c). Die erfolgreiche Methode der Detektion von DCCs im KM durch eine Anfärbung der Tumorzellen mit einem Antikörper gegen Cytokeratin ist bereits mehrfach beschrieben (Klein et al., 2002).

Diese Arbeit zeigt, dass sowohl DCCs eines Patienten, die zum gleichen Zeitpunkt isoliert wurden, als auch die DCCs von unterschiedlichen Zeitpunkten ein sehr heterogenes CNV-Muster aufweisen. Die Darstellung aller Zellen eines Patienten als kumulatives Histogramm konnte diese Beobachtung illustrieren. Auch Klein et. al. konnten eine starke Heterogenität unter DCCs feststellen, die unabhängig davon war, von welchem Ort die Zellen isoliert wurden (Knochenmark, Lymphknoten) und davon, ob sie von unterschiedlichen Knochenmarkspunktionen stammten (Klein et al., 2002).

Diese Heterogenität als Ausdruck der Instabilität des Genoms bietet möglicherweise auch einen Ansatz für die Therapie der minimalen Resterkrankung.

4.3 Identifizierung progressassoziierter Veränderungen

Zu Beginn der Rekrutierung wies keine der Patientinnen Metastasen auf. Dennoch konnten DCCs im Knochenmark, sowohl von den Patienten, die im Laufe ihrer Erkrankung rezidierten, als auch von denjenigen, die rezidivfrei blieben detektiert werden. Es entwickelten also nicht alle Patienten dieser Kohorte mit einer minimalen Resterkrankung Metastasen, bzw. waren nicht alle der disseminierten Tumorzellen in der Lage zu proliferieren. Drei der untersuchten Patientinnen erlitten ein Rezidiv (Patientin 4.6, 5.7, 7.2). Die isolierten DCCs der Patientin 4.6 stammen aus dem Jahr der Entdeckung des Lokalrezidivs. Die DCCs der Patientin 5.7 wurden drei und fünf Jahre vor Entwicklung des ersten Rezidivs isoliert, die der Patientin 7.2 zwei Jahre vor Entwicklung von Hirnmetastasen (Tab. 3.3, Abb. 3.5, Abb. 7.7, Abb. 7.8). Klein et. al. haben gezeigt, dass DCCs von bereits metastasierten Patienten homogener erscheinen als DCCs von M0-Patienten und gleichzeitig mehr Aberrationen pro Zelle aufweisen. DCCs von M0-Patienten sind möglicherweise in der Lage, sich hinsichtlich ihres Genoms, dem der DCCs von M1-Patienten anzugleichen. Dennoch sind diese Zellen nur sehr selten im Knochenmark von M0-Patienten zu finden (Klein, 2013; Klein et al., 2002).

Interessant wäre es, charakteristische DNA-Signaturen zu finden, die Rückschlüsse auf das Risiko eines Rezidivs zuließen. Bei einem retrospektiven Vergleich der DCCs von rezidierten mit den DCCs nicht-rezidivierter Patienten dieser Kohorte ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der CNVs der Subgruppen. Es ergab sich die Tendenz, dass Tumorzellen von rezidierten Patientinnen weniger Genverluste, dafür eher Amplifikationen zeigen, als DCCs von nicht-rezidierten Patientinnen.

Eine deutliche Limitation ist hier die geringe Stichprobengröße, aufgrund der beschränkten Anzahl an Probenmaterial. Eingeschlossen werden konnten zehn Zellen von M1-Patientinnen und 13 von M0-Patientinnen. Allerdings handelte es sich hier um eine einmalige Kohorte, mit Patientinnen, die bereit waren sich mehrmals einer Knochenmarkspunktion zu unterziehen und somit einen Einblick in den Krankheitsabschnitt einer Brustkrebserkrankung nach adjuvanter Chemotherapie zu gewähren, für den es keine klinische Möglichkeit der Überwachung gibt. Zusätzlich wiesen die Patientinnen der Kohorte ein langes, zum Teil mehrere Jahrzehnte anhaltendes, rezidivfreies Überleben auf.

4.4 Isolation zweier Zelltypen von einem Objektträger

Disseminierte Tumorzellen sind sehr selten im Knochenmark zu finden. Braun et al. beschreiben eine Häufigkeit von im Median drei Zellen pro 2×10^6 Knochenmarkszellen (Braun et al., 2000). Daher war es für das hier vorliegende Kollektiv nicht möglich, einen Objektträger für eine alleinige Kontrollzellfärbung zu entbehren. Mit dem in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Protokoll (Abb. 3.7 c) ist es möglich, an eine CK-Färbung mit anschließender Isolation der DCCs, eine Kontrollzellfärbung anzuschließen.

Der Schlüsselschritt ist das Erhitzen der Objektträger in einem HIAR-Puffer auf 80 °C im Wasserbad, um gebildete Querbrücken zwischen den Epitopen zu lösen. Insgesamt wurden sechs unterschiedliche Protokolle hinsichtlich Einwirkdauer und -temperatur untersucht. Am Ende konnte ein Protokoll entwickelt werden, das eine Isolation von CD68-positiven Kontrollzellen in guter Qualität ermöglicht. Dadurch war es möglich, Kontrollzellen zu generieren, ohne einen Verlust von DCCs in Kauf nehmen zu müssen. Da für den Färbeschritt in dieser Arbeit das gleiche Protokoll verwendet wurde, ist als Voraussetzung gegeben, dass die zuerst angefärbte Zellgruppe in einer zu erwartenden sehr geringen Häufigkeit auftritt und nach erfolgreicher Färbung vollständig vom Objektträger entfernt wird. Andernfalls ist eine Differenzierung der gefärbten Zellen nach dem zweiten Färbeschritt nicht mehr möglich. Prinzipiell ist diese Methode auch auf andere Experimente übertragbar und ermöglicht generell eine zweifache sequentielle Bearbeitung eines Objektträgers zur Identifizierung zweier verschiedener Zellgruppen.

4.5 Limitationen der Arbeit

Eine Einschränkung in der Methodik ist die notwendige Behandlung der Zellen mit dem hochenergetischen Laser im Zuge der Lasermikrodissektion. Hier kam es, wie in den Sequenzierungsprofilen der Kontrollzellen zu sehen ist, zu einer geringen Anzahl an falsch positiven Aberrationen (Kapitel 3.2.1.2, Abb. 7.1 d). Man muss also davon ausgehen, dass nicht alle der in den DCC-Profilen gefundenen Aberrationen wahre Aberrationen sind. Dadurch, dass hier nur Vergleiche von Subgruppen durchgeführt wurden, die gleichermaßen behandelt wurden, also auch im gleichen Maße falsch positive Aberrationen tragen, sind die dargestellten Ergebnisse nicht beeinträchtigt.

Eine bereits erwähnte, starke Limitation der Arbeit ist die geringe Stichprobenanzahl, die einen Vergleich der Zellen erschwert. Grund dafür ist das beschränkt zur Verfügung stehende Probenmaterial, die strengen Auswahlkriterien der Patienten als auch der eingeschlossenen DCCs. Es handelt sich bei der vorliegenden Kohorte um ein sehr altes Kollektiv, sodass es sich

schwierig gestaltete, an Proben des Primärtumors und der Metastasenbiopsien zu gelangen. Auch waren nicht mehr alle Patientinnen für ein Follow-up zu erreichen.

4.6 Schlussfolgerungen

In dieser Kohorte, der mit dem Bisphosphonat *Zoledronat* behandelten Brustkrebspatientinnen, konnte gezeigt werden, dass sich DCCs an mehreren Zeitpunkten nach der Primärtumorentfernung im Knochenmark finden lassen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Färbung der Zellen vor der LMD elementar für eine valide Detektion von CNVs ist. Nicht alle Patientinnen erlitten ein Rezidiv im Krankheitsverlauf. Die gefundenen DCCs sowohl der M0- als auch der M1-Patientinnen zeigten sich sehr heterogen in ihren genetischen Aberrationen. Möglicherweise befanden sich die Zellen noch im Prozess der Selektion, bevor sich eine Stabilisierung des Genoms und mit anschließender klonaler Expansion einstellte. Auf eine klonale Entwicklung der DCCs, also eine gemeinsame Ursprungszelle der DCCs, konnte bei den untersuchten Patientinnen aufgrund der ausgeprägten Heterogenität nicht geschlossen werden. Was nicht abgebildet werden konnte, sind mögliche klonale Treibermutationen, die der Expansion zugrunde liegen.

Die Heterogenität bietet gleichzeitig aber auch eine Chance auf Therapie. Durch die Instabilität der Genome sind die Zellen möglicherweise auch verletzlich und zugänglich für Chemotherapien.

Ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf genetische Aberrationen der DCCs von Patienten mit Rezidiv im Vergleich zu Patientinnen ohne Rezidiv konnte hier nicht gefunden werden.

Außerdem hat es sich als wichtig herausgestellt, dass die Färbung der isolierten Zellen möglichst intensiv ausfällt. Nur dadurch konnte der schädigende Einfluss des Lasers ausreichend reduziert werden.

Die hier dargestellten CNV-Profile der Tumorzellen sind hinsichtlich ihrer Signalklarheit und Interpretationswürdigkeit nicht perfekt, allerdings zeigten die Normalzellen deutlich unterschiedliche Profile mit signifikant weniger Aberrationen. Man kann also zusammengefasst nicht sicher sagen, dass jede Aberration wahr ist, doch lässt sich mit Sicherheit sagen, dass jede der gefundenen Tumorzellen aberrant ist.

Um weitere Schlüsse aus der Arbeit zu ziehen, insbesondere, um den Zeitpunkt der Separation der DCCs näher eingrenzen zu können, sollte sich eine Untersuchung des Primärtumors anschließen. Vorhandene Gewebeproben von Metastasen sollten ebenso mit in die Analyse einbezogen werden, um einen besseren Einblick zu bekommen, ob deren Ursprung in den disseminierten Tumorzellen begründet liegt. Auch bietet sich an, von der Patientin 7.2 weitere

DCCs zu sequenzieren, um hier eine möglicherweise engere Verwandtschaft der Zellen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden DCCs zu mehreren Zeitpunkten von nur fünf Patientinnen untersucht. Es stehen noch eine große Anzahl weiterer WGA-Produkte sowohl von den hier beschriebenen, als auch der weiteren Patientinnen zur Verfügung.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Absiedelung von disseminierten Tumorzellen (DCCs) in das Knochenmark bei Brustkrebspatienten stellt einen frühen Schritt dar, der bereits während der Tumorigenese beginnt und spielt eine entscheidende Rolle im Krankheitsverlauf von Brustkrebserkrankungen. Die Zellen sind in der Lage (neo-)adjuvante Chemotherapien zu überdauern und sich zu Metastasen weiterzuentwickeln (Minimale Resterkrankung). Sie haben Einfluss auf die Prognose, das krankheitsfreie und allgemeine Überleben der Patienten. Allerdings existieren keine adäquaten Möglichkeiten, den weiteren Krankheitsprogress, besonders die molekulare Evolution der DCC während der minimalen Resterkrankung zur verfolgen oder in dieser Krankheitsphase vor dem Auftreten von Metastasen zielgerichtet zu therapieren. In dieser Arbeit wird versucht einen Einblick zu geben, wie sich die DCCs im Krankheitsverlauf weiterentwickeln. Hierzu wurden DCCs von mehreren Zeitpunkten nach Diagnosestellung und adjuvanter Chemotherapie aus dem Knochenmark isoliert und sequenziert.

Methoden: Zur Verfügung stehende tiefgefrorene mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen (n = 56) wurden in dieser Arbeit auf Cytokeratin gefärbt und durch Lasermikrodissektion und Mikromanipulator als Einzelzelle (n = 281) isoliert. Anschließend wurden die Copy Number Variations (CNV) mittels LowPass Sequenzierung untersucht und die Entwicklung der Zellen im Verlauf herausgearbeitet und Vergleiche mit den Subgruppen angestellt. Als Kontrollzellen dienen CD68-positive Zellen, die nach gleichem Protokoll gefärbt und isoliert wurden. Fünf Patientinnen (M0 und M1), die sich aufgrund vieler DCCs mit guter Qualität von unterschiedlichen Zeitpunkten der KM-Punktion besonders gut zu einer vergleichenden Analyse eigneten, wurden ausgewählt und die DCCs sequenziert und analysiert.

Ergebnisse: Es konnte eine erfolgreiche Methode zur Gewinnung von Tumor- und Kontrollzellen entwickelt werden. Diese ermöglichte auch, Kontrollzellen von Objektträgern zu gewinnen, von welchen bereits DCCs isoliert wurden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Einfluss des Lasers im Rahmen der Mikrodissektion auf die DNA durch eine vorherige Anfärbung der Zellen ausreichend reduziert werden kann, sodass signifikante Unterschiede zwischen CK+ DCCs und CD68+ Kontrollzellen aufgezeigt werden konnten. DCCs konnten sowohl aus dem Knochenmark von rezidivfreien als auch von metastasierten Patienten isoliert werden. In beiden Fällen präsentierten sich die Tumorzellen sehr heterogen. Es bestand kein Unterschied in den CNVs rezidivierter und nicht-rezidivierter Patientinnen. Es zeigte sich eine statistische nicht signifikante Tendenz, dass M0-Patienten im Vergleich zu M1-Patienten mehr Genverluste tragen.

Diskussion: Diese einzigartige Kohorte ermöglicht einen Einblick in die Entwicklung der DCCs nach Beendigung der adjuvanten Chemotherapie und damit in die Latenzphase bei Brustkrebspatientinnen. Da im Moment noch keine Möglichkeiten der Therapie der minimalen Resterkrankung bestehen, wird erst wieder mit dem Auftreten von Metastasen mit einer erneuten Therapie begonnen. Die gesehene Heterogenität der Zellen ist möglicherweise Ausdruck der genomischen Instabilität und kann einen Ansatz zur Therapie bieten. Eine weiterführende Analyse von Tumor- und Metastasengewebe könnte Rückschlüsse darauf ermöglichen, wann es zu einer Abspaltung der DCCs gekommen ist und welche Eigenschaften der DCCs für eine Progression verantwortlich sind, da offensichtlich nicht alle der Tumorzellen zu einer Proliferation in der Lage sind. Um molekulare Subgruppen der DCCs zu definieren waren allerdings die Fallzahlen dieser Kohorte zu gering.

6. Literaturverzeichnis

- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* 7, 834–846. <https://doi.org/10.1038/nrc2256>.
- Ahmed, F.E. (2006). Laser Microdissection: Application to Carcinogenesis. *Cancer Genomics Proteomics* 3 9, 217–226. <http://cgpi.iarjournals.org/content/3/3-4/217.abstract>.
- Amin, M.B., Greene, F.L., Edge, S.B., Compton, C.C., Gershenwald, J.E., Brookland, R.K., Meyer, L., Gress, D.M., Byrd, D.R., and Winchester, D.P. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging: The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual. *CA. Cancer J. Clin.* 67, 93–99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>.
- Anders, C.K., Hsu, D.S., Broadwater, G., Acharya, C.R., Foekens, J.A., Zhang, Y., Wang, Y., Marcom, P.K., Marks, J.R., Febbo, P.G., et al. (2008). Young Age at Diagnosis Correlates With Worse Prognosis and Defines a Subset of Breast Cancers With Shared Patterns of Gene Expression. *J. Clin. Oncol.* 26, 3324–3330. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.2471>.
- Banys-Paluchowski, M., Reinhardt, F., and Fehm, T. (2020). Disseminated Tumor Cells and Dormancy in Breast Cancer Progression. In: *Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Metastatic Disease*, Springer International Publishing, S. 35–43.
- Bastiaannet, E., Liefers, G.J., de Craen, A.J.M., Kuppen, P.J.K., van de Water, W., Portielje, J.E.A., van der Geest, L.G.M., Janssen-Heijnen, M.L.G., Dekkers, O.M., van de Velde, C.J.H., et al. (2010). Breast cancer in elderly compared to younger patients in the Netherlands: stage at diagnosis, treatment and survival in 127,805 unselected patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 124, 801–807. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0898-8>.
- Baudis, M. (2007). Genomic imbalances in 5918 malignant epithelial tumors: an explorative meta-analysis of chromosomal CGH data. *BMC Cancer* 7, 226. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-226>.
- Baudis, M., and Cleary, M.L. (2001). Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 17, 1228–1229.
- Braun, S., Kantenich, C.R.M., Gastroph, S., Wischnik, A., and Kindermann, G. (2000). Cytokeratin-Positive Cells in the Bone Marrow and Survival of Patients with Stage I, II, or III Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 342, 525–533. <https://doi.org/10.1056/NEJM200002243420801>.
- Braun, S., Janni, W., Schlimok, G., Gebauer, G., Oruzio, D., Kundt, G., Wong, G.Y.C., and Pantel, K. (2005). A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 793–802. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050434>.
- Cahill, D.P., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (1999). Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 9, M57–M60.
- Denda, T., Kamoshida, S., Kawamura, J., Harada, K., Kawai, K., and Kuwano, S. (2012). Optimal antigen retrieval for ethanol-fixed cytologic smears: Immunocytochemical Antigen Retrieval. *Cancer Cytopathol.* 120, 167–176. <https://doi.org/10.1002/cncy.21192>.

- Espina, V., Heiby, M., Pierobon, M., and Liotta, L.A. (2007). Laser capture microdissection technology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 7, 647–657. <https://doi.org/10.1586/14737159.7.5.647>.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I).
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>.
- Fidler, I.J., and Kripke, M.L. (1977). Metastasis Results from Preexisting Variant Cells Within a Malignant Tumor. *Science* 197, 893–895. <https://doi.org/10.1126/science.887927>.
- Fragomeni, S.M., Sciallis, A., and Jeruss, J.S. (2018). Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 27, 95–120. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>.
- Fredholm, H., Eaker, S., Frisell, J., Holmberg, L., Fredriksson, I., and Lindman, H. (2009). Breast Cancer in Young Women: Poor Survival Despite Intensive Treatment. *PLoS ONE* 4, e7695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007695>.
- G Klein (1998). Foulds’ Dangerous Idea Revisited: The Multistep Development of Tumors 40 Years Later. 72, 1–23. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60698-3](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60698-3).
- Ghosh, M.S. (2021). Identification of metastasis founder cells in breast cancer by cell lineage tracing.
- Hosseini, H., Obradović, M.M.S., Hoffmann, M., Harper, K.L., Sosa, M.S., Werner-Klein, M., Nanduri, L.K., Werno, C., Ehrl, C., Maneck, M., et al. (2016). Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature* 540, 552–558. <https://doi.org/10.1038/nature20785>.
- Howlader, N., Cronin, K.A., Kurian, A.W., and Andridge, R. (2018). Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 27, 619–626. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0627>.
- Hüsemann, Y., Geigl, J.B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmüller, G., et al. (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 13, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.12.003>.
- Jens Warfsmann et al. (unveröffentlicht). HIENA: Automated CNV profil workflow.
- Klein, C.A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer* 9, 302–312. <https://doi.org/10.1038/nrc2627>.
- Klein, C.A. (2013). Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature* 501, 365–372. <https://doi.org/10.1038/nature12628>.
- Klein, C.A., Schmidt-Kittler, O., Schardt, J.A., Pantel, K., Speicher, M.R., and Riethmüller, G. (1999). Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4494–4499. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4494>.

Klein, C.A., Blankenstein, T.J.F., Schmidt-Kittler, O., Petronio, M., Polzer, B., Stoecklein, N.H., and Riethmüller, G. (2002). Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet Lond. Engl.* 360, 683–689. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09838-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09838-0).

Koscielny, S., Tubiana, M., Lê, M.G., Valleron, A.J., Mouriessse, H., Contesso, G., and Sarrazin, D. (1984). Breast cancer: Relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br. J. Cancer* 49, 709–715. <https://doi.org/10.1038/bjc.1984.112>.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2021). S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4, AWMF Registernummer: 032-045OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>.

Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* 10, 955–960. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879>.

Paez, D., Labonte, M.J., Bohanes, P., Zhang, W., Benhanim, L., Ning, Y., Wakatsuki, T., Loupakakis, F., and Lenz, H.-J. (2012). Cancer Dormancy: A Model of Early Dissemination and Late Cancer Recurrence. *Clin. Cancer Res.* 18, 645–653. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2186>.

Perou, C.M., Sørli, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>.

Polzer, B., Medoro, G., Pasch, S., Fontana, F., Zorzino, L., Pestka, A., Andergassen, U., Meier-Stiegen, F., Czyz, Z.T., Alberter, B., et al. (2014). Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol. Med.* 6, 1371–1386. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404033>.

Rack, B., Jückstock, J., Genss, E.-M., Schoberth, A., Schindlbeck, C., Strobl, B., Heinrigs, M., Rammel, G., Zwingers, T., Sommer, H., et al. (2010). Effect of Zoledronate on Persisting Isolated Tumour Cells in Patients with Early Breast Cancer. *Anticancer Res.* 30, 1807–1814.

Riethdorf, S., Wikman, H., and Pantel, K. (2008). Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int. J. Cancer* 123, 1991–2006. <https://doi.org/10.1002/ijc.23825>.

Ring A, Spataro M, Wicki A and Aceto N. (2022). Clinical and Biological Aspects of Disseminated Tumor Cells and Dormancy in Breast Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* 10:929893. doi:10.3389/fcell.2022.929893

Robert Koch Institute (ed.) and the Association of Population-based Cancer Registries in Germany (ed.) (2020). Cancer in Germany 2015/2016. 12th edition.

Rojas, K., and Stuckey, A. (2016). Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol.* 59, 652–672. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000239>.

- Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M., Ahr, A., Blankenstein, T.J.F., Kaufmann, M., Diebold, J., Arnholdt, H., Muller, P., et al. (2003). From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7737–7742. <https://doi.org/10.1073/pnas.1331931100>.
- Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 10869–10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>.
- Sosa, M.S., Bragado, P., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2014). Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 611–622. <https://doi.org/10.1038/nrc3793>.
- Steeg, P.S. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat. Med.* *12*, 895–904. <https://doi.org/10.1038/nm1469>.
- Stoecklein, N.H., Erbersdobler, A., Schmidt-Kittler, O., Diebold, J., Schardt, J.A., Izbicki, J.R., and Klein, C.A. (2002). SCOMP Is Superior to Degenerated Oligonucleotide Primed-Polymerase Chain Reaction for Global Amplification of Minute Amounts of DNA from Microdissected Archival Tissue Samples. *Am. J. Pathol.* *161*, 43–51. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64155-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64155-7).
- Stoecklein, N.H., Hosch, S.B., Bezler, M., Stern, F., Hartmann, C.H., Vay, C., Siegmund, A., Scheunemann, P., Schurr, P., Knoefel, W.T., et al. (2008). Direct Genetic Analysis of Single Disseminated Cancer Cells for Prediction of Outcome and Therapy Selection in Esophageal Cancer. *Cancer Cell* *13*, 441–453. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.04.005>.
- Valastyan, S., and Weinberg, R.A. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* *147*, 275–292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>.
- Vogel, A., Lorenz, K., Horneffer, V., Hüttmann, G., von Smolinski, D., and Gebert, A. (2007). Mechanisms of Laser-Induced Dissection and Transport of Histologic Specimens. *Biophys. J.* *93*, 4481–4500. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.102277>.
- Vuong, D., Simpson, P.T., Green, B., Cummings, M.C., and Lakhani, S.R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch.* *465*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7>.
- Weigelt, B., Peterse, J.L., and van't Veer, L.J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 591–602. <https://doi.org/10.1038/nrc1670>.
- Wikman, H., Lamszus, K., Detels, N., Uslar, L., Wrage, M., Benner, C., Hohensee, I., Ylstra, B., Eylmann, K., Zapatka, M., et al. (2012). Relevance of PTEN loss in brain metastasis formation in breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* *14*. <https://doi.org/10.1186/bcr3150>.
- van de Wouw, A.J., Janssen-Heijnen, M.L.G., Coebergh, J.W.W., and Hillen, H.F.P. (2002). Epidemiology of unknown primary tumours; incidence and population-based survival of 1285 patients in Southeast Netherlands, 1984–1992. *Eur. J. Cancer* *38*, 409–413. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00378-1).

Wu, Q., Li, J., Zhu, S., Wu, J., Chen, C., Liu, Q., Wei, W., Zhang, Y., and Sun, S. (2017). Breast cancer subtypes predict the preferential site of distant metastases: a SEER based study. *Oncotarget* 8, 27990–27996. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15856>.

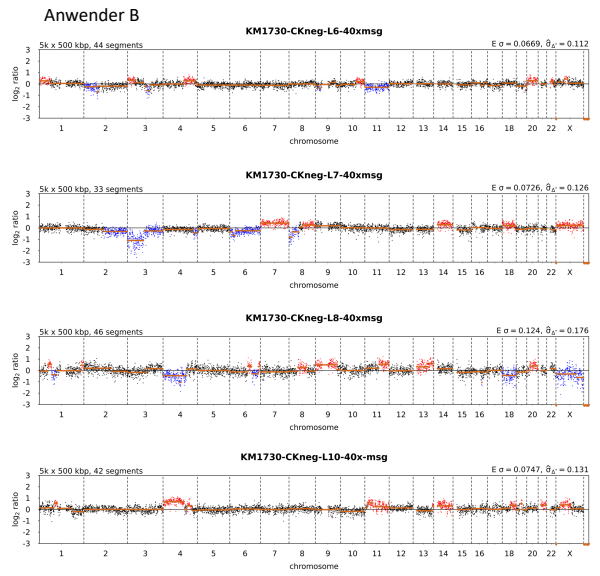
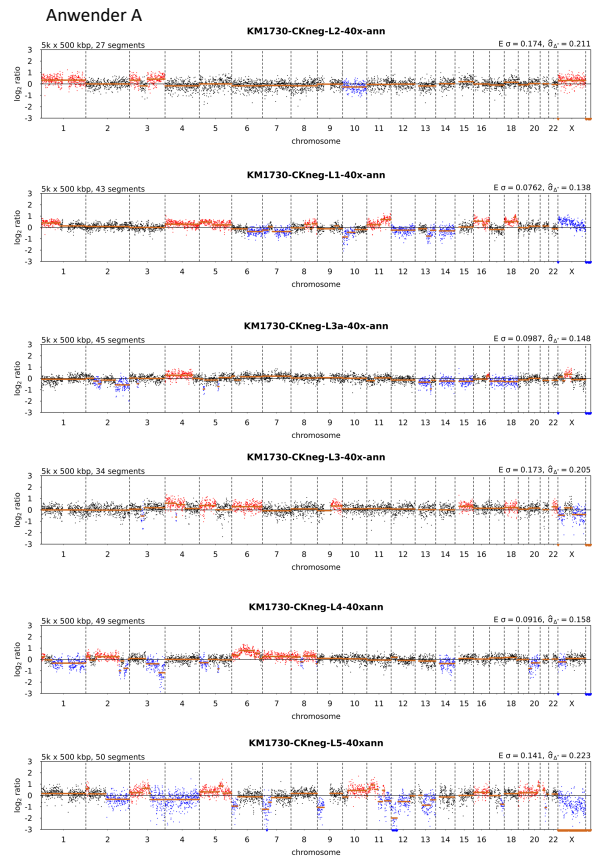
7. Anhang

Tab. 7.1: Bestimmung des Schrittes, der eine Anschlussfärbung behindert

Getestet wurde auf PBL-Objektträgern, die entsprechend dem Versuchsaufbau behandelt wurden. Bei der Blockung handelte es sich um einen Schritt, bei dem für 30 min mit einer 10 % AB/PBS-Lösung inkubiert wird. Hierdurch werden unspezifische Antikörperbindungsstellen verhindert, indem hydrophobe Regionen besetzt werden. Die Färbung mit dem 1:250 verdünnten Antikörper CD68 geschah bei Raumtemperatur und einer Inkubationszeit von einer Stunde.

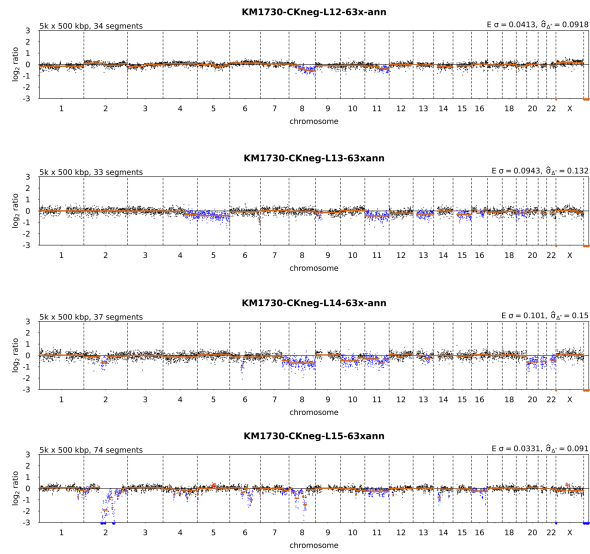
	1	2	3	4	5
CK-Färbung	-	+	+	+	+
Hämatoxylin	-	+	-	-	+
EtOH und Aceton	-	+	-	+	-
Blockung	+	-	-	-	-
1° Antikörper	CD68	CD 68	CD 68	CD 68	CD 68
1:250	1h	1h	1h	1h	1h
Färbeergebnis	+++	-	+++	++	+

a CK-negative Zellen nach LMD bei einer Vergrößerung von 40x

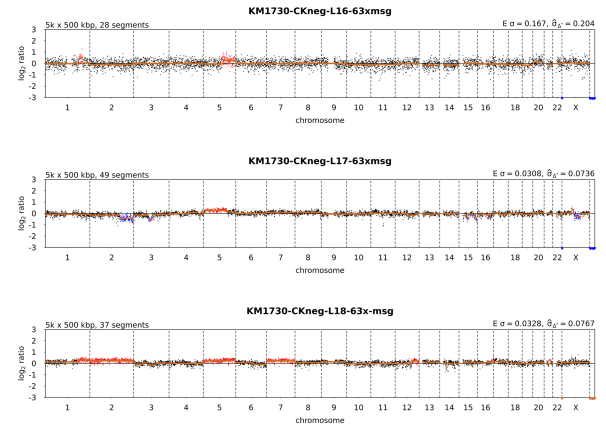


b CK-negative Zellen nach LMD bei 63x Vergrößerung

Anwender A

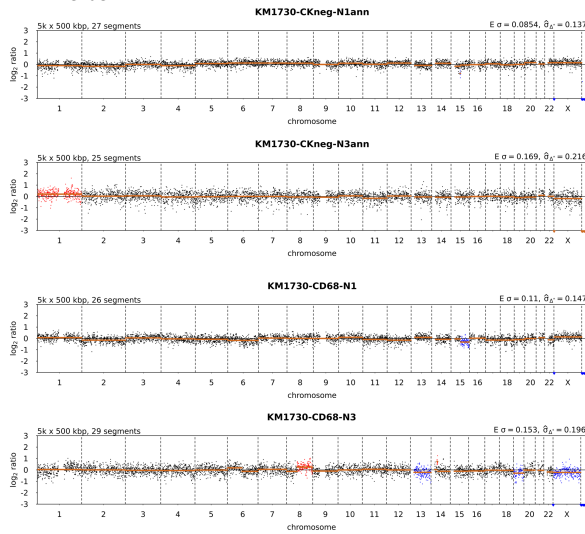


Anwender B

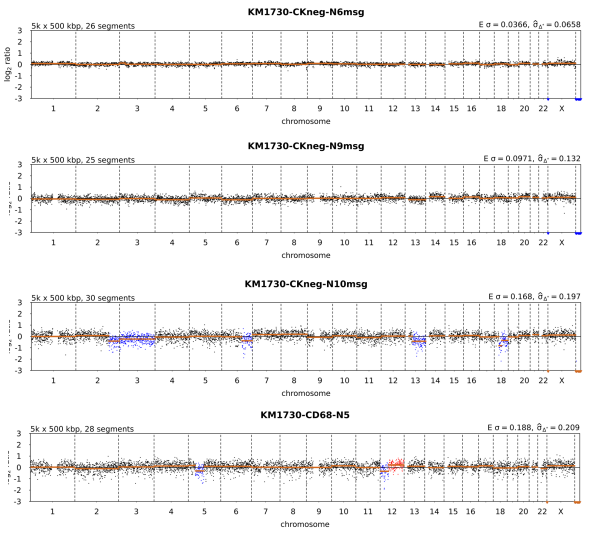


c CK-negative Zellen ohne LMD

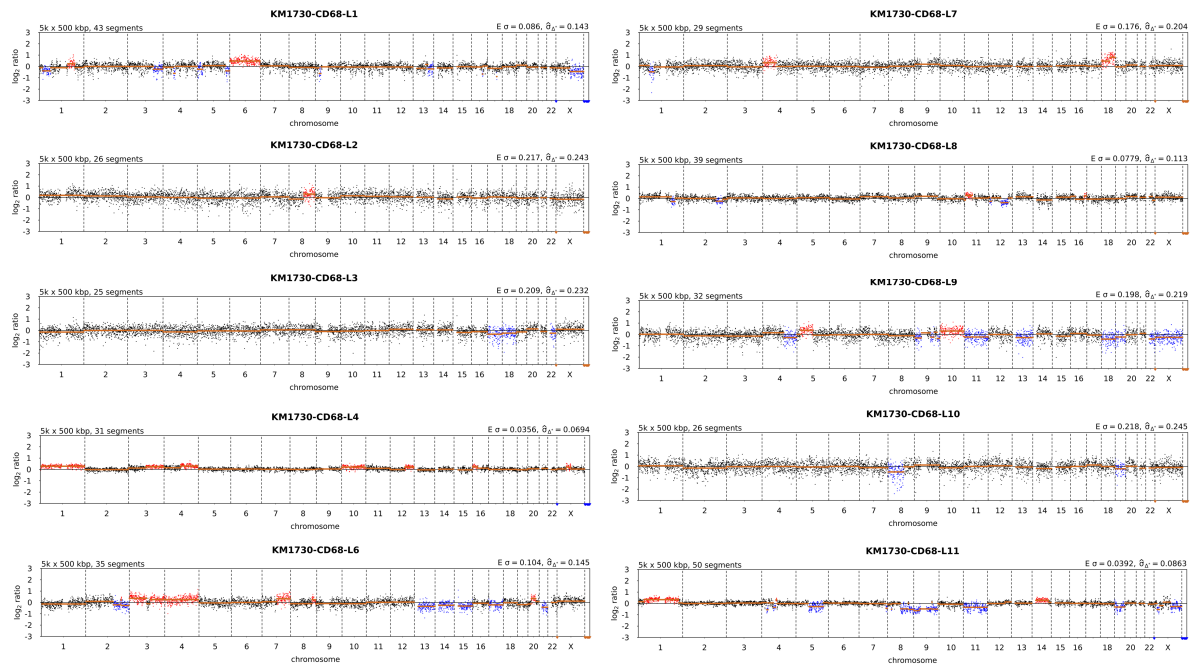
Anwender A



Anwender B



d CD68-positive Zellen nach LMD bei 40x Vergrößerung (Anwender A)



e CD68-positive Zellen ohne LMD (Anwender A)

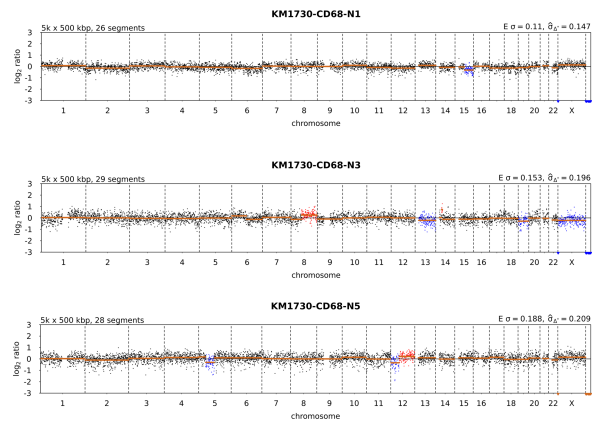
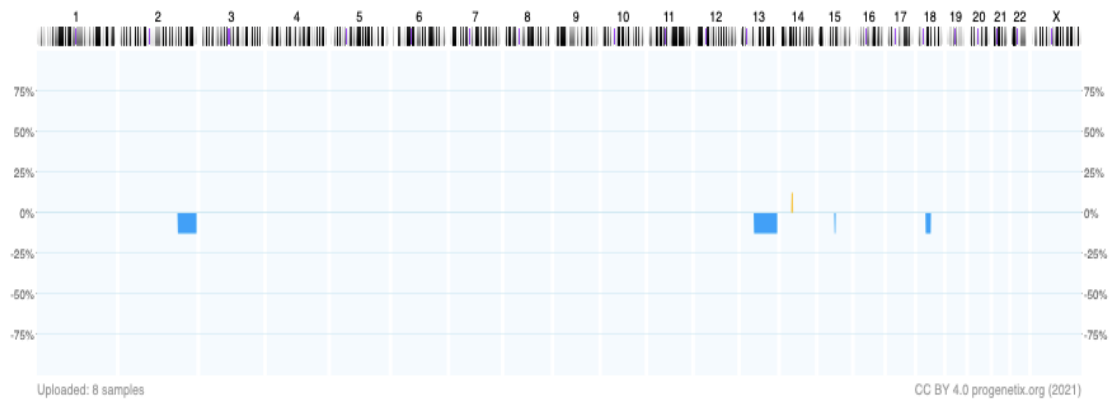


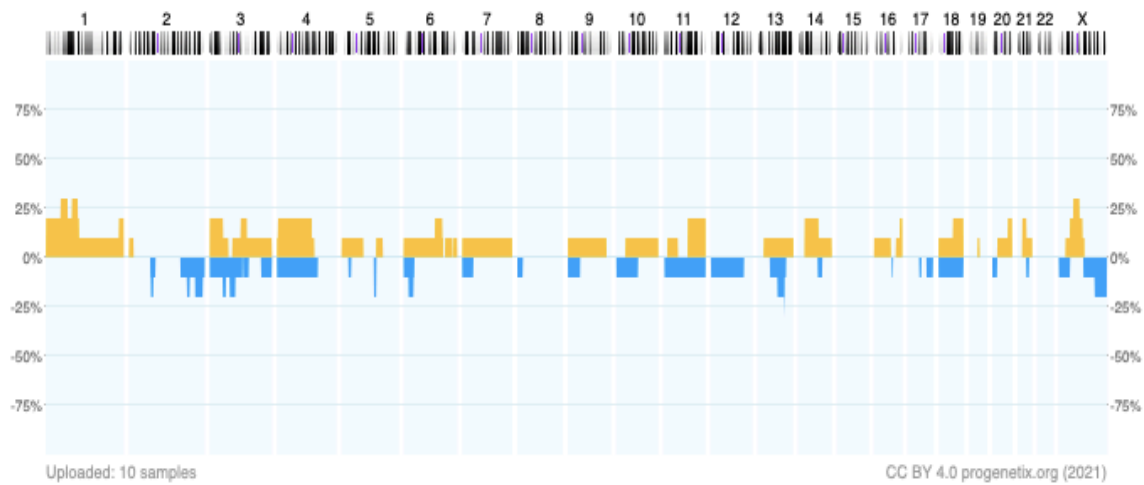
Abb. 7.1: CNV-Profile der Kontrollzellgruppen

a: CK-negative Zellen nach LMD beider Operatoren (LMD bei einer Vergrößerung von 40x). b: CK-negative Zellen nach LMD beider Operatoren (LMD bei einer Vergrößerung von 63x). c: CK-negative Zellen ohne LMD beider Operatoren. d: CD68-positive Zellen nach LMD (LMD bei einer Vergrößerung von 40x) e: CD68-positive Zellen ohne LMD

CK-negative und CD68-positive Kontrollzellen ohne LMD



CK-negative Kontrollzellen mit LMD



CD68-positive Kontrollzellen mit LMD

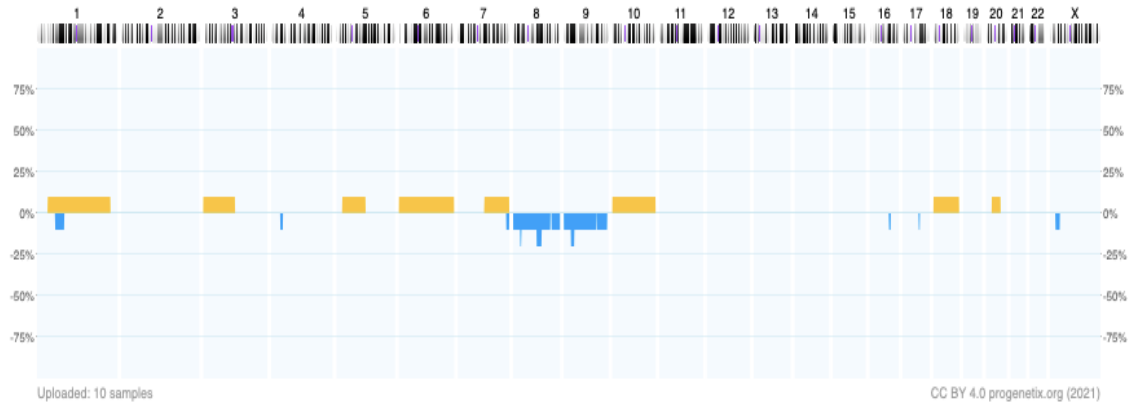


Abb. 7.2: Kumulative CNV-Profile de Kontrollzellgruppen
Gelbe Balken stellen Genamplifikationen dar, blaue Balken Genverluste.

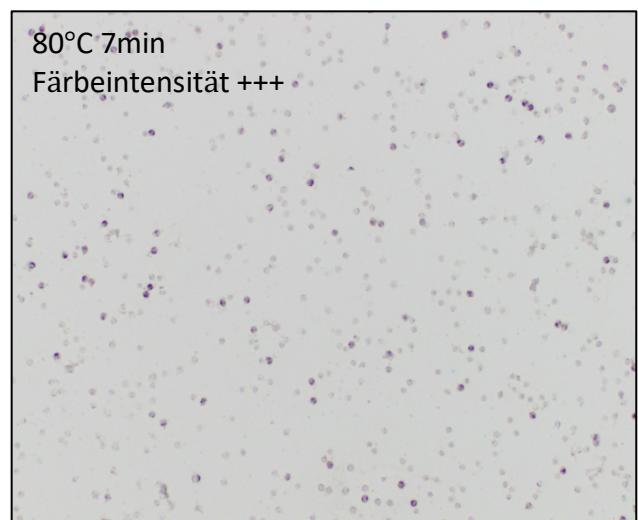
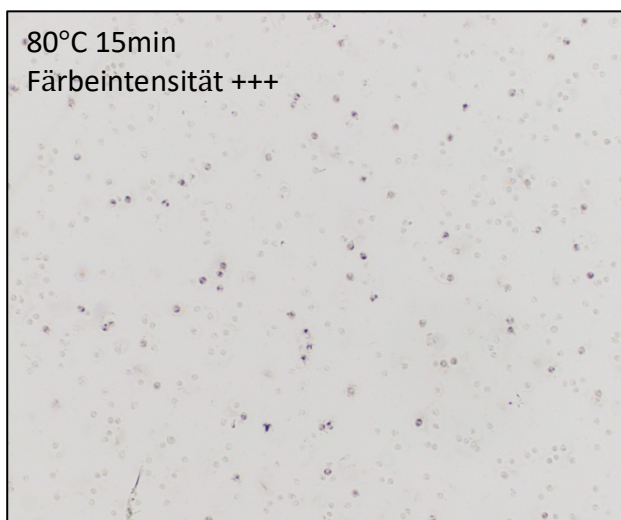
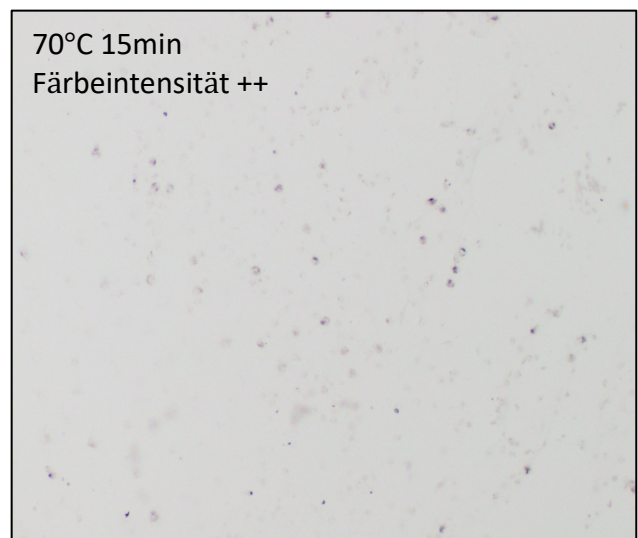
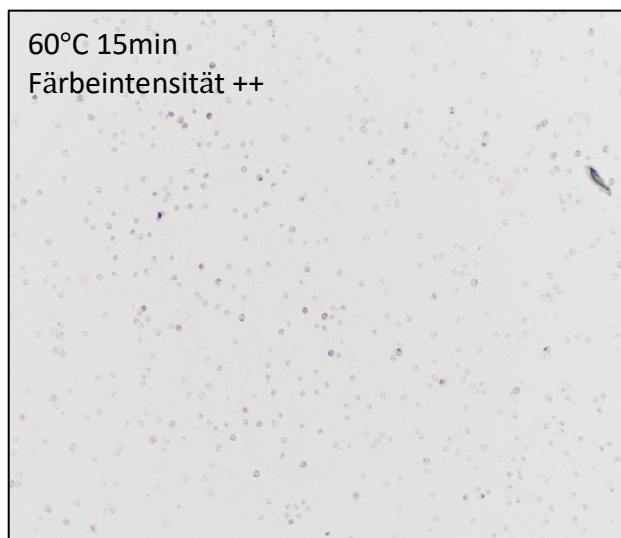
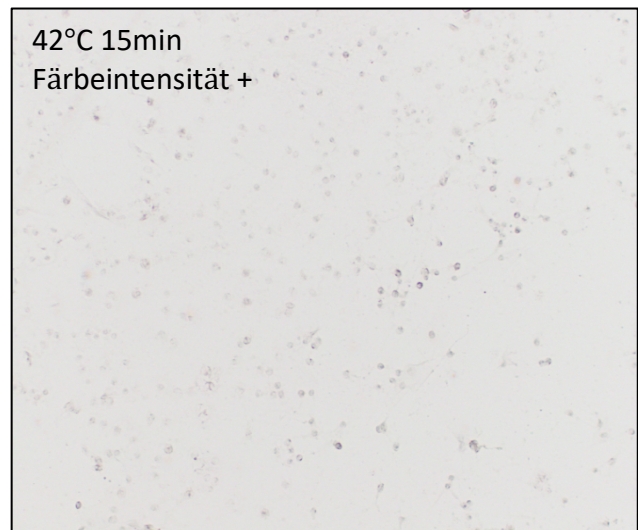
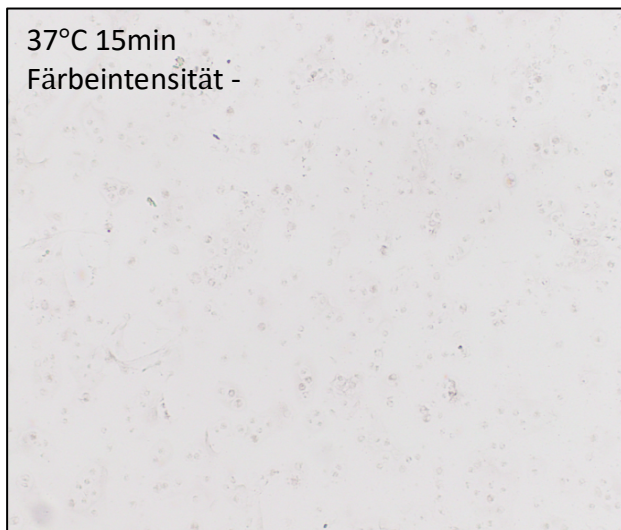


Abb. 7.3: CD68-Färbeergebnisse nach dem HIAR

Bei einer HIAR mit einer Erhitzung des Puffers auf 80 °C und einer Inkubationszeit von sieben Minuten finden sich zufriedenstellende Färbeergebnisse. Die Färbung erfolgte auf PBL-Objektträgern. Vergrößerung: 10X

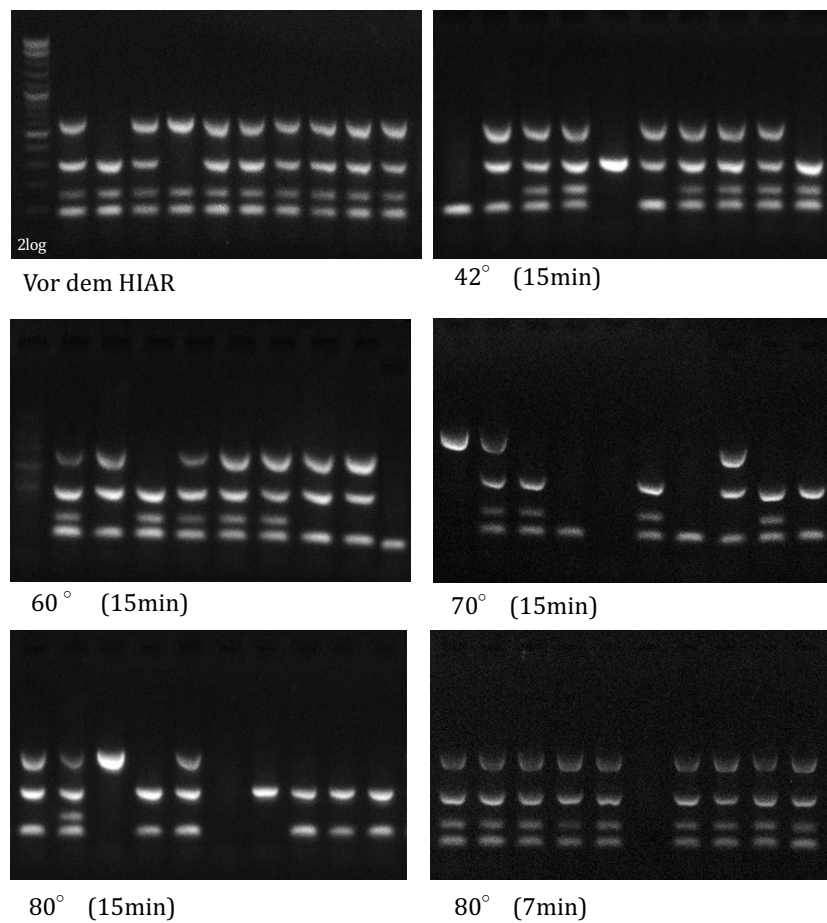
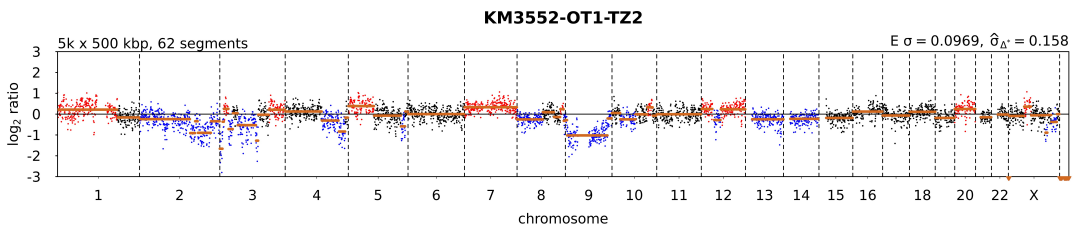
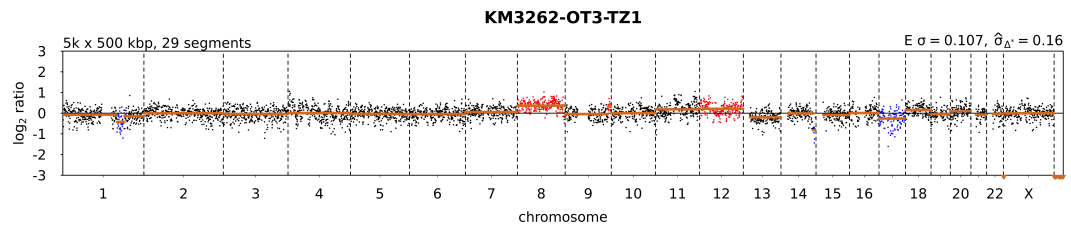


Abb. 7.4: Gelelektrophoresebanden von Kontrollzellen nach verschiedenen HIAR-Protokollen

Darstellung der DNA-Qualität mithilfe des GII der Kontrollzellen zu den angegebenen HIAR-Bedingungen (Temperatur des HIAR-Puffers in Grad Celsius und Einwirkdauer). Im ersten Gel sind die Referenzbanden als 2log-Ladder mit abgebildet. Die Zellen, die bei 80°C für 7 min behandelt wurden, wiesen im Gegensatz zu den Zellen, die bei 80°C für 15 min behandelt wurden, eine signifikant bessere, DNA-Qualität auf (Mann-Whitney-U $p=0,0005$).

01/2008



12/2008

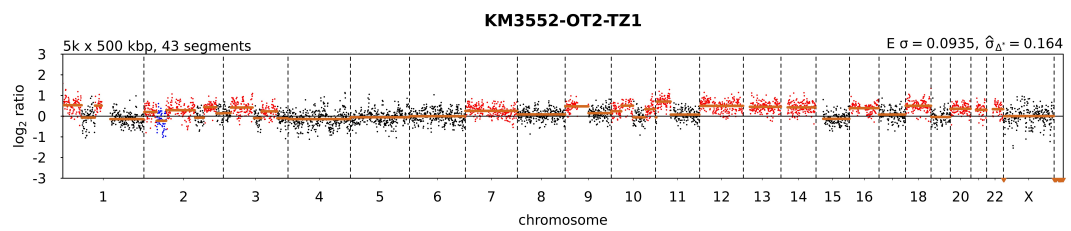
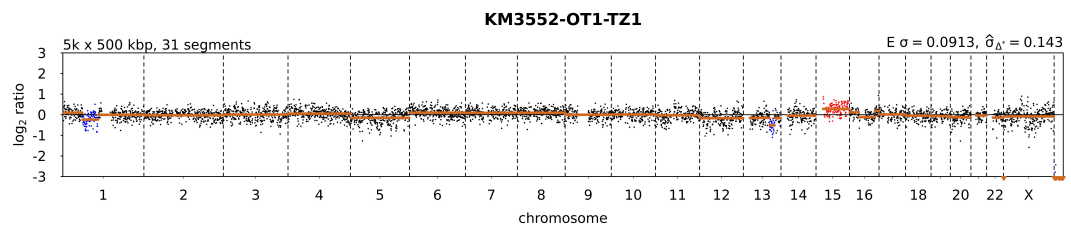
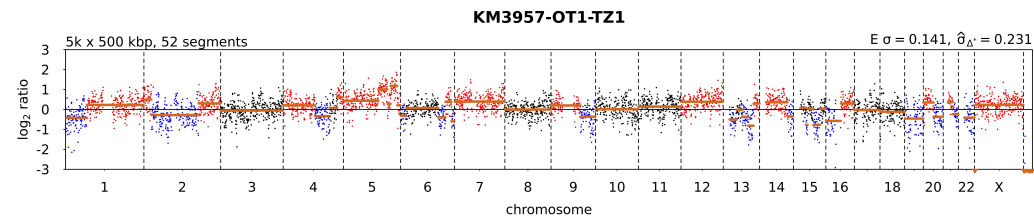
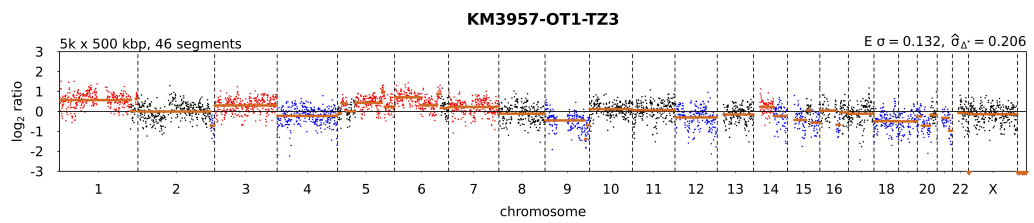
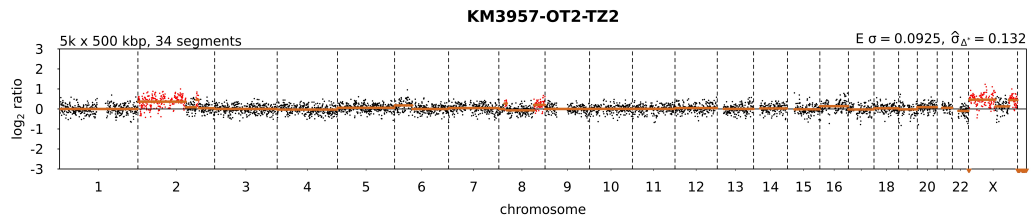
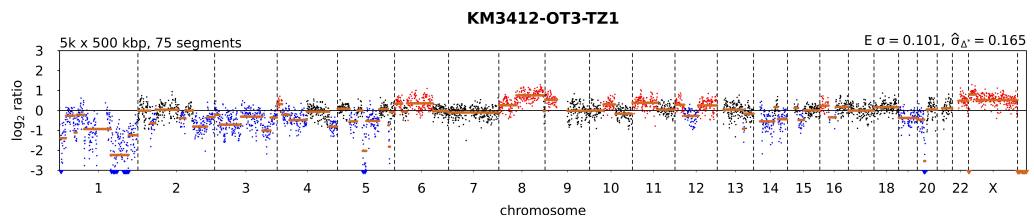
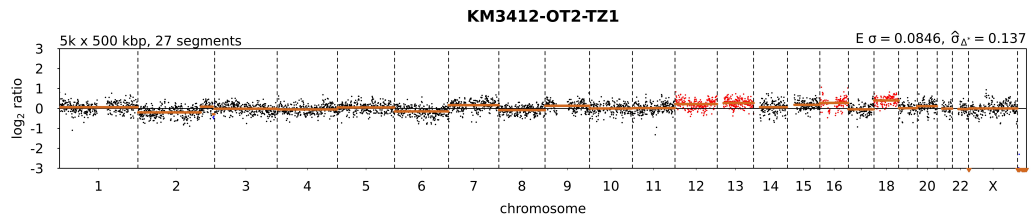


Abb. 7.5: CNV-Profil der Patientin 4.6 (M1)

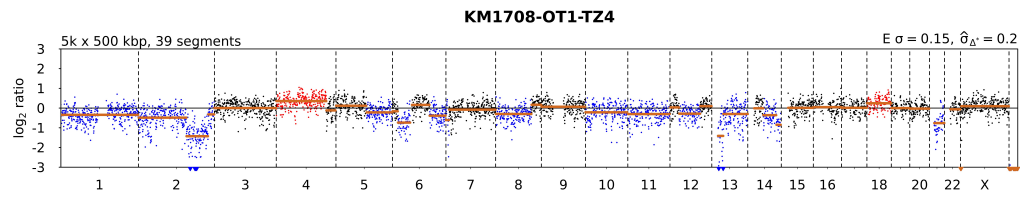
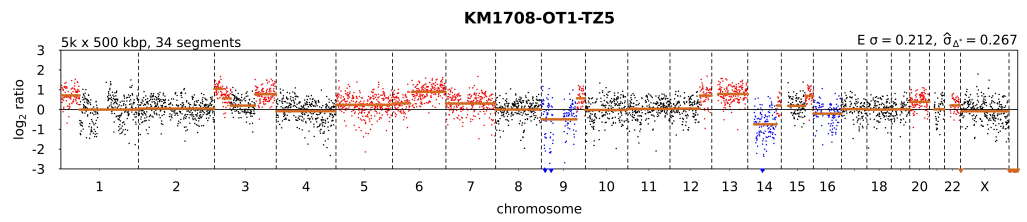
07/2008



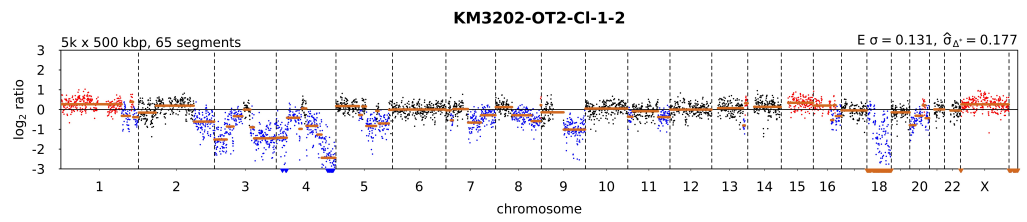
08/2010

Abb. 7.6: CNV-Profil der Patientin 5.7 (M1)

04/2002



12/2007



11/2008

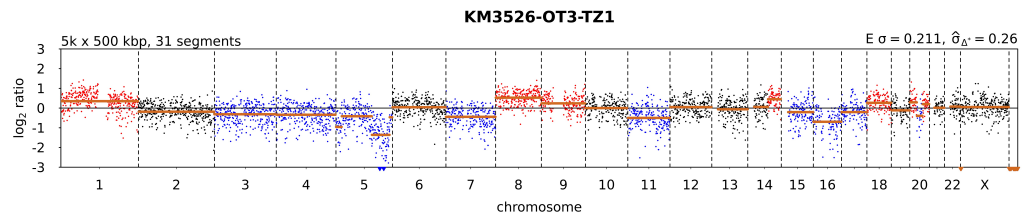
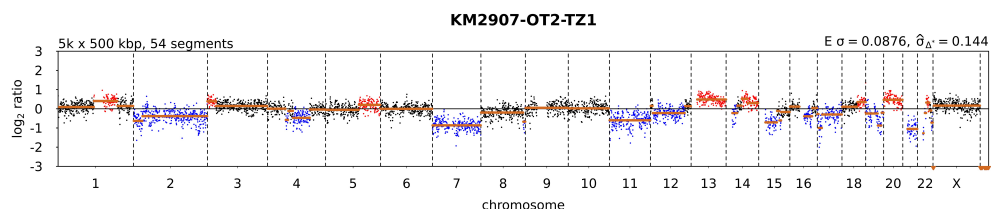
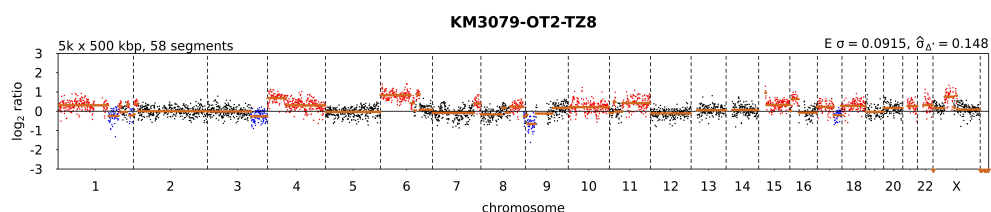
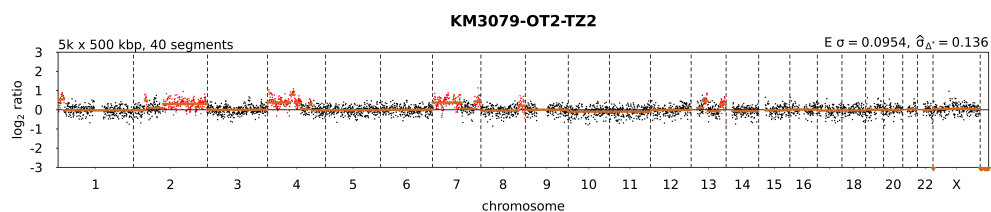


Abb. 7.7: CNV-Profile der Patientin 9.1 (M0)

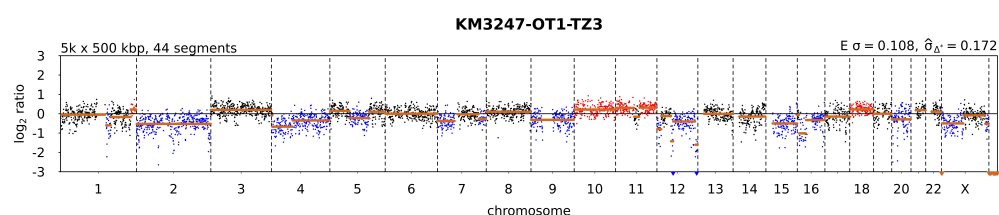
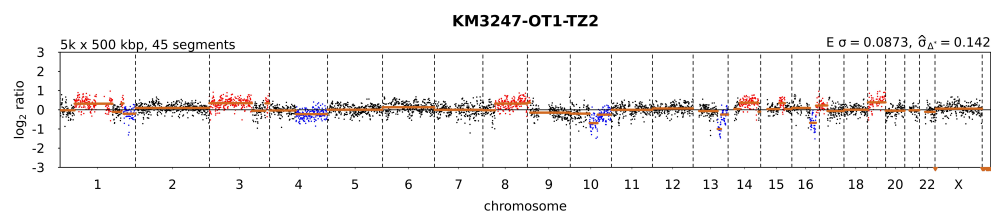
11/2006



11/2006



01/2008



04/2009

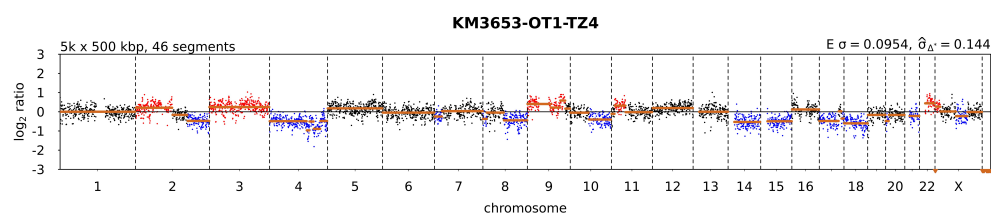
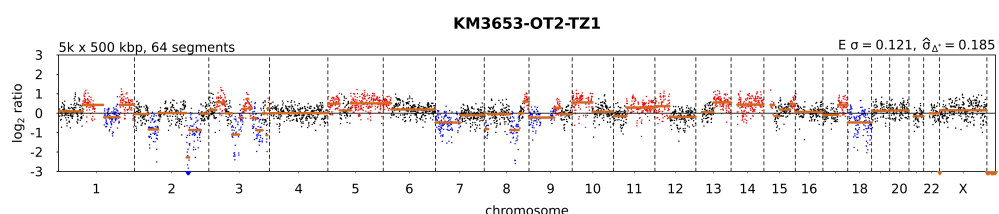
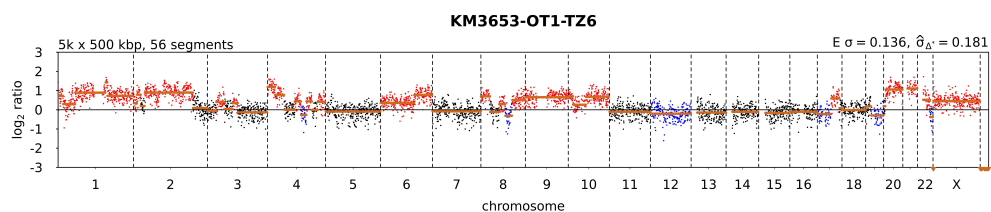


Abb. 7.8: CNV-Profil der Patientin 10.1

Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christoph Klein für die Bereitstellung des Themas sowie die Unterstützung in allen Phasen des Projekts mit regelmäßigen Treffen, vielen Anregungen und wertvollem Feedback. Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Lehrstuhls, insbesondere Frau Dr. Manjusha Ghosh für die Einarbeitung und intensive Mitbetreuung, für die vielen Ratschläge und die geduldige Beantwortung aller meiner Fragen.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Familie und bei Herrn Andreas Geiger bedanken, für die Unterstützung bei all meinen Vorhaben sowie für die aufbauenden Worte, wenn ich sie am meisten gebraucht habe.