

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

GENOMISCHE ANALYSE DISSEMINIERTER KREBSZELLEN AUS DEM KNOCHEN-
MARK VON BRUSTKREBSPATIENTINNEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kristina Killinger

2023

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

GENOMISCHE ANALYSE DISSEMINIERTER KREBSZELLEN AUS DEM KNOCHEN-
MARK VON BRUSTKREBSPATIENTINNEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kristina Killinger

2023

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christoph KLein
2. Berichterstatter:	PD. Dr. Stephan Seitz
Tag der mündlichen Prüfung:	27.11.2023

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1.	Das Mammakarzinom – epidemiologische Eckdaten	6
1.2.	Kurzer Einblick in die Klinik und Therapie des Mammakarzinoms	7
1.3.	Klassifikation und Tumorbiologie bestimmen die Prognose des Mammakarzinoms.....	8
1.4.	Auswanderung und Streuung der Krebszellen.....	10
1.5.	Disseminierte Tumorzellen – eine schlafende Gefahr?	13
1.6.	Zielsetzung und Forschungsfragen.....	14
2.	Materialien	15
2.1.	Kooperationspartner	15
2.2.	Ethik.....	15
2.3.	Reagenzien, Enzyme, Chemikalien.....	15
2.4.	Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	17
2.5.	Primer und Nucleotide	19
2.6.	Datenbanken und Software.....	20
3.	Methoden	22
3.1.	Knochenmarkaufbereitung.....	23
3.2.	Immunzytochemische Färbung und mikroskopisches Screening	23
3.3.	Einzelzellisolierung	25
3.4.	Amplifikation genomischer DNA von isolierten Einzelzellen.....	26
3.5.	Qualitätskontrolle der Amplifikation (nach 65)	30
3.6.	Agarose-Gelelektrophorese	31
3.7.	Re-Amplifikation von WGA-Proben.....	32
3.8.	Genamplifikationsanalyse durch quantitative Polymerasekettenreaktion	33
3.9.	Somatische Punktmutationsanalyse durch Sanger-Sequenzierung	37
3.10.	Aufarbeitung und DNA-Isolierung von Primärtumorgewebe	39
3.11.	Qualitätskontrolle der Amplifikation von DNA aus FFPE-Primärtumorgewebe	41
3.12.	Kopienzahlveränderungsanalyse durch Array-basierte komparative genomische Hybridisierung	44

3.13.	Kopienzahlveränderungsanalyse durch Low-Pass-Sequenzierung	48
3.14.	Statistische Auswertung	57
4.	Ergebnisse.....	58
4.1.	Detektion und Isolierung von DCCs.....	60
4.1.1.	Das Patientenkollektiv-deskriptive Analyse der histopathologischen Eigenschaften des Primärtumors	61
4.1.2.	Korrelation zwischen CK-Positivität und klinischen Daten	63
4.2.	Gewinnung von Bulk-DNA aus FFPE-Primärtumorblöcken.....	65
4.3.	Genomische Analysen der Einzelzellen	66
4.3.1.	Ergebnisse der Genamplifikationsanalyse	66
4.3.2.	Ergebnisse der Mutationsanalyse	68
4.3.3.	Ergebnisse der Kopienzahlanalyse der Einzelzellen und Primärtumoren	70
4.3.3.1.	Qualitätskontrolle und Abgleich der Methoden zur Kopienzahlanalyse	70
4.3.3.2.	Ergebnisse der graphischen Auswertung der CNA-Profile.....	72
4.3.3.3.	Chromosomenanalyse der aberranten DCCs und Primärtumoren	73
4.3.3.4.	Vergleich der Zellmorphologie dreier Patientinnen und deren generierten CNA-Profilen.....	77
4.3.3.5.	Vergleich der Kopienzahlanalyse mit den Ergebnissen der Amplifikations- und Punktmutationsanalyse	79
3.4.	Statistische Auswertung	79
3.4.1.	Korrelationen zwischen Drivermutationen und dem Auftreten genomisch aberranter CNA-Profile	79
3.4.2.	Testung auf klinische Signifikanz der Untersuchungsergebnisse	82
4.	Diskussion.....	85
4.1.	Stärken und Limitationen der Studie.....	85
4.2.	DCCs können bereits in frühen Stadien des Mammakarzinoms nachgewiesen werden und haben das Potential nach neoadjuvanter Chemotherapie zu persistieren	86
4.3.	Nur wenige DCCs zeigen zum Zeitpunkt der Primäroperation Drivermutationen	88
4.3.1.	MYC.....	88
4.3.2.	ERBB2	89
4.3.3.	FGFR1	89
4.3.4.	CCND1.....	90
4.3.5.	TP53	90
4.3.6.	PIK3CA	91
4.4.	Nur ein Fünftel der DCCs entpuppt sich als echte Tumorzellen	92
4.5.	Genetische Heterogenität zwischen DCCs und Primärtumoren	92

4.5.1. Balanciertes PT-Profil und balanciertes bzw. aberrantes DCC-Profil.....	92
4.5.2. Aberrantes PT-Profil und balanciertes bzw. aberrantes DCC-Profil.....	93
5. Zusammenfassung	94
6. Tabellenverzeichnis	96
7. Abbildungsverzeichnis.....	97
8. Literaturverzeichnis	101
9. Danksagung	116
10. Eidesstattliche Erklärung.....	116

1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom – epidemiologische Eckdaten

Brustkrebs ist die zweithäufigste Krebsart weltweit und somit ein globales Gesundheitsproblem (1). Gleichzeitig ist das Mammakarzinom die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau (Abbildung 1) (2) und verantwortlich für die höchste tumorspezifische Mortalität des weiblichen Geschlechts (3). Für das Jahr 2018 schätzte die IACR (*International Association on Research of Cancer*) die Brustkrebs Inzidenz auf 2,09 weltweit mit einer Mortalität von 626700 (2). Deutschland registrierte 2013 rund 72300 Neuerkrankungen, davon waren circa 1% männliche Brustkrebspatienten. Die Mortalität im gleichen Jahr lag bei etwa einem Viertel der Neuerkrankungen. Circa 316.000 Frauen lebten 2013 mit einer Brustkrebserkrankung, die in den davor liegenden fünf Jahren zum ersten Mal diagnostiziert wurde, in Deutschland. Die Inzidenzraten sind weltweit seit 1970 stark angestiegen und haben sich in manchen Ländern, wie Deutschland, verdoppelt. Die altersabhängige Sterblichkeit zeigt sich dahingegen langfristig rückläufig (4). 5-Jahres-Überlebensraten variieren zwischen 74 % (Osteuropa) und 85% (Nordeuropa) innerhalb Europas (5). Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 64 Jahre und in Deutschland hatte eine Frau bislang ein Lebenszeitrisko von 12.8% an Brustkrebs zu erkranken (6). Ungefähr 30% aller Frauen mit einem Mammakarzinom in Deutschland haben eine familiäre Vorbelastung (7).

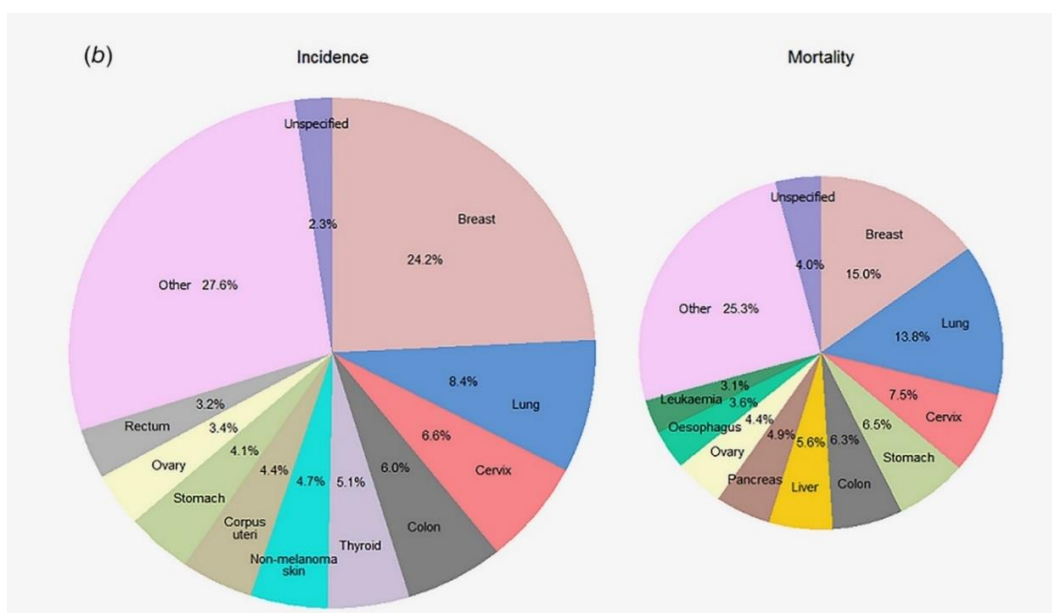


Abbildung 1: Prozentuale Anteile der Krebsentitäten an der weltweiten Krebsinzidenz und Krebsmortalität (2)

1.2. Kurzer Einblick in die Klinik und Therapie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist eine heterogene Erkrankung, welche größtenteils aus dem Drüsengewebe der Brust entsteht. Dabei gehen die meisten bösartigen Tumore von den Drüsenläppchen, den Lobuli, oder von den Milchgängen, den Dukti, aus (8).

Die größten Risikofaktoren an einem Mammakarzinom zu erkranken sind hereditäre, endokrine und toxische Faktoren sowie der Zustand nach Erkrankung an Mammakarzinom der kontralateralen Seite. Unter hereditären Risikofaktoren unterscheidet man genetische Krankheitsbilder, wie zum Beispiel eine Keimbahnmutation in den *BRCA1/2*- und *RAD1*-Genen, von anamnestisch familiärer Vorbelastung. Zu den endokrinen Risikofaktoren gehören: 1) eine frühe Menarche, 2) späte Menopause, 3) späte Gravidität, 4) Adipositas bzw. postmenopausale Gewichtszunahme, 5) Hormonersatztherapie postmenopausal. Noxen, die das Brustkrebsrisiko steigern, beinhalten eine Strahlensexposition im Kindesalter, Rauchen und hohen Alkoholkonsum (9).

Die klinischen Symptome des Mammakarzinoms sind in den frühen Stadien der Erkrankung unauffällig und die Therapie beruht maßgeblich auf dem pathologischen Befund des Primärtumors. Zum einen werden durch das Mammographie-Screening und zum anderen durch auffällige Tastbefunde Frauen mit Brustkrebs erkannt (7). Zu den typischen klinischen Zeichen des Brustkrebs gehören: 1) unscharf begrenzte, nicht verschiebbare und schmerzlose Verhärtungen/Knoten, 2) Hauteinziehungen, Hautödeme oder Erytheme, 3) Orangenhaut, 4) Mamillenretraktion bzw. Sekretion aus den Mamillen, 5) Vergrößerung der axillären/supraklavikulären Lymphknoten und bei fortgeschrittenem Stadien auch Exulzerationen und Panzerkrebs (10).

Die zwei wichtigsten Faktoren für ein langes Überleben bei Brustkrebs sind die frühe Detektion und effektive Therapie desselben (11). Eine frühe Detektion ermöglicht es eine Metastasierung möglicherweise aufzuhalten und zusätzlich eine weniger aggressive Therapieform zu wählen, um die therapie-assoziierte Morbidität zu senken. Die therapeutischen Standards des Mammakarzinoms in Deutschland sind durch die S3-Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie definiert (7). Grundbaustein aller nicht-fortgeschrittenen Tumorerkrankungen ist die operative Resektion des Malignoms in sano (12). Während der Operation sollte ein axilläres Staging mittels Sentinellymphknotenbiopsie zum Ausschluss einer beginnenden lymphogenen Streuung erfolgen (13). Das Vorhandensein von Metastasen kann präoperativ

mittels Bildgebung ausgeschlossen werden (7). Postoperativ sollte nach brusterhaltender Operation eine Bestrahlung der betroffenen Brust zur Verringerung des Rezidivrisikos erfolgen (14,15). Die Entscheidung zur systemisch adjuvanten oder neoadjuvanten Therapie und deren Auswahl zwischen endokrin, Chemo-, und/oder Antikörpertherapie hängt maßgeblich vom pathomorphologischen und molekularbiologischen Befund, dem Menopausenstatus und dem Alter der Patientin ab (7).

1.3. Klassifikation und Tumorbiologie bestimmen die Prognose des Mammakarzinoms

Die Prognose des Mammakarzinoms wird von vielen Faktoren bestimmt, welche histologisch und molekularbiologisch zur Therapieplanung ermittelt werden. Die histologische Klassifikation des Mammakarzinoms erfolgt weltweit nach dem Schema der WHO anhand der histomorphologischen Eigenschaften der Mehrzahl der Tumorzellen (16). Im Wesentlichen werden Tumore vom non-special type (NST) von denen eines special-types (ST) unterschieden, wobei Mammakarzinome vom NST mit 50-80% aller invasiven Arten die häufigsten sind (7). Weiterhin werden Primärtumore postoperativ anhand der pathologischen UICC TNM-Klassifikation eingeteilt (17). Um den Differenzierungsgrad der Tumorzellen auszudrücken, wird in Deutschland das histologische Grading nach Elston und Ellis angewandt (7,18). Das Grading zusammen mit Angaben zur Tumorgröße und Lymphknotenstatus machen eine Prognoseeinschätzung durch den Nottingham-Prognose-Index möglich (19,20). Zudem kommen in den Updates der großen Krebsgesellschaften wie der American Joint Commission for Cancer (AJCC) biomolekulare Prognosefaktoren zum initialen Staging hinzu. Diese beinhalten Proliferationsrate der Tumorzellen anhand des Ki67-Indexes, Östrogen- und Progesteronrezeptor-Expression, HER2-Expression und Expression bestimmter genetischer Panels (21). Eine Einteilung in biologische Subtypen, welche sowohl als prognostisch als prädiktiv wichtig gelten, wurde von der Internationalen St. Gallen Konferenz festgelegt und stetig überprüft (22,23) (Tabelle 1) Aufgrund der zeitlichen Spannbreite unseres Probenkollektivs und demzufolge fehlender Informationen (z.B. zum Ki67-Status) zur genauen Einteilung nach St. Gallen, wurde unsere interne Klassifikation in Anlehnung der oben genannten Einteilung geführt.

Tabelle 1: klinisch-pathologische Subtypen des Mammakarzinoms nach der Internationalen St. Gallen Konferenz (20)

Biologischer Subtyp	Eigenschaften/Notizen^a	Interne Klassifikation
Triple negative	Negativer ER, PR und HER2-Status	Triple negative

Hormonrezeptor negativ und HER2-positiv	ASCO/CAP Leitlinien	Her2-enriched
Hormonrezeptor positiv und HER2-positiv	ASCO/CAP Leitlinien	Luminal B-like
Hormonrezeptor positiv und HER2 negativ – ein Spektrum von ER+ und HER2 negativ <i>Hohe Rezeptordichte, niedrige Proliferation, niedriges Grading</i>	ER und/oder PR positiv $\geq 1\%$ Multiparameter molekularer Marker ‘gut’ wenn vorhanden. ^b Hoher ER/PR-Status und niedriger Ki-67-Status oder Grading.	Luminal-like, falls Ki-67 nicht bestimmt Luminal A-like
<i>Intermediat</i>	Multiparameter molekularer Marker ‘intermediat’ wenn vorhanden. Unsicherheit bleibt über den Grad des Risikos und des Ansprechens auf endokrine- oder Chemotherapien.	
<i>Niedrige Rezeptordichte, hohe Proliferation, hohes Grading</i>	Multiparameter molekularer Marker ‘schlecht’ wenn vorhanden. Niedriger ER/PR-Status mit hohem Ki-67 und/oder histologischem Grading 3.	Luminal B-like
<i>a= Basal-like und Her2-enriched können nur durch genomische Assays bestimmt werden b=Gentests spielen bei low-risk Tumoren keine Rolle (pT1a, pT1b, G1, ER high, pN0)</i>		

Genexpressionsanalysen haben seit 2000 die Taxonomie elementar verändert und führten zu einem Fortschreiten in der individualisierten Krebstherapie (24). Diese Individualisierung der Therapie ist von besonderer Wichtigkeit beim Einsatz neuester Therapieoptionen, wie z.B. den Checkpoint-Inhibitoren. Die Genanalysen der letzten Jahre haben gezeigt wie heterogen Brustkrebs als Erkrankung ist und wie wichtig die personalisierte Medizin im Kampf gegen den Krebs ist (25). In mehreren Studien (26–29) wurde gezeigt, dass zwischen den molekularen Subtypen ein signifikant unterschiedliches Überleben sowie metastatisches Verhalten und Rezidivrisiko vorherrscht (Abbildung 2). So überlebten in einer Studie von *Kennecke et. al (2010)* nach 10 Jahren am meisten Patientinnen mit Luminal-A-like Brustkrebs (70%) verglichen mit Luminal-B-like (54.4%), HER2+- (48.1%) und Triple-negativem Brustkrebs (62.6%) (27).

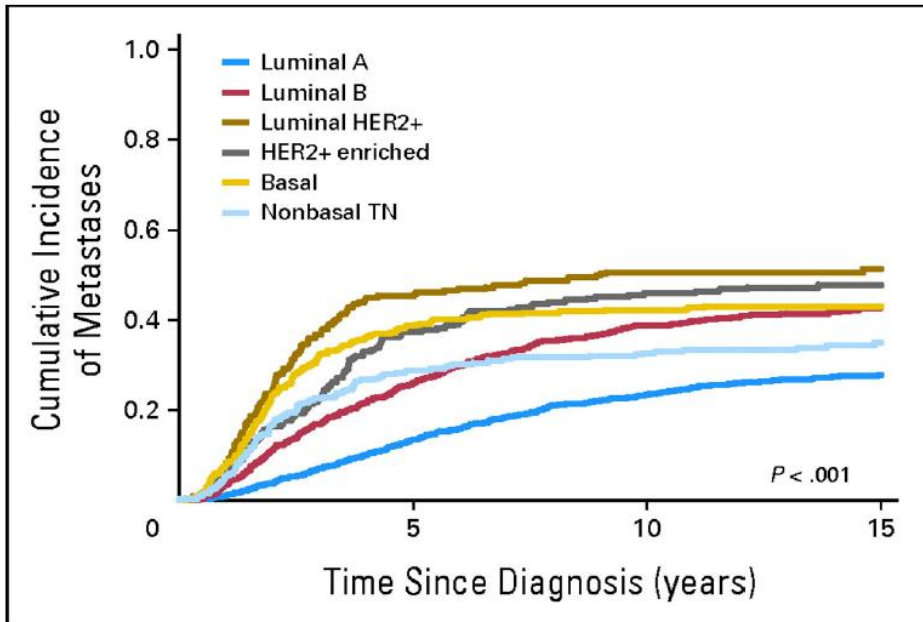


Abbildung 2: Kumulative Inzidenzkurven für Metastasen in Brustkrebssubtypen unterteilt. HER2, human epidermal growth factor receptor 2; TN, triple negative (27).

In dieser Arbeit wird vorwiegend auf die vier Subtypen: Triple-negative, HER2-positiv, Luminal A-like and Luminal-B-like, bzw. zusammengefasst in Luminal-like eingegangen.

1.4. Auswanderung und Streuung der Krebszellen

Ein Großteil der Krebsforschung dieser Tage bezieht sich auf den Prozess der Metastasierung. Der Begriff der „Metastase“ wurde schon 1829 von Jean Claude Recamier (30) verwendet und wird als *“der Transfer der Erkrankung von einem singulären Organ oder Teilorgan zu einem nicht zusammenhängenden anderen Organ”* definiert (31). Wie, auf welchem Wege und wann Zellen aus dem Verband eines soliden Tumorgewebes auswandern und welche Anpassungsmechanismen sie durchlaufen sind essenzielle Fragen, um neue therapeutische Strategien gegen Metastasen zu entwickeln.

Wie: Ein prominenter Erklärungsansatz, warum Zellen es schaffen den Primärtumor zu verlassen und sich in anderen Organen anzusiedeln, ist das Epithelial-Mesenchymal-Transition-Programm (EMT) (32,33), welches bereits aus der Embryologie bekannt ist (34). Verlust der Zelladhäsion, Invasionsfähigkeit in die Tumorumgebung, Intra- und Extravasation und Überlebensfähigkeit im fremden Gewebe hängen laut dem Modell mit der Transition von einem epithelialen Phänotyp der Tumorzelle zu einem mesenchymalen Phänotyp zusammen (35). Diese mesenchymalen Eigenschaften akquirieren Tumorzellen durch extra- und intrazelluläre

Signalwege und die daraus resultierende Aktivierung von EMT-Transkriptionsfaktoren, welche unter anderem epitheliale Marker unterdrücken. Diese Vorgänge werden durch Interaktionen mit dem Mikromilieu, wie zum Beispiel der Ausschüttung von Proteasen oder Zytokinen sowohl durch Tumor- als auch Stromazellen, komplementiert. Hierbei schaffen die Zellen es sich vom Tumorgewebe zu lösen und auszuwandern (32,36,37).

Weg: Brustkrebszellen können auf zwei verschiedene Wege andere Organe erreichen: durch die Lymphbahn oder direkt durch die Blutzirkulation (38–40). Für das Mammakarzinom wurde ein organspezifisches Streuungsmuster gezeigt (Abbildung 3). Dabei streut der Brustkrebs vornehmlich über das Herz in die Lunge, wo Zellen das Kapillarbett überwinden müssen, und von dort aus in den Knochen, das Gehirn und die Leber wandern. Zellen, welche über die Lymphe auswandern, werden erst in das venöse System ausgeschüttet, um dann den eben beschriebenen Weg zu machen (41).

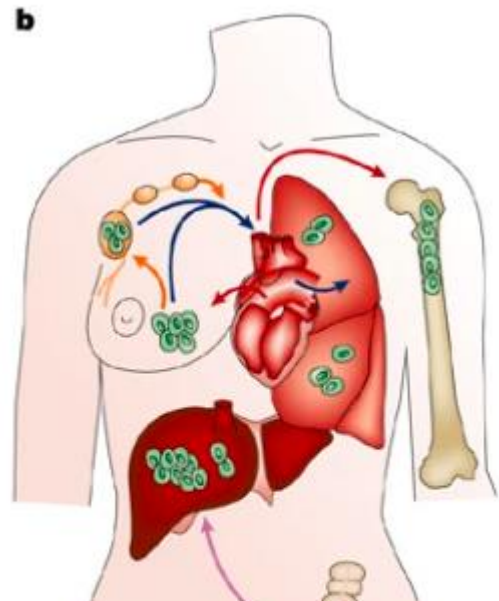


Abbildung 3: Hämatogene Streuung von Brustkrebs verglichen mit Darmkrebs. Brustkrebs streut seine Zellen über das Herz-Lungen-System, wohingegen Darmkrebs in das hepatoportale System streut (41)

Wann: In der heutigen Metastasenforschung gibt es unterschiedliche Paradigmen zum zeitlichen Verlauf der Metastasierung. Während in früheren Studien die Entwicklung von Metastasen auf eine kontinuierliche Expansion des Primärtumors durch Anhäufung von Mutationen (Abbildung 4) zurückgeführt wurde und entsprechend radikale Mastektomien mit Axilladissektionen als Heilungsversuche angewandt wurden (42,43), geht man heute vermehrt von einer frühen Dissemination einzelner Tumorzellen aus und wendet dementsprechend zusätzlich zu den lokal chirurgischen auch systemische Therapien an (44–46).

Bei dem Modell der späten Dissemination sammelt die disseminierte Zelle ihre Mutationen innerhalb des Primärtumors an und kann dementsprechend wie der Primärtumor behandelt werden. Wandert die disseminierte Zelle jedoch in einem früheren Stadium aus, kann sie sich vor allem durch die veränderte Umgebung anders entwickeln als der Primärtumor und Metastasen müssten dementsprechend differenzierter behandelt werden (Abbildung 5) (47). Dies bietet eine mögliche Erklärung für die Tatsache, dass die Behandlung auf Grundlage der Molekularpathologie des Primärtumors bis heute kein erfolgsbringender Ansatz zur Bekämpfung einer bereits disseminierten Tumorerkrankung ist (48).

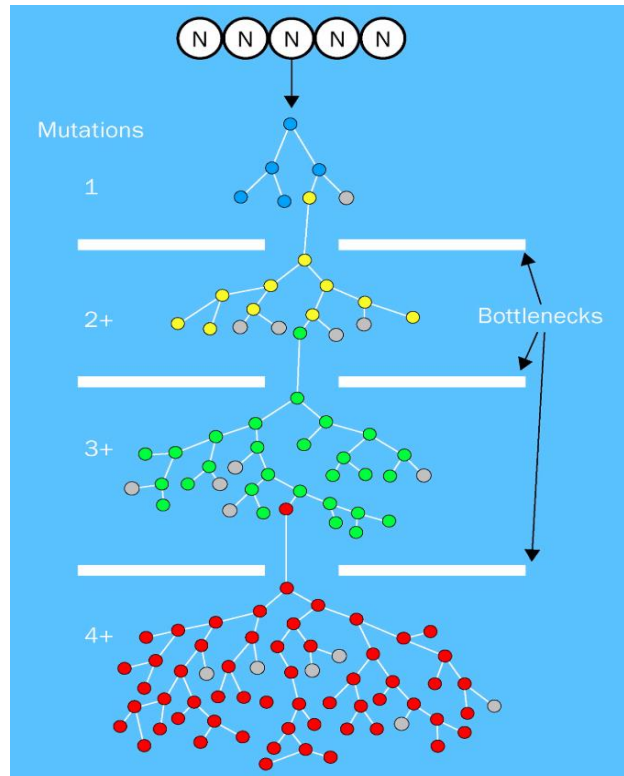


Abbildung 4: Klonale Evolution des Tumors anhand Darwinistischer Prinzipien: Proliferation, genetische Diversifikation und Mutationen durch selektiven Druck an den "Bottlenecks" (Apoptose, Immunantwort, Gegebenheiten der biologischen Nische). N= Normalzelle (42)

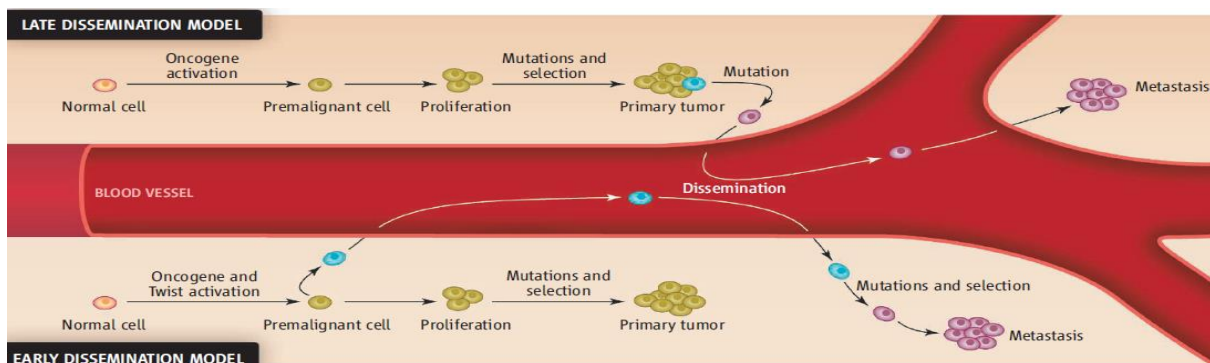


Abbildung 5: Späte vs. frühe Dissemination und deren Auswirkung auf den Geno- und Phänotyp von Metastasen (47)

1.5. Disseminierte Tumorzellen – eine schlafende Gefahr?

Auch wenn Studien gezeigt haben, dass nur sehr wenige Zellen die Fähigkeit haben eine Makrometastase zu formen, so können in 20-60 % der Fälle zum Zeitpunkt der Primär-OP in M0-Patientinnen Tumorzellen in der Blutzirkulation, so genannte zirkulierende Tumorzellen (CTCs), und im Knochenmark oder Lymphknoten, so genannte disseminierte Tumorzellen (DCCs), gefunden werden (36,49). Diese Zellen bilden die Grundlage für ein Phänomen, welches minimale Resterkrankung/Minimal Residual Disease (MRD) genannt wird (50). Diese minimale Resterkrankung ist bis jetzt in der Standarddiagnostik und Nachsorge nicht erkennbar, führt aber zu einer Erhöhung des Risikos für ein Lokalrezidiv und für eine Metastasierung. Im Mittel wurde ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Metastasen auf 5-6 Jahre nach Erstdiagnose des Mammakarzinoms geschätzt (48,51). In Zusammenschau dessen, dass schon bei Erstdiagnose DCCs zu finden sind, aber die Diagnose der Metastasierung oder des Lokalrezidivs Jahre später erst gestellt werden kann, wird von einer Latenzphase/Dormancy der DCCs ausgegangen. Dieser Mechanismus, welcher noch nicht ausreichend erforscht ist, könnte ein Grund für ein Nichtansprechen dieser Zellen auf Systemtherapien sein (52). Ein weiterer Grund für die Therapieresistenz könnte in der genomischen Heterogenität zwischen Primärtumor und DCCs liegen, was durch die parallele Progression der beiden erklärt werden könnte (53,54). Dass ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten ausgewanderter Zellen (CTCs und DCCs) und dem Risiko ein Rezidiv oder einen Krankheitsprogress zu erleiden besteht, wurde in mehreren Forschungsprojekten bestätigt (55–60). Welche Faktoren dazu beitragen, dass eine DCC in den Status der „Dormancy“ übergeht oder diesen auch wieder verlässt, ist bislang unklar. Die genetische Analyse der in unserer Studie isolierten DCCs soll Licht ins Dunkle der DCC-Genetik bringen.

Als erster Ausgangspunkt für diese Analysen diene uns das Landschaftsbild der Tumorgene, welches von *Stephens et. al* (2012) veröffentlicht wurde. In dieser Studie wurden die Genome von 100 Brusttumoren auf somatische Kopienzahlveränderungen und Mutationen in protein-kodierenden Exonen untersucht und in Driver- und Passengermutationen unterteilt. Drivermutationen sollen im Gegenteil zu Passengermutationen kausal mit der Onkogenese des Brustkrebses zusammenhängen und somit einen Vorteil im Selektionsprozess darstellen (61). Abbildung 6 zeigt die am häufigsten in den 100 untersuchten Tumoren gefundenen Drivermutationen. Wir beschränkten unsere genetischen Analysen auf sechs der sieben häufigsten Tumorgene mit Drivermutationen: TP53, PIK3CA, ERBB2, MYC, FGFR1 und CCND1.

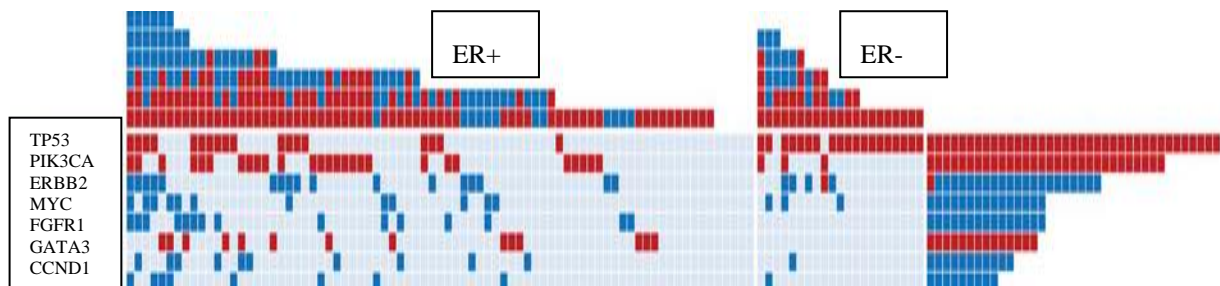


Abbildung 6: Drivermutationen des Brustkrebses nach Stephen et al. (2012); rot=Punktmutationen, blau=Kopienzahlveränderungen; Anzahl der 40 Drivermutation in den 100 Tumoren in Zeilen, Anzahl der Drivermutationen in einzelnen Tumor in Spalten, adaptiert aus (61)

1.6. Zielsetzung und Forschungsfragen

Auch wenn die Gesamtmortalität des Brustkrebses zurückgeht, so verstirbt doch die Mehrzahl aller Brustkrebspatientinnen an den Folgen einer Metastasierung (62). Es ist daher von großer Wichtigkeit die Prozesse zu verstehen, welche zur Entwicklung von Metastasen führen. Hierzu gehört das Verständnis der Rolle der früh disseminierten Tumorzellen, welche im Knochenmark zu finden sind.

Ziel dieser Forschungsarbeit war demnach die Detektion von früh disseminierten Tumorzellen aus Knochenmarkspalten von Brustkrebspatientinnen zur Analyse der Prävalenz von DCCs. Weiterhin war es Ziel der Studie die Prävalenz der häufigsten Drivermutationen der Brustkrebsentität aus den isolierten DCCs zu bestimmen und gemeinsame Subtyp-relevante Kopienzahlveränderungen sowohl im Genom der isolierten DCCs als auch der korrespondierenden Primärtumorproben zu finden. Zuletzt erfolgte die Korrelation zwischen dem klinischen Outcome der Patientinnen und dem Vorkommen von DCCs, Drivermutationen, aberranten Genprofilen und gemeinsamen Genveränderungen. Daraus ergeben sich folgende Forschungsfragen:

1. Wie hoch ist die Prävalenz von DCC-positiven Brustkrebserkrankungen in unserer Gruppe?
2. Wie hoch ist die Prävalenz der sechs häufigsten Drivermutationen in DCCs in unserer Forschungspopulation?
3. Welche gemeinsamen Genveränderungen haben DCCs nach Subtyp stratifiziert?
4. Besteht eine Assoziation zwischen DCC-Vorkommen und Lokalrezidiv-/Metastasierung-/ Überlebensrate?

5. Besteht eine Assoziation zwischen dem Vorkommen der sechs häufigsten Drivermutationen in DCCs und Lokalrezidiv-/Metastasierung-/ Überlebensrate?

2. Materialien

2.1. Kooperationspartner

Im Zeitraum von 2004 bis 2015 erhielten wir Knochenmarkaspirate oder fertig-aufgearbeitete Haftobjektträger mit mononukleären Zellen aus dem Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom von den folgenden Kliniken: Zentralkrankenhaus Augsburg (II. Innere Medizin), Caritas Krankenhaus Sankt Josef Regensburg (Frauenheilkunde) und Universitätskrankenhaus München (Frauenheilkunde). Methodische Unterstützung erhielten wir vom Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin und dem Institut für Pathologie der Universität Regensburg.

2.2. Ethik

Schriftliches Einverständnis über die weitere Verwendung von Knochenmarkaspiraten zu Forschungszwecken wurde in den jeweiligen Kliniken von allen Patientinnen eingeholt. Für die Verwendung der Patientenproben zum Zwecke der Forschung liegt ein Ethikvotum (07/079) der Ethikkommission Regensburg vor.

2.3. Reagenzien, Enzyme, Chemikalien

Artikel	Firma
4',6'- Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI), 10mg	Roche Diagnostics GmbH
Ab-Serum, human	BIO Rad
ACK Lyse Puffer	Life Technologies GmbH
Acrylamid, 40 %	Merck
Agarose	Sigma
Agarose LE	Anprotec
Albumin Rinderserum (BSA), Fraktion V	Sigma
Albumin Rinderserum (BSA), Mol-Biol. 20mg/ml	Roche Diagnostics GmbH
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck
Ampli1 LowPass Kit for Illumina - Set A Reagents	Menarini Silicon Biosystems
Ampli1 LowPass Kit for Illumina - Set B Reagents	Menarini Silicon Biosystems
AMPure XP Beads	Beckman Coulter
AP-Polymer anti-Mouse	Zytomed Systems

Aqua ad injectabilia	Braun
ATP Lsg.40 75 100mM	Roche Diagnostics GmbH
BCIP/NBT (AP conjugate substrate Kit)	BIO Rad
Borsäure (H3BO3)	J.T. Baker
BSA	Sigma Aldrich GmbH
Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP), 10mM	GE Healthcare Europe GmbH
Desoxy-Cytosintriphosphat (dCTP), 10mM	GE Healthcare Europe GmbH
Desoxy-Guanintriphosphat (dGTP), 10mM	GE Healthcare Europe GmbH
Desoxy-Thymidintriphosphat (dTTP), 10mM	GE Healthcare Europe GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	BioChem
Dithiothreitol (DTT), 0,1 M	Molecular Probes
DNA Größenstandard 2-Log-DNA-Ladder (0,1-10 kb)	Molecular Probes
DNA Polymerase Mix	Roche Diagnostics GmbH
DNA Tag-Polymerase, 5 U/µl	Roche Diagnostics GmbH
DNA-Standard 2-Log- Ladder + Dye	New England Biolabs
dNTP Set (10mM of each)	GE Healthcare Europe GmbH
Ethanol absolut	Fisher Bioreagents
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Sigma Aldrich GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	J.T. Baker
Expand Long Templ. PCR Syst. 3600 U	Roche Diagnostics GmbH
Expand Long Template Buffer 1	Roche Diagnostics GmbH
Expand long template PCR system (Puffer 1 und PolMix 5U/µl)	Roche Diagnostics GmbH
FastStart dNTP mix	Roche Diagnostics GmbH
FastStart PCR buffer with MgCl ₂	Roche Diagnostics GmbH
FastStart Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics GmbH
Formaldehydlösung 37% gepuffert	VWR
Gel loading dye 6x, purple, no SDS	New England Biolabs
GelPilot DNA Loading Dye, 5x	Quiagen
H ₂ O, HPLC grade	Biochrom AG
H ₂ O, mit Diethylidcarbonat (DEPC) behandelt	Molecular Probes
Hanks Salzlösung	Biochrom AG
High Sensitivity DNA Chips	Agilent Technologies
High Sensitivity DNA Reagent Kit	Agilent Technologies
Igepal CA-360 viscous liquid	Sigma Aldrich GmbH
IgG1, Kappa from murine myeloma, Clone MOPC 21	Sigma Aldrich GmbH
Kaliumacetat, 5 M	Sigma
Kaliumchlorid (KCl), 1 M	Fluka
Levamisol (Tratramizole hydrochlorid)	eigene Herstellung
LightCycler480 Probes Master 10x5ml	Roche Diagnostics GmbH
LightCycler480 Probes Master 5x1ml	Roche Diagnostics GmbH
LMW ladder	New England Biolabs
Long Template enzyme	
Magnesium-Acetat, 1 M	Fluka
Magnesiumchlorid, MgCl ₂ , 1M	Sigma
MiSeq Reagent Kit v2 (300-cycles)	Illumina
MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles)	Illumina

MiSeq Reagent Kit v2 (50-cycles)	Illumina
MiSeq Reagent Kit V2 Nano	Illumina
MiSeq Reagent Kit v3 (150-cycle)	Illumina
MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle)	Illumina
Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 8,18,19- Clone A45B/B3	AS Diagnostik
Mse I, rekombinant, conc., 2500U 50000U/ml	New England Biolabs
NaOH Alkaline Reagent, 10M	Thermo Scientific
Natriumacetat (pH 5,2), 3 M	Calbiochem
NGS-Wasser	Braun
PCR Nucleotide Mix (10mM of each dNTP)	Roche Diagnostics GmbH
PCR-H ₂ O für HPLC	VWR International GmbH, CLN Labor-großhandel
PEG NaCl Solution	Roche Diagnostics GmbH
Percoll™	GE Healthcare
PhiX Control v3	Illumina
Pol Mix 5 U/µl (Expand)	Roche Diagnostics GmbH
Proteinase K, rec. PCR grade Solution	Roche Diagnostics GmbH
QIAamp FFPE Tissue Kit	Quiagen
Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen
Reinstwasser HPLC Gradient	Roth
Roche Probe Master®	Roche Diagnostics GmbH
SeraPlus 500ml	Pan Biotech GmbH
T4-DNA-Ligase, konz. 500U; 5U/µl;	Roche Diagnostics GmbH
TBE-Puffer	
TE Puffer 1x pH 8.0 low EDTA	AppliChem
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem
Tris	AppliChem
Tris-Acetat	Sigma
Tris-HCl, molecular biology grade (pH 8), 1 M	Sigma
Trypanblau	Sigma Aldrich GmbH
TWEEN® 20, for molecular biology, viscous liquid	Sigma Aldrich GmbH

2.4. Verbrauchsmaterialien und Geräte

Name	Hersteller
0.2ml DOMED CAP TUBES	ABgene House
96-PCR Platte	PEQLab - Biotechnologie GmbH
Adhesive Clear PCR Seal	Biozym Scientific GmbH
Automatische Pipetten	Gilson
Bioanalyser 2100	Agilent
Centrifuge 5430	Eppendorf
Domed Cap Tubes, 0,2 ml	Abgene House
Echo 525	Labcyte
Echo Qualified 384 LDV Plus Microplate	Labcyte
Eisbehälter	neoLab

Elektrophoresekammer	
Erlenmeyerkolben	Fisher Scientific
Falcons (15ml und 50ml)	VWR
Falconständer	VWR
Filterspitzen	Greiner Bio-One
Geldokumentationssystem	PEQLab - Biotechnologie GmbH
Gelkammer	PEQLab - Biotechnologie GmbH
Gelkammer	PEQLab - Biotechnologie GmbH
Glasflaschen	Schott
Haftobjektträger	Thermo Fisher Scientific
IKA MS 3 basic	IKA works
Kamera	
Labortücher	KIMTECH Science
Lab-Tek Chamber Slides, 8 Well	Fisher Scientific
LabTek Chamber Slides, Glas, 8 Felder	Nunc GmbH
LightCycler 480 II 96-well-Platten und Folien	Roche Diagnostics GmbH
Low-binding microcentrifuge tubes (0,5ml/5ml)	Eppendorf
Magnetständer für 0,2 ml Tubes	Dynal
Microtubes, Kunststoff	Thermo
Mikro-Hämatokrit-Kapillare	Brand GmbH & Co KG
Mikro-Hämatokrit-Kappillare	Brand
Mikroskop	Olympus
Mikrowelle	Siemens
Mikrozentrifuge	Grant Bio / Kisker
MiSeq Hochdurchsatzsequenzierer	Illumina
Multikanalpipetten (8er)	Gilson
Multiply - μ Strip pro 8er Kette	Sarstedt
NanoDrop ND-1000	PEQLab - Biotechnologie GmbH
PCR Tubes (0,2ml) Maxymum Recovery	Axygen
PCR-Maschine	BioRad Laboratories GmbH
Pipetierroboter Pipetmax®	Gilson
Pipetman	Gilson
Pipetten	Gilson
Programm IntasImage	
Qubit 3.0 Fluorometer	Invitrogen
Serologische Pipetten	Fisher Scientific
Serologische Pipetten, Kunststoff, steril	Greiner Bio-One
Skirted 96-well PCR Plate (0,2ml)	Thermo Scientific
Tetrad 2 Thermocycler	Bio-Rad
Tubes (1,5 ml/2 ml/5 ml)	Eppendorf
Tubes (50 ml)	Greiner Bio-One
Tubeständer	Eppendorf
Vortexer	VELP Scientifica
VWR Ministar	VWR
Waagen, elektronische	Kern

2.5. Primer und Nucleotide

Name	Sequenz
Lib1	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT
ddMSE11	TAA CTG ACAG ddC
Exon 2/3 FwdPrimer	CAGCCCAACCCTTGTCTTA
Exon 2/3 RevPrimer	GAAGCGTCTCATGCTGGATC
CK19 FwdPrimer	TTCATGCTCAGCTGTGACTG
CK19 RevPrimer	GAAGATCCGCGACTGGTAC
D5S2117 FwdPrimer	ACTGAGTCTCCTCCAACCATGG
D5S2117 RevPrimer	CCAGGTGAGAACCTAGTCAG
KRAS FwdPrimer	CTG AAT TAG CTG TAT CGT CAA GG
KRAS RevPrimer	ATA AGG CCT GCT GAA AAT GAC
P5	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GA
P7	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT
EGFR14 FwdPrimer	CTGACCCTGTTCATCTGTTT
EGFR14 Sonde	TAACACTTGCGGCTACCTGGACG
EGFR14 RevPrimer	CTGACAGACTATGGCCTCTA
EGFR15 FwdPrimer	CTGACAGACTATGGCCTCTA
EGFR15 Sonde	TGCCCAGGTGGTTCTGGAAGTC
EGFR15 RevPrimer	GGAGGCAGAGATAGTGTGTA
EGFR32 FwdPrimer	CCTACCAAGTGAAAGCAAGA
EGFR32 Sonde	CACCCACCCAGACACTTGCTCA
EGFR32 RevPrimer	GAAGGAGCCAGTTTCTAAGG
MET7 FwdPrimer	GTGGTTTCACACTGCATTAG
MET7 Sonde	AAAGGAGAGGGCTGGGAACACAAA
MET7 RevPrimer	CTCTTGGGAAGTTGCAATATG
MET30 FwdPrimer	TGAGAATCATGTGCATGGAG
MET30 Sonde	TGAGCACTTGTCTCTCCTTTGGCC
MET30 RevPrimer	GACTGGAGAGCACTCATTG
MET36 FwdPrimer	GCAGGTGTTTCTGTGAAAGT
MET36 Sonde	ATTCATTTCTGGCAATCACGCGGG
MET36 RevPrimer	GATAGATGTCCACCACAAGC
RUFY21 FwdPrimer	ATGAAGGAGGAGCCTCAATA
RUFY21 Sonde	ACAGCCCAGACCAAAGAACCCA
RUFY21 RevPrimer	CCATGTCCAGGTTGGAATC
SMYD33 FwdPrimer	CCCAAGCTCAGAAAGTATGAT
SMYD33 Sonde	TCTCACAAGGAGTTGGCTGGGC
SMYD33 RevPrimer	GAACTGAGGCACAGAGATATG
BlueCone25 FwdPrimer	CTGTGCTTACCAAAGGCTTC
BlueCone25 Sonde	TAGACGAGGGAAGCCACAAAACCC
BlueCone25 RevPrimer	GACTCTACCCAGGTTTCTAG
AGTR1-24 FwdPrimer	CAGGAGATGAGAGTTCCAGA
AGTR1-24 Sonde	TGTTCTGTCCAGTTTCCAAAGGGCA
AGTR1-24 RevPrimer	GTACCAGGTGCAAGTGTAGC
GranzymB FwdPrimer	AAATTAGGCCTCTGCAAAC

GranzymB Sonde	TGGTGGATGGTGCTTCTTTGGAAG
GranzymB RevPrimer	TAATTACTGCACCCCCAGTG
CACNA FwdPrimer	CACAAAGCTGTAGCAGTCTGG
CACNA Sonde	TACCTTCCTGTCTCTTCGGGTTGCA
CACNA RevPrimer	GGGCTAAATATACCCGTACAGC
FGFR1-23 FwdPrimer	GTTTCCATCCCACCAAGAG
FGFR1-23 Sonde	TAAGGGAGCAGTGGGACTGGGA
FGFR1-23 RevPrimer	GCTAGTGCAGTTCCAGATG
FGFR1-A FwdPrimer	CAGCACTCCCCACCCCCAA
FGFR1-A Sonde	TGAAACGGAACCAGATGCGGCTGC
FGFR1-A RevPrimer	GCTGCGGTGTACCCGTGTGG
FGFR1-B FwdPrimer	GGGAAGGGCTGGCCTGTTGC
FGFR1-B Sonde	AGTCTTGACACAGAGGCATGGATGT
FGFR1-B REV RevPrimer	TAGGGCGCCACAGCTCGAAG
Her2-E FWD FwdPrimer	TGGCACAGTGAAGCACGGGAAAG
Her2-E Sonde	ACAGAGCAGTGACTGTTGTTACTCGCTGT
Her2-E RevPrimer	GGCCCTCCTCCAAGCTTGATCCT
Her2-310 FwdPrimer	CTGAGGTGGGAGACTTGCT
Her2-310 Sonde	TTGCAGTGAGCCAAGACTGTACCA
Her2-310 RevPrimer	ACTCGATGCTTGCTACTGCA
Her2-315 FwdPrimer	GACAAAATGTAGAGCCAGACCATTTGG
Her2-315 Sonde	TCCTCGCTCCTCCACTCACTAGCACA
Her2-315 RevPrimer	GGATCAGCACTGTGAGATTC

2.6. Datenbanken und Software

- Ampli1 Docker V1.0 – bioinformatic pipeline for mapping and CNV analysis of WGS data (Menarini Silicon Biosystems Spa, Bologna, Italien)
- Control-FREEC (Control-Free Copy number caller) (Boeva, V., et al., 2012, Ferrarini, A., et al., 2018)
- CodonCodeAligner
- Illumina Experiment Manager V. 1.14.0 (Illumina, San Diego, CA, USA)
- Illumina Sequencing Analysis Viewer V. 2.4.5 (Illumina, San Diego, CA, USA)
- QDNAseq (Scheinin, I., et al., 2014; <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/QDNAseq.html>)
- 2100 Expert Software Version B.02.09SIO725 (SR1) (Agilent Technologies, Penzberg)
- Microsoft Office 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)
- Multiqc V. 1.8 – A tool to summarize analysis results for multiple tools and samples (Ewels, P., et al., 2016; <https://multiqc.info/>)

- Samtools V. 1.9 – software package for handling and converting NGS data (<https://github.com/samtools/samtools/>)
- Bwa V. 0.7.17 – tool for mapping DNA sequences against a large reference genome (<https://github.com/lh3/bwa/>)
- BBTools (BBDuk und BBMap – Tools for trimming/decontamination and mapping of high-throughput sequencing data (<https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>)
- BioBloomTools – tool for decontamination of NGS data (Chu, J., et al., 2014; (<https://github.com/bcgsc/biobloom/>)
- FastQC V. 0.11.9 – A quality control tool for high-throughput sequence data (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/>)
- PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)
- NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)
- StataCorp
- GraphPadPrism

3. Methoden

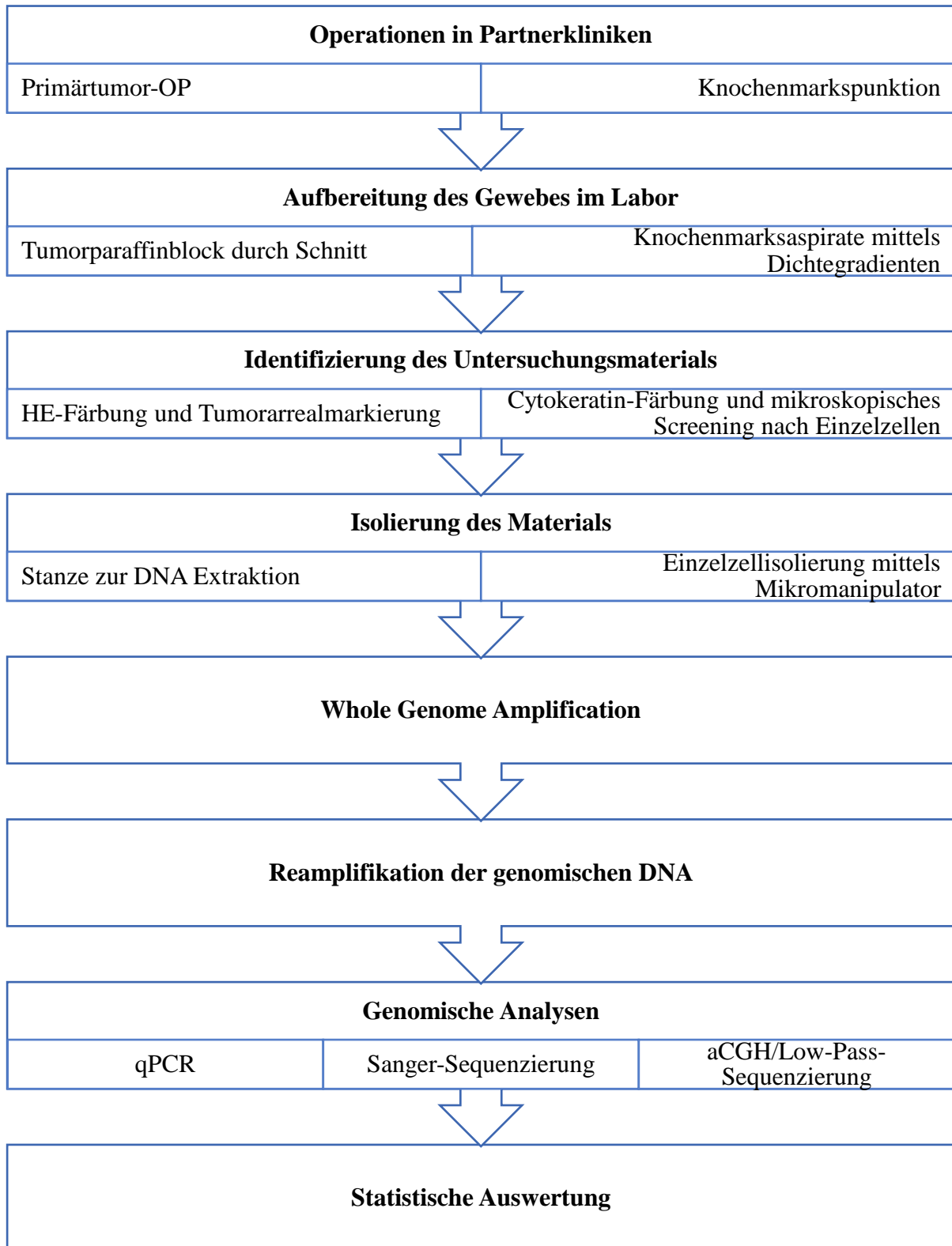


Abbildung 7: Arbeitsablauf der Studie

3.1. Knochenmarkaufbereitung

Die Aufbereitung der Knochenmarkzellen von eingesendeten Knochenmarkspiraten erfolgt standardgemäß nach einem zertifizierten Diagnostikprotokoll in unserem Labor. Die Aspirate werden nach der Operation gekühlt und in sterilen Behältnissen an den Lehrstuhl für experimentelle Medizin und Therapieverfahren geschickt. Um das Gerinnen der Proben zu verhindern, werden die Röhrchen mit Heparin vorbehandelt. Aus den Proben werden 5-10 ml in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen übertragen und mit Hanks Salzlösung aufgefüllt. Es folgt die Zentrifugierung bei 170 g für 10 Minuten. Der gebildete Überstand wird verworfen und es wird ein weiteres Mal mit Hanks Salzlösung aufgefüllt und zentrifugiert (10 Minuten bei 170 g). Der Überstand wird wieder verworfen. Sollte eine Gerinnselbildung auftreten, wird die gesamte Probe verworfen. Das noch vorhandene Pellet wird mit 9 ml Hanks Salzlösung resuspendiert. In ein zweites Zentrifugenröhrchen werden 6 ml Percoll 65 % (bzw. Ficoll, Percoll 60 %) pipettiert und mit der Zellsuspension vorsichtig überschichtet, so dass zwei Phasen entstehen. Daraufhin folgt eine weitere Zentrifugierung (20 Minuten bei 1000 g), bei welcher sich ein Dichtegradient bildet und die mononukleären Zellen sich von den restlichen Blutbestandteilen lösen (Abbildung 8). Diese mononukleären Zellen werden vorsichtig in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen übertragen und mit PBS aufgefüllt. Die Probe wird zentrifugiert (10 Minuten bei 500 g) und der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird mit 5ml PBS resuspendiert. Bevor die Zellen auf Haftobjektträger (HOT) aufgetragen werden, wird die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Pro HOT werden ca. 0,5 Mio mononukleäre Zellen aufgetragen. Vom Zentralklinikum Augsburg wurden bereits aufbereitete HOTs zur Verfügung gestellt.

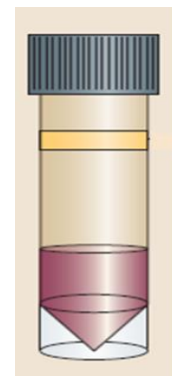


Abbildung 8: KM mit Dichtegradient (gelb=mononukleäre Zellen, rot=Erythrozyten) aus hausinterner SOP

3.2. Immunzytochemische Färbung und mikroskopisches Screening

Zur Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wird die Polymer-basierte Färbung gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 verwendet. Die zur Verfügung gestellten HOTs sind eingefroren auf -20°C gelagert und werden im ersten Schritt 20-30 Minuten aufgetaut. Daraufhin folgt die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 300 μl 10% AB-Serum/PBS (pH 7,4), einem humanen, antikörperfreien Serum der Blutgruppe AB. Dieser Schritt

ist notwendig, um die unspezifische Bindung des primären Antikörpers an ungewollte Proteine oder an exprimierte Fc-Rezeptoren zu vermeiden.

Es folgt die Applikation und 60-minütige Inkubation von 250 µl des primären Antikörpers pro HOT, zum einen mit dem monoklonalen panzytokeratin Antikörper A45B/B3 (1:100 Verdünnung mit 10 % ABS/PBS) und zum anderen mit dem unspezifischen MOPC21-Antikörper (1:500 Verdünnung mit 10 % ABS/PBS). Der MOPC21-Antikörper wird aus dem durch mineralische Öle induzierten Plasmozytom der BALBc Maus gewonnen. Er fungiert als Isotypkontrolle, da er dieselbe Immunglobulinklasse und – subklasse wie der monoklonale Antikörper A45B/B3 besitzt. Durch die Isotypkontrolle werden Proben mit unspezifischen Bindungen erkannt und können ausgeschlossen werden. Falls es zu einem positiven Befund der Isotypkontrolle kommt, kann nicht davon ausgegangen werden, dass der primäre Antikörper Zytokeratine spezifisch gebunden hat.

Als nächstes folgen drei 3-minütige Waschschrte mit PBS-Puffer in nach Antikörper getrennten Küvetten. Daraufhin wird 30 Minuten lang mit 10 % AB-Serum/AP-Polymer inkubiert und wieder dreimal 3 Minuten mit PBS gewaschen. Das AP-Polymer bindet an den primären Antikörper. Für die Entwicklung der Färbung wird eine BCIP/NBT + 0.5 % Levamisol Lösung (108 mg/mL) verwendet, welche 10 Minuten inkubiert wird. Die Zugabe von Levamisol zur Substrat-Chromogenlösung inhibiert die Aktivität endogener alkalischer Phosphatase. Daraufhin folgt ein weiterer Waschschrte und dann eine 5-minütige Fixierung der A45B3-Objektträger mit 37,5 % Formaldehyd in einer 1,38:100 Verdünnung. Am Schluss wird noch einmal 3x3 Minuten mit PBS gewaschen.

Das Screening der Proben erfolgt an einem Olympus-Mikroskop in 100-facher Vergrößerung mäanderförmig von einem bis zum anderen Rand des Feldes. Gefärbte Zellen heben sich durch ihre violette, dunkle Farbe von ungefärbten Zellen ab. Pro Färbedurchgang wird eine Kontrolle mit peripheren Blutlymphozyten (Negativkontrolle) und eine Kontrolle mit einer Tumorzelllinie (Positivkontrolle) angefertigt. Beim Fund einer gefärbten Zelle (Abbildung 9) werden deren Koordinaten notiert. Daraufhin werden die HOTs der Isotypkontrolle MOPC21 gescreent, um falsch-positive Färbungen auszuschließen. Insgesamt werden pro Patientin im Schnitt 3 Mio. Zellen gescreent.

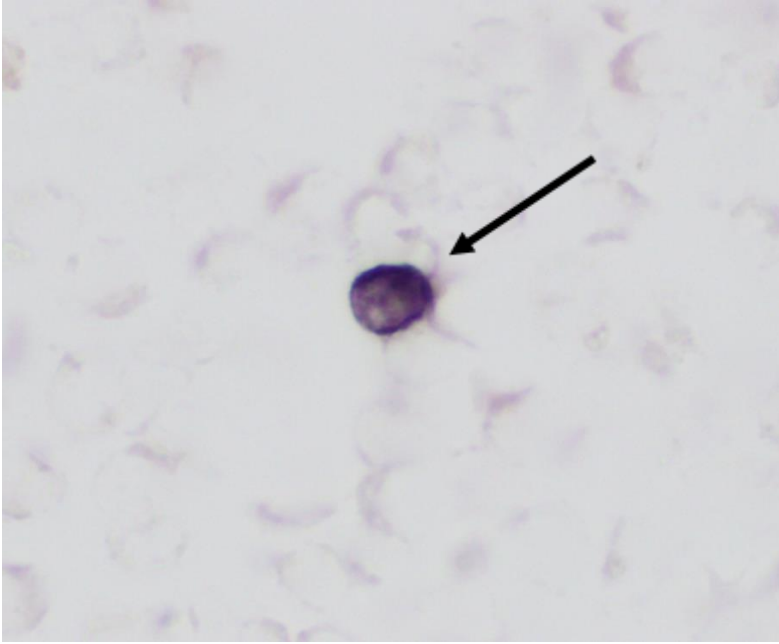


Abbildung 9: blau-lila gefärbte CK⁺-Zelle auf HOT, anliegend finden sich ungefärbte Zellen, welche ebenfalls als negative Kontrolle gepickt wurden.

3.3. Einzelzellisolierung

Die Isolation der Einzelzellen erfolgt mit einem Mikromanipulator unter dem Olympus-Mikroskop. Hier bekam ich technischen Support und Supervision durch Thomas Schamberger. Hierfür wird ein flüssiges Pickfeld ohne zelluläre Verunreinigungen auf einer 8-Felder-Kammer vorbereitet. Dieses Feld wird zuerst mit BSA beträufelt, bis sich ein dünner Film bildet. Dies soll das Anheften von Zellen vermeiden. Danach werden 200 μ l PBS auf das Feld gegeben. Aus dem Pickfeld wird mit der Pipette eine Negativkontrolle (1 μ l) in ein 0.2 PCR-Tube überführt. Nun wird der Mikromanipulator so eingestellt, dass die Mikrokapillare in der Mitte des Sichtfeldes auf dem Mikroskop erscheint. Die einzelnen Zellen werden anhand ihrer beim Screening notierten Koordinaten gefunden und dann mittels vorsichtigen Kratzens vom Objektträger, welcher ebenfalls mit PBS bedeckt ist, gelöst und unter Sicht in die Kapillare gesaugt. Diese wird zurück ins Pickfeld geführt, um dort die Zelle zu entlassen. Die Zelle wird dann mit einer Pipette (1 μ l) in ein PCR-Tube transferiert. In dem PCR-Tube ist der vorher zusammengestellte und aliquotierte PK-Verdau (siehe Kapitel 3.4.) bereits enthalten. Der Vorgang wird für jede Tumorzelle wiederholt. Außerdem werden zusätzlich zwei ungefärbte Zellen isoliert. Zum Schluss wird mit der Pipette am Objektträger geschabt und ein Zellpool aufgesaugt, welcher als Positivkontrolle für die anschließende DNA-Aufbereitung dient (1).

3.4. Amplifikation genomischer DNA von isolierten Einzelzellen

Die Amplifikation der genomischen DNA wird mit dem Ampli1™ WGA Kit (Menarini Silicon Biosystems) durchgeführt. Diese Methode eignet sich besonders gut, um die DNA der Einzelzellen reproduzierbar zu amplifizieren und wurde laborintern entwickelt (63,64). Sie beruht auf dem gleichmäßigen Restriktionsverdau der DNA mit der Restriktion-Endonuklease MseI. Die DNA-Fragmente werden anschließend mithilfe von Primern wieder aufgefüllt und anschließend in einer PCR global amplifiziert.

Der erste Schritt besteht aus einem Verdau mit der Serinprotease Proteinase K. Beim Proteinase-K-Verdau wird die Zelle aufgeschlossen, die Histone entfernt und dadurch die DNA zugänglich gemacht. Es wird ein 10-facher Ansatz des Mastermixes (Tabelle 2) erstellt und jeweils 2 µl in vorbehandelten PCR-Tubes aliquotiert. OPA ist ein Puffer für alle nachfolgenden Enzymschritte. TWEEN und Igepal sind Detergenzien, welche die Grenzflächenspannungen zwischen DNA und Plastik des PCR-Tubes heruntersetzen. Proteinase K ist eine Proteinase aus dem Schlauchpilz *Tritirachium album*, die zur Familie der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen gehört. Die Protease spaltet Peptidbindungen und beseitigt dadurch DNA-umlagernde Proteinstrukturen. Die beim Picken gewonnenen Proben (1 µl) werden direkt in den Mastermix pipettiert. Über die folgende Nacht erfolgt der „PK-Verdau“ im PCR-Cycler.

Tabelle 2: Mastermix und PCR-Programm des Proteinase-K-Verdaus der WGA

Reagenzien	Ansatz 10x in µl
OPA Puffer 10x	2
Tween 10%	1,3
Igepal 10%	1,3
Proteinase K (10 mg/ml)	2,6
PCR-H ₂ O	12,7
insgesamt	20

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	42	10 h
2	80	10 min

3	4	∞
---	---	---

Als nächster Schritt wird das Preannealing (Tabelle 4) vorbereitet und der MseI-Verdau vollzogen, welcher zur gleichmäßigen Fragmentierung der DNA dient. Vom MseI-Mastermix (Tabelle 3) werden 2 µl zur Probe gegeben, wobei die Pipette nicht die Probe berühren sollte. Die Proben werden zentrifugiert. Das Cycler-Programm „MSE-Verdau“ wird gestartet und benötigt 3h. Mse I, ein Restriktionsenzym der Micrococcus-Spezies schneidet die Doppelstrang-DNA in Fragmente. Die Schnittstellen befinden sich immer an der gleichen Sequenz (5'... T T A A ... 3' 3'... A A T T ... 5'). Die durch MseI erzeugten DNA-Fragmente liegen zwischen 150 – 1500 bp Länge und haben eine freie Phosphatgruppe am Ende. Hieran kann der Lib1-Adapter ligieren.

Tabelle 3: Mastermix und PCR-Programm des MseI-Verdaus der WGA

Reagenzien	Ansatz 1x in µl
OPA Puffer 10x	0,2
MseI (50.000 U/ml)	0,2
PCR-H ₂ O	1,6

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	37	3 h
2	65	5 min
3	4	∞

In der Zwischenzeit wird der Preannealing-Mix (Tabelle 4) in ein 0,2 ml PCR-Tube pipettiert und für eine Stunde mit dem Programm „Preannealing“ in den Cycler gegeben (Tb. 4). Im Preannealing verbinden sich Lib1- und ddMSE11-Adaptoren miteinander zu doppelsträngigen Primern.

Tabelle 4: Mastermix und PCR-Programm des Preannealings der WGA

Reagenzien	Ansatz 1x in µl
OPA buffer 10x	0,5

Lib1 100 μ M	0,5
ddMse11 100 μ M	0,5
PCR-H ₂ O	1,5
insgesamt	3

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	65 \rightarrow 15	1 min/1°C
2	15	∞

Nach dem Programm wird zum Mastermix noch 1 μ l ATP 10 mmol und 1 μ l T4-Ligase pro Ansatz gegeben. Vom fertigen Mastermix werden 5 μ l zu den Proben gegeben und über Nacht ligiert (Tabelle 5). Das ATP liefert die Energie, welche zur Ligation benötigt wird. Die T4-DNA-Ligase ligiert nur doppelsträngige DNA. Ziel der Ligation ist das Binden der Adaptern an die MseI-Fragmente. Bei der Ligation wird die OH-Gruppe am 3'-Ende des Lib1-Primers mit der Phosphatgruppe am 5'-Ende des DNA-Fragmentes verknüpft. Dabei wird nur der Lib1-Primer fest ligiert, da am 5'-Ende des synthetisch hergestellten ddMSE11-Primers keine Phosphatgruppe vorhanden ist.

Tabelle 5: Mastermix und PCR-Programm der Ligation der WGA

Reagenzien	Ansatz 1x in μ l
Preannealing mix	3
ATP (10mM)	1
T4 DNA-Ligase (hoch-konzentriert)	1
insgesamt	5

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	15	∞ (über Nacht)

Am nächsten Morgen wird die primäre PCR pipettiert und gestartet (Tabelle 6). Ziel dieser Reaktion ist die gleichmäßige und globale Amplifikation der eingebrachten DNA. Nachdem das Lib1-Oligonukleotid des Adapters an die genomischen MseI-Fragmente ligiert wurde, kann der rezessive DNA-Strang aufgefüllt werden, damit eine zu Lib1

komplementäre Primerbindungsstelle entsteht. Hierzu werden die PCR-Reagenzien zur ligierten Probe addiert und diese bei 68° C drei Minuten inkubiert. Das 11 bp lange ddMse11-Oligonukleotid denaturiert bei dieser Temperatur, so dass nach der Zugabe einer DNA-Polymerase das rezessive Ende des unteren DNA-Strangs aufgefüllt wird. Weil das kurze ddMSE11 am 3'-Ende keine OH-Gruppe besitzt, kann hier keine Polymerase greifen und das kurze Oligonukleotid dient somit nicht als Primer. Damit entstehen zu Lib1 komplementäre Sequenzen am 3' Ende der Fragmente, welche im nächsten Zyklus als Primer-Bindungsstellen dienen, so dass die Fragmente dann exponentiell amplifiziert werden können.

Tabelle 6: Mastermix und PCR-Programm der primären PCR der WGA

Reagenzien	Ansatz 1x in µl
Buffer 1	3
dNTPs (10mM)	2
PolMix	1
PCR-H ₂ O	35
insgesamt	41

Schritt	Zyklen	Temperatur in °C	Zeit
1	1	68	3 min
2	15	94	40sec
3		57	30sec
4		68	1min 30sec + 1sec/Zyklus
5		94	40sec
6	9	57 + 1/Zyklus	30sec
7		68	1min 45sec + 1sec/Zyklus
8		94	40sec
9	23	65	30sec
10		68	1min 53sec + 1sec/Zyklus
11		68	3min 40sec
12		4	∞

3.5. Qualitätskontrolle der Amplifikation (nach 65)

Zur Qualitätskontrolle der amplifizierten Einzelzell-DNA wird eine Multiplex-PCR mit dem Roche FastStartTaq-Polymerase-Kit verwendet. Dazu werden vier verschieden große Fragmente gezielt überprüft, welche bei einer korrekten und vollständigen Amplifikation der DNA vorhanden sein sollten. Die Primer amplifizieren Abschnitte auf den MseI-Restriktionsfragmenten, welche länger als 1000 bp sind. Das Vorliegen langer Abschnitte gilt als Qualitätskriterium. Die Genomabschnitte entsprechen *TP53 Exon 2/3*, *CK19*, *D5S2117* und *KRAS*, welche mithilfe spezifischer Primer amplifiziert werden (Tabelle 7). Die Primerpaare für *KRAS*, *D5S2117*, *CK19* und *TP53 Exon 2/3* werden jeweils 4 µM in einem Primer-Mix mit H₂O verdünnt. Zur Reaktion werden hierzu 9µl Mastermix und 1 µl der Probe gegeben (Tabelle 8). Nach der PCR wird mittels Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.6.) das Vorhandensein der spezifischen Fragmente überprüft. Daraus wird der Genomic Integrity Index (GII) abgeleitet. Jede Bande steht für einen Punkt des Index. GIIs von 3 oder 4 indizieren eine gute bis sehr gute DNA-Qualität.

Tabelle 7: Primersequenzen (*TP53 Exon2/3*, *CK19*, *D5S2117*, *Kras*) der Multiplex-Kontroll-PCR

Gen	Sense-Sequenz Antisense-Sequenz
TP 53 Exon 2/3	CAGCCCAACCCCTTGTCCTTA GAAGCGTCTCATGCTGGATC
CK19	TTCATGCTCAGCTGTGACTG GAAGATCCGCGACTGGTAC
D5S2117	ACTGAGTCCTCCTCCAACCATGG CCAGGTGAGAACCTAGTCAG
Kras	ATAAGGCCTGCTGAAAATGAC CTGAATTAGCTGTATCGTCAAGG

Tabelle 8: Mastermix und PCR-Programm der Multiplex-Kontroll-PCR

Reagenzien	Ansatz 1x in µl
PCR Puffer (Tube 2, grün)	1
dNTPs (10mM)	0,2
Primer-Mix (4Primerpaare)	1
BSA	0,2

H ₂ O	6,5
Faststart Taq Polymerase	0,1
insgesamt	9

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	95	4 min
2	95	30 s
3	58	30 s
4	72	1,5 min
5	72	7 min
6	4	∞

3.6. Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese wird das Vorhandensein gewünschter DNA-Fragmente aus der oben erwähnten Qualitätskontrolle nach der Amplifikation überprüft. Für ein Gel werden 1,5 g Agarose pro 100 ml TBE-Puffer in einem dafür vorgesehenen Erlenmeyer-Kolben abgewogen und anschließend durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Die 1,5%ige Agarose-Lösung wird etwas abgekühlt und in den entsprechenden Erlenmeyer-Kolben für Ethidiumbromid umgefüllt. Es werden unter dem Abzug 5 µl Ethidiumbromid hinzu pipettiert und in die Gelkammer gegossen. Das Gel wird mindestens 15 Minuten zum Abkühlen bei Raumtemperatur belassen. Danach werden das Klebeband und die Kämmen vorsichtig entfernt und das Gel mit dem Träger in die entsprechende Elektrophoresekammer gelegt. Die Kammer muss immer wieder mit TBE-Puffer aufgefüllt werden. Zu jeder Probe werden jeweils 3 µl Dye pipettiert. Es werden in jeder Reihe des Gels links und rechts 8 µl 2-Log-DNA-Größenstandards aufgetragen. Die Proben bzw. Kontrollen werden jeweils vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Die Fragmente werden im Gel für 45 Minuten bei 160 V und 400 mA aufgetrennt. Das Gel wird auf den UV-Schirm gelegt, mit dem Programm IntasImage visualisiert und digital fotografiert (Abbildung 10).

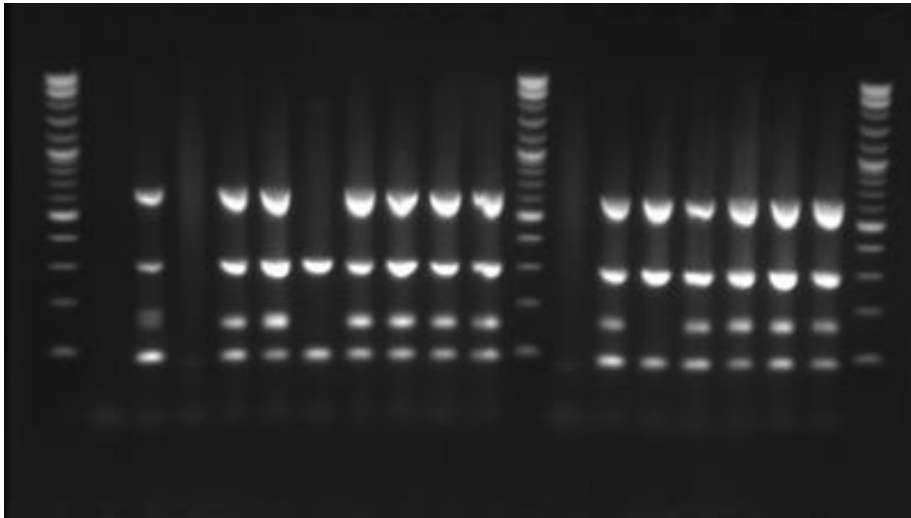


Abbildung 10: Gel-Elektrophoresebild der WGA verschiedener Einzelzellen, Banden korrespondieren (von unten nach oben): Kras, D5S2117, Exon2/3, CK19, Anzahl der vorhandenen Banden = GII

3.7. Re-Amplifikation von WGA-Proben

Die Re-Amplifikation ist ein Zwischenschritt, um mehr DNA-Material für die nachfolgenden genomischen Analysen zu generieren. Ziel ist die weitere Amplifikation der MseI-Fragmente. Die WGA-Proben mit einem GII von ≥ 2 werden als Templates für die Re-Amplifikationsreaktion verwendet. Es wird ein dreifacher Ansatz aus Mastermix und Template erstellt, um zu gewährleisten, dass genügend Produkt für alle Analysen vorhanden ist. Dafür werden 147 μl vom Mastermix (Tabelle 9) mit 3 μl Template aus der WGA-Probe in ein 0,2mL PCR-Tube gegeben und nach dem Vortexen und Zentrifugieren auf 3 PCR-Tubes aufgeteilt. Anschließend wird im PCR-Cycler das Programm Reamp 65 (Tabelle 9) durchlaufen und von den Proben eine zweite Multiplex-PCR zur Kontrolle des GIIs gemacht.

Tabelle 9: Mastermix und PCR-Programm der Re-Amplifikation

Reagenzien	Ansatz 1x in μl
Roche Puffer 1	5
Lib1 (10 μM)	5
dNTPs (10 mM)	1,75
BSA (Roche)	1,25
Pol. Mix	0,5
PCR-H ₂ O	35,5

insgesamt	49
-----------	----

Schritt	Zyklen	Temperatur in °C	Zeit
1	10	94	1 min
2		60	30 s
3		65	2 min
4		94	30 s
5		60	30 s
6		65	2 min + 20 s/Zyklus
7		4	∞

3.8. Genamplifikationsanalyse durch quantitative Polymerasekettenreaktion

Für die Genamplifikationsanalyse wurde ich durch meine Kollegen und Mitdoktoranden Oliver Schmidt und Martin Brunner unterstützt, welche die Methodik im Rahmen ihrer Dissertation weiterentwickelten. Das Experimentprotokoll und die Messungen beruhen auf Grundlage der Dissertationen von Oliver Schmidt und Martin Brunner (eingereicht). Die Messungen wurden mit und unter Supervision von Oliver Schmidt und Martin Brunner generiert. Der erste Schritt der genomischen Analyse der disseminierten Tumorzellen beinhaltet eine Genamplifikationsanalyse von den vier bei Brustkrebs am häufigsten auftretenden Drivermutationen mittels Multiplex-quantitativer Polymerasekettenreaktion. Die zu untersuchenden Gene sind *MYC*, *ERBB2*, *FGFR1* und *CCND1* (61). Die Messung basiert auf einer quantitativen PCR (qPCR) unter Verwendung von Hydrolysesonden. Die Verwendung drei unterschiedlicher Chromophoren ermöglicht eine Quantifizierung von drei Genabschnitten pro Reaktionsansatz. Es werden jeweils drei Genabschnitte der Zielgene *MYC*, *ERBB2*, *FGFR1* und *CCND1* quantifiziert. Sechs Regionen auf verschiedenen Chromosomen (*SMYD1*, *RUFY2*, *OPN1SW*, *GranzymB*, *AGTR1* und *CACNA*) werden als Referenzen genutzt und repräsentieren in der Berechnung das gesamte Genom (66). Es handelt sich um Gene, die nicht mit Brustkrebs assoziiert werden. Außerdem liegen die Referenzgene in stabilen Regionen des Genoms, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass jeweils zwei Allele dieser Genabschnitte vorliegen, diese also weder deletiert noch amplifiziert sind (66). Die PCR wird in drei technischen Replikaten durchgeführt. Zu Beginn werden die Proben mit Hitze denaturiert. Dadurch können sich die Fluoreszenz-markierten

Sonden an die DNA anlagern. Ebenfalls an der Sonde befindet sich ein Quencher, welcher das Fluoreszenz-Signal abfängt. In der PCR lagern sich die Primer an und die Elongation durch die Taq-Polymerase beginnt. Diese besitzt zusätzlich zu ihrer Polymerase Aktivität, eine 5'-3'-Exonuklease-Funktion, wodurch die Sonden abgebaut werden. Der Quencher und die Sonde werden dadurch räumlich getrennt und das Fluoreszenz-Signal der Sonde wird sichtbar.

Zur Aufarbeitung der Proben wird der Pipettierroboter (Pipetmax®) genutzt, um eine konstant hohe Pipettierqualität zu erreichen. Die Proben werden auf eine gedrittelte 96-Well-PCR-Platte in einer 1:20 Verdünnung gegeben. Pro Lauf werden 48µl benötigt, es empfiehlt sich jedoch mindestens 100 µl (= 5 µl Probe + 95 µl H₂O) anzusetzen. Des Weiteren wird auf jede Verdünnungsplatte ein entsprechender Kalibrator mit einer den Proben entsprechenden Verdünnung/Volumen gegeben. Dieser ermöglicht einen Vergleich der Platten untereinander. Zusätzlich enthält jede PCR-Platte 200 µl Wasser als Negativkontrolle (Tabelle 10).

Tabelle 10: qPCR Pipettierschema der Verdünnungsplatte

	1	2	3	4
A	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25
B	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26
C	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27
D	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28
E	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29
F	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30
G	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Kalibrator
H	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Negativkontrolle

Um größere Probenkollektive effektiver messen zu können und um die Hydrolysesonden weniger oft einfrieren und auftauen zu müssen, wird der MasterMix in Aliquots vorpipettiert (Tabelle 11). Bei der Vorpipettierung werden Primer, Sonden und Wasser zusammengegeben und eingefroren. Bevor der Mastermix im Pipetmax positioniert wird, müssen 425 µl Roche Probe Master® hinzugegeben, gevortext und in einer Tischzentrifuge für drei Sekunden zentrifugiert werden (Abbildung 11). Insgesamt wurde ein Überschuss von 10% bei allen Volumina mit einberechnet.

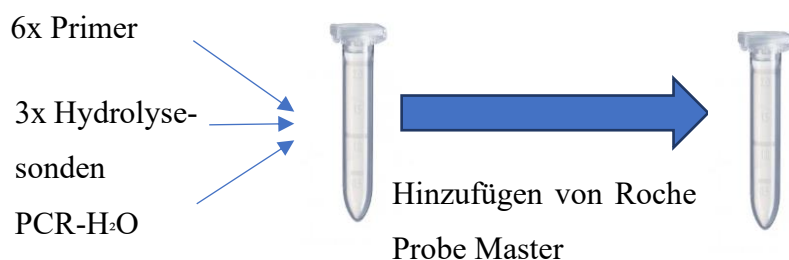


Abbildung 11: Schema der Zusammensetzung des Mastermix

Tabelle 11: Mastermix der qPCR

Reagenzien	Ansatz 96x in μl
Roche Probe Master ®	425
Primer A forward (8 μM)	42,5
Primer B forward (8 μM)	42,5
Primer C forward (8 μM)	42,5
Primer A reverse(8 μM)	42,5
Primer B reverse(8 μM)	42,5
Primer C reverse (8 μM)	42,5
Sonde A (10 μM)	8,5
Sonde B (10 μM)	8,5
Sonde C (10 μM)	8,5
PCR-H ₂ O	144,5
insgesamt	850

Das Roboter-Protokoll ist standardisiert und besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Schritten von je sieben Minuten. Im ersten Schritt wird der Mastermix aus einem 1,5 ml Eppendorf-Tube auf die LightCycler®-Platte verteilt. Im zweiten Schritt werden die Proben auf die LightCycler-Platte übertragen. Nach dem Pipettiervorgang wird die PCR-Platte mit den Proben mit einer Folie versiegelt und bis zum nächsten Lauf im Kühlschrank gelagert. Die LightCycler Platte wird mit einer LightCycler-Folie abgedichtet und bei 1500 g für 2 min zentrifugiert. Danach wird sie in den LightCycler 480 II gestellt. Für die Kombinationen der einzelnen Targets und Referenzen sind vorgefertigte Programmierungen, genannt Template oder Makro, am

LightCycler verfügbar (s. Dissertation Martin Brunner, eingereicht). Bei der qPCR werden für alle Messungen der Amplifikations-Schritt 35-mal wiederholt. Eine Ausnahme bildet *MYC*, hier werden 40 Zyklen durchgeführt (Tabelle 12).

Tabelle 12: PCR-Programm der qPCR

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	95	5 min
2	95	10 s
3	60	30 s
4	72	10 s
5	40	1 min
6	4	∞

Mittels serieller Verdünnung wird zuvor eine Standardkurve für jedes Primer/Sonden-Paar gebildet. Durch die Standardkurve wird geprüft, dass die Reaktion mit gleichbleibender Effizienz abläuft. Die Erstellung und Prüfung der Standardkurven erfolgten im Vorfeld dieser Arbeit (s. Dissertationen Schmidt und Brunner). Im Anschluss an die Messung wird durch die LightCycler-Software eine Berechnung der „relativen Quantifizierung“ durchgeführt. Diese ist in den Makros bereits einprogrammiert. Der LightCycler berechnet aus sechs Referenzen und drei Targets 18 normalisierte Verhältnisse analog der Pfaffl-Gleichung (Abbildung 12) und nimmt den Median dieser Brüche logarithmiert zur Basis als Ausgangswert für die weitere Berechnung (qPCR-Wert) (67). Das Errechnen der Amplifikationswahrscheinlichkeit wird mit einem Berechnungsskript in R durchgeführt. Hierbei wird der qPCR-Wert auf einer Dichteverteilung von qPCR-Werten eines Normalzellkollektivs aufgetragen (Abbildung 13). Das Normalzellkollektiv besteht aus CK⁻-Zellen, welche auf gleicher Weise wie CK⁺-Zellen aufbereitet werden, und zeigt eine Verteilung von qPCR-Werten, die einer Normalverteilung ähnelt. Die Amplifikationswahrscheinlichkeit der Tumorzelle korrespondiert mit dem Prozentrang der Tumorzelle in der Dichteverteilung des Normalzellkollektivs. Ein Wert von >0,95 wird als Amplifikation gewertet.

Damit eine Amplifikationsanalyse als auswertbar gilt, müssen diverse Kriterien erfüllt werden. Pro Gen müssen mindestens zwei von drei Genabschnitten ein Ergebnis liefern. Für die

Referenzgene gilt, dass mindestens fünf von sechs Referenzgenen sinnvolle Ergebnisse liefern müssen. Bei allen Messungen darf der STD-CP-Wert der Triplikate 0,2 nicht überschreiten. DCCs, die diese Kriterien nicht erfüllen, werden für weitere Berechnungen ausgeschlossen.

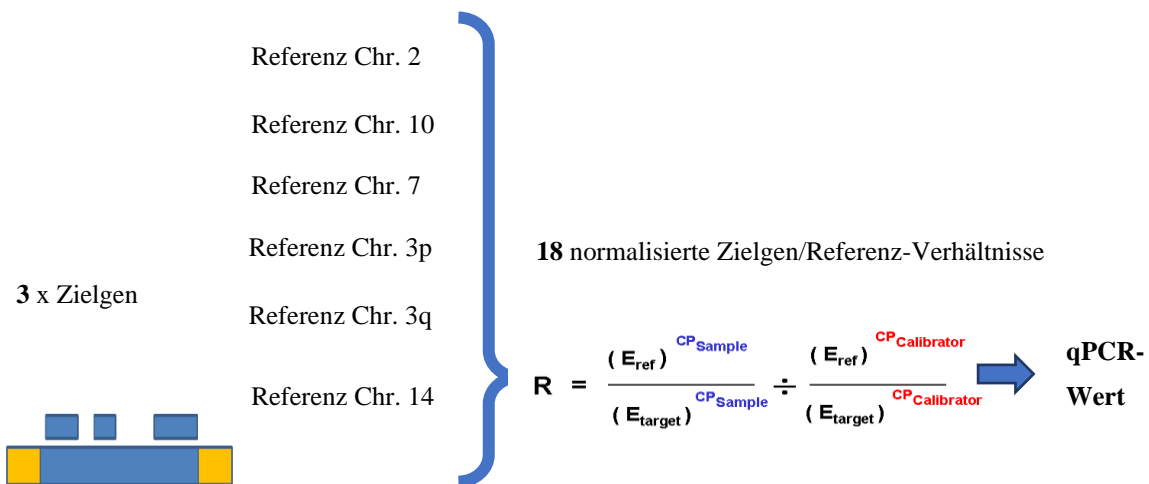


Abbildung 12: Schema der Berechnung des qPCR-Werts anhand der Pfaffl-Gleichung (E =Effizienz, R = normalised ratio, CP = Crossing Point (67), (adaptiert aus Schmidt und Brunners Dissertation)

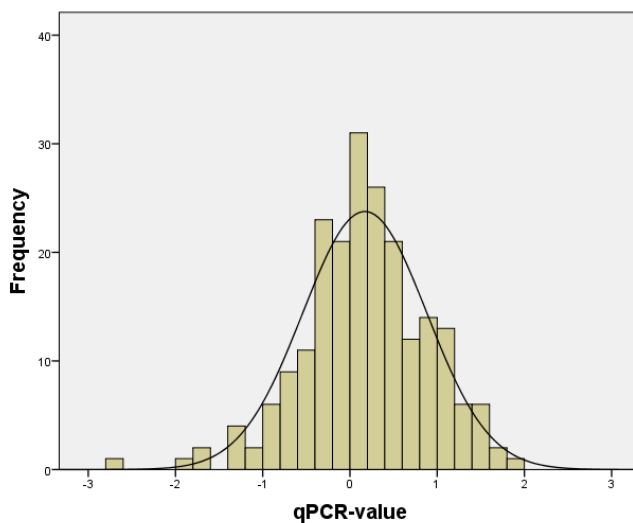


Abbildung 13: Dichteverteilung der qPCR-Werte CK-negativer Zellen, Kolmogorow-Smirnov-Test $p=0,044$, (aus Schmidt und Brunners Dissertation)

3.9. Somatische Punktmutationsanalyse durch Sanger-Sequenzierung

Der nächste Schritt der genomischen Analyse ist die somatische Punktmutationsanalyse mittels Sanger-Sequenzierung. Die DNA-Sequenzierung nach *Sanger et al.* (1977) (68) wird auch als Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet. Hier wurde ich durch meine Betreuerin Dr. Elisabeth Schneider bei der Auswertung unterstützt. Es handelt sich um eine enzymatische

Methode, bei der die zu analysierende DNA als Matrize für die Synthese neuer DNA-Fragmente mithilfe einer DNA-Polymerase dient. Die DNA wird zuerst in eine einzelsträngige Form überführt. Diese Matrizen-DNA wird mit einem Primer hybridisiert. Ausgehend von diesem Primer erfolgt die Synthese des zur Matrize komplementären Stranges. Anhand dieses Stranges kann dann die ursprüngliche Basensequenz ermittelt werden.

Ziel der Sequenzierung ist das Auffinden somatischer Punktmutationen im *TP53*-Gen (lokalisiert auf Exon 4, 5, 6, 7 und 8) und im *PIK3CA*-Gen (lokalisiert auf Exon 9 und 20). Diese beiden Gene werden ebenfalls zu den häufigsten Drivermutationen beim Mammakarzinom gezählt (61). Exon 4 bis 8, welche *TP53* abbilden, beinhalten keine MseI-Schnittstellen und können deswegen auf ihrer gesamten Exonsequenz analysiert werden. Das gleiche gilt für die Exone 9 und 20 des *PIK3CA*-Gens. Für die Mutationsanalysen werden WGA-Produkte mit einem GII von >2 verwendet. Als weiteres Qualitätskriterium gilt das Vorhandensein von qPCR-Ergebnissen, da anzunehmen ist, dass bei nicht genügender Qualität für die qPCR auch die Mutationsanalyse erschwert ist. Ausgewählt werden Zellen, bei welchen mindestens zwei Zielgene (*cMYC*, *HER2neu*, *FGFR1*, *CCND1*) in der qPCR auswertbar waren.

Zur Vorbereitung der Sequenzierungsplatten findet eine erste Testung der Primer statt. Dafür werden PCRs mit allen Einzelzellen und den entsprechenden Primern durchgeführt und auf das Vorhandensein spezifischer Banden geprüft (Tabelle 13). Zellen, welche diese Qualitätskontrolle bestehen, werden mit den entsprechenden Primern und dem *Menarini Silicon Biosystems Ampli1* PCR-kit amplifiziert und zum Sequenzierungsservice GATC geschickt, welche die Aufreinigung und Sequenzierung der Einzelzellen durchführen. Die Rohdaten werden mit den Originalsequenzen aus der NCBI-Gendatenbank in das Programm CodonCode-Aligner eingespeist und auf Punktmutationen ausgewertet.

Tabelle 13: Sequenzlängen der zu untersuchenden Gene mit entsprechenden Exone in bp

Gen/Exon	Länge
TP53 Exon 4	361 bp
TP53 Exon 5	353 bp
TP53 Exon 6	210 bp
TP53 Exon 7	400 bp
TP53 Exon 8	245bp
PIK3CA Exon 9	196 bp

PIK3CA Exon 20	221bp
----------------	-------

Tabelle 14: Mastermix und PCR-Programm der Amplifizierung der Genabschnitte für die Mutationsanalyse

Reagenzien	Ansatz x2 in μ l
FastStart Puffer (green)	2
FastStart Puffer (red)	4
dNTPs (10mM)	0,4
Primer for (10 μ M)	1
Primer rev (10 μ M)	1
FastStart Taq	0,2
Wasser	9,4
insgesamt	18

Schritt	Zyklen	Temperatur in $^{\circ}$ C	Zeit
1	35	94	4 min
2		94	20 s
3		59	20 s
4		72	45 s
5	1	72	2 min
6		4	∞

3.10. Aufarbeitung und DNA-Isolierung von Primärtumorgewebe

Primärtumore (PT) werden von den jeweiligen pathologischen Instituten nach Primäroperation in Paraffin fixiert. Es findet keine präanalytische Selektion der Tumorblöcke statt, um eine möglichst hohe Anzahl an Proben zu generieren. Zur Vervollständigung der Daten für die biologische Subtypanalyse werden Primärtumorblöcke eingeholt und ein Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Zur Aufarbeitung der Primärtumor-DNA werden durch die Kollegen aus der Pathologie Tumorareale auf den Schnitten bestimmt und Stanzen aus diesen Arealen entnommen. Die Aufarbeitung der Primärtumorblöcke erfolgt durch mich und meine Betreuerin

Dr. Schneider. Von der Stanze wird zuerst überschüssiges Paraffin mit einem sterilen Skalpell entfernt. Der Rest der Stanze wird zwischen zwei Objektträgern zerdrückt, mit dem Skalpell stark zerkleinert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt. Das Gewebe wird kurz zentrifugiert und mit dem QIAamp FFPE Tissue Kit aufgearbeitet (Abbildung 14).

Zur Probe wird 1ml Xylene gegeben, das Cup wird 10 sec gevortext und danach bei RT 2 min zentrifugiert. Überstehendes Xylene wird vorsichtig pipettiert, ohne das gebildete Pellet zu berühren. Zur Probe werden 1 ml 90% Ethanol gegeben, was überschüssiges Xylene aus der Probe entfernt, und für 10 s gevortext und 2 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Tube geöffnet, um bei 37° C für 10 min zu inkubieren. Es werden als nächstes 180 µl Buffer ATL und 20 µl Proteinase K hinzugegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Die Lyse erfolgt bei 56° C für 1 h im Inkubator. Danach wird für eine weitere Stunde auf 90° C inkubiert, was dazu führt, dass der Buffer ATL die Modifizierung der DNA durch Formaldehyd teils rückgängig macht. Die Probe wird kurz zentrifugiert. Dann werden 200 µl des Buffer AL hinzugegeben und gevortext. Zusätzlich wird danach 200 µl 96 % Ethanol hinzugefügt und nochmals gevortext und zentrifugiert. Das Lysat wird nun auf eine QIAamp MinElute Säule übertragen und bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die Säule wird in ein 2 ml Tube überführt und der Überstand wird entsorgt. In die Säule werden 500 µl Buffer AW1 hinzugefügt und die Zentrifugierung wiederholt. Der Überstand kann wieder entsorgt werden und die Säule in ein neues 2 ml Tube überführt werden. 500 µl Buffer AW2 werden nun in die Säule pipettiert und abermals zentrifugiert. Die Säule wird wieder in ein neues Tube überführt und bei 14000 rpm für 3 min zentrifugiert bis die Membran komplett trocken ist. Nun wird die Säule in ein 1,5 ml Tube gebracht. Der Überstand im letzten Tube wird wieder entsorgt. Im neuen Tube wird die Säule geöffnet und 20-100 µl Buffer ATE in die Mitte der Membran gegeben. Bei RT wird die Säule für 5 min inkubiert und anschließend bei 14000 rpm für eine

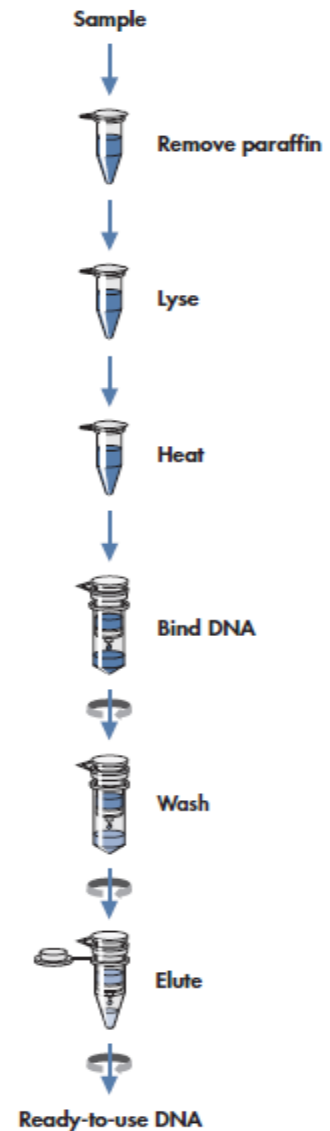


Abbildung 14: Workflow der DNA-Extraktion aus Paraffinblöcken, aus QIAamp-Protokoll

Minute zentrifugiert. Per NanoDrop (siehe Kapitel 3.12) wird die Konzentration der gDNA gemessen. Das gereinigte DNA-Eluat kann nun entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in der WGA aufbewahrt werden.

Alle DNA-Proben von Primärtumorgewebe werden den gleichen WGA- und Reamp-Protokollen unterzogen, bevor sie genomisch analysiert werden.

3.11. Qualitätskontrolle der Amplifikation von DNA aus FFPE-Primärtumorgewebe

Es ist davon auszugehen, dass die DNA der FFPE-Proben durch die Aufbereitung mit Formalin und Paraffin Schäden davon getragen hat. Um weiteren Problemen bei der Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen vorzubeugen, ist eine ausgiebige Qualitätskontrolle von Nöten. Dafür wurde ein spezieller Assay für kurze Amplifikate (90-500 bp) entwickelt, bei welchem für jede einzelne FFPE-Probe drei verschiedene Multiplex-Reaktionen mit unterschiedlichen Primern durchgeführt wurden. Die Qualitätskontrolle der WGA-Produkte aus PT-Gewebe unterscheidet sich zu der von DCCs in den zu untersuchenden Genabschnitten. Für aus FFPE gewonnener amplifizierter DNA werden neun Marker getestet. Es werden drei verschiedene Multiplex-PCRs durchgeführt, wodurch das Vorhandensein von Sequenzen innerhalb kurzer (100-300 bp), mittellanger (301-750 bp) und langer (>750 bp) MSE-Fragmente überprüft werden kann (Tabelle 15). Vor allem mittellange und lange Mse-Fragmente sprechen für eine höhere Qualität der DNA. Diese Amplifikate werden zum größten Teil in der 2. und 3. Multiplex-PCR nachgewiesen. Die Primer wurden zusätzlich selektiert, um die spätere Selektion von Proben zur Überprüfung von bekannten Onkogenen (z.B. *KRAS*, *PIK3CA* und *EGFR*) mit Sequenzanalysen zu erleichtern.

Tabelle 15: Primersequenzen der 3 Multiplex-PCRs mit korrespondierenden PCR-Produktlängen (grün: Multiplex1, rot: Multiplex2, weiß: Multiplex3)

Primer	bp	Primer forward
		Primer reverse
TP53 Exon 5/6	507	ACGCATGTTTGTTCCTTTGC ACCCCTCCTCCCAGAGAC
EGFR Exon 20	442	AAACGTCCCTGTGCTAGGTC CATGGCAAACCTTTGCTATCC
CKND2A	380	TGGCTCTGACCATTCTGTTC TGGAAGCTCTCAGGGTACAA

NRAS Exon 2	174	ACACCCCCAGGATTCTTACA TCCGCAAATGACTTGCTATT
TP53 Exon 8	245	AGGTAGGACCTGATTTCTTACTG AGGCATAACTGCACCCTTG
EGFR Exon 21	418	CAGCGGGTTACATCTTCTTTC AAACAATACAGCTAGTGGGAAGG
EGFR Exon 18	496	TTGTCCTTCCAAATGAGCTG TGCCTTTGGTCTGTGAATTG
KRAS Exon 1_short	91	ATAAGGCCTGCTGAAAATGAC CTGAATTAGCTGTATCGTCAAGG
BRAF Exon 15	171	CTCTTCATAATGCTTGCTCTG TCCAGACAACTGTTCAAACCTG
PIK3CA Exon 20 (HS2)	221	TCTAGCTATTCGACAGCATGC TTGTGTGGAAGATCCAATCCAT
EGFR Exon 19	350	TCCTCGATGTGAGTTTCTGC ATGCCTCCATTTCTTCATCC
TP53 Exon 7	400	GAGGCTGAGGAAGGAGAATG AGTATGGAAGAAATCGGTAAGAGG

Für jede Multiplex-Reaktion wird ein Mastermix (Tabelle 16) erstellt und mit 1 µl der Probe zusammengebracht, gevortext und kurz zentrifugiert. Im Lightcycler wird das Programm Multiplex (Tabelle 16) durchlaufen und im Anschluss mittels Gelelektrophorese ausgewertet (siehe Kapitel 3.12). Die amplifizierten Proben mussten auf mindestens drei von zwölf getesteten Markern positiv sein, um für die Low-Pass-Sequenzierung ausgewählt zu werden. Multiplex 1 und Multiplex 2 richten sich an kürzere MseI-Fragmente, wohingegen positive Banden bei der Multiplex 3 für eine sehr hohe Qualität und geringe Denaturierung bzw. Fragmentierung der DNA auf Grund der Fixierung sprechen.

Tabelle 16: Mastermixe der Multiplex-Reaktionen (1. Grün, 2. Rot, 3. Weiß) und PCR-Programm

Reagenzien	Ansatz 1x in µl
PCR Buffer	1,0

Primer set #1 (8 μ M) (KRAS_Ex1, PIK3CA_Ex20, EGFR_Ex19)	3,0	→ 0,5 μ l pro Reaktion
Primer set #2 (8 μ M) (BRAF_Ex15, TP53_Ex7)	4,0	
BSA	0,2	
dNTPs (10 mM)	0,2	
FastTaq	0,1	
H ₂ O	0,5	
insgesamt	9,0	

Reagenzien	Ansatz 1x in μ l	
PCR Buffer	1,0	→ 0,5 μ l pro Reaktion
Primer set #3 (8 μ M) (EGFR_Ex18, EGFR_Ex21, TP53_Ex8, NRAS_Ex2)	4,0	
BSA	0,2	
dNTPs (10 mM)	0,2	
FastTaq	0,1	
H ₂ O	3,5	
insgesamt	9,0	

Reagenzien	Ansatz 1x in μ l	
PCR Buffer	1,0	→ 0,5 μ l pro Reaktion
Primer set #4 (8 μ M) (CKND2A_Ex3, EGFR_Ex20, TP53_Ex5/6)	3,0	
BSA	0,2	
dNTPs (10 mM)	0,2	
FastTaq	0,1	
H ₂ O	4,5	
insgesamt	9,0	

Schritt	Zyklen	Temperatur in °C	Zeit
1	32	95	4 min
2		94	30 s

3		58	30 s
4		72	1,5 min
5	1	72	7 min
6		4	∞

3.12. Kopienzahlveränderungsanalyse durch Array-basierte komparative genomische Hybridisierung

Die aCGH basiert auf einer hochauflösenden Oligonucleotid-Hybridisierung und dient der Erkennung von strukturellen Kopienzahlveränderungen. Die hier angewendete Methode hat den Vorteil, dass sie zuverlässig numerische Kopienzahlveränderungen von bis zu 0,1Mb in Einzelzellen erkennt. Die methodische Ausarbeitung wurde bereits in *Czyz et al (2014)* publiziert (69). Die Probenaufarbeitung erfolgte zum größten Teil durch Dr. Schneider und Dr. Czyz. Die Ergebnisse wurden mir zur weiteren Auswertung zur Verfügung gestellt.

Vorbereitung der Proben: Ausgangsmaterial für die aCGH sind re-amplifizierte (Reamp65) Proben und Referenz-DNA, welche von gesunden Probanden mittels Blutentnahme gewonnen wird. Im ersten Schritt wird die DNA mit dem SureTag DNA Labeling Kit (Agilent Technologies) gelabelt. Dafür wird der Mastermix (Tabelle 17) im doppelten Ansatz angesetzt und 98 µl mit 2 µl der Probe in zwei Tubes (49 µl Mastermix und 1 µl Probe) gebracht, gevortext und zentrifugiert. Cy5-dCTP und Cy5-dUTP werden zum Labeling der Probe verwendet und Cy3-dCTP und Cy3-dUTP zum Labeling der Referenz. Das Labeling erfolgt in einer PCR (Tabelle 17) (Dauer: ca. 1 h 26 min). Cy5 bzw. Cy3 konjugieren dabei direkt mit dem dNTPs, was eine gleichmäßige Verteilung des Dyes auf allen DNA-Fragmenten unabhängig von ihrer Größe zur Folge hat. Die fluoreszenzmarkierten NTPs werden in einer PCR eingesetzt, welche bei der Elongation verwendet werden und somit die DNA markieren.

Tabelle 17: Mastermix und PCR-Programm für die Labeling-Reaktion der aCGH

Reagenzien Probe/Referenz	Ansatz 1x in µl
Roche PCR Buffer	5
LIB1 (100µM)	1,2
9/10 Mix (dNTPs)	1.75

Cy5-dCTP/Cy3-dCTP	1.75
CY5-dUTP/Cy3-dUTP	1.75
BSA (Roche)	0.5
PolMix	1.5
H ₂ O PCR HPLC	36,05

Schritt	Zyklen	Temperatur in C°	Zeit
1	10	94	15 s
2		60	30 s
3		65	3,5 min
4	2	94	15 s
5		60	30 s
6		65	3,5 min +10 s/ Zyklus
7	1	65	7 min

Der nächste Schritt ist ein Verdau mit dem Restriktionsenzym TruI, welcher zur Abspaltung der LIB1-Adaptoren dient. Dabei wird wieder ein doppelter Ansatz des Mastermixes (Tabelle 18) angesetzt und pro Probe 6,6 µl des Verdau-Mix hinzugegeben und im Tetrad-Thermocycler das Program TRU1 (Tabelle 18) gestartet (Dauer: ca. 3h).

Tabelle 18: Mastermix und PCR-Programm des TruI-Verdaus der aCGH

Reagenzien	Pro Probe in µl
Buffer R	5.6
Tru I	1

Temperatur in °C	Zeit
65	3 h

Als nächstes folgt die Aufreinigung des Tru1-Labeling-Produktes mit dem Amicon Ultra 0,5-100k Purification Kit. Dazu werden zuerst die Doppelansätze gemeinsam in ein Tube gegeben und 360 μl H_2O werden zugegeben und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren wird alles vermischt. Danach wird das Gemisch auf die Säulen pipettiert und bei 14000 rcf für 10 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Durchfluss kann verworfen werden. Es werden 480 μl H_2O hinzugegeben und bei gleicher Einstellung zentrifugiert und der Durchfluss wird wieder verworfen. Die Säule wird mit der Öffnung nach unten zeigend in ein neues 1,5 ml Tube überführt, um den Rest des Durchflusses zu sammeln und danach zu entsorgen. Bei 1000 rcf wird die Säule ein weiteres Mal für eine Minute bei RT zentrifugiert. Das Eluat-Volumen wird mit einer Pipette bestimmt (ca. 11-18 μl) und auf 21 μl mit H_2O in ein Tube aufgefüllt. Die Säule kann danach entsorgt werden. Die DNA-Ausbeute und Dye-Inkorporation wird mit dem NanoDrop ND 2000c (Thermo Scientific) gemessen. Dazu werden 2 μl auf den Sensor pipettiert und für die Einstellungen „Cy5“ und „Cy3“, „overlay spectra“ und „dsDNA“ vermessen. Dabei werden Maxima der Absorptionskurve bei 260 nm als gut bewertet und Koeffizienten der Maxima zwischen Test und Blank-Probe von 1,8 als rein bewertet (Abbildung 15).

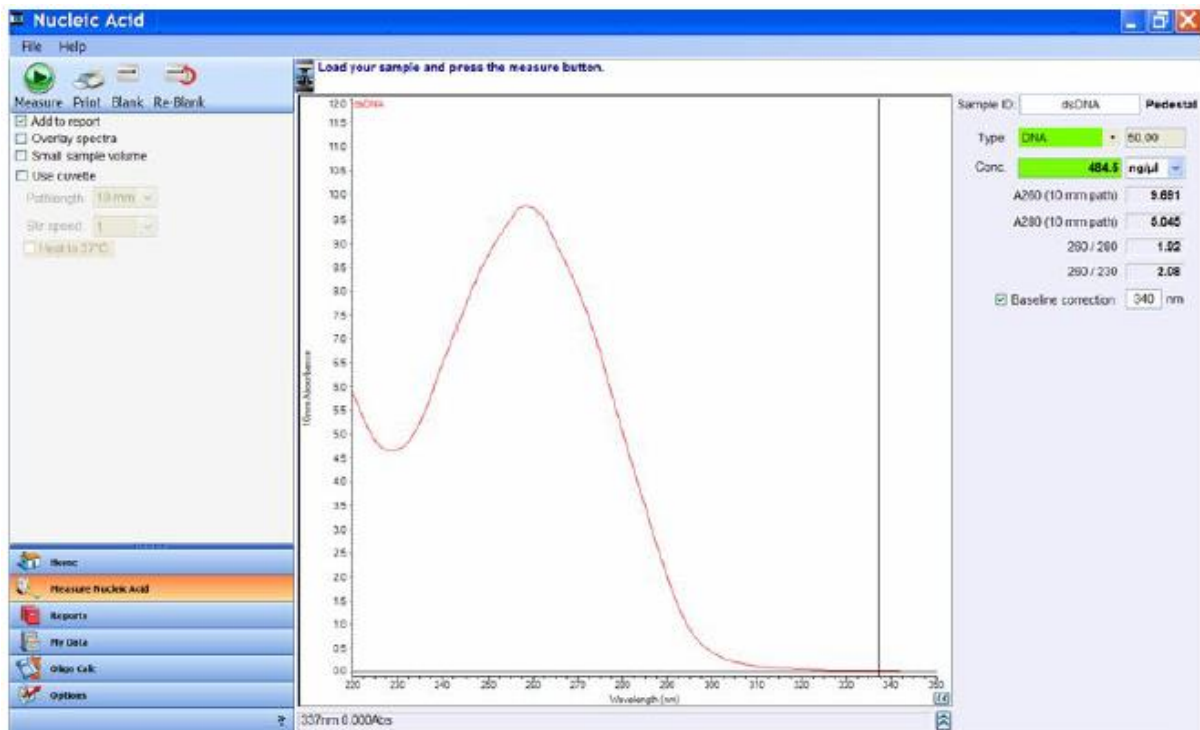


Abbildung 15: Optimale Absorptionskurve einer NanoDrop 2000c Messung von dsDNA, Max. bei 260 nm

Hybridisierung: Bei der Hybridisierung wird kompetitiv Proben- und Referenz-DNA an Bindestellen auf dem Microarray-Chip gebunden. Cot1-DNA dient dazu hochrepetitive, unspezifische Bindestellen in der DNA zu binden. Ein Array kann 4 Proben erfassen. Pro Experiment können 2-3 Arrays hybridisiert werden. Zuerst folgt ein Denaturierungs-/Renaturierungsschritt. Hierzu wird ein vierfacher Ansatz des Mastermix (Tabelle 19) angefertigt. Es werden je 19 μl der Probe und Referenz in ein 1,5 ml Tube pipettiert und mit 87,4 μl des Mastermix durch langsames Auf- und Abpipettieren vermischt. Die Proben werden dann in der Zentrifuge bei 350 rpm für 3 min auf 95° C denaturiert und für 300 min bei 37° C renaturiert.

Tabelle 19: Mastermix der Hybridisierung der aCGH

Reagenzien	Ansatz 1x in μl
Cot1-DNA (Roche)- 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	5
10x Agilent Blocking Reagent	12
2x Hi RPM Hybridization Buffer	60
Tween20 - 25% (v/v)	5,2
Igepal - 25% (v/v)	5,2
Gesamtvolumen	87,4

Als nächstes werden 105 μl der Hybridisierungslösung auf das Gasket Slide in einen Bereich pipettiert und das aCGH Slide (Agilent) darauf platziert. Zusammen werden sie in den Microarray Hybridization Ofen gegeben und für 24 h bei 65°C und 20 rpm hybridisiert.

Waschen: Zuvor werden drei kleine und zwei große Glasküvetten mind. 4x mit VE-Wasser gewaschen und über Nacht im Wasserbad bei 37°C belassen. Nach der Hybridisierung werden die Slides herausgenommen und in Waschpuffer 1A geöffnet. aCGH Slide wird dann in Waschpuffer 1B gestellt und bei RT 100 rpm für 2,5 min zentrifugiert. Der Slider wird umgedreht und der letzte Schritt wiederholt. Die gleiche Prozedur wird im Waschpuffer 2 bei RT und 100 rpm für je 30 s wiederholt. Daraufhin wird der Slide kurz in eine Küvette mit Acetonitril gestellt, getrocknet und mit einem darüberliegenden Ozonschutz in einen schwarzen Slide Holder (Agilent) gelegt. Nun kann der Array im Microarray Scanner Type C (Agilent) gescannt werden.

Analyse: Die Bilddateien wurden mit der Agilent Genomic Feature Extraction Software (Version 10.7) verarbeitet und in der Agilent Genomic Workbench Software (Version 6.5 Lite) ausgewertet. Setting zur Auswertung der aCGH-Profiles:

Es wurde dazu ein ADM-2 Algorithmus mit Centralization-Threshold bei 6,0 und Bin Größe von 10 verwendet. GC-Korrektur lag bei 40kb. Ein Abberationsfilter mit einem Minimum von \log_2 ratio 0,3 und einem Minimum von 25 Probes in einem aberranten Intervall wurden gewählt, um falsch-positives Calling zu vermeiden.

3.13. Kopienzahlveränderungsanalyse durch Low-Pass-Sequenzierung

Die Low-Pass-Sequenzierung wurde in Zusammenarbeit mit einer Bachelorstudentin, Selina Waldbauer, und unter Supervision von Dr. Czyz durchgeführt.

Ausgangsmaterial für die Low-Pass-Sequenzierung sind re-amplifizierte Proben (Reamp 68) mit einem GII von 2 oder mehr. Die Vorbereitung beinhaltet eine Aufreinigung, das Versehen mit Barcodes und Adaptoren und einer anschließenden Amplifizierung. Nach jedem Schritt folgt eine weitere Aufreinigung. Es wird in Sets von 8 Proben gearbeitet. Für die Aufreinigung werden paramagnetischen Kugeln, welche reversibel DNA binden, verwendet (70).

Reamp-Aufreinigung: 5 μ l Reamp-Produkt und 5 μ l Nuklease-freies Wasser werden in 0,2 ml PCR-Tube überführt. Zum Resuspendieren werden die SPRIselect Beads (engl. Solid-phase reversible immobilisation) gevortext und 18 μ l werden zur verdünnten Probe hinzugefügt. Danach wird kurz gevortext und zentrifugiert und 5 Minuten auf Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Tubes werden auf eine magnetische Platte gestellt, was die Beads vom Überstand trennt. Der Überstand wird abgetragen und 200 μ l 80% Ethanol werden hinzugefügt, während die Tubes noch auf der magnetischen Platte sind. 30 Sekunden Inkubation folgen und der Überstand wird wieder abgetragen. Dieser Waschschrift wird zweimal wiederholt. Nach einer Minute Lufttrocknen können die Tubes von der magnetischen Platte genommen werden. Die Probe wird mit 22 μ l Nuklease-freiem Wasser eluiert. Es wird gevortext, kurz zentrifugiert und 2 Minuten auf Raumtemperatur inkubiert. Die Proben werden auf der magnetischen Platte 5 Minuten inkubiert und 20 μ l des Überstand abgetragen (Abb. 20).



Abbildung 16: Aufreinigungsprozess mit SPRI-Beads (aus Menarini-Protokoll)

In den nächsten Schritten werden die DNA-Fragmente mit Adaptoren an beiden Enden der Sequenz versehen. Hierzu werden DNA Primeroligomere verwendet. Vom Illumina P7 D7XX gibt es 12 Varianten und vom Illumina P5 D50X gibt es 8 Varianten (Tabelle 20). Durch unterschiedliche Kombinationen dieser Adaptervarianten können bis zu 96 Proben mit unterschiedlichen Barcodes markiert werden (Tabelle 21).

Tabelle 20: Illumina Adapter Sequenzen D5xx und D7xx

Ampli1 D5xx	Sequenz
D501	TATAGCCT
D502	ATAGAGGC
D503	CCTATCCT
D504	GGCTCTGA
D505	AGGCGAAG
D506	TAATCTTA
D507	CAGGACGT
D508	GTACTGAC

Ampli1 D7xx	Sequenz
D701	ATTACTCG
D702	TCCGGAGA
D703	CGCTCATT
D704	GAGATTCC
D705	ATTCAGAA
D706	GAATTCGT
D707	CTGAAGCT
D708	TAATGC GC
D709	CGGCTATG
D710	TCCGCGAA
D711	TCTCGCGC
D712	AGCGATAG

Tabelle 21: Aufteilung einer Illumina-Sequenzierplatte mit 96 Proben

Ampli1	D701	D702	D703	D704	D705	D706	D707	D708	D719	D7010	D7011	D7012
D501	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
D502	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
D503	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
D504	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

D505	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
D506	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
D507	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
D508	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

1. Extensionreaktion (FE) mit Ampli1™ D7xx: Der Mastermix (Tabelle 22) wird im Vorhinein zusammengemischt für 8 Proben mit 10% Exzess, um Pipettierfehler zu kompensieren. Er wird kurz gevortext und zentrifugiert. Je 9 µl des Mixes werden mit 3 µl des spezifischen Ampli1™ D7xx in ein PCR-Tube überführt. Danach werden 3 µl der aufgereinigten Probe hinzugefügt, kurz gevortext, zentrifugiert und im Thermocycler das FE-Programm (Tabelle 22) gestartet (Dauer: 10-11 Minuten).

Tabelle 22: Mastermix und PCR-Programm der 1. Extensionsreaktion der Low-Pass-Sequenzierung

Reagenzien	Ansatz 8x in µl
Ampli1™ PCR-H ₂ O	76
Ampli1™ PCR Reaction Buffer	12
Ampli1™ PCR dNTPs	4,08
Ampli1™ PCR BSA	2,96
Ampli1™ PCR Taq Polymerase	0,96
Insgesamt	96

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	95	4 min
2	95	30 s
3	62	30 s
4	72	3 min
5	10	∞

FE-Produkt Aufreinigung: SPRIselect Beads werden zum Resuspendieren gevortext und 22,5 µl werden dem FE-Produkt hinzugefügt, gevortext und kurz zentrifugiert. Es folgen 5 Minuten Inkubation bei RT. Die Tubes werden für ca. 5 min auf die Magnetplatte gestellt und der Überstand wird danach vorsichtig abgenommen. 200 µl 80 % Ethanol werden hinzugegeben und 30

s bei RT inkubiert. Der Überstand wird wieder vorsichtig abgenommen. Die Waschschrte werden zweimal wiederholt. Es wird zentrifugiert und die letzten Tropfen Ethanol werden entfernt und die Probe wird luftgetrocknet für ca. eine Minute.

2. Extensionsreaktion (SE): Der Mastermix (Tabelle 23) wird in der Wartezeit der FE-Reaktion vorbereitet und direkt nach der letzten Aufreinigung werden je 12 µl pro Probe hinzugegeben. Es werden 3 µl spezifischer Ampli1™ D5xx hinzugefügt, gevortext und kurz zentrifugiert und im Thermocycler das SE-Programm (Tabelle 23) durchlaufen (Dauer: 11 min).

Tabelle 23: Mastermix und PCR-Programm der 2. Extensionsreaktion der Low-Pass-Sequenzierung

Reagenzien	Ansatz 8x in µl
Ampli1™ PCR-H ₂ O	76
Ampli1™ PCR Reaction Buffer	12
Ampli1™ PCR dNTPs	4,08
Ampli1™ PCR BSA	2,96
Ampli1™ PCR Taq Polymerase	0,96
insgesamt	96

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	95	4 min
2	95	30 s
3	60	30 s
4	72	3 min
5	10	∞

SE-Produkt Aufreinigung: Zum SE-Produkt werden 22,5 µl PEG NaCl-Lösung hinzugefügt, gevortext, kurz zentrifugiert und bei RT 5 min inkubiert. Die Tubes werden für ca. 5 min auf die Magnetplatte gestellt und der Überstand wird danach vorsichtig abgenommen. Es werden 200 µl 80 % Ethanol hinzugegeben und nach 30 s Inkubationszeit wird der Überstand vorsichtig abgenommen. Dieser Waschschrte wird zweimal wiederholt und die letzten Tropfen Ethanol werden vorsichtig abgenommen und die Proben werden eine Minute luftgetrocknet.

Library Amplifikation (LA): Der Mastermix (Tabelle 24) wird während der Wartezeit angefertigt, gevortext und zentrifugiert. Es werden 15 µl des Mastermixes direkt zum aufgereinigten Produkt gegeben, gevortext und kurz zentrifugiert. Die Proben durchlaufen dann das LA-Programm am Thermocycler (Tabelle 24) (Dauer: 1h 12 min).

Tabelle 24: Mastermix und PCR-Programm der Library Amplifikation der Low-Pass-Sequenzierung

Reagenzien	Ansatz 8x in µl
Ampli1™ PCR-H ₂ O	84
Ampli1™ PCR Reaction Buffer	12
Ampli1™ P5 Primer	8
Ampli1™ P7 Primer	8
Ampli1™ PCR dNTPs	4,08
Ampli1™ PCR BSA	2,96
Ampli1™ PCR Taq Polymerase	0,96
insgesamt	120

Schritt	Zyklen	Temperatur in °C	Zeit
1	1	95	4 min
2		95	30 s
3		60	30 s
4		72	2 min
5	12	95	30 s
6		60	30 s
7		72	2 min (+20 s/Zyklus)
8		72	7 min
9		10	∞

Ampli1™ Low-Pass-Library Aufreinigung: Es werden 22,5 µL PEG NaCl-Lösung hinzugefügt, gevortext, kurz zentrifugiert und bei RT für 5 min inkubiert. Die Tubes werden auf für ca.

5 min auf die magnetische Platte gestellt und der Überstand wird danach vorsichtig abgenommen. Es werden 200 µL 80 % Ethanol hinzugefügt und 30 s inkubiert. Danach wird der Überstand wieder vorsichtig abgenommen. Der letzte Schritt wird noch zweimal wiederholt. Die letzten Tropfen Ethanol werden abgenommen und die Proben für eine Minute luftgetrocknet. Die Proben werden von der Magnetplatte genommen und mit 17 µL Low TE verdünnt, gevortext, zentrifugiert und für 2 min auf RT inkubiert. Die Tubes werden wieder auf die Magnetplatte gestellt und nach 5 min Inkubation werden 15 µL des Überstands in neue Tubes transferiert. An diesem Punkt werden die Proben gepoolt und es folgt die Qualitätskontrolle der Libraries.

Qualitätskontrolle der Low-Pass-Libraries: Um einen austarierten Pool zu erhalten, in dem jede Probe die gleiche Anzahl an sequenzierbaren Amplikons beisteuert, ist eine Qualitätskontrolle der Libraries von Nöten. Die Qualitätskontrolle der Lowpass-Proben ist mehrschrittig und besteht aus: 1.) Qubit Messung, 2.) Bioanalyzer Messung, 3.) NanoDrop Messung, 4.) MiSeq Messung.

1.) In der Qubit Messung (Thermo Fischer) wird die Quantität der dsDNA-Moleküle fluorometrisch bestimmt. Hierzu müssen die Proben so verdünnt werden, dass ihr dsDNA-Gehalt auf der Standardkurve des verwendeten Kits liegen. Alle Kit Komponenten werden bei RT verwendet. Zuerst wird die Qubit Working Solution (1:200 Dye und Puffer) hergestellt. Als nächstes wird der Standard (190 µl Qubit Working Solution und 10 µl Reagent 1 / 2 Aus dem Kit) hergestellt. Die Proben-Verdünnung folgt mit 198 µl Working Solution zu 2 µl Probe. Alles wird gevortext und bei RT in Dunkelheit für 2 min inkubiert. Dann erfolgt die Messung. Zuerst werden die Standards 1 / 2 vermessen und danach alle Proben. Der eingesetzte Farbstoff (Dye) bindet spezifisch an dsDNA und sondert nach Anregung mit Laserlicht ein Fluoreszenzsignal ab, das proportional zu der eingesetzten Menge an DNA ist. Anschließend wird aus dem Ergebnis das molekulare Volumen errechnet: $1 \text{ ng} / \mu\text{l} = 2 \text{ nM}$. Für eine erfolgreiche Sequenzierung sollten die finalen Library Pools eine DNA-Menge von mindestens $1 \text{ ng} / \mu\text{l}$ aufweisen.

2.) Die BioAnalyzer Messung gibt Aufschluss über die Verteilung der Fragmentgrößen der DNA und schätzt das Mittel der Amplikongrößen. Das Verfahren entspricht einer semi-automatisierten Gelelektrophorese. Der hier verwendete Agilent BioAnalyzer HS Kit ermöglicht eine hochsensitive Detektion der dsDNA Fragmente in einem Größenbereich von 35 bis 10.800

bp. Zuerst werden die Libraries 1:5 mit Low TE Puffer verdünnt. Es wird 1 µl der Library auf den Agilent High Sensitivity DNA-Chip aufgetragen und im Agilent 2100 Bioanalyzer vermessen. Sollte die Library Konzentration jedoch größer als 10 ng/µl sein, müssen die Proben vor der Vermessung weiter verdünnt werden. Nach der durchgeführten Messung werden von der Agilent 2100 Expert Software Diagramme (Abbildung 17) erstellt, mithilfe derer die Größenverteilung der dsDNA Amplikons ausgelesen werden kann.

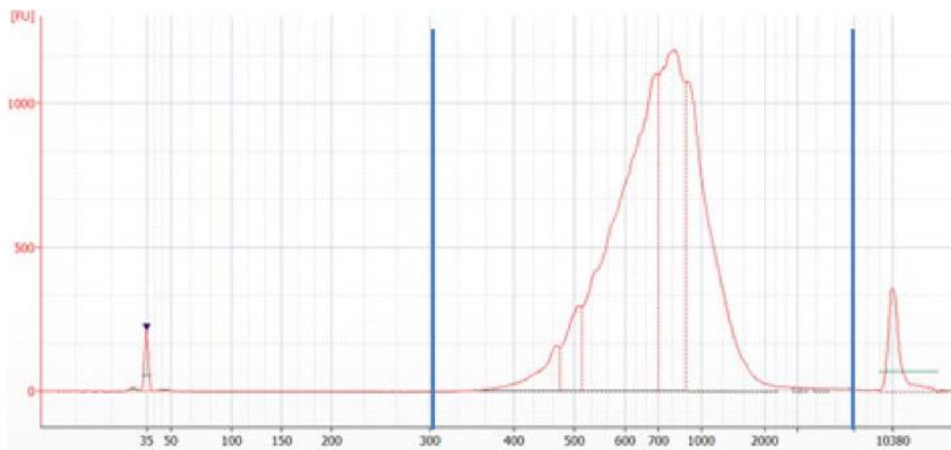


Abbildung 17: Beispiel einer BioAnalyzer-Messung

3.) Das Protokoll der NanoDrop Messung ist bereits im Kapitel 3.12 beschrieben.

4.) Die MiSeq (Abbildung 22) Messung hilft zusätzlich zu den vorherigen Messungen ein Level an Kontamination zu bestimmen, indem es die Quantität der Reads aus dem humanen Genom bestimmt und in Relation zu gemessenen Genomen von Prokaryoten im Pool setzt. Zusätzlich wird die Menge an gemessenen Amplikons in jeder Probe in Relation zur Gesamtmenge an Amplikons im Pool gesetzt. Dieser zusätzliche



Abbildung 18: MiSeq (Illumina) Gerät

Qualitätsstandard erlaubt es auch das Pooling der Zellen noch ausgeglichener zu gestalten, indem auf Grundlage der Read-Zählung Konzentrationen verändert werden können.

Zuerst werden alle Bestandteile aus dem MiSeq Reagent Kit V2 Nano auf RT gebracht. Der Cartridge wird in einem Wasserbad bei RT 1 Stunde lang inkubiert und anschließend auf Eis überführt wird. Die Natronlauge wird auf eine Konzentration von 0,2 N verdünnt. Dann wird

der Sample Pool, mit dem im Illumina 44 Kit enthaltenen HT1 Puffer auf 4nM verdünnt. Es folgt ein Denaturierungsschritt mit der Natronlauge. Für die Denaturierung werden 5 µl der frischen 0,2 N NaOH Lösung zur verdünnten Probe gegeben, gevortext, 1 Minute lang abzentrifugiert und für 5 min bei RT inkubiert. Danach werden 990 µl HT1 Buffer zur denaturierten Probe hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 20 pM zu erreichen. Dann wird die Probe auf 12,5 pM mit HT1 Puffer verdünnt. Zur Verdünnung der Ampli1 SEQ Primer werden 5 µl der Ampli1 SEQ Primer Lösung (60 nM) zu 595 µl HT1 Puffer gegeben und die resultierende Lösung (0,5 nM) gevortext. Im Folgenden wird der Cartridge auf Position 17 mit 600 µl der verdünnten Library und auf Position 18 mit dem verdünnten Custom Primer 1 beladen. Als nächster Schritt wird die Vorbereitung des MiSeq Systems auf den Sequenzierlauf initiiert. Es beginnt mit der Vorbereitung der sog. Flowcell, ein Glasobjektträger, auf deren Oberfläche die Sequenzierung stattfinden wird). Dafür wird die Flowcell aus dem Aufbewahrungsbehälter entfernt und gründlich mit Wasser abgespült, um Salzablagerungen und Pufferrückstände zu entfernen. Anschließend wird sie mit einem Alkohol befeuchteten Tuch gereinigt, sodass alle Anschlüsse freizugänglich und alle Wasserreste entfernt sind. Im Anschluss kann auch der PR2 Buffer (Washpuffer für die Sequenzierung) in die Reagenzienkammer eingesetzt und der Cartridge in das System eingeschoben werden. Die richtige Platzierung aller Bestandteile im MiSeq wird durch das System überprüft. Nach jedem Lauf muss ein Post-Run-Wash durchgeführt werden. Dafür wird eine frische Waschlösung aus 0,5% Tween 20 verwendet, welche in jedes Reservoir des Wash Tray und in die Waschflasche pipettiert wird.

Pooling mit Labcyte Echo-525-System: Zur Erstellung eines äquimolaren Pools wird ein semi-automatisiertes Flüssigkeitstransfersystem verwendet, welches sich vor allem durch eine hohe Präzision beim Pipettieren von kleinen Volumina auszeichnet. Das Pooling besteht aus zwei Transferschritten, wobei beim 1. Schritt die Low-Pass-Proben gepoolt werden und beim 2. Schritt die Volumina für jede Probe angepasst werden.

1. Schritt: Von jeder Probe werden 0,5 µl entnommen und auf eine 385-Well-Platte übertragen. Es erfolgt eine Quantifizierung mit Qubit und BioAnalyzer, gefolgt von einer Sequenzierung mit MiSeq. Reads mit einem hohen Anteil an nicht-humanen oder nicht-kartierten Sequenzen werden detektiert und eliminiert.

2. Schritt: Zur Anpassung der Volumina werden die Proben anhand von Schwellenwerten (Amplikons/Reads) in drei Kategorien eingeteilt. Bei der ersten Kategorie handelt sich um Proben mit 0-300 Reads. Der Schwellenwert wird so angepasst, dass nicht mehr als 8 von 96

Proben darunterfallen. Bei dieser Gruppe wird das gesamte Volumen verwendet. Bei der zweiten Kategorie handelt es sich um Proben mit einer mittleren Anzahl an Reads. Hier wird ein proportionaler Volumentransfer zur jeweiligen Menge an Reads pro Probe durchgeführt (Abbildung 19). Mindestens werden 125 nl transferiert. Die Proben benötigen im Normalfall keine zusätzliche Verdünnung.

$$\text{Volume } [\mu\text{l}] = \text{Volume(max)}[\mu\text{l}] \times \frac{\text{Read count (min)}}{\text{Read count (MiSeq)}}$$

Abbildung 19: Gleichung zur Volumenberechnung von Proben mit mittlerer Menge an Reads. Volume (max)= maximal transferierbares Volumen (9,0 µl). Read count (min) = Schwellenwert für Kategorie 1. Read count (MiSeq) = gemessene Readanzahl der Probe.

Bei Proben der Kategorie drei handelt es sich um Proben mit einer hohen Konzentration an Reads. Diese werden vor dem Pooling so verdünnt (Abbildung 20), dass mindestens ein Volumen von 125 nl transferiert werden kann.

$$\text{Volume } [\mu\text{l}] = \text{Volume(max)}[\mu\text{l}] \times \frac{\text{Read count (min)}}{\text{Read count (MiSeq)}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Abbildung 20: Gleichung zur Volumenberechnung von Proben mit hoher Menge an Reads. Volume (max)= maximal transferierbares Volumen (9,0 µl). Read count (min) = Schwellenwert für Kategorie 1. Read count (MiSeq) = gemessene Readanzahl der Probe. Verdünnungsfaktor = Faktor der angesetzten Proben

Im letzten Schritt werden die einzelnen Transfervolumina zusammengebracht, aufgereinigt und quantifiziert, wobei sie ein Endvolumen von 50 µl nicht überschreiten sollten.

Aufreinigung und Quantifizierung der Pools: Die austarierten Pools werden mit den AMPure XP Beads aufgereinigt und anschließend mit dem Qubit dsDNA HS und BioAnalyzer HS Assays quantifiziert. Die zusätzliche Aufreinigung ermöglicht die noch in den Proben vorhandenen Adapter-Oligomere zu entfernen. Die Quantifizierung mit Qubit- und BioAnalyzer-Verfahren ermöglicht die Verifizierung der DNA-Qualität (Menge und Fragmentgrößenverteilung) vor der Sequenzierung des Pools. Bei der Beurteilung der Qualität müssen die Vorgaben der Sequenzierdienstleister eingehalten werden. Sofern diese eingehalten wurden, werden die Proben auf Trockeneis gelagert zum Sequenzieren verschickt.

Sequenzierung des Proben Pools mit dem NovaSeq 6000 System: Dabei wird jeder Pool jeweils auf eine Linie der SP Flow Cell geladen und mit einer Leselänge von 1x151 bp sequenziert. Zusätzlich wird bei der Sequenzierung der Reads ein Custom Primer (in Ampli1 LowPass WGS

Kit mitgeliefert) angesetzt. Darüber hinaus wurden neben den Sequenzreads auch zwei 8 bp lange Index Reads ausgelesen. Insgesamt werden bei der Sequenzierung mit dem NovaSeq 6000 System unter Verwendung einer SP Flow Cell bis zu 400 Cluster pro Linie generiert, was einer Durchschnittsmenge von ca. 4 Millionen Reads pro Probe entspricht.

3.14. Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mit der Software Stata/IC 16.0 durchgeführt. Die Prävalenz wurde anhand deskriptiver Statistik erhoben. Die Korrelationsanalysen wurden anhand des Pearson Chi-Square Tests oder Fisher`s Exact Tests berechnet. Einen Zusammenhang zwischen Alter der Patienten und dem Vorhandensein von DCCs im Knochenmark wurde mittels logistischer Regression ermittelt, der Zusammenhang zwischen Alter und Anzahl der DCCs pro Patienten wurde anhand einer linearen Regression festgestellt. *P*-Werte von <0.05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Überlebensanalysen wurden anhand der Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Untersucht wurden das krankheitsfreie Überleben (übersetzt Disease Free Survival, abgekürzt als DFS) und das Gesamtüberleben (übersetzt Overall Survival, abgekürzt als OS) in Bezug auf das Vorliegen CK+-Zellen, das Vorliegen von Drivermutationen in den CK-Zellen und das Vorliegen von aberranten Genomen in den CK-Zellen. Für die statistischen Korrelationen zur klinischen Signifikanz sowie für die Überlebensanalysen wurden Patientinnen ausgeschlossen, für die kein klinisches Follow-up vorlag.

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Studie präsentiert. Der generelle Arbeitsablauf ist in Abbildung 21 dargestellt. Zusammenfassend wurden 74 Paraffinblöcke und 495 Knochenmark-aspirate aufbereitet. Patientinnen, mit vorbekanntem Zweitkarzinom, mit Knochenmarkspunktion nicht nach der primären onkologischen Operation oder bei denen weniger als 1 Mio. Zellen aus dem Aspirat gescreent wurden ausgeschlossen. Es konnten 363 Färbungen/bzw. Patientinnen in die Studie aufgenommen werden. 135 Patientinnen zeigten im Knochenmark CK+-Zellen. Es wurde DNA aus 137 Stenzen Primärtumor und aus insgesamt 330 CK+-Zellen extrahiert, amplifiziert und re-amplifiziert. Nach der Qualitätskontrolle konnten 37 Primärtumorproben und 260 CK+-Zellen genomisch analysiert werden. Aus den CK+-Zellen wurden 239 qPCRs, 174 Sanger-Sequenzierungen erfolgreich durchgeführt. Aus der Bulk-DNA und aus den CK+-Zellen wurden insgesamt 266 CNV-Analysen (entweder mittels aCGH oder mittels Low-Pass-Sequenzierung) durchgeführt. Am Ende erfolgte die statistische Auswertung in Bezug auf die klinische Signifikanz der ermittelt genomischen Ergebnisse.

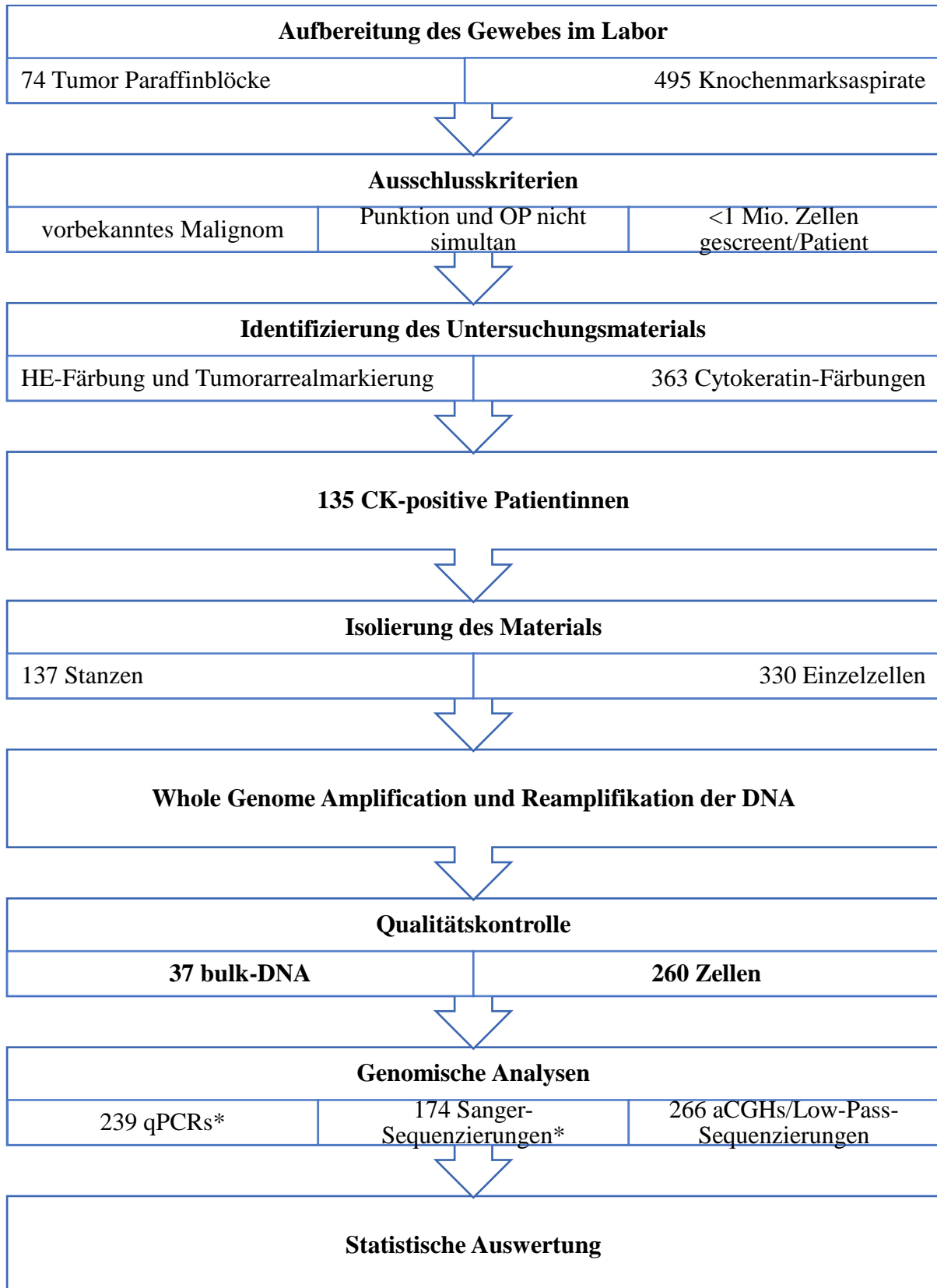


Abbildung 21: Überblick der Studie

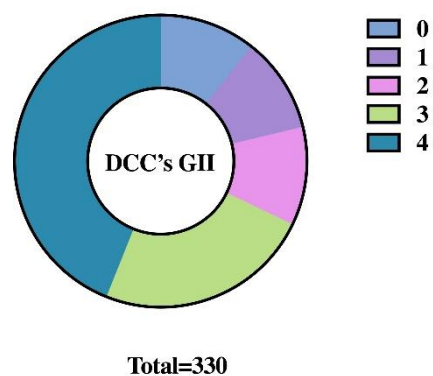
4.1. Detektion und Isolierung von DCCs

Es konnten im Zeitraum von 2004 bis 2015 Knochenmarksproben von insgesamt 495 Patientinnen ausgewertet werden. Isotyp-positive Proben galten als nicht auswertbar, wurden verworfen und ihre Anzahl nicht festgehalten. Von 495 untersuchten Patientenproben konnten 363 Patientinnen in die Studie aufgenommen werden. Einschlusskriterien waren: (a) Knochenmarksaspiration erfolgte direkt nach primär-onkologischer Operation, (b) es war anamnestisch kein Malignom bekannt, welches Zytokeratine exprimierte, (c) es wurden mindestens 1 Mio. Zellen pro Patientin gescreent. Von 362 Patientinnen wurden 135 positiv und 228 negativ auf CK-Zellen gescreent, was einen Anteil von 37,2% CK-positiver Patientinnen ergab.

Insgesamt konnten 390 Zellen, die CK exprimieren, beim Screening der HOTs detektiert werden. Dies entsprach einem Mittelwert von 3 CK+-Zellen pro Patientin. Dabei reichte die Anzahl positiver Zellen von 1 bis 35 pro Patientin. Von den detektierten Zellen wurden 330 Zellen von 131 Patientinnen mittels Mikromanipulators erfolgreich isoliert und deren Genom amplifiziert (Abbildung 21). Von insgesamt 4 Patientinnen war es methodisch nicht möglich DCCs zu isolieren. Gründe dafür waren Probleme beim Wiederauffinden der gefärbten Zelle anhand der Koordinaten oder eine fehlgeschlagene Isolation der Zelle vom Haftobjektträger. 260 gepickte DCCs hatten nach erfolgreicher Amplifikation der DNA einen GII von 2 oder größer und wurden für weitere genomische Analysen verwendet (Tabelle 25).

Tabelle 25: Häufigkeitstabelle und Tortendiagramm der GIIs von 330 gepickten DCCs von 133 Mammakarzinompatientinnen, Legende: GII 0-4 nach Farbe geordnet

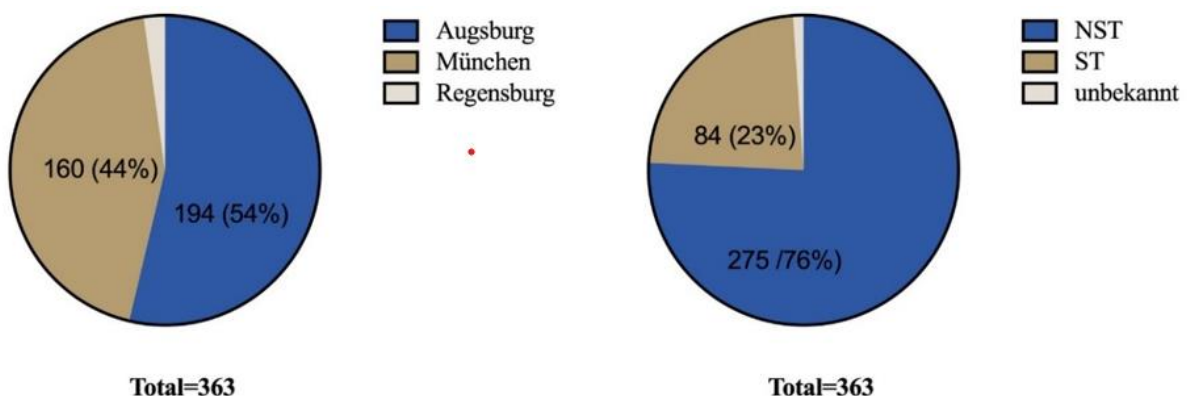
GII	Häufigkeit	Prozent (%)
0	35	10.61
1	35	10.61
2	36	10.91
3	79	23.94
4	145	43.94



4.1.1. Das Patientenkollektiv-deskriptive Analyse der histopathologischen Eigenschaften des Primärtumors

Das untersuchte Patientenkollektiv bestand aus 363 Patientinnen. Die meisten Proben wurden uns durch das Zentralkrankenhaus Augsburg (jetzt Universitätskrankenhaus Augsburg) und die Ludwig-Maximilian-Universität München zur Verfügung gestellt. Die Krankenhäuser stellten uns die Informationen zum Primärtumor zur Verfügung. Die deskriptive Analyse ergab folgende Hintergrundinformationen unserer Brustkrebskohorte (Abbildung 22).

Unser Kollektiv war ausschließlich weiblich. Zum größten Teil waren die Patientinnen an einem Brustkrebs vom non-special type (invasiv-duktral nach älterer Klassifikation) erkrankt (75,5%). Der am häufigsten aufgetretene biologische Subtyp war luminal-like (Hormonrezeptor positiv bei unbekanntem Ki-67-Wert). Über die Hälfte der Patientinnen wurden zu einem frühen Zeitpunkt ihrer Erkrankung diagnostiziert, da in der postoperativen pathologischen Untersuchung der Primärtumore 52,6% T1-Status, 61,4% N0-Status, 92,8% M0-Status, 56,2% L0-Status und 65,6% V0-Status aufwiesen. Diese Faktoren wurden als prognostisch positiv bewertet. Circa 65% wurden ohne makro- bzw. mikroskopischen Tumorrest (R0) an den Resektionsrändern primär operiert, was einen weiteren positiven prognostischen Wert darstellte. Der histologische Differenzierungsgrad der Zellen im Präparat war bei über 50% mäßig und bei einem Drittel der Präparate sogar wenig differenziert, was im Gegensatz zu den oben genannten pathologischen Merkmalen einem negativen prognostischen Faktor entsprach.



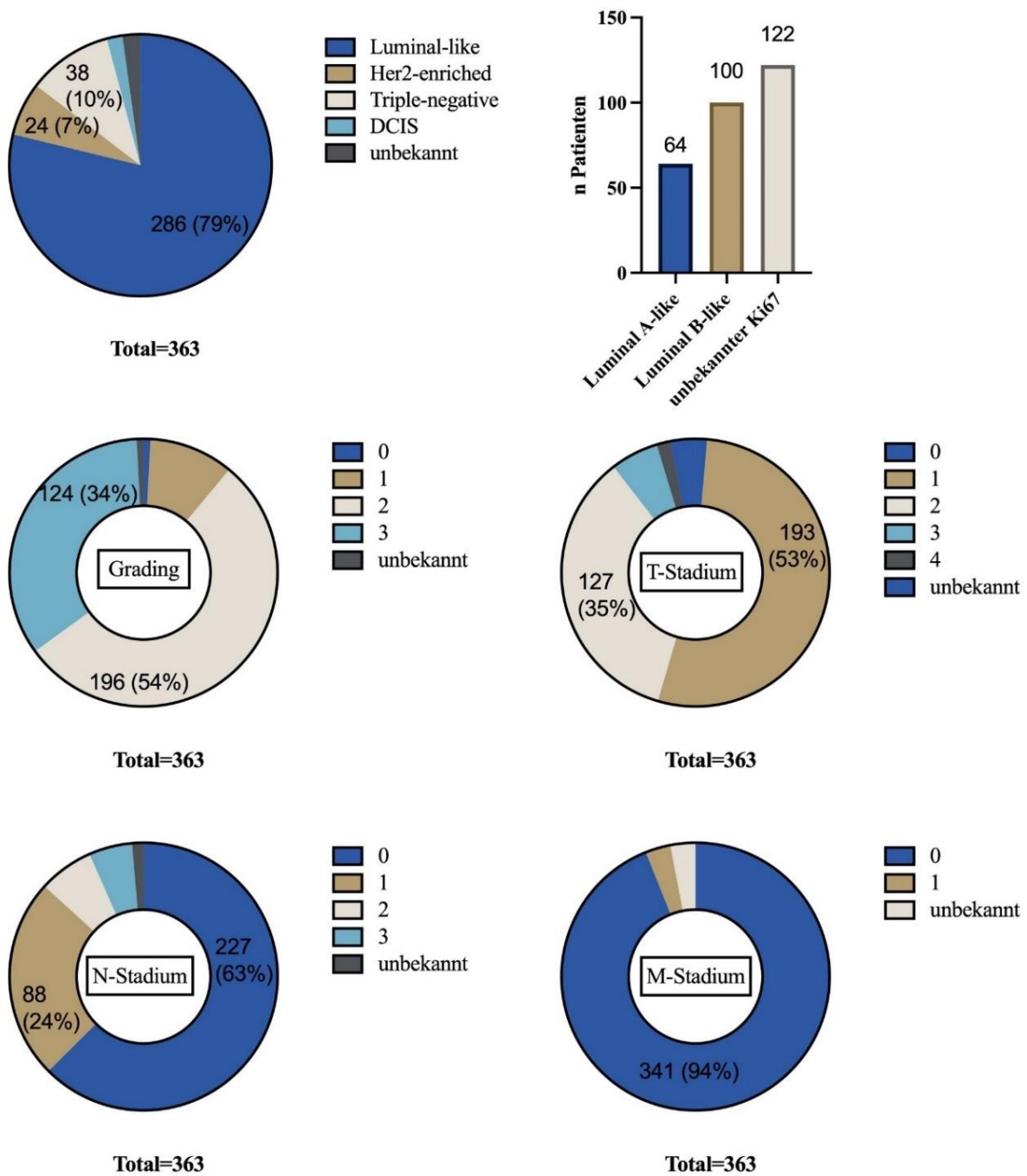


Abbildung 22: Kollektiveigenschaften der 363 eingeschlossenen Patienten; a) Herkunft, b) path. Typ, c) biologischer Subtyp mit spezifischer Unterteilung des Luminal-like Subtyps, d) Grading, e) T-Stadium, f) N-Stadium, g) M-Stadium

Zum Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion war die jüngste Patientin 30 und die Älteste 87 Jahre alt. Das mediane Alter der Patientinnen liegt bei 60 Jahren mit einem Interquartilenbereich von 18,5 Jahren. Die Altersdistribution des Kollektivs ist normal verteilt (Shapiro-Wilk-Test p=0,5)

(Abbildung 23). Von 363 Patientinnen erhielten 214 adjuvante endokrine Therapie, 263 erhielten adjuvante Strahlentherapie, 183 erhielten eine Form der Chemotherapie und 36 erhielten eine Form der Antikörpertherapie. Laut unserem klinischen Follow-Up erhielten 39 der 363 Patientinnen eine neoadjuvante Therapie, darunter waren 20 nach der Primär-OP DCC-positiv gescreent worden.

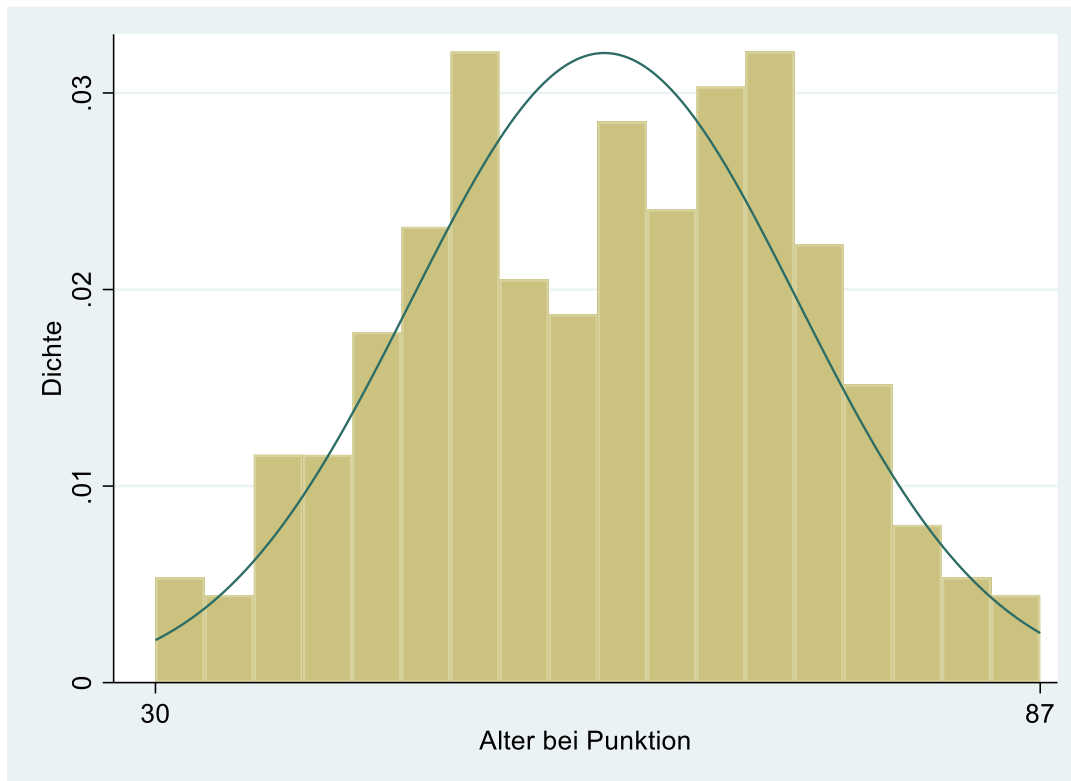


Abbildung 23: Histogramm der Altersdistribution des Patientenkollektivs mit Normalkurve

4.1.2. Korrelation zwischen CK-Positivität und klinischen Daten

Nach dem Screening und der Isolation der CK⁺-Zellen wurde deren Detektion (ja/nein) mit dem Vorhandensein prognostisch positiver bzw. negativer Faktoren verglichen. Verwendet wurden hierfür die in Tabelle 25 gelisteten klinisch-pathologischen Daten, sowie das Alter der Patientinnen. Exkludiert wurden 4 Patientinnen, bei welchen methodisch eine Isolation der CK⁺-Zellen nicht möglich war. Die einzige Charakteristik der klinischen Daten, welche signifikant mit der Existenz CK⁺-Zellen korrelierte, war der biologische Subtyp des Primärtumors ($p < 0.001$) (Abbildung 24). Die statistische Signifikanz beruhte allerdings auf dem Luminal-like Typ unbekannter Art, weswegen keine schlussfolgernde Aussage getroffen werden kann. Dort zeigten

sich vor allem bei Triple-negative, sowie luminalen Tumoren CK-positive Zellen im Knochenmark. Ein Trend bei der Korrelation zwischen CK-Positivität und der Tumorgroße war zu beobachten ($p=0.057$).

Tabelle 26: Korrelation zwischen dem Vorhandensein von DCCs und anerkannten histo-pathologischen Prognosefaktoren

Klinische Daten		Gesamt	DCC-positive n (%)	p-Wert Chi-squared/Fishers exact
Gesamt		359	133 (37.05)	
Alter		356		p=0,55
	<52	111	44 (39.64)	
	≥52	245	89 (36.33)	
Histologie		357		p=0,14
	DCIS	7	4 (57.14)	
	Non-special	271	92 (33.95)	
	lobular	48	19 (39.58)	
	special	31	16 (51.61)	
Grading		356		p=0,49
	1	38	11 (28.95)	
	2	197	74 (37.56)	
	3	121	48 (39.67)	
T-Status		346		p=0,057
	1	193	63(32.64)	
	2	126	54 (42.86)	
	3	21	9 (42.86)	
	4	6	0 (0)	
N-Status		357		p=0,54
	0	226	82 (36.28)	
	1	88	31 (35.23)	
	2	24	9 (37.5)	
	3	19	10 (52.63)	
M-Status		359		p=0,89
	0	337	124 (36.8)	
	X	10	4 (40)	
	1	12	5 (41.67)	
ER-Status		353		p=0,73
	negativ	61	24 (39.34)	
	positiv	292	108 (36.99)	
PR-Status		353		p=0,33
	negativ	81	34 (41.98)	
	positiv	272	98 (36.03)	
Her2-Status		352		p=0,56
	negativ	299	114 (38.13)	
	positiv	53	18 (33.96)	

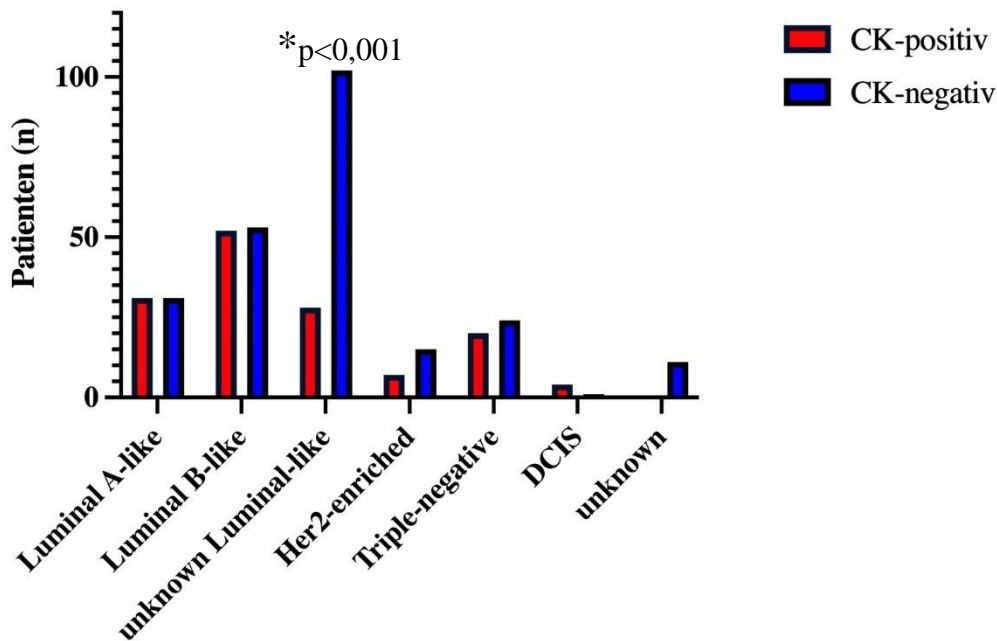


Abbildung 24: Vergleich der CK-Positivität zwischen den einzelnen biologischen Subtypen und DCIS-Tumoren zeigt signifikante Unterschiede (* Qui-Square $p < 0,001$)

4.2. Gewinnung von Bulk-DNA aus FFPE-Primärtumorblöcken

Hier konnten 137 Stenzen aus 74 Primärtumorblöcken entnommen werden und deren DNA isoliert werden. Nach der Isolation wurde anhand von des A260/280 Ratios, A260/230 Ratios und dem Verlauf der Spektralkurve Proben von ausreichender Qualität ausgewählt. Im Falle von mehrfachen Stenzen pro Primärtumor, wurde die Probe mit der höheren Qualität ausgewählt. Daraufhin wurde von 37 Proben 1ng der DNA-Lösung entnommen und die WGA durchgeführt. Nach Durchführung der WGA an den DNA-Proben, wurde eine spezielle Qualitätskontrolle mit 9 verschiedenen Primern durchgeführt. Einschlusskriterium für weitere Analysen war das Vorhandensein von mindestens 3 Genomabschnitten. Nach der Qualitätskontrolle konnten 26 Proben in den Pool zum Lowpass-Sequenzieren aufgenommen werden (Abbildung 26). 1 Probe wurde im Nachhinein

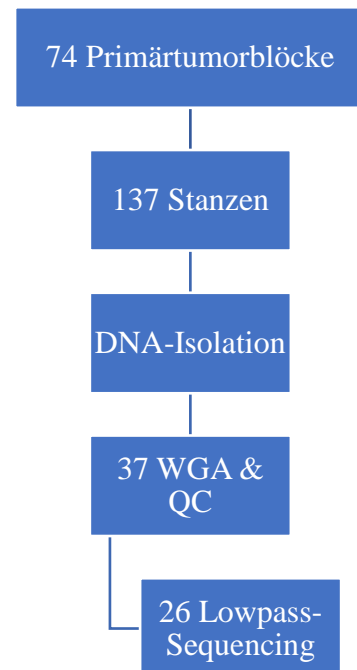


Abbildung 25: Workflow der Aufarbeitung der Primärtumorblöcke

wieder ausgeschlossen, da bei der Patientin ein Zweitkarzinom vor dem Brustkrebs in der Anamnese gefunden wurde.

Banden	Häufigkeit	Prozent (%)
1	7	18,92
2	4	10,81
3	4	10,81
4	4	10,81
5	7	18,92
6	2	5,41
7	2	5,41
8	4	10,81
9	3	8,11

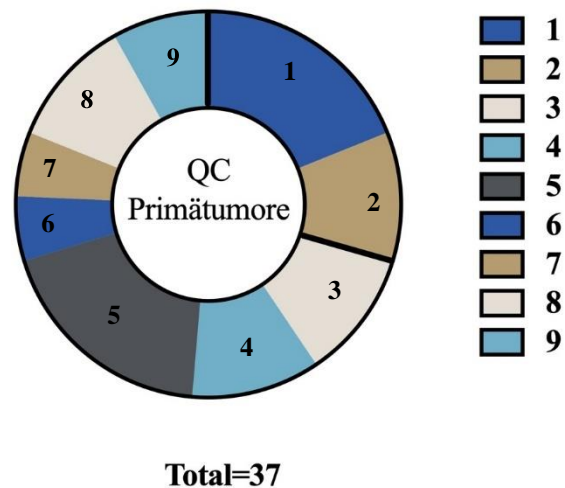


Abbildung 26: 26 der 37 Primärtumorproben konnten nach der Qualitätskontrolle der WGA für die genomische Analyse verwendet werden.

4.3. Genomische Analysen der Einzelzellen

4.3.1. Ergebnisse der Genamplifikationsanalyse

Aus den 131 Patientinnen, bei welchen DCCs isoliert werden konnten, konnten die Zellen von 107 Patientinnen Zellen in der qPCR vermessen werden. Die übrigen Zellen entsprachen nicht den gesetzten Qualitätsmerkmalen ($GII \geq 2$). Aus den 239 Zellen, mit denen die qPCR durchgeführt wurde, konnte von 219 ein ct-Wert generiert werden. Nach weiteren bioinformatischen Qualitätskontrollen der Messergebnisse mussten 15 weitere Zellen exkludiert werden. Inkludiert wurden alle Zellen, für welche mindestens auf einem Genlocus ein Ergebnis in der qPCR generiert werden konnte.

Unter den insgesamt 204 erfolgreich vermessenen Zellen zeigten 17 Zellen eine Amplifikation auf dem MYC-Locus, zehn auf dem ERBB2-Locus, zehn auf dem FGFR1-Locus und sieben auf dem CCND1-Locus. MYC hatte mit einer Häufigkeit von 8,8% amplifizierter Zellen den größten Anteil an Amplifikationen, was aus der Heatmap in Abbildung 30 hervorgeht. Von den amplifizierten Zellen waren die meisten vom Luminal-like-Subtyp, gefolgt vom Triple-negativen Subtyp (Tabelle 27+Abbildung 27).

Tabelle 27: Anzahl Amplifikationen pro Gen aus 204 gemessenen Einzelzellen

Zielgen	Gesamt	Anzahl Amplifikation	Lumi-nal-Like	Her2-neu enriched	Triple-negative	DCIS
MYC	194	17 (8,8)	9 (52,9)	0	8 (47,1)	0
ERBB2	197	10 (5,1)	6 (60)	0	3 (30)	1 (10)
FGFR1	193	10 (5,2)	7 (70)	0	3 (30)	0
CCND1	191	7 (3,7)	4 (57,1)	0	3 (42,9)	0

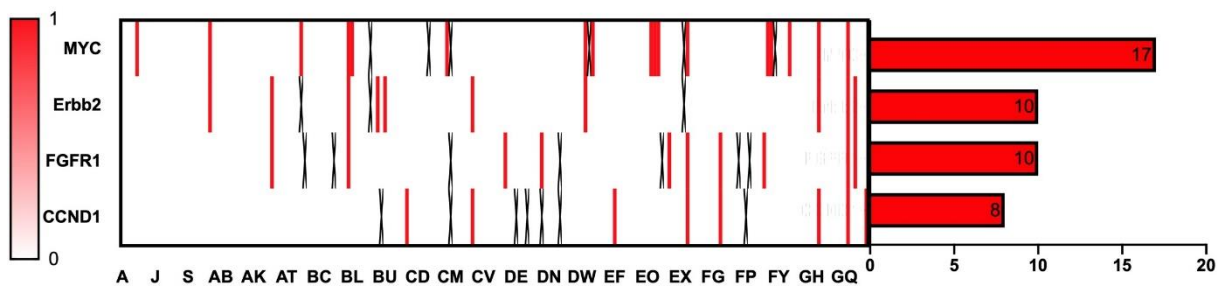


Abbildung 27: Heatmap der Amplifikationen pro Gen aus 204 DCCs (jede Zelle entspricht einer Buchstabenkombination) mit Balkendiagramm der Häufigkeiten pro Gen; auf der y-Achse sind die vier untersuchten Drivermutationen aufgeführt, auf der x-Achse die untersuchten Einzelzellen anhand Buchstaben aufgelistet

4.3.2. Ergebnisse der Mutationsanalyse

Für die Mutationsanalyse wurden Zellen mit einer GII von ≥ 2 ausgewählt. Zusätzliches Auswahlkriterium war mindestens auf zwei von vier Zielgenen in der qPCR Ergebnisse erzielt zu haben. Es wurden insgesamt 251 Zellen vermessen. Identifiziert wurden Silent-Mutationen, Missense-Mutationen und Hotspotmutationen mit dem CodonCode-Aligner. Beispiele hierfür sind in Abbildung 28 zu sehen. Es konnten Ergebnisse von 174 DDCs generiert werden (Tabelle 28 + Abbildung 29)

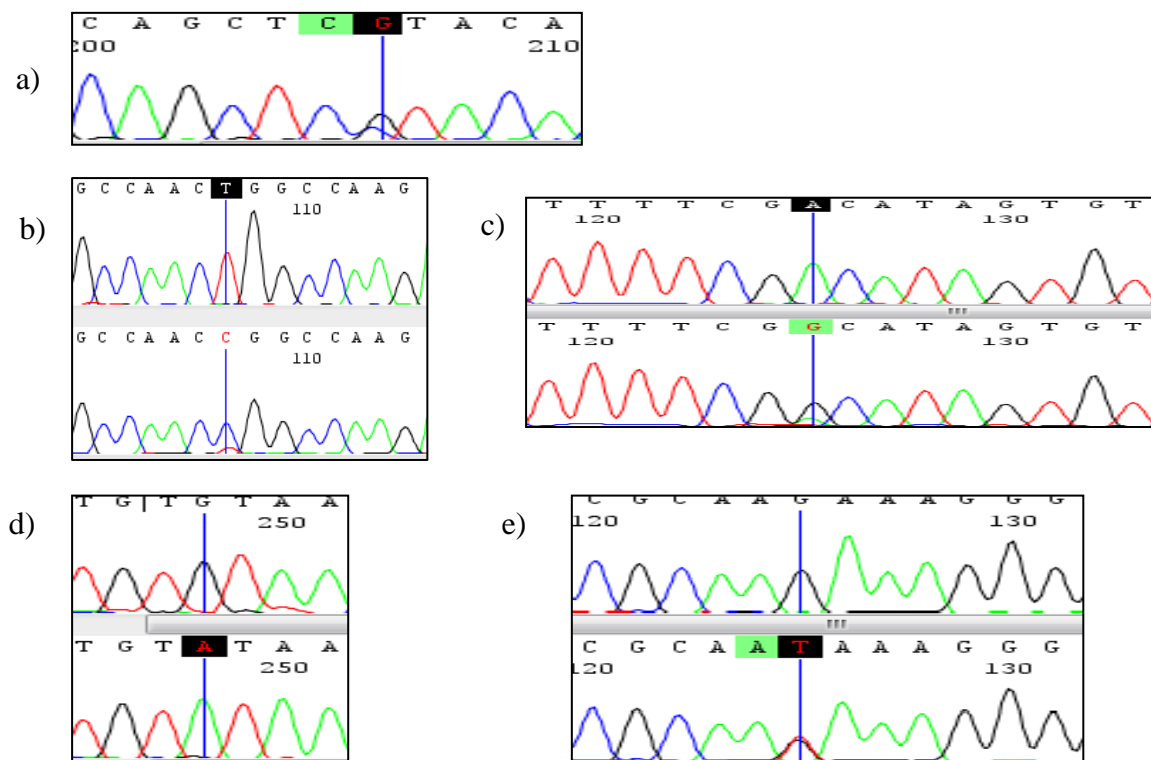


Abbildung 28: Beispiele von TP53-Punktmutationen in unserem Patientenkollektiv; a) Exon 4 Missense-Mutation pP80R, b) Exon 5 Missense-Mutation pL137P, c) Exon 6 Silent-Mutation, d) Exon 7 Missense-Mutation pC238Y, e) Exon 8 Missense-Mutation pK291N

Für das Gen TP53 wurden Exon 4,5,6,7 und 8 untersucht (Abbildung 31). Auf Exon 4 wurden zwei Missense-Mutationen (pR110C und pP80R) detektiert. Auf Exon 5 wurden ebenfalls zwei Missense-Mutationen (pL137P und pV172A) detektiert. Auf Exon 7 fanden sich vier Missense-Mutationen (pP250L, pC238R und zweimal pC238Y). Exon 8 wies eine Missense-Mutation (pK291N) auf. Die insgesamt neun gefundenen Missense-Mutationen im TP53-Gen waren zum größten Teil von Luminal-B-like Patientinnen (n=5) und Triple-negativen Patientinnen (n=3). Eine Patientin hatte einen Her2-enriched Primärtumor (Tabelle 28).

Für PIK3CA wurden Exon 9 und 20 untersucht. Auf Exon 9 befanden sich drei Hotspot-Regionen (pE545A, pS553T, pH554fs und zweimal pE545K). Auf Exon 20 wurden drei Hotspot-Mutationen (dreimal pH1047R) Die insgesamt sechs gefundenen Hotspot-Regionen auf dem PIK3CA-Locus fanden sich ausschließlich bei Patientinnen mit dem Luminal-like Subtyp, vier vom Luminal-B-like und zwei vom Luminal-A-like Subtyp (Tabelle 28).

Tabelle 28: Anzahl der gefundenen somatischen Punktmutationen in 174 Zellen

Genlocus	DCCs	Missense	Subtyp	Silent	Anzahl (%)
TP53 Ex4	158	2	TN, LumB	2	4 (2,5)
TP53 Ex5	163	2	Her2, LumB	0	2 (1,2)
TP53 Ex6	162	0	-	10	10 (6,2)
TP53 Ex7	127	4	TN, LumB	0	4 (3,2)
TP53 Ex8	164	1	LumB	0	1 (0,6)
Genlocus	DCCs	Hotspot	Subtyp	Silent	Anzahl (%)
PIK3CA Ex9	153	3	LumA, LumB	0	3 (2,0)
PIK3CA Ex20	157	3	LumB	3	6 (3,8)

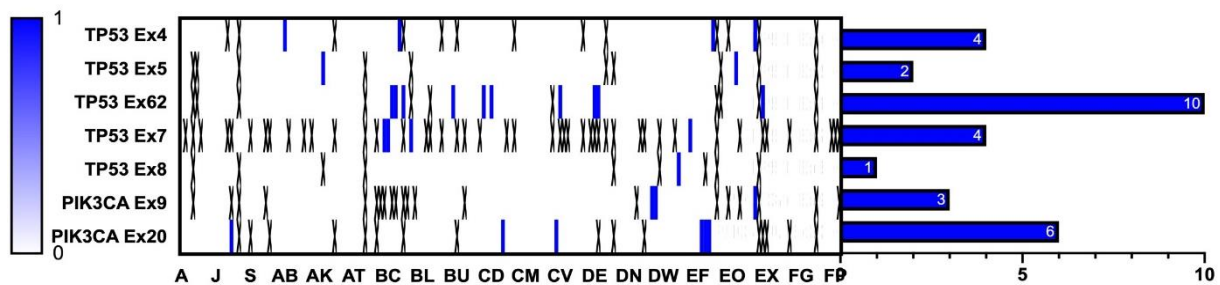


Abbildung 29: Heatmap der somatischen Punktmutationen pro Genlocus von 174 Einzelzellen (jede Zelle entspricht einer Buchstabenkombination) und Balkendiagramm mit den Häufigkeiten pro Punktmutation; auf der y-Achse sind die zwei untersuchten Drivermutationen mit den jeweiligen Loci aufgeführt, auf der x-Achse die untersuchten Einzelzellen anhand Buchstaben aufgelistet

4.3.3. Ergebnisse der Kopienzahlanalyse der Einzelzellen und Primärtumoren

4.3.3.1. Qualitätskontrolle und Abgleich der Methoden zur Kopienzahlanalyse

- 1.) Um aussagekräftige Kopienzahlveränderungsprofile (CNA-Profile) erstellen zu können, benötigt man mindestens 200.000 Reads pro Probe, die besten Ergebnisse erreicht man ab 500.000 Reads pro Probe. Dies wurde anhand interner Qualitätsanalysen über mehrere Jahre verifiziert und veröffentlicht (69).
- 2.) Der DLRS-Wert (transl. derivative log ratio spread) gibt das Ausmaß des Hintergrundrauschens an. Werte von $<0,3$ sprechen für ein niedriges Niveau an Hintergrundrauschen und somit für eine gut interpretierbare Probe.
- 3.) Die graphische Begutachtung der Profile beinhaltet vor allem die Beurteilung der Varianz der Datenpunkte und des insgesamten Verteilungsmusters der Kopienzahlen (wellig oder gleichmäßig). Diese wurden von mindestens drei davon zwei erfahrenen Wissenschaftlern (Schneider und Czyz) durchgeführt (Abbildung 30).

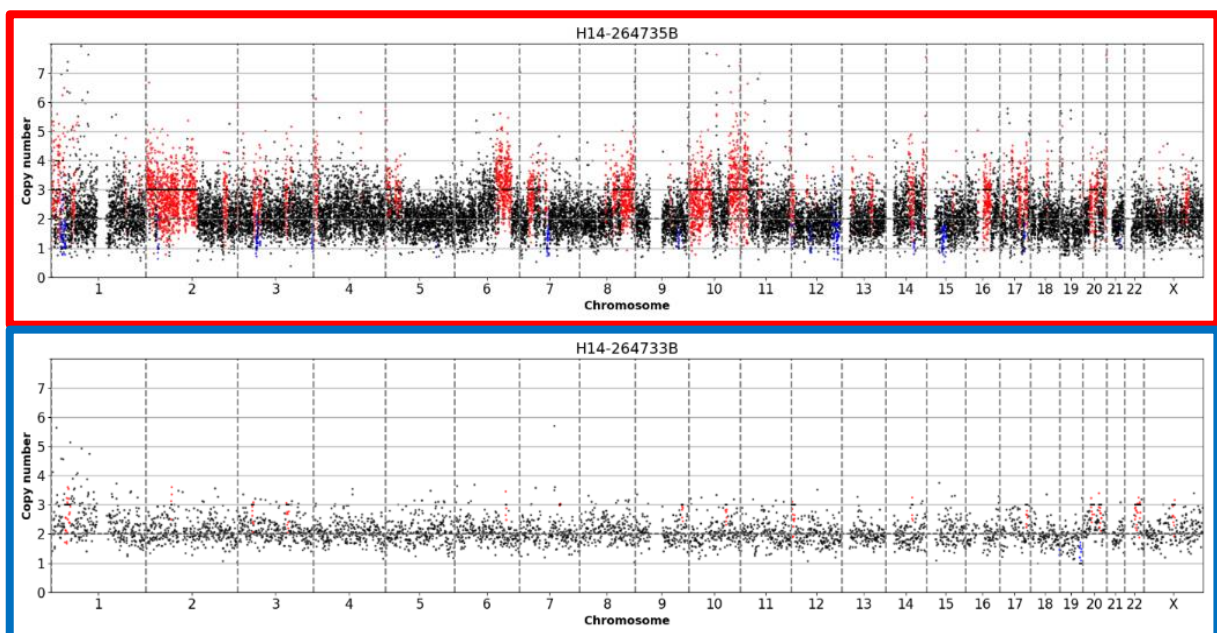


Abbildung 30: Beispiel einer aberranten CK⁺-Zelle (rot umrahmt) und einer balancierten CK⁻-Zelle (grün umrahmt) einer Patientin

Anhand der drei Bewertungspunkte werden die Proben in vier Kategorien eingeteilt: „gut“, „ausreichend“, „unbefriedigend“ und „schlecht“. Zuverlässige Aussagen über Kopienzahlveränderungen können nur mit guten oder zufriedenstellenden Profilen erreicht werden. In

unserem Kollektiv wurde der Großteil der Profile in die Kategorien „gut“ und „ausreichend“ eingeteilt (72,1%). 16,7% der Profile zeigten unbefriedigende Qualität und wurden nach mehrfacher Prüfung in Einzelfallentscheidungen in die Analysen aufgenommen. Ausgeschlossen wurden 27 DCCs (11,3%), da aufgrund ihrer schlechten Qualität keine zuverlässige Aussage hinsichtlich möglicher Kopienzahlveränderungen möglich war (Abbildung 31).

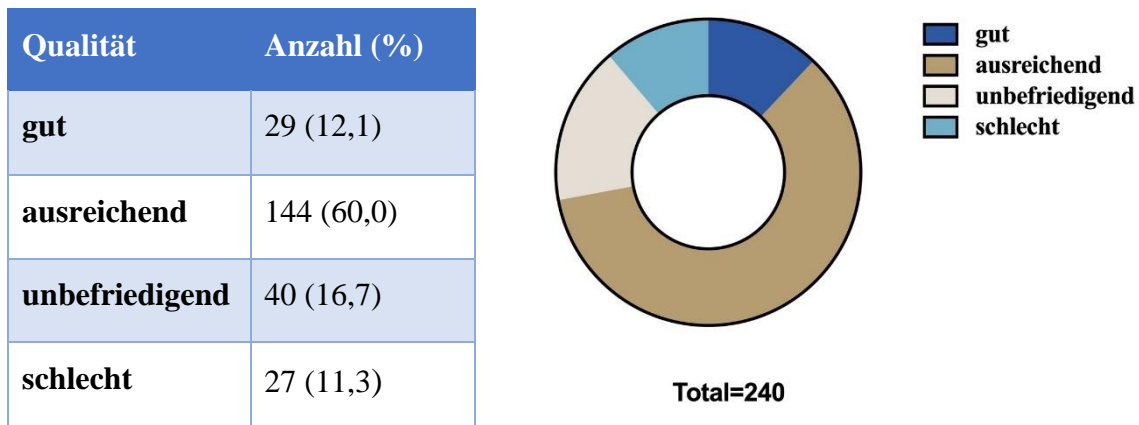


Abbildung 31: Ergebnisse der kumulativen Qualitätsauswertung der erhobenen Kopienzahl-analyse

Um einen Vergleich aus den Informationen der beiden Methoden aCGH und Lowpass-Sequenzierung ziehen zu können, wurden einzelne Samples mit beiden Methoden vermessen und die Profile miteinander verglichen. In den von uns untersuchten Proben konnten keine signifikanten Differenzen in der Qualität sowie im Informationsgehalt beobachtet werden. Alle als aberrant eingestufte Zellen blieben aberrant und balanciert eingestufte Zellen schienen nicht mehr Aberrationen aufzuweisen. Teilweise konnte die Qualität der Profile allerdings um eine Stufe zwischen aCGH und Lowpass-Sequenzierung verbessert werden. Nur „schlechte“ Zellen blieben in beiden Methoden „schlecht“. Die Ähnlichkeit der Profile ist exemplarisch anhand zweier aberranter Zellen mit beiden Methoden dargestellt (Abbildung 32).

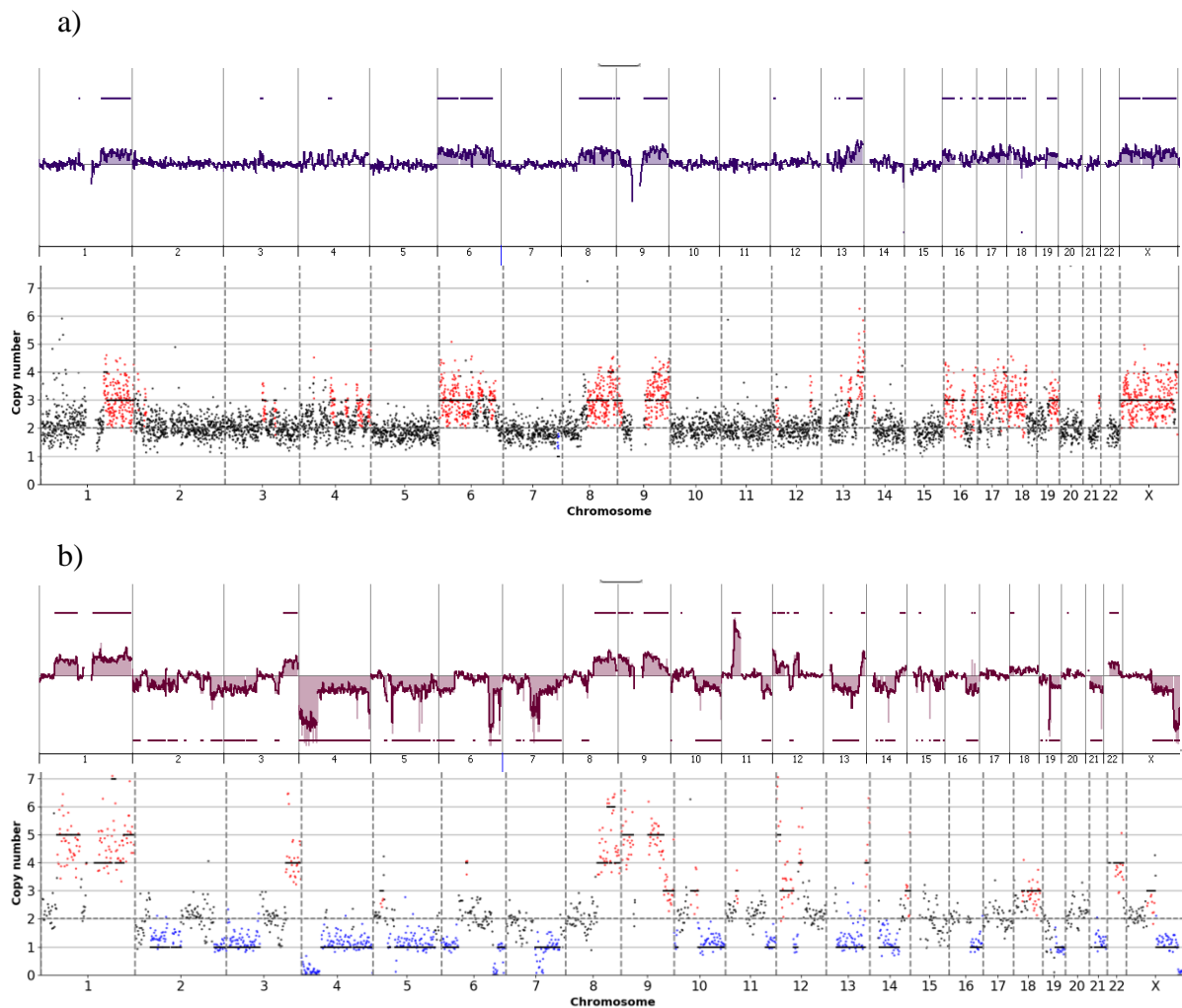


Abbildung 32: Vergleich der CNA-Profile zwischen aCGH (oben) und LP (unten) zweier aberranter Zellen (a) und b))

4.3.3.2. Ergebnisse der graphischen Auswertung der CNA-Profile

Die Profile, welche als auswertbar eingestuft wurden, wurden im ersten Schritt graphisch in aberrant bzw. balanciert unterteilt. Insgesamt konnten 23,75% der Proben nicht ausgewertet werden. Der Grund dafür war entweder eine schlechte Qualität oder eine erschwerte Interpretation der Kopienzahlveränderungen bei welligem Profil. Es zeigte sich, dass 20% der analysierten Profile von einzelnen DCCs aberranter Natur und 56,25% balancierter Natur waren. Aberrante Proben wurden direkt als DCCs eingestuft, wohingegen balancierte Proben weiter kumulativ analysiert werden müssen, um sie als „echte“ Tumorzellen klassifizieren zu können. Im Gegensatz hierzu war die Mehrzahl (68%) der sequenzierten Primärtumoren aberranter

Natur, 28% zeigten balancierte Profile und eine Probe war aufgrund ihrer Qualität nicht auswertbar. Es zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an aberranten Primärtumoren als DCCs in unserer Studienkohorte (Fishers exact, $p=0,01$) (Tabelle 29 und Abbildung 33).

Tabelle 29: Ergebnisse der graphischen Auswertung von 240 CNA-Profilen der Einzelzellen und 25 CNA-Profilen von Primärtumor-Bulk-DNA

Auswertung	Anzahl DCCs (%)	Anzahl PTs (%)
balanciert	135 (56,25)	7 (28)
aberrant	48 (20)	17 (68)
na	57 (23,75)	1 (4)

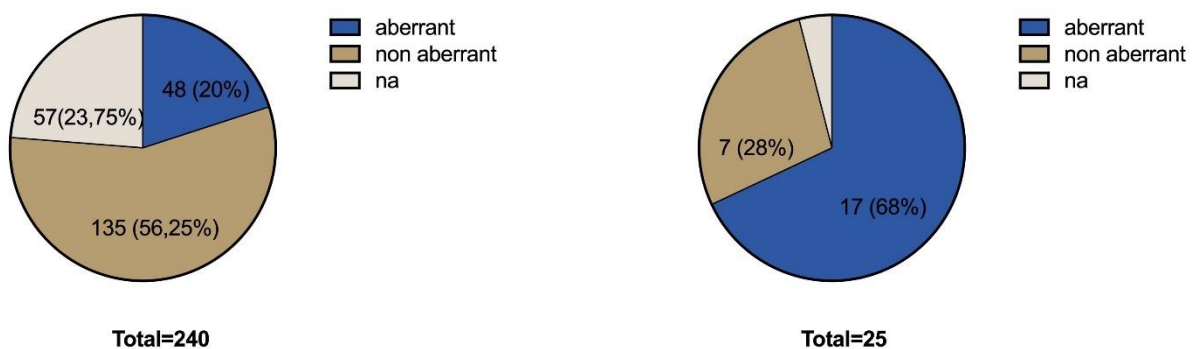


Abbildung 33: graphische Darstellung der CNV-Analyse

4.3.3.3. Chromosomenanalyse der aberranten DCCs und Primärtumoren

Im nächsten Schritt der genomischen Analyse wurden die 48 aberranten DCCs sowie die 17 aberranten Primärtumoren auf chromosomaler Ebene ausgewertet. Dazu wurden die Profile graphisch auf Kopienzahlveränderungen, Gewinne (Gains) und Verluste (Losses), untersucht. Hierzu wurden nur eindeutige Kopienzahlveränderungen von Artefakten, welche durch Ausreißer zustande kamen, unterschieden. Relativ zur Gesamtzahl an PTs zeigten die Chromosomen 1 und 8 die meisten Kopienzahlveränderungen. Dagegen zeigten die Chromosomen X, 3 und 11 die häufigsten Kopienzahlveränderungen relativ zur Anzahl der DCCs. Kopienzahlveränderungen in DCCs und PTs zeichneten sich vor allem durch Gewinne aus. Während bei den DCCs vor allem das X-Chromosom und danach die Chromosomen 3,2,1, 11 und 20 betroffen

waren, hatten die Primärtumoren Gewinne in den Chromosomen 1, 8 und 12 zu verzeichnen. Verluste kamen bei den DCCs vorwiegend auf den Chromosomen X, 14, 6,7 und 19 vor. Unter den Primärtumoren zeigten vorwiegend die Chromosomen X, 11 und 19 Verluste (Abbildung 34).

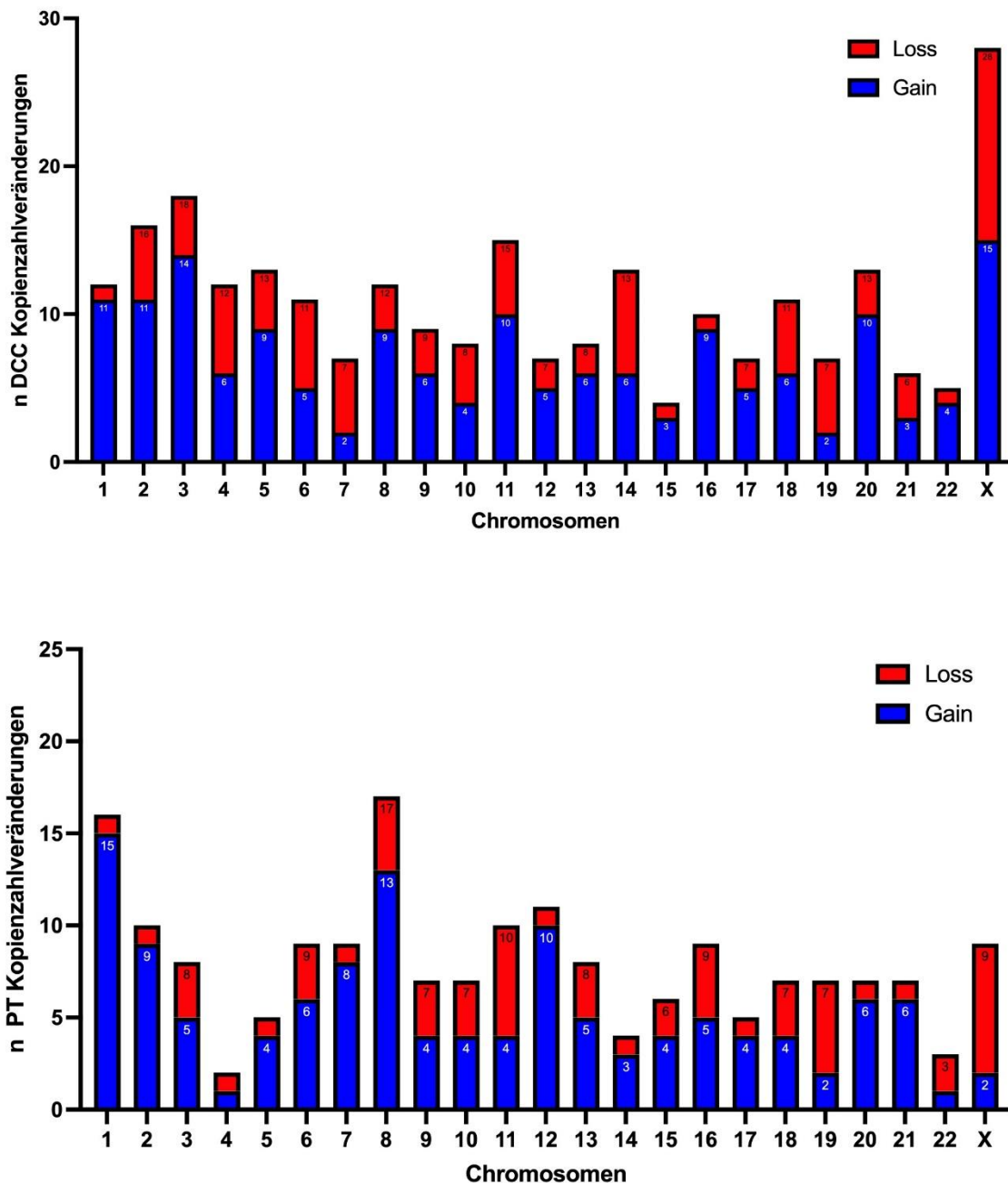
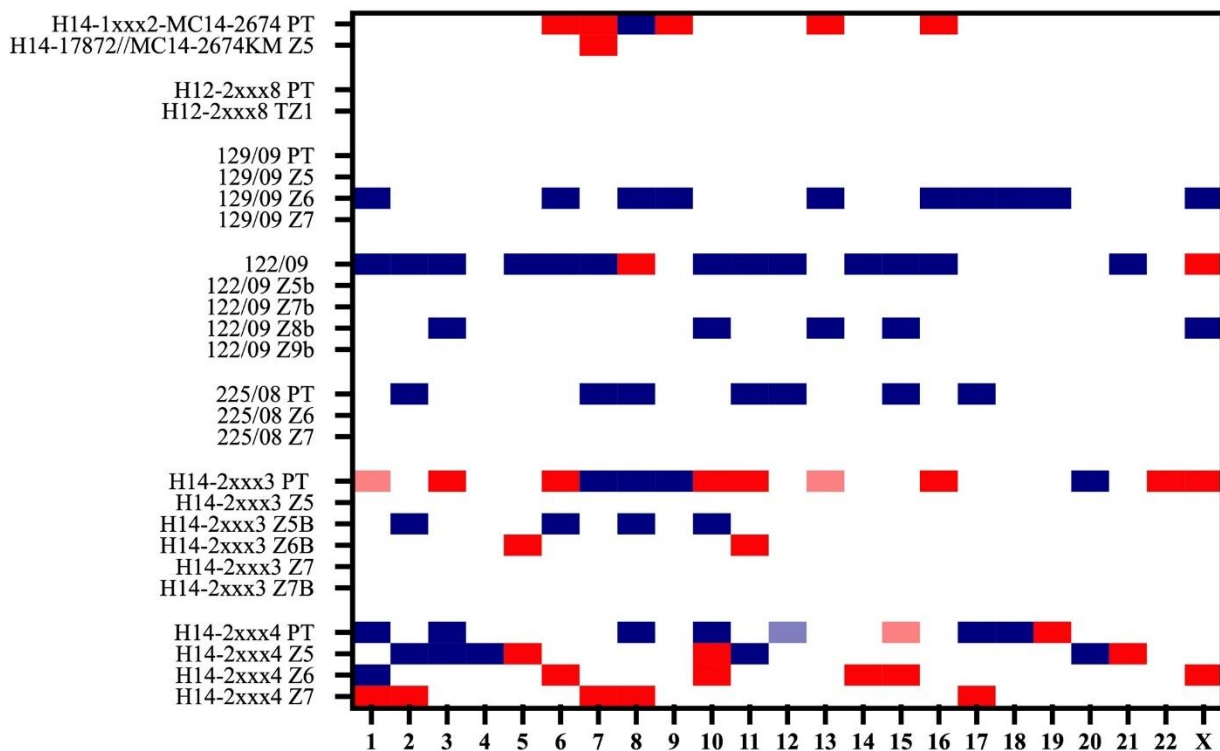
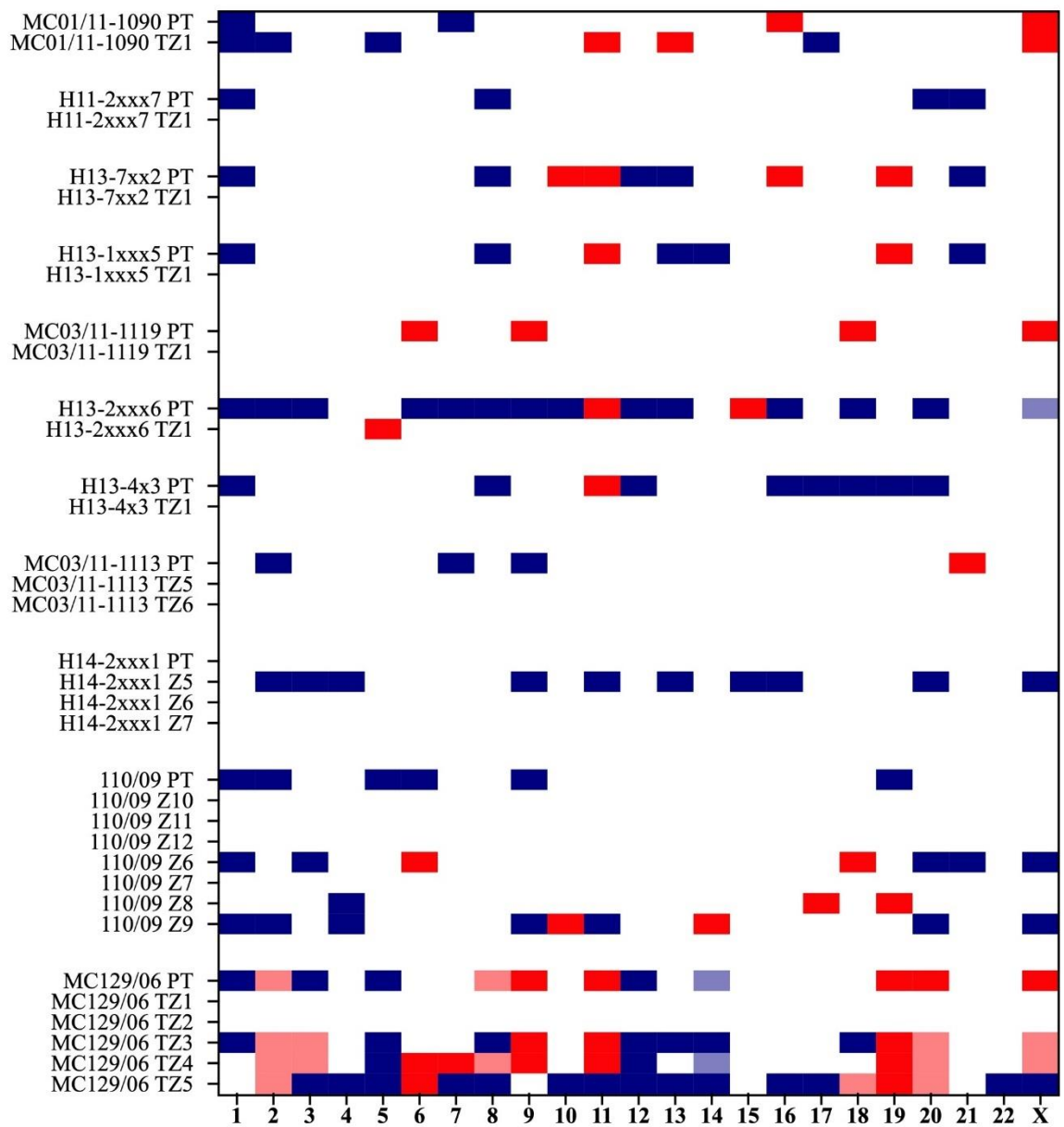


Abbildung 34: Kumulative Analyse der beobachteten Kopienzahlveränderungen pro Chromosom von a) 48 aberranten Einzellen und b) 17 aberranten Primärtumorstanzen; Rot=Kopienzahlverlust, Blau=Kopienzahlgewinn; die absolute Zahl ist in der Säule abgebildet

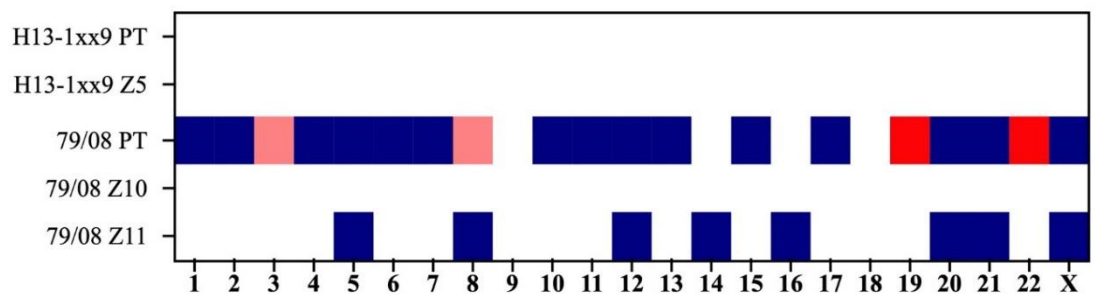
Es konnten insgesamt 25 Patientinnen mit Primärtumor und korrespondierenden DCCs ausgewertet werden. Davon waren sieben dem Luminal A-like, elf dem Luminal B-like und zwei einem unbekanntem Luminal-Like Subtyp zuzuordnen. Zwei weitere Patientinnen hatten einen HER2-enriched und die übrigen drei Patientinnen einen Triple-negative Subtyp. Bei der Analyse der Primärtumor/DCC-Gruppen fiel auf, dass kaum Übereinstimmung zwischen Primärtumor und korrespondierenden DCCs zu finden war. Ebenfalls zeigten die aberranten DCCs untereinander eine starke Heterogenität. Gemeinsame Subtyp-spezifische Aberrationen waren nicht auszumachen. Eine Ausnahme bildet die Patientin MC129/06, bei welcher ein 3 von 5 DCCs starke Übereinstimmungen mit dem Profil des Primärtumors zeigen (Abbildung 35).



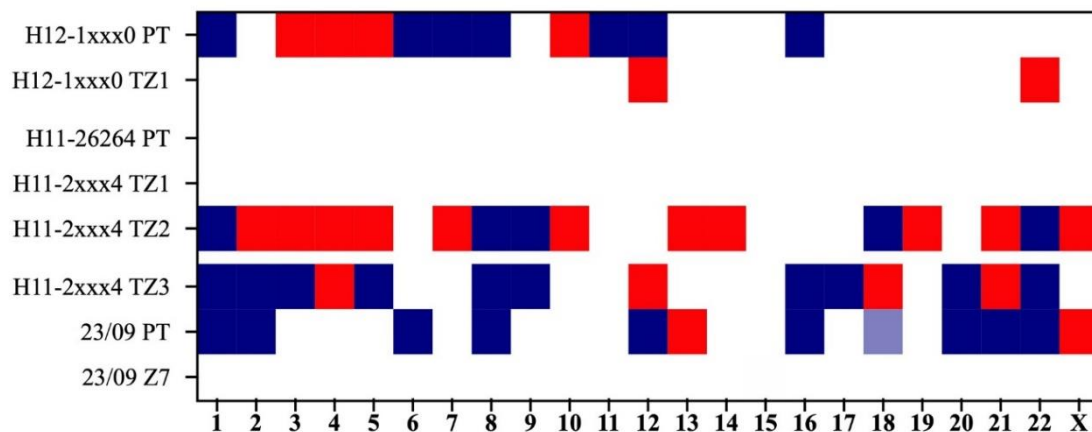
a) *Luminal-A-like*



b) *Luminal-B-like*



c) *Her2-enriched*



d) Triple-negative

Abbildung 35: Vergleich der Kopienzahlveränderungen (rot=Verlust, blau=Gewinn, hellrot=Verlust+Gewinn, hellblau=Gewinn+Verlust) zwischen Primärtumoren und korrespondierenden DCC's aufgeteilt anhand des biologischen Subtyps, a) Luminal-A-like Subtyp mit 7 Patientinnen, b) Luminal B-like Subtyp mit 11 Patientinnen, c) HER2-enriched Subtyp mit 2 Patientinnen, d) Triple-negative Subtyp mit 3 Patientinnen; nicht aufgeführt sind 2 Patientinnen mit unbekanntem Luminal-like Subtyp, welche wieder im PT noch in den DCC's Aberrationen aufwiesen

4.3.3.4. Vergleich der Zellmorphologie dreier Patientinnen und deren generierten CNA-Profilen

Die Kopienzahlanalyse hat ein genomisch heterogenes Bild der DCCs aufgezeigt. Im nächsten Schritt wurde anhand von drei der oben genannten Patientinnen, welche sowohl aberrante als auch balancierte DCC-Profile aufwiesen, versucht stichprobenartig die Zellmorphologie retrospektiv mit dem Ergebnis der CNA-Profile zu vergleichen.

Bei der ersten Patientin (#129/09) handelte es sich um eine Patientin vom Luminal-A-like Subtyp mit genomisch balanciertem Primärtumorprofil. Von den unten aufgezeigten Zellen waren Zellen 5 und 7 genomisch balanciert und Zelle 6 aberrant (Abbildung 36, obere Reihe).

Bei der zweiten Patientin (#122/09) handelte es sich ebenfalls um einen Primärtumor vom Luminal-A-like Subtyp allerdings mit genomisch aberrantem Primärtumorprofil. Von den untersuchten Zellen war Zelle 8B ebenfalls genomisch aberrant und zeigte einige ähnliche Kopienzahlveränderungen wie der Primärtumor. Die restlichen Zellen zeigten dagegen balancierte Profile (Abbildung 36, mittlere Reihe).

Bei der dritten Patientin (#110/09) handelte es sich um einen Primärtumor vom Luminal-B-like Subtyp mit aberrantem Profil. Bei dieser Patientin waren die Zellen 6 und 9 ebenfalls aberrant mit teilweise ähnlichen Merkmalen wie im Primärtumor (Abbildung 36, untere Reihe).

Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, haben die aberranten Zellen weder eine Gemeinsamkeit, noch stechen sie mit einer außergewöhnlichen Färbeintensität, Farbverteilung oder einem besonderen Verhältnis zwischen Zytoplasma und Nucleolus hervor. Sie zeigen jedoch alle eine klare lila-farbene Färbung im Vergleich zu den in ihrer Umgebung liegenden nicht-gefärbten Zellen. Dasselbe gilt ebenso für die balancierten CK⁺-Zellen.

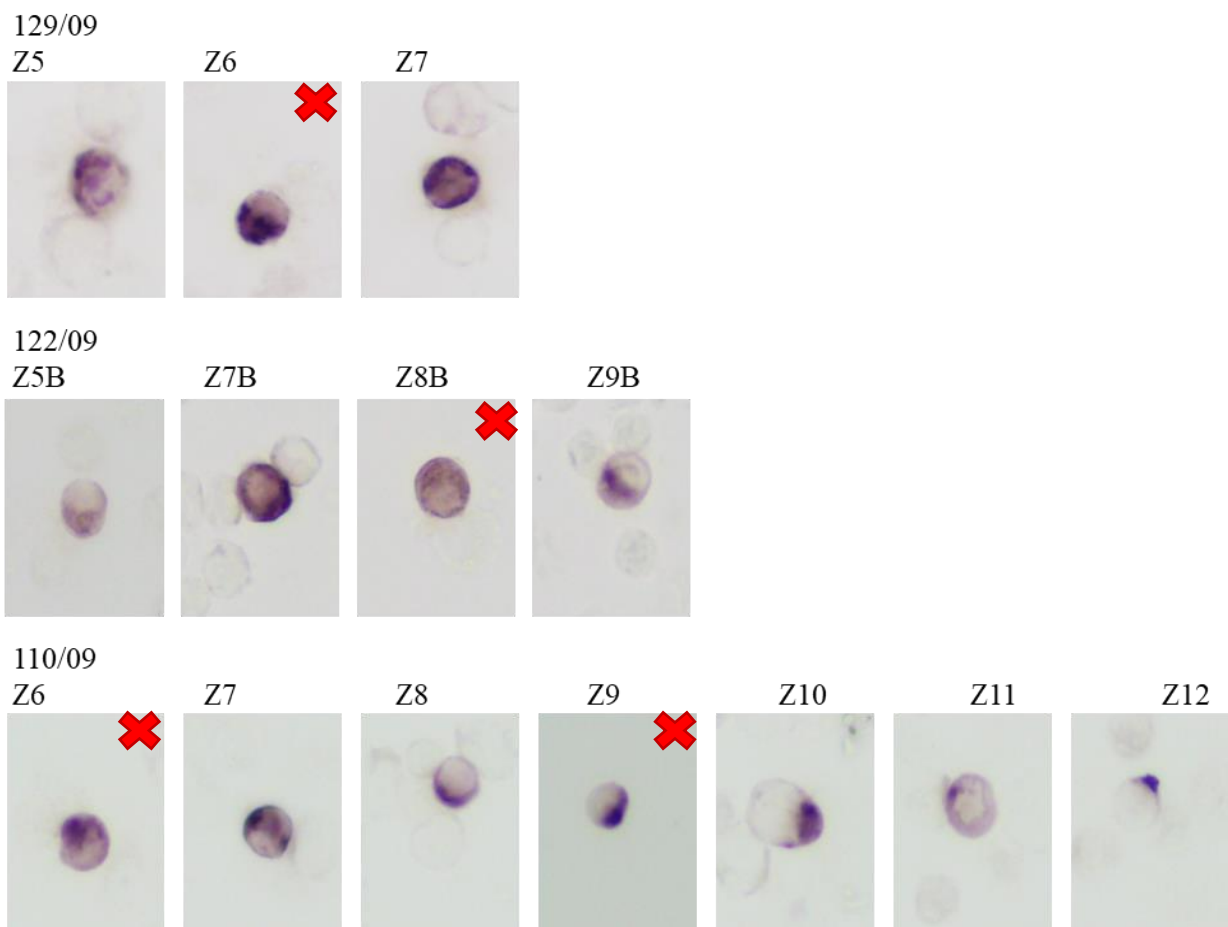


Abbildung 36: Zytokeratinfärbung der DCCs dreier Patientinnen, aberrante Zellen wurden durch rote Kreuze in der Ecke gekennzeichnet

4.3.3.5. Vergleich der Kopienzahlanalyse mit den Ergebnissen der Amplifikations- und Punktmutationsanalyse

Um die qPCR-Methode zu validieren, untersuchten wir bei den CNV-Profilen zuerst die bekannten Loci der vier untersuchten Drivermutationen. Die in der qPCR gefundenen Amplifikationen konnten teilweise von der Kopienzahlanalyse bestätigt werden. In den meisten Fällen war dies jedoch nicht der Fall (Tabelle 30). Dies trat vor allem dann auf, wenn die CNA-Profile einen balancierten Charakter aufwiesen oder aufgrund von Hintergrundrauschen und welligem Aussehen gewisse Aberrationen nicht erkannt wurden (gekennzeichnet in Tabelle 30 als n/a).

Tabelle 30: Abgleich der qPCR-Amplifikationen mit den CNA-Profilen

Gen	Anzahl qPCR-Calls	Anzahl CNA-Calls
MYC	17	5 (4 n/a)
ERBB2	10	3 (3 n/a)
FGFR1	10	1 (3 n/a)
CCND1	8	0 (3 n/a)

3.4. Statistische Auswertung

3.4.1. Korrelationen zwischen Drivermutationen und dem Auftreten genomisch aberranter CNA-Profile

Von allen getesteten Zellen wiesen 57 von 243 DCCs mindestens eine Drivermutation auf. Bei der Kopienzahlanalyse zeigten 48 von 240 DCCs ein aberrantes Profil. Somit liegt die Call-Rate für „echte“ DCCs bei 23,5% zu 20% respektive je nach Methode.

Es wurden alle untersuchten Treibermutationen auf einen statistischen Zusammenhang mit aberranten Genomen hin mittels Chi-Square-Testung analysiert. Auch wenn viele Drivermutationen in der CNA-Analyse nicht erkannt wurden, so gab es doch einen statistischen Zusammenhang zwischen dem Auftreten mindestens einer Drivermutation generell in der qPCR und dem Vorhandensein eines aberranten Genoms ($p=0,009$) (

Abbildung 37).

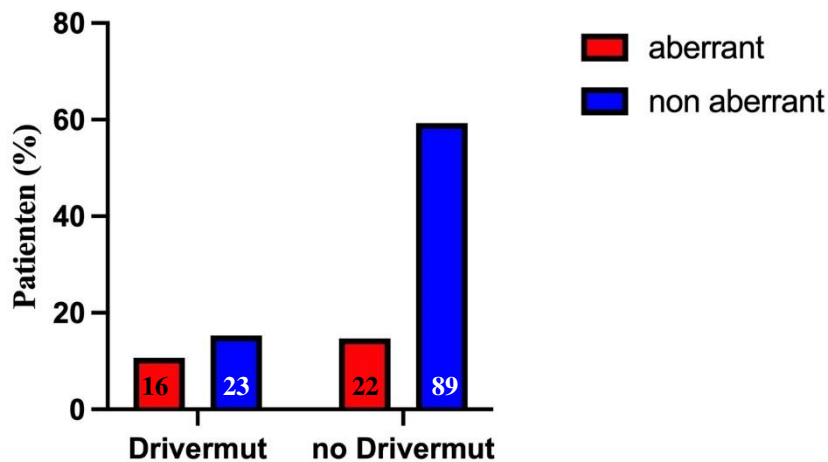


Abbildung 37: Säulendiagramm zur Korrelation zwischen dem Vorhandensein mindestens einer Drivermutation und einem aberranten Genprofil, Chi-Square-Test ($p=0,009$); die absolute Patientenzahl ist in der Säule abgebildet

Nachdem Drivermutationen generell mit aberranten Kopienzahlprofilen korrelieren wurden die einzelnen Drivermutationen nochmals getestet. Allein zwischen dem Auftreten einer Amplifikation auf dem MYC-Genlocus und dem Vorhandensein eines aberranten Genoms bestand ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,042$). Zwischen allen anderen untersuchten Amplifikationen und dem Auftreten eines aberranten Genoms konnte keine Korrelation aufgezeigt werden (Abbildung 38).

Zwischen dem Auftreten von PIK3CA-Punktmutationen und dem Vorhandensein eines aberranten Genoms bestand ebenso kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,095$), allerdings korrelierten TP53-Punktmutationen mit dem Auftreten generell aberranter Genome ($p=0,039$) (Abbildung 38).

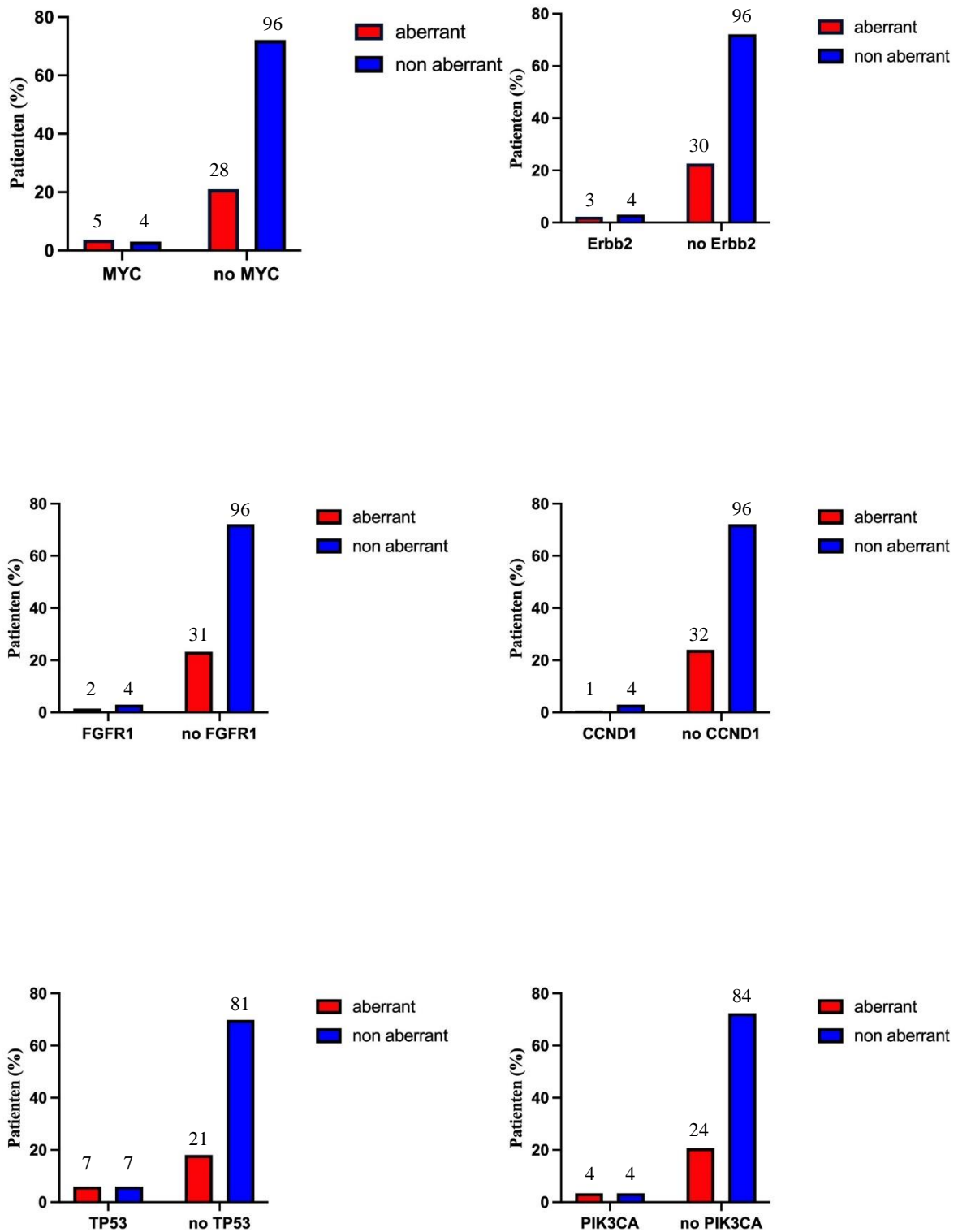


Abbildung 38: Säulendiagramme zur Darstellung der Korrelation zwischen dem Vorhandensein einer Drivermutation in der qPCR bzw. im Sanger-Sequencing und einem aberranten Genomprofil in der CNA-Analyse; die absoluten Patientinnenzahlen sind oberhalb der Säulen vermerkt

3.4.2. Testung auf klinische Signifikanz der Untersuchungsergebnisse

Im nächsten Schritt untersuchten wir die klinische Signifikanz unserer experimentellen Ergebnisse, indem wir die uns verfügbaren klinischen Follow-Ups mit den Ergebnissen verglichen. Luminal-like-Tumorpatienten waren zu 39,2% positiv für aberrante DCCs und zu 37,8% positiv für Drivermutationen. Her2-enriched-Tumorpatienten waren zu 33,3% positiv für aberrante DCCs und zu 33,3% positiv für Drivermutationen. Triple-negative-Tumorpatienten waren zu 25,0% positiv für aberrante DCCs, jedoch zu 53,3% positiv für Drivermutationen. DCIS-Patienten hatten keine aberrante DCCs inne, jedoch zeigten 66,7% der DCIS-Patientinnen DCCs mit Drivermutationen (Abbildung 39).

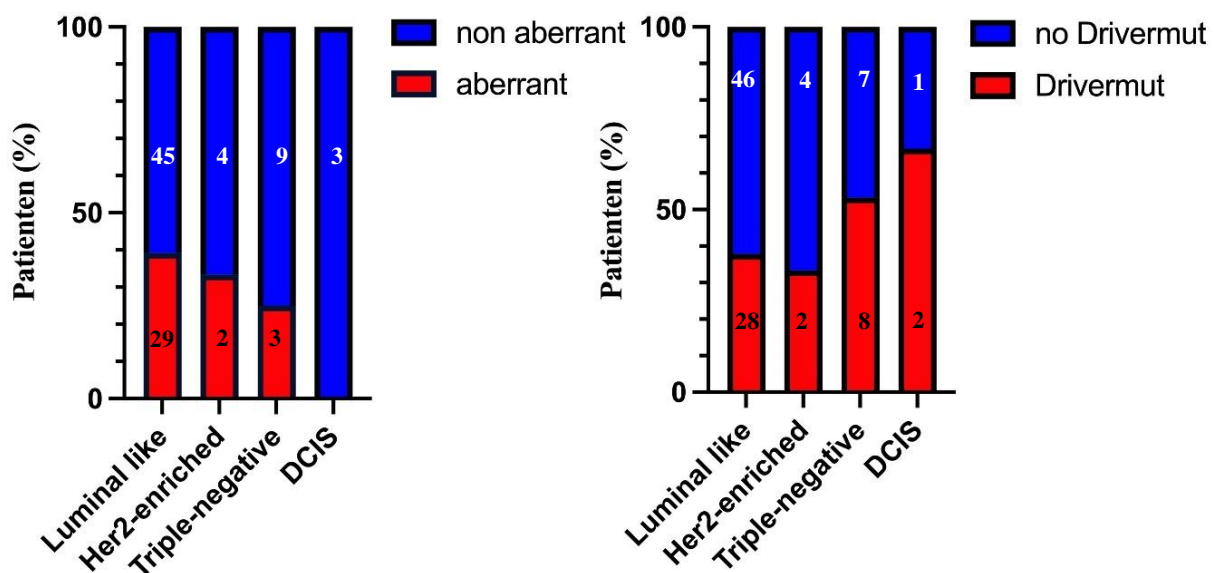


Abbildung 39: Balkendiagramm zum Vergleich der verschiedenen Subtypen und dem Vorhandensein eines aberranten Genoms bzw. einer Drivermutation; die absolute Patientenzahl ist in der Säule abgebildet

Zusätzlich zeigte sich, dass keine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein mindestens einer CK-positiven Zelle mit einer Drivermutation oder/und einem aberranten Gen und dem biologischen Subtyp der Patientin gefunden werden konnte. Aufgrund der Anzahl der Patienten mit Luminal-like Tumoren wurde nochmals zwischen Luminal A-like und Luminal B-like unterschieden. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Es konnte ebenso keine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein mindestens einer CK-positiven Zelle mit einer Drivermutation oder/und einem aberranten Genom und dem klinischen Outcome bezogen auf Rezidiv, Metastasierung, Tod und zusammengefasst einem Event gefunden werden (Abbildung 40).

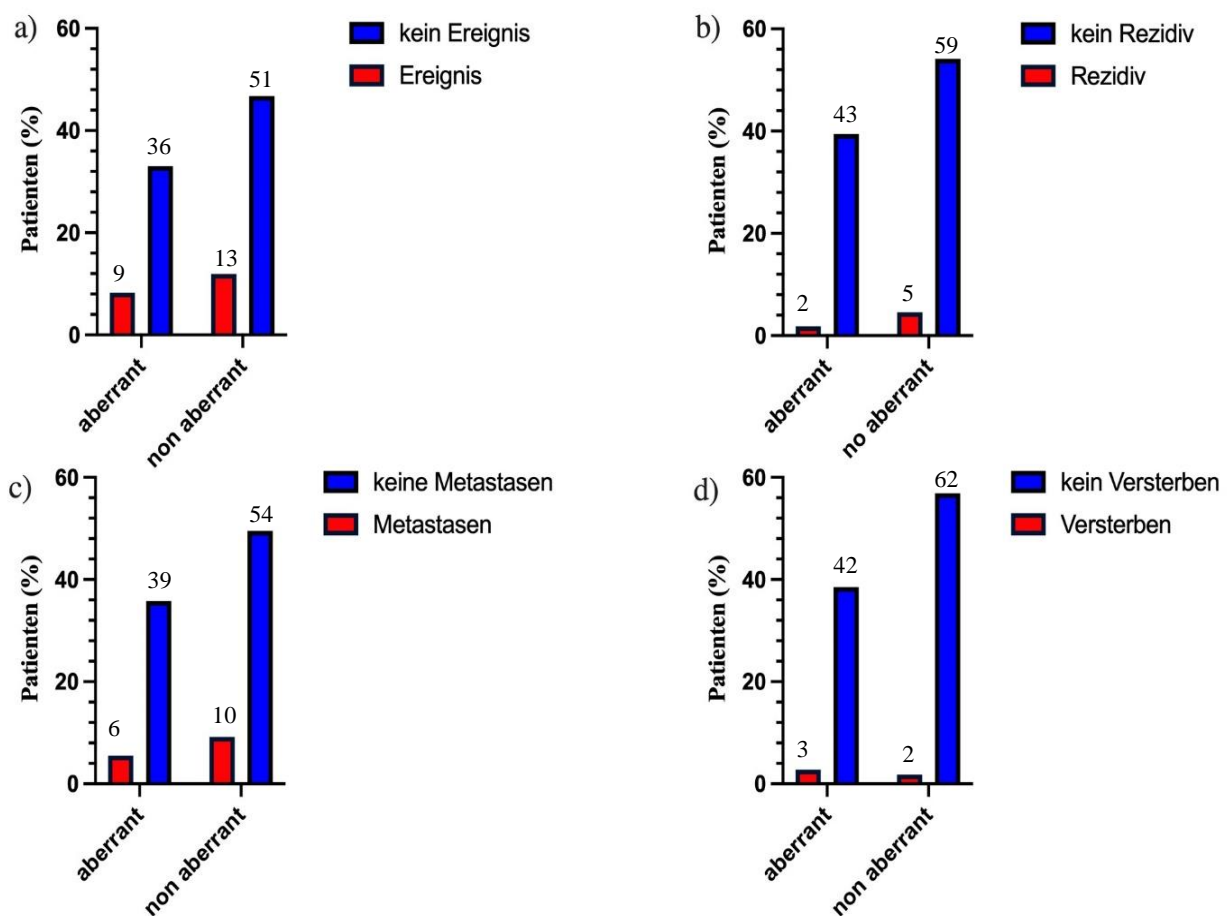


Abbildung 40: Säulendiagramme zur Korrelation zwischen dem Vorhandensein mindestens einer aberranten DCC und dem klinischen Outcome gemessen in a) Zusammenfassung aller Ereignisse, b) Rezidiv, c) Metastasen und d) Tod; die absoluten Patientinnenzahlen sind oberhalb der Säulen vermerkt

In den durchgeführten Überlebensanalysen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein CK-positiver Zellen und einem verschlechterten Gesamtüberleben oder

krankheitsfreien Überleben hergestellt werden (Abbildung 41). Ebenso wenig konnte bei den CK-positiv getesteten Patientinnen ein vermindertes Gesamtüberleben oder krankheitsfreies Überleben festgestellt werden, wenn Drivermutationen und/oder aberrante Genome in den CK-Zellen detektiert wurden (Abbildung 42).

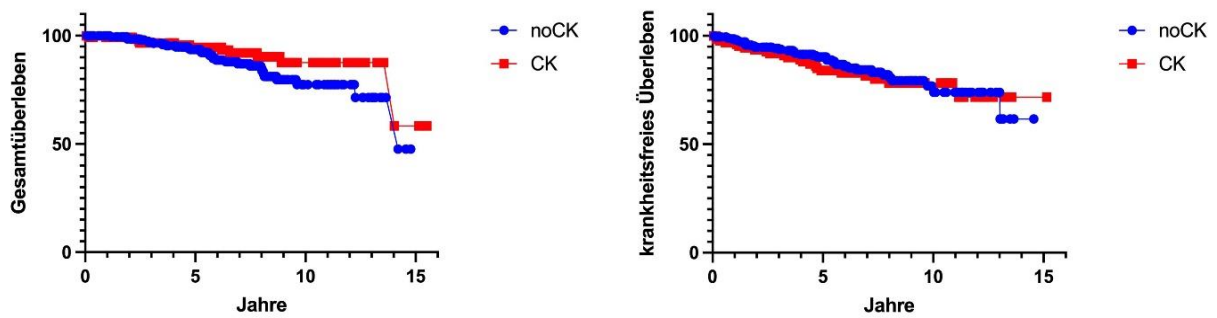


Abbildung 41: Kaplan-Meier-Graph zur Überlebensanalyse von Patientinnen mit CK-positiven Zellen im Knochenmark (rot) und Patientinnen ohne CK-positive Zellen im Knochenmark (blau) in Bezug auf das Gesamtüberleben (links) und das krankheitsfreie Überleben (rechts); Log-rank Test für Patientinnen mit CK-positiven Zellen OS $p=0,24$, DFS $p=0,66$

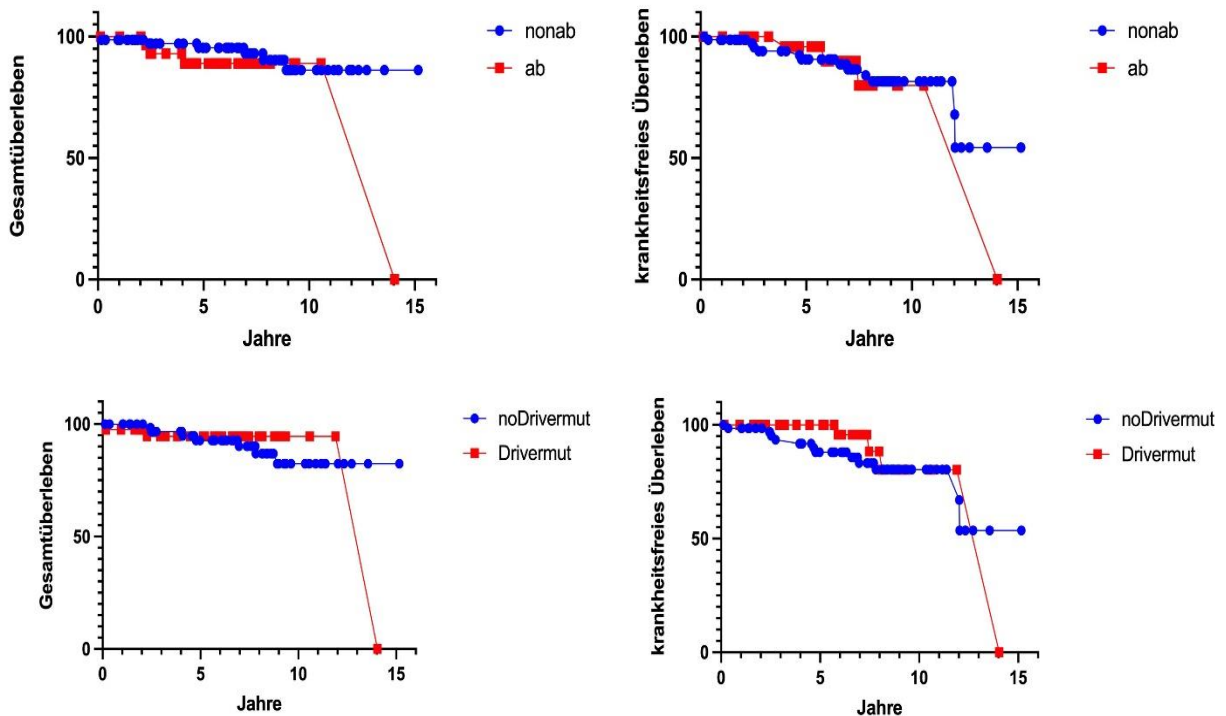


Abbildung 42: Kaplan-Meier-Graph zur Überlebensanalyse von Patientinnen mit CK-positiven Zellen im Knochenmark und aberrantem Genom bzw. Drivermutationen (rot) und Patientinnen mit CK-positive Zellen im Knochenmark ohne aberrantes Genom bzw. Drivermutationen (blau) in Bezug auf das Gesamtüberleben (links) und das krankheitsfreie Überleben (rechts); Log-rank Test für genomisch aberrante CK-Zellen OS $p=0,37$, DFS $p=0,99$; Log-rank Test für CK-Zellen mit Drivermutationen OS $p=0,72$, DFS $p=0,51$

4. Diskussion

4.1. Stärken und Limitationen der Studie

Die klinische Einordnung und Interpretation der vorliegenden Ergebnisse geht Hand in Hand mit den methodologischen Stärken und Schwächen dieser Studie. Insgesamt wurde durch mehrjährige, multizentrische Probensammlung eine Kohorte von 363 Studienpatientinnen erzielt, was im Vergleich mit ähnlichen insbesondere experimentellen Studien einer relativ hohen Fallzahl entspricht (71,72). Von den 135 Studienpatientinnen, welche positiv auf DCCs testeten, konnten insgesamt 330 Einzelzellen mit guter genomischer Qualität isoliert und genomisch aufgearbeitet werden. Der Einsatz verschiedener Methoden von PCR-basiert bis zur array-basierenden CGH und dem Lowpass-Sequenzieren mit ausgedehnten Qualitätsanalysen lässt eine zuverlässige Beantwortung der Forschungsfragen und eine genomische Charakterisierung auf Einzelzellniveau zu.

Bei der Methodik stellte sich die CNV-Analyse und deren Interpretation als limitierender Faktor heraus. Aufgrund von Qualitätsfaktoren, wie einem erhöhtem Hintergrundrauschen oder einer verminderten Anzahl von Reads mit überproportionalen Ausreißern, kann das Interpretieren von Kopienzahlgewinnen oder Verlusten einen subjektiven Charakter bekommen. Hier wurde bei der Auswertung strengstens auf die Qualitätsstandards geachtet, weswegen 57 von 240 Profilen (23,75%) exkludiert wurden. Zusätzlich wurden die Profile von drei unabhängigen Wissenschaftlern mit teilweise langjähriger Erfahrung im Bereich der Kopienzahlanalyse beurteilt und über Kopienzahlveränderungen konsensual entschieden. Außerdem wurden 19 von insgesamt 29 aCGH-Profile ebenso mittels LP erstellt und verglichen, um sowohl interpersonellen als auch methodologischen Bias zu minimieren. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Profilen. Nichtsdestotrotz kann nicht mit letzter Sicherheit die Validität dieser Analyse bestätigt werden. Hierzu erwarten wir noch die kumulative bioinformatische Auswertung aller Proben. Zusätzlich wäre es von Nutzen bioinformatisch die CNV-Analysen anderer

Tumorentitäten gegenüber den Mammakarzinomproben zu stellen, um Kopienzahlveränderungen, welche spezifisch für das Mammakarzinom sind, besser herauszufiltern.

Zudem fehlt dieser genomischen Studie die funktionale Ebene, um diese frühen Genveränderungen, ihre Bedeutung und deren Persistenz zu beweisen. Zum Vergleich können hierzu die Studien von *Hosseini et al. (2016)* und *Werner-Klein et al. (2020)* herangezogen werden, welche einerseits die sehr frühe Dissemination beim Mammakarzinom sowie die Rolle von Interleukin-6 auf funktionaler Ebene beleuchteten (73,74).

Die größte Limitation der durchgeführten Studie liegt in der fehlenden statistischen Power aufgrund der außergewöhnlich geringen Ereigniszahl (Metastasierung, Rezidiv oder krankheitsspezifischer Tod) im klinischen Follow-Up. Hier erwies sich die Recherche in den drei verschiedenen Tumorzentren als langwierig und herausfordernd, da vereinzelt Patientinnen nicht mehr nachgesorgt wurden und somit keine Daten zum späteren klinischen Verlauf gemacht werden konnten. Auch wenn das mediane Follow-up mit 6,5 Jahren adäquat ist, so kann die Mehrzahl der möglichen späten Ereignisse, ob lokoregional oder fernmetastasiert, nicht abgebildet werden. Aktuell wird das bestehende klinische Follow-Up nachgearbeitet. Nach Erhalt der fehlenden Informationen und nach Überprüfung des gesamten klinischen Follow-Ups sollte es möglich sein, adäquate Überlebensanalysen durchzuführen und gegebenenfalls neue klinisch wichtige von untergeordneten transienten Mutationen/Kopienzahlveränderungen zu unterscheiden. Die im folgenden diskutierten Tendenzen könnten mit einem aussagekräftigeren Follow-Up deutlich ausgeprägter ausfallen.

4.2. DCCs können bereits in frühen Stadien des Mammakarzinoms nachgewiesen werden und haben das Potential nach neoadjuvanter Chemotherapie zu persistieren

In unserer Studie ist es gelungen aus einer großen Anzahl an Brustkrebspatientinnen disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark zu isolieren und genomisch aufzuarbeiten. Die Prävalenz (37.2%) von DCCs direkt nach primär onkologischer Operation ist vergleichbar mit der berichteten Prävalenz anderer großer kumulativer Analysen (~30%) (36,56).

Auch das Auftreten von DCCs im Knochenmark von Patientinnen, welche aufgrund eines DCIS operiert wurden, wurde bereits in anderen größeren Studien beschrieben. Die Prävalenz unterschied sich dabei beträchtlich, denn in unserem Kollektiv waren vier von sieben DCIS-Patientinnen positiv auf DCCs im Knochenmark getestet worden, wohingegen in den oben beschriebenen Studien höchstens 11% der DCIS-Patientinnen DCCs aufwiesen (75,76). Diese

Diskrepanz beruht am ehesten auf einem Selektionseffekt in unserer Studie, da beim Screening der eingeschickten Proben die endgültige Histologie nicht berücksichtigt wurde. Tatsächlich erlitt keine unserer DDC-positiven DCIS-Patientinnen ein Lokalrezidiv, wobei eine DCC-negative Patientin im selben Jahr ihrer Erst-OP ein beidseitiges Mammakarzinom entwickelte. In diesem Zusammenhang konnte bereits in großen epidemiologischen Studien zum DCIS gezeigt werden, dass es sich im Aspekt des lokalen Rezidivierens ähnlich einem mikroinvasiven Karzinom verhält und dass die 20-jährige krankheitsspezifische Mortalitätsrate bei 3,3% insgesamt liegt. Die Kapazität Metastasen zu formen dahingegen, wird in den herkömmlichen Modellen invasiven Formen allein zugeschrieben (75,77,78). Das Vorhandensein von DCCs im Knochenmark von Patientinnen, welche ein DCIS hatten aber keine die Basalmembran überschreitende invasive Krebsform, sowie die krankheitsspezifische Mortalitätsrate von 3,3% des DCIS, lassen sich am ehesten mit dem Modell der parallelen Progression erklären (78).

In unserem Kollektiv erhielten 39 Patientinnen eine neoadjuvante Therapie. Davon waren 20 (51,3%) der Patientinnen nach Neoadjuvanz und Primär-OP DCC-positiv. Dieses Ergebnis korrespondiert gut mit dem Ergebnis anderer Studien, welche explizit auf DCCs nach erfolgter neoadjuvanter Therapie und deren prognostischen Wert screenen (79,80). Ob und inwiefern diese persistierenden Zellen im Knochenmark Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika trugen und ob diese zu einem späteren Zeitpunkt zum Tumorprogress führten, kann auf Grundlage unserer Daten nicht beantwortet werden.

Die klinische Signifikanz der DCCs, gemessen anhand des Rezidiv-freien, Progress-freien und Event-freien Zeitraums, konnte bei unserem Kollektiv im Gegensatz zu vorherigen Studien nicht bestätigt werden (55,56,58–60,81). In diesen Studien gilt nicht nur das Vorhandensein von DCCs im Knochenmark als alleinstehender prognostischer Faktor, sondern es korreliert ebenfalls mit bereits bekannten patho-histologischen Prognosefaktoren, wie der TNM-Klassifikation, dem Grading, dem molekular-biologischen Subtyp und dem Alter. Aus unseren Analysen ging hervor, dass das Vorhandensein von DCCs nur mit dem molekularbiologischen Subtyp korrelierte, aber einen Trend zur Korrelation mit der Größe des Tumors aufwies. Zusätzlich schien das Vorhandensein von DCCs generell nicht mit dem Alter zu korrelieren, jedoch zeigte sich ein negativer Zusammenhang zwischen dem Alter der Patientinnen bei Primär-OP und der Anzahl gefundener DCCs. Hier muss wieder auf die ausgesprochen niedrige Zahl an Ereignissen in unserem klinischen Follow-Up hingewiesen werden.

4.3. Nur wenige DCCs zeigen zum Zeitpunkt der Primäroperation Drivermutationen

Da man aufgrund des alleinigen Vorhandenseins von DCCs im Knochenmark noch nicht auf ihr onkogenes Potential, also das Potential Metastasen zu formen, schließen kann, erfolgte der Versuch die Prävalenz der häufigsten Drivermutationen des Brustkrebses in den DCCs zu bestimmen und deren klinische Rolle zu distinguieren. Generell traten in den von uns untersuchten DCCs weniger Drivermutationen auf als in den Primärtumoren, welche durch *Stephens et. al* (2012) untersucht wurden (61). Die Differenzierung zwischen HR-positiven und HR-negativen Primärtumoren zeigte, dass Drivermutationen vor allem in DCCs von HR-positiven Primärtumoren (63%) nachgewiesen werden konnten. Dieses Ergebnis korrespondiert gut mit den Ergebnissen von *Stephens et. al* (61). Dies spricht für die These, dass Tumorzellen früh aus dem Primärtumor auswandern und noch sehr wenige onkogene Veränderungen aufweisen. Im Folgenden werden die einzelnen Drivermutationen kurz vorgestellt und unsere Ergebnisse beleuchtet.

4.3.1. MYC

Das MYC-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 8 lokalisiert (8q24.1) (NCBI Gen ID: 4609). Amplifikationen von 8q wurden bei Brustkrebs häufig beobachtet (82). C-myc ist ein Transkriptionsfaktor, welcher als Protoonkogen vor allem an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt ist. Die Amplifikation des Gens kann zu aberranten Zellzyklen wie auch zur Genominstabilität führen. Aktuelle Studien gehen davon aus, dass die Rolle von MYC in der Tumorgenese weitaus weitreichender als die eines Transkriptionsfaktors ist (83). In mehreren Studien wurde die relative Häufigkeit der C-myc-Amplifikation im Mittel bei ca. 15% der untersuchten Brusttumoren beschrieben (61,84). Unsere Ergebnisse zeigten wesentlich geringere Häufigkeiten (8,8%), was für eine fast doppelt so hohe Häufigkeit der MYC-Amplifikation in Primärtumoren als in DCCs sprechen könnte. Auf der anderen Seite zeigten sich Kopienzahlgewinne auf dem Chromosom 8 bei unseren PT in 50% der Fälle (13 von 26). Aufgrund der niedrigen Gesamtzahl an Primärtumorproben kann keine generalisierende Aussage getroffen werden. Manche Studien bezeichnen eine MYC-Amplifikation als starken prognostischen Marker bei frühem Brustkrebs bezogen auf die krankheitsfreie Zeit (DFS) (85), andererseits gibt es auch Beobachtungen, in denen eine MYC-Amplifikation keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben zeigte (86). In unserer Studie konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen Überleben bzw. krankheitsfreier Zeit und dem Vorhandensein einer

MYC-Amplifikation in DCCs hergestellt werden. Die Anzahl der positiven Fälle ist allerdings so gering, dass keine verlässliche Aussage getroffen werden konnte.

4.3.2. ERBB2

Das Gen des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (englisch: human epidermal growth factor receptor 2, HER2/neu) ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 lokalisiert (17q12) (NCBI Gen ID: 2064). Die Aktivierung des Gens ist vereinfacht ausgedrückt für die Hemmung der Apoptose über den mTOR-Signalweg sowie für die Zellproliferation und die Regulierung von Wachstum, und Differenzierung verantwortlich (87–89). In 20-25% aller Brustkrebsarten ist das Gen im Primärtumor amplifiziert (90). Durch eine Überexpression von HER2-Rezeptoren wird die Entartung maligner Zellen gefördert. Patientinnen mit HER2/neu-positiven Tumoren haben demnach eine geringere Lebenserwartung im Vergleich zu Patientinnen mit HR⁺-HER2/neu⁻-Tumoren (90,91). Allerdings kann mittlerweile basierend auf einer dualen Blockade der Her2/3-Rezeptoren eine neo-/adjuvante und palliative Therapie mit Trastuzumab und Pertuzumab durchgeführt werden, welche sowohl die Überlebensrate als auch die krankheitsfreie Zeit signifikant erhöhte und die Krebstherapie revolutionierte (92–94). Eine HER/2neu-Amplifikation war in den von uns untersuchten Zellen mit nur 5,1% unterrepräsentiert. Auch hier zeigte sich keine klinische Signifikanz, was wahrscheinlich ebenfalls auf die niedrige Fallzahl zurückzuführen ist. Tatsächlich zeigte sich auf Chromosom 17 auch bei den Primärtumoren in nur vier von 26 Fällen ein Kopienzahlgewinn, bei den aberranten DCCs in fünf von 48 Zellen. Von diesen fünf DCCs mit Kopienzahlgewinn auf Chromosom 17, hatte keine der jeweiligen Patientinnen einen HER2/neu-positiven Primärtumor. Interessanterweise haben die drei DCCs von Patientinnen mit HER2/neu-angereichertem Subtyp keine Kopienzahlveränderungen auf dem Chromosom 17. Dies alles, auch wenn es statistisch nicht verwertbar ist, spricht für die hohe Heterogenität zwischen Primärtumor und DCCs.

4.3.3. FGFR1

Der Genlocus des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 1 (englisch: fibroblast growth factor receptor type 1 FGFR1) ist auf Chromosom 8p11–12 lokalisiert (NCBI Gen ID 2260). Das Gen codiert ein Protein der FGFR-Tyrosinkinase-Familie. Eine Amplifikation von FGFR1 wurde mit einem schlechteren Krankheitsausgang und mit einer möglichen Resistenz gegenüber antihormoneller Therapie insbesondere beim Luminal-B-Brustkrebs assoziiert (95). Gleichzeitig werden FGF-Rezeptoren als potentielle Ziele für zukünftige Therapien erforscht

(96). Die Häufigkeit einer Amplifikation auf dem FGFR1-Genlokus in unseren DCC-Analysen (5,2%) unterschied sich stark von der durch *Stephens et. al* ermittelten Häufigkeit in Primärtumoren (15%) (61). In unserer Primärtumoranalyse zeigten allerdings über die Hälfte der Tumoren eine Kopienzahlveränderung auf Chromosom 8. In unserem Fall gab es keine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein einer FGFR1-Amplifikation und einem schlechteren klinischen Follow-Up.

4.3.4. CCND1

Das Gen Cyclin D1 (CCND1) ist auf dem langen Arm von Chromosom 11 lokalisiert (11q13.3) (NCBI Gene ID: 595). Cycline wirken generell auf den Zellzyklus durch Cyclin-abhängige-Kinasen (CDK). CCND1 im Speziellen interagiert dabei durch Komplexbildung mit CDK4 oder CDK6. Die beiden Kinasen werden für den Übergang aus der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus benötigt. Eine Überexpression von CCND1 verursacht somit einen Kontrollverlust über den Zellzyklus, was letztendlich eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielt (97). Daten zur klinischen Signifikanz einer CCND1 Amplifikation bzw. einer Überexpression von Cyclin D1 sind ambivalent. Studien zeigten, dass in ca. 20% der Brustkrebsfälle eine erhöhte Kopienzahl im CCND1-Lokus und in über 50% der Fälle eine Überexpression von Cyclin D1 vorliegt, was beides mit Hormonrezeptor-positiven Brustkrebsentitäten korreliert (97–99). Zur klinischen Signifikanz dieser Drivermutation existieren kontroverse Daten. So konnte in mehreren histo-pathologischen Studien kein bzw. nur in der HR-negativen Subgruppe, in anderen wiederum auch in der HR-positiven Subgruppe, ein Effekt auf den klinischen Ausgang ausgemacht werden (100–102). In unserem Datensatz konnte keine klinische Signifikanz für eine Amplifikation im CCND1-Gen nachgewiesen werden, was mit der sehr geringen Rate an detektierten Amplifikationen (3,7%) zusammenhängen kann. Die Rate an detektierten Amplifikationen ist im Vergleich zur Publikation von *Stephens et. al* (9%) mehr als halbiert.

4.3.5. TP53

Das TP53-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert (17p13.1) und codiert das Protein p53 (NCBI Gen ID: 7157). Bei dem Protein handelt es sich um einen Tumorsuppressor. Das Protein p53 befindet sich im Zellkern und bindet dort direkt an geschädigte DNA. Dadurch werden Prozesse induziert, welche je nach Situation zur Reparatur von DNA-Schäden oder zur Apoptose der Zelle führen. Bei einer Funktionsstörung oder Ausfall von p53 kommt

es zu unkontrollierter Zellteilung und inadäquatem Überleben. Viele Therapieformen sind von einem intakten TP53-Pathway abhängig (103,104).

Einerseits können TP53-Mutationen autosomal vererbt werden, wie beim Li-Fraumeni-Syndrom, andererseits können auch somatische Mutationen, welche in 20-40% aller Brustkrebskrankungen auftreten, zu Tumorgenese führen. Dabei werden 98% der Mutationen im Bereich von Exon 5-9 gefunden (105).

Viele dieser Mutationen führen dazu, dass p53 nicht mehr an DNA binden kann und verursachen dadurch eine Funktionsstörung des p53-Proteins. Vielen Studien haben gezeigt, dass TP53-Mutationen bei Brustkrebs ein unabhängiger Risikofaktor für eine schlechtere Prognose sind (106–108). In unserer Studie konnten wir feststellen, dass TP53-Mutationen vor allem bei DCCs mit einem aberranten Genom vorkommen, was dafürspricht, dass diese Patientinnen an aggressiveren Krebsentitäten leiden. Nichtsdestotrotz konnte in unserer Kohorte kein klinischer Zusammenhang zwischen dem Auftreten von TP53-Mutationen in DCCs und einer schlechteren Prognose ausgemacht werden. Eine generalisierte Aussage kann auf Grundlage unserer Daten allerdings nicht getroffen werden, da die statische Power sehr gering ist.

4.3.6. PIK3CA

Auf Chromosom 3 befindet sich das Gen PIK3CA (NCBI Gen ID: 5290), welches für die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-kinase kodiert. Die PI3-Kinase ist Teil des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, welcher vor allem den Metabolismus, das Überleben, die Proliferation und das Wachstum der Zelle beeinflusst (109,110). Die Häufigkeit von PIK3CA Mutationen wurde über mehrere Studien hinweg mit 25-40% angegeben (111–114). Im Gegensatz zu einer ähnlichen Studie an DCCs, welche mittels EPCAM-Marker detektiert wurden, zeigte unsere Kohorte eine wesentlich geringere Mutationsrate an PIK3CA-Mutationen (27% vs. <5%) (115).

Studien konnten zeigen, dass die Mutationen sowohl in Exon 9 als auch in Exon 20 mit einem früheren Wiederauftreten der Erkrankung bzw. geringerem Gesamtüberleben assoziiert sind (116–118). Andere Analysen konnten diese Erkenntnisse nicht bestätigen (119). Anhand unserer Daten ist aufgrund der niedrigen Anzahl der Ereignisse keine Aussage hinsichtlich der klinischen Signifikanz möglich, allerdings fiel auf, dass alle DCCs mit PIK3CA-Mutationen von HR-positiven Primärtumoren stammten, was ebenfalls in der Literatur beschrieben ist (119) und was auf eine Häufung von PIK3CA Mutationen in diesem Subtyp hindeutet. Eine weitere

Vertiefung insbesondere dieser Mutationen sollte zukünftig bei der Analyse disseminierter und zirkulierender Tumorzellen angestrebt werden, da mit Alpelisib, einem PI3K α -spezifischen Inhibitor, eine individualisierte Therapieoption für PIK3CA-mutierte fortgeschrittene Brustkrebskrankungen existiert und diese von der Vorhersage des Mutationsstatus der disseminierten Zellen profitieren könnten (120).

4.4. Nur ein Fünftel der DCCs entpuppt sich als echte Tumorzellen

Nachdem nur wenige DCCs eine der vier untersuchten Drivermutationen aufwiesen, untersuchten wir die Zellen auf genomische Kopienzahlveränderungen, um eine Aussage hinsichtlich ihrer Malignität treffen zu können. Hierbei ergab sich, dass 20% der 240 untersuchten DCCs ein aberrantes Genom vor allem mit Kopienzahlgewinnen in den Chromosomen 1,2,3,11 und X aufwiesen. Teilweise konnten die in der qPCR nachgewiesenen Drivermutationen in der Kopienzahlanalyse nicht bestätigt werden. Ob diese nun als "falsch-positive" Drivermutationen zu werten sind, ist schwierig einzuschätzen, denn nachgewiesenermaßen ist die qPCR ein sehr sensitives Messverfahren selbst für sehr kleine Amplifikationen in bestimmten Zielregionen (66,121), wohingegen die Detektionsgrenzen für Kopienzahlveränderungen sowohl in der aCGH und dem LP im Kilobasenbereich liegen (69,122). Dementsprechend ist ein direkter Vergleich der beiden Methoden nicht möglich. Die nicht-bestätigten Drivermutationen könnten sehr frühe Amplifikationen sein, welche noch keine signifikante Kopienzahlveränderungen zeigen. Auch das Postulat, dass "echte" Tumorzellen ein aberrantes Genom aufweisen müssen, bleibt weiterhin zu überprüfen, da in der Vergangenheit bereits anhand von spezifischer Analysen karyotypisch normal erscheinende CK-positive Zellen als Tumorzellen identifiziert werden konnten (123).

4.5. Genetische Heterogenität zwischen DCCs und Primärtumoren

Generell zeigte sich durch unsere CNA-Analyse von 25 Patientinnen mit korrespondierenden PT- und KM-Proben, dass sich die molekularen Eigenschaften von Primärtumor und DCCs ebenso wie die molekularen Eigenschaften der DCCs untereinander unterschieden. Im Folgenden möchte ich die einzelnen Fälle diskutieren.

4.5.1. Balanciertes PT-Profil und balanciertes bzw. aberrantes DCC-Profil

In vier Fällen ergab sich zu einem balancierten PT-Profil ein balanciertes Profil der zugehörigen DCC. Im ersten Fall (#H12-2xxx8) war der Primärtumor vom Luminal-A-like Subtyp, im

zweiten Fall (#H13-1xx9) handelte es sich um einen Her2-enriched Subtyp, und bei beiden Patientinnen wurde lediglich eine DCC isoliert. Zusätzlich gab es zwei Fälle (#94/09 und #233/08), welche ebenfalls sowohl im PT also auch in den DCCs balancierte Profile aufwiesen. Beide waren von unbekanntem Luminal-like Subtyp. Auf der anderen Seite gab es drei weitere Fälle, bei welchen der PT ein balanciertes Profil aufwies, allerdings wenigstens eine DCC ein aberrantes genomisches Profil. Die ersten beiden Fälle (#129/09 und #H14-2xxx1), welche respektive dem Luminal-A-like und Luminal-B-like Subtyp zugeschrieben werden können, zeigten bei einer von drei DCCs ein klar aberrantes Profil. Der dritte Fall (#H11-2xx6), welcher einen Triple-negativen Subtyp aufwies, zeigte bei einer von zwei DCCs ein aberrantes Profil. Keiner dieser Fälle zeigte im klinischen Follow-Up einen Tumorprogress oder Rezidiv.

Bei Betrachtung dieser Fälle (7/25) muss die Frage gestellt werden, warum die Primärtumorproben keine genomisch veränderten Profile aufwiesen. Es könnte sein, dass beim Stanzen des Primärtumorblocks kein Tumorareal, sondern umliegendes nicht betroffenes Brustgewebe getroffen und verarbeitet wurde. Da die Blöcke allerdings vorher mikroskopisch durch unsere Kollegen aus der Pathologie beurteilt und die am meisten tumorös veränderten Areale markiert wurden, ist es sehr unwahrscheinlich, dass in sieben von 25 Fällen normales Brustgewebe getroffen wurde. Ein anderer Erklärungsansatz ist, dass Areale des Tumors getroffen wurden, welche tatsächlich noch keine strukturellen genomischen Veränderungen aufwiesen, sondern vielleicht nur SNPs, kleine Aberrationen oder Translokationen, welche durch die CNA-Analyse nicht ersichtlich sind. In vier der sieben Fälle waren sowohl PT also auch DCCs genomisch balanciert, was für ein sehr frühes Auswandern dieser Zellen spricht (Frühdisseminierungsmodell). In drei Fällen allerdings zeigte sich jeweils eine aberrante Zelle zwischen balancierten DCCs. Ob diese aberranten Zellen von anderen nicht dargestellten Teilen des Primärtumors stammen oder sich unabhängig vom balancierten Teil des Tumors genetisch weiterentwickelt haben, ist anhand unserer Daten nicht zu sagen. Allerdings erlitt eine der drei Patientinnen ein Rezidiv.

4.5.2. Aberrantes PT-Profil und balanciertes bzw. aberrantes DCC-Profil

In neun von 18 Fällen konnten zu einem aberrantem PT-Profil keine aberranten DCCs zugeordnet werden. Wenn man davon ausgeht, dass diese DCCs keine wahren Tumorzellen sind, so müsste das klinische Follow-Up für diese Fälle blande sein. Allerdings zeigte sich ein Fall mit einem Rezidiv und ein Fall, bei welchem es zur Metastasierung kam. Beide Fälle waren vom

Luminal-B-like Subtyp. Man kann also annehmen, dass in diesen Fällen nicht die potenten DCCs isoliert wurden, sondern Metastasen von nicht isolierten DCCs im Verlauf gebildet wurden. Dies kann auch im Zusammenhang mit der in dieser Arbeit beschriebenen interzellulären Heterogenität gesehen werden. Auf der anderen Seite zeigten sich im klinischen Follow-Up der Patientinnen (neun Fälle), welche sowohl im Primärtumor als auch in mindestens einer DCC ein aberrantes Profil aufwiesen, ebenfalls nur bei drei Patientinnen ein Tumorprogress. Diese Patientinnen hatten einen Primärtumor vom Luminal-B-like (n=2) und Her2-enriched (n=1) Subtyp. Alle drei Patientinnen erlitten einen Tumorprogress im Sinne einer Metastasierung und eine Patientin (#129/06) verstarb an der Erkrankung. Eben bei dieser Patientin zeigten sich die meisten Übereinstimmungen zwischen Primärtumor und DCCs in der CNA-Analyse.

Auch wenn aufgrund der sehr geringen Fallzahl keine generalisierten Annahmen zu treffen sind, so ist doch auffällig, dass in der Gruppe mit balancierten Primärtumorproben nur ein Rezidiv-Fall auftrat, wohingegen in der Gruppe mit aberranten Primärtumorproben ein Rezidivfall und vier Fälle mit Metastasierung zu finden waren. Verglichen dazu zeigte sich in der Gruppe mit balancierten DCCs ein Rezidiv- und ein Metastasierungsfall und in der Gruppe mit aberranten DCCs ein Rezidivfall und drei Fälle mit Metastasierung. Die Gruppe mit einem aberranten Primärtumor und DCCs war am anfälligsten für einen Tumorprogress. Leider lassen sich aus den uns vorliegenden Daten vorerst keine generalisierenden Rückschlüsse treffen.

5. Zusammenfassung

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung der Frau weltweit, was die Bekämpfung zu einem globalen Thema von übergeordneter Dringlichkeit macht. Zugleich ist Brustkrebs eine stark heterogene Erkrankung mit multiplen molekular-biologischen Subgruppen, welche sich in ihrer Prognose und insbesondere hinsichtlich ihrer Kapazität zu Metastasieren unterscheiden. Metastasen stellen trotz fortschreitender Erfolge in der Therapie den Grund für die höchste tumorassoziierte Mortalität dar. Metastasen und Rezidive werden von disseminierten Krebszellen, die zunächst in entfernten Organen eine Latenzphase durchlaufen und klinisch unauffällig bleiben, verursacht.

In unserer Studie haben wir disseminierte Tumorzellen von Patientinnen mit Brustkrebs in einem frühen Stadium auf genomischer Ebene untersucht. Zur Detektion dieser disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen wurden Antikörper gegen Zytokeratine verwendet. Die einzelnen Tumorzellen wurden dann isoliert und das Genom mehrfach amplifiziert.

Mittels der quantitativen PCR, der Sanger Sequenzierung, der array-basierten komparativen genomischen Hybridisierung und der Lowpass-Sequenzierung wurden die Einzelzellgenome untersucht und mit dem Genom der Primärtumoren verglichen. Diese Arbeit hat gezeigt, dass nahezu 40% der frühen Brustkrebserkrankungen bereits disseminierte Tumorzellen im Knochenmark aufweisen können. Von diesen Tumorzellen weisen knapp ein Viertel Drivermutationen und/oder aberrante Kopienzahlveränderungen auf. Hier zeigte sich ein heterogenes Bild unter den Einzelzellen und im Vergleich zu deren Primärtumoren, was für die Theorie der frühen Dissemination spricht. Ob zwischen den von uns detektierten molekulargenetischen Ereignissen und der klinischen Prognose wirklich kein Zusammenhang besteht, werden zukünftige Überlebensanalysen mit dem vollständigen Follow-Up zeigen können. Bis dato kann hierzu aufgrund fehlender statistischer Power keine Aussage getroffen werden.

Der Schlüssel zu weiterem Fortschritt im Kampf gegen Brustkrebs liegt in der personalisierten Tumorthherapie, welche insbesondere auf den Erkenntnissen der Sequenzierung von Primärtumoren, formierten Metastasen und disseminierten sowie zirkulierenden Tumorzellen beruht. Diese Arbeit beinhaltet die Darstellung einer erfolgreichen genomischen Charakterisierung auf Einzelzellniveau. Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Studie dar, dass innerhalb der früh-disseminierten Tumorzellen nur sehr wenige ihr onkogenes Potential bereits innehaben, was die These der parallelen Disseminierung und der „Dormancy“ unterstützt und was der Grund für spätere Therapieresistenzen sein kann.

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: klinisch-pathologische Subtypen des Mammakarzinoms nach der Internationalen St. Gallen Konferenz	8
Tabelle 2: Mastermix und PCR Programm des Proteinase-K-Verdau der WGA	26
Tabelle 3: Mastermix und PCR Programm des MseI-Verdau der WGA	27
Tabelle 4: Mastermix und PCR Programm des Preannealings der WGA.....	27
Tabelle 5: Mastermix und PCR Programm der Ligation der WGA.....	28
Tabelle 6: Mastermix und PCR Programm der primären PCR der WGA	29
Tabelle 7: Primersequenzen (TP53 Exon2/3, CK19, D5S2117, Kras) der Multiplex-KontrollPCR.....	30
Tabelle 8: Mastermix und PCR Programm der Multiplex-KontrollPCR.....	30
Tabelle 9: Mastermix und PCR Programm der Re-Amplifikation	32
Tabelle 10: qPCR Pipettierschema der Verdünnungsplatte	34
Tabelle 11: Mastermix der qPCR.....	35
Tabelle 12: PCR Programm der qPCR.....	36
Tabelle 13: Sequenzlängen der zu untersuchenden Gene mit entsprechenden Exone in bp....	38
Tabelle 14: Mastermix und PCR Programm der Amplifizierung der Genabschnitte für die Mutationsanalyse.....	39
Tabelle 15: Primersequenzen der 3 Multiplex-PCRs mit korrespondierenden PCR-Produktlängen (grün: Multiplex1, rot: Multiplex2, weiß: Multiplex3).....	41
Tabelle 16: Mastermixe der Multiplex-Reaktionen (1. Grün, 2. Rot, 3. Weiß) und PCR-Programm	42
Tabelle 17: Mastermix und PCR Programm für die Labeling-Reaktion der aCGH	44
Tabelle 18: Mastermix und PCR Programm des TruI-Verdau der aCGH.....	45
Tabelle 19: Mastermix der Hybridisierung der aCGH.....	47
Tabelle 20: Illumina Adapter Sequenzen D5xx und D7xx	49
Tabelle 21: Aufteilung einer Illumina-Sequenzierplatte mit 96 Proben	49

Tabelle 22: Mastermix und PCR Programm der 1. Extensionsreaktion der Low-Pass-Sequenzierung	50
Tabelle 23: Mastermix und PCR Programm der 2. Extensionsreaktion der Low-Pass-Sequenzierung	51
Tabelle 24: Mastermix und PCR Programm der Library Amplifikation der Low-Pass-Sequenzierung	52
Tabelle 25: Häufigkeitstabelle und Tortendiagramm der GIIs von 330 gepickten DCCs von 133 Mammakarzinompatientinnen, Legende: GII 0-4 nach Farbe geordnet	60
Tabelle 26: Korrelation zwischen dem Vorhandensein von DCCs und anerkannten histopathologischen Prognosefaktoren	64
Tabelle 27: Anzahl Amplifikationen pro Gen aus 204 gemessenen Einzelzellen	67
Tabelle 28: Anzahl der gefundenen somatischen Punktmutationen in 174 Zellen	69
Tabelle 29: Ergebnisse der graphischen Auswertung von 240 CNA-Profilen der Einzelzellen und 25 CNA-Profilen von Primärtumor-Bulk-DNA.....	73
Tabelle 30: Abgleich der qPCR-Amplifikationen mit den CNA-Profilen.....	79

7. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Prozentuale Anteile der Krebsentitäten an der weltweiten Krebsinzidenz und Krebsmortalität (2)	6
Abbildung 2: Kumulative Inzidenzkurven für Metastasen in Brustkrebssubtypen unterteilt. HER2, human epidermal growth factor receptor 2; TN, triple negative (27).	10
Abbildung 3: Hämatogene Streuung von Brustkrebs verglichen mit Darmkrebs. Brustkrebs streut seine Zellen über das Herz-Lungen-System, wohingegen Darmkrebs in das hepatoportale System streut (41).....	11
Abbildung 4: Klonale Evolution des Tumors anhand Darwinistischer Prinzipien: Proliferation, genetische Diversifikation und Mutationen durch selektiven Druck an den "Bottlenecks" (Apoptose, Immunantwort, Gegebenheiten der biologischen Nische). N= Normalzelle (42). 12	

Abbildung 5: Späte vs. frühe Dissemination und deren Auswirkung auf den Geno- und Phänotyp von Metastasen (47)	12
Abbildung 6: Drivermutationen des Brustkrebses nach Stephen et al. (2012); rot=Punktmutationen, blau=Kopienzahlveränderungen; Anzahl der 40 Drivermutation in den 100 Tumoren in Zeilen, Anzahl der Drivermutationen im einzelnen Tumor in Spalten, adaptiert aus (61)	14
Abbildung 7: Workflow der Studie	22
Abbildung 8: KM mit Dichtegradient (gelb=mononukleäre Zellen, rot=Erythrozyten) aus hausinterner SOP	23
Abbildung 9: blau-lila gefärbte CK ⁺ -Zelle auf HOT, anliegend finden sich ungefärbte Zellen, welche ebenfalls als negative Kontrolle gepickt wurden.	25
Abbildung 10: Gel-Elektrophoresebild der WGA verschiedener Einzelzellen, Banden korrespondieren (von unten nach oben): Kras, D5S2117, Exon2/3, CK19, Anzahl der vorhandenen Banden = GII	32
Abbildung 11: Schema der Zusammensetzung des Mastermix	35
Abbildung 12: Schema der Berechnung des qPCR-Werts anhand der Pfaffl-Gleichung (E=Effizienz, R= normalised ratio, CP= Crossing Point (67), (adaptiert aus Schmidt und Brunners Dissertation).....	37
Abbildung 13: Dichteverteilung der qPCR-Werte CK-negativer Zellen, Kolmogorow-Smirnov-Test p=0,044, (aus Schmidt und Brunners Dissertation)	37
Abbildung 14: Workflow der DNA-Extraktion aus Paraffinblöcken, aus QIAamp-Protokoll 40	
Abbildung 15: Optimale Absorptionskurve einer NanoDrop 2000c Messung von dsDNA, Max. bei 260 nm	46
Abbildung 16: Aufreinigungsprozess mit SPRI-Beads (aus Menarini-Protokoll).....	49
Abbildung 17: Beispiel einer BioAnalyzer-Messung	54
Abbildung 18: MiSeq (Illumina) Gerät	54
Abbildung 19: Gleichung zur Volumenberechnung von Proben mit mittlerer Menge an Reads. Volume (max)= maximal transferierbares Volumen (9,0 µl). Read count (min) = Schwellenwert für Kategorie 1. Read count (MiSeq) = gemessene Readanzahl der Probe.	56

Abbildung 20: Gleichung zur Volumenberechnung von Proben mit hoher Menge an Reads. Volume (max)= maximal transferierbares Volumen (9,0 µl). Read count (min) = Schwellenwert für Kategorie 1. Read count (MiSeq) = gemessene Readanzahl der Probe. Verdünnungsfaktor = Faktor der angesetzten Proben	56
Abbildung 21: Überblick der Studie	59
Abbildung 22: Kollektiveigenschaften der 363 eingeschlossenen Patienten; a) Herkunft, b) path. Typ, c) biologischer Subtyp mit spezifischer Unterteilung des Luminal-like Subtyps, d) Grading, e) T-Stadium, f) N-Stadium, g) M-Stadium.....	62
Abbildung 23: Histogramm der Altersdistribution des Patientenkollektivs mit Normalkurve	63
Abbildung 24: Vergleich der CK-Positivität zwischen den einzelnen biologischen Subtypen und DCIS-Tumoren zeigt signifikante Unterschiede (* Qui-Square $p < 0,001$).....	65
Abbildung 25: Workflow der Aufarbeitung der Primärtumorblöcke.....	65
Abbildung 26: 26 der 37 Primärtumorproben konnten nach der Qualitätskontrolle der WGA für die genomische Analyse verwendet werden.	66
Abbildung 27: Heatmap der Amplifikationen pro Gen aus 204 DCCs (jede Zelle entspricht einer Buchstabenkombination) mit Balkendiagramm der Häufigkeiten pro Gen; auf der y-Achse sind die vier untersuchten Drivermutationen aufgeführt, auf der x-Achse die untersuchten Einzelzellen anhand Buchstaben aufgelistet	67
Abbildung 28: Beispiele von TP53-Punktmutationen in unserem Patientenkollektiv; a) Exon 4 Missense-Mutation pP80R, b) Exon 5 Missense-Mutation pL137P, c) Exon 6 Silent-Mutation, d) Exon 7 Missense-Mutation pC238Y, e) Exon 8 Missense-Mutation pK291N	68
Abbildung 29: Heatmap der somatischen Punktmutationen pro Genlocus von 174 Einzelzellen (jede Zelle entspricht einer Buchstabenkombination) und Balkendiagramm mit den Häufigkeiten pro Punktmutation; auf der y-Achse sind die zwei untersuchten Drivermutationen mit den jeweiligen Loci aufgeführt, auf der x-Achse die untersuchten Einzelzellen anhand Buchstaben aufgelistet.....	69
Abbildung 30: Beispiel einer aberranten CK+-Zelle (rot umrahmt) und einer balancierten CK-Zelle (grün umrahmt) einer Patientin.....	70
Abbildung 31: Ergebnisse der kumulativen Qualitätsauswertung der erhobenen Kopienzahlanalyse	71

Abbildung 32: Vergleich der CNA-Profile zwischen aCGH (oben) und LP (unten) zweier aberranter Zellen (a) und b))	72
Abbildung 33: graphische Darstellung der CNV-Analyse.....	73
Abbildung 34: Kumulative Analyse der beobachteten Kopienzahlveränderungen pro Chromosom von a) 48 aberranten Einzellen und b) 17 aberranten Primärtumorstanzen; Rot=Kopienzahlverlust, Blau=Kopienzahlgewinn; die absolute Zahl ist in der Säule abgebildet	74
Abbildung 35: Vergleich der Kopienzahlveränderungen (rot=Verlust, blau=Gewinn, hellrot=Verlust+Gewinn, hellblau=Gewinn+Verlust) zwischen Primärtumoren und korrespondierenden DCC`s aufgeteilt anhand des biologischen Subtyps, a) Luminal-A-like Subtyp mit 7 Patientinnen, b) Luminal B-like Subtyp mit 11 Patientinnen, c) HER2-enriched Subtyp mit 2 Patientinnen, d) Triple-negative Subtyp mit 3 Patientinnen; nicht aufgeführt sind 2 Patientinnen mit unbekanntem Luminal-like Subtyp, welche wieder im PT noch in den DCC`s Aberrationen aufwiesen.....	77
Abbildung 36: Zytokeratinfärbung der DCCs dreier Patientinnen, aberrante Zellen wurden durch rote Kreuze in der Ecke gekennzeichnet	78
Abbildung 37: Säulendiagramm zur Korrelation zwischen dem Vorhandensein mindestens einer Drivermutation und einem aberranten Genprofil, Chi-Square-Test ($p=0,009$); die absolute Patientenzahl ist in der Säule abgebildet	80
Abbildung 38: Säulendiagramme zur Darstellung der Korrelation zwischen dem Vorhandensein einer Drivermutation in der qPCR bzw. im Sanger-Sequencing und einem aberranten Genomprofil in der CNA-Analyse; die absoluten Patientinnenzahlen sind oberhalb der Säulen vermerkt	81
Abbildung 39: Balkendiagramm zum Vergleich der verschiedenen Subtypen und dem Vorhandensein eines aberranten Genoms bzw. einer Drivermutation; die absolute Patientenzahl ist in der Säule abgebildet	82
Abbildung 40: Säulendiagramme zur Korrelation zwischen dem Vorhandensein mindestens einer aberranten DCC und dem klinischen Outcome gemessen in a) Zusammenfassung aller Ereignisse, b) Rezidiv, c) Metastasen und d) Tod; die absoluten Patientinnenzahlen sind oberhalb der Säulen vermerkt	83

Abbildung 41: Kaplan-Meier-Graph zur Überlebensanalyse von Patientinnen mit CK-positiven Zellen im Knochenmark (rot) und Patientinnen ohne CK-positive Zellen im Knochenmark (blau) in Bezug auf das Gesamtüberleben (links) und das krankheitsfreie Überleben (rechts); Log-rank Test für Patientinnen mit CK-positiven Zellen OS $p=0,24$, DFS $p=0,66$ 84

Abbildung 42: Kaplan-Meier-Graph zur Überlebensanalyse von Patientinnen mit CK-positiven Zellen im Knochenmark und aberrantem Genom bzw. Drivermutationen (rot) und Patientinnen mit CK-positive Zellen im Knochenmark ohne aberrantes Genom bzw. Drivermutationen (blau) in Bezug auf das Gesamtüberleben (links) und das krankheitsfreie Überleben (rechts); Log-rank Test für genomisch aberrante CK-Zellen OS $p=0,37$, DFS $p=0,99$; Log-rank Test für CK-Zellen mit Drivermutationen OS $p=0,72$, DFS $p=0,51$ 85

8. Literaturverzeichnis

1. Cancer IA for R on. Breast fact sheet [Internet]. Organisation WH, editor. Source: Globocan 2018. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J cancer* [Internet]. 2019;144(8):1941–53. Available from: [file:///C:/Users/Ulrike/Documents/Citavi 6/Projects/Drarbeit/Citavi Attachments/Ferlay, Colombet et al. 2019 - Estimating the global cancer incidence.pdf](file:///C:/Users/Ulrike/Documents/Citavi%206/Projects/Drarbeit/Citavi%20Attachments/Ferlay,%20Colombet%20et%20al.%202019%20-%20Estimating%20the%20global%20cancer%20incidence.pdf)
3. Ferlay J, Héry C, Autier P, Sankaranarayanan R. Global Burden of Breast Cancer. In: *Breast Cancer Epidemiology* [Internet]. International Agency for Research on Cancer ferlay@iarc.fr M4 - Citavi: Springer, New York, NY; 2010. p. 1–19. Available from: https://link-springer-com.proxy.kib.ki.se/chapter/10.1007/978-1-4419-0685-4_1
4. Koch-Institut R. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Available from: https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3_Downloads/K/Krebs/Krebsgeschehen_RKI.pdf
5. Neamțiu L, Bocchi G, Ulutürk A, Bramesfeld A, Saz Parkinson Z, Dimitrova N, et al. European guidelines for breast cancer screening and diagnosis [Internet]. Vol. 28360,

- EUR, Scientific and technical research series. Luxembourg: Publications Office; 2016. 27 p. Available from: <http://www.worldcat.org/oclc/1044386467>
6. Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausg. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin; 2015. 152 p.
 7. Onkologie L. S3-Leitlinie Mammakarzinom. Available from: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.3/LL_Mammakarzinom_Kurzversion_4.2.pdf
 8. AGO. No Title [Internet]. Brustkrebs Patientenratgeber zu den AGO-Empfehlungen. 2019. Available from: https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/AGO_Brustkrebs_2019.pdf
 9. Wörmann B. Krebsfrüherkennung in Deutschland 2014 [Internet]. Stand: Mai. Vol. Band 4, Gesundheitspolitische Schriftenreihe der DGHO. Berlin: Vorstand der DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e. V; 2014. 108 TS-WorldCat T4-Evidenz-aktueller Stand. Available from: <http://www.worldcat.org/oclc/1073823527>
 10. Fehm T et. al. Brustkrebs Symptome [Internet]. Available from: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs/symptome.html>
 11. Organisation WH. Breast Cancer [Internet]. Available from: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/> M4 - Citavi
 12. Moran MS, Schnitt SJ, Giuliano AE, Harris JR, Khan SA, Horton J, et al. Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2014;88(3):553–64. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4790083>
 13. Lyman GH, Somerfield MR, Bosserman LD, Perkins CL, Weaver DL, Giuliano AE. Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients With Early-Stage Breast Cancer: American

- Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* [Internet]. 2017;35(5):561–4. Available from: file:///C:/Users/Ulrike/Documents/Citavi 6/Projects/Drarbeit/Citavi Attachments/Lyman, Somerfield et al. 2017 - Sentinel Lymph Node Biopsy.pdf
14. Kunkler IH, Williams LJ, Jack WJL, Cameron DA, Dixon JM. Breast-conserving surgery with or without irradiation in women aged 65 years or older with early breast cancer (PRIME II): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(3):266–73.
 15. S Darby C Correa, C Taylor, R Arriagada, M Clarke, D Cutter, C Davies, M Ewertz, J Godwin, R Gray, L Pierce, T Whelan, Y Wang, R Peto PM. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9804):1707–16.
 16. Board WHOE. WHO classification of tumours. Breast Tumours [Internet]. Vol. fifth, World Health Organization classification of tumours, 5th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019. 356 TS-WorldCat M4-Citavi. Available from: <http://www.worldcat.org/oclc/1142500653>
 17. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. TNM classification of malignant tumours. Eighth edi. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc; 2017. 253 p.
 18. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403–10.
 19. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1992;22(3):207–19.
 20. D'Eredita' G, Giardina C, Martellotta M, Natale T, Ferrarese F. Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *Eur J Cancer*. 2001;37(5):591–6.
 21. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast

- Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(4):290–303.
22. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2017;28(8):1700–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6246241>
 23. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2011;22(8):1736–47. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144634>
 24. Brenton JD, Carey LA, Ahmed A, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? *J Clin Oncol*. 2005;23(29):7350–60.
 25. Perou CM, Sørile T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Renshaw MW, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* [Internet]. 2000 Aug 17 [cited 2020 Jun 23];406(6797):747–52. Available from: <https://www-nature-com.proxy.kib.ki.se/articles/35021093>
 26. Fallahpour S, Navaneelan T, De P, Borgo A. Breast cancer survival by molecular subtype: a population-based analysis of cancer registry data. *C Open* [Internet]. 2017 Sep 25 [cited 2020 Jun 26];5(3):E734–9. Available from: </pmc/articles/PMC5621954/?report=abstract>
 27. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Jul 10 [cited 2020 Jun 23];28(20):3271–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498394>
 28. Wang Y, Yin Q, Yu Q, Zhang J, Liu Z, Wang S, et al. A retrospective study of breast cancer subtypes: The risk of relapse and the relations with treatments. *Breast Cancer Res*

- Treat [Internet]. 2011 Nov [cited 2020 Jun 26];130(2):489–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21837481/>
29. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2020 Jun 26];28(10):1684–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20194857/>
 30. Recamier J. . *Recherches sur le traitement du cancer sur la compression methodique simple ou combinee et sur l’histoire generale de la meme maladie*. 2nd ed. 1829.
 31. Dorland WAN. *Dorland’s American Illustrated Medical Dictionary*. Am J Nurs. 1906;
 32. Thierry JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease [Internet]. Vol. 139, *Cell*. Cell; 2009 [cited 2020 Jun 27]. p. 871–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19945376/>
 33. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*. 2007 Jun 1;39(3):305–18.
 34. Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. Vol. 120, *Mechanisms of Development*. Elsevier Ireland Ltd; 2003. p. 1351–83.
 35. Scheel C, Onder T, Karnoub A, Weinberg RA, Talmadge JE. Adaptation versus selection: The origins of metastatic behavior [Internet]. Vol. 67, *Cancer Research*. American Association for Cancer Research; 2007 [cited 2020 Jun 27]. p. 11476–80. Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/67/24/11476>
 36. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. Vol. 147, *Cell*. Cell Press; 2011. p. 275–92.
 37. Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, Weinberg RA. EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2020 Jun 28];35(4):645–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27878502/>
 38. Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer*

- [Internet]. 2003 Jul 15 [cited 2020 Jun 27];98(2):413–23. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.11464>
39. Venet D, Fimereli D, Roth F, Boeckx B, Maetens M, Majjaj S, et al. Phylogenetic reconstruction of breast cancer reveals two routes of metastatic dissemination associated with distinct clinical outcome-NC-ND license. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). EBioMedicine [Internet]. 2020 [cited 2020 Jun 27];56:102793. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102793>
 40. Cummings MC, Simpson PT, Reid LE, Jayanthan J, Skerman J, Song S, et al. Metastatic progression of breast cancer: insights from 50 years of autopsies. J Pathol [Internet]. 2014;232(1):23–31. Available from: [file:///C:/Users/Ulrike/Documents/Citavi 6/Projects/Drarbeit/Citavi Attachments/Metastatic progression of breast cancer, insights in 50 years of autopsy.pdf](file:///C:/Users/Ulrike/Documents/Citavi%206/Projects/Drarbeit/Citavi%20Attachments/Metastatic%20progression%20of%20breast%20cancer,%20insights%20in%2050%20years%20of%20autopsy.pdf)
 41. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites [Internet]. Vol. 2, Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group; 2002 [cited 2020 Jun 28]. p. 563–72. Available from: <https://www-nature-com.proxy.kib.ki.se/articles/nrc865>
 42. HALSTED WS. THE RESULTS OF OPERATIONS FOR THE CURE OF CANCER OF THE BREAST PERFORMED AT THE JOHNS HOPKINS HOSPITAL FROM JUNE, 1889, TO JANUARY, 1894. Ann Surg [Internet]. 1894 Jul [cited 2020 Jun 26];20(5):497–555. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1493925/>
 43. Greaves M. Cancer causation: The Darwinian downside of past success? Vol. 3, Lancet Oncology. Lancet Publishing Group; 2002. p. 244–51.
 44. Hellman S, Harris JR. The Appropriate Breast Cancer Paradigm. Cancer Res. 1987;47(2).
 45. Jatoi I. Breast Cancer: A Systemic or Local Disease? . Am J Clin Oncol [Internet]. 1997 [cited 2020 Jun 26];20(5):536–9. Available from: https://journals-lww-com.proxy.kib.ki.se/amjclinicaloncology/fulltext/1997/10000/breast_cancer__a_systemic_or_local_disease_.22.aspx?casa_token=QvPeHFstiLIAAAAA:ULFAtkXkTUC4Vr

GsWZgVdOIRBzM65pD2HgBXDtauYdEP4vpm9dvw0u58eHKS5KAqe-
Pmt0IHQen02JvgW0TNUd-GFJrjS3-yabUvWcyt

46. van Netten JP, Ross AS, Cann SA, Derry DM, Ashwood Smith MJ. Is breast cancer a progressive or systemic disease? Vol. 345, *The Lancet*. Elsevier; 1995. p. 319–20.
47. Klein CA. The Metastasis Cascade. *Science* (80-). 2008;
48. Engel J, Eckel R, Kerr J, Schmidt M, Fürstenberger G, Richter R, et al. The process of metastasisation for breast cancer. *Eur J Cancer*. 2003 Aug 1;39(12):1794–806.
49. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2015 Jan [cited 2020 Jun 28];7(1):1–11. Available from: </pmc/articles/PMC4309663/?report=abstract>
50. Tachtsidis A, McInnes LM, Jacobsen N, Thompson EW, Saunders CM. Minimal residual disease in breast cancer: an overview of circulating and disseminated tumour cells [Internet]. Vol. 33, *Clinical and Experimental Metastasis*. Springer Netherlands; 2016 [cited 2020 Jun 28]. p. 521–50. Available from: </pmc/articles/PMC4947105/?report=abstract>
51. Klein CA, Hölzel D. Systemic Cancer Progression and Tumor Dormancy. *Math Model Meet Single Cell Genomics, Cell Cycle* [Internet]. 2006 [cited 2020 Jun 28];5:1788–98. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kccy20>
52. Banys-Paluchowski M, Reinhardt F, Fehm T. Disseminated Tumor Cells and Dormancy in Breast Cancer Progression. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. Springer; 2020 [cited 2020 Jun 28]. p. 35–43. Available from: [https://link-springer-com.proxy.kib.ki.se/chapter/10.1007/978-3-030-35805-1_3](https://link.springer-com.proxy.kib.ki.se/chapter/10.1007/978-3-030-35805-1_3)
53. Hartkopf AD, Banys M, Meier-Stiegen F, Hahn M, Röhm C, Hoffmann J, et al. The HER2 status of disseminated tumor cells in the bone marrow of early breast cancer patients is independent from primary tumor and predicts higher risk of relapse. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2013 Apr 15 [cited 2020 Jun 28];138(2):509–17. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10549-013-2470-9>

54. Stoecklein NH, Klein CA. Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis [Internet]. Vol. 126, International Journal of Cancer. Int J Cancer; 2010 [cited 2020 Jun 28]. p. 589–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19795462/>
55. Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. N Engl J Med [Internet]. 2000;342(8):525–33. Available from: <file:///C:/Users/Ulrike/Documents/Citavi 6/Projects/Drarbeit/Citavi Attachments/Braun, Pantel et al. 2000 - Cytokeratin-positive cells in the bone.pdf>
56. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. N Engl J Med. 2005;353(8):793–802.
57. Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients [Internet]. Vol. 123, International Journal of Cancer. Int J Cancer; 2008 [cited 2020 Jun 28]. p. 1991–2006. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18712708/>
58. Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, et al. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. Clin Cancer Res [Internet]. 2004 Aug 15 [cited 2020 Jun 28];10(16):5342–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15328170/>
59. Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. J Clin Oncol [Internet]. 2003 Sep 15 [cited 2020 Jun 28];21(18):3469–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12972522/>
60. Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: Results of a 3-year median follow-up. Br J Cancer [Internet]. 1994 [cited 2020 Jun 28];69(3):566–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7510120/>

61. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, van Loo P, Greenman C, Wedge DC, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* [Internet]. 2012;486(7403):400–4. Available from: [file:///C:/Users/Ulrike/Documents/Citavi6/Projects/Drarbeit/Citavi Attachments/nature11017.pdf](file:///C:/Users/Ulrike/Documents/Citavi6/Projects/Drarbeit/Citavi%20Attachments/nature11017.pdf)
62. Loberg RD, Bradley DA, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Pienta KJ. The Lethal Phenotype of Cancer: The Molecular Basis of Death Due to Malignancy. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2020 Jun 27];57(4):225–41. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/canjclin.57.4.225>
63. Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 Apr 13 [cited 2020 Jul 2];96(8):4494–9. Available from: </pmc/articles/PMC16360/?report=abstract>
64. Klein CA, Blankenstein T, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* [Internet]. 2002 Aug 31 [cited 2020 Jul 2];360(9334):683–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12241875/>
65. Polzer B, Medoro G, Pasch S, Fontana F, Zorzino L, Pestka A, et al. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med*. 2014 Nov;6(11):1371–86.
66. Hoffmann M, Pasch S, Schamberger T, Maneck M, Möhlendick B, Schumacher S, et al. Diagnostic pathology of early systemic cancer: *ERBB2* gene amplification in single disseminated cancer cells determines patient survival in operable esophageal cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2018 Feb 15 [cited 2020 Jul 20];142(4):833–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.31108>
67. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2001 [cited 2020 Jul 1];29(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55695/>
68. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1977 [cited 2020 Jul 1];74(12):5463–7. Available

from: /pmc/articles/PMC431765/?report=abstract

69. Czyz ZT, Hoffmann M, Schlimok G, Polzer B, Klein CA. Reliable single cell array CGH for clinical samples. *PLoS One*. 2014;
70. Deangelis MM, Wang DG, Hawkins TL. Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Res*. 1995;23(22):4742–3.
71. Demeulemeester J, Kumar P, Møller EK, Nord S, Wedge DC, Peterson A, et al. Tracing the origin of disseminated tumor cells in breast cancer using single-cell sequencing. *Genome Biol* [Internet]. 2016;17(1):250. Available from: file:///C:/Users/Ulrike/Documents/Citavi 6/Projects/Drarbeit/Citavi Attachments/13059_2016_Article_1109.pdf
72. Hartkopf AD, Brucker SY, Taran FA, Harbeck N, von Au A, Naume B, et al. Disseminated tumour cells from the bone marrow of early breast cancer patients: Results from an international pooled analysis. *Eur J Cancer*. 2021;154:128–37.
73. Hosseini H, Obradovic MMS, Hoffmann M, Harper KL, Sosa MS, Werner-Klein M, et al. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature*. 2016;540(7634):552–8.
74. Werner-Klein M, Grujovic A, Irlbeck C, Obradović M, Hoffmann M, Koerkel-Qu H, et al. Interleukin-6 trans-signaling is a candidate mechanism to drive progression of human DCCs during clinical latency. *Nat Commun*. 2020;11(1).
75. Narod SA, Iqbal J, Giannakeas V, Sopik V, Sun P. Breast cancer mortality after a diagnosis of ductal carcinoma in situ. *JAMA Oncol*. 2015;1(7):888–96.
76. Walter V et al. No Title. In: Detection of disseminated tumor cells in DCIS patients impacts local recurrence. 2017. p. Abstract P1-01-16.
77. Narod SA, Sopik V. Countercurrents: DCIS or Cancer? Why All the Confusion? *Curr Oncol*. 2022;29(7):4936–40.
78. Narod SA, Sopik V. Is invasion a necessary step for metastases in breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2018;169(1):9–23. Available from:

<https://doi.org/10.1007/s10549-017-4644-3>

79. Becker S, Solomayer E, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Fehm T. Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;106(2):239–43.
80. Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, et al. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer.* 2005;103(5):884–91.
81. Riethdorf S, Pantel K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: Current state of detection and characterization [Internet]. Vol. 75, *Pathobiology*. Pathobiology; 2008 [cited 2020 Jun 28]. p. 140–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18544969/>
82. Escot C, Theillet C, Lidereau R, Spyrtos F, Champeme MH, Gest J, et al. Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(13):4834–8.
83. Baluapuri A, Wolf E, Eilers M. Europe PMC Funders Group Target-gene independent functions of MYC oncogenes. 2021;21(5):255–67.
84. Deming SL, Nass SJ, Dickson RB, Trock BJ. C-myc amplification in breast cancer : a meta-analysis of. 2000;83:1688–95.
85. Schlotter CM, Vogt U, Bosse U, Mersch B, Waßmann K. C-myc, not HER-2/neu, can predict recurrence and mortality of patients with node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2003;5(2):30–6.
86. Park K, Kwak K, Kim J, Lim S, Han S. c-myc amplification is associated with HER2 amplification and closely linked with cell proliferation in tissue microarray of nonselected breast cancers. *Hum Pathol.* 2005;36(6):634–9.
87. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science (80-)* [Internet]. 1986 Jun 27;232(4758):1644 LP – 1646. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/232/4758/1644.abstract>

88. Olayioye MA. Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res.* 2001;3(6):385–9.
89. Dey N, De P, Leyland-Jones B. PI3K-AKT-mTOR inhibitors in breast cancers: From tumor cell signaling to clinical trials. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2017;175:91–106. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.037>
90. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* (80-) [Internet]. 1987 Jan 9;235(4785):177 LP – 182. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/235/4785/177.abstract>
91. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast.* 2015;24:S26–35.
92. Hurvitz SA, Martin M, Symmans WF, Jung KH, Huang C-S, Thompson AM, et al. Neoadjuvant trastuzumab, pertuzumab, and chemotherapy versus trastuzumab emtansine plus pertuzumab in patients with HER2-positive breast cancer (KRISTINE): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018 Jan;19(1):115–26.
93. Sekeres MA. Neoadjuvant Pertuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2013;11(12):799–800.
94. von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E, Zardavas D, Benyunes M, Viale G, et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2017/06/05. 2017 Jul 13;377(2):122–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28581356>
95. Turner N, Pearson A, Sharpe R, Lambros M, Geyer F, Lopez-Garcia MA, et al. FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* 2010;70(5):2085–94.
96. Dey JH, Bianchi F, Voshol J, Bonenfant D, Oakeley EJ, Hynes NE. Targeting fibroblast growth factor receptors blocks PI3K/AKT signaling, induces apoptosis, and impairs mammary tumor outgrowth and metastasis. *Cancer Res.* 2010;70(10):4151–62.

97. Barnes DM, Gillett CE. Cyclin D1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;52(1–3):1–15.
98. Gillett C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, et al. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res.* 1994 Apr;54(7):1812–7.
99. Ravikumar G, Ananthamurthy A. Cyclin D1 expression in ductal carcinoma of the breast and its correlation with other prognostic parameters. *J Cancer Res Ther.* 2014;10(3):671–5.
100. Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, Yoshida H. Overexpression of cyclinD1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2002;98(3):415–8.
101. Kenny FS, Hui R, Musgrove EA, Gee JM, Blamey RW, Nicholson RI, et al. Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 1999 Aug;5(8):2069–76.
102. Mohammadizadeh F, Hani M, Ranaee M, Bagheri M. Role of cyclin D1 in breast carcinoma. *J Res Med Sci Off J Isfahan Univ Med Sci.* 2013 Dec;18(12):1021–5.
103. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science.* 1994 Nov;266(5186):807–10.
104. Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(5):1–12.
105. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991 Jul;253(5015):49–53.
106. Olivier M, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(4):1157–67.
107. Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Pétré A, Mounawar M, Plymoth A, et al. Recent

- advances in p53 research: An interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther.* 2009;16(1):1–12.
108. Petitjean A, Achatz MIW, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: Functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene.* 2007;26(15):2157–65.
 109. Fresno Vara JÁ, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004;30(2):193–204.
 110. Volinia S, Hiles I, Ormondroyd E, Nizetic D, Antonacci R, Rocchi M, et al. Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110 α (PIK3CA) gene. Vol. 24, *Genomics.* 1994. p. 472–7.
 111. Martínez-Saéz O, Chic N, Pascual T, Adamo B, Vidal M, González-Farré B, et al. Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2020;22(1):1–9.
 112. Campbell IG, Russell SE, Choong DYH, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CSF, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res.* 2004;64(21):7678–81.
 113. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther.* 2004;3(8):772–5.
 114. Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, Janakiraman V, Bhatt D, Stern HM, et al. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature.* 2010;466(7308):869–73.
 115. Magbanua MJM, Rugo HS, Hauranieh L, Roy R, Scott JH, Lee JC, et al. Genomic and expression profiling reveal molecular heterogeneity of disseminated tumor cells in bone marrow of early breast cancer. *npj Breast Cancer* [Internet]. 2018;4(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41523-018-0083-5>
 116. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L, Cotrupi S, Barassi F, Del Grammastro M, et al.

- Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2007;13(20):6064–9.
117. Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, Pietenpol JA. Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. *Cancer.* 2015;121(1):8–16.
 118. Mangone FR, Bobrovnitchaia IG, Salaorni S, Manuli E, Nagai MA. PIK3CA exon 20 mutations are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Clinics.* 2012;67(11):1285–90.
 119. Pang B, Cheng S, Sun SP, An C, Liu ZY, Feng X, et al. Prognostic role of PIK3CA mutations and their association with hormone receptor expression in breast cancer: A meta-analysis. *Sci Rep.* 2014;4:1–9.
 120. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA -Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer . *N Engl J Med.* 2019;380(20):1929–40.
 121. Ståhlberg A, Kubista M. Technical aspects and recommendations for single-cell qPCR. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2018;59:28–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.07.004>
 122. Ferrarini A, Forcato C, Buson G, Tononi P, Del Monaco V, Terracciano M, et al. A streamlined workflow for single-cells genome-wide copy-number profiling by low-pass sequencing of LM-PCR whole-genome amplification products. *PLoS One* [Internet]. 2018;13(3):e0193689. Available from: [file:///C:/Users/Ulrike/Documents/Citavi6/Projects/Drarbeit/Citavi Attachments/Low Pass Manarezi.pdf](file:///C:/Users/Ulrike/Documents/Citavi6/Projects/Drarbeit/Citavi%20Attachments/Low%20Pass%20Manarezi.pdf)
 123. Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, Schubert F, Schmidt-Kittler O, Fuhrmann C, et al. Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell.* 2005;8(3):227–39.

9. Danksagung

Ich möchte mich bei der AG Klein unter Leitung von Professor Christoph Klein für die Durchführung der Dissertation bedanken. Insbesondere für den technischen, den intellektuellen Support und die wohltuenden Kaffeepausen bin ich sehr dankbar. Die Arbeit in der AG hat mich in die faszinierende Welt der Wissenschaft eingeführt und mir die nötigen Mittel zur Umsetzung dieses Projekt gewährt.

Am meisten möchte ich Dr. rer. nat. Elisabeth Schneider für die Betreuung und die Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit danken. Weiterhin möchte ich Oliver Schmidt für seine Hilfe bei der qPCR und der Mutationsanalyse bedanken. Ebenso möchte ich mich bei Zbigniew Czyz und Selina Waldbauer für die Hilfe bei der Fertigstellung des Lowpass-Sequencing bedanken. Auf den technischen Support in Zeiten der Frustration von Tom, Isa, Irene, Theresa und Manni war immer Verlass. Vielen vielen Dank dafür. Genauso sehr bin ich meiner Familie und Freunden für den Rückhalt und die Geduld während der Erstellung dankbar.

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Name (Unterschrift)