

Untersuchungen zur genetischen Heterogenität  
einzelner Tumorzellen von Kopf-Hals-  
Karzinomen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Bianca Behrens

aus Düsseldorf

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des  
Universitätsklinikums der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-  
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Nikolas H. Stoecklein

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 19. November 2015

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	3
1.1	Inzidenz des Kopf-Hals-Karzinoms .....	3
1.2	Molekulare Pathogenese des Kopf-Hals-Karzinoms .....	5
1.2.1	Diagnostik und Klassifikation des Kopf-Hals-Karzinoms .....	8
1.2.2	Therapie des Kopf-Hals-Karzinoms .....	9
1.3	Zytogenetik des Kopf-Hals-Karzinoms.....	10
1.4	Tumorevolution und -progression .....	13
1.5	Genetische Heterogenität in Primärtumoren und Metastasen.....	14
1.6	Einzelzell-PCR.....	18
1.7	Genomische Analysen an Einzelzell-Amplifikaten.....	20
2	Ziele der Arbeit.....	22
3	Materialien und humane Gewebe .....	24
1.1.	Einwegartikel und Kunststoffgefäße .....	24
3.1	Humane Tumorproben für Einzelzell-Analysen .....	24
3.2	Zelllinien .....	25
3.3	Chemikalien, Enzyme, Puffer, Geräte und Oligonukleotide.....	26
3.3.1	Fertige Puffer .....	26
3.3.2	Selbst hergestellte Puffer.....	26
3.3.3	Primärantikörper für indirekte Färbungen .....	27
3.3.4	Sekundärantikörper .....	27
3.3.5	Direkt konjugierte Antikörper .....	27
3.3.6	Enzyme .....	28
3.3.7	DNA-Sonden.....	28
3.3.8	Kit-Systeme .....	28
3.3.9	Microarrayplattform.....	28
3.3.10	Chemikalien.....	29
3.4	Geräteliste .....	30
3.4.1	Pipetten.....	30
3.4.2	Zentrifugen.....	30

3.4.3	Thermocycler .....	30
3.4.4	Sterilbänke .....	30
3.4.5	Heizblöcke, Heizbäder und Inkubatoren.....	30
3.4.6	Kühl- und Gefrierschränke .....	31
3.4.7	Messgeräte.....	31
3.4.8	Mikroskope .....	31
3.4.9	Sonstiges .....	31
3.5	Software .....	31
4	Methoden.....	33
4.1	Untersuchte Gewebe .....	33
4.2	Zellkultur.....	33
4.2.1	Kultivierung von HNSCC-Zelllinien .....	33
4.2.2	Kultivierung der REH, mLCL und wLCL Zelllinie.....	34
4.2.3	Short Tandem Repeat (STR)-Analyse .....	34
4.2.4	Herstellung von Positivkontrollen für die Immunfluoreszenzfärbung.....	35
4.3	Herstellung von Einzelzellsuspensionen von HNSCC-Präparaten .....	35
4.3.1	Herstellung von Einzelzellpräparaten aus Frischgewebe für Einzelzellisolierung mittels Mikromanipulation.....	35
4.3.2	Herstellung von Präparaten aus Frischgewebe für die Einzelzellisolation mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS).....	36
4.4	DNA-Isolation aus FFPE-Präparaten .....	37
4.4.1	Schneiden der Gewebe .....	37
4.4.2	Hämalaun- und Eosin-Färbung (HE).....	37
4.4.3	Gill-Färbung.....	38
4.4.4	Isolation von Tumorgewebe per manueller Makrodissektion und anschließende DNA-Isolation.....	38
4.5	Immunzytochemie.....	39
4.5.1	CD44v6 und CK 5/14 als Marker für Plattenepithelkarzinome.....	39

4.5.2	Immunhistochemische Färbung von CD44v6 und CK 5/14 an HNSCC-FFPE Gewebeschnitten .....	39
4.6	Identifizierung und Isolierung einzelner positiv markierten Zellen mit dem Mikromanipulator .....	41
4.6.1	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CD44v6 und CK 5/14.....	41
4.7	Isolierung einzelner mononukleärer Zellen aus Blut .....	44
4.8	Amplifikation von Einzelzellgenomen .....	45
4.8.1	Protein-Verdau .....	45
4.8.2	<i>Mse</i> I-Restriktionsverdau .....	45
4.8.3	Hybridisierung der Adapter.....	46
4.8.4	Ligation.....	46
4.8.5	Adapter-Linker-PCR.....	47
4.8.6	Multiplex-PCR.....	47
4.8.7	Gelelektrophorese .....	49
4.9	aCGH .....	49
4.9.1	Fluoreszenzmarkierung der Einzelzellamplifikate für aCGH.....	50
4.9.2	Vorbereitung der fluoreszenzmarkierten Einzelzellamplifikate für die Hybridisierung .....	52
4.9.3	Präparation genomischer DNA für aCGH-Analysen.....	52
4.9.4	Hybridisierung der Proben und Waschen des CGH-Arrays.....	54
4.9.5	Scannen des CGH-Arrays.....	54
4.9.6	Datenextraktion und Datenvorbehandlung.....	55
4.9.7	Detektion von Bruchpunkten und Bestimmung der Kopienanzahlveränderung bei Einzelzellgenomen und Zelllinien DNA.....	56
4.9.8	Filter-Einstellungen und Array-Auflösung.....	58
4.9.9	Visualisierung .....	59
4.9.10	Erstellen von "Receiver Operating Characteristic" -Kurven.....	60
4.9.11	Individuelle und gemeinsame Aberrationen .....	60
4.9.12	Heterogenitäts-Index .....	60
4.9.13	Bestimmung angereicherter SCNA in den Metastasenzellen.....	61

4.9.14	Filtern von Genen in der Region 8q24 .....	62
4.10	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	62
4.10.1	Herstellung eines HNSCC Tissue-Micro-Array (TMA).....	62
4.10.2	FISH zur Validierung von SCNA bei 7p12 ( <i>EGFR</i> ), 8q24.1 ( <i>MYC</i> ), 9p21 ( <i>CDKN2A</i> ) und 11q13 ( <i>CCND1</i> ).....	62
4.10.3	FISH zur Darstellung des <i>ASAP1</i> -Genlokus.....	64
4.10.4	Auswertung und Statistik der FISH-Experimente.....	66
4.11	mRNA-Expressionsanalyse.....	67
4.11.1	Datenauswertung des Expressionsarrays .....	68
4.12	Migrations- und Proliferations- Assay für <i>ASAP1</i> an der HNSCC- Metastasen-Zelllinie UM-SCC-22B .....	69
	Patientenkollektiv .....	71
5	Ergebnisse .....	72
5.1	Detektion und Isolation epithelialer Tumorzellen in Gewebe- Suspensionen .....	72
5.2	Qualitätsüberprüfung der Einzelzellgenom-Amplifikate .....	74
5.3	Einzelzell-aCGH Analyse .....	75
5.3.1	Qualitätsüberprüfung und Reproduzierbarkeit sowie Sensitivität und Spezifität der Einzelzell-aCGH-Methode.....	75
5.3.2	Überprüfung der aCGH-Hybridisierungsqualität der HNSCC- Einzelzellamplifikate.....	78
5.4	SCNA der HNSCC-Einzelzellen.....	80
5.5	Fallweise Beschreibung SCNA-Profile.....	81
5.6	Vergleichende Analyse der SCNA innerhalb und zwischen Primärtumoren und Metastasen .....	91
5.6.1	Grad der Heterogenität zwischen Primärtumoren und Metastasen	91
5.7	Suche nach selektierten SCNA in Metastasenzellen .....	92
5.8	Überprüfung der Frequenz von <i>MYC</i> - und <i>ASAP1</i> - Zugewinnen an einem HNSCC Kollektiv mittels FISH.....	96

5.9	Genexpressionsanalyse von Primärtumoren und Metastasen auf der 8q24 lokalisierten Gene .....	99
5.10	Funktionelle Untersuchungen von <i>ASAP1</i> an UM-SCC Kopf-Hals-Tumor Zelllinien .....	101
5.10.1	Untersuchung der <i>ASAP1</i> -Expression in HNSCC-Zelllinien .....	103
5.10.2	<i>ASAP1</i> als Faktor für die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen ...	104
6	Diskussion.....	106
6.1	Identifizierung von Tumorzellen .....	107
6.2	Einzelzell-WGA und aCGH .....	109
6.2.1	Qualitätsparameter und Auswahlkriterien .....	112
6.3	Ausmaß der genetischen Heterogenität in Kopf-Hals-Karzinomen .....	113
6.4	Selektion eines bestimmten Genotyps während der Metastasierung	116
6.4.1	Analyse der mRNA-Expression der identifizierten Gene auf 8q24	120
6.4.2	Die Funktion von <i>ASAP1</i> .....	123
6.5	Schlussfolgerung.....	125
6.6	Ausblick.....	126
7	Zusammenfassung .....	129
8	Abstract .....	130
9	Literaturverzeichnis.....	131
10	Appendix .....	151
11	Danksagung.....	155
12	Lebenslauf .....	157
13	Publikationen und Auszeichnungen.....	158
14	Präsentationen.....	159

## Abkürzungsverzeichnis

aCGH	Array Comparative Genomic Hybridization
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CEP	Chromosomal Enumeration Probe
CK	Cytokeratin
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
DAPI dest.	4',6-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid destilliert
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Minimum Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fötale Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
h	Stunde
hc	high concentrated
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HRP	Horse Radish Peroxidase
LCL	Lymphozyten Zelllinie

m	männlich
MeOH	Methanol
min	Minute
mRNA	messenger-RNA
NGS	Next-Generation-Sequencing
nm	Nanometer
OT	Objektträger
OPA	One-Phor-All Puffer
PBS	Phosphat-buffered-Saline
PBMNC	Peripheral-Blood-Mono-Nuclear-Cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
rpm	rounds per minute
sec	Sekunde
SCC	Squamous Cell Carcinoma"
SDS	Sodium-dodecyl-sulfate
SCNA	Somatic Copy Number Alteration
SSC	Saline-Sodiumcitrat
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	Tris-Buffered-Saline
TBST	Tris-Buffered-Saline & Tween
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
UD	Universität Düsseldorf
UM	Universität Michigan
v. PEC	verhornendes Plattenepithelkarzinom
w	weiblich

# 1 Einleitung

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCC, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) können in der Mundhöhle, im Oropharynx, im Larynx oder im Hypopharynx entstehen. Das Kopf-Hals-Karzinom ist die sechst häufigste Krebserkrankung weltweit und wird überwiegend durch exogen zugeführte Noxen verursacht (Koch *et al*, 2009). Histologisch sind Kopf-Hals-Karzinome in ca. 90% der Fälle Plattenepithelkarzinome (Rothenberg & Ellisen, 2012).

## 1.1 Inzidenz des Kopf-Hals-Karzinoms

Das Kopf-Hals-Karzinom zählt mit einem weltweiten Auftreten von ca. 650.000 Fällen und 350.000 Toten pro Jahr (Parkin *et al*, 2005) zu den häufigsten und aggressivsten Tumorarten. Unbehandelt führt das Kopf-Hals-Karzinom ausnahmslos zum Tod der Patienten, welche durch Ersticken, Tumorarrosionsblutungen oder allgemeine Tumorkachexie versterben. Zwei Drittel der Betroffenen stammen aus den Industrienationen. Etwa 5% aller malignen



Tumoren betreffen die Mundhöhle mit den Lokalisationen nicht-keratinisiertes-Lippenrot, Vestibulum, Alveolarfortsatz,

**Abbildung 1.1:** Mundhöhlen-Karzinom des linken Unterkieferalveolarfortsatzes (C03.1L) von Patient #170.

Mundboden, Zunge, harter und weicher Gaumen sowie Wange (Abb. 1.1). Kopf-Hals-Karzinome treten am häufigsten in der sechsten und siebten Lebensdekade auf. Besonders Männer (weltweit ca. 7500/Jahr) sind hiervon betroffen, aber auch Frauen erkranken immer häufiger an Kopf-Hals-Karzinomen (Barnes, 2005; Stransky *et al*, 2011). Die Inzidenz des Kopf-Hals-Karzinoms unterliegt starken regionalen Schwankungen: so ist sie im Bereich des Kehlkopfes und des

Hypopharynx besonders hoch bei Männern in Süd- und Mitteleuropa, in einigen Teilen von Südamerika und unter der schwarzen Bevölkerung in den Vereinigten Staaten. Besonders niedrige Inzidenzen dagegen sind in Süd-Ost-Asien und Zentralafrika zu finden. Die Krankheit ist im städtischen Raum etwas häufiger als in ländlichen Gebieten (Barnes *et al*, 2005).

Die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung des Kopf-Hals-Karzinoms sind Nikotin- und Alkoholabusus, insbesondere bei kombiniertem Genuß (Benhamoui *et al*, 1992). Rauchgewohnheiten, wie das Rauchen von schwarzem Tabak (im Vergleich zu hellem Tabak), Rauchen in jungen Jahren, eine hohe Anzahl der täglich konsumierten Zigaretten und tiefe Inhalation des Rauches erhöhen das Risiko der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen (Benhamou *et al*, 1992).

Durch Alkohol- und Nikotinkarenz könnten umgekehrt schätzungsweise etwa 90% der Kopf-Hals-Karzinome, vor allem im Bereich Kehlkopfs und des Hypopharynx, verhindert werden. Der Konsum von Kautabak ist eine Hauptursache von oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen auf dem indischen Subkontinent, Teilen von Süd-Ost-Asien, in China und Taiwan (Znaor *et al*, 2003). In Indien verursacht das Kauen von Tabak knapp 50% der Mundhöhlen- und Rachen-Tumoren bei Männern und sogar über 90 % bei den Frauen (Barnes *et al*, 2005).

Ein weiteres wesentliches Risiko für die Entwicklung von Kopf-Hals-Karzinomen ist der Alkoholkonsum (La Vecchia *et al*, 1999). So steigt das Risiko für die Entwicklung eines Kopf-Hals-Karzinoms mit der Menge an täglich konsumiertem Alkohol linear an. Der gleichzeitige übermäßige Konsum hochprozentigen Alkohols (in Form von Bränden, Wein und Spirituosen), der hierbei als Lösungsmittel für die im Zigarettenrauch befindlichen Kanzerogene dient, verstärkt die Wirkung des Nikotinabusus überproportional (La Vecchia *et al*, 1999; Pelucchi *et al*, 2003). Umgekehrt ist beschrieben worden, dass eine Ernährung mit viel frischem Obst und Gemüse eine protektive Wirkung haben kann (Pelucchi *et al*, 2003).

Einige berufliche Belastungen können ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Kopf-Hals-Karzinoms, insbesondere des Kehlkopfs, in Verbindung gebracht werden: z.B. durch Metallstaub, Zementstaub oder Lacke. Signifikante Assoziationen wurden auch bei ionisierender Strahlung, Dieselabgasen, Schwefelsäure und Senfgas (Barnes *et al*, 2005) nachgewiesen. Eine Subgruppe von Kopf-Hals-Karzinomen, vor allem im Bereich des Oropharynx und Zungengrundes, wird durch die Hochrisikotypen des Humanen Papilloma-Virus (HPV), insbesondere HPV-16 und -18, verursacht. Eine Übertragung dieser Viren geschieht v.a. durch oralen Geschlechtsverkehr. Die Kopf-Hals-Karzinome, welche durch HPV verursacht sind, werden heute als eine eigene klinikopathologische und molekulare Tumorentität betrachtet (Leemans *et al*, 2011).

In der westlichen Welt nimmt die Inzidenz von Kopf-Hals-Karzinomen, vor allem im Bereich des Zungengrundes und des Oropharynx zu, was in Zusammenhang mit einer Erhöhung der oralen und oropharyngealen Human Papilloma-Virus (HPV)-Infektionsrate stehen könnte (Leemans *et al*, 2011).

## **1.2 Molekulare Pathogenese des Kopf-Hals-Karzinoms**

Das Kopf-Hals-Karzinom ist eine heterogene Erkrankung, die mindestens in zwei verschiedene ätiologische Unterklassen eingeteilt werden kann: Tumore, die durch Infektion mit Hochrisiko-HPV-Typen hervorgerufen werden und diejenigen, die unabhängig von einer HPV-Infektion durch die klassischen Risikofaktoren entstehen. Etwa 20% aller Kopf-Hals-Karzinome enthalten ein transkriptionell aktives HPV, weitere 60% weisen eine *TP53*-Mutation auf und die verbleibenden 20% der Kopf-Hals-Karzinome haben Mutationen in Genen, welche entweder den p53-Signalweg betreffen oder unabhängig von diesem sind (Wilting *et al*, 2009). In den Zellgenomen der betroffenen Schleimhäute konnte eine erhöhte Frequenz von Guanin→Thymin Transversionen (eine Punktmutation, bei der eine Pyrimidinbase gegen eine Purinbase ausgetauscht wird oder umgekehrt) im

*TP53*-Gen als Folge der krebserzeugenden Wirkung des Rauchens beschrieben werden (Barnes *et al*, 2005).

Insgesamt gibt es viele verschiedene Subtypen von HPV, von denen nur einige an der Karzinogenese von Tumoren beteiligt sind und als Hochrisiko-HPV-Typen bezeichnet werden (z.B. HPV-16 und -18) (Moody & Laimins, 2010; zur Hausen, 2002). Das für Kopf-Hals-Karzinome relevante Humane Papilloma-Virus (HPV) ist ein streng epitheliotropes, zirkuläres doppelsträngiges DNA-Virus.

HPV-positive Kopf-Hals-Karzinome unterscheiden sich in ihrem molekularen Profil von HPV-negativen Kopf-Hals-Karzinomen und haben eher molekulare Ähnlichkeiten mit HPV-positiven Cervixkarzinomen (Marur & Forastiere, 2010). Die meisten HPV-induzierten Kopf-Hals-Karzinome werden durch den HPV-16-Subtyp verursacht. Für die Hochrisiko HPV-Subtypen konnte belegt werden, dass deren viralen Onkoproteine E6 und E7 orale Epithelzellen transformieren können. Das E6-Protein induziert den Abbau von p53 über eine Ubiquitin-vermittelte Proteolyse, was zu einem erheblichen Verlust der p53-Aktivität führen kann. Eine wichtige Funktion von p53 ist, Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus zu arretieren, um so Zeit für die DNA-Reparatur zu gewinnen oder nach einer bestimmten Zeitspanne den programmierten Zelltod, die Apoptose, zu induzieren. E6-exprimierende Zellen sind nicht in der Lage, die p53-vermittelte Zellantwort nach einer DNA-Schädigung zu aktivieren und sind damit anfällig für genomische Instabilität. Das E7-Protein bindet und inaktiviert das Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein pRB, was eine Störung des Zellzyklus zur Folge hat und der (evtl. bereits chromosomal instabilen) Zelle ermöglicht, in die S-Phase einzutreten (Molden *et al*, 2007; Syrjanen *et al*, 2011; Temam *et al*, 2007).

Für Kopf-Hals-Karzinome, die durch Alkohol- und Tabakkonsum induziert wurden, sind hingegen *TP53*-Mutationen charakteristisch. Ein weiteres, bei HPV-negativen Tumoren verändertes Gen ist *CCND1*, welches *Cyclin-D1* kodiert. Dieses Onkogen ist in mehr als 80% aller HPV-negativen Kopf-Hals-Karzinome amplifiziert oder mindestens zugewonnen. Ebenfalls häufig betroffen ist Tumorsuppressorgen *CDKN2A* (kodiert p16), welches durch Mutationen,

homozygote Deletionen oder Promotor-Hypermethylierung inaktiviert werden kann (Barnes *et al*, 2005). Auch das kodierende Gen für den „Epidermal Growth Factor Receptor“ (*EGFR*) ist in vielen Kopf-Hals-Karzinomen überexprimiert (Hama *et al*, 2009). *EGFR* ist ein Tyrosin-Kinase-Transmembran-Rezeptor, welcher den Zelloberflächenrezeptoren der ErbB-Familie angehört. Der Rezeptor selbst besteht aus einem Heterodimer, der sich aus Mitgliedern der ErbB-Familie zusammensetzt. Die Kinase-Domäne von *EGFR* kann durch eine Transautophosphorylierung die Tyrosinreste anderer Rezeptoren aktivieren und in gleicher Weise kann die *EGFR*-Domäne wiederum auch selbst aktiviert werden (Bae & Schlessinger, 2010). Die Heterodimerisierung des *EGFR*-Rezeptors führt zu einer Stimulierung der Kinaseaktivität und einer verstärkten Autophosphorylierung (Bae & Schlessinger, 2010). Einmal phosphoryliert bzw. aktiviert, kann der *EGFR*-Rezeptor den MAPK, Akt, ERK und Jak/STAT-Signalweg antreiben. Die ungesteuerte Aktivität dieser Signalwege kann das maligne Potential von Zellen vorantreiben, da sie Zellproliferation und die Invasivität der Zellen erhöhen können (Oda *et al*, 2005). Die Hyperaktivität dieses Rezeptors und seiner assoziierten Signalwege sind in 80-90% der Kopf-Hals-Karzinome zu beobachten (Kalyankrishna & Grandis, 2006). Mutationen und Amplifikationen von *EGFR* sind in 10-30% der Fälle nachgewiesen worden (Sheu *et al*, 2009; Temam *et al*, 2007). Interessanterweise hat sich gezeigt, dass mikroskopisch normal erscheinende Schleimhaut in Nachbarschaft zu invasivem Plattenepithelkarzinom-Gewebe eine starke Überexpression und Hochregulierung von *EGFR* in der Phase der Transformation von der Dysplasie zum Karzinom aufzeigen kann (Grandis & Tweardy, 1993; Shin *et al*, 1994). Der Nachweis einer erhöhten *EGFR*-Expression wird mit einer schlechten klinischen Prognose in Verbindung gebracht (Chung *et al*, 2004; Temam *et al*, 2007). Ein Zugewinn der *EGFR* Kopienanzahl ist beim Kopf-Hals-Karzinom ebenfalls mit einer ungünstigen Prognose korreliert (Chung *et al*, 2006).

### 1.2.1 Diagnostik und Klassifikation des Kopf-Hals-Karzinoms

Die Diagnostik des Kopf-Hals-Karzinoms umfasst neben der klinischen Untersuchung auch bildgebende Maßnahmen wie die Ultraschalldiagnostik, Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT), Röntgen-Thorax oder CT-Thorax. Zusätzlich kann bei besonderer Indikationsstellung die Kombination von Positronen-Emissions-Tomographie und Computertomographie (PET/CT) zur Anwendung kommen (Koch *et al*, 2008).

Die pathologische Beurteilung und das Staging zum Zeitpunkt der Diagnose sind die wichtigsten prognostischen Indikatoren beim Kopf-Hals-Karzinom. Nach ihrem Differenzierungsgrad unterscheidet man Tumoren, die gut (G1), mäßig (G2), schlecht differenziert (G3) oder entdifferenziert (G4) sind (Wittekind, 2010). Für eine pathologische Klassifikation werden die Tumore in die pTNM-Klassifikation eingeteilt, welche die Tumorgröße, die Infiltration in Nachbarorgane und die Tiefeninfiltration beschreibt. Das Präfix „p“ steht für die „pathologische“ Klassifikation. „T“ steht für die Größe und Ausdehnung des Primärtumors, „N“ für die Anzahl der befallenen regionalen Lymphknoten und „M“ beschreibt das Vorhandensein von Fernmetastasen (Wittekind, 2010).

**Tabelle 1.1:** pTNM-Klassifikation von Kopf- und Halstumoren im Bereich der Lippen und Mundhöhle (Quelle: Wittekind und Meyer, 2010).

pTNM	Beschreibung
pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
pT4a	Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen, in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut

pT4b	Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna
pNx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten (Lk), 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pN2a	solitäre ipsilaterale Lk > 3 cm, aber < 6 cm
pN2b	multiple ipsilaterale Lk < 6 cm
pN2c	bi-/kontralaterale Lk < 6 cm
pN3	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
pMx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

### 1.2.2 Therapie des Kopf-Hals-Karzinoms

Die Therapie des Kopf-Hals-Karzinoms ist abhängig von der Größe und Lage des Primärtumors, dem Allgemeinzustand des Patienten und dem zu erwartenden Behandlungserfolg hinsichtlich der Morbidität und ästhetischen Folgen. Ziel der Behandlung ist eine dauerhafte bzw. möglichst lange regionäre Tumorkontrolle bei geringen funktionellen oder ästhetischen Beeinträchtigungen (Klein *et al*, 2014).

Die Standardtherapie des Kopf-Hals-Karzinoms besteht aus Chirurgie, Radiotherapie, Chemotherapie oder kombinierterer Radio-Chemotherapie für Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien. Die häufigsten angewandten Chemotherapien beinhalten Platinanaloga, z.B. Kombinationen von Cisplatin oder Carboplatin mit 5-Fluoruracil (5-FU), welche eine Therapie-Ansprechrates von 20%-40% aufweisen (Klein *et al*, 2014; Kundu & Nestor, 2012). Die bislang einzige zielgerichtete Therapie, die durch die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) und durch die European Medicines Agency (EMA) eine Zulassung zur Behandlung des Kopf-Hals-Karzinoms erhalten hat, ist die EGFR-

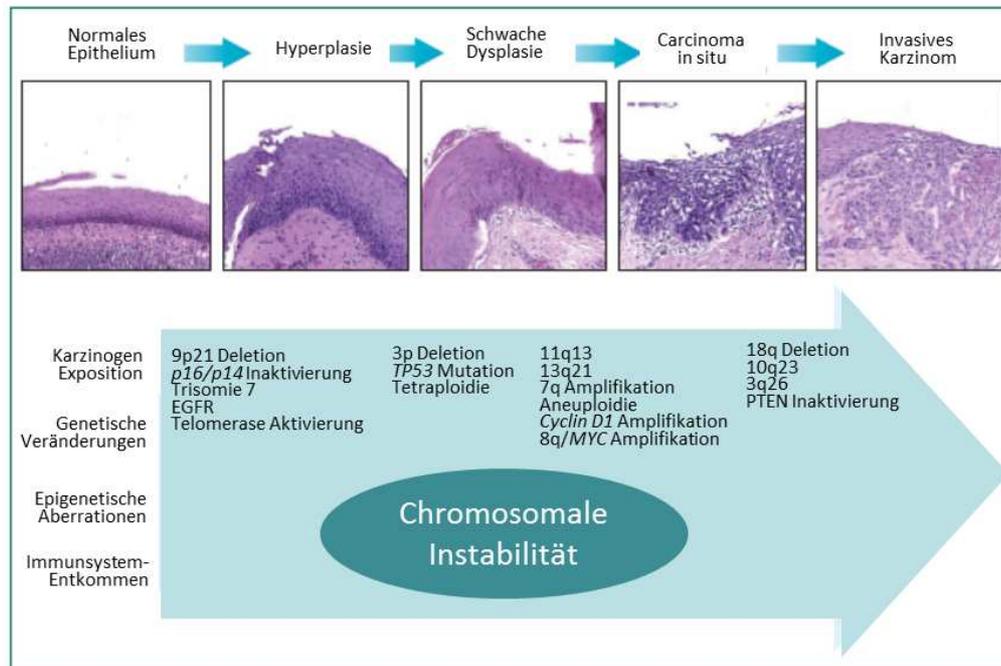
Inhibition durch Cetuximab. Viele andere Inhibitoren wie EGFR-Tyrosinase-Kinase-Inhibitoren (Gefitinib, Erlotinib), VEGFR-Inhibitoren (Bevacizumab, Vandetanib) und auch diverse Inhibitoren gegen Src-Kinasen, PARP, Proteasomen, mTOR, COX und Hitze-Schock-Proteine werden derzeit im Rahmen von klinischen Studien geprüft. Ihre Wirksamkeit ist noch so lückenhaft und inkonsistent dokumentiert, dass eine Zulassung noch in weiter Ferne scheint (Kundu & Nestor, 2012).

Insgesamt hat sich die Überlebensrate von Patienten mit HNSCC in den letzten Jahrzehnten trotz teils dramatischer Fortschritte in der chirurgischen Therapie (die Einführung der freien Lappenplastiken aus den verschiedensten Spenderarealen erlaubt heute weit ausgedehntere Resektionen) als auch in der Strahlentherapie (hier seien nur die intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT) oder die Protonentherapie genannt) nicht verbessert (Vikram *et al*, 1984; Bose *et al*, 2013). Die Erfolge in der lokalen Tumorkontrolle werden hierbei durch das jetzt vermehrt in den Vordergrund rückende Auftreten prognoserelevanter Fernmetastasen konterkariert (Kowalski *et al* 2005; Takes *et al* 2012). Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium, welche nicht systemisch erkrankt sind und deren Tumor chirurgisch entfernt werden konnte, haben eine 5-Jahres Überlebensprognose von ca. 40-50%. Bei Patienten mit einer nachgewiesenen systemischen Erkrankung wird die Standardtherapie aus Radio- und Chemotherapie in palliativer Intention durchgeführt. Es gibt derzeit keine systemisch kurativ wirksame Therapie des Kopf-Hals-Karzinoms. Gründe des Therapieversagens sind u.a., dass Kopf-Hals-Karzinome nach einem teils dramatischen Ansprechen auf systemische Therapien regelhaft in Form resistenter Rezidivtumore wieder auftreten (Argiris *et al* 2008; Rabinowits *et al* 2012).

### **1.3 Zytogenetik des Kopf-Hals-Karzinoms**

Als wichtiger Faktor, der zum aggressiven Phänotyp des Kopf-Hals-Karzinoms beiträgt, wird die chromosomale Instabilität der Tumorzellen diskutiert. Die

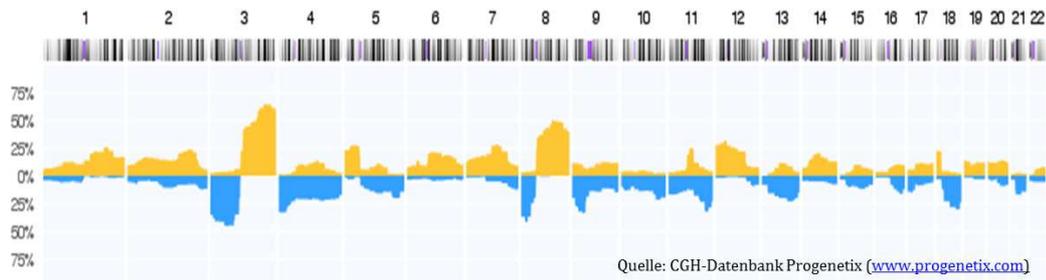
chromosomale Instabilität bei Kopf-Hals-Karzinomen äußert sich in einer erhöhten Rate von Zugewinnen und Verlusten ganzer Chromosomen oder Teile von Chromosomen. Dies führt zu einer Veränderung des Karyotyps, der von Zelle zu Zelle variieren kann (Cahill *et al*, 1999).



**Abbildung 1.2:** Darstellung der phänotypischen Progression und Ansammlung molekularer Alterationen während der Kopf-Hals Tumorgenese (modifiziert nach Argiris 2008 (Argiris *et al*, 2008)).

Es konnte gezeigt werden, dass genomische Veränderungen, die charakteristisch für frühe Stadien des Kopf-Hals-Karzinoms sind, bevorzugt bestimmte Gene treffen, welche unter anderem auf den Chromosomen 3p, 9p21 (*CDKN2A*) und 17p13 (*TP53*) lokalisiert sind. Alterationen, die in späteren Stadien des Kopf-Hals-Karzinoms auftreten sind *CCND1*-Amplifikationen, PTEN-Inaktivierung und „Loss of Heterozygosity“ (LOH) in den chromosomalen Lokalisationen 13q21, 14q32, 6p, 8q, 4q27 und 10q23 (Argiris *et al*, 2008; Hunt *et al*, 2014) (Abb. 1.2). Zytogenetische Analysen zeigten auch, dass die Anzahl chromosomaler Zugewinne im Vergleich zu den chromosomalen Verlusten bei den meisten Kopf-Hals-Karzinomen überwiegen (Abb. 1.3)(Freier *et al*, 2010; Jin *et al*, 2001). Die

häufigsten chromosomalen Zugewinne betreffen 5q, 7q, 8q, 11q, sowie Chromosom 20 (Jin *et al*, 2005; Squire *et al*, 2002).



**Abbildung 1.3:** Frequenz-Plot von 196 Kopf-Hals-Karzinomen mit den für diese Tumorentität typischen genomischen Veränderungen. Die X-Achse stellt die einzelnen Chromosomen dar und die Y-Achse die Frequenz der Aberration innerhalb des Kollektivs dar. Chromosomale Zugewinne sind in Gelb und Verluste in Blau dargestellt. Quelle der Daten: Progenetix ([www.progenetix.com](http://www.progenetix.com)).

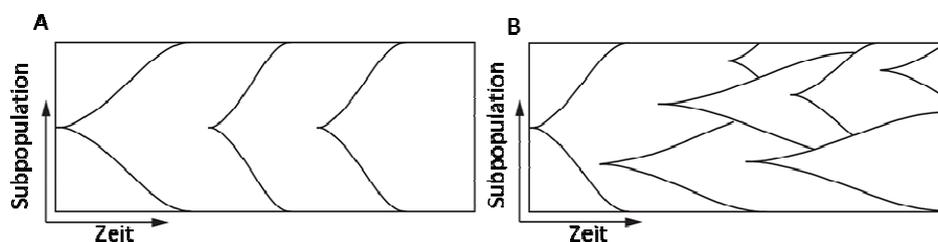
Ein Beispiel für ein Krebs-assoziiertes Gene in der sehr häufig zugewonnenen Region 8q24.1 ist *MYC*. Dieses Onkogen ist ein *helix-loop-helix* Transkriptionsfaktor und wird durch andere Signale wie WNT, SHH und EGF über den MAPK/ERK-Signalweg aktiviert. Es verstärkt ohne Präferenzen die Expression von etwa 15% aller menschlichen Gene durch die Bindung an *Enhancer-Box* Sequenzen, die zu diesem Zeitpunkt in der Zelle aktiv sind (Cotterman *et al*, 2008; Dominguez-Sola *et al*, 2007). Eine mutierte bzw. aktivierte Form von *MYC* führt zur Überexpression von Genen, die hauptsächlich in der Zellproliferation involviert sind und wodurch bei Überaktivität die Tumorprogression begünstigt werden kann (Denis *et al*, 1991).

Chromosomale Verluste betreffen häufig die Regionen 1p, 3p, 4p, 8p, 11q, 13q, 17p und 18q. Zu den wiederholten Deletionen bei Kopf-Hals-Karzinomen gehören die Gene *CDKN2A* (9p21) und *FHIT* (3p14). Am häufigsten ist das Tumorsuppressorgen *TP53* (17p13) (Soussi, 2007) deletiert. Das Tumorsuppressorgen *TP53* kodiert einen Transkriptionsfaktor namens p53, der sich aus zwei p53-Dimeren zu einem Tetramer zusammensetzt und in dieser Form an die Promotorregionen von Zielgenen binden kann. Die Funktionen von p53 sind vielseitig. Die bislang bekannten Funktionen betreffen die Regulation des

Zellzyklus, die Induktion von DNA-Reparaturen und die Regulation der Seneszenz und Apoptose. DNA-Schädigungen durch äußere Einflüsse wie UV- oder  $\gamma$ -Strahlung (Cui *et al*, 2007), Entzug von Wachstumsfaktoren (Rufini *et al*, 2013) oder Hitzeschock (Wang & Chen, 2003), wie auch der Kontaktverlust zu anderen Zellen (Grossmann, 2002) aktivieren p53.

#### 1.4 Tumorevolution und -progression

Krebs ist eine genetische Erkrankung auf zellulärer Ebene (Vogelstein & Kinzler, 1993). Dabei ist die Tumorevolution und -progression abhängig von seltenen, zufälligen Mutationsereignissen. Eine einzige mutierte Zelle reicht wahrscheinlich aus, um den Grundstein für eine Krebserkrankung zu bilden (Almendro *et al*, 2013). Durch die genetische Diversität und das Entstehen neuer Mutationen werden nach dem darwinistischen Prinzip Zelltypen selektiert, die sich ihrer Umgebung am besten anpassen können (Merlo *et al*, 2006). Von der Vielzahl der Krebszellen wird jedoch nur ein kleiner Teil selektiert, welcher Wachstumsvorteile in einer bestimmten Umgebung oder einem bestimmtem Zusammenhang aufweist, wie z.B. Wachstumspotential bei einer niedrigen Sauerstoff-Konzentrationen (Hypoxie) oder Resistenz gegen eine medikamentöse Therapie. Dies kann zu einer klonalen Expansion von Zellen mit einem bestimmten Genotyp führen und damit zur Tumorprogression beitragen (Almendro *et al*, 2013).



**Abbildung 1.4:** Lineare und verzweigte klonale Expansion. **A** Lineare Evolution, bei der durch sukzessive „klonale Sweeps“ ein vorheriger Stammklon eliminiert wird. **B** Verzweigte Evolution. Quelle: Marusky & Polyak, 2010.

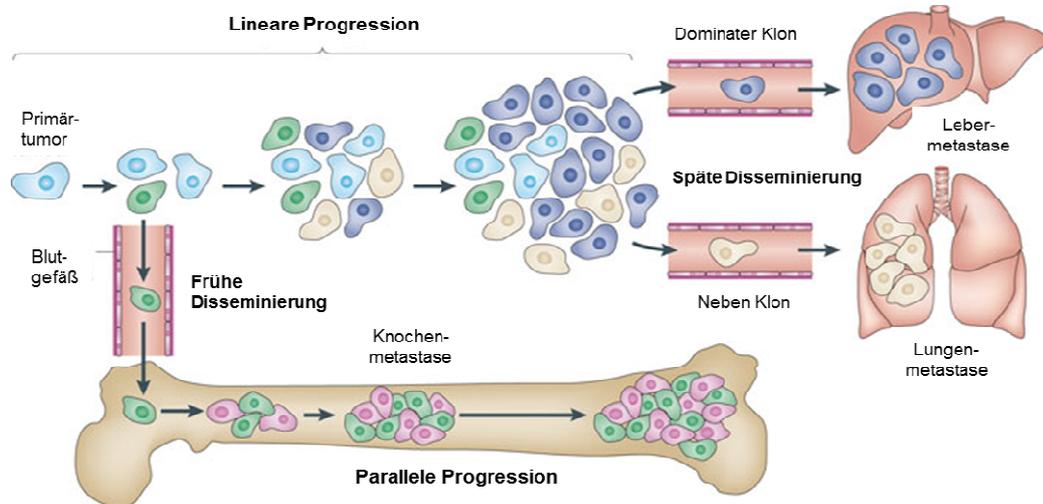
Die meisten der spontan auftretenden Mutationen sind neutrale oder für die Zelle gar nachteilige Mutationen. Während stark nachteilige Mutationen im Selektionsprozess nicht fixiert werden, können neutrale oder nahezu neutrale Mutationen, aufgrund des Gendrifts expandieren (Kimura, 1991) und werden manchmal auch fixiert. Interessanterweise sind vorteilhafte Mutationen, die in einem Klon direkt selektiert und fixiert werden, wahrscheinlich sehr selten (Marusyk *et al*, 2012; Merlo *et al*, 2006; Nowak *et al*, 2006). Durch diese komplexen und vielschichtigen Mechanismen der Tumorevolution kann es lange dauern bis eine Mutation, welche einen Wettbewerbsvorteil darstellt und aufgrund ihrer phänotypischen „Fitness“ selektiert wird, klonale Dominanz entwickelt (Marusyk & Polyak, 2010; Marusyk & Polyak, 2013).

Neuere Studien beschreiben, dass die Mehrheit der Tumoren genetisch heterogen sind und aus verschiedenen klonalen Subpopulationen bestehen (Marusyk & Polyak, 2010; Marusyk & Polyak, 2013). Wie sich diese Klone im Tumor zu einander verhalten und im Zeitverlauf entwickeln ist noch weitgehend unbekannt. Daher wurden verschiedenen Modelle entwickelt, die miteinander konkurrieren. Nach dem linearen Tumor-Evolutions-Modell geschieht die klonale Expansion wellenhaft durch nacheinander erworbene, vorteilhafte Mutationen. Dabei verdrängt der expandierende den alten Stammklon durch einen sogenannten „klonalen Sweep“ (Abb. 1.4 A). Dagegen entstehen nach dem verzweigten Tumor-Evolutions-Modell parallel neue, auswachsende Subklone, sodass kein „klonaler Sweep“ möglich ist, sich aber so verschiedene Subklone innerhalb eines Tumors entwickeln können (Abbildung 1.4 B). Da Tumorzellpopulationen schnell expandieren, ist das letztere beschriebene Modell möglicherweise wahrscheinlicher (Burrell & Swanton, 2014).

## **1.5 Genetische Heterogenität in Primärtumoren und Metastasen**

Genetische Heterogenität von Tumoren wird in zwei Kategorien eingeteilt. Die *intertumorale* Heterogenität beschreibt die genetischen Unterschieden zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen, während die *intratumorale*

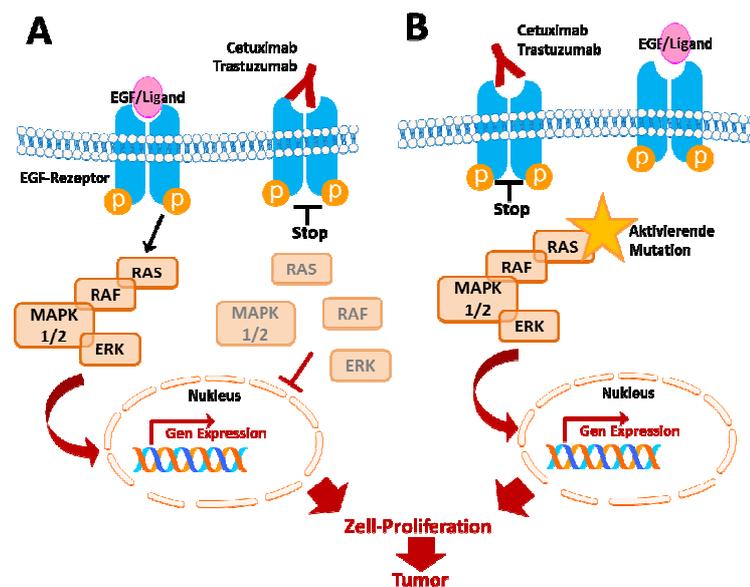
Heterogenität die Unterschiede innerhalb eines Primärtumors oder einer Metastase darstellt (Heppner, 1984; Marusyk & Polyak, 2013). Die genetische intratumorale Heterogenität von Primärtumoren ist dabei ein lange bekanntes Phänomen, jedoch nur ein Aspekt der genetischen Heterogenität von Krebserkrankungen. Tumorzellen des Primärtumors gelangen über die Blut- und Lymphbahnen in andere Organe und können dort zu Metastasen auswachsen, welche letztlich für die Mehrheit der Krebs-Todesfälle verantwortlich sind (Taneja *et al*, 2002). Daher ist ein Verständnis der genetischen Heterogenität der Krebserkrankung ohne eine Analyse der Metastasen unvollständig.



**Abbildung 1.5:** *Schema der Tumorprogressions-Modelle.* Das lineare Tumorprogressions-Modell zeigt eine schrittweise Entwicklung des Tumors, an dessen Ende die späte Disseminierung bzw. Metastasierung steht. Das parallele Progressions-Modell beschreibt eine frühe Disseminierung von Tumorzellen, wodurch die Metastasen sich genetisch unabhängig vom Tumor entwickeln und daher andere genetische Eigenschaften als die Primärtumore aufweisen können. Quelle: Marusyk *et al*, 2012.

Im bislang vorherrschenden linearen Tumorprogressionsmodell (Abb. 1.5) wird die Metastasierung als der letzte Schritt in der Tumorprogression beschrieben (Vogelstein, 1990). Dieses „späte“ Metastasierungsmodell impliziert auch, dass Metastasen die gleichen oder zumindest sehr ähnliche genetische Veränderungen aufweisen wie deren Primärtumor. Ein neueres Modell, das parallele Progressionsmodell besagt, dass Tumore schon während der Entwicklung und weit vor der klinischen Diagnosestellung zu streuen beginnen

(Klein, 2009). Die weitere Entwicklung dieser gestreuten Zellen kann dann unabhängig von der des Primärtumors geschehen (Klein & Stoecklein, 2009; Stoecklein *et al*, 2008). Für Therapieansätze ist dies bedeutend, da ausgehend vom alten linearen Progressionsmodell, der Primärtumor ein Surrogatmarker auch für die systemische Erkrankung sein sollte. Die Verwendung des Primärtumors als Surrogatmarker für die Systemerkrankung ist derzeit die übliche klinische Routine. So werden die heutigen molekularen Therapien immer noch anhand der molekulargenetischen Eigenschaften des Primärtumors ausgerichtet und die Eigenschaften der Metastasen zu wenig berücksichtigt (Arteaga & Baselga, 2004). Ein Beispiel gibt hier das Kolonkarzinom, welches heute unter anderem mit einem Antikörper gerichtet gegen den EGFR-Rezeptor therapiert wird (Abb. 1.6 A). Diese Therapie ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn im nachgeschalteten Signalweg keine weiteren aktivierende Mutationen vorliegen (Abb. 1.6 B) (De Luca & Normanno). Eine solche genetische Veränderung muss aber nicht zwingend sowohl im Primärtumor als auch in den Metastasen vorkommen, sondern könnte z.B. auch nur auf den Primärtumor beschränkt sein (Gerlinger *et al*, 2012b). Auch könnte nur ein bestimmter Anteil der Metastasenzellen diese genetische Veränderung aufweisen.



**Abbildung 1.6:** Die Inhibition von EGFR ist eine Therapie für das fortgeschrittene Kopf-Hals-Karzinom (A). Bei einer starken Heterogenität des Tumors kann diese Therapie nicht effektiv wirken. Ein Grund für ein Therapieversagen kann beispielsweise eine erneute Downstream-Aktivierung des EGFR-Signalweges in einer anderen Zelle des Primärtumors, oder in einer Metastase sein (B).

Eine Therapie gegen das entsprechend mutierte/veränderte Protein wäre dann sogar für Tumorzellen ohne diese Mutation ein Selektionsvorteil (Mardis *et al*, 2009). Dies kann auch beim Therapieversagen unter Cetuximab Behandlung eindrucksvoll durch das Auswachsen von zuvor nicht nachweisbaren KRAS mutierten Klonen belegt werden (Bardelli & Siena, 2010; Sartore-Bianchi *et al*, 2010).

Daher hat die genetische Heterogenität von Primärtumoren und Metastasen mit Sicherheit einen wichtigen Einfluss auf die Effektivität der Therapie und die Heilungschancen von Krebserkrankungen.

Systematische Untersuchungen zur genetischen Heterogenität zwischen Primärtumoren und autologen Metastasen wurden insgesamt wenig durchgeführt (Stoecklein & Klein, 2010). Allerdings gewann das Thema der intertumoralen genetischen Heterogenität in den letzten zwei bis drei Jahren immer mehr an Bedeutung für die Krebsforschung und Krebstherapie, und es wurde daher auch mehr über dieses Thema geforscht und publiziert. Dies lag unter anderem auch an dem technischen Fortschritt wie der Entwicklung der „Next Generation Sequencing“ (NGS) - Methoden oder hochauflösenden DNA-Oligonukleotid-Arrayformaten.

Für die meisten Heterogenitätsanalysen wurden aus Primärtumorgewebe und Metastasengewebe genomische DNA oder auch mRNA extrahiert und untersucht. Üblicherweise wurde jedoch die DNA bzw. mRNA von Tausenden bis Millionen von Zellen untersucht. Dennoch wurde schon bei diesen Analysen klar, dass, abhängig vom Tumortyp, erhebliche genetische Divergenzen zwischen Primärtumoren und Metastasen vorhanden sein können (Maley *et al*, 2006). Es gibt viele Untersuchungen zur intratumoralen genetischen Heterogenität, die nur vermuten lassen, dass wahrscheinlich keine Tumorzelle der anderen gleicht (Klein, 2006; Salk *et al*; Salk *et al*, 2010). In diesem Zusammenhang liegt die Frage nahe, wie sich Primärtumoren und Metastasen auf der Ebene der einzelnen Tumorzelle wirklich unterscheiden. Tatsächlich existieren aktuell nur drei systematische Studien auf Einzelzellebene in welcher Tumore und deren

autologe Metastasen analysiert wurden (Navin *et al*, 2011; Wang *et al*, 2014; Xu *et al*, 2012).

## 1.6 Einzelzell-PCR

Umfassende Untersuchungen der genetischen Heterogenität auf Einzelzell-Ebene waren lange nicht möglich, was vorrangig an den technischen Schwierigkeiten bei der experimentellen Umsetzung lag. Für umfassende genetische Untersuchungen müssen zuerst einzelne Zellen erfolgreich isoliert und anschließend das Genom der Zellen global amplifiziert werden.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden entwickelt, die es erlauben, das Genom einer einzelnen Zelle global zu amplifizieren, um genetische Veränderungen auf Einzelzell-Ebene untersuchen zu können. Eine humane Zelle enthält ca. 6 pg DNA (Morton, 1991). Für umfassende genetische Analysen werden DNA-Mengen durchschnittlich von bis zu 0,5-1 µg benötigt (Kallioniemi *et al*, 1992). Für das Sequenzieren des Exoms oder Genoms einer Einzelzelle braucht man mindestens 1-2 µg DNA (Illumina) und für einen 180k Array (Agilent) 0,5-1 µg DNA (Mohlendick *et al*, 2013).

Um nun solche umfassenden genetischen Analysen auf Einzelzell-Ebene durchführen zu können, muss das gesamte Einzelzellgenom amplifiziert werden. Für diese globale Amplifikation des Zellgenoms, der sogenannten „Whole Genome Amplification“ (WGA), gibt es verschiedene methodische Ansätze. Die WGA-Methoden basieren entweder auf der „Multiple-Displacement-Amplification“ (MDA), Polymerase-Kettenreaktion (PCR), oder auf eine Kombination von beiden Prinzipien.

Einer der ersten WGA-Techniken war die DOP-PCR, die auf der Verwendung von degenerierten Oligonukleotid-Primern basiert (Telenius *et al*, 1992). Die DOP-Primer bestehen aus festgelegten 5´ und 3´ Basen und dazwischen sechs zufällig generierten Nukleotiden, welche es den Primern unter wenig stringenten Bedingungen ermöglichen, genomweit zu binden. Eine weitere Methode ist die „primer extension pre-amplification“ (PEP)-PCR (Xu *et al*, 1993), die mit

vollständig degenerierten Primern arbeitet. Eine weitere und von uns angewandte Methode ist die Adapter-Linker-PCR. Diese Methode ist aufwendiger als andere PCR-basierten Methoden, da hier zuerst ein Restriktionsverdau mit *MseI* durchgeführt wird, welcher spezifische „sticky-ends“ generiert, an die dann ein passendes Adapter-Konstrukt ligiert wird. An dieses Adapter-Konstrukt können spezifische Primer binden und auf diese Weise das gesamte Genom der Zelle mittels einer PCR amplifizieren (Klein *et al*, 1999; Stoecklein *et al*, 2002). Diese Methode hat den Vorteil, dass die Schnittstellen und die entstehenden Fragmente determiniert sind. Dies ermöglicht uns, das gesamte Amplifikat *in silico* darzustellen (Binder *et al*, 2014) und verschiedene weiterführende Methoden und Analysen anpassen zu können. Die entstehenden *MseI*-Fragmente und die daran ligierten Adapter sind im Durchschnitt zwischen 250-500 bp lang und sind damit ein optimales Ausgangsprodukt für die Einzelzell-aCGH-Analyse (Möhlendick *et al*, 2013). Diese WGA-Methode wurde inzwischen bis zur Marktreife entwickelt und ist auch kommerziell als Kit erhältlich (*Ampli1*<sup>TM</sup> WGA Kit, Silicon Biosystems, Bologna, Italien).

Die sogenannten „Multiple Displacement Amplification“ (MDA)- bzw. „Isothermal Multiple Displacement Amplification“ (IMDA)- Methoden sind Techniken, die das Genom in den ersten Amplifikationszyklen annähernd linear amplifizieren (Van Loo & Voet, 2014). Die DNA-Synthese wird bei diesen Methoden bei gleichbleibender Temperatur von der Phi-29 Polymerase des Bakteriophagen Lambda katalysiert. Bei der MDA bzw. IMDA werden Random-Hexamer-Primer an die denaturierten Einzelzell-DNA-Stränge angelagert und anschließend bei 30°C die Amplifikation durchgeführt (Shoaib *et al*, 2008). Hierbei kommt es kontinuierlich zu einer Strangverdrängung (strand displacement), wenn das 3'-Ende des neu synthetisierten Fragmentes das 5'Ende des benachbarten Fragmentes erreicht. Das bereits fertig synthetisierte Fragment wird am 3' Ende verdrängt und an diesem Bereich kann die Synthese neu beginnen (Shoaib *et al*, 2008).

Die „Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycles“ (MALBAC) ist eine Kombination der PCR und MDA Methoden. MALBAC nutzt spezielle modifizierte Primer, welche komplementäre Enden aufweisen und wodurch das neu synthetisierte Amplikon eine Schleife bildet. Hierdurch kann das Amplikon nicht mehr als Template dienen und eine exponentielle Amplifikation wird verhindert (de Bourcy *et al*, 2014).

## 1.7 Genomische Analysen an Einzelzell-Amplifikaten

Die Techniken der "Single-Cell-Genomics" ermöglichen die genomweite Charakterisierung der intratumoralen Heterogenität auf Einzelzellebene und damit ein besseres Verständnis für die individuelle Evolution der Krebserkrankung. Einzelzell-Amplifikate wurden mit einer Vielzahl von Hochdurchsatz-Plattformen, einschließlich Oligonukleotid-Microarrays und "Next-Generation-Sequencing" (NGS) analysiert (Macaulay & Voet, 2014).

Beispielweise ist bei Oligonukleotid-Arrays der Fa. Agilent das gesamte humane Genom auf Glas-Objektträgern durch DNA-Oligonukleotide mit einer Länge von durchschnittlich 60 bp repräsentiert. Diese Oligonukleotide werden synthetisch über die Phosphoramidit-Methode hergestellt. Das Prinzip beruht auf der Blockierung der spontanen Ausbildung von Phosphordiesterbindungen zwischen den Nukleotiden durch Einsatz von Schutzgruppen am 5'-Ende der Desoxyribose. Ein gezieltes Entfernen der Schutzgruppen ermöglicht eine gerichtete Verlängerung der Nukleotidketten. Ähnlich wie beim Drucken mit einem Tintenstrahldrucker werden die Nukleotide als 60-mer Oligonukleotide direkt auf einen speziellen Objektträger nach der Phosphoramidit-Methode synthetisiert (Quelle: Application Note, "Agilent's Microarray Platform: How High-Fidelity DNA Synthesis Maximizes the Dynamic Range of Gene Expression Measurements", 2008, Fa. Agilent).

Oligonukleotide-Microarrays haben im Gegensatz zu „Bacterial-Artificial-Chromosome“ (BAC)-Arrays den Vorteil, dass keine Verunreinigung durch Bakterien-DNA besteht, welche bei der Hybridisierung stören könnte (Ylstra *et al*,

2006). Die Auflösung der aktuellen Oligonukleotide-Arrays ist zusätzlich wesentlich höher als bei den BAC-Arrays, welche eine durchschnittliche Auflösung von 1 Mb aufweisen (Ylstra *et al*, 2006) und für Einzelzell-Amplifikate eine Auflösung von bis zu 8,3 Mb erreichen (Konings *et al*, 2012). Dagegen können mit Oligonukleotid-Arrays bei der vergleichenden genomische Hybridisierungen (aCGH), Veränderungen von unter 100 kb in Einzelzell-Amplifikaten detektiert werden (Möhlendick *et al*, 2013).

## 2 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die genetische Heterogenität von Kopf-Hals-Tumoren auf Einzelzell-Ebene untersucht werden. Hierfür sollten die somatischen Kopienanzahlunterschiede (SCNA) zwischen Primärtumor- und Metastasenzellen analysiert werden. Mit Hilfe entsprechender Einzelzell-Methoden, sollte es möglich sein, die chromosomale Instabilität und daraus resultierende genetische Heterogenität zwischen Primärtumoren und Metastasen der Kopf-Hals-Tumore genomweit zu analysieren und zu vergleichen. Um sowohl die inter- als auch intratumorale genetische Heterogenität von Primärtumoren und autologen Lymphknotenmetastasen auf Einzelzellebene analysieren und vergleichen zu können, eignet sich das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Halsbereiches (HNSCC) als Modell besonders gut, da es u.a. eine verhältnismäßig starke chromosomale Instabilität im Vergleich zu anderen Tumorarten wie z.B. dem Brustkrebs aufweist (Lawrence *et al*, 2013; Reshmi & Gollin, 2005; Reshmi *et al*, 2004). Dieser Tumortyp ist aggressiv und metastasiert häufig in die Halslymphknoten, die recht oberflächlich gelegen und damit sehr gut zugänglich sind. Da die Lymphknotenmetastasen oft schon im Vorfeld bekannt sind, sowie recht groß und intra-operativ einfach aufzufinden sind, können aus frischem Primärtumorgewebe und autologen Metastasengewebe gut Einzelzellpräparationen hergestellt werden. Dies ermöglichte direkte genetische Analysen der einzelnen Tumorzellen durchzuführen, ohne die Zellen kultivieren zu müssen, wobei sie möglicherweise weitere genetische Veränderungen dazu gewinnen oder verlieren, bzw. eine weitere Selektion erfolgt, und somit kein direktes Abbild der genetischen Heterogenität von Kopf-Hals-Karzinomzellen dargestellt werden kann.

Die Daten dieser Arbeit sollen in diesem Kontext folgende Fragen beantworten:

- Können Aussagen über das Ausmaß genomweiter chromosomaler Instabilität auf Einzelzell-Ebene innerhalb der Primärtumore und deren autologer Metastasen getroffen werden?
- Gibt es Unterschiede im Grad der Ausprägung der genetischen Heterogenität zwischen Primärtumoren und deren autologer Metastasen?
- Wie ist das Verhältnis der Kopienanzahl-Veränderung (Somatic Copy Number Alteration, SCNA) zwischen einzelnen Tumorzellen der Primärtumore und zugehörigen Metastasen?
- Welche Gene und chromosomale Regionen werden während der Metastasierung bei den einzelnen Tumorzellen selektiert?
- Ergeben sich durch besonders häufig oder stark selektierte SCNA Anhaltspunkte für neue metastasierungsrelevante Gene, die auch als therapeutische Zielstruktur dienen könnten?

Um diese Fragen beantworten zu können wurde zunächst aus frischen Primärtumor- und Metastasengewebe von HNSCC Fällen Einzelzellsuspensionen hergestellt und einzelne Tumorzellen mittels Mikromanipulation oder Fluoreszenz-aktivierter-Zell-Sortierung (FACS) isoliert. Das Genom dieser Tumoreinzellen wurde dann mittels der Adapter-Linker PCR global amplifiziert und anschließend gesamtgenomisch mithilfe der aCGH gemäß eines von uns etablierten Protokolls (Möhlendick *et al*, 2013) charakterisiert.

### 3 Materialien und humane Gewebe

#### 1.1. Einwegartikel und Kunststoffgefäße

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Kunststoff- und Einwegartikel wurden von den Firmen Falcon/Becton-Dickinson (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Starlab GmbH (Ahrensberg), Corning (Wiesbaden), Greiner Bio-one (Frickenhäusen), BD Bioscience (Heidelberg), Whatman (Dassel), Millipore (Schwalbach) und VWR (Darmstadt) bezogen.

#### 3.1 Humane Tumorproben für Einzelzell-Analysen

**Tabelle 3.1:** *Klinische Daten* des untersuchten Patientenkollektivs mit Kopf-Hals-Karzinomen und Lymphknotenmetastasen.

Fall Nr.	Alter/ Geschl.	OP Datum	HPV Status	Lokalisation	Typ	pTNM	UICC- Stadium
#68	62, m	23.03.09	Neg.	C04.1 (Alveolarfortsatz; Mundboden rechts)	M8071/3 (v. PEC)	pT2pN2b (2/ 14) pMx G2 L1 V0 R0	IVA
#74	70, m	19.05.09	Neg.	C02.1 (Zunge)	M8071/3 (v. PEC)	pT3 pN2c(11/ 35) pMx G3 L1 V0 R0	IVA
#98	45, w	14.12.09	Neg.	C04.1 (Alveolar- fortsatz; Mundboden rechts)	M8071/3 (v. PEC)	pT4apN2 b (3/42) pMx G2 L1 V0 R1	IVA
#170	58, m	08.06.11	Neg.	C03.1 (Mundboden/Alv eolarfort- satz/Wange rechts)	M8071/3 (v. PEC)	pT4apN2 b(3/52) cMx G2 L1 V0 R1	IVA
#178	73, w	30.08.11	Neg.	C06.2 (innerer Kieferwinkel, Planum buccale rechts)	M8071/3 (v. PEC)	pT4apN2 b(4/35) cMx G2 L0 V0 R0	IVA

### 3.2 Zelllinien

**Tabelle 3.2:** *Verwendete humane Zelllinien.*

Bezeichnung	Geschl.	Ursprung des Gewebes	Quelle
UD-SCC-4	m	Primärtumor des Oropharynx	Prof. Dr. H. Bier, Hals-Nasen-Ohren-Klinik und Poliklinik, TU München
UM-SCC-14C	w	Primärtumor der Mundhöhle	Prof. PhD Thomas E. Carey, Pharmakologie und Otolaryngologie, Kopf- und Hals- Chirurgie, Universität zu Michigan
UM-SCC-17A	w	Primärtumor der Supraglottis	
UM-SCC-22B	w	Halsmetastase	
REH	w	B-Lymphozyten einer Patientin mit Leukämie	Leibniz-Institut DSMZ GmbH, Braunschweig
mLCL	m	Unveränderte Lymphozyten	Coriell Institut, New Jersey
wLCL	w	Unveränderte Lymphozyten	Coriell Institut, New Jersey

### 3.3 Chemikalien, Enzyme, Puffer, Geräte und Oligonukleotide

#### 3.3.1 Fertige Puffer

20x SSC	Sigma, Deisenhofen
1x PBS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
TE	Promega, Madison

#### 3.3.2 Selbst hergestellte Puffer

OPA-Puffer	1,25 g Trisacetat (99%) 5 ml Mg-Acetat (100 mM) 5 ml K-Acetat (500 mM) ad 50 ml Aqua dest.
10x TBS (pH 7,5)	87,6 g NaCl 12,1 g Tris ad 1 l Aqua dest.
TBST	100 ml 10x TBS 900 ml Aqua dest. 1 ml Tween 20
10x SDS Laufpuffer	30,3 g Tris (25 mM) 144 g Glycin (1,9 M) 10 g SDS Ad 1 l Aqua dest.
10x Transferpuffer	144 g Glycin (1,9 M) 30,3 g Tris (25 mM) ad 1 l Aqua dest.
1x Transferpuffer	0,1 l 10x Transferpuffer 0,2 l Methanol ad 1 l Aqua dest.

### 3.3.3 Primärantikörper für indirekte Färbungen

Antikörper	Spezies	Klon	Produkt Nr.	Firma
Anti-human CD44v6	Maus	Monoklonal, IgG1	NCL- CD44v6	Leica Microsystem, New Castle
Anti-human CK 5	Kaninchen	Monoklonal, IgG	NB 110- 56916	Novus, Cambridge
Anti-human CK 14	Kaninchen	Monoklonal, IgG	51054	ABCAM, Littelton
Isotypkontrolle MOPC 21	Maus	Monoklonal, IgG1 <sub>k</sub>	M5284	Sigma, Deisenhofen
Isotypkontrolle X0903	Kaninchen	Polyklonal, IgG	X0903	DAKO, Hamburg

### 3.3.4 Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Klon	Produkt Nr.	Firma
Anti-Mouse Alexa 488	Ziege	Polyklonal, IgG	A11029	Invitrogen Karlsruhe
Anti-Rabbit Cy3	Ziege	Polyklonal, IgG	C-2306	Sigma, Deisenhofen

### 3.3.5 Direkt konjugierte Antikörper

Antikörper	Spezies	Klon	Produkt Nr.	Firma
Anti-human CD44v6- APC	Maus	Monoklonal, IgG <sub>1</sub>	A11029	R&D Systems
Anti-human CK 14- FITC	Maus	Monoklonal,	C-2306	R&D Systems
Isotypkontrolle IgG <sub>1</sub> - APC	Maus	Monoklonal, IgG <sub>1</sub>	17430181	eBioscience,
Isotypkontrolle IgG <sub>3kappa</sub> -FITC	Maus	Monoklonal, IgG <sub>3kappa</sub>	559806	BD Bioscience

### 3.3.6 Enzyme

DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
<i>Mse</i> I (hc)	Biolabs, Ipswich
Proteinase-K	Roche, Mannheim
T4-Ligase (hc)	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Trypsin	Merck, Darmstadt
Precision Strep Tactin-HRP Conjugate	Merck, Darmstadt
Collagenase III und IV	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

### 3.3.7 DNA-Sonden

Vysis TP53/CEP 17 FISH Probe Kit	Abbott Park, Illinois
Vysis MYC/CEP 8 FISH Probe Kit	Abbott Park, Illinois
Vysis CDKN2A/CEP 9 FISH Probe Kit	Abbott Park, Illinois
Vysis CCND1/CEP 11 FISH Probe Kit	Abbott Park, Illinois
ASAP1 BAC-Klon RP11-140N11	reSource, Nottingham
ASAP1 BAC-Klon RP11-598A18	reSource, Nottingham
ASAP1 BAC-Klon RP11-1104D13	reSource, Nottingham

### 3.3.8 Kit-Systeme

QIAamp DNA Micro Kit	Qiagen, Hilden
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
aCGH Labeling Kit	Agilent Technologies, St. Clara
aCGH Hybridization Kit	Agilent Technologies, St. Clara
aCGH Washing Kit	Agilent Technologies, St. Clara
Gasket/Microarray slides	Agilent Technologies, St. Clara
Tissue Digestion Kit I	KREATECH, Amsterdam
Immun-Star-Western Kit	Biorad, Kalifornien

### 3.3.9 Microarrayplattform

SurePrint G3 HMN CGH 4x180K- Oligo Micorarray Kit	Agilent Technologies, St. Clara
--	---------------------------------

**3.3.10 Chemikalien**

ABC-Kit (Mouse IgG; Rabbit-IgG)	Vectastain, Burlingame
AB-Serum	Biotest, Dreieich
DAB + Chromogen	DAKO, Glostrup
Acrylamid Mix, 30%	Biorad, Kalifornien
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	GE Healthcare, Chalfont St. Giles
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BSA	Roche, Mannheim
Cytofix	BD Bioscience, New Jersey
DAPI	Roche, Mannheim
DNA-Größenmarker	Starlab, Hamburg
1x PBS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Eosin G	Merck, Darmstadt
Entellan	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a. (99,9%)	Merck, Darmstadt
Ethanol 99%, vergällt (1% Petrohletcher)	Zentralapotheke UKD, Düsseldorf
FCS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll	GE-Healthcare, Chalfont St. Giles
Fixogum	Marabu, Tamm
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hämalaun nach Mayer	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin Lösung nach Gill III	Merck, Darmstadt
Hanks-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Igepal	Sigma, Deisenhofen
Kalium Chlorid 75 mM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Ladepuffer (5x)	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Medium 199	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Milupa, Friedrichsdorf
Nukleasefreies Aqua dest.	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd 34 %	Merck, Darmstadt
PermWash	BD Bioscience, New Jersey
Peroxidase	Vector Laboratories, Burlingame
Ponceau S Pulver	BioRad, Kalifornien
Protein-Größenmarker	BD Bioscience, New Jersey
RPMI 1640 + Glutamax™-I	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure 5N	Merck, Darmstadt

SDS (98.5%)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Target Retrieval Solution, 10x	DAKO, Glostrup, Dänemark
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TEMED	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Vectarshield Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

### 3.4 Geräteliste

#### 3.4.1 Pipetten

Research	Eppendorf
Reference	Eppendorf
Pipettierhilfe	Integra Biosciences

#### 3.4.2 Zentrifugen

FRESCO 17 Centrifuge Thermo	HERAEUS
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Mikrozentrifuge Micro 6	Quick Pack

#### 3.4.3 Thermocycler

S 1000 Thermal Cycler	BioRad
C 1000 Thermal Cycler	BioRad
Dyad Disciple Cycler	BioRad

#### 3.4.4 Sterilbänke

Thermo Electron Hera safe	HERAEUS
---------------------------	---------

#### 3.4.5 Heizblöcke, Heizbäder und Inkubatoren

Thermostatic Waterbath WBS	Fried Electric
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf
Neo Block II	Neo Lab
Dry Bath System	StarLab
WPE 45	Memmert

Hera Cell Inkubator

HERAEUS

**3.4.6 Kühl- und Gefrierschränke**

Comfort

LIEBHERR

Premium Biofresh

LIEBHERR

Sparkfree Laboratory Freezer

Thermo

**3.4.7 Messgeräte**

Qubit Fluorometer

Life Technologies

Bio-Photometer

Eppendorf

Infinite M200 Spektrometer

Tecan

Versa Doc Imaging System

BioRad

pH-Meter 211

HANNA instruments

440-43N-Waage

KERN

**3.4.8 Mikroskope**

Axioplan-2 Imaging

Zeiss

Wiloverta A

Hund WETZLAR

DMIL

LEICA

**3.4.9 Sonstiges**

Array Scanner

Agilent

SM200R Microtom

LEICA

ManNK2-Mikromanipulator

Eppendorf

SUB CELL GT Kammern

BioRad

Orbitalschüttler

VELP Scientifica

**3.5 Software**

ISIS Version

Metasystems

Infinite Version 1.0

Tecan

Quantity One Version 1.1

BioRad

Leica Application Suite Version 4.1

LEICA

PRISM Version 5.01

GraphPad

aCGH Version 1.40.0

Bioconductor

GLAD Version 2.26.0

Bioconductor

Feature Extraction Version 11.5.1.1, 9.5.1.1.	Agilent Technologies
Genomic Workbench Lite Edition Version 6.5.0.18	Agilent Technologies
circos Version 0.16	Circos

## 4 Methoden

### 4.1 Untersuchte Gewebe

Das Tumorgewebe wurde den Patienten im Rahmen einer indizierten Standardbehandlung chirurgisch entfernt. Für diagnostische Zwecke nicht benötigtes Gewebe wurde für die hier beschriebenen Forschungszwecke verwendet. Dafür lag von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität ein positives Votum vor (Studiennummer 3090). Alle Patienten, deren Gewebe für diese Arbeit verwendet wurde, haben nach entsprechender Aufklärung zur Entnahme und Untersuchung des Probenmaterials zu Forschungszwecken schriftlich eingewilligt. Das für Forschungszwecke frisch gewonnene Primärtumor- und Metastasengewebe wurden direkt nach dem Eingriff, wie unter 4.3 beschrieben, verarbeitet.

### 4.2 Zellkultur

#### 4.2.1 Kultivierung von HNSCC-Zelllinien

Die Kultivierung von humanen Zelllinien wurde nach publizierten Standardprotokollen des Forschungslabors durchgeführt (Driemel *et al*, 2014) und ggf. für die hier verwendeten Zelllinien angepasst. Die adhärent wachsenden HNSCC-Zelllinien UD-SCC-4 und UM-SCC-14C, -17A, -22B wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin in einem T75-Kulturflasche, bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei 80% Konfluenz der Zellen wurden diese passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit 15 ml 1x PBS gewaschen und durch eine 10-minütige Trypsinbehandlung (0,5 mM EDTA, 2% Trypsin, in 1x PBS) von der Kulturflaschenoberfläche abgelöst. Die Enzymaktivität des Trypsins wurde mit 12 ml des Mediums mit den genannten Zusätzen gestoppt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 400 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend in einer 1:5 Verdünnung neu ausplattiert.

#### 4.2.2 Kultivierung der REH, mLCL und wLCL Zelllinie

Die B-Zell Progenitor-Leukämie-Zelllinie REH und die Lymphozyten Zelllinien mLCL und wLCL, wurden in RPMI1640 + GlutaMax mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte als Suspensionskultur inkubiert. Die REH- und LCL- Zelllinien wurden alle drei Tage 1:4 mit RPMI1640 + GlutaMax Medium verdünnt und neu ausgesät.

#### 4.2.3 Short Tandem Repeat (STR)-Analyse

Um die Identität der hier verwendeten Zelllinien sicherzustellen wurden STR Analysen durchgeführt. Für die Zelllinien UM-SCC -14C, -17A, -22B, wLCL, mLCL und REH waren die entsprechenden STR-Profile bekannt (Brenner *et al*, 2009). Daher wurden für diese Zelllinien STR-Analysen („Fingerprinting“) im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt (Tab. 4.1). Hierfür wurde zunächst nach Herstellerangaben die DNA dieser Zelllinien mittels des „DNA Blood and Tissue Kit“ der Firma Qiagen isoliert. Anschließend wurde 1 ng genomische DNA mithilfe des Identifier-1-Kits und ESI17-Kits der Fa. Promega amplifiziert. Für die Sequenzierung wurden die PCR-Produkte mit dem ABI 310 Kapillar Sequenzierer analysiert und mit der Software „Genotyper V3.1“ (Applied Biosystems) allotypisiert.

**Tabelle 4.1:** STR-Analyse der verwendeten Zelllinien. Angegeben sind die Namen der analysierten Zelllinien und die Namen der Mikrosatelliten-Marker. Die Zahlen geben die Wiederholungendes Markers auf den beiden Allelen an. Ist nur eine Zahl angegeben, so kann dies bedeuten, dass beide Allele die gleiche Anzahl von Wiederholungen aufweisen oder nur ein Allel vorhanden ist.

Marker	Zelllinie	wLCL	mLCL	REH	UMSCC-14C	UMSCC-17A	UMSCC-22B
VWA		14, 18	16, 16	14, 15	14, 18	14, 17	15, 18
D18S51		15, 21	14, 18	13, 16	15	22	28
Amel		XX	XY	XY	XX	XY	XX
D8S1179		13, 13	11, 14	13, 16	8, 13	12	11, 13
FGA		23, 25	20, 25	22, 23, 24	20, 21	20, 22	22, 24
D7S820		7, 9	8, 9	9, 12	9, 1	12	8, 9
D13S317		8, 10	11, 11	11, 12, 13	12	11, 13	8, 12
D5S818		11, 11	11, 11	11, 12, 13	11, 14	11	12
D3S1358				18	15	15, 18	16
D21S11			27, 28, 29, 30, 31		29	28	28

#### **4.2.4 Herstellung von Positivkontrollen für die Immunfluoreszenzfärbung**

Die adhärent wachsenden Zellen der Zelllinie UD-SCC-4 wurden enzymatisch mithilfe einer 10-minütigen Trypsinbehandlung abgelöst, die Trypsinaktivität mit Medium abgestoppt und die Zellen abzentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Neubauerkammer bestimmt und die Zellkonzentration auf  $5 \times 10^5$  Zellen/ml mit 1x PBS eingestellt. Zur Herstellung von Positivkontrollen wurden pro Feld eines Haft-Objektträgers (Haft-OT) 0,5 ml der Zellsuspension gegeben und die Zellen für 30 min bei RT auf die Objektträger sedimentieren gelassen. Abschließend wurde der Überstand abgeschüttet, die Haft-OTs über Nacht getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

### **4.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen von HNSCC-Präparaten**

#### **4.3.1 Herstellung von Einzelzellpräparaten aus Frischgewebe für Einzelzellisolierung mittels Mikromanipulation**

Aus den Primärtumor- und Metastasengeweben der Fälle #68, #74 und #98 wurde zunächst eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese Methode wurde nach Standardprotokoll des Chirurgischen Forschungslabors durchgeführt und bereits von Stoecklein *et al*, 2008 und Driemel *et al*, 2014 publiziert. Hierfür wurden die Tumore (ca.  $0,8 - 1,5\text{ cm}^3$ ) in eine Petrischale gelegt, von makroskopisch erkennbarem Bindegewebe mit Hilfe eines Skalpellens befreit und zu ca.  $2\text{ mm}^2$  großen Stücken zerkleinert. Die Gewebestücke der Tumore oder Lymphknotenmetastasen wurden mit 1 ml 1x PBS in einen Medicon-Schredder gegeben und mechanisch für 30 sec weiter zerkleinert. Dieses Prozedere wurde in Abhängigkeit von der Größe der Proben mehrmals wiederholt. Mit einer Einwegspritze wurde die Zelloösung aus den Medicon-Einheiten nach Herstellerangabe herausgezogen und dann in ein 12 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 10 ml 1x PBS zum Waschen dazugegeben und für 10 min bei  $450 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zum Zellpellet abgenommen und in 5 ml 1x PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch ein  $70\text{ }\mu\text{m}$

Zellsieb filtriert und anschließend die Zellzahl in einer Neubauerkammer gezählt. Die Zellzahl wurde dann auf ca.  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml mit 1x PBS verdünnt. Es wurden je 500  $\mu$ l (entspricht  $2,5 \times 10^5$  Zellen) dieser Suspension auf ein Feld der Haft-Objektträger (Haft-OT) gegeben. Die Zellsuspension wurde 30 min sedimentiert und der Rest an Flüssigkeit abgekippt. Für die Kontrollversuche wurden Zytospins hergestellt, da diese preiswerter herzustellen waren. Hierfür wurden Glasobjektträger in Zytokammern eingespannt und je Kammer 2 x 1 ml (entspricht  $1 \times 10^6$  Zellen) der Zellsuspension pipettiert. Diese wurden dann für 3 min bei 450 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen und über Nacht bei RT getrocknet.

#### **4.3.2 Herstellung von Präparaten aus Frischgewebe für die Einzelzellisolation mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS)**

Parallel zu dem in 4.3.1 beschriebenen Verfahren wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein auf enzymatischer Disaggregation basierendes Protokoll (modifiziert nach Prince *et al*) für eine Einzelzellablage mittels FACS etabliert (Prince *et al*, 2007). Das frisch exzidierten HNSCC-Tumorgewebe der Fälle #170 und #178 wurde mit einem Skalpell, wie in 4.3.1 beschrieben, in kleine Stücke geschnitten und in 4 ml Collagenase-Lösung (Medium 199, Collagenasen III, C0225 und Collagenasen IV, je 200 U/ml) aufgenommen und für 3h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Tumorgewebesuspension aufgrund verbleibender Zellverbände zusätzlich mechanisch mittels eines Medicon<sup>®</sup>-Schredders aufgelöst. Die so erhaltene Zellsuspension wurde anschließend durch ein 100  $\mu$ m und 70  $\mu$ m-Sieb gefiltert um die letzten Gewebestücke zu entfernen. Dann wurde die Zellsuspension 2x mit 1x PBS gewaschen und für 8 min bei 200 x g zentrifugiert. Nach Re-Suspension in 5-20 ml 1x PBS wurde die Zellzahl mittels Neubauerkammer bestimmt und die Zellkonzentration auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Schließlich wurden 2 ml der Suspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 8 min bei 200 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Zellpellets bei -80 °C für max. 2 Wochen gelagert.

## **4.4 DNA-Isolation aus FFPE-Präparaten**

### **4.4.1 Schneiden der Gewebe**

Von Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten (FFPE) Geweben wurden mit Hilfe eines Mikrotoms Gewebeschnitte mit 4 µm Schnittdicke, sowie 10 µm Schnittdicke angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden in ein Wasserbad überführt und anschließend auf Glasobjektträger aufgezogen. Zur besseren Haftung der Schnitte wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten bei 56 °C über Nacht inkubiert.

### **4.4.2 Hämalaun- und Eosin-Färbung (HE)**

Die HE-Färbung wurde nach dem Standardprotokoll des Chirurgischen Forschungslabors durchgeführt und bereits von Kroepil *et al*, 2013 publiziert.

Die 4 µm dicken Gewebeschnitte wurden 2 x 5 min in Xylol und danach je 2 min in einer absteigenden vergällten Ethanolreihe (99,5%, 96%, 80% und 70%) inkubiert. Dann wurden die OTs kurz in Aqua dest. gewaschen. Es erfolgte eine 45 sec Färbung in Hämalaun und darauf ein kurzes Spülen mit Leitungswasser. Anschließend wurden die OTs unter fließendem Leitungswasser für 5 min gebläut und darauf kurz in Aqua dest. eingetaucht. Es folgte eine 1 min Inkubation der Gewebeschnitte in 1% Eosin, welche anschließend kurz in Aqua dest. gewaschen wurden. Daraufhin wurden die Paraffin-Schnitte je 2 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80% und 99,5%) entwässert. Abschließend wurden die Gewebe-Schnitte für 2 x 5 min in Xylol inkubiert und mit zwei Tropfen Entellan und einem Deckgläschen eingedeckt.

Anhand der HE-gefärbten Gewebeschnitte wurde das Tumorareal mittels Hellfeldmikroskopie bestimmt und mit einem Folienstift auf dem Deckglas umrandet. Diese Markierung diente als Vorlage für die anderen ungefärbten Serienschnitte des gleichen Areals, welche für die DNA-Isolierung makrodissektiert wurden.

#### **4.4.3 Gill-Färbung**

Für die Makrodissektion von Tumorgewebe wurden 10 µm Gewebeschnitte mit Gill's Hämatoxylin gefärbt, um die Gewebestrukturen (Zellkerne) besser erkennen zu können. Als erstes wurde das Paraffin aus den Geweben gelöst. Dafür wurden die Schnitte 2 x für 5 min in Xylol inkubiert und dann für je 30 sec in einer absteigenden Ethanolreihe (99,5%, 95%, 80% und 70%) inkubiert und abschließend für 30 sec in Aqua dest. rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte 30 sec in Gill's Hämatoxylin getaucht (1:1 verdünnt mit Aqua dest.), dann 2 x 15 sec in Aqua dest. gespült und abschließend in einer 3% Glycerin-Lösung inkubiert. Dann folgte die manuelle Dissektion des Tumorgewebes.

#### **4.4.4 Isolation von Tumorgewebe per manueller Makrodissektion und anschließende DNA-Isolation**

Mithilfe einer Kanüle wurden die identifizierten Tumorareale von den OTs gekratzt und das isolierte Gewebe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mithilfe des QIAamp-DNA-Micro-Kits aus den Tumorgewebefragmenten isoliert. Dazu wurde zu dem Gewebe in dem 1,5 ml Reaktionsgefäß zuerst 180 µl ATL Puffer gegeben und dann mit 20 µl Proteinase-K über Nacht bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde 200 µl AL Puffer dazugegeben und 15 sec gemischt. Darauf wurde die DNA mit 100% Ethanol p.a. 15 sec gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde darauf auf eine QIAamp-MinElute-Säule überführt und bei 6.200 x g für 1 min zentrifugiert. Der Waschpuffer wurde entfernt, 500 µl AW1 Puffer wurde hinzugegeben und für 1 min bei 6.200 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem AW2 Puffer wiederholt. Nach Entfernen des Waschpuffers wurde die Säule mit dem Lysat für 3 min bei 17.000 x g zentrifugiert und dann mit Aqua dest. für 1 min zentrifugiert und die DNA eluiert.

Die in Aqua dest. gelöste, isolierte DNA wurde in eine Küvette überführt und die DNA-Konzentration mithilfe eines Photometers bestimmt. Zuerst wurde ein Nullwert festgelegt, um Messfehler zu vermeiden. Hierfür wurde eine Messung

mit 50 µl Aqua dest. am Photometer vorgenommen. Anschließend wurden 2 µl der DNA mit 48 µl Aqua dest. verdünnt und die DNA-Konzentration bestimmt.

## **4.5 Immunzytochemie**

### **4.5.1 CD44v6 und CK 5/14 als Marker für Plattenepithelkarzinome**

Die HNSCC-Zellen exprimieren eine Reihe von Proteinen, die es erlauben, die epithelialen Tumorzellen von nicht-epithelialen Zellen zu unterscheiden. Hierzu gehören die Zytokeratine 5 und 14 (CK 5/14), welche im Rahmen dieser Arbeit als Marker für die Identifizierung von Tumorzellen epithelialen Ursprungs genutzt wurden. Zytokeratine sind Strukturproteine des Zytoskeletts von Epithelzellen und gehören zu den Intermediärfilamenten (Moll, 1998; Moll *et al*, 1982).

Als weiterer Marker wurde CD44v6 verwendet, da dieses Protein normalerweise nicht von Epithelzellen der Mundschleimhaut exprimiert wird (van Hal *et al*, 1999). CD44v6 wird ausschließlich von Tumoren exprimiert und kann als Marker für epitheliale Tumorzellen genutzt werden (Rautava *et al*, 2003).

### **4.5.2 Immunhistochemische Färbung von CD44v6 und CK 5/14 an HNSCC-FFPE Gewebeschnitten**

Um die Spezifität der CD44v6 und CK 5/14 Antikörper zu überprüfen, wurden an Gewebeschnitten von allen untersuchten Tumoren eine immunhistochemische Färbung nach der Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode) durchgeführt. Diese Methode wurde nach Standardprotokoll des Chirurgischen Forschungslabors durchgeführt (Kroepil *et al*, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proben für die immunhistochemische Färbung mit Hilfe eines Mikrotoms von Paraffinblöcken geschnitten und wie in 4.4.1 bzw. 4.4.2. bereits beschrieben, fixiert, deparaffinisiert und rehydriert. Daraufhin wurden die Schnitte in einer 1 x „*Target-Retrieval*“-Lösung (1:10 in Aqua dest.) im Wasserbad bei 95 °C für 30 min erhitzt. Nach Abkühlen der Schnitte für etwa 20 min auf Raumtemperatur folgte ein 5 min Waschschrift in 1x PBS. Um endogene Peroxidasen zu inaktivieren und damit mögliche unspezifische Hintergrund-

färbungen zu vermeiden, wurde eine 30 minütige Inkubation der Schnitte bei RT mit Wasserstoffperoxid (0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 1x PBS) durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte noch einmal für 5 min in 1x PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer bei RT. Zunächst erfolgte eine 20 min Inkubation mit dem „*diluted normal serum*“ als Blockierungsserum. Anschließend wurde eine Antikörperlösung bestehend aus dem spezifischen primären Antikörper gegen CD44v6 (1:50) bzw. gegen Zytokeratin 5 (1:100) und Zytokeratin 14 (1:100) in 10% humanem AB-Serum in 1x PBS für 30 min bei RT auf den Schnitten inkubiert. Dann wurden die Schnitte 2 x 5 min mit 1x PBS-Puffer gewaschen. Danach wurde der sekundäre, Biotin-konjugierte Antikörper aufgetragen und für 30 min bei RT inkubiert. Nach 2 x 5 min Waschen mit 1x PBS wurde das ABC-Reagenz, welches einen Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex enthält, hinzugegeben und für 30 min inkubiert. Über eine freie Bindungsstelle am Avidin bindet sich dieser Komplex an das Biotin des sekundären Antikörpers. Nach erneutem Spülen mit 1x PBS wurde das DAB-Substrat bzw. Chromogen (DAB und DAB-Puffer) für 10 min im Dunkeln auf den Gewebeschnitten inkubiert, welches durch die an dem Antikörper-Komplex gebundene Peroxidase zu einem braunen Farbstoff oxidiert wurde. Daraufhin wurden die Schnitte für 2 x 5 min mit Leitungswasser gespült. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun für 15 sec und Bläuen der Färbung in Leitungswasser. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe zum Dehydrieren der Gewebe und darauf die Fixierung der Färbung durch eine 2 min Inkubation in Xylol. Zuletzt wurden die Schnitte mit zwei Tropfen Entellan und einem Deckgläschen luftdicht konserviert.

1 x Antikörpermix CD44v6

80 µl	Anti-CD44v6 (1:20 Stocklösung, nach Herstellerangaben der Fa. Leica)
120 µl	10% AB-Serum in 1x PBS

1x Antikörpermix CK 5/14

2 µl	Anti-CK 15 (100 µg/ml)
2 µl	Anti-CK 4 (100 µg/ml)
196 µl	10% AB-Serum in 1x PBS

## **4.6 Identifizierung und Isolierung einzelner positiv markierten Zellen mit dem Mikromanipulator**

### **4.6.1 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CD44v6 und CK 5/14**

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung erfolgte nach dem Standardprotokoll des chirurgischen Forschungslabors (Driemel *et al*, 2013). Die Zellen auf Haft-Objektträgern wurden bei -20 °C gelagert und unmittelbar vor der Färbung bei RT aufgetaut. Im ersten Schritt wurden pro Feld 200 µl einer 0,5% Triton-X-100/1x PBS-Lösung gegeben, welche die Zellmembran permeabilisiert. Dieser Schritt ist notwendig, damit die Antikörper (AK) das intrazytoplasmatische Zytokeratin binden können. Anschließend wurde dreimal mit 1x PBS gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Protein Antikörper-Bindungen wurde mit 20% humanem AB-Serum (in 1x PBS verdünnt) blockiert. Anschließend wurden die Zellen über 45 min mit dem Primärantikörper gegen das Transmembranprotein CD44v6 (1:50 in 10% AB-Serum/1x PBS) bei RT inkubiert und darauf dreimal 3 min mit 1x PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper Anti-Mouse Alexa 488 (1:200 in 10% AB-Serum/1x PBS) wurde für 30 min bei RT inkubiert.

Dieser sekundäre Antikörper Anti-Mouse Alexa 448 absorbiert bei 495 nm (blaues Licht) und emittiert bei 519 nm (grünes Licht). Von diesem Schritt an wurde hierbei im Dunkeln gearbeitet. Es wurde dreimal für je 3 min mit 1x PBS gewaschen, und für die zweite Färbung wurden die Zellen auf den Objektträgern ebenfalls mit 20% AB-Serum in 1x PBS für 20 min inkubiert. Der zweite Primär-Antikörper-Mix bestand aus einer Kombination der Antikörper gegen Zytokeratin 5 (1:100 in 10% AB-Serum/1x PBS) und gegen Zytokeratin 14 (1:100 in 10% AB-Serum/1x PBS). Von dieser zweiten Primärantikörperlösung wurden pro Feld 200 µl aufgetragen und für 45 min bei RT inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen für 3 min mit 1x PBS. Der zweite sekundäre Antikörper Anti-Rabbit-Cy3 (1:100 in 10% AB-Serum/1x PBS) wurde in einem Volumen von 200 µl pro Feld aufgetragen und für 30 min inkubiert.

1 x Antikörperlösung 1. Primär-AK

80 µl	Anti-CD44v6 (1:20 Stocklösung, nach Herstellerangaben der Fa. Leica)
120 µl	10% AB-Serum in 1x PBS

1x Antikörperlösung 1. Sekundär-AK

1 µl	Anti-Mouse Alexa488 (1:200)
199 µl	10% AB-Serum in 1x PBS

1x Antikörperlösung 2. Primär-AK

2 µl	Anti-CK 15 (100 µg/ml)
2 µl	Anti-CK 4 (100 µg/ml)
196 µl	10% AB-Serum in 1x PBS

1x Antikörperlösung 2. Sekundär-AK

2 µl	Anti-Rabbit Cy3 (100 µg/ml)
196 µl	10% AB-Serum in 1x PBS

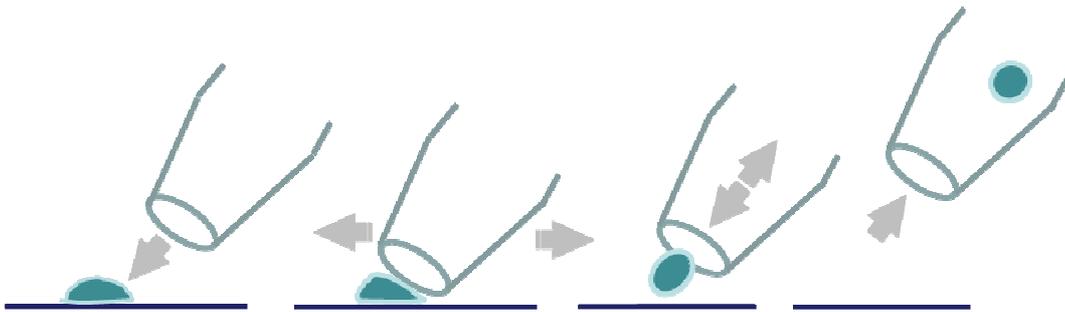
Dieser absorbiert bei 552 nm (grünes Licht) und emittiert bei 565 nm (rotes Licht). Daraufhin wurden die Zellen auf den Haft-OTs für dreimal 3 min mit 1x PBS gewaschen, dann 4 min in 1% Paraformaldehyd fixiert und erneut dreimal 3 min in 1x PBS gewaschen.

Bei allen Färbungen wurde als Positivkontrolle die Tumor-Zelllinie UD-SSC-4 mitgeführt, welche sowohl CD44v6, als auch CK 5/14 exprimiert. Als Negativkontrollen zum Ausschluss unspezifischer Färbungen wurden Isotypkontrollen bei jedem Präparat durchgeführt. X0903 diente als polyklonaler Anti-Rabbit IgG-Kontrollantikörper für die Zytokeratin-Antikörper und bindet kein menschliches Epitop; es ist ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen-Serum. MOPC 21 wurde als Maus-Serum-Kontroll-Antikörper (IgG1, monoklonal) für den CD44v6-Antikörper verwendet.

Zur Dokumentation wurden Fotos der markierten Zellen unter UV-Licht der entsprechend gefilterten Wellenlänge der fluoreszierenden Antikörper angefertigt. Mittels Durchlichtmikroskopie wurde die allgemeine Morphologie der Zellen betrachtet.

Die CD44v6 und CK 5/14 positiven Zellen wurden wie auch von Stoecklein *et al.* beschrieben (Stoecklein *et al.*, 2008) mit Hilfe eines Mikromanipulators von den Objektträgern isoliert (Abb. 4.1). Für die Isolation wurden die Zellen auf den Haft-Objektträger zunächst mit 1x PBS + 0,5% Igepal überschichtet. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden unter Sicht vorsichtig vom Objektträger

gelöst und in eine Glaskapillare aufgesogen. Die einzelnen Zellen wurden in einem Feld eines 8-Feld-Objektträgers überführt, welches mit einem Tropfen 1x PBS benetzt war. Unter Sicht wurde diese Zelle mit einer 1 µl Pipette aus dem Tropfen aufgesogen und in ein PCR-Reaktionsgefäß mit vorgelegten Proteinase-K Mix überführt.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der Isolation einer Einzelzelle von einem Objektträger.

Für die Isolierung von Tumorzellen aus Zellsuspension der Frischgewebe von HNSCC-Patienten wurden Tumorzellpellets mit  $2 \times 10^6$  Zellen in 150 µl Cytofix fixiert, durch Resuspendieren gelöst und 20 min auf einem Orbital-Schüttler bei RT inkubiert. Danach wurde die Zelllösung mit 1x PermWash - einer permeabilisierenden Waschlösung - auf 1,5 ml aufgefüllt und bei 200 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 300 µl 1x PermWash resuspendiert und dann mit 10 µl des CD44v6 Antikörper und 10 µl des CK 14 Antikörper (Tab. 1.4.5) für 20 min bei RT auf dem Orbital-Schüttler inkubiert. Darauf wurde die Zelllösung mit 1x PermWash aufgefüllt und vorsichtig resuspendiert; anschließend bei 200 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gefärbten Zellpellets wurden in 200 µl 1x PermWash resuspendiert und die Zellen dann durch ein 50 µm Sieb filtriert. Zu dem finalen Volumen von 200 µl der fluoreszenzmarkierten Zellen wurden zusätzlich 50 µl Hoechst-Lösung (70 ng/ml in 1x PBS) für eine Kernfärbung hinzugegeben. Mit dieser Färbung können zellkernlose Zellfragmente von intakten Zellen unterschieden werden.

Parallel wurden Isotypkontrollen für jedes Präparat durchgeführt. Anstelle des CD44v6-Antikörper wurde ein Anti-Maus-IgG1 (10 µg/ml), und im Falle des CK14-Antikörpers ein Anti-Maus-IgG3<sub>k</sub> Antikörper (10 µg/ml) verwendet.

Positiv markierte Einzelzellen wurden mithilfe des MoFlo XDP der Firma Beckman-Coulter (in Kooperation mit der „Cellsort-Facility“ des ITZ und Katharina Raba) isoliert und jeweils in ein Gefäß einer 96-Loch PCR-Platte überführt, in welches zuvor 5 µl eines modifizierten Proteinase-K Mix (siehe Kapitel 4.8.2) vorgelegt wurde.

#### **4.7 Isolierung einzelner mononukleärer Zellen aus Blut**

Um Einzelzell-Amplifikate von mononukleären Zellen für Kontrollexperimente und als Referenz-DNA für die aCGH Experimente zu gewinnen, wurden einzelne mononukleäre Zellen aus Blut von gesunden Spendern isoliert und das Zellgenom amplifiziert.

Das abgenommene Blut bzw. das Buffy-Coat Präparat wurden in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit 1x PBS vermischt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 170 x g für 10 min ohne Bremse zentrifugiert und danach der Überstand mit einer Pipettierhilfe bis zum Zellpellet abgenommen. Es wurde zu dem Zellpellet das doppelte Volumen an 1x PBS gegeben und das Pellet darin resuspendiert. In einem neuen 50 ml Röhrchen wurde Ficoll in einem Verhältnis von 1:1 vorgelegt und die Zellsuspension darauf überschichtet. Die Lösungen wurden darauf bei 550 x g für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in 1x PBS (1:1) aufgenommen. Je nach Zellzahl wurde die Zellsuspension 1:100 - 1:1000 mit 1x PBS verdünnt. 10 µl der Suspension wurde in eine Petrischale gegeben. Der Boden der Petrischale (Durchmesser 5 cm) wurde vorher mit FCS abgesättigt und dann mit 5 ml 1x PBS aufgefüllt. Unter einem Lichtmikroskop mit 100 x Vergrößerung waren im optimalen Fall 2 bis 3 Zellen im Sichtfeld zu sehen. Einzelne Zellen wurden mit einer 1 µl Pipette aus der Lösung isoliert und in ein PCR-Reaktionsgefäß mit Proteinase-K -Reaktionsmix überführt.

## 4.8 Amplifikation von Einzelzellgenomen

Die Einzelzell-Amplifikation wurde nach Standardprotokoll unseres Labors durchgeführt (z.B. Möhlendick *et al*, 2013). Erstmals wurde diese Methode durch C. Klein beschrieben (Klein *et al*, 1999).

### 4.8.1 Protein-Verdau

Die aufgenommene Zelle wurde in ein 200 µl Reaktionsgefäß überführt, in dem 2 µl Proteinase-K Mix vorgelegt war:

1x Proteinase- K Mix:

0,2 µl OPA Puffer

0,13 µl Igepal 10%

0,13 µl Tween 10%

0,26 µl Proteinase-K (10 mg/ml)

1,28 µl H<sub>2</sub>O

Der Reaktionsmix wurde über 10 Stunden bei 42 °C in einem Thermocycler inkubiert. In diesem Schritt werden die Proteine der Zelle abgebaut. Die Proteinase-K wurde dann durch eine 10 min Inkubation bei 80°C deaktiviert.

### 4.8.2 MseI-Restriktionsverdau

Das Genom der einzelnen Zelle wurde mit dem Restriktionsenzym *MseI* (Schnittstelle: T<sup>A</sup>TAA) geschnitten, wodurch an den 5'-Enden TA-Überhänge („sticky-ends“) entstehen. Der Restriktionsverdau läuft bei 37 °C über 3 Stunden in einem Thermocycler. Zu der mit Proteinase-K verdauten Zelle wurde folgender Reaktionsmix zugeben:

0,2 µl OPA Puffer

0,2 µl *MseI* high concentration (10 U)

1,6 µl Aqua dest.

Das Restriktionsenzym *MseI* wurde anschließend durch eine 5 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert und der Restriktionsverdau gestoppt.

Für die Einzelzellablage mithilfe des FACS wurde das Volumen des vorgelegten Proteinase-K Mix von 2 µl auf 5 µl erhöht:

#### 1x modifizierter Proteinase-K Mix

1,2 µl Proteinase K (10 mg/ml)

3,8 µl Aqua dest.

Nach der Proteindegradation wie in 4.8.1 beschrieben, wurde pro Reaktion 1 µl des OPA Puffers und 1 µl des *MseI*-Enzyms dazugegeben und wie in 4.8.2 beschrieben in einem Thermocycler inkubiert.

#### **4.8.3 Hybridisierung der Adapter**

Die doppelsträngigen Adapter werden aus den Oligonukleotiden LIB1 und dd*MseI* gebildet. Die Basenpaarung des Adapters wird dabei durch langsames Abkühlen in der PCR-Maschine nach einem programmierten Gradienten (65 °C bis 15 °C für je 1 min pro Temperaturschritt) erzielt. Hierfür wurde folgender 1x Reaktionsmix pipettiert:

0,5 µl OPA Puffer

0,5 µl LIB1 Primer (100mM)

0,5 µl ddMSE1 Primer (100mM)

1,5 µl Aqua dest.

#### Verwendete Oligonukleotide:

LIB1: 5'-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT-3'

ddMSE1: 3'-Cdd-GA CAG TCA AT-5'

Ligierter Adapter mit "sticky-ends":

5'-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT-3'  
3'-Cdd -GA CAG TCA AT-5'

#### **4.8.4 Ligation**

An die durch den Restriktionsverdau entstandenen Überhänge der DNA-Fragmente wurden die LIB1/ddMSE1 Adapter ligiert. Dazu wurden zu jedem mit *MseI* verdaulichem Einzelzell-Genom 3 µl des generierten Adapters sowie 1 µl

T4 DNA-Ligase und 1 µl ATP (10 mM) gegeben. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 15 °C.

#### 4.8.5 Adapter-Linker-PCR

Zu den fertig ligierten Adapter-DNA-Fragmenten wurde jeweils 40 µl des unten aufgeführten PCR-Reaktionmixes gegeben:

- 3 µl BM Puffer 1
- 2 µl dNTP's (10 µM)
- 35 µl Aqua dest.
- 1 µl DNA PolMix

Für die notwendige Auffüllreaktion der 3'-Enden der Adapter-Konstrukte wurde zunächst der ddMse-Adapter vom DNA-Fragment mit einem 3-minütigen 68°C-Schritt denaturiert. Im nächsten Zyklus wurde dieser DNA-Abschnitt durch die DNA-Polymerase komplementär aufgefüllt. Im letzten Schritt geschieht die eigentliche Amplifikation des Einzelzellgenoms (Klein *et al*, 1999).

**Tabelle 4.2:** PCR-Programm der Adapter-Linker-PCR.

1x		14x		8x		22x		1x	
68°C	3 min	94°C	40 sec	94°C	40 sec	94°C	40 sec	68°C	3.40 min
		57°C	30 sec	57°C	30 sec + 1°C/Zyklus	65°C	30 sec	4°C	∞
		68°C	1.30 min + 1 sec/Zyklus	68°C	1.45 min + 1 sec/Zyklus	68°C	1.53 min + 1 sec/Zyklus		

Das entstandene primäre Amplifikat wurde bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

#### 4.8.6 Multiplex-PCR

Als Amplifikationskontrolle der verschiedenen Einzelzell-DNA Präparate wurde wie bei Möhlendick *et al* 2013 beschrieben eine modifizierte Multiplex PCR nach

Knijnenburg *et al* (Knijnenburg *et al*, 2007) verwendet, die als Qualitätskontrolle von Einzelzell-Amplifikaten für aCGH-Analysen dient:

**Tabelle 4.3:** *Verwendete Primer* und deren Sequenzen für die Multiplex-PCR.

Primer	Sequenz	Konz. in Reaktion
LAMC1 For	TCTGCTTTGGGCATTCTTCT	0,2 µM
LAMC1 Rev	TTCTAACAGGTTGGGGGATG	0,2 µM
GRIK5 For	CTAGCTCCCACCAACCTCAG	0,1 µM
GRIK5 Rev	CTCGATGATCCCGTTGATCT	0,1 µM
NEK9 For	GCAGGAGGGAACCTGTATGA	0,08 µM
NEK9 Rev	CAGGAAAGAAAGCCCACAGA	0,08 µM
CADPS For	CCCCACCTTCTTCACTACA	0,08 µM
CADPS Rev	GTGTGCACATACCACCGAAG	0,08 µM
PICK1 For	TCGTATGCTGGAGTCCTGTG	0,08 µM
PICK1 Rev	GGGATGGCTTTGTTGAGGTA	0,08 µM
DNAH9 For	GGGTCTCATCACCAGCATT	0,08 µM
DNAH9 Rev	GCCATCTCCACATGGTCTT	0,08 µM

Die Amplifikationsprodukte repräsentieren *Mse*I-Fragmente der Größen 171 bp (LAMC1), 490 bp (NEK9), 625 bp (DNAH9), 717 bp (CADPS), 1111 bp (PICK1) und 2520 bp (GRIK5) (Abb. 4.2). Da innerhalb des 717 bp großen Fragmentes eine *Mse*I-Schnittstelle lokalisiert ist, wird dieses Fragment üblicherweise in der WGA nicht amplifiziert und wurde daher für die Bewertung der Amplifikationskontrolle nicht berücksichtigt. Eine aCGH sollte mit Amplifikaten durchgeführt werden, die in der Multiplex-PCR mindestens drei der fünf möglichen Amplifikationsprodukte zeigen (Möhlendick *et al*, 2013). Der PCR-Reaktionsmix für den Nachweis der spezifischen Sequenz bestand aus:

1x Reaktionsmix:

5 µl Dream Taq Green PCR Master Mix (2x)

1 µl Primer Mastermix (10x)

6,3 µl Aqua dest.

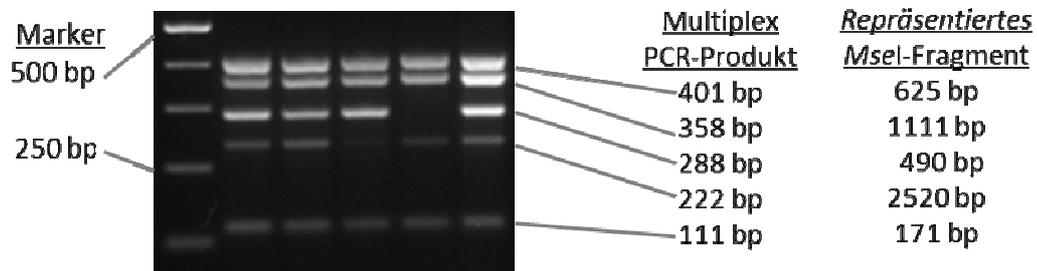
+0,3 µl primäres Amplifikat

**Tabelle 4.4:** PCR-Programm der Multiplex-PCR.

1x		33x		1x		$\infty$
95°C	2 min	95°C	30 sec	72°C	5 min	4°C
		60°C	40 sec			
		72°C	1 min			

#### 4.8.7 Gelelektrophorese

Von den Amplifikaten der Kontroll-PCR wurden je 10  $\mu$ l PCR-Produkt, 3  $\mu$ l Gel-Ladepuffer und als DNA-Größenstandard 7  $\mu$ l der 50 bp DNA-Leiter auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen. Die Auftrennung der PCR Produkte erfolgte mittels Elektrophorese. Begonnen wurde die Auftrennung mit 15 min bei 80 Volt und wurde anschließend für weitere 45 min bei 120 Volt fortgesetzt. Die Gele wurden mithilfe des Versadoc Imaging-Systems dokumentiert.



**Abbildung 4.2:** Repräsentatives Ergebnis einer Amplifikationskontrolle der WGA mittels der Multiplex-PCR.

#### 4.9 aCGH

Die Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (aCGH) ist ein zytogenetisches Verfahren zum Analysieren der somatischen Kopienanzahl (Somatic Copy Number Alteration, SCNA) einer Test-DNA im Vergleich zu einer Referenz-DNA. Diese Technik ermöglicht es, schnell und effizient zwei verschiedene DNA-Proben in Bezug auf Zugewinne oder Verluste ganzer

Chromosomen oder subchromosomalen Regionen, zu vergleichen (Kallioniemi *et al.*, 1992). Die CGH kann dabei nur unbalancierte Chromosomenanomalien erkennen. Dies ist darin begründet, dass balancierte Chromosomenanomalien wie Translokationen, Inversionen oder Ringchromosomen keinen Einfluss auf die Kopienanzahl haben (Pinkel & Albertson, 2005).

Für die vorliegende Arbeit wurden 82 HNSCC-Einzelzellamplifikate, mehrere Einzelzellamplifikate der Leukämie-Zelllinie REH und aus Blut isolierte einzelne mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMNCs) mithilfe der aCGH-Technik untersucht. Als Referenz-DNA dienten Einzelzellamplifikate von PBMNCs von gesunden Spendern oder Einzelzellamplifikate von Lymphozyten der Zelllinien mLCL oder wLCL.

#### **4.9.1 Fluoreszenzmarkierung der Einzelzellamplifikate für aCGH**

Die Fluoreszenzmarkierung wurde nach dem Arbeitsprotokoll "Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis" Version 7.1 der Fa. Agilent Technologies durchgeführt. Die Markierung der Einzelzellamplifikate erfolgte mittels dem „Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit“ der Fa. Agilent Technologies. Hierfür wurde 1 µg des Tumor-Einzelzellamplifikats mit Cyanin 5 (Cy5) und 1 µg Referenz-Einzelzellamplifikat mit Cyanin 3 (Cy3) durch „random primed labeling“ markiert. Bei dieser Markierungsreaktion werden nach dem Zufallsprinzip Hexanukleotid-Primer an die Template-DNA für eine Neusynthese der DNA hybridisiert. Hierzu wird die Template-DNA denaturiert und anschließend wieder abgekühlt, um eine Anlagerung der Hexanukleotide an die DNA zu ermöglichen. Die Synthese der komplementären DNA-Stränge startet an den gebundenen Hexanukleotiden und wird durch das Exo-Klenow-Fragment katalysiert. Dieses Enzym hat die besondere Eigenschaft, dass es die Polymeraseaktivität der DNA-Polymerase I von *E.coli*, sowie die 3'-5' Exonukleaseaktivität (für die "blunt ends"), jedoch keine 5'-3' Exonukleaseaktivität besitzt. Während der Synthese werden neben den unmodifizierten Nukleotiden in einem bestimmten Verhältnis auch markierte Nukleotide, Cyanin 3-dUTP oder Cyanin 5-dUTP, eingebaut. Das Einzelzell-

Amplifikat wurde in einem finalen Volumen von 24  $\mu\text{l}$  für die Markierung in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben und 5  $\mu\text{l}$  der Random Primer wurden hinzugefügt. Der Reaktionsmix wurde vorsichtig resuspendiert und für 3 min bei 95 °C im Thermocycler denaturiert. Die Probe wurde danach für 5 min bei 4 °C inkubiert. Es wurde folgender 1x Mastermix angesetzt:

2 $\mu\text{l}$	Aqua dest.
10 $\mu\text{l}$	5x Puffer
5 $\mu\text{l}$	10x dNTP
	Cyanin 3-dUTP
3 $\mu\text{l}$	bzw.
	Cyanin 5-dUTP
1 $\mu\text{l}$	Exo-Klenow Fragment

Anschließend wurden 21  $\mu\text{l}$  des Mastermixes mit Cy5 zu der Test-DNA und 21  $\mu\text{l}$  des Mastermixes mit Cy3 zu der Referenz-DNA gegeben. Die Proben wurden getrennt für 2 h bei 37 °C in einem Thermocycler inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Inkubation bei 65 °C für 10 min gestoppt.

Anschließend wurde die fluoreszenzmarkierte DNA mithilfe von Amicon-Säulen der Fa. Millipore nach dem Waschprotokoll der Fa. Agilent von unnötigen Komponenten der Markierungs-PCR wie Salzen, Enzymen und einzelne Nukleotiden befreit. Insbesondere nicht eingebaute markierte Nukleotide können unspezifische Signale beim Auslesen des Arrays erzeugen („Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis" Version 7.1).

Der Erfolg der Markierungs-PCR wurde über die Einbaurate der markierten Nukleotide in die DNA, der sogenannten „spezifische Aktivität“, bestimmt. Die spezifische Aktivität spiegelt das Verhältnis der Menge Fluoreszenz-markierter Nukleotide zu unmarkierten Nukleotiden wider. Die spezifische Aktivität ist wie folgt definiert (Arbeitsprotokoll „Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis" Version 7.1 der Fa. Agilent Technologies):

$$\text{Spez. Aktivität (pmol}/\mu\text{g)} = \frac{(\text{pmol}/\mu\text{l Farbstoff})}{(\mu\text{g}/\mu\text{l DNA})}$$

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde die Absorption der Farbstoffe Cy3 (550 nm) und Cy5 (650 nm) mittels eines Spektralphotometer bestimmt. Für die Messung wurde 1,5 µl der markierten DNA unverdünnt eingesetzt. Laut Herstellerangaben der Fa. Agilent, liegt die zu erwartende Spezifische Aktivität für Cy3 zwischen 20 – 30 pmol/µg DNA und für Cy5 zwischen 15 -25 pmol/µg DNA.

#### **4.9.2 Vorbereitung der fluoreszenzmarkierten Einzelzellamplifikate für die Hybridisierung**

Nach dem Waschprotokoll und der Messung der spezifischen Aktivität wurde, nach Herstellerangaben der Fa. Agilent, die Test- und Referenz-DNA vereinigt und nach der Zugabe eines Hybridisierungsmix denaturiert.

##### 1x Hybridisierungsmix:

5 µl Cot-1 DNA (1 mg/ml)  
11 µl 10x Blockierungs-Lösung  
55 µl 2x Hybridisierungspuffer

Der Hybridisierungsmix wurde für 3 min bei 95 °C und dann für 30 min bei 37 °C in einem Heizblock inkubiert.

#### **4.9.3 Präparation genomischer DNA für aCGH-Analysen**

Im Gegensatz zu den bereits fragmentierten Einzelzellamplifikaten muss die hochmolekulare gDNA zunächst geschnitten werden, bevor sie markiert werden kann. Hierfür wurde ein Restriktionsverdau mit *AluI* und *RsaI* nach dem Arbeitsprotokoll „Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis" Version 7.1 der Fa. Agilent durchgeführt. Das Enzym *AluI* schneidet hierbei in der Sequenz AG'CT und *RsaI* in GT'AC. Zunächst wurde 1 µg DNA mit Aqua dest. auf ein Volumen von 20,2 µl eingestellt. Die Reaktionslösung setzte sich aus 2 µl Aqua dest., 2,6 µl Puffer C (10x), 0,2 µl BSA (10 µg/µl), 0,5 µl *AluI* (10 U/µl) und 0,5 µl *RsaI* (10 U/µl) zusammen. 5,8 µl der Reaktionslösung wurden zu

den 20,2 µl DNA gegeben und für 2 h bei 37 °C und 400 rpm im Schüttelheizblock inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation für 20 min bei 65 °C gestoppt und die Lösung anschließend bei 4 °C inkubiert. Für die nachfolgende Markierung sollten die DNA-Fragmente eine Größe zwischen 200 bp und 500 bp aufweisen. Die Fragmentgröße wurde daher auf einem 0,8% Agarosegel und einer Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurden 2 µl DNA mit 8 µl Aqua dest. und 3 µl 5x-Ladepuffer vermischt und neben einer 50 bp-Leiter als Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die fragmentierte DNA wurde bei -20°C gelagert oder direkt fluoreszenzmarkiert.

Die Fluoreszenzmarkierung wurde nach dem Arbeitsprotokoll „Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis" Version 7.1 der Fa. Agilent durchgeführt. Im Unterschied zu den Einzelzellamplifikaten wurde für die Analyse der gDNA ein Arrayformat (8x60k) mit niedrigerer Auflösung gewählt. Die Markierung der gDNA erfolgte wie beschrieben, mittels dem „Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit" der Fa. Agilent Technologies. Hierfür wurde 500 ng der Test-gDNA mit Cy5 und 500 ng Referenz-gDNA mit Cy3 markiert.

#### 1x Markierungsmix

2 µl	Aqua dest.
5 µl	5x Puffer
2,5 µl	10x dNTP
	Cyanin 3-dUTP
1,5 µl	bzw.
	Cyanin 5-dUTP
0,5 µl	Exo-Klenow Fragment

Die Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten gDNA, wie auch die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte wie bereits beschrieben.

Nach der Aufreinigung und Messung der spezifischen Aktivität wurde nach Herstellerangaben der Fa. Agilent die Referenz- und Test-DNA vereinigt und nach der Zugabe eines Hybridisierungsmix, wie im Kapitel zuvor beschrieben, denaturiert.

1x Hybridisierungsmix:

2 µl Cot-1 DNA (1 mg/ml)  
4,5 µl 10x Blockierungs-Lösung  
22,5 µl 2x Hybridisierungspuffer

**4.9.4 Hybridisierung der Proben und Waschen des CGH-Arrays**

Für die Hybridisierung wurden nach Herstellerangaben der Fa. Agilent die markierten DNA-Proben auf die vier Areale eines CGH Arrays pipettiert und mit einem „Backing“, einem Objektträger mit passenden Dichtungsringen für den DNA-Array, luftdicht und wasserdicht versiegelt. Anschließend wurden die Proben für 24 h bei 65°C und 20 rpm in einem Hybridisierungsofen der Fa. Agilent Technologies inkubiert.

Nach der Inkubation wurde der Array nach den Angaben im aCGH-Arbeitsprotokoll (Version 7.1 der Fa. Agilent Technologies) unter einem Abzug in 200 ml Glasküvetten gewaschen. Zuerst wurde das „Backing“ vom Array unter Zuhilfenahme einer Pinzette in „aCGH-Waschpuffer I“ abgelöst. Der Array wurde dann für 5 min bei RT in „aCGH-Waschpuffer I“ und anschließend bei 37 °C für 1 min in „aCGH-Waschpuffer II“ gewaschen. Danach wurden die Microarrays für 10 sec in Acetonitril bei RT inkubiert und abschließend für 30 sec bei RT in die „Stabilisierungs- & Trockenlösung“ gegeben. Die „Stabilisierungs- & Trockenlösung“ schützt das Cy5 Molekül vor dem Ausbleichen, indem es die Oxidations-Reaktion über das im Sauerstoff gelöste Ozon verhindert. Nach dem Waschen wurde der Array in einen Kunststoffhalter mit einer Ozon-Schutzkappe eingespannt und direkt gescannt.

**4.9.5 Scannen des CGH-Arrays**

Die CGH-Arrays wurden mit dem Microarray-Scanner G2565CA von der Fa. Agilent Technologies mit 3 µm Auflösung und 16 bit Farbtiefe prozessiert. Die Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 werden mit zwei Lasern, einem „SHG-YAG“-Laser („Second-Harmonic-Generation-Yttrium-Aluminium-Granat“) mit einer

Emissionswellenlänge von 532 nm für Cy3 und einem „HeNe“-Laser („Helium-Neon“) mit einer Emissionswellenlänge von 633 nm für Cy5, angeregt (Handbuch: „G2565CA Microarray Scanner System“, 2008, Fa. Agilent).

Hierbei absorbieren die Fluorochrome das Laserlicht und emittieren längerwelliges, weniger energetisches Licht wodurch der sogenannte „Rotshift“ entsteht. Die Lichtsignale gelangen durch spezifische Filter für Cy3 und Cy5 in einen Photoelektronenvervielfacher. Durch diesen können schwache Lichtsignale durch Erzeugung und Verstärkung eines elektrischen Signals detektiert und anschließend als Bilddatei digitalisiert werden. Die Bilddatei ist die Grundlage für die Datenextraktion.

Bei einer Hybridisierung von gleichen Anteilen der amplifizierten Fragmente der Test- und Referenz-DNA erscheinen die Spots gelb; bei einer Überrepräsentation der Test-Amplifikate erscheinen die Punkte rot-orange und bei einer Unterrepräsentation grün (Manual „Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis“ Version 7.1 der Fa. Agilent).

#### **4.9.6 Datenextraktion und Datenvorbehandlung**

Zur Datenextraktion wurde das Programm „Feature Extraction Version 11.5.1.1“ (Fa. Agilent Technologies) verwendet. In diesem Schritt der Datenprozessierung wird ein optisches Signal in einen Zahlenwert umgewandelt.

Zunächst wurde ein Flächenraster über die Bilddatei gelegt und mit dessen Hilfe wurde die Position der Oligonukleotide für die Datenextraktion bestimmt („User Guide: Feature Extracion“, Version 11 der Fa. Agilent). Hier geben insbesondere die hybridisierten und unhybridisierten Kontrolloligonukleotide in den vier Eckpartien des Microarrays Aufschluss über den korrekten Verlauf der Hybridisierung. Anschließend wurden die Intensitäten der beiden Fluorochrome normalisiert, unspezifische Hintergrundsignale herausgefiltert und die Verhältnisse der Intensitäten verglichen. Der  $\log_2$ ratio-Wert ist hierbei das logarithmierte Verhältnis zur Basis 2 des Fluoreszenz-Signals der Probe zu dem der Referenz-Probe („User Guide: Feature Extracion“ Version 11 der Fa. Agilent

Technologies). Die zu erwartende Kopienzahl kann über folgende Formel berechnet werden:

$$\text{Kopienzahländerung} = 2^{\log_2 \text{ratio}}$$

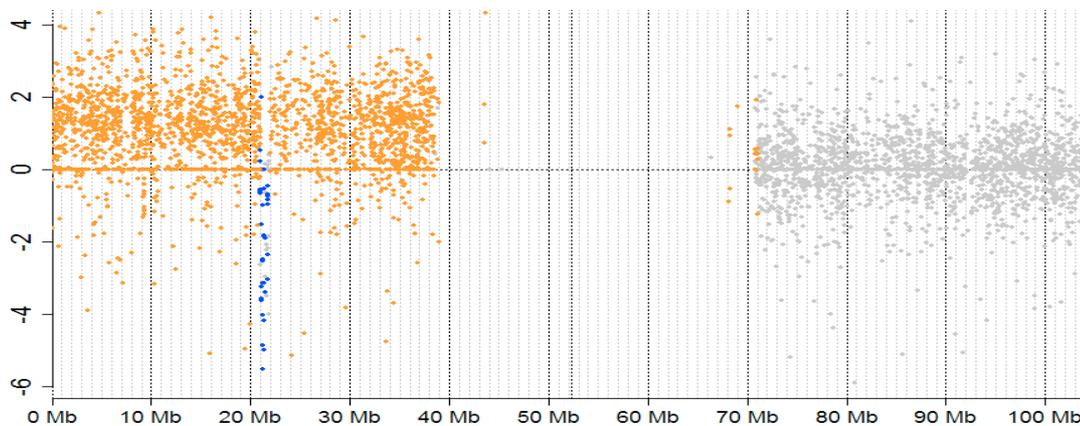
Nach dieser Formel entspricht eine  $\log_2$ ratio von 0,6 der 1,5-fachen Kopienanzahl und ein Wert von -1 der 0,5-fachen Kopienanzahl. Die Software gibt die Ergebnisse in einer Textdatei aus, die mit einem entsprechenden Analyseprogramm ausgewertet werden kann. Zusätzlich erhält man einen Qualitätsbericht („QC-Report“), dem man Informationen über den Verlauf der Analyse und die Qualität des Arrays entnehmen kann. Der Durchschnitt der  $\log_2$ ratio-Varianzen von Oligonukleotid zu Oligonukleotid über das gesamte Genom, wird als „Derivative of the Log-Ratio-Spread“ (DLRS) bezeichnet und ist einer der wichtigsten Qualitätsparameter. Bei einem zu hohen DLRS-Wert kommt es zu einer hohen Streuung der Signalwerte der Oligonukleotide, was dazu führen kann, dass Aberrationen nicht mehr voneinander abgegrenzt werden können. Die 4x180k aCGH-Einzelzell-Experimente wurden ggf. wiederholt bzw. aussortiert, wenn ein DLRS-Wert größer als 1,8 gemessen wurde (siehe auch Ergebnisteil 5.3.2).

Die 8x60k basierten aCGH-Experimente für die gDNA-Analyse sollten laut Herstellerangaben der Fa. Agilent einen DLRS-Wert von 0,3 nicht überschreiten. Experimente die einen DLRS-Wert  $>0,3$  zeigten, wurden wiederholt bzw. aussortiert.

#### **4.9.7 Detektion von Bruchpunkten und Bestimmung der Kopienanzahlveränderung bei Einzelzellgenomen und Zelllinien DNA**

Die Datenanalyse, wie auch die Visualisierungen der aCGH-Ergebnisse, wurden mit Hilfe aCGH-Daten-Analysepaketen aus dem Bioconductor Programm ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) durchgeführt. Vor der Analyse wurden die Rohdaten, die zunächst als normalisierten  $\log_{10}$ -Werte in der extrahierten „Feature Extraction“ Datei vorlagen, in  $\log_2$  Werte umgewandelt. Alle weiteren Analysen wurden auf Basis der  $\log_2$  Werte berechnet. Alle Oligonukleotid Spots, welche

von dem „Feature Extraction“ Programm als gesättigt oder nicht gleichmäßig hybridisiert markiert waren, wurden entfernt. Da gut charakterisierte genreiche Regionen durch mindestens eine Sonde und krebisrelevante Gene durch mindestens zwei Sonden repräsentiert werden ([www.chem.agilent.com/library/brochures/5990-3368en\\_lo.pdf](http://www.chem.agilent.com/library/brochures/5990-3368en_lo.pdf)), wurde für Oligonukleotide die mehrfach detektiert wurden, der Mittelwert berechnet. Für die Bruchpunktanalyse wurde der im „GLAD“-System implementierte „HaarSeg“-Algorithmus mit den Standardparametern (Ausnahme: haarStartLevel = 3, haarEndLevel = 6) verwendet (Ben-Yaacov & Eldar, 2008; Hupe et al, 2004). Für die eigentliche Aberrations-Detektion der 4x180k Array-Plattform wurde ein  $\log_2$ ratio Schwellenwert gewählt, der bereits geglättete Werte über 0,2 als chromosomalen Zugewinn und unter 0,2 als chromosomalen Verlust wertet. Darauf folgte ein Filterschritt, welcher Veränderungen entfernt, die zu klein sind (weniger als drei Oligonukleotide mit einem  $\log_2$ ratio Wert von  $\pm 0.2$ ) um als „echter“ Verlust oder Gewinn gewertet zu werden.



**Abbildung 4.3:** aCGH-Profil (4x180k Array-Plattform) von Chromosom 9 einer HNSCC-Einzelzelle (Primärtumor Fall #170) nach Analyse und Visualisierung mit dem R-Modul „GLAD“. An der Ordinate ist die  $\log_2$ ratio abzulesen. Die Abzisse gibt die Basenpaarpositionen von Chromosom 9 an. Jeder Punkt repräsentiert eine Sonde. Zugewinne sind orange und Verluste blau markiert.

Die Parameter der verschiedenen Filterschritte wurden anhand der zytogenetisch gut charakterisierten Leukämie-Zelllinie REH (Binder *et al*, 2014)

ausgetestet und diese Einstellungen für das hier analysierte Kollektiv übernommen.

Die computergestützte Auswertung kann auf Grund der Schwankungen der  $\log_2$ ratio zu einer Ausgabe falsch-positiver SCNA oder falsch-negativer SCNA führen. Daher war es notwendig, stichprobenartig detektierte SCNA mit einer zweiten, unabhängigen Methode (z.B. der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, FISH) zu überprüfen. Hierfür wurden die chromosomalen Lokalisationen der Tumorsuppressorgene *TP53*, *CDKN2A* und Onkogene *MYC*, *CCND1*, *EGFR* gezielt mit der FISH Methode analysiert und mit den aCGH-Daten verglichen.

#### **4.9.8 Filter-Einstellungen und Array-Auflösung**

Laut Hersteller der Fa. Agilent hat z.B. der 4x180k Array eine genomweite mediane Abdeckung von ca. 13 kb, d.h. zwischen zwei Sonden besteht ein medianer Abstand von 13 kb. Durch die gewählten Filter werden mindestens 3 Oligonukleotide, mit einem  $\log_2$ ratio-Grenzwert von mindestens  $\pm 0,2$ , als eine Region zusammengezogen und die  $\log_2$ ratio Werte gemittelt, um die Kopienanzahlveränderungen zu berechnen. Tatsächlich wäre hier die Auflösung: 3 Oligos á 60 bp = 180 bp. Dazu addiert werden 3 x 13.000 bp (durchschnittliche Distanz zwischen den Oligonukleotiden, Quelle: „Detail and Specification Note: Human Genome aCGH Microarray Kit 4x180k“, Fa. Agilent). Dies ergibt rechnerisch eine durchschnittliche Auflösung von ca. 40 kb (Tab. 4.5). Für die hier verwendeten Filtereinstellungen bedeutet dies, dass eine genomische Aberration im Durchschnitt mindestens 40 kb umfassen muss, um als verändert detektiert werden zu können.

**Tabelle 4.5.:** *Auflösung und verwendete Filter* für die Arrayformate 4x180k bzw. 8x60k.

Spezifikation	Array Format	
	4x180k	8x60k
Anzahl der Oligos pro Array	180.000	60.000
Medianer Abstand der Oligos (kb)	13,066	41,448
Durchschnittlicher Abstand der Oligos	17,627	54,455
Verwendeter Filter	$\geq 3$ Oligos und $\geq \pm 0,2$ $\log_2$ ratio	$\geq 2$ Oligos und $\geq \pm 0,15$ $\log_2$ ratio
Theoretische durchschnittliche Auflösung	ca. 40 kb	ca. 82 kb

Diese Auflösung variiert, je nachdem, wie dicht die Oligonukleotide in einer bestimmten Region nebeneinander liegen. Genreiche Regionen werden nach Herstellerangaben durch eine verhältnismäßig höhere Anzahl an Oligonukleotiden repräsentiert, d.h. die Distanz zwischen den einzelnen Oligonukleotiden ist geringer und die Auflösung somit höher. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Deletion mit einer Größe von ca. 41 kb in mehreren Einzelzellgenomen (4x180k Array) detektiert und mittels FISH bestätigt werden. Die Auflösung für das 8x60k Arrayformat ist entsprechend niedriger (Tab 4.5).

#### 4.9.9 Visualisierung

Die Verteilung der genomischen Imbalancen wurde mit dem R-Modul „aCGH“ analysiert und mittels “Frequency plot” dargestellt (Snijders *et al*, 2001). Bei dieser Darstellung wird der prozentuale Anteil von Zugewinnen oder Verlusten für die jeweilige Region angezeigt.

Für die Darstellung der Einzelzell-Profile im Circos-Plot wurde mithilfe des R-Moduls „aCGH“ eine Aberrations-Bibliothek der gefilterten chromosomalen Zugewinne und Verluste erstellt. Auf Grundlage dieser Bibliotheken konnte mit dem - auf Perl-Modulen basierenden Programm „circos“ (<http://www.circos.ca>) - die sogenannten Circos-Plots erzeugt werden (Krzywinski *et al*, 2009).

#### 4.9.10 Erstellen von "Receiver Operating Characteristic" -Kurven

Die „Receiver Operating Characteristic“ (ROC)-Kurve bzw. Grenzwert-optimierungskurve ist eine Methode zur Bewertung von Analysestrategien und ist eine Anwendung der Signalentdeckungstheorie. Die ROC-Kurve stellt visuell die Abhängigkeit der Effizienz mit der Fehlerrate für verschiedene Parameterwerte dar (Fawcett, 2005). Die ROC-Kurven für die vorliegende Arbeit wurden in Kooperation mit Hilfe von Christoph Bartenhagen vom Institut für medizinische Informatik der Universität Münster erstellt.

Um die Sensitivität und Spezifität aller Einzelzell-aCGH Experimente beurteilen zu können, wurde die Kopienanzahl ( $\log_2$ ratios) jeder Sonde, mit dem "Calling" des ADM-2 Algorithmus des Programms „Genomic Workbench“ verglichen. Der Vergleich bezieht sich auf das Vorliegen einer Veränderung der Signalwerte der einzelnen Sonden gegenüber der Referenz und nicht auf seine Art (Gewinn oder Verlust), noch seiner tatsächlichen Kopienanzahl. Mithilfe des hier für diese Arbeit verwendete R-Paketes "ROCR" (Sing *et al*, 2005) wurde das Verhältnis der Richtig- und Falsch-Positiven Signale, sowie die "Area Under the Curve" (AUC) berechnet.

#### 4.9.11 Individuelle und gemeinsame Aberrationen

Um die Einzelzell-Kollektive von Fall zu Fall und Tumor zu Tumor miteinander vergleichen zu können, wurde jede detektierte SCNA eines Tumors als eine "individuelle" oder "gemeinsame" Aberration klassifiziert. Eine gemeinsame Veränderung war so definiert, dass chromosomale Zugewinne oder Verluste an einer bestimmten Lokalisation, mindestens in zwei oder mehr Zellen innerhalb eines Tumors zu detektieren waren, während eine individuelle aberrante Veränderung einer Region nur in einer Zelle eines Tumors gefunden wurde.

#### 4.9.12 Heterogenitäts-Index

Um das Verhältnis individueller und gemeinsamer SCNA auf Einzelzellebene für jeden Tumor miteinander vergleichen zu können, wurde für jeden Tumor ein Heterogenitäts-Index (HI) berechnet. Der HI beschreibt das Verhältnis zwischen

den gemeinsamen Aberration und den individuellen Aberration der Zellen eines Tumors, zu der Gesamtanzahl der Aberrationen der Zellen des untersuchten Tumors. Der HI wurde nach Georgiades *et al.* mit folgender Formel berechnet (Georgiades *et al.*, 1999):

$$HI = (individuelle\ SCNA / ((gemeinsame\ SCNA + individuelle\ SCNA) \times n)) \times 100$$

Die Höhe des berechneten Werts korreliert mit dem Grad der Heterogenität: je höher die Punktzahl, desto häufiger sind individuelle Aberrationen pro Zelle im Kollektiv repräsentiert.

#### **4.9.13 Bestimmung angereicherter SCNA in den Metastasenzellen**

Ein Ziel dieser Arbeit war das Aufdecken von metastasierungsrelevanten SCNA beim HNSCC. Daher sollten aus den aCGH Experimenten solche Regionen herausgefiltert werden, die in den Einzelzellen der Metastasen angereichert sind. Für deren Berechnung wurde die Anzahl der verschiedenen SCNA der Primärtumorzellen mit den SCNA der Metastasenzellen verglichen. Die Häufigkeits-Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mit dem Exakten Test nach Fisher über eine 3x2 Kreuztabelle (Zugewinne, Verluste, und keine Veränderung in beiden Gruppen) bewertet. Der exakte Test nach Fisher ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit in einer Kreuztabelle. Dieser Test stellt keine Voraussetzungen an den Stichprobenumfang und liefert auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate (Fisher, 1922). Um Gefahr falsch positiver  $p$ -Werte, die durch multiples Testen zustande kommen könnten, zu minimieren, wurden die  $p$ -Werte nach Benjamini-Hochberg korrigiert (Benjamini *et al.*, 2001). Mit diesem Test wurde ein Ranking der signifikanten  $p$ -Werte erstellt und die "False Discovery Rate" (FDR) berechnet. Die FDR gibt Auskunft darüber, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass die detektierten Unterschiede falsch-positiv sind (Benjamini *et al.*, 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die drei signifikant häufigsten gemeinsamen Veränderungen für weiterführende Analysen berücksichtigt.

#### **4.9.14 Filtern von Genen in der Region 8q24**

Nachdem die Region 8q24 als in den Metastasenzellen angereicherte Region identifiziert wurde, wurde sich ausschließlich auf die Protein-kodierenden Gene dieser Lokalisation fokussiert.

### **4.10 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)**

Mit Hilfe der FISH können chromosomale Aberrationen in Geweben visualisiert werden (Pardue & Gall, 1969). Für die FISH wurden HNSCC-Gewebeschnitte wie bereits in Kapitel 4.4.1 beschrieben, präpariert.

#### **4.10.1 Herstellung eines HNSCC Tissue-Micro-Array (TMA)**

In Zusammenarbeit mit Dr. Csaba Toth aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (Aktuell: Institut für Pathologie der Universität zu Köln) und Dr. Dr. Christoph Sproll (Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf) wurde ein TMA von 28 Patienten mit je einem HNSCC Primärtumor-, einer Lymphknotenmetastase-, gesunder Mukosa des Patienten und eine Patienten unabhängige Positivkontrolle aus Mukosa, zusammengestellt und für dieses Arbeit zur Verfügung gestellt. Dafür wurden aus FFPE-Material Regionen gestanzt (Durchmesser: 0,4 cm), die mindestens 60% Tumorgewebe enthielten. Pro TMA Block wurde Tumorgewebe von drei Patienten und entsprechende Kontrollen zusammgelegt. Von diesen Blöcken wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Glasobjektträger aufgezogen, welche bei RT gelagert wurden. Zusätzlich wurde je ein HE-gefärbter Schnitt des TMAs im Institut für Pathologie angefertigt, welcher für die Lokalisation von Tumorzellen im Gewebe diente.

#### **4.10.2 FISH zur Validierung von SCNA bei 7p12 (*EGFR*), 8q24.1 (*MYC*), 9p21 (*CDKN2A*) und 11q13 (*CCND1*)**

Die 5 µm dicken FFPE-Gewebeschnitte wurden nach Herstellerangaben der Fa. Kreatech mithilfe des „Digestion Kit I“ vorbehandelt (Instructions for Paraffin-Embedded Tissues Protocol I, Kreatech) und anschließend mit den

entsprechenden fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden hybridisiert. Hierfür wurden die TMA-Objektträger zunächst über Nacht bei 56 °C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 2 x 10 min in Xylol entparaffiniert und dann in einer absteigenden Ethanolreihe (99,5%, 80% und 70%) min sowie Aqua dest. für je 3 min bei RT rehydriert. Dann wurden die Präparate für 15 min bei 98 °C in "Solution A" inkubiert und anschließend 2 x 2 min in Aqua dest. bei RT gewaschen. Darauf folgte eine Behandlung mit 200 µl „Pepsin-Solution“ der Fa. Kreatech pro OT für 1h bei RT um das Gewebe von den Zellkernen wegzudauen. Anschließend wurden die OT für 1 min in Aqua dest. und dann für 5 min in 2x SSC gewaschen. Anschließend wurden die OT in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80% und 99,5%) dehydriert und danach bei RT luftgetrocknet. Die FISH-Sonden (Tab. 4.6) wurden nach Herstellerangaben der Fa. Abbott vorbereitet und hybridisiert („Application Note for Abbott Vysis Probes“, Abbott). Für die Gewebeschnitte wurde je ein 1x 10 µl Sonden-Reaktionsmix angesetzt. Aufgrund der großen Fläche der TMA-Schnitte wurde für diese immer die doppelte Menge (20 µl) des Sondenmix vorbereitet:

#### 1x Sondenmix

1 µl Vysis Sonde Gen A/Chromosome A

2 µl Aqua dest.

7 µl LSI Sonden Puffer

Der Sondenmix wurde für 5 min bei 73 °C im Thermomixer denaturiert und anschließend direkt auf den vorbereiteten OT gegeben und mit einem Deckglas und einer flüssigen Gummimasse abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer bei 42 °C über Nacht.

Das Post-Hybridisierungsprotokoll wurde nach Herstellerangaben der Fa. Kreatech durchgeführt („Instructions for Paraffin-Embedded Tissues Protocol I“, Kreatech). Zuerst wurde die Gummilösung vorsichtig vom OT entfernt und das Deckgläschen mit „Wash Buffer II“ abgewaschen. Der OT wurde für 2 min bei 73 °C in „Wash Buffer I“, danach nochmal für 1 min bei RT in „Wash Buffer II“

gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe durch eine je 1-minütige Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80% und 99,5%) dehydriert und anschließend bei RT getrocknet. Abschließend wurden die OT für eine Kernfärbung für 5 min in einer DAPI-Lösung (200ng/ml in 4x SSC.) inkubiert, anschließend mit 2 Tropfen des Mounting-Mediums „Vektorshield“ und einem Deckglas eingedeckt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

**Tabelle 4.6:** *Verwendete DNA-FISH Sonden, deren Hybridisierungsregion und darin lokalisierte Krebs-assoziierte Gene.*

<b>Sonden Name</b>	<b>Ziel (Größe)</b>	<b>Zytobanden</b>
<b>EGFR</b>	<i>EGFR</i> (303 kb)	7p12
Chromosome Enumeration Probe (CEP) 7	Chr. 7 Alpha-Satelliten DNA	7p11.1-q11.1
<b>MYC</b>	<i>MYC</i> (750 kb)	8q24.1-24.21
CEP 8	Chr. 8 Alpha-Satelliten DNA	8p11.1-q11.1
<b>CDKN2A</b>	<i>CDKN2A</i> (222 kb)	9p21
CEP 9	Chr. 9 Alpha-Satelliten DNA	9p11-q11
<b>CCND1</b>	<i>CCND1</i> (378 kb)	11q13
CEP 11	Chr. 11 Alpha-Satelliten DNA	11p11-q11

#### 4.10.3 FISH zur Darstellung des *ASAP1*-Genlokus

Die Vorbehandlung der 5 µm FFPE-Gewebeschnitte wurde wie in 4.10.2 beschrieben durchgeführt. Die für diese Arbeit zur Verfügung gestellte Biotin-markierte *ASAP1*-Sonde wurde wie folgt hybridisiert. Hierfür wurde zuerst folgender Sondenmix hergestellt:

1x Sondenmix:

15 µl *ASAP1*-Sonde  
3 µl Lachssperma-DNA (10 µg/ml)  
5 µl Cot1-DNA (1 µg/ml)  
5 µl 3M Natriumacetat  
150 µl 100% Ethanol

Anschließend wurde dieser Hybridisierungsmix für 15 min bei -80 °C gefällt und dann 10 min bei 4 °C mit 14000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 150 µl 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Reaktionsmix noch einmal für 10 min bei 4 °C mit 14000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet bei RT getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 2,5 µl Formamid gelöst und über Nacht bei 400 rpm und 37 °C im Thermomixer inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 2,5 µl 20% Dextransulfat in 4x SSC und einer 5-minütigen Inkubation bei 72 °C zur Denaturierung. Anschließend wurde die denaturierte Sonde direkt auf den vorbereiteten Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen und einer Gummilösung versiegelt. In einer feuchten Kammer wurden die Objektträger bei 42 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Deckgläschen vorsichtig vom Objektträger gelöst. Der Objektträger wurde dann bei 37 °C 3 x 5 min in 2x SSC/0,2% Tween und anschließend bei 42 °C 3 x 5 min in 0,05x SSC gewaschen. Nachfolgend wurden 200 µl einer 5% BSA-Blockierungs-Lösung auf die Gewebeschnitte gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und für 30 min bei 37 °C inkubiert, um einen möglichen Hintergrund zu minimieren. In der Zwischenzeit wurde der Avidin Cy3-Reaktionsmix zum Nachweis der Biotin-markierten *ASAP1*-Sonde vorbereitet:

1x Avidin-Mix:

150 µl 5% BSA-Blockierungs-Lösung  
0,6 µl Avidin-Cy3

Die Blockierungs-Lösung wurde abgeschüttet und anschließend der Avidin-Cy3 Reaktionsmix auf die Gewebeschnitte pipettiert. Diese wurden mit einem Deckglas abgedeckt und mit dem Reaktionsmix für 1h bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Präparat 3 x 5 min in 2xSSC/0,2% Tween bei 37 °C gewaschen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 2 min in einer DAPI-Lösung (200 ng/µl in 4x SSC) inkubiert und mit 2 Tropfen des Eindeckediums „Vectashield“ eingedeckert. Die Präparate wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

#### 4.10.4 Auswertung und Statistik der FISH-Experimente

Die visuelle Auswertung der FISH erfolgte an einem Zeiss Axioplan-2 Fluoreszenzmikroskop bei 640-facher Vergrößerung. Pro Präparat wurden pro Tumorgewebe durchschnittlich 65 (Spanne: 28-123) intakte Interphasekerne ausgezählt. Für die durchgeführte FISH an dem TMA wurden die Signale von durchschnittlich 35 (Spanne: 11-48) intakte Interphasekerne pro Gewebestanze ausgezählt. Die Auszählung wurde in einer Tabelle dokumentiert und anschließend analysiert. Zunächst wurde pro Tumor die Gensignal-Anzahl pro Zellkern für *CDKN2A*, *CCND1*, *EGFR* und *MYC* sowie die entsprechende Zentromersignal-Anzahl dokumentiert und anschließend für jede einzelne Zelle der Quotient von Gensignal-Anzahl zu Zentromersignal-Anzahl berechnet.

Für die Auswertung der erhobenen Daten anhand des TMA für *MYC* und *ASAP1*, sowie der Zentromerregion von Chromosom 8 an dem TMA, wurde pro Tumor die durchschnittliche Gensignal- und Zentromersignal-Anzahl berechnet sowie der Gen/Zentromersignal-Ratio pro Tumorzelle. Die Einstufungen der Aberrationen wurden wie folgt definiert:

- Ein Gensignal wurde als Zugewinn eingestuft, wenn der Quotient zwischen  $>1$  und  $<2$  war.
- Ein Gensignal wurde als Duplikation bewertet, wenn der Quotient zwischen  $\geq 2$  und  $<3$  lag.
- Eine Amplifikation lag vor, wenn der Quotient  $\geq 3$  war.

- Von einer homozygoten Deletion wurde ausgegangen, wenn keine Gensignale in einem Zellkern beobachtet wurden.

Anschließend wurden die Daten der Primärtumore mit denen der Metastasen verglichen und hinsichtlich ihrer Signifikanz statistisch überprüft.

Die graphische Darstellung sowie die statistische Analyse der FISH-Ergebnisse erfolgten mithilfe des Statistikprogramms „PRISM“. Mit dem Mann-Whitney-Test als Rangsummentest wurde anschließend die Datenverteilung zweier unabhängigen Gruppen verglichen (Whitney, 1947). Für die statistische Überprüfung zweier Gruppen mit gepaarten Stichproben wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet (Wilcoxon, 1945).

#### **4.11 mRNA-Expressionsanalyse**

Um die in den Einzelzell-Experimenten identifizierten Gene auf mRNA-Expressions-Ebene in Primärtumoren und Metastasen untersuchen zu können, wurden für diese Arbeit in einer Kooperation mit Dr. Dr. C. Sproll aus der Kieferchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf Tumor-Expressionsprofile von 13 HNSCC-Patienten mit Metastasen (13 Primärtumore und 29 autologe Metastasen) zur Verfügung gestellt. Die Daten sollten dazu dienen, die beobachteten in den Metastasen-angereicherten genomischen Veränderungen für 8q24 zusätzlich auf Transkriptom-Ebene zu überprüfen.

Für die Expressionsanalyse wurde in einer Kooperation mit der Firma „Arrows-biomedical“ in Münster und Dr. Dr. C. Sproll die Total-RNA aus kryokonserviertem HNSCC-Gewebe isoliert. Die RNA wurde mit Qiazol (Qiagen) isoliert, mit dem miRNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt und anschließend mit einem Nanodrop ND-100 UV-VIS-Spektrophotometer quantifiziert. Reinheit und Integrität der isolierten RNA wurden mithilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) überprüft. Ausschließlich Proben mit einer „RNA Integrity Number“ (RIN) von mehr als 8,0 wurden für die Hybridisierung verwendet.

#### 4.11.1 Datenauswertung des Expressionsarrays

Die computergestützte Auswertung wurde in Kooperation mit M. Beier, Institut für Humangenetik der Universität Düsseldorf, durchgeführt. Die Genexpressionsanalyse der insgesamt 42 HNSCC Tumore wurde mittels Microarrays der Fa. Agilent als „One-Color“-Experimente analysiert. Wegen des großen zeitlichen Abstands zwischen den ersten und den letzten Array-Experimenten kamen dabei zwei verschiedene Chip-Versionen zum Einsatz: „Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K“ bei den ersten (2009 - 2010) und „Agilent-026652 Whole Human Genome Microarray 4x44K v2“ bei den späteren Versuchen (2013). Die hybridisierten Arrays wurden auf einem Agilent Scanner G2505B eingescannt und die gescannten Bilder mit Agilents „Feature Extraction Software Version 9.5.1.1“ quantifiziert. Die Software liefert dabei automatisch für jedes Oligonukleotid einen um das „Hintergrundrauschen“ bereinigten Signalwert, der direkt für weitere Analysen verwendet werden kann. Die komplette weitere Auswertung fand anschließend in der statistischen Programmierumgebung „R“ statt. Speziell für die Analyse von Expressionsdaten aus Microarray-Experimenten hat sich in den letzten Jahren die auf R basierende Programmier-Bibliothek „Limma“ (Smyth, 2004) als Standard etabliert. „Limma“ bietet sowohl diverse Methoden zur Normalisierung der Daten als auch für Hypothesen-Tests, d.h. zur Ermittlung differenziell exprimierter Gene. Die Normalisierung der Expressionswerte zwischen den einzelnen Arrays („inter-slide normalization“) ist dabei der erste Schritt, um die Expressionshöhen verschiedener Experimente überhaupt vergleichen zu können. Von den zur Auswahl stehenden Methoden wurde hierfür die bei gesamt-genomischen Experimenten als robust bekannte Quantil-Normalisierung gewählt. Bei der Quantil-Normalisierung werden alle Intensitätswerte (bzw. deren Logarithmen), die auf den verschiedenen Arrays den gleichen Rang belegen, durch deren Mittelwert ersetzt. Mithin werden die Arrays also anhand der empirischen (mittleren) Verteilung der Intensitäten derart abgeglichen, dass die Histogramme aller Arraydaten nach der Normalisierung identisch sind (Bolstad *et al*, 2003). Als

nachteilig erwies sich hierbei, dass unsere Daten von zwei verschiedenen Arraytypen stammten, so dass im Folgenden nur die Schnittmenge der auf beiden Chips vorhandenen Oligonukleotide für die Normalisierung und die weitere Auswertung benutzt werden konnte (18561 Oligonukleotide, das entspricht ca. 54% des v2-Chips). Um einen allen Lymphknoten-Metastasen gemeinsamen Expressionsunterschied gegenüber den Primärtumoren genomweit zu ermitteln, wurden die gepoolten Expressionsdaten der Metastasen und die gepoolten Daten der Primärtumoren über einen t-Test miteinander verglichen. „Limma“ berechnet dazu für jedes Gen eine t-Statistik aus der  $\log_2$ Ratio von Tumor/Metastase, dividiert durch den kumulativen Standardfehler (Symth, 2004). Allerdings wird im Unterschied zum gewöhnlichen t-Test bei der in „Limma“ implementierten "moderierten" t-Statistik der Standardfehler nicht nur aus den beiden Standardfehlern des jeweiligen Gens berechnet, sondern mit Hilfe der Bayes'schen Methode wird die Information darüber aus der Gesamtheit aller Gene gewonnen (bei entsprechend angepassten Freiheitsgraden), was die Aussagekraft des Tests deutlich erhöht (Lee *et al*, 2012). Die so ermittelten *p*-Werte wurden anschließend nach Benjamini-Hochberg für multiples Testen korrigiert (Benjamini *et al*, 2001). Für die aus der Korrektur resultierenden *q*-Werte wurde eine „False Discovery Rate“ (FDR) von 0,01 festgelegt.

Nach der Berechnung der FDR-Werte für alle analysierten Gene, wurden ausschließlich die statistisch signifikanten Expressionsunterschiede für die mittels der aCGH-Analyse identifizierten 46 Gene betrachtet und für weiterführende Analysen berücksichtigt.

#### **4.12 Migrations- und Proliferations- Assay für ASAP1 an der HNSCC-Metastasen-Zelllinie UM-SCC-22B**

Die Migrations- und Proliferations-Assays für die funktionelle Analyse *in vitro* von ASAP1 (Sriamporn *et al*) wurde von Dr. K. Roensch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Sleeman, Institut für Toxikologie und Genetik des Karlsruher Institut für

Technologie, durchgeführt und ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Experimente wurden für diese vorliegende Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Für die Experimente wurde die HNSCC-Zelllinie UM-SCC-22B verwendet, da diese ASAP1 exprimiert. Interessanterweise wurde diese Zelllinie von einer Lymphknoten-Metastase etabliert. Um die Funktionalität von ASAP1 zu überprüfen wurde mittels RNA-Interferenz (siRNA) die ASAP1 Expression supprimiert. ASAP1-supprimierte UM-SCC-22B Zellen wurden anschließend mit entsprechenden Kontrollzellen (untransfizierte UM-SCC-22B und mit Kontroll-siRNA transfizierte UM-SCC-22B) in einem Wundheilungs-Assay bezüglich ihrer Migration und in einem MTT-Assay bezüglich ihrer Proliferationsrate verglichen.

## Patientenkollektiv

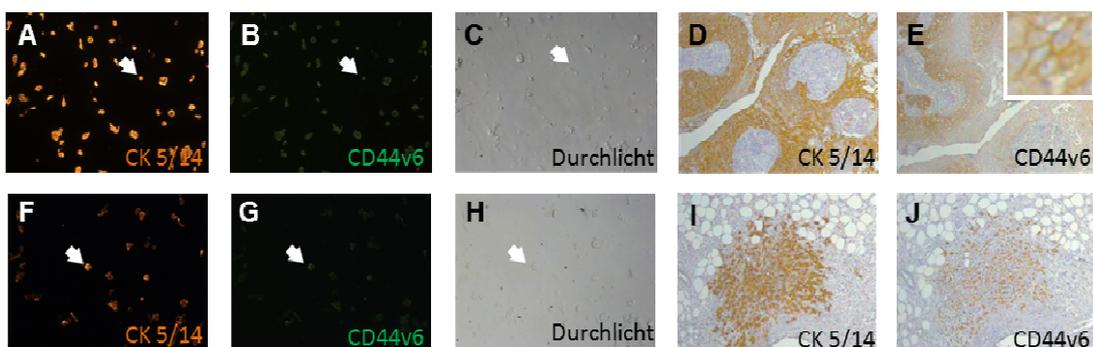
Tabelle 4.7: Übersicht der analysierten Patientengewebe.

Fall Nr.	Einzelzell-aCGH		TMA		Expressions-Array	
	PT	M	PT	M	PT	M
#98	x	x				
#68	x				x	x
#74	x	x			x	x
#170	x	x	x	x	x	x
#178		x	x	x	x	x
#24			x	x	x	x
#75			x	x	x	x
#3			x	x	x	x
#55			x	x	x	x
#44			x	x	x	x
050					x	x
060					x	x
020					x	x
031					x	x
#76					x	x
#15			x	x		
#14			x	x		
#45			x	x		
#31			x	x		
#139			x	x		
#177			x	x		
#154			x	x		
#186			x	x		
#185			x	x		
#189			x	x		
#110			x	x		
#187			x	x		
#215			x	x		
#65			x	x		
#52			x	x		
#16			x	x		
#220			x	x		
#144			x	x		
#46			x	x		
<b>Fälle total</b>	<b>n = 5</b>		<b>n = 28</b>		<b>n = 13</b>	

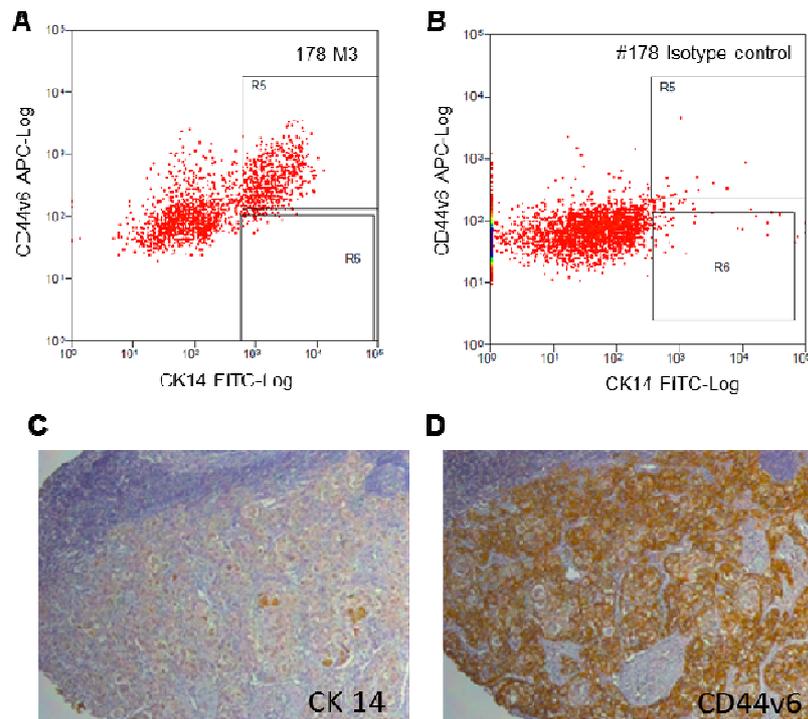
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Detektion und Isolation epithelialer Tumorzellen in Gewebesuspensionen

Probengewebe aus Tumoren sind zellulär sehr heterogen und enthalten neben den Tumorzellen in unterschiedlichen Anteilen auch Stromazellen, Entzündungszellen, Gefäßzellen und ggf. auch normale Epithelzellen. Um in diesem heterogenen Gemisch mit hoher Wahrscheinlichkeit epitheliale Tumorzellen isolieren zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zur Detektion von CD44v6 sowie den Zytokeratinen 5 und 14 (CK 5/14) durchgeführt (Abb. 5.1). Die Detektion dieser epithelialen Marker erfolgte für die Fälle #68, #74 und #98 mithilfe einer indirekten Immunfärbung. Positive Zellen wurden anschließend per Mikromanipulation isoliert. Für die Fälle #170 und #178 wurde eine direkte Immunfärbung für die nachfolgende FACS-Isolation durchgeführt. Da für diese Applikation neben dem CD44v6 nur ein CK 14 Antikörper kommerziell erhältlich war, wurde auf die Zytokeratin 5 Detektion verzichtet.



**Abbildung 5.1:** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Primärtumorzellen von Fall #74 (A-E). Immunfluoreszenz- Doppelfärbung der Marker CK5/14 (A) und CD44v6 (B), Präparate im Durchlicht (C) (200-fache Vergrößerung). Der Pfeil markiert eine für diese Studie isolierte Zelle. Primärtumorgewebeschnitt von Fall #74 mit CK 5/14-positiven (D) und CD44v6-positiven Tumorzellen (E) (100-fache Vergrößerung). Repräsentative Aufnahmen der Metastasenzellen von Fall #74 (F-J).



**Abbildung 5.2:** Einzelzellisolierung mithilfe von Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS). CD44v6 und CK 14-positive Einzelzellen der Metastase von Fall #178 (A). Isotypkontrolle der Metastasenzellen von Fall #178 (B). Immunhistochemische Färbung von CK 14 (C) und CD44v6 (D) an einem Gewebeschnitt der Metastase von Fall #178 (100-fache Vergrößerung).

In allen hier analysierten Fällen konnten CD44v6- und Zytokeratin 5/14- bzw. Zytokeratin 14-positive Zellpopulationen identifiziert werden. In Abb. 5.1 sind repräsentative immunhistochemische Färbungen der Zytokeratine 5/14 (Abb. 5.1 D+I) und des Zellmembranadhäsionsproteins CD44v6 (Abb. 5.1 E+J) an Primärtumorgewebe (A-E) und Metastasengewebe (F-J) dargestellt. Hierbei zeigte sich ein typisches zytoplasmatisches Färbemuster für Zytokeratin 5/14 und eine membranäre Färbung für CD44v6.

Bei der Isolation von doppelt-positiven Einzelzellen mittels des Mikromanipulators, waren je nach Präparat 60-80% der Zellen CK5/14 und CD44v6 positiv. Die Anzahl der doppelt-positiven Zellen variierte von Präparat zu Präparat. Beispielsweise weist der Primärtumor von Fall #74 (Abb. 5.1 A+B) im Vergleich zu der entsprechenden Metastase (Abb. 5.1 E+F) eine höhere Anzahl

an doppelt positiv gefärbten Tumorzellen im Gesichtsfeld auf. Insgesamt war bei allen Tumorzellpräparaten die Zytokeratin 5/14-Färbung stärker im Vergleich zu der CD44v6-Färbung (Abb. 5.1.).

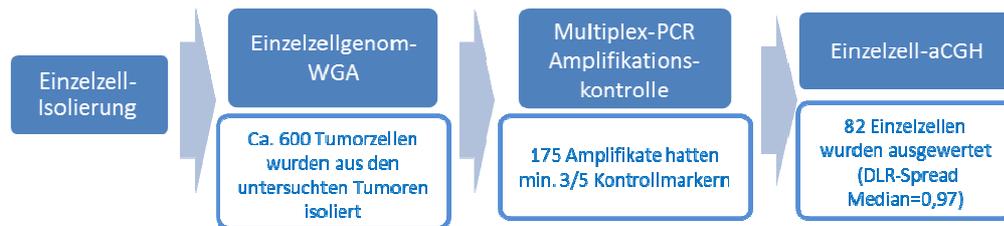
Bei der Isolation von Tumoreinzellen der Fälle #170 und #178 mittels Einzelzellablage (FACS-Sorting) konnten nicht für jeden Tumor CD44v6- und Zytokeratin 14- positive Zellen isoliert werden. Die Metastasenzellen beider Fälle hatten eine deutliche CD44v6-Expression. Besonders bei Fall #178 zeigten die isolierten Tumorzellen eine starke CD44v6 Färbung (Abb. 5.2. A), was bereits in der immunhistochemischen Färbung von CD44v6 im Vergleich zu CK 5/14 zu beobachten war (Abb. 5.2. C+D). Bei dem untersuchten Fall #170 bestand die doppelt-positive Subpopulation nur aus einer geringen Anzahl von Zellen. Daher wurden zusätzlich auch einfach Zytokeratin 14-positive Tumoreinzellen isoliert. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen dieser CD44v6/Zytokeratin 14-positiven bzw. nur Zytokeratin 14-positiven Einzelzellen zeigte sich kein Unterschied in der Prozessierbarkeit der Einzelzellgenome oder bei den genetischen Profilen.

## 5.2 Qualitätsüberprüfung der Einzelzellgenom-Amplifikate

Insgesamt wurden mittels Mikromanipulation und FACS ca. 600 Tumorzellen von den fünf analysierten Fällen isoliert und amplifiziert. Um nun zu überprüfen, ob die "Whole Genome Amplification" (WGA) erfolgreich war, wurde stichprobenartig an fünf verschiedenen Genloci die Vollständigkeit des Amplifikates mittels einer Multiplex-PCR analysiert. Es wurden ausschließlich Einzelzell-Amplifikate weiterführend untersucht, die mindestens drei der fünf PCR-Produkte aufwiesen (Möhlendick *et al*, 2013).

Als ein weiterer Parameter zur Qualitätsüberprüfung der Einzelzellamplifikate wurde die DNA-Menge evaluiert. Durchschnittlich lagen die DNA-Konzentrationen der aufgereinigten Einzelzell-Amplifikate zwischen 100-200 ng/ $\mu$ l. Die optimale DNA-Menge der Einzelzell-Amplifikate für die aCGH wurden

ebenfalls in der Studie von Möhlendick *et al* ausgetestet (Möhlendick *et al*, 2013). Nur zwei Einzelzell-Amplifikate welche die PCR Qualitätskontrolle bestanden, hatten eine DNA-Konzentration von  $<100$  ng/ $\mu$ l. Insgesamt erfüllten 175 Einzelzell-Amplifikate die zuvor beschriebenen Qualitätsstandards zur weiteren aCGH-Analyse (Abb. 5.3).



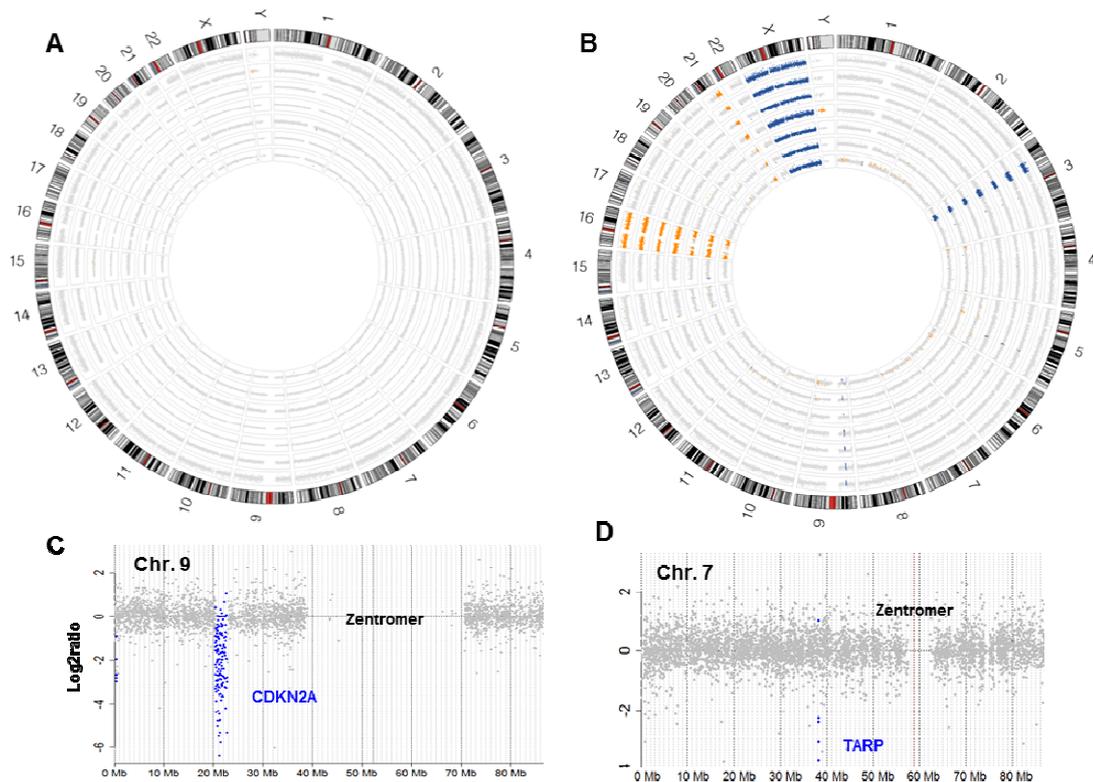
**Abbildung 5.3.:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Einzelzell-aCGH. In den blauen Boxen sind die experimentellen Abschnitte beschrieben. Die weißen Boxen zeigen die entscheidenden Parameter für das weitere Prozessieren der Einzelzell-Amplifikate.

## 5.3 Einzelzell-aCGH Analyse

### 5.3.1 Qualitätsüberprüfung und Reproduzierbarkeit sowie Sensitivität und Spezifität der Einzelzell-aCGH-Methode

Vor Durchführung der aCGH-Experimente mit den erfolgreich amplifizierten HNSCC-Einzelzellen, wurden zunächst Kontroll-Experimente durchgeführt, um die Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit des Einzelzell-aCGH-Versuchsaufbaus erneut zu überprüfen. Bei dem von Möhlendick *et al.* (Möhlendick *et al*, 2013) beschriebenen Versuchsaufbau wurde das Auswerteprogramm "Genomic Workbench" der Fa. Agilent Technologies mit dem implementierten ADM-2-Algorithmus verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde das "R"-basierte frei verfügbare Bioconductor Auswertepaket "GLAD" verwendet. Um DNA-Zugewinne und -Verluste bestimmen zu können, wurde anstelle von ADM-2 der HaarSeg-Algorithmus für die Segmentierung und Bruchpunktanalyse verwendet.



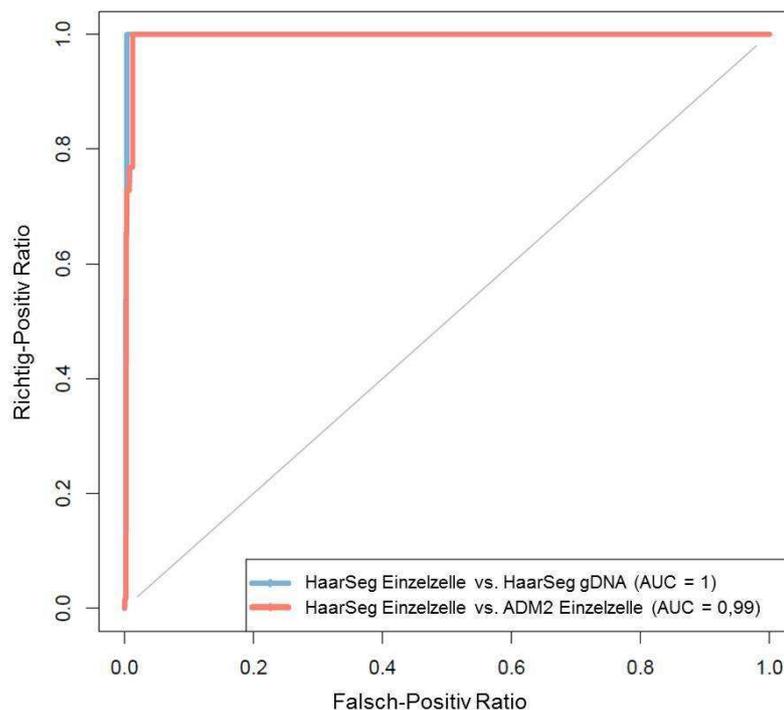
**Abbildung 5.4:** *Circos Plots von Einzelzellgenomen.* Die Circos Plots zeigen die Einzelzell-aCGH-Profile von sieben verschiedenen PBMNCs von einem gesunden Spender (**A**) und sieben verschiedenen Zellen der Leukämie-Zelllinie REH (**B**). Der äußere Ring repräsentiert die Lokalisation der Chromosomen 1-22, X und Y. Jeder Ring repräsentiert das SCNA-Profil einer Zelle. In orange sind chromosomale Zugewinne und in blau Verluste dargestellt. Detailansicht von einer *CDKN2A*-Deletion auf Chromosom 9 (**C**) und einer *TARP*-Deletion auf Chromosom 7 (**D**) der REH Zelllinie.

Für die Überprüfung wurden zunächst einzelne PBMNCs eines gesunden Spenders analysiert, da bei diesen keine relevanten somatischen Kopienzahlveränderungen zu erwarten sind. Bei den sieben einzelnen PBMNC zeigten sich mit dem hier verwendenden "R"-basierten Auswertalgorithmus keine SCNA (Abb. 5.4 A), wie es auch in der Studie von Möhlendick *et al* beschrieben wurde.

Weitere Einzelzell-aCGH Kontroll-Experimente wurden mit der gut charakterisierten Leukämie-Zelllinie REH durchgeführt (Binder *et al*, 2014; Möhlendick *et al*, 2013). Analog zu der Aberrationsdetektion mit dem ADM-2 Algorithmus (Möhlendick *et al*, 2013) wurden die charakteristischen SCNA der REH-Zelllinie, wie die Deletionen auf dem kurzem Arm von Chromosom 3, sowie

die Zugewinne auf Chromosom 21q und des gesamten Chromosom 16, mit dem hier verwendeten Algorithmus HaarSeg ebenfalls detektiert (5.4. B). Auch die 115 kb große *CDKN2A*-Deletion auf Chromosom 9, sowie die 56 kb kleine *TARP*-Deletion auf Chromosom 7 konnten mit dem HaarSeg-Algorithmus detektiert werden (Abb. 5.4 C+D).

Zur Ermittlung der genomweiten Sensitivität, sowie Spezifität in Abhängigkeit der Fehlerrate für den HaarSeg-Algorithmus im Vergleich zu dem ADM-2-Algorithmus, wurde eine Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) berechnet (Abb. 5.5). Für den ADM-2-Algorithmus konnte bereits gezeigt werden, dass dieser bei Einzelzellexperimenten im Vergleich zu korrespondierender genomischer DNA eine Effizienz von  $AUC = 0.96$  (möglicher Höchstwert = 1) (Möhlendick *et al*, 2013) erreichen kann.



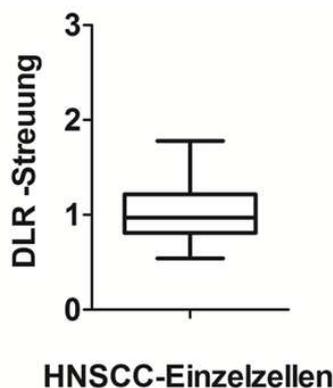
**Abbildung 5.5:** Darstellung der Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit der Fehlerrate des HaarSeg-Algorithmus im Vergleich zum ADM-2-Algorithmus für die Einzelzell-aCGH mithilfe von ROC-Kurven. AUC = Area under the curve.

Es dienen die mit ADM-2-Algorithmus ermittelten SCNA-Profile einzelner REH-Zellen als Referenz für die hier durchgeführten ROC-Analysen der Einzelzell-aCGHs, die nun mit HaarSeg analysiert wurden. ADM-2 und HaarSeg hatten dabei

eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität für die Detektion von SCNA in Einzelzell-Amplifikaten (AUC = 0,99). Darüber hinaus zeigte sich in der ROC-Analyse, dass die Detektion von SCNA bei einer Einzelzelle unter optimalen Bedingungen genauso sensitiv und spezifisch ist (AUC = 1), wie bei nicht-amplifizierter gDNA der REH-Zelllinie (Abb. 5.5).

### 5.3.2 Überprüfung der aCGH-Hybridisierungsqualität der HNSCC-Einzelzellamplifikate

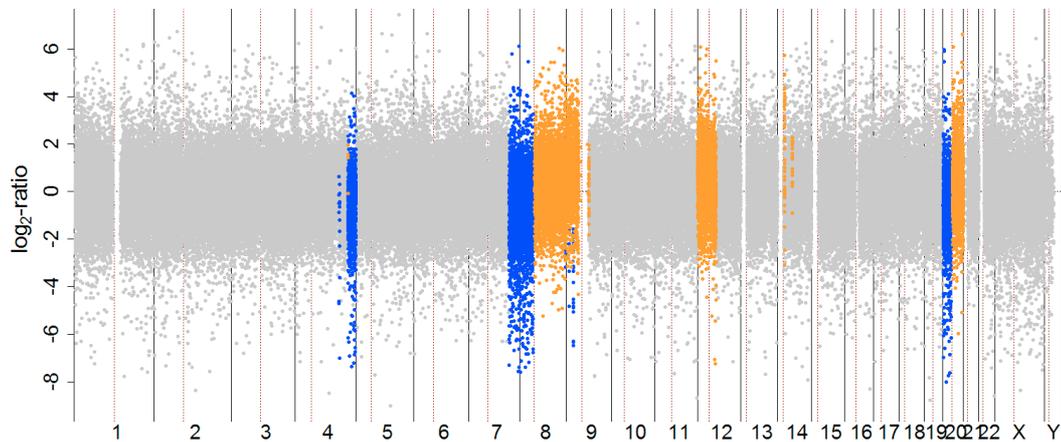
Einer der wichtigsten Parameter für die Qualität der Hybridisierung, ist der "Derivative Log<sub>2</sub>Ratio Spread" (DLRS); dieser beschreibt die Streuung der Log<sub>2</sub>Ratio-Werte der einzelnen hybridisierten Sonden. Die DLRS-Werte der untersuchten Einzelzellen waren das wichtigste Auswahlkriterium für weiterführende Analysen.



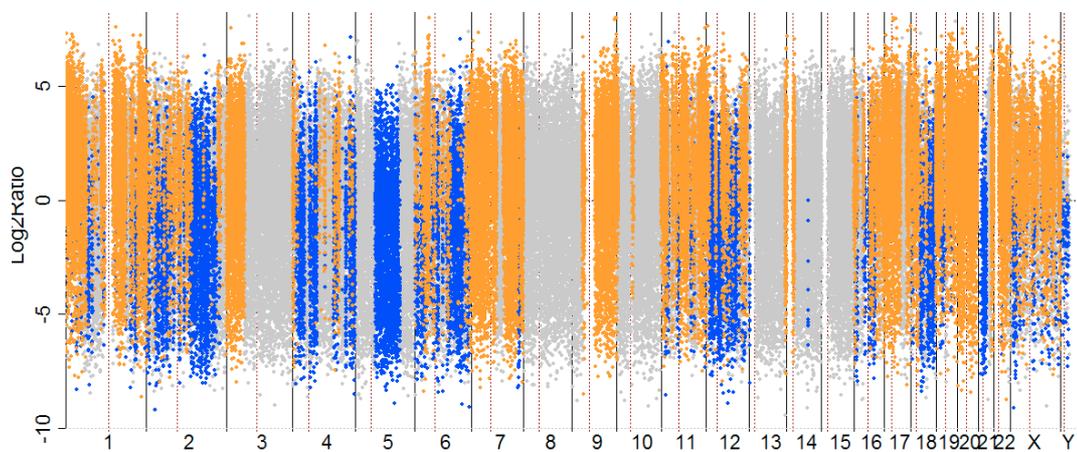
**Abbildung 5.6:** Box-Plot Darstellung der DLR-Streuung der analysierten HNSCC Einzelzell-aCGH-Experimente. 75%-Perzentil = 1,218.

Die DLRS-Werte hatten bei den hier durchgeführten HNSCC Einzelzell-aCGHs einen Median von 0,97 und Mittelwert von 1,02 (Spanne: 0,54-1,78) sowie ein 75%-Perzentil von 1,218 (Abb. 5.6). Es wurde beobachtet, dass der Auswertalgorithmus in einem Einzelzell aCGH-Profil von Fall #170 mit einem DLRS von 0,99 die entsprechenden Sondensignale klar voneinander differenzieren und Aberrationen eindeutig als Zugewinn oder Verlust identifizieren konnte (Abb. 5.7). Dies war bei einem Einzelzellamplifikat von Fall #178 mit einem DLRS von 2,19 (Abb. 5.8) nicht mehr möglich. In Abbildung 5.8 ist

zu erkennen, dass sich Signale überlagerten und für die jeweilige Region nicht festzustellen war, ob es ein Zugewinn oder Verlust sein könnte, da beides gleichzeitig detektiert wurde.



**Abbildung 5.7:** aCGH-Profil einer Tumorzelle mit einem DLRS-Wert von 0,99. In orange sind chromosomale Zugewinne und in blau Verluste dargestellt.



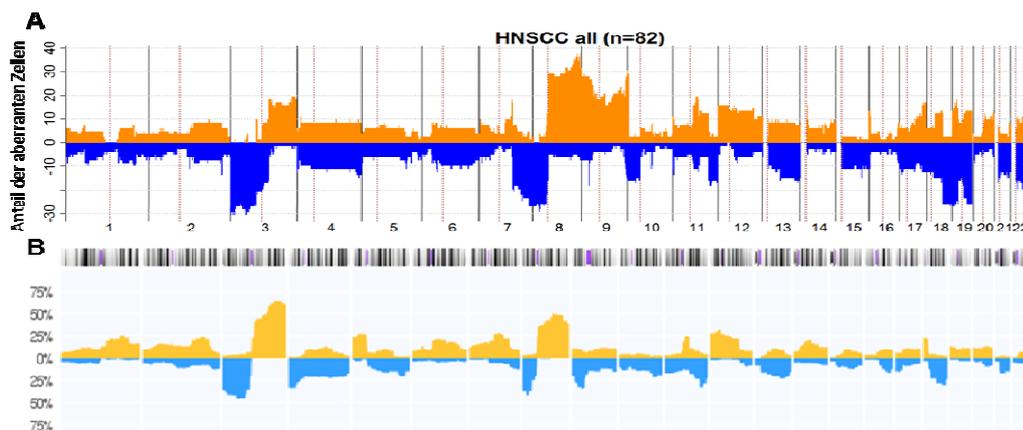
**Abbildung 5.8:** aCGH-Profil einer Tumorzelle mit einem DLRS-Wert von 2,19. In orange sind chromosomale Zugewinne und in blau Verluste dargestellt.

Als Konsequenz dieser Beobachtungen und da bislang keine Referenzwerte für die DLRS-Werte von amplifizierten Einzelzellgenomen aus Tumorgeweben bestimmt wurden, wurde 1,8 als DLRS-Grenzwert für diese Arbeit definiert. Auf Grund dieses Grenzwertes wurden 93 der 175 amplifizierten Einzelzellgenome

aussortiert. Damit konnten insgesamt 82 erfolgreich hybridisierte Einzelzell-Amplifikate ausgewertet werden.

#### 5.4 SCNA der HNSCC-Einzelzellen

Für diese Arbeit wurden insgesamt 82 Tumoreinzelzellen aus Primärtumorgewebe und Lymphknotenmetastasen von fünf Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen bezüglich ihrer SCNA auf Einzelzellebene analysiert. Bei drei Patienten konnten Paare von Primärtumor und Metastase untersucht werden (Fall #74, #98 und #170), bei einem weiteren Fall nur der Primärtumor (Fall #68) und in einem anderen Fall nur die Metastase (Fall #178). Im Median konnten pro Tumor 10 einzelne HNSCC Zellen mittels aCGH analysiert werden. Insgesamt zeigten neun der 82 analysierten Einzelzellen (11%) kein aberrantes SCNA-Profil.

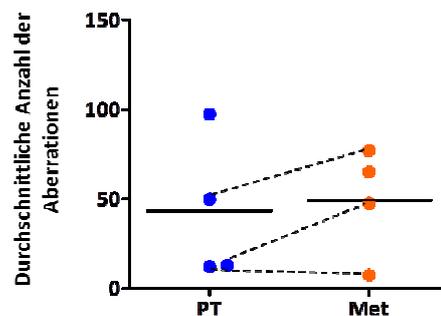


**Abbildung 5.9:** Darstellung der Lokalisation und Häufigkeit verschiedener detektierter SCNA von HNSCC in einem Frequenz-Plot. Die Abzisse zählt die Chromosomen auf und die Ordinate zeigt den prozentualen Anteile der jeweiligen Aberration im Verhältnis zum Kollektiv. Es wurden 82 HNSCC-Einzelzellen mittels aCGH analysiert (A). Frequenz-Plot basierend auf den 196 HNSCC-Profilen der Progenetix-datenbank (B). Quelle: [www.progenetix.com](http://www.progenetix.com)

Bei den detektierten SCNA fanden sich am häufigsten Zugewinne der Chromosomen 3q, 8q, 11q und 12. Verluste fanden sich am häufigsten auf 3p, 4, 7q, 8p, 11q, 13 und 18q. Um zu überprüfen, ob die detektierten chromosomalen Veränderungen typisch für das HNSCC sind, wurde zunächst von allen 82 aCGH

Einzelzell-Profilen ein Summenhistogramm erstellt (Abb. 5.9 A). Anschließend wurde mit Hilfe der CGH-Datenbank Progenetix ebenfalls ein Summenhistogramm der CGH-Daten aller dort verfügbaren HNSCC-Tumoren erzeugt ( $n = 196$ , Abb. 5.9 B) und mit den eigenen Daten verglichen. Es zeigte sich, dass die hier beobachteten Veränderungen der Tumoreinzelzellen sehr gut HNSCC-typischen Veränderungen zuzuordnen waren. Ein Unterschied zeigte sich bei Chromosom 9, da im hier untersuchten Kollektiv deutlich mehr Zugewinne des gesamten Chromosoms 9 beobachtet wurden.

Im nächsten Schritt wurde die Frequenz der detektierten SCNA für jeden Tumor analysiert. Insgesamt wiesen die Metastasen eine durchschnittlich leicht höhere Anzahl an SCNA pro Zelle ( $49,10 \pm 10,18$  SCNA/Zelle) als die Primärtumoren ( $43,85 \pm 11,96$  SCNA/Zelle) auf. Bei drei Patienten konnten Zellen der Primärtumore und autologe Lymphknotenmetastasen miteinander verglichen werden (Abb. 5.10). Für diese Primärtumor/Metastasen-Paare konnte eine erhöhte Aberrationsanzahl in den Metastasen (SCNA/Zelle  $44,35 \pm 12,7$ ) im Vergleich zu den Primärtumoren ( $24,56 \pm 7,97$  SCNA/Zelle) festgestellt werden. Dieser Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant ( $p = 0,2436$ ).

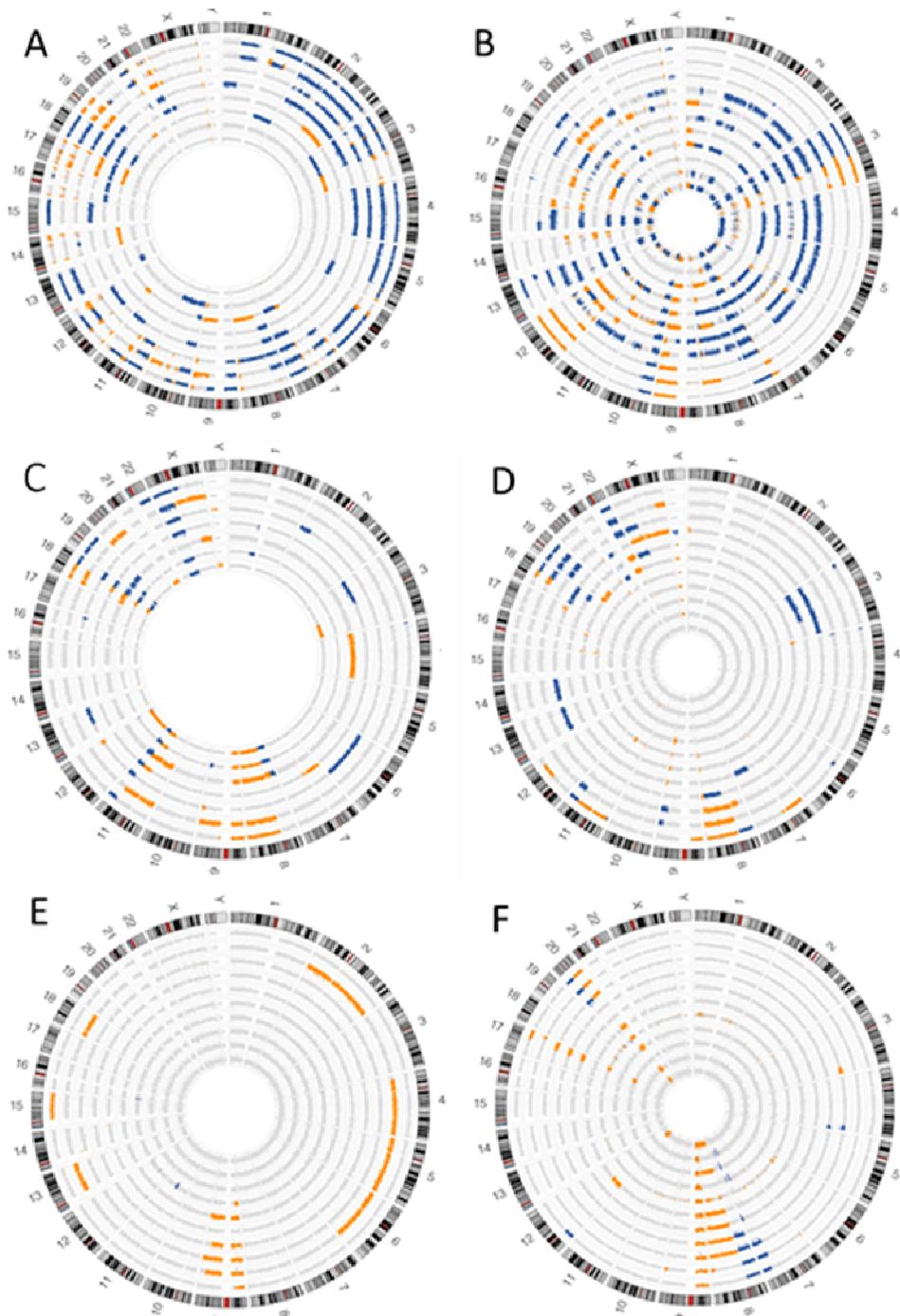


**Abbildung 5.10:** Durchschnittliche Anzahl der SCNA der untersuchten Einzelzellen pro Tumor. Die gestrichelte Linie markiert die Primärtumor/Metastasen-Paare.

## 5.5 Fallweise Beschreibung SCNA-Profile

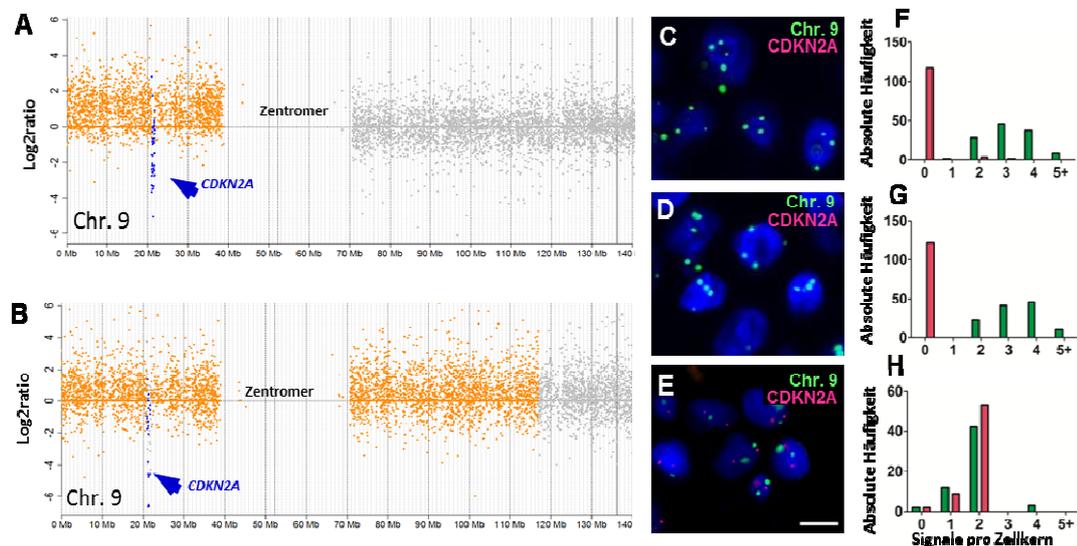
Um die Verteilung der Aberrationen im Rahmen der Metastasierung mit einer unabhängigen Methode zu untersuchen und um potentiell auftretende Unterschiede herausarbeiten zu können, war es naheliegend, sich auf die Fälle

#74, #98# und #170 zu fokussieren, da in diesen Fällen Zellen aus Primärtumor und Metastase verfügbar waren (Abb. 5.11).



**Abbildung 5.11:** *Circos Plot* Darstellungen der Einzelzell-aCGH Profile der drei untersuchten Primärtumor/Metastasen-Paare. Primärtumor **(A)** und Metastase **(B)** von Fall #74. Primärtumor **(C)** und Metastase **(D)** von Fall #98. Primärtumor **(E)** und Metastase **(F)** von Fall #170. Jeder Ring repräsentiert das SCNA-Profil einer Einzelzelle. In orange sind chromosomale Zugewinne und in blau chromosomale Verluste dargestellt.

Bei den Einzelzellprofilen dieser drei Paare konnten fallspezifische gemeinsame Aberrationen zwischen Primärtumoren und ihren Metastasen beobachtet werden. Beispiele hierfür sind der 7p Verlust von Fall #74, der 11q-Verlust von Fall #98 und 9p-Zugewinn von #170 (Abb. 5.11). Interessanterweise war der 9p-Zugewinn von #170 sehr häufig mit einer Deletion des *CDKN2A*-Lokus kombiniert (Abb. 5.12) und fand sich in 80% der untersuchten Metastasenzellen und in 33% der Primärtumorzellen. Um nun Veränderungen stichprobenartig an Gewebeschnitten der hier untersuchten Fälle mit einer unabhängigen Methode zu validieren, wurden an den Loci von *CDKN2A* (9p21.3), *CCND1* (11q13.3), *EGFR* (7p11.2) und *MYC* (8q24.21) FISH-Analysen durchgeführt (für eine Zusammenfassung der FISH und aCGH Ergebnisse siehe Tabelle 10.1 im Appendix). Zur Kontrolle wurde für jeden untersuchten Locus eine entsprechende Hybridisierung mit den Sonden an Mukosazellen durchgeführt, die einem diploiden und unveränderten Karyotyp aufweisen. In Abbildung 5.12 ist die o.g. homozygote *CDKN2A* (9p21.3) Deletion von Fall #170 in der FISH-Analyse gut zu erkennen; die Deletion war in diesem untersuchten Tumorareal in jeder Tumorzelle (112/112 Zellen, 100%) zu beobachten.



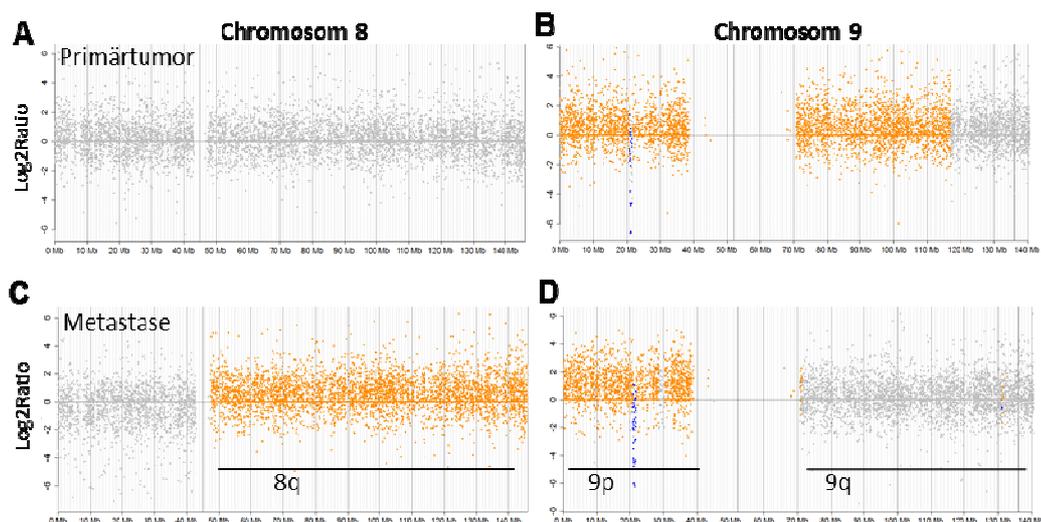
**Abbildung 5.12:** Aberrations- und FISH-Analyse von Chromosom 9 und des *CDKN2A*-Genlokus von Fall #170. Chromosomenplots von Chr. 9 einer repräsentativen Primärtumorzelle (A) und einer Metastasenzelle (B). In orange sind chromosomale Zugewinne dargestellt und in blau chromosomale Verluste. Die blauen Pfeile markieren *CDKN2A*. Repräsentative Fotos der FISH des *CDKN2A* Genlokus (rot) und Zentromers von Chr. 9 (grün) des Primärtumors (C), der Metastase (D) und einer Kontrollhybridisierung an Mukosazellen (E). Darstellung der graphischen Auswertung der *CDKN2A*-FISH für den Primärtumor (F), der Metastase (G) und der Kontrollhybridisierung (H). Messbalken = 10  $\mu$ m.

Gleichzeitig lag ein messbarer Zugewinn von Chromosom 9, sowohl im Primärtumor in 113 von 123 Zellen (92%) als auch in der Metastase in 99 von 112 Zellen (88%) von Fall #170, vor (Abb. 5.12 F+G).

**Tab. 5.1:** Absolute und prozentuale Werte der aCGH und FISH-Auswertung von Fall #170 für den Verlust des Genlokus *CDKN2A* in Einzelzellen.

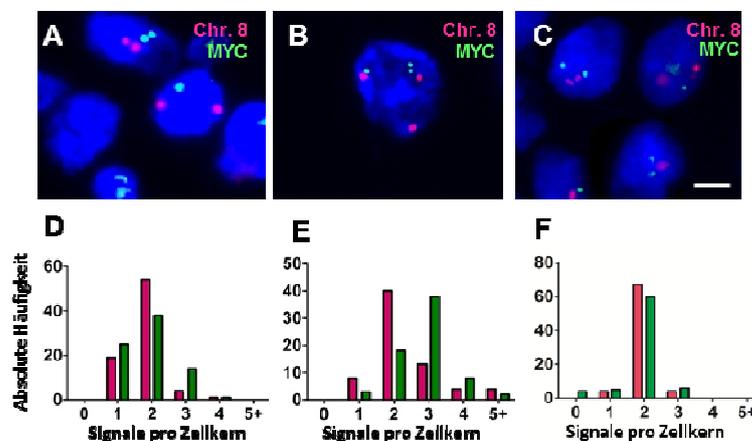
Gen-Lokus	170 PT		170 M	
	Detektions-Methode			
	aCGH	FISH	aCGH	FISH
<i>CDKN2A</i>	4/10 (50%)	117/123 (95%)	12/15 (80%)	112/112 (100%)

Dieser Zugewinn wurde über eine Zentromer-Sonde bestimmt, ein Bereich der über die aCGH nicht erfasst werden kann. Jedoch zeigten sich in den Einzelzell-aCGH Analysen am kurzen Arm von Chromosom 9 auch perizentromerisch, sowohl bei den Primärtumorzellen als auch bei den Metastasenzellen, deutliche Zugewinne. Neben solchen gemeinsamen Aberrationen konnten auch genetische Veränderungen beobachtet werden, die zwischen Primärtumoren und Metastasen divergent waren. Besonders auffällig war hier eine Konstellation bei Fall #170. In der aCGH-Analyse konnte nur in den Zellen des Primärtumors ein Zugewinn am langen Arm von Chromosom 9 (9q13-q33.3) detektiert werden, jedoch nicht in den Zellen der Metastase (Abb. 5.13 B+D).



**Abbildung 5.13:** Aberrations-Analyse von Chromosom 8 und 9 von Fall #170. Chromosomen-plots von Chromosom 8 und Chromosom 9 einer repräsentativen Primärtumorzelle sowie einer Metastasenzelle. In orange sind chromosomale Zugewinne dargestellt und in blau chromosomale Verluste.

Des Weiteren konnte nur bei den Zellen der Metastase ein 8q-Zugewinn (8q13.1-q24.3) beobachtet werden, der wiederum nicht bei den Primärtumorzellen (Abb. 5.13 A+C) beobachtet wurde. Die Zugewinne auf dem langen Arm von Chromosom 8 wurden mithilfe einer Sonde für den *MYC*-Lokus sowie der entsprechenden Zentromerregion für Fall #170 überprüft. In der Metastase konnte in 37 von 69 Zellen (54%) ein *MYC*-Zugewinn sowie *MYC*-Duplikationen (3/69 Zellen; 4%) beobachtet werden. Im Primärtumor wurde ebenfalls ein Zugewinn des *MYC*-Lokus (15/78 Zellen, 20%) detektiert, welcher aber deutlich seltener im Vergleich zur Metastase war (Abb. 5.14).



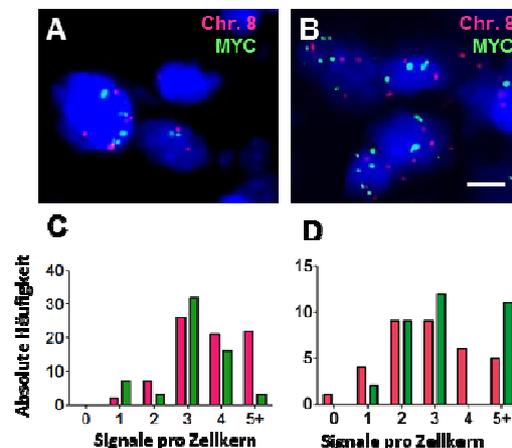
**Abbildung 5.14:** FISH-Analyse des *MYC* Genlokus (Grün) und Zentromer von Chr. 8 (Rot) von Fall #170. Primärtumorzellen (A), Metastasenzellen (B) und eine Kontrollhybridisierung an Mukosazellen (C). Graphische Darstellung der FISH-Auswertung (D-F). Messbalken = 10  $\mu$ m.

Darüber hinaus konnte in der aCGH Analyse beobachtet werden, dass für die Fälle #74, #98 und #170 Aberrationen detektiert wurden, welche entweder im Primärtumor oder in der Metastase häufiger zu sehen waren. Zum Beispiel wurde bei Fall #74 ein 8q-Zugewinn (8q24.21-q24.22) häufiger in den Zellen der Metastase (5/11 Zellen; 46%) beobachtet als im korrespondierenden Primärtumor (2/8 Zellen; 25%). Mithilfe einer *MYC*-Sonde (8q24.21), als Marker für den langen Arm von Chromosom 8, wurde der oben 8q-Zugewinn überprüft. Im Primärtumor von Fall #74 konnte so in 39 von 78 Zellen (50%) eine Signalvermehrung des *MYC*-Genlokus festgestellt werden. Gleichzeitig konnte aber auch eine fast doppelt so häufige Signalanzahl der Zentromerregion von

Chromosom 8 (69 von 78 Zellen, 89%) detektiert werden (Abb. 5.15). Dies bedeutet, dass es sich aufgrund der Gensignal/Zentromersignal-Ratio nur in 16 von 78 Zellen um einen *MYC*-Zugewinn handelt. In der Metastase wurde dagegen eine Signalvermehrung von *MYC* (23/34 Zellen; 68%), bei einer gleichzeitig niedrigeren Signalanzahl der Zentromerregion von Chromosom 8 (20 von 34 Zellen, 59%) beobachtet, sodass in 44,1% der Metastasenzellen (15/34 Zellen) ein Zugewinn des *MYC*-Genlokus festgestellt werden konnte. Außerdem wurde in vier der 34 untersuchten Metastasenzellen (12%) eine *MYC*-Duplikation detektiert. Die FISH-Analyse des *MYC*-Genlokus von Fall #74 konnte die mittels aCGH beobachteten *MYC*-Zugewinne verifizieren.

**Tabelle 5.1:** Absolute und prozentuale Werte der aCGH- und FISH-Auswertung von Fall #74 für den Zugewinn des Genlokus *MYC* in Einzelzellen.

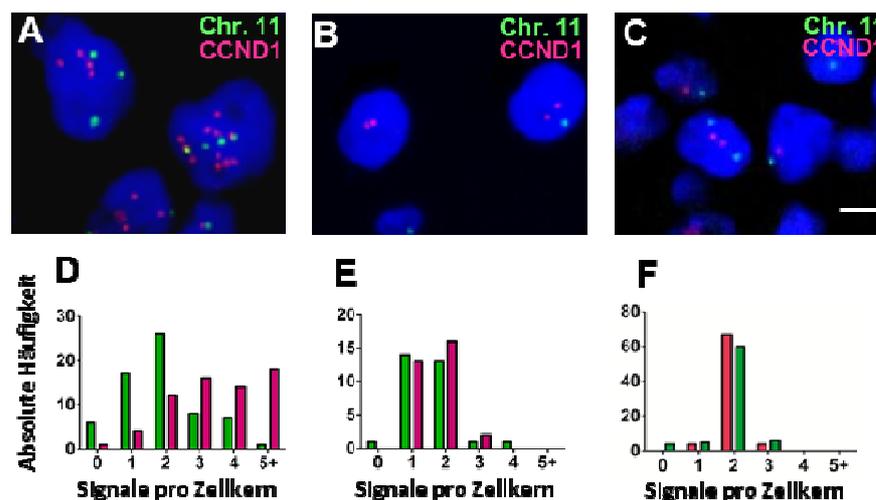
Gen-Lokus	74 PT		74 M	
	Detektions-Methode			
	aCGH	FISH	aCGH	FISH
<i>MYC</i>	2/8 (25%)	39/78 (50%)	5/11 (46%)	23/34 (68%)



**Abbildung 5.15:** FISH-Analyse des *MYC* Genlokus (Grün) und Zentromer von Chr. 8 (Rot) von Fall #74. Primärtumorzellen (A), Metastasenzellen (B). Graphische Darstellung der FISH-Auswertung (C+D). Messbalken = 10 µm.

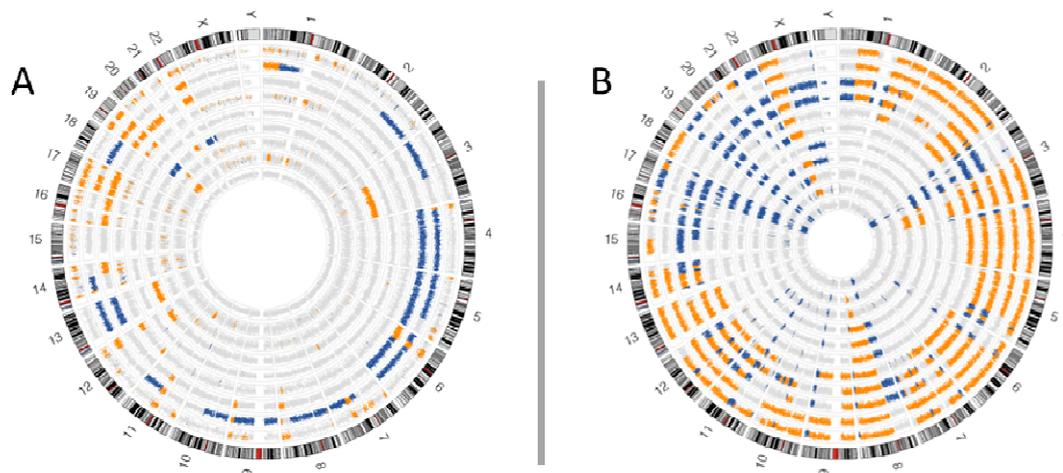
Im Primärtumor von Fall #98 konnte mittels aCGH ein häufiger Zugewinn der chromosomalen Region 11q15.4-q22.3 (6/8 Zellen; 75%), im Vergleich zur Metastase (2/12 Zellen; 17%), detektiert werden. Mithilfe einer *CCND1*-Sonde (11q13.3), als Marker für den langen Arm von Chromosom 11, wurde in der FISH-

Analyse (Abb. 5.16) in 22 von 69 Zellen (34%) des Primärtumors eine *CCND1*-Duplikation sowie in 13 von 69 Zellen (20%) eine *CCND1*-Amplifikation festgestellt. Weiterhin wurde in 70 von 82 Zellen (85%) eine Signalvermehrung der Zentromerregion von Chromosom 11 im Primärtumor beobachtet, was zu dem mittels aCGH detektierten 11q-Zugewinnen passen würde. In der Metastase konnte nur in zwei von 31 Zellen (6%) ein *CCND1*-Zugewinn beobachtet werden. In Abbildung 5.16 ist außerdem dargestellt, dass in 28 von 31 Zellen (90%) das Zentromer von Chromosom 11 diploid vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass in dem untersuchten Metastasenpräparat offenbar ausschließlich unveränderte Normalzellen ausgewertet wurden, da in diesem ausgewerteten Gewebeschnitt möglicherweise kein Tumorgewebe mehr vorhanden war (Abb. 5.16 B). Es handelte sich bei dieser Metastase ohnehin um eine kleine Läsion (Durchmesser = 0,48 mm). Somit konnte für den Primärtumor von Fall #98 mithilfe der FISH-Analyse der detektierte Zugewinn auf dem langem Arm von Chromosom 11 bestätigt werden, aber für die Metastase bleibt das aCGH Ergebnis unbestätigt, da kein zusätzliches Gewebe für eine weitere Überprüfung zur Verfügung stand.



**Abbildung 5.16.:** FISH-Analyse des *CCND1* Genlokus (Rot) und Zentromer von Chr. 11 (Grün) von Fall #98. Primärtumorzellen (A), Metastasenzellen (B) und eine Kontrollhybridisierung an Mukosazellen (C). Graphische Darstellung der FISH-Auswertung (D-F). Messbalken = 10 µm.

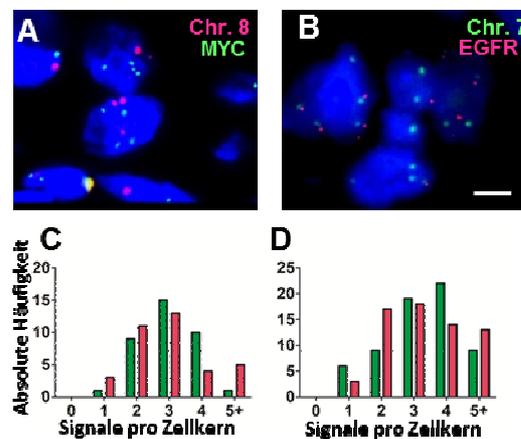
Für die Fälle #68 und #178 konnten nur Tumorzellen des Primärtumors, bzw. der Metastase genetisch charakterisiert werden. Der Primärtumor von Fall #68 zeigte kaum Veränderungen, die in mehr als zwei Zellen detektiert wurden. Zwei Aberrationen, die in mindestens 3 von 10 Zellen dieses Falls zu finden waren, waren die Zugewinne von Chromosom 19 (19q13.32-q13.43) und Chromosom 17 (17p13.3-p13.1)(Abb. 5.17 A). Außerdem wiesen zwei der Primärtumorzellen von Fall #68 ein sehr ähnliches genetisches Profil auf. Die gemeinsamen Aberrationen waren überwiegend große chromosomale Verluste auf den Chromosomen 4, 5, 6 sowie 13. Zusätzlich wurden in diesen beiden Zellen gemeinsame Zugewinne auf den Chromosomen 6p, 17p und 19 festgestellt (Abb. 5.17 A). Da für diesen Fall kein Gewebe verfügbar war, konnten entsprechende FISH Analysen nicht durchgeführt werden.



**Abbildung 5.17:** *Circos Plot* der Einzelzell-aCGH Profile von Fall #68 und #178. Primärtumor von Fall #68 (A) und Metastase von Fall #178 (B). In orange sind chromosomale Zugewinne und in blau chromosomale Verluste dargestellt.

Die Zellen der Metastase von Fall #178 wiesen insgesamt die höchste SCNA-Rate auf (siehe Kapitel 5.4). Zwei der häufigsten Aberrationen dieses Falles waren ein chromosomaler Zugewinn in der Region von 8q24.12-q24.22 und ein Verlust von Chromosom 19ptel-19p13.11 (Abb. 5.5 B). Weitere häufige chromosomale Zugewinne betrafen Chromosom 9p (9ptel-p33.3), Chromosom 7p (7ptel-p22.1) und Chromosom 11q (11q12.3-q13.4), sowie ein Teilverlust von Chromosom 17

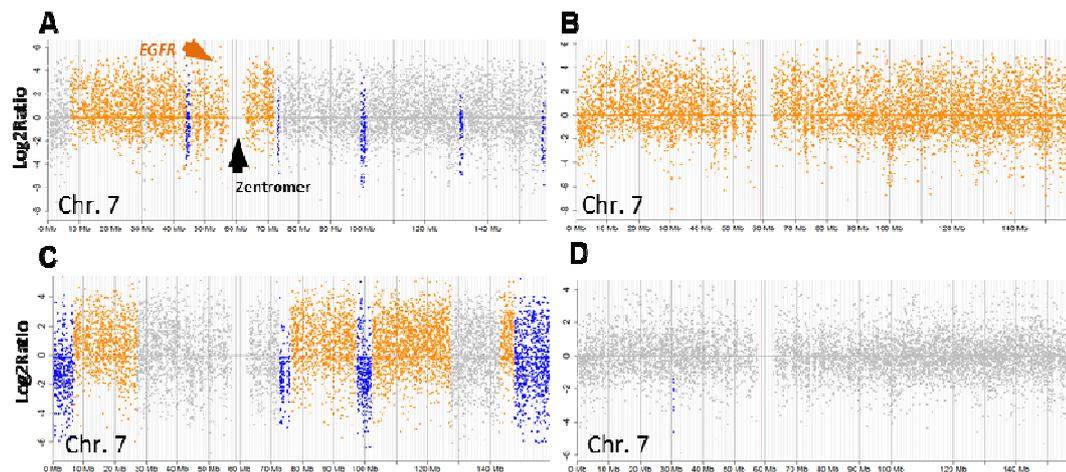
(17ptel-p21.33). Zur Bestätigung wurden einige dieser in der aCGH Analyse häufigen Veränderungen mittels FISH am Ausgangsgewebe überprüft (siehe Tabelle 10.1 im Appendix). Hierfür wurden der *MYC*-Genlocus (8q24.21) und *EGFR*-Genlocus (7p11.2) analysiert. Die FISH-Ergebnisse des *MYC*-Genlocus zeigten einen deutlichen Zugewinn des *MYC*-Gens: insgesamt konnte in 53 von 79 Zellen (67%) ein *MYC*-Zugewinn und zusätzlich in 11 von 79 Zellen (14%) eine *MYC*-Duplikation festgestellt werden. Diese mittels FISH dargelegten *MYC*-Zugewinne und *MYC*-Duplikationen passen zu den Ergebnissen der aCGH-Analyse, in der ein Zugewinn des langen Arms von Chromosom 8 in 10 von 12 Zellen (83%) festgestellt wurde (Abb. 5.18 A+C).



**Abbildung 5.18:** FISH-Analyse des Metastasengewebes von Fall #178. *MYC* (grün) und Chr. 8 (rot) (A) sowie *EGFR* (rot) und Chr. 7 (grün) (B). Graphische Darstellung der FISH-Analyse (C+D). Messbalken = 10  $\mu$ m.

Die Zugewinne auf dem langen Arm von Chromosom 7 im Fall #178 wurden mithilfe einer Sonde für den *EGFR*-Lokus sowie der entsprechenden Zentromerregion untersucht (Abb. 5.18 B+D). Hierbei wurde in 22 von 66 Zellen (33%) ein Zugewinn des *EGFR*-Lokus beobachtet, von denen 10 Zellen (15%) triploid für den *EGFR*-Lokus und der Zentromerregion waren. Dagegen war der Großteil der ausgewerteten Zellen (29/66 Zellen; 44%) diploid bzw. unverändert für den *EGFR*-Lokus und der Zentromerregion in der FISH-Analyse. Interessanterweise konnte in der aCGH-Analyse von Chromosom 7 verschiedene Aberrationsmuster beobachtet werden. In Abbildung 5.19 sind die aCGH-Profile

von Chromosom 7 für vier verschiedene Metastasenzellen dargestellt. Man erkennt perizentromerische Zugewinne in Abbildung A und B, sowie dass nur die Zelle in Abbildung B einen Zugewinn des gesamten Chromosoms 7 aufweist. Allerdings ließen sich mit der hier verwendeten FISH-Analyse zwischen diesen beiden heterogenen Aberrationsprofilen keine Unterschiede feststellen.



**Abbildung 5.19:** Aberrations-Analyse von Chromosom 7 von Fall #178. aCGH-Chromosomenplots von Chr. 7 von vier Metastasenzellen. In orange sind chromosomale Zugewinne dargestellt und in blau chromosomale Verluste. Der orangene Pfeil markiert *EGFR* und der schwarze Pfeil das Zentromer.

**Tab. 5.2:** Absolute und prozentuale Werte der aCGH- und FISH-Auswertung von Fall #178 für die Zugewinne der Genloci *MYC* und *EGFR* in Einzelzellen.

Gen-Lokus	178 M	
	Detektions-Methode	
	aCGH	FISH
<i>MYC</i>	10/12 (83%)	64/79 (81%)
<i>EGFR</i>	4/12 (33%)	22/66 (33%)

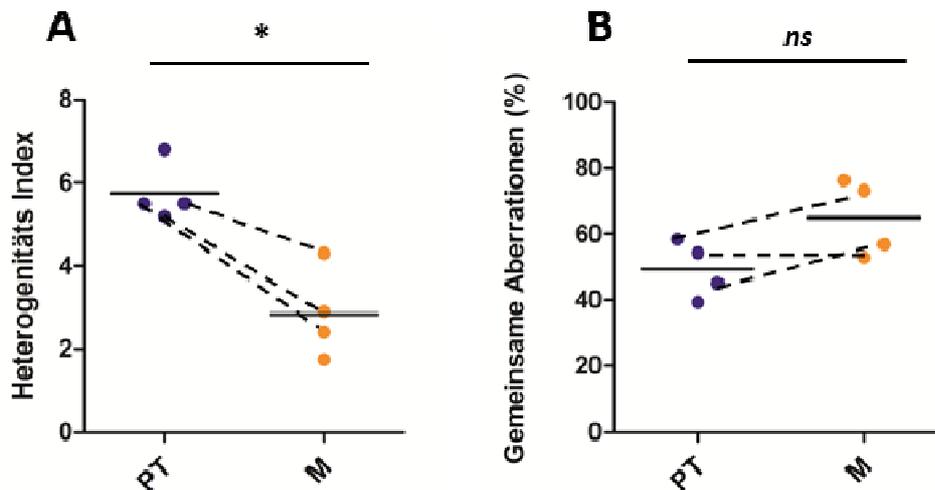
Soweit die entsprechenden Tumorgewebe zur Verfügung standen, konnten insgesamt mit Hilfe der FISH-Analyse die repräsentativ überprüften Zugewinne und Verluste der aCGH-Profile für die hier untersuchten Primärtumoren und Metastasen bestätigt werden.

## 5.6 Vergleichende Analyse der SCNA innerhalb und zwischen Primärtumoren und Metastasen

### 5.6.1 Grad der Heterogenität zwischen Primärtumoren und Metastasen

Um den Grad der genetischen Heterogenität der untersuchten Tumore beurteilen zu können, wurde der Heterogenitätsindex (HI) nach Georgiades *et al* für jeden Tumor anhand des Verhältnisses zwischen gemeinsamen und individuellen SCNA berechnet (Georgiades *et al*, 1999). Als gemeinsame SCNA eines Tumors wurden solche gewertet, die in mindestens zwei Tumoreinzellen detektiert wurden. Als individuelle SCNA wurden Alterationen definiert, die nur in einer Einzelzelle eines Tumors detektiert werden konnten.

Die durchschnittliche HI-Wert (HI = 3,2) aller Metastasen (n = 4) war signifikant niedriger ( $p = 0,0189$ ) als der der Primärtumoren (HI = 5,4) (n = 4). Auch in dem HI-Vergleich der drei Primärtumor/Metastasen-Paare (n = 3) konnte ein signifikant reduzierter ( $p = 0,0041$ ) HI-Wert in den Metastasen ( $3,2 \pm 0,57$ ) im Vergleich zu den Primärtumoren ( $5,4 \pm 0,54$ ) festgestellt werden. Diese Daten deuteten an, dass die SCNA in den Metastasen homogener als in ihren Primärtumoren sind. Um diesem Befund weiter nachzugehen, wurde die Anzahl der gemeinsamen SCNA der Einzelzellen für jedes Primärtumor/Metastasen-Paar (n = 3) miteinander verglichen. Bei dieser Auswertung war bei zwei Metastasen der drei untersuchten Fälle (#74, #170) eine erhöhte aber nicht signifikante Anzahl an gemeinsamen SCNA festzustellen (Abb. 5.20). Der Primärtumor und die Metastase von Fall #98 wiesen eine vergleichbare Anzahl an gemeinsamen SCNAs (38 vs. 36 SCNA/Tumor) auf (Abb. 5.20). Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Metastasen bzgl. ihrer SCNA weniger heterogen als die Primärtumore sind.

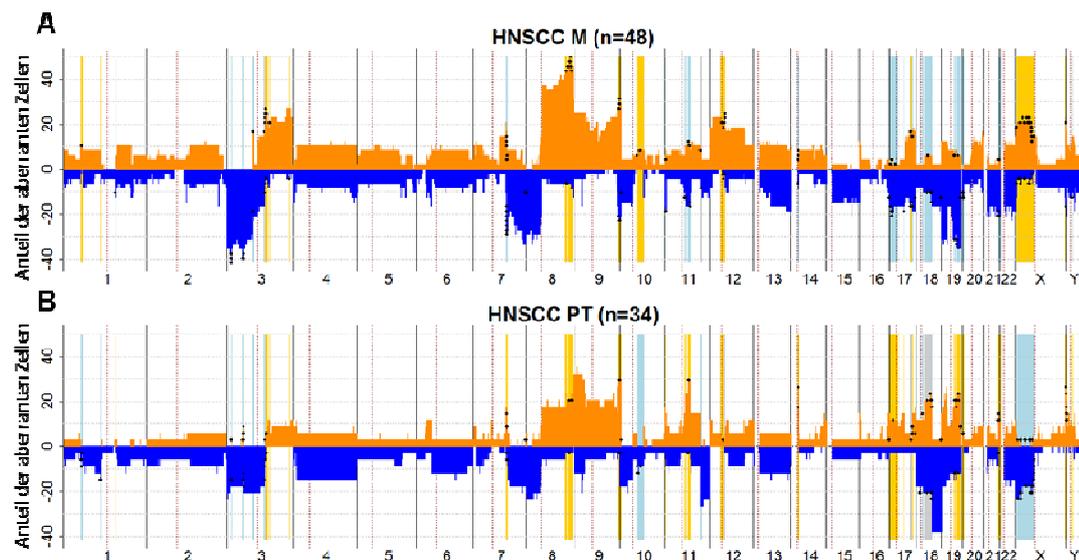


**Abbildung 5.20.:** Auswertung der SCNA der Primärtumoren (blau) und/oder Metastasen (orange) der Fälle 68#, #74, #98, #170 und #178. Heterogenitäts-Indices (**A**) und relative Anzahl der SCNA (**B**). Die gestrichelten Linien verbinden die Primärtumor/Metastasen Paare. \*  $p < 0,05$ , ns = nicht signifikant.

## 5.7 Suche nach selektierten SCNA in Metastasenzellen

Die Beobachtung, dass Metastasenzellen bezüglich ihrer SCNA homogener waren als die Zellen der Primärtumore, könnte für eine Selektion von metastasierungsrelevanten SCNAs sprechen. Daher war es von großem Interesse, solche in den Metastasen angereicherte SCNA zu identifizieren. Zur Ermittlung dieser SCNA wurde deren Verteilung zwischen vier Primärtumoren (insgesamt 34 analysierte Zellen) und vier Metastasen (48 Zellen) mithilfe des „Exakten Test nach Fisher“ ( $\alpha = 0,05$ ) verglichen.

Hierbei ließ sich zunächst feststellen, dass chromosomale Zugewinne in den Metastasenzellen signifikant häufiger vorhanden waren, als chromosomale Verluste (Abb. 5.21, Tab. 5.3 & 5.4).



**Abbildung 5.21.:** Zusammenfassende Darstellung der chromosomalen Verluste (blau) und Zugewinne (orange) der HNSCC Einzelzellen. Metastasenzellen (A) und Primärtumorzellen (B). Auf der Abszisse sind die Chromosomen, auf der Ordinate ist der prozentuale Anteil aberranter Zellen dargestellt. Signifikante Häufigkeitsunterschiede ( $q > 0,05$ ) sind farbig hinterlegt.

Signifikant mehr Zugewinne in den Metastasen wurden bei 3q21.1-q29, 7q11.23-q21.3, 8q23.3-q24.23, 12p13.33-p13.11 und Xp22.33-p11.23 (Abb. 5.21, Tab. 5.3) beobachtet und Verluste bei 3p26.3, 3p25.2, 7q22.1 und 7q31.33-q32.1 (Abb. 5.21, Tab. 5.4). Dabei konzentrierten sich die häufigsten chromosomalen Zugewinne in einer 21,1 Mb großen Region auf Chromosom 8q24.11-q24.23 (Start-Stop Position der SCNA: 118117254-139185613 bp) (Tab. 5.5). Die drei signifikant häufigsten gemeinsamen Veränderungen der untersuchten Metastasenzellen (44%, 46% und 48%) wiesen einen Zugewinn bei dieser Region auf (Tab. 5.5), in dem 46 Gene lokalisiert sind.

Da sich innerhalb dieses Segments das Onkogen *MYC* befindet (Tab. 5.5), sowie das Lymphknotenmetastasen-assoziierte Gen *ASAP1*, sollte der Zugewinn dieser Genloci an einem größerem HNSCC-Kollektiv überprüft werden.

**Tabelle 5.3.:** Bei Metastasenzellen signifikant häufigere (FDR<0,05) DNA-Gewinne (aCGH Analyse).

Chr.	Start (bp)	Stop (bp)	P-Wert	FDR	Chr.	Start (bp)	Stop (bp)	P-Wert	FDR
1	51285096	51315020	0,0199	0,0430	23	45215011	45283486	0,0011	0,0212
1	49846868	51222743	0,0222	0,0432	23	21471614	21840820	0,0015	0,0269
1	51315020	53190104	0,0222	0,0428	23	34516510	34629500	0,0015	0,0249
1	109306940	109506847	0,0278	0,0456	23	40583660	40656854	0,0015	0,0231
1	53190104	55176633	0,0379	0,0457	23	41557496	41670566	0,0015	0,0216
3	115587989	115614356	0,0117	0,0381	23	20107178	21471614	0,0022	0,0292
3	115418602	115587989	0,0163	0,0421	23	21840820	30186228	0,0022	0,0275
3	119555875	122598744	0,0208	0,0436	23	30934040	34516510	0,0022	0,0260
3	115359659	115418602	0,0299	0,0470	23	34629500	40583660	0,0022	0,0246
3	77453310	77517160	0,0324	0,0459	23	40721472	41557496	0,0022	0,0234
3	110610938	113915274	0,0339	0,0458	23	41670566	42185012	0,0022	0,0223
3	113915274	114875990	0,0344	0,0450	23	42256902	45080301	0,0022	0,0213
3	77517160	79789281	0,0371	0,0458	23	45283486	46803416	0,0022	0,0203
3	79974561	80093981	0,0371	0,0455	23	14680736	14704594	0,0027	0,0236
3	115614356	116601440	0,0377	0,0456	23	14764200	14790334	0,0027	0,0227
3	116601440	118824458	0,0381	0,0447	23	15325347	15711908	0,0027	0,0218
3	188108022	188162478	0,0408	0,0460	23	46803416	46866295	0,0032	0,0235
3	129851600	129957848	0,0418	0,0469	23	40656854	40721472	0,0037	0,0262
3	115115552	115359659	0,0455	0,0490	23	46914628	47986866	0,0043	0,0292
3	118943195	119555875	0,0478	0,0489	23	49272360	50327686	0,0043	0,0283
3	115055558	115115552	0,0478	0,0487	23	3656516	9895585	0,0043	0,0276
8	134010119	134028136	0,0096	0,0365	23	17548647	17571096	0,0043	0,0268
8	128557831	134010119	0,0139	0,0388	23	47986866	48020846	0,0047	0,0286
8	134028136	134551203	0,0139	0,0383	23	49153314	49272360	0,0047	0,0278
8	118422968	123381468	0,0174	0,0439	23	46866295	46888348	0,0053	0,0282
8	134551203	134801490	0,0184	0,0438	23	14881556	14943361	0,0071	0,0343
8	126295460	128557831	0,0241	0,0429	23	17046623	17078558	0,0071	0,0336
8	139146873	139185613	0,0241	0,0425	23	17124532	17548647	0,0071	0,0328
8	118117254	118422968	0,0330	0,0457	23	17571096	17603022	0,0071	0,0321
8	134801490	135784197	0,0349	0,0451	23	49061178	49085482	0,0074	0,0326
8	135808307	139146873	0,0349	0,0448	23	46888348	46914628	0,0086	0,0339
12	47521988	48093930	0,0055	0,0279	23	30186228	30934040	0,0109	0,0393
12	46761617	47521988	0,0111	0,0379	23	42185012	42256902	0,0109	0,0387
12	48093930	48108250	0,0179	0,0432	23	45080301	45215011	0,0109	0,0380
12	34102911	38593468	0,0222	0,0436	23	3564262	3656516	0,0123	0,0384
12	44648662	46761617	0,0251	0,0440	23	49085482	49141512	0,0133	0,0386
12	38593468	40853674	0,0304	0,0470	23	50327686	50517430	0,0133	0,0381
12	44589378	44648662	0,0304	0,0467	23	54104939	54168488	0,0133	0,0376
12	40853674	44589378	0,0331	0,0455	23	48020846	48036590	0,0187	0,0440
17	64550770	67154704	0,0128	0,0392	23	48973644	49061178	0,0187	0,0435
17	70033586	70073526	0,0128	0,0386	23	49141512	49153314	0,0187	0,0430
17	67154704	70033586	0,0218	0,0444	23	56604338	56672446	0,0264	0,0455
23	14790334	14881556	0,0011	0,0466	23	50760134	54104939	0,0307	0,0452
23	14943361	15325347	0,0011	0,0388	23	54168488	56536178	0,0307	0,0449
23	15711908	17001371	0,0011	0,0333	23	3413414	3564262	0,0343	0,0454
23	17020084	17046623	0,0011	0,0291	23	56672446	57310336	0,0380	0,0448
23	17078558	17124532	0,0011	0,0259	23	56536178	56588688	0,0450	0,0489
23	17603022	20107178	0,0011	0,0233	24	59002374	59019008	0,0222	0,0417

**Tabelle 5.4.:** Bei Metastasenzellen signifikant häufigere (FDR <0,05) DNA-Verluste (aCGH Analyse).

Chr.	Start (bp)	Stop (bp)	P-Wert	FDR	Chr.	Start (bp)	Stop (bp)	P-Wert	FDR
1	154661654	154899255	0,0379	0,0454	17	8182948	8307236	0,0131	0,0386
3	49038272	49073704	0,0029	0,0227	17	81078976	81093224	0,0162	0,0434
3	51749355	51811296	0,0029	0,0219	17	67154704	70033586	0,0218	0,0444
3	49073704	51749355	0,0047	0,0271	17	70234626	70378516	0,0222	0,0439
3	51811296	52553503	0,0047	0,0264	17	7924426	8182948	0,0272	0,0454
3	12800963	12863018	0,0107	0,0392	17	8372118	13285529	0,0272	0,0450
3	48103710	49038272	0,0118	0,0380	17	70132392	70234626	0,0282	0,0460
3	52553503	52562332	0,0172	0,0440	17	1241388	7924426	0,0328	0,0461
3	12698534	12784448	0,0190	0,0433	17	13285529	27920877	0,0328	0,0458
3	12863018	13399156	0,0190	0,0428	17	63508917	64550770	0,0338	0,0459
3	12784448	12800963	0,0252	0,0437	17	51914	59766	0,0341	0,0457
3	46726089	48103710	0,0295	0,0470	17	46675482	46692482	0,0344	0,0452
7	100063810	100135400	0,0058	0,0288	17	70378516	71067352	0,0367	0,0460
7	100032328	100063810	0,0097	0,0362	19	59083548	59091158	0,0088	0,0339
7	100023276	100032328	0,0157	0,0428	19	46387088	52337020	0,0114	0,0382
7	100143848	100167163	0,0176	0,0430	19	54568812	59083548	0,0114	0,0376
7	100326980	100653748	0,0206	0,0438	19	46373908	46387088	0,0175	0,0437
7	100135400	100143848	0,0299	0,0467	19	52337020	54568812	0,0175	0,0432
7	100229186	100326980	0,0305	0,0465	19	46362248	46373908	0,0240	0,0432
7	100653748	100803846	0,0305	0,0461	19	266146	275954	0,0341	0,0454
7	100853848	102113866	0,0305	0,0458	19	38805508	41737504	0,0391	0,0451
7	99952702	100023276	0,0344	0,0447	19	44948126	46362248	0,0391	0,0449
7	102113866	102224716	0,0376	0,0458	19	44563094	44948126	0,0466	0,0499
7	100803846	100853848	0,0473	0,0496	20	1560030	1589908	0,0162	0,0429
8	161494	176841	0,0379	0,0451	20	3522944	4201592	0,0162	0,0423
9	135836794	135910618	0,0213	0,0443	20	299087	1560030	0,0222	0,0425
9	136002213	136552188	0,0213	0,0439	20	1589908	3522944	0,0222	0,0421
9	135669095	135836794	0,0267	0,0456	20	270927	299087	0,0473	0,0499
9	135910618	136002213	0,0267	0,0452	21	43916396	48067895	0,0050	0,0270
9	136552188	138007534	0,0267	0,0449	21	43822746	43834242	0,0055	0,0285
9	134874022	134930608	0,0305	0,0456	21	43834242	43916396	0,0119	0,0375
9	135556502	135669095	0,0305	0,0453	21	42785632	42916411	0,0239	0,0433
9	140994752	141008889	0,0379	0,0449	21	43814437	43822746	0,0400	0,0454
9	132908765	134874022	0,0497	0,0499	23	155072740	155086470	0,0075	0,0327
9	134930608	135556502	0,0497	0,0497	23	155100093	155223830	0,0075	0,0320
11	2988980	3248890	0,0196	0,0437	23	155086470	155100093	0,0086	0,0345
11	62368986	63585895	0,0323	0,0463	23	154510417	154528382	0,0324	0,0461
11	60688186	60750846	0,0385	0,0449	23	151801418	151816134	0,0351	0,0446
17	64550770	67154704	0,0128	0,0392	23	153908257	153996444	0,0351	0,0443
17	70033586	70073526	0,0128	0,0386	23	151816134	153027810	0,0391	0,0453
17	70073526	70132392	0,0130	0,0390	24	16524718	16650096	0,0449	0,0491

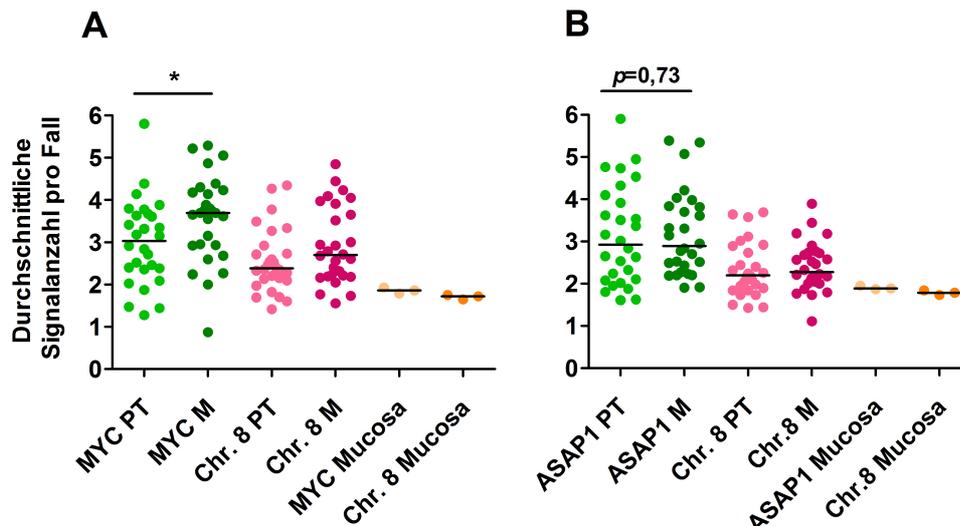
**Tabelle 5.5:** Alle identifizierten Gene (n = 46) der drei signifikant häufigsten gemeinsamen Zugewinne, welche auf Chromosom 8q24.11-q24.23 lokalisiert sind.

Zytoband	<i>p</i> -Wert	FDR	Anzahl der Metastasen-zellen mit einem Zugewinn auf 8q24 (%)	Anzahl der Metastasen-zellen mit einem Verlust auf 8q24 (%)	Anzahl der Primärtumor-zellen mit einer SCNA auf 8q24 (%)	Auf dem Segment lokalisierte Gene
8q24.11-q24.12	0,0174	0,0439	<b>21 (44%)</b>	3 (6%)	8 (17%)	<i>MED30, EXT1, SAMD12, TNFRSF11B, COLEC10, MAL2, NOV, ENPP2, TAF2, DSCC1, DEPDC6, COL14A1, MRPL13, MTBP, SNTB1, HAS2, HAS2AS</i>
8q24.13-q24.21	0,0241	0,0429	<b>22 (46%)</b>	3 (6%)	8 (17%)	<i>NSMCE2, TRIB1, FAM84B, CCAT1, CASC8, POU5F1P1</i>
8q24.21-q24.22	0,0139	0,0388	<b>23 (48%)</b>	3 (6%)	8 (17%)	<i>MYC, CCDC26, GSDMC, FAM49B, ASAP1, ADCY8, EFR3A, OC90, HHLA1, KCNQ3, HPRG1, LRRC6, TMEM71, PHF20L1</i>
8q24.22	0,0139	0,0383	<b>23 (48%)</b>	3 (6%)	8 (17%)	<i>TG, SLA, WISP1, NDRG1, ST3GAL1</i>
8q24.22	0,0349	0,0451	<b>21 (44%)</b>	4 (8%)	8 (17%)	<i>ZFAT, ZFATAS</i>
8q24.22-q24.23	0,0349	0,0448	<b>21 (44%)</b>	4 (8%)	8 (17%)	<i>T-STAR, FAM135B</i>

## 5.8 Überprüfung der Frequenz von *MYC*- und *ASAP1*-Zugewinnen an einem HNSCC Kollektiv mittels FISH

Die bisher erlangten Daten deuteten an, dass die Anzahl der Zellen mit einem *MYC*- und *ASAP1*-Zugewinn in den untersuchten Metastasen deutlich höher ist als in den Primärtumoren. Da mit der Einzelzellanalyse nur wenige Fälle untersucht wurden (n = 5), sollte in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob sich diese Befunde auch bei einem größeren Kollektiv bestätigen lassen. Hierfür wurden mittels FISH ein *Tissue-Micro-Array* (TMA) mit 28 autologen Paaren von HNSCC Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen untersucht. Die FISH-

Analyse für den *MYC*-Genlocus ergab eine erhöhte durchschnittliche Kopienanzahl ( $3,56 \pm 1,03$ ) in den Metastasen gegenüber den Primärtumoren ( $3,0 \pm 1,01$ ). Dagegen konnte kein Unterschied der durchschnittlichen Kopienanzahl des *ASAP1*-Genlocus im Vergleich der Primärtumoren ( $3,13 \pm 1,67$ ) zu den Metastasen ( $3,18 \pm 1,01$ ) beobachtet werden.

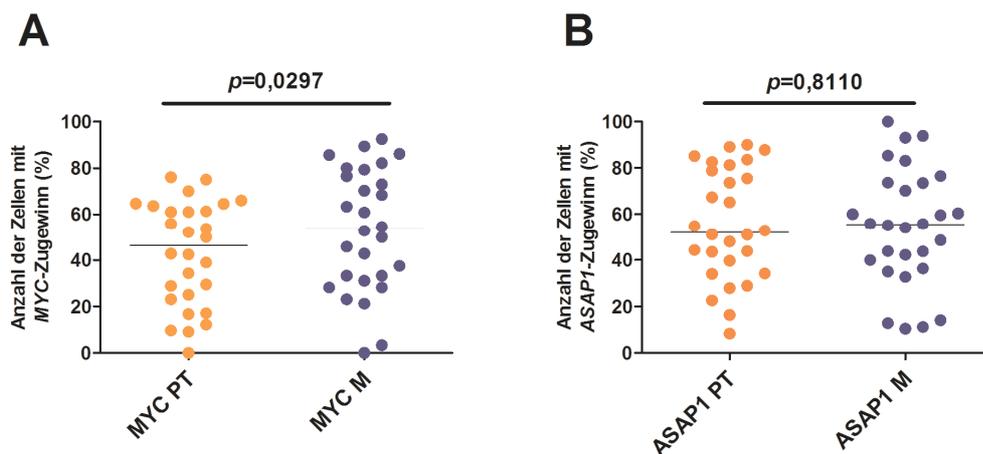


**Abbildung 5.22:** Graphische Darstellung der durchschnittlichen Kopienanzahl pro Tumor des *MYC*-Genlocus (A) und des *ASAP1*-Genlocus (B) in HNSCC-Primartumoren (PT) sowie Lymphknotenmetastasen (M). \* $p = 0,0258$ .

Mithilfe des Mann-Whitney-Tests wurde ermittelt, dass die durchschnittliche Kopienanzahl des *MYC*-Genlocus in den Metastasen, im Vergleich zu den Primärtumoren, signifikant erhöht ( $p = 0,0258$ ) war (Abb. 5.22 A). Die Kopienanzahl des *ASAP1*-Genlocus zwischen Primärtumoren und Metastasen war dagegen nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0,7300$ ) (Abb. 5.22 B).

Nachdem die durchschnittliche Kopienanzahl für jeden Tumor untersucht wurde, sollte nun überprüft werden, ob die Anzahl der Zellen mit einem *ASAP1*- oder *MYC*-Zugewinn häufiger in den Metastasen zu detektieren sind, als im Vergleich zu den Primärtumoren. Hierfür wurde für jede einzelne Tumorzelle der Ratio aus Gensignal-Anzahl/Zentromersignal-Anzahl berechnet. War diese Ratio einer Tumorzelle  $\geq 1,2$  wurde dies als Zugewinn (mehr als zwei Kopien des Genlocus)

definiert. Anschließend wurde für jedes untersuchte Tumorgewebe der prozentuale und totale Anteil von Tumorzellen mit einem Genlokus-Zugewinn berechnet. Auf Grundlage dieser Analyse wurde für jedes Primärtumor/Metastasen-Paar ermittelt, welcher Tumor einen höheren Anteil an Zellen mit *ASAP1*- bzw. *MYC*-Zugewinn vorweist (Abb. 5.23). Die Ergebnisse der untersuchten Primärtumoren und autologen Metastasen wurde mithilfe eines paarweisen t-Tests statistisch geprüft.



**Abbildung 5.23:** Prozentualer Anteil von Tumorzellen mit einem *MYC*- bzw. *ASAP1*-Zugewinn im Primärtumor und der Metastase von 28 HNSCC-Patienten. *MYC* (A); *ASAP1* (B).

Für den *MYC*-Genlokus konnte festgestellt werden, dass in 21 von 28 Fällen die untersuchten Metastasen eine signifikant ( $p = 0,0297$ ) erhöhte Anzahl von Zellen mit einem *MYC*-Zugewinn (515/967 Metastasenzellen, 53%), im Vergleich zu den autologen Primärtumoren (446/1038 Primärtumorzellen, 43%), aufwiesen (Abb. 5.23 A). *MYC*-Amplifikationen (mehr als 4 Kopien des Genlokus) wurden zu 8% in den Metastasenzellen und zu 9% in den Primärtumorzellen insgesamt weniger häufig detektiert. Außerdem konnte in 11 von 28 Fällen eine höhere Anzahl von Zellen mit *MYC*-Amplifikationen in den Metastasen als in den Primärtumoren festgestellt werden. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,5680$ ).

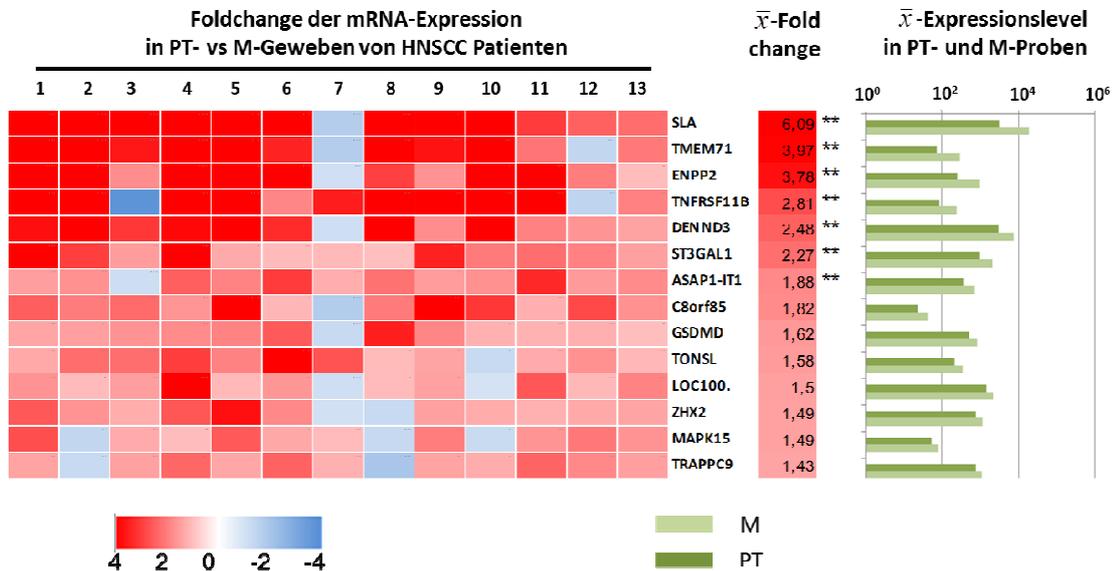
Die Analyse der Anzahl von Zellen mit einem *ASAP1*-Zugewinn in den Metastasen (54%, 661/1218 Metastasenzellen) und der Primärtumoren (56%, 754/1351

Primärtumorzellen) zeigte ein ähnliches Ergebnis. Bei einer paarweisen Auswertung konnte kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,8110$ ) eines *ASAP1*-Zugewinns in den Metastasen im Vergleich zu den Primärtumoren (13/28 Fällen) festgestellt werden (Abb. 5.23 B). Interessanterweise wurden *ASAP1*-Amplifikationen leicht häufiger in den Metastasen (10%, 118/1218 Zellen) und Primärtumoren (8%, 114/1351 Zellen) detektiert, als für den o.g. *MYC*-Genlocus. Die höhere Anzahl der Zellen mit einer *ASAP1*-Amplifikation in den Metastasen im Vergleich zum Primärtumor war statistisch nicht signifikant, zeigte aber einen Trend ( $p = 0,2326$ ).

### **5.9 Genexpressionsanalyse von Primärtumoren und Metastasen auf der 8q24 lokalisierten Gene**

Um nun einen Hinweis zu erhalten, ob die auf 8q24 lokalisierten Gene auch auf Expressions-Ebene in Primärtumoren und Metastasen differenziert exprimiert werden, wurden an einem weiteren unabhängigen HNSCC-Kollektiv die mRNA-Expression untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die genomweiten Expressionsprofile von insgesamt 13 HNSCC-Patienten, bei denen jeweils der Primärtumor ( $n = 13$ ) und mindestens eine autologe Lymphknotenmetastase vorlag, untersucht. Insgesamt standen die Expressionsdaten von 18562 Genen zur Verfügung. Mithilfe des T-Test nach Mann-Whitney wurde berechnet, ob die mRNA-Expression zwischen den hier untersuchten HNSCC-Primärtumoren ( $n = 13$ ) und -Metastasen ( $n = 29$ ) signifikant unterschiedlich ( $FDR < 0,05$ ) war. Genomweit betrachtet wurden 4632 Gene (25%) signifikant unterschiedlich zwischen Primärtumoren und Metastasen exprimiert. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich die Expressionsunterschiede für die in der aCGH-Analyse identifizierten 47 zugewonnen Genloci in der chromosomalen Region 8q24 betrachtet (Appendix Abb. 10.2). Für 31 dieser 46 Gene (31/46, 67%) konnte ein statistisch signifikanter differenzierter Expressionsunterschied zwischen Primärtumoren und Metastasen beobachtet werden (Tab. 5.6). Davon konnten 14 Gene in der Region 8q24 als signifikant überexprimiert identifiziert werden (Tab. 5.6).

**Tabelle 5.6:** Zusammenfassung der 14 Gene mit einer signifikanten mRNA Überexpression (FDR <0,05, \*\*<0,005) in den Metastasen im Vergleich zu den korrespondierenden Primärtumoren.

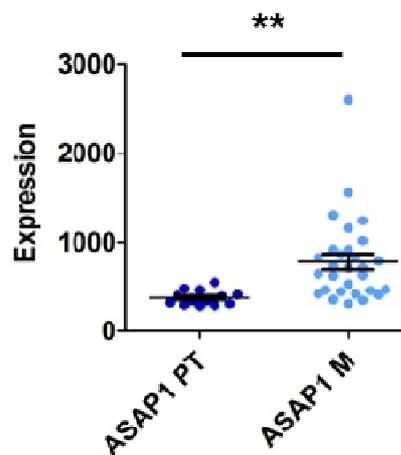


In einem nächsten Schritt wurden die o.g. 14 Gene mit den 46 identifizierten Genen aus der aCGH-Analyse (siehe Kapitel 5.7, Tab. 5.5) abgeglichen. Zehn Gene, die bei den Metastasen sowohl in der aCGH-Analyse signifikant zugewonnen, als auch in der Expressionsanalyse gegenüber den Primärtumoren überexprimiert waren, wurden auf diese Weise identifiziert und sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst.

**Tabelle 5.7:** Alle Gene ( $n = 10$ ) der untersuchten Metastasen welche im Expressionsarray signifikant überexprimiert waren und bereits in der aCGH-Analyse (Tab. 5.5) als signifikant zugewonnen identifiziert wurden.

Gen	Zytoband	Expr. PT	Expr. M	Fold change	p-Wert	FDR
<i>SLA</i>	8q24.22	3109,1	18926,4	6,09	0,00000052	0,0000698
<i>ENPP2</i>	8q24.12	251,1	949,6	3,78	0,0000151	0,0005358
<i>ST3GAL1</i>	8q24.22	938,8	2126,9	2,27	0,00003602	0,00093643
<i>TMEM71</i>	8q24.22	73,2	290,8	3,97	0,00008002	0,00159362
<i>GSDMC</i>	8q24.3	521,5	843,8	1,62	0,00008988	0,00172526
<i>ASAP1</i>	8q24.21	363,5	683,5	1,88	0,0000918	0,00175302
<i>TNFRSF11B</i>	8q24.12	86,6	243,4	2,81	0,00044755	0,00506869
<i>TRAPPC9</i>	8q24.3	758,8	1084,5	1,43	0,00237289	0,01560154
<i>MAPK15</i>	8q24.3	52,2	77,7	1,49	0,00258331	0,01660851
<i>ZHX2</i>	8q24.13	768,5	1148,5	1,49	0,00528549	0,027176

Interessanterweise wurde - im Vergleich zu dem detektierten Zugewinn von *MYC* in der aCGH Analyse - kein signifikanter Expressionsunterschied von *MYC* zwischen den Primärtumoren und den Metastasen (Fold change = -1,01) beobachtet (Appendix Abb. 10.2). Im Gegensatz dazu konnte jedoch für *ASAP1* eine signifikant häufigere mRNA-Überexpression in den Metastasen festgestellt werden (Fold change = 1,88;  $p = 9,18 \times 10^{-5}$ ; FDR = 0,001753) (Abb. 5.24; Tab. 5.7).

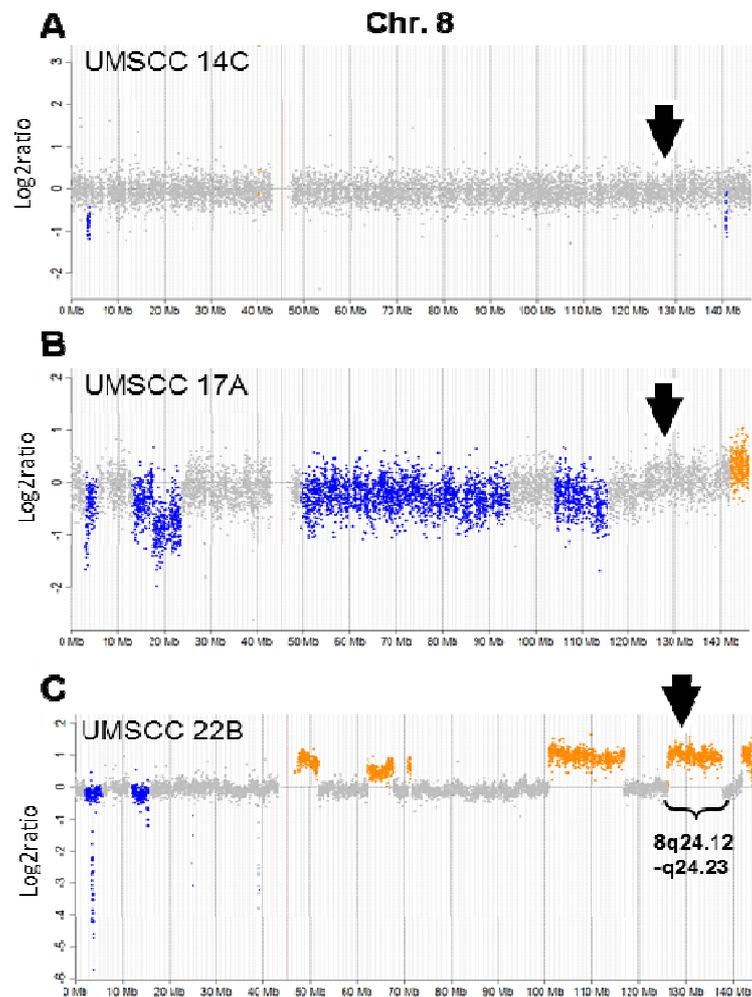


**Abbildung 5.24:** *ASAP1* mRNA-Expressionswerte in Primärtumoren (PT) und Metastasen (M). \*\* FDR<0,005.

### 5.10 Funktionelle Untersuchungen von *ASAP1* an UM-SCC Kopf-Hals-Tumor Zelllinien

Die bisherigen Daten wiesen auf eine mögliche Bedeutung von *ASAP1* bei der lymphatischen Metastasierung von Kopf-Hals-Karzinomen hin, da der *ASAP1*-Genlocus in den untersuchten Metastasen häufig zugewonnen und überexprimiert war.

Weiterhin ist im Falle von *ASAP1* interessant, dass eine frühere Untersuchung einen fördernden Einfluss auf die Lymphknotenmetastasierung im Falle von kolorektalen Karzinomen funktionell nachgewiesen hat (Müller *et al*, 2010).



**Abbildung 5.25:** aCGH-Chromosomenansicht von Chr. 8. Darstellung der chromosomalen Zugewinne und Verluste von drei untersuchten Kopf-Hals-Karzinom Zelllinien UM-SCC-14C (A), UM-SCC-17A (B) und UM-SCC-22B (C). Der Pfeil zeigt auf die Lokalisation von *ASAP1*.

Um nun die *ASAP1*-Expression als möglichen Faktor für die Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen für das HNSCC zu überprüfen, wurden entsprechende funktionelle Analysen an drei verschiedenen HNSCC-Zelllinien durchgeführt.

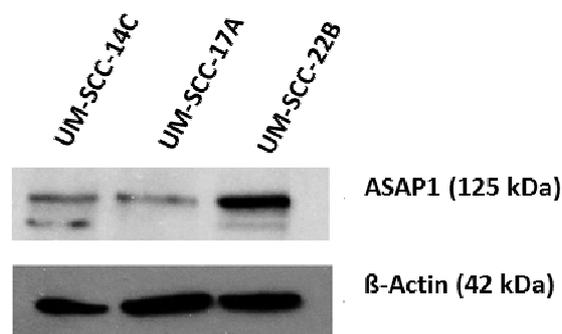
Zunächst wurden diese Zelllinien mithilfe der aCGH charakterisiert; insbesondere mit der Frage, ob ein *ASAP1*-Zugewinn bei 8q24.21 vorhanden ist. Zwei dieser HNSCC-Zelllinien (UM-SCC-14C, UM-SCC-17) wurden aus oralen Primärtumoren

etabliert. Die Zelllinie UM-SCC-22B entstammte einer Hals-Metastase eines weiteren HNSCC Patienten.

Die Profile der drei Zelllinien wiesen Aberrationen auf, die typisch für fortgeschrittene HNSCC sind, wie z.B. ein Verlust von 3p und ein Zugewinn von 3q (Appendix, Abb. 10.3). Im Gegensatz zu der Metastasenzelllinie UM-SCC-22B (Abb. 5.25 C) war bei den beiden Primärtumor-Zelllinien UM-SCC-14C und -17A (Abb. 5.25 A+B) jedoch kein chromosomaler Zugewinn bei *ASAP1* nachzuweisen.

### 5.10.1 Untersuchung der ASAP1-Expression in HNSCC-Zelllinien

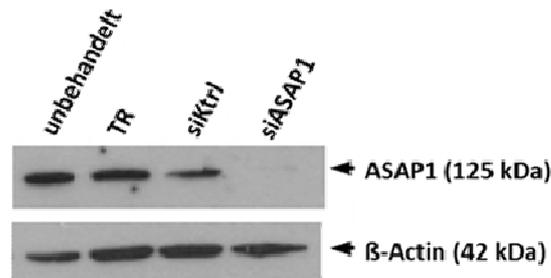
Im nächsten Schritt wurde die Expression von ASAP1 bei den drei Zelllinien analysiert. Um die ASAP1-Proteinexpressionsprofile der Zelllinien UM-SCC-14C, -17A und -22B zu bestimmen, wurden diese Zelllinien mithilfe der Western-Blot-Methode und anschließender Immundetektion analysiert. In den Zelllinien UM-SCC-14C und UM-SCC-22B wurden zwei verschiedene bekannte Isoformen ASAP1a und ASAP1b (125 kDa bzw. 130 kDa) detektiert (Abb. 5.26). Interessanterweise war die ASAP1-Proteinexpression der Metastasenzelllinie UM-SCC-22B höher als die der beiden Primärtumorzelllinien (UM-SCC -14C und -17A) (Abb. 5.26). Somit konnte für die aus der Metastase etablierte Zelllinie UM-SCC-22B eine erhöhte ASAP1-Expression, bei einem gleichzeitigen chromosomalen Zugewinn der Genregion, festgestellt werden.



**Abbildung 5.26:** Proteinexpressionsanalyse von *ASAP1* in den HNSCC Zelllinien UM-SCC-14C, -17A und -22B. Als Kontrollprotein wurde  $\beta$ -Actin nachgewiesen

### 5.10.2 ASAP1 als Faktor für die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen

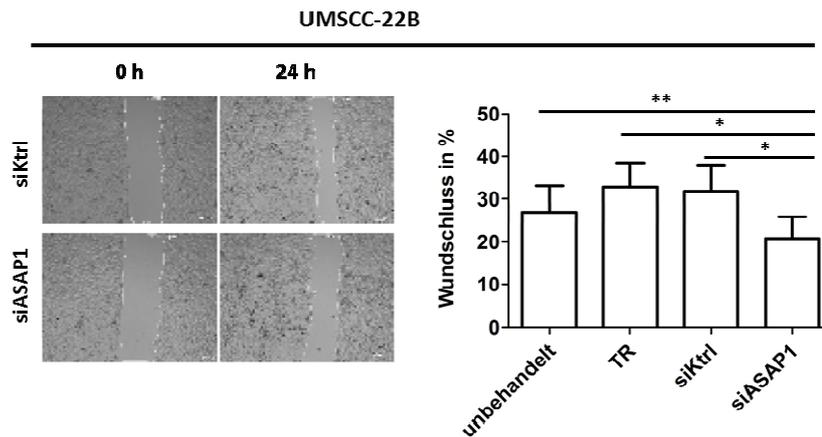
Da die Migrationsfähigkeit ein wichtiger Faktor im Prozess der Metastasierung ist, sollte überprüft werden, ob ASAP1 einen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Tumorzellen hat. Hierfür wurde zunächst ASAP1 in Zellen der HNSCC-Metastasen-Zelllinie UM-SCC-22B mithilfe siRNA vermittelter Interferenz („siASAP1“) herunterreguliert (Abb. 5.27). Zum Vergleich wurden Kontrollen von unbehandelten (Wildtyp), mit Transfektions-Reagenz behandelten (TR) und mit einer nicht-funktionellen, sogenannten „scrambled“ siRNA transfizierten (siKtrl) UM-SCC-22B Zellen analysiert. Die ASAP1 Protein-Expression konnte mittels der siRNA für ASAP1 in den UM-SCC-22B Zellen erfolgreich herunterreguliert werden (Abb. A).



**Abbildung 5.27:** Proteinexpressionsanalyse von ASAP1 nach der Transfektion der Zelllinie UM-SCC-22B mit einer gegen ASAP1-mRNA gerichteten siRNA. Als Kontrollprotein wurde β-Actin nachgewiesen.

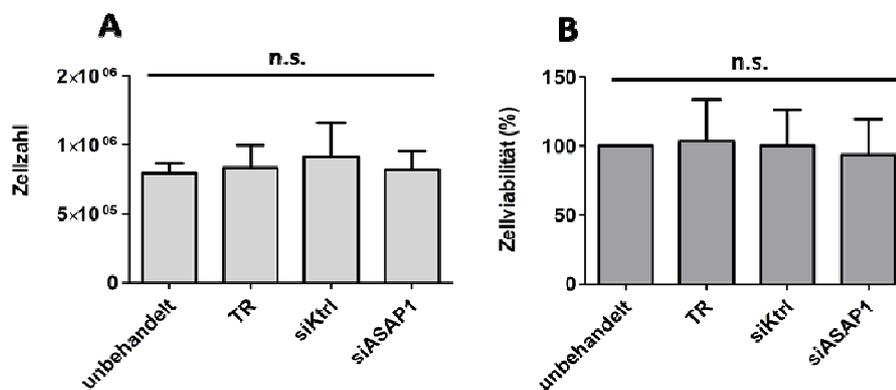
Die Zelllinien wurden dann in einen Wundheilungs-Assay eingebracht, um den Effekt der reduzierten ASAP1-Expression auf die Migrationsfähigkeit der UM-SCC-22B zu testen. Dabei war die Migrationsfähigkeit der UM-SCC-22B Zellen mit reduzierter ASAP1-Expression (siASAP1) signifikant geringer (Abb. 5.28).

Um auszuschließen, dass die beobachtete veränderte Migrationsrate durch eine verminderte Proliferation der Zellen hervorgerufen wurde, wurde zusätzlich die Proliferationsrate aller eingesetzten Zellen mithilfe eines MTT-Assays bestimmt (Abb. 5.29 B).



**Abbildung 5.28:** Analyse der Migrationsrate von UM-SCC-22B nach reduzierter ASAP1-Expression. Links: Repräsentative Aufnahmen des Migrations-Assays. Rechts: Graphische Darstellung der ausgewerteten Assays. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Im Gegensatz zur Migrationsrate waren keine signifikanten Veränderungen in der Proliferationsrate zu messen (Abb. 5.29). Aus diesen Daten geht hervor, dass ASAP1 die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen der Zelllinie UM-SCC-22B positiv beeinflussen kann.



**Abbildung 5.29:** Analyse der Zellzahl und Proliferationsrate nach der Herunterregulierung von ASAP1 mittels siRNA. Zellzahl (A), Proliferationsrate (B) nach 72h.

## 6 Diskussion

Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals Bereiches gehört zu den Krebsarten mit der höchsten Inzidenz in der westlichen Welt (Parkin, 2001). Trotz der Zunahme der verfügbaren Therapiemöglichkeiten ist die allgemeine Prognose für Patienten im fortgeschrittenen Stadium in den letzten 40 Jahren beinahe unverändert mit einer Fünfjahresüberlebensrate von weniger als 50% (Hunter *et al*, 2005).

Die molekulare und genetische *intertumorale* (Unterschiede zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen) sowie *intratumorale* Heterogenität (innerhalb eines Tumors) erschwert die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren und sind zwei der Gründe für die schlechten klinischen Ergebnisse (Chung *et al*, 2004; Leemans *et al*, 2011). Die genetische intratumorale Heterogenität von Primärtumoren ist ein lange bekanntes Phänomen, jedoch nur ein Aspekt der genetischen Heterogenität von Krebserkrankungen, daher ist ein Verständnis der genetischen Heterogenität der Krebserkrankung ohne eine Analyse der Metastasen unvollständig.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die genetische intertumorale Heterogenität als auch die intratumorale Heterogenität von Primärtumoren und Metastasen auf Einzelzellebene untersucht und miteinander verglichen. Die genetische Heterogenität zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen wurde bereits in einigen Arbeiten, auf die in Kapitel 6.3 und 6.4 genauer eingegangen wird, erforscht. In diesen Studien wurden die HNSCC-Tumore mittels Loci-spezifischen Mikrosatelliten-, FISH- und Mutationsanalysen (el-Naggar *et al*, 1997; el-Naggar *et al*, 1992; Gotte *et al*, 2004; Sun *et al*, 1995; Tabor *et al*, 2002; van Oijen & Slootweg, 2000; Zariwala *et al*, 1994) oder mithilfe von niedrig auflösenden gesamt-genomischen Techniken, wie Metaphasen-CGH (mCGH) und 44k-Arrays, miteinander verglichen (Bockmuhl *et al*, 2002; Huang *et al*, 2002; Tremmel *et al*, 2003; Welkoborsky *et al*, 2000; Yoshioka *et al*, 2013). Trotzdem existiert kein klares Bild über die intra- bzw. intertumorale genetische Heterogenität von Primärtumoren und

Metastasen des Kopf-Hals Bereiches. Dies liegt u.a. daran, dass die SCNA-Profile der zuletzt genannten Studien mit aus Gesamttumorgewebe isolierter DNA erstellt worden sind. Mit diesem methodischen Ansatz kann ausschließlich ein Querschnitt der genetischen Charakteristika des untersuchten Gewebes dargestellt werden. Es ist mittlerweile bekannt, dass durch Analysen von Tumorgeweben seltene Zellpopulationen maskiert werden können und daher dieser methodische Ansatz keine Aussage über die Häufigkeit der Aberrationen in den Tumorzellen erlaubt (Navin, 2014).

Zusammengenommen zeigen die Daten der o.g. Studien die klonale Beziehung zwischen Primärtumoren und Metastasen. Die Autoren beschreiben einen relativ niedrigen Grad an inter- und intratumoraler Heterogenität, zeigen aber gleichzeitig auch einige genetische Unterschiede zwischen den Primärtumoren und Metastasen. Diese Untersuchungen geben somit erste Hinweise für eine genetische Diversifikation während der Metastasierung in HNSCC (Sun *et al*, 1995; Tabor *et al*, 2002; Yoshioka *et al*, 2013, el-Naggar *et al*, 1997, Tremmel *et al*, 2003).

Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung der genetischen Heterogenität auf Ebene von SCNAs von Einzelzellen des Kopf-Hals-Karzinoms, um metastasierungsrelevante Kandidatengene herauszufiltern, die auch als therapeutische Zielstruktur dienen könnten.

## **6.1 Identifizierung von Tumorzellen**

Für die Identifizierung und Isolation von Tumoreinzelzellen muss zunächst das Zellgewebe disaggregiert und eine Einzelzellsuspension hergestellt werden. Hierbei werden die Tumorzellen von verschiedenen Seiten des Tumors gelöst und verteilen sich zufällig im Gesamtvolumen. Um nun in der heterogenen Mischpopulation Tumorzellen von z.B. Endothelzellen, Fibroblasten, Immunzellen oder anderen Stromazellen unterscheiden zu können, wurde in dieser Arbeit eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zur Darstellung der Proteine Zytokeratin 5/14, sowie CD44v6 durchgeführt. Die Zytokeratine 5/14 werden in

der Basalschicht von Epithelien exprimiert (Cakir *et al*, 2012; Laakso *et al*, 2005) und weisen darüber hinaus in Kopf-Hals-Karzinomen eine stark erhöhte Expression auf (Becker *et al*, 2004; Moll *et al*, 1982). CD44v6 ist als guter Marker für epitheliale Tumorzellen bekannt (Spiegelberg *et al*, 2014) und speziell an gesundem Epithelgewebe und Kopf-Hals-Karzinomen in unterschiedlichen Tumorentwicklungsstadien untersucht worden. Demnach wird die Spleißvariante CD44v6 zu ca. 95% in Kopf-Hals-Karzinomen exprimiert (Mack & Gires, 2008; Spiegelberg *et al*, 2014). In einer Studie von Wang *et al* konnte in 26 von 28 Kopf-Hals-Primärtumoren und in 18 von 24 Lymphknotenmetastasen eine starke CD44v6 Expression festgestellt werden und es wurde gezeigt, dass keine Lymphozyten oder andere Zellen des Lymphknotens außer der epithelialen Tumorzellen markiert wurden (Wang *et al*, 2009). Diese Daten legen nahe, dass CD44v6 als Marker für die Identifikation von Tumorzellen geeignet ist. In einer qualitativen Analyse der detektierten SCNA von den hier untersuchten Kopf-Hals-Tumorzellen (n = 82) konnten typische chromosomale Aberrationen für diese Tumoridentität festgestellt werden, womit verdeutlicht wird, dass mithilfe dieser Marker Tumorzellen identifiziert werden können.

Bezüglich der gesamt-genomischen Einzelzell-Analyse von Tumormaterial sind bislang nur drei mit dieser Arbeit vergleichbare Studien verfügbar (Navin *et al*, 2011; Wang *et al*, 2014; Xu *et al*, 2012). Jedoch wurden bislang noch keine Studien am HNSCC durchgeführt. Interessanterweise wurden bei keiner der drei Studien Zellproteine als Marker für die Identifizierung von Tumorzellen verwendet. Zwei dieser drei Studien sind von derselben Arbeitsgruppe (Navin *et al* und Wang *et al*) und in beiden Studien wurden Tumoreinzellen von Mamma-Karzinomen mittels FACS anhand ihrer aberranten Ploidie identifiziert, isoliert und dann deren DNA sequenziert. Insgesamt wurden 300 Einzelzellgenome der Mamma-Karzinome genetisch charakterisiert und die erstellten genetischen Profile deuteten dabei darauf hin, dass anscheinend ein großer Anteil (>30%) der untersuchten Zellen keine Tumorzellen waren (Navin *et al*, 2011; Wang *et al*, 2014). In einer weiteren Einzelzell-Studie von Xu *et al*

wurden 25 Zellkerne eines Nieren-Adenoms mit dem von Navin *et al* beschriebenen Ansatz analysiert. Auch hier erkennt man anhand der genetischen Profile, dass 9 der 25 Zellen möglicherweise keine Tumorzellen waren (Xu *et al*, 2012). Der gewählte methodische Ansatz dieser drei Studien hat den Nachteil, dass während der Isolierung der Phänotyp der Einzelzellen nicht evaluiert und unterschieden werden kann (z.B. PBMNCs oder Tumorzellen). Der in dieser Arbeit durchgeführte experimentelle Ansatz hat den Vorteil, dass mithilfe einer Doppel-Immunfluoreszenzfärbung Nichttumorzellen von potentiellen Tumorzellen zum Zeitpunkt unterschieden werden konnten. Jedoch ist auch für diesen methodischen Ansatz festzustellen, dass keine 100% reine Tumorzellpopulation isoliert werden konnte. Trotzdem ermöglichte die für diese Arbeit gewählte Strategie eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit aus einer heterogenen Tumor/Normalzellsuspension Tumorzellen mit einem aberranten SCNA-Profil (73/82 Zellen, 89%) zu identifizieren, im Vergleich zu den o.g. Studien von Xu *et al* (17/26 Zellen, 65%), Navin *et al* (91/200 Zellen, 46%) und Wang *et al* (73/100 Zellen, 73%). Auch wenn positiv-markierte Zellen keine Aberrationen aufwiesen, bedeutet dies nicht, dass es nicht trotzdem Tumorzellen sein könnten. Es könnten sich um Tumorzellen mit kleinen Aberrationen (<40 kb), strukturellen Aberrationen oder Punktmutationen handeln, die mit der aCGH-Methode nicht detektierbar waren.

## 6.2 Einzelzell-WGA und aCGH

Für die Einzelzell-aCGH Technik war es notwendig, aufgrund der geringen DNA-Menge einer einzelnen Zelle (6-9 pg), das Einzelzellgenom global zu amplifizieren. In dieser vorliegenden Arbeit wurde hierfür ein Einzelzell-aCGH Ansatz verfolgt, der bereits zweimal unabhängig voneinander untersucht und publiziert worden ist (Czyz *et al*, 2014; Mohlendick *et al*, 2013). Beide Publikationen zeigten, dass die Adapter-Linker-PCR für die Amplifikation von Einzelzellen die geeignetste Methode für ein anschließendes aCGH-Experiment ist. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass das Genom homogen amplifiziert wird

(Binder *et al*, 2014; Mohlendick *et al*, 2013; Schmidt-Kittler *et al*, 2003). Zusätzlich produziert die Adapter-Linker-PCR basierte WGA ausreichend Amplifikationsprodukt (2-4 µg DNA) für die aCGH-Analyse (Möhlendick *et al*, 2013; Czyz *et al*, 2014). Darüber hinaus ermöglicht diese WGA-Technik aufgrund der Erkennungssequenz des *MseI*-Enzyms eine *in silico* Darstellung des fragmentierten Genoms und somit eine Vorhersagbarkeit über Genomrepräsentation des WGA-Produktes für weiterführende „downstream“ Analysen (Möhlendick *et al*, 2013). Außerdem wurde die Sensitivität und Spezifität des Aberrationsdetektions-Algorithmus ADM-2 (Fa. Agilent Technologies) für Einzelzellamplifikate basierend auf verschiedene WGA analysiert. Hierfür wurden ROC-Kurven berechnet, welche das Richtig- bzw. Falsch-Positiv -Verhältnis der gemessenen Signale darstellt. Für die Adapter-Linker-PCR basierte Methode konnte der höchste „Area Under the Curve“ -Wert (AUC = 0,96) im Vergleich zu den beiden anderen überprüften WGA-Methoden (AUC = 0,94 und AUC = 0,7) festgestellt werden und belegt eine gute Sensitivität und Spezifität des ADM-2-Algorithmus in Kombination mit der Adapter-Linker-PCR (Möhlendick *et al*, 2013). In der ersten publizierten Studie zur Sequenzierung von Tumoreinzellen wurden diese mithilfe der „GenomePlex“ WGA (Fa. Sigma-Aldrich) amplifiziert. Aufgrund der gewählten Amplifikations-Methode wurden sogenannte „Pileups“ - unverhältnismäßig häufig amplifizierte Loci und somit falsch-positive Zugewinne - beobachtet (Navin *et al*, 2011). In einer kürzlich publizierten Sequenzierstudie der gleichen Arbeitsgruppe wurde eine alternative WGA-Methode verwendet in deren Produkten keine "Pileups" detektiert wurden (Wang *et al*, 2014). Dies veranschaulicht, dass die Wahl der WGA-Methode ein wichtiger Faktor für das Vermeiden von Artefakten und die Detektion von richtig-positiven bzw. falsch-positiven Aberrationen ist.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde abweichend zu der o.g. Publikation von Möhlendick *et al*, der HaarSeg-Algorithmus (Hupe *et al*, 2004) für die Detektion von Aberrationen in Einzelzellen verwendet. Der Vorteil des HaarSeg-

Algorithmus liegt in der freien Implementierung für verschiedene Plattformen. Dagegen existiert für den ADM-2-Algorithmus keine freie Implementierung und somit auch keine für die hier verwendete auf „R“-basierende Plattform. Die für diese Arbeit in „R“ durchgeführten Metaanalysen wie z.B. die Erstellung von gemeinsamen/individuellen-SCNA-Tabellen zur Berechnung des Heterogenitäts-Index, statistische Determinierung von häufigen Zugewinnen bzw. Verlusten zwischen Primärtumoren und Metastasen, bis hin zur Konvertierung ins Eingabeformat für die Circos-Plots, wäre mit dem in der "Genomic-Workbench" implementierten ADM-2 nicht möglich gewesen. Durch den Vergleich des HaarSeg- mit dem ADM-2-Algorithmus konnte jedoch gesichert werden, dass der HaarSeg-Algorithmus und ADM-2-Algorithmus hinsichtlich Sensitivität und Spezifität gleichwertig sind (AUC = 0,99) (Abb. 5.5).

Im Vergleich zu der hier verwendeten aCGH haben die NGS-Methoden den Vorteil, dass sie eine höhere Sensitivität bis auf Basenpaar-Ebene ermöglichen sowie strukturelle Veränderungen detektieren können (Marusyk *et al*, 2012). In der Arbeit von Möhlendick *et al* konnte mithilfe der Einzelzell-aCGH eine durchschnittliche Auflösung von 100 kb und im Maximum eine Auflösung bis zu 56 kb erreicht werden (Möhlendick *et al*, 2013). Auch in dieser hier vorliegenden Arbeit konnten kleine Aberrationen, wie z.B. eine 41 kb große *CDKN2A*-Deletion mithilfe der Einzelzell-aCGH detektiert und mit einer weiteren unabhängigen Methode bestätigt werden. Navin *et al* konnten Einzelzellgenome mit einer durchschnittlichen Auflösung von 56 kb bei einer genomweiten Abdeckung von 6% sequenzieren (Navin *et al*, 2011). In einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe von Navin wurde eine Auflösung von durchschnittlich 220 kb und eine Genomabdeckung von mindestens 50% der analysierten Tumorzellen erreicht (Wang *et al*, 2014). Interessanterweise wurde von Binder *et al* beobachtet, dass die Auflösung des Einzelzell-aCGH SCNA-Profiles (aufgrund der aktuellen Schwierigkeiten der bioinformatischen Auswertung von Einzelzellen) im Vergleich zu einem aus Sequenzierungsdaten generierten SCNA-Profil von REH-Einzelzellen z.Zt. überlegen ist (Binder *et al*, 2014). Insbesondere die Daten-

Prozessierung hinsichtlich der Sequenz-Assemblierung ist bei Einzelzellen durch die gesamt-genomische Amplifikation des Einzelzellgenoms anspruchsvoller als bei Arraydaten (Ning *et al*, 2014). Bei der Sequenz-Assemblierung muss jedes sequenzierte Fragment gegen eine Referenz überprüft und so seine Position im Genom lokalisiert werden, was enormen Rechenaufwand und Bio-Informatik-Kompetenz benötigt (Severin *et al*, 2014). Dazu sind Sequenzierungstechniken bislang verhältnismäßig teuer im Vergleich zu den Mikroarrays. Da man für die systematische Analyse von Tumoren mehr als zwei oder drei Zellen analysieren muss bzw. bestenfalls einen ganzen Tumor ( $1 \text{ mm}^2$  entspricht  $1 \times 10^6$  Zellen), erscheint die Mikroarray-Plattform vom finanziellen Aspekt zur Zeit betrachtet eine gute Alternative.

### 6.2.1 Qualitätsparameter und Auswahlkriterien

Für das Einzelzell-Kollektiv der in dieser Arbeit ausgewerteten Tumorzellen sind die Amplifikationskontrolle nach der WGA sowie der DLRS-Wert nach der Hybridisierung die wichtigsten Qualitätsparameter gewesen. In der von Möhlendick *et al* publizierten Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass eine Detektion von drei der fünf möglichen Amplifikationsprodukte einer Kontroll-PCR die Wahrscheinlichkeit für ein qualitativ gutes Ergebnis eines Einzelzell-aCGH Experiments erhöht (Möhlendick *et al*, 2013).

Da Einzelzellen aus Tumorgewebe anderen Bedingungen unterliegen als z.B. Zellkulturzellen und sich verschiedene Protokolle unterschiedlich auf die Qualität der Einzelzellanalyse auswirken können, wurde nach Referenzwerten des Streuungsmass der Signale für genomische Einzelzellanalysen aus Frischgewebe in anderen Studien gesucht. Da in einer Literaturrecherche keine Referenzen gefunden werden konnten, wurde mithilfe der hier erhobten Daten versucht einen oberen Grenzwert des Streuungsmass (DLRS-Wert) von Einzelzellen aus Frischgewebe zu definieren. In dem untersuchten Kollektiv wurde anhand von Tumorzellen des Falles #178 beobachtet, dass bei einem DLRS-Wert von 2,19 Zugewinne und Verlust nicht mehr eindeutig zu identifizieren waren und sich die Signale innerhalb eines Genomabschnitts überlagerten. Bei einem

Einzelzellamplifikat dieses Falles entsprach der höchste Streuungswert mit klar trennbaren Signalen der Zugewinne und Verluste einem DLRS-Wert von 1,78 (Abb. 5.7 und Abb. 5.8). Dieses Ergebnis legt nahe, dass für Einzelzell-aCGH-Analysen mit einem DLRS-Grenzwert von  $\leq 1,78$  - zumindest für das hier untersuchte Kollektiv - Aberrationen als Zugewinne bzw. Verluste eindeutig identifizierbar sind.

### **6.3 Ausmaß der genetischen Heterogenität in Kopf-Hals-Karzinomen**

Die genomische Charakterisierung von 82 Kopf-Hals-Tumorzellen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, veranschaulicht das Ausmaß der intratumoralen Heterogenität bei Kopf-Hals-Karzinomen und weist generell auf eine individuell unterschiedlich ausgeprägte genetische Heterogenität zwischen Primärtumoren und den korrespondierenden Metastasen hin. Darüber hinaus konnte in den aCGH-Profilen der Tumorzellen beobachtet werden, dass trotz einiger gemeinsamer genetischer Veränderungen jede Tumorzelle ein individuelles genomisches Aberrations-Profil aufweist.

In der Analyse der Primärtumor/Metastasen-Paare von Fall #74, #98 und #170 konnten für jeden Fall Aberrationen nachgewiesen werden, welche im Primärtumor und der autologen Metastase zu detektieren waren. Dies ist ein Hinweis auf einen genetischen Klon der anscheinend sowohl in dem Primärtumor als auch in der Metastase vorhanden war. Zum Beispiel war der 7q-Verlust in Fall #74, der 11q-Verlust in Fall #98 und der 9p-Zugewinn in Fall #170 in beiden Geweben mithilfe der aCGH zu detektieren (Abb. 5.11). Allerdings war die Frequenz dieser gemeinsamen Aberrationen zwischen Primärtumor- und Metastasengewebe unterschiedlich ausgeprägt. Zusätzlich konnten Aberrationen identifiziert werden, welche ausschließlich in einem der beiden Gewebetypen gefunden wurden, wie zum Beispiel ein 1p-Zugewinn in den Metastasenzellen von Fall #74 oder ein 17q- sowie 8q-Zugewinn in den Metastasenzellen von Fall #170. Die Überprüfung mit der FISH Methode für die Gen-Loci *CDKN2A*, *MYC*, *EGFR* und *CCND1* bestätigte weitgehend die mittels aCGH beschriebenen

gemeinsamen und individuellen Veränderungen innerhalb der untersuchten drei Primärtumor/Metastasen-Paare (Appendix Tab. 10.1). Jedoch gab es auch Unterschiede im Vergleich zur aCGH-Analyse. So wurde beim Fall #170 der Zugewinn des *MYC*-Gens nicht nur in der Metastase sondern auch im Primärtumor detektiert. Hier ist zu berücksichtigen, dass bei der aCGH-Analyse nur zehn Zellen (0/10 Zellen zeigten einen *MYC*- bzw. 8q-Zugewinn) und in der FISH immerhin 78 Zellen (15/78 Zellen, 19%, zeigten einen *MYC*-Zugewinn) des Primärtumors ausgewertet wurden. Die geringe Anzahl der Zellen die mittels aCGH untersucht wurden, kann das Fehlen des *MYC*- bzw. 8q-Zugewinns in den Zellen des Primärtumors für Fall #170 erklären. Trotzdem verifizieren die FISH-Ergebnisse die mittels aCGH detektierten Unterschiede zwischen Primärtumor und Metastasen hinsichtlich des *MYC*-Genlokus, da hier ähnliche Verhältnisse zwischen Primärtumor und Metastasen, nämlich deutlich mehr *MYC*-Zugewinne in der Metastase, festgestellt wurden.

Eine weitere Veränderung, die sich in der FISH-Analyse unterschiedlich darstellte war ein *EGFR*-Zugewinn in der Metastase von Fall #178. So konnten einige Zugewinne auf Chromosom 7 von Fall #178 mittels FISH wahrscheinlich nicht identifiziert werden, da diese in der aCGH beobachteten Zugewinne die Zentromerregion und/oder den *EGFR*-Lokus nicht umfassten (Abb. 5.18 und 5.19), sodass Zellen mit diesen Zugewinnen außerhalb der Lokalisation der verwendeten Sonden möglicherweise als "unverändert" klassifiziert wurden. Dies würde den hohen Anteil der diploiden Signale für *EGFR* und der Zentromerregion in den Metastasenzellen erklären. Ein anderer zu kritisierender Punkt der FISH-Methode, der ebenfalls zu einen erhöhten Anteil an diploiden Signalen führen kann, ist, dass normale Stromazellen und Lymphozyten in den ausgewerteten Tumorarealen aufgrund der FISH-Methode nicht eindeutig identifiziert werden können und so fälschlicherweise mit ausgewertet wurden. Dieses Problem lag wahrscheinlich auch bei der *MYC*-Validierung von Fall #98 vor. So wurde in der aCGH ein *MYC*-Zugewinn in der Metastase detektiert, aber in der FISH-Analyse eine diploide Kopienanzahl sowohl für *MYC* als auch für die Zentromerregion von

Chromosom 8 festgestellt. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass in den FISH-Analysen natürlicherweise nicht die exakt gleichen Anteile des Tumormaterials analysiert werden konnten. Daher kann es auf Grund der Heterogenität auch zu Unterschieden zwischen den FISH-Analysen und der aCGH kommen. Obwohl unter diesen Gesichtspunkten nur repräsentatives Tumormaterial des gleichen Falles für die FISH-Analysen zur Verfügung stand, muss festgehalten werden wie gut die Veränderungen in den zwei völlig unabhängigen Analysen übereingestimmt haben. Insgesamt konnten beide experimentelle Ansätze (FISH-Analyse und aCGH-Analyse) eine ausgeprägte genetische intratumorale Heterogenität und unterschiedliche Frequenzen von Aberrationen nachweisen, die jedoch abhängig von Gewebe und Patient variierten. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete genetische Heterogenität der untersuchten Tumore passt zu der bekannten hohen chromosomale Instabilität von HNSCC, welche zu Chromosomenbrüchen und in Folge dessen zu einem aneuploiden Karyotyp führt (Maeda *et al*, 1999; Wiseman *et al*, 2004). Parallel zu der ausgeprägten genetischen Heterogenität der einzelnen Tumore konnten interessanterweise Unterschiede im Ausmaß der Heterogenität und der Anzahl an Aberrationen zwischen Primärtumoren und Metastasen festgestellt werden. So wurde in den mittels aCGH untersuchten Metastasenzellen, im Vergleich zu den Primärtumorzellen, eine höhere Anzahl von Aberrationen bei einem gleichzeitig signifikant niedrigeren Heterogenitäts-Index festgestellt. Auffällig ist, dass trotz der niedrigen Anzahl von analysierten Fällen, ein Trend hinsichtlich einer höheren Anzahl von Aberrationen pro Zelle ( $44,35 \pm 12,7$  pro Metastasenzelle vs.  $24,56 \pm 7,97$  pro Primärtumorzelle, Abb. 5.10) beobachtet werden konnte. Interessanterweise konnte gleichzeitig ein signifikant niedrigerer ( $p = 0,0041$ ) Heterogenitäts-Index in den Metastasen ( $3,2 \pm 0,57$ ), im Vergleich zu den entsprechenden Primärtumoren ( $5,4 \pm 0,54$ ), festgestellt werden (Abb. 5.20). Diese Ergebnisse korrespondieren mit den Daten anderer Studien, welche die genetische Heterogenität von Kopf-Hals-Karzinomen untersuchten. In zwei verschiedenen Studien von Götte *et al* wurde anhand der Anzahl verschiedener

Chromosomen mittels FISH die intratumorale genetische Heterogenität analysiert. In 76% der untersuchten Primärtumore konnte eine deutliche intratumorale Heterogenität nachgewiesen werden (Gotte *et al*, 2002) und in 23 Primärtumor/Metastasen-Paaren wurde eine erhöhte Homogenität in den Metastasen (30% vs. 16%) festgestellt (Gotte *et al*, 2004). Auch auf Punktmutations-Ebene konnte Zhang *et al* mithilfe von NGS in mehreren Biopsien eines Kopf-Hals-Primärtumor/Metastasen-Paars eine stärker ausgeprägte genetische Homogenität in der Metastase im Vergleich zum Primärtumor (77% vs. 52% gemeinsame Punktmutationen) nachweisen (Zhang *et al*, 2013). Die Ergebnisse dieser Studien stimmen mit der in dieser Arbeit beschriebenen stärkeren genetischen Homogenität der Metastasen, im Vergleich zum korrespondierenden Primärtumor, überein.

#### **6.4 Selektion eines bestimmten Genotyps während der Metastasierung**

Genetische Mutationen und selektive Expansion der am besten adaptierten Klone sind grundlegende Mechanismen der Metastasierung (Klein, 2013) und spielen sowohl für die Anpassung an geänderte Stoffwechselverhältnisse (Escote & Fajas, 2015), die Umgehung der körpereigenen Abwehr, wie auch für die Resistenzentwicklung gegenüber gängigen systemischen Therapien eine zentrale Rolle (Bedard *et al*, 2013). Um nun Veränderungen aufzudecken, die bei der lymphatischen Metastasierung der HNSCC angereichert und damit möglicherweise positiv selektiert wurden sind die Häufigkeiten von SCNAs der Primärtumorzellen (n = 34) mit den Metastasenzellen (n = 48) direkt verglichen worden. Hierbei erwies sich der chromosomale Zugewinn der Region 8q24.11-q24.23 (folgend wird "8q24" verwendet) als eine in den Metastasen angereicherte Veränderung (Abb. 5.21). Mithilfe der für diese Arbeit verwendeten hoch-auflösenden aCGH-Methode, konnten dabei neun chromosomale Segmente auf 8q24 als signifikant häufiger in den Metastasen zugewonnen (FDR <0,05), verglichen mit den Primärtumoren, identifiziert werden. Diese neun Segmente umfassten insgesamt 21,1 Mb und bis zu 23 der

48 (48%) analysierten Metastasenzellen hatten in diesen Lokalisationen einen Zugewinn.

In einem dieser neun Segmente welches in 48% der Metastasenzellen zugewonnen war, waren die Gene *MYC* und *ASAP1* lokalisiert (Tab. 5.5). Deren Kopienanzahl-Status wurde mithilfe einer FISH-Analyse an weiteren 28 Primärtumor/Metastasen-Paaren überprüft. Interessanterweise konnte neben der erhöhten Kopienanzahl dieser Genloci ebenfalls eine erhöhte Frequenz dieser Klone in den Metastasen, im Vergleich zum korrespondierenden Primärtumor, festgestellt werden. Dieser Unterschied war nur für den *MYC*-Genlocus signifikant (*MYC*,  $p = 0,0297$ ). Eine Betrachtung der *ASAP1*-Amplifikationen in den Primärtumor/Metastasen-Paaren zeigte einen Trend für eine erhöhte Zellzahl mit Amplifikationen in den Metastasen ( $p = 0,2110$ ) im Gegensatz zum *MYC*-Genlocus ( $p = 0,5680$ ). So scheinen die Ergebnisse der FISH eine Expansion von Zellklonen mit Zugewinnen der beiden o.g. Gene in den untersuchten Metastasengeweben erkennen zu lassen.

Laut mehreren Studien gehören Zugewinne der chromosomalen Region 8q23.1-8q24.22 tatsächlich zu den häufigsten Alterationen in HNSCC und werden in bis zu 74% der Tumore festgestellt (Cancer Genome Atlas, 2015; Jarvinen *et al*, 2006; Salahshourifar *et al*, 2014; Squire *et al*, 2002; Wolff *et al*, 1998). In einer Arbeit von Chen *et al* konnte in mehr als 60% von HNSCC-Primärtumoren ein *MYC*-Zugewinn innerhalb eines 1 Mb großen Segments auf 8q24, beobachtet werden (Chen *et al*, 2004). Zudem wurde der 8q-Zugewinn bei HNSCC in einer kürzlich publizierten Studie des "Cancer Genome Atlas" als eine von den drei häufigsten SCNA bei HNSCC-Tumoren ( $n = 279$ ) beschrieben, sowie dass 47 dieser 279 Fälle (17%) eine *MYC*-Amplifikation aufweisen (Cancer Genome Atlas, 2015).

Im Vergleich zu der Anzahl der Arbeiten über die genomische Charakterisierung von HNSCC-Primärtumoren, existieren deutlich weniger Studien über die genomischen Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen HNSCC-Primärtumoren und deren autologen Lymphknotenmetastasen. Zwei vergleichende mCGH-Studien der Gruppe von Gotte *et al* konnten einen

Zugewinn der 8q-Region sowohl in den Metastasen als auch im Primärtumor detektieren (Gotte *et al*, 2005; Tremmel *et al*, 2003). In einer weiteren Untersuchung von Bockmühl *et al* wurde ein Zugewinn der Region 8q23-q24.2 in HNSCC-Primärtumoren und Metastasen beobachtet, aber nicht als "Metastasen-assoziiertes" Zugewinn gewertet (Bockmühl *et al*, 2002). Eine Arbeit von Welkoborsky *et al* berichtet ebenfalls von einem 8q-Zugewinn in den Metastasen welcher aber nicht statistisch signifikant war ( $n = 10$ ) (Welkoborsky *et al*, 2000). In einer neueren Studie von Yoshioka *et al* wurden von 15 HNSCC-Primärtumor/Metastasen-Paaren die Kopienanzahl-Profile mithilfe der aCGH-Technik analysiert. Die Autoren identifizierten einen Zugewinn einer 51 Mb großen Region innerhalb der Lokalisation 8q22.1-8q24.3 in 93% der Metastasen, im Gegensatz zu 80% in den Primärtumoren. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,6$ ), jedoch wurde in dieser Studie ein signifikant vermehrter Zugewinn von 8q22.1-q24.3 in den Metastasen im Vergleich zu nicht-metastasierten HNSCC-Primärtumoren festgestellt ( $p = 0,024$ ) (Yoshioka *et al*, 2013). In diesen vier zuletzt genannten Arbeiten konnten 8q-Zugewinne in den Metastasen detektiert werden, zeigten aber im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit keinen statistischen Unterschied in der Aberrationsfrequenz von 8q zu den autologen Primärtumoren. Ein Grund könnte die Verwendung unterschiedlicher Plattformen (mCGH und 44k-aCGH-Format) mit unterschiedlichen Sondenabdeckungen, im Vergleich zu dieser Arbeit, gewesen sein. Ein weiterer sehr wichtiger Aspekt aller genannten Studien war, dass diese an genomischer DNA aus Gesamttumorgewebe durchgeführt wurden. Eine mögliche Normalzellkontamination durch diesen methodischen Ansatz, könnte die sensitive Detektion von Aberrationen zusätzlich erschwert haben. Rein theoretisch könnte eine Normalzellkontamination im Lymphknotengewebe größer gewesen sein als die im Primärtumorgewebe. Dadurch könnten möglicherweise einige Aberrationen, wie z.B. der Zugewinn von 8q, in den Metastasen durch Normalzellen verdünnt bzw. maskiert worden sein. So wäre es möglich, dass bestimmte Aberrationsunterschiede zwischen den Primärtumoren

und Metastasen nicht detektiert werden konnten. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnte in der genetischen Heterogenität der Tumorzellen selbst liegen, welche mit den verwendeten methodischen Ansätzen der o.g. Studien nicht berücksichtigt werden konnte.

In dem hier untersuchten Kollektiv scheinen interessanterweise Tumorzellen mit einem gemeinsamen Zugewinn der Gene auf 8q24 während der Metastasierung positiv selektiert zu werden. Generell könnten verschiedene Mechanismen in Frage kommen, welche die Selektion eines bestimmten Genotyps beeinflussen (Klein, 2013). Die Selektion eines Genotyps könnte bereits zu einem frühen Zeitpunkt im Primärtumor auftreten, als Voraussetzung für die Zellproliferation der Tumorzellen (Hanahan & Weinberg, 2000). Andererseits könnte die Selektion eines Genotyps ebenfalls das Ergebnis von Adaptionsprozessen an die Umwelt während der Metastasierung bzw. des Auswachsens im Lymphknoten gewesen sein (Klein, 2013). Für das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv ist jedoch unklar welcher Mechanismus eher relevant gewesen sein könnte. In den hier analysierten Primärtumor- und Metastasenzellen konnten zudem gemeinsame Aberrationen beobachtet werden und die Wahrscheinlichkeit ist gering, dass sich diese identischen Aberrationen unabhängig voneinander in den Zellen entwickelt haben (Cairns, 1975; Heng *et al*, 2011). Dies unterstützt die Hypothese, dass nur eine begrenzte Population von genetisch aberranten Zellen den Tumor verlassen und auswachsen kann (Roesch *et al*, 2010; Shackleton, 2010).

Die hier beobachtete genetische Heterogenität von verschiedenen Subpopulationen lässt vermuten, dass durch eine Verabreichung von Chemotherapeutika wahrscheinlich nicht alle Zellen eines Tumors vernichtet werden können. Verschiedene Studien bekräftigen auch die Vorstellung, dass sich Resistenzen gegen chemische und molekulare Therapien in Folge der genetischen Heterogenität in der Krebserkrankung ausprägen können (Bettegowda *et al*, 2014; Campbell *et al*, 2010; Gatenby *et al*, 2009; Hunter *et al*, 2005; Lorz *et al*, 2015; Siravegna *et al*, 2015; Sottoriva *et al*, 2013; Su *et al*, 2012). Dadurch können einige bestimmte Klone durch genetische Mutationen die

Therapie relativ oder ganz unbeschadet überstehen und expandieren wie es in einer Studie von Misale *et al*, anhand der molekularen Anti-EGFR-Therapie bei Patienten mit Kolorektalkrebs, gezeigt werden konnten. Die Autoren konnten bereits vor der Therapie einen seltenen Klon mit einer im EGFR-Signalweg nachgeschalteten *KRAS*-Mutation detektieren. Dieser Anti-EGFR-Therapieresistente Klon wurde durch die Therapie selektiert und konnte dann expandieren und die Tumormasse dominieren (Misale *et al*, 2012). In zwei Publikationen der Gruppe um Cooke *et al* konnte anhand von SCNA-Profilen belegt werden, dass heterogene Tumore schwieriger zu therapieren sind, da anscheinend bereits vor der Therapie resistente Subpopulationen existieren, welche dann nach der Therapie expandieren (Cooke *et al*, 2010; Cooke *et al*, 2011). In einer weiteren Untersuchung von der Gruppe um Mardis wurden in acht Patienten mit akuter myelotischer Leukämie (AML) verschiedene Tumorzellklone vor und nach der Chemotherapie mithilfe von NGS analysiert und deren Entwicklung verfolgt. Interessanterweise konnte in allen untersuchten Fällen die Chemotherapie die Tumorerkrankung nicht vollständig eradizieren. Dabei wurden in drei Fällen eine Expansion von Klonen mit neuen genetischen Mutationen identifiziert, die vor der Chemotherapie nicht vorhanden waren (Ding *et al*, 2012).

#### **6.4.1 Analyse der mRNA-Expression der identifizierten Gene auf 8q24**

Als Nächstes sollte überprüft werden, ob die mittels der aCGH identifizierten signifikant häufig zugewonnenen Genen (n = 47) in den Metastasen, auch auf Expressionsebene zwischen Primärtumoren und Metastasen differentiell exprimiert wurden. Von dem gleichen Kollektiv konnten keine Expressionsdaten erhoben werden, aber anhand eines weiteren und größeren Kollektivs, war es möglich die mRNA-Expressionsprofile von 15 HNSCC-Primärtumoren und deren autologen Lymphknotenmetastasen zu untersuchen.

Für die vorliegende Arbeit wurde sich ausschließlich auf die 47 Gene in der Expressionsprofil-Analyse fokussiert, welche zuvor in der aCGH-Analyse als signifikant häufig zugewonnen ermittelt wurden. So konnten zehn Gene auf 8q24

identifiziert werden, welche neben einem signifikanten Zugewinn auch eine signifikante Überexpression in den Metastasen, im Vergleich zu den korrespondierenden Primärtumoren, aufwiesen (Tab. 5.7). Nach einer Literaturrecherche (PubMed: 05.08.2015) kann festgehalten werden, dass bislang für zwei Gene, *TMEM71* und *TRAPPC9*, keine Funktion in Zusammenhang der Tumorgenese oder Metastasierung beschrieben wurde. Dagegen wurde für die Gene *SLA* und *ZHX2* in der Tumorgenese einen Einfluss festgestellt (Kazi *et al*, 2015; Nagel *et al*, 2012). Für den Prozess der Metastasierung haben die Gene *ENPP2*, *ST3GAL1*, *GSDMC*, *MAPK15* und *ASAP1* eine Bedeutung (Muller *et al*, 2010; Parris *et al*, 2014; Sakuma *et al*, 2012; Watabe *et al*, 2001). Beispielsweise kodiert das Gen *MAPK15* das Protein ERK8, welches für die Genomintegrität sowie Zellbeweglichkeit wichtig ist und außerdem als potenzielle Zielstruktur für die Therapie bei kolorektalen Karzinomen beschrieben wird (Xu *et al*, 2010). Interessanterweise wurde auch *ASAP1* als eines der zehn überexprimierten und zugewonnenen Gene in den Metastasen identifiziert und wird im nächsten Kapitel 6.4.2 genauer beschrieben (Abb. 5.24).

In einer Studie von Roepman *et al* wurden die genomweiten mRNA-Expressionsprofile von 15 HNSCC-Primärtumoren und deren autologen Lymphknotenmetastasen miteinander verglichen. Es konnte dabei nur für das Gen *MAT1* ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Primärtumoren und Metastasen festgestellt werden. Darüber hinaus konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Expressionsprofile der Metastasen denen der korrespondierenden Primärtumoren sehr ähnlich waren. Die Autoren schlossen daraus, dass die Expressionssignatur des Primärtumors ausschlaggebend für die Entwicklung der systemischen Erkrankung und deren Behandlung ist (Roepman *et al*, 2005). Im Gegensatz zu der Arbeit von der Gruppe um Roepman zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen deutlichen signifikanten mRNA-Expressionsunterschied zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen. Genomweit betrachtet konnte für insgesamt 4632 Genen (25% des Genoms), inklusive der Gene welche in der o.g. Region 8q24 lokalisiert sind, ein

signifikanter Expressionsunterschied detektiert werden. Weitere Arbeiten verglichen, mit einem mRNA-Mikroarray basierten methodischen Ansatz wie bei Roepman *et al*, die mRNA-Expressionsprofile von Primärtumoren mit deren korrespondierenden Metastasen oder auch die Profile von Metastasierten-HNSCCs mit nicht-Metastasierten-HNSCCs um potentielle Metastasen-assoziierte Gene zu identifizieren (Braakhuis *et al*, 2006; Kato *et al*, 2006; Mendez *et al*, 2007; Nguyen *et al*, 2007; O'Donnell *et al*, 2005; Roepman *et al*, 2005; Zhou *et al*, 2006). Auffällig ist, dass in den jeweils publizierten Metastasen-assoziierten Gen-Sets der genannten Studien keines der hier identifizierten Gene auf 8q24 als Kandidatengen identifiziert wurde (Roepman *et al*, 2005; O'Donnell *et al*, 2005; Mendez *et al*, 2007). Außerdem zeigen diese Studien unterschiedliche Ergebnissen hinsichtlich der identifizierten Zielgene und dass in den identifizierten Gen-Sets nur wenige Gemeinsamkeiten existieren. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der zitierten Studien könnte die Verwendung von unterschiedlichen Plattformen und Auswertungsverfahren sein. Die Verwendung von verschiedenen Isolationsmethoden für das Tumorgewebe könnte ebenfalls die Unterschiede in den Expressionsprofilen erklären. So wurde das Tumormaterial in einigen Studien makrodissektiert, wodurch eine Analyse einer reinen Tumorphosphorie unwahrscheinlich erscheint. Auch für die vorliegende Arbeit konnte die mRNA aus dem Tumorgewebe nicht frei von Normalzellen isoliert werden. Hier könnten die Expressionsprofile der Nicht-Tumorzellen die Ergebnisse beeinflussen. In den hier durchgeführten Untersuchungen, konnten trotz vorliegender Normalzellkontaminationen signifikante Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Metastasen detektiert werden. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der o.g. Studien und der Problematik einer Normalzellkontamination, wird auch für diese Arbeit deutlich, wie wichtig die Überprüfung der Ergebnisse mit einer weiteren Methode bzw. die Verifizierung der potenziellen Kandidatengene *in vitro* ist. Für die vorliegende Arbeit diente die Analyse der Expressionsprofile als ein zusätzlicher Filter zur Identifikation von Kandidatengenen aus den aCGH-Daten,

Mithilfe derer zehn Gene in den Metastasen identifiziert wurden, die im Vergleich zu den Primärtumoren sowohl eine signifikant erhöhte Kopienanzahl vorwiesen als auch überexprimiert waren. Um nun zu überprüfen, ob mithilfe des hier verwendeten experimentellen Ansatzes, diese zehn Gene auf 8q24 auch einen funktionellen Einfluss auf Tumorzellen ausüben können, wurde das Gen *ASAP1* beispielhaft als „Proof of concept“ *in vitro* untersucht. Die übrigen neun Kandidatengene sollen in Projekten außerhalb dieser Promotionsarbeit bezüglich ihrer funktionellen Bedeutung analysiert werden.

#### **6.4.2 Die Funktion von ASAP1**

Die Fokussierung auf *ASAP1* in der vorliegenden Arbeit begründete sich durch einen fördernden Effekt auf die Lymphknotenmetastasierung, die bei kolorektalen Karzinomen festgestellt wurde (Muller *et al*, 2010). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang noch nicht vollständig verstanden, jedoch deuten die vorhandenen Daten auf eine Steigerung der Migration durch *ASAP1* hin (Muller *et al*, 2010; Onodera *et al*, 2005; Sabe *et al*, 2009).

Das Gen *ASAP1* (ADP Ribosylierungs-faktor-GTPase aktivierendes Protein 1), welches auch als *AMAP1* bezeichnet wurde, kodiert für das gleichnamige GTPase aktivierende Multidomänen-Protein ASAP1. Als solches verfügt es über mehrere Proteinregionen mit verschiedenen funktionell sowie strukturell unabhängigen Abschnitten über die es mit anderen Proteinstrukturen interagieren kann (Richardson, 1981). Durch eine Pleckstrin-homologe Domäne ist ASAP1 in der Lage, Phosphoinositid-Phospholipide zu binden. Diese Bindungsfähigkeit von ASAP1 ist essentiell für seine GTPase-aktivierende Funktion (Randazzo & Hirsch, 2004). Außerdem ermöglicht die BAR-Domäne am N-Terminus von ASAP1 die Krümmung von Membranen (Nie *et al*, 2006). Mithilfe dieser funktionellen und strukturellen Eigenschaften, scheint ASAP1 außerdem das Ausbilden von Membranausstülpungen und die Remodellierung des Zytoskeletts beeinflussen zu können (Sabe *et al*, 2009). Diese zuletzt genannten Eigenschaften von ASAP1 sind möglicherweise für die Modulation der Migrationsfähigkeit von Zellen verantwortlich (Stylli *et al*, 2008).

Um nun zu überprüfen, ob ASAP1 einen Einfluss auf das Migrationsverhalten bei HNSCC hat, wurden in einer geeigneten Zelllinie mittels RNA-Interferenz die Proteinexpression von ASAP1 stark herunter reguliert, was zu einer signifikant reduzierten Migrationsfähigkeit der Zellen führte. Diese Daten sind ein weiterer Hinweis für die Rolle von ASAP1 als fördernder Modulator der Zellmigration. Die an den Tumorzelllinien gewonnenen Daten legen nahe, dass eine ASAP1-Überexpression durch chromosomalen Zugewinn des Genlokus induziert werden kann und zum Anderen, dass hierdurch die HNSCC-Zellen einen möglichen Selektionsvorteil während des Metastasierungsprozesses durch die gesteigerte Migration erlangen könnten.

ASAP1 ist in verschiedenen Krebsarten überexprimiert und beim kolorektalen Karzinom mit niedrigerer metastasenfrier Überlebenszeit und schlechter Prognose korreliert (Muller *et al*, 2010). Zudem stimulierte die Überexpression von ASAP1 die Motilität und Invasion in Pankreas- und kolorektalen - Karzinomzelllinien *in vitro*, sowie die Metastasenbildung in einem *in vivo* Tiermodell. Hierbei korrelierte die Stärke der Expression von ASAP1 proportional mit dem Grad der Metastasierung (Muller *et al*, 2010).

Obwohl die metastasierungsfördernden Mechanismen von ASAP1 noch nicht entschlüsselt sind, konnte in anderen Studien beschrieben werden, dass ASAP1 mit Proteinen interagiert und diese auch aktiviert, welche mit der Kontrolle fokaler Adhäsion, Membranfaltung, Zellbeweglichkeit und Zellinvasion assoziiert sind (Hashimoto *et al*, 2006; Lin *et al*, 2008; Onodera *et al*, 2005; Randazzo & Hirsch, 2004; Sabe *et al*, 2009). Jedoch gibt es widersprüchliche Daten zur Funktion von ASAP1. So ist in drei Studien beschrieben worden, dass eine erhöhte Expression und Aktivität von ASAP1 einen hemmenden Effekt auf die zelluläre Motilität hat (Liu *et al*, 2005; Lin *et al*, 2008; Onodera *et al*, 2005). Eine mögliche Interpretation dieser gegensätzlichen Befunde ist, dass die Wirkung von ASAP1 vom zellulären Kontext, bzw. vom Zelltyp abhängig ist. Im Falle des HNSCC scheint ASAP1 ein fördernder Faktor für die Metastasierung durch Steigerung der Migrationsfähigkeit zu sein.

## 6.5 Schlussfolgerung

Die genetische Heterogenität und klonale Divergenz zwischen Primärtumoren und Metastasen-Paaren waren bislang verhältnismäßig wenig systematisch untersucht, sind jedoch auf Grund der zunehmenden klinischen Bedeutung v.a. im Rahmen molekularer Therapien, zunehmend in den Fokus geraten (Stoecklein & Klein, 2010; Swanton, 2012). In diesem Kontext wurde die vorliegende Arbeit durchgeführt, in der genomweit von 82 HNSCC-Einzelzellen ein SCNA-Profil erstellt wurde. Neben der beobachteten Heterogenität konnte ebenfalls die intra- sowie inter-tumorale Klonalität der untersuchten Tumorzellen von Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen anhand gemeinsamer Aberrationen nachgewiesen werden. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die Genome der Metastasenzellen weniger heterogen und stärker aberrant waren als die Genome der autologen Primärtumore. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Selektion eines bestimmten Genotyps während der Metastasierung. Eine vergleichende Analyse der Aberrationen der Primärtumor- sowie Metastasenzellen identifizierte neun Segmente auf 8q, welche in den Metastasen signifikant häufiger zugewonnen waren und wiesen darauf hin, dass diese Aberrationen relevant für die Metastasierung sein könnten. Mithilfe einer FISH-Sonde für den Genlokus von *MYC* in der Region 8q24 konnte an einem größeren, unabhängigen Primärtumor/Metastasen-HNSCC-Kollektiv gezeigt werden, dass Zellen mit einem 8q24-Zugewinn anscheinend signifikant stärker in den Metastasen expandieren. Vermutlich ist die in dieser Arbeit beschriebene Homogenisierung von Klonen in den untersuchten Metastasen eine Art „genetischer Fußabdruck“ des Selektions- bzw. Adaptionprozesses während der lymphatischen Metastasierung.

Zu den bereits identifizierten selektierten Zugewinnen auf 8q24 konnte in einer mRNA-Expressionsanalyse an einem weiteren Primärtumor/Metastasen-HNSCC-Kollektiv eine signifikante Überexpression von 10 Genen auf 8q24 festgestellt werden. Weiterhin konnte beispielhaft anhand von *ASAP1* - eines der überexprimierten Gene auf 8q24 - gezeigt werden, dass die veränderte

Expression von *ASAP1* einen wichtigen Einfluss auf die Tumorzell-Motilität und auch auf die Metastasierung zu haben scheint. Zudem könnte die Größe der 8q24 zugewonnenen Region selbst ein weiterer Hinweis darauf sein, dass auch andere Gene neben *ASAP1* und *MYC* eine wichtige Rolle für die Metastasierung in HNSCC spielen. Dies ist im Einklang mit der Hypothese, dass Gene nicht zufällig lokalisiert sind und funktionell verwandte Gene in „Gen-Clustern“ kodiert zu sein scheinen (Hurst *et al*, 2004).

Die hier dargelegten Ergebnisse für *ASAP1* sind als „Proof of concept“ zu sehen und diese Daten können einen Einblick in die Bedeutung der Aberrationen auf 8q24 für die Tumorprogression in HNSCC geben. Für die Funktion der zugewonnenen Gene auf 8q24 und deren mögliche Bedeutung für die Metastasierung sollten weiterführende Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*, durchgeführt werden.

## 6.6 Ausblick

Es ist bekannt, dass genetische Heterogenität zwischen Primärtumoren und Metastasen existiert und dass sie ein wichtiger Faktor für den Erfolg oder Misserfolg von Krebstherapien ist (Gerlinger *et al*, 2012a). Gerade die besondere genetische Komplexität des HNSCCs erschwert die Entwicklung molekularbasierter Therapien die in der Lage sind verschiedene Subpopulationen des HNSCCs anzugreifen (Braakhuis *et al*, 2012). Aber wie soll man im "Rauschen" dieser genetischen Heterogenität potentielle neue therapeutische Angriffspunkte identifizieren können? In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe der Einzelzellanalyse versucht, gemeinsame metastasierungsrelevante Eigenschaften in heterogenen Tumoren zu finden. Mit dem hier verwendeten methodischen Ansatz konnten in einer genomweiten Untersuchung mehrere Kandidatengene, die möglicherweise therapeutische Angriffspunkte darstellen, in den heterogenen Tumorgeweben identifiziert werden. Nachdem bereits ein Kandidatengen (*ASAP1*) funktionell untersucht wurde, sollen in anschließenden Projekten die hier identifizierten Kandidatengene (n = 10) hinsichtlich ihrer

metastasierungsrelevanten Eigenschaften analysiert werden. Darüber hinaus sollen weitere aCGH-Einzelzellanalysen an HNSCC-Fällen fortgeführt werden, um die Fallzahl des Kollektivs zu vergrößern und die hier erhobenen Daten zusätzlich zu bestätigen. In einem anderen Projekt unserer Arbeitsgruppe wurde von Patienten mit HNSCC disseminierten Tumorzellen (DTC) aus Lymphknoten, welche als Gründungszellen von Metastasen beschrieben werden (Klein 2009), mittels aCGH analysiert. Interessanterweise wiesen 32 von 34 untersuchten DTCs keinen Zugewinn der 8q24-Region auf und hatten im Vergleich zu den untersuchten Metastasen einen signifikant niedrigeren Anteil an Aberrationen im Genom. Dies lässt vermuten, dass der gemeinsame Zugewinn der Gene in der 8q24-Region eine Rolle für das Auswachsen der DTCs im Lymphknoten spielen könnte. Möglicherweise interagieren die auf 8q24 kodierten Gene miteinander bzw. haben einen additiven Einfluss, der einen Wachstumsvorteil in der Mikroumgebung des Lymphknotengewebes ermöglicht. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass die hier identifizierten Kandidatengene metastasierungsrelevant sind und potentielle Zielstrukturen für die molekulare Therapie von HNSCC-Patienten darstellen könnten.

Eine andere Perspektive, hinsichtlich der in Kapitel 6.4 diskutierten Studien über die Entwicklung sowie Selektion von Krebstherapien, wäre eine systematische Analyse der Ausprägung von Therapieresistenzen aufgrund der genetischen Heterogenität in Tumoren. Es wäre von entscheidender Bedeutung potentielle resistente Klone so früh wie möglich zu erkennen. Diese hier vorliegende Studie bietet einen ersten experimentellen Ansatz, wie man solche Klone identifizieren könnte. Darüber hinaus verlaufen Krebstherapien häufig nach einem festen Protokoll, von dem gegebenenfalls nur bei übermäßiger Toxizität abgewichen wird. Außerdem sind Chemotherapien nicht spezifisch auf die Zielzellen ausgerichtet. Die hier erarbeiteten Daten weisen darauf hin, wie wichtig die Berücksichtigung der genetischen Heterogenität von Primärtumoren und Metastasen ist. In einer Studie von Maley *et al* an Ösophagus-Adenokarzinomen konnte gezeigt werden, dass der Grad der tumoralen Heterogenität mit dem

Tumorprogress korreliert, sowie dass die genetische Heterogenität für die Prognose eine Bedeutung hat (Maley *et al*, 2006). In einer Publikation von Boeckx *et al* konnte eine geringe Ansprechrate von HNSCC auf Anti-EGFR-Therapien beobachtet werden, was die Autoren unter anderem mit der bekannten Heterogenität von HNSCC erklärten (Boeckx *et al*, 2014). So könnte das genaue Erfassen der genetischen Heterogenität helfen, die Prognose der Patienten besser abzuschätzen und medikamentöse Krebstherapien effektiver zu gestalten.

## 7 Zusammenfassung

Genetische Diversität einzelner Tumorzellen trägt wesentlich zu der Komplexität der Krebserkrankung bei und stellt eine große Herausforderungen für die Molekular-Diagnostik und -Therapie dar. Ziel dieser Arbeit war bei bekannter Heterogenität, auf Ebene von SCNAs von Einzelzellen des Kopf-Hals-Karzinoms, metastasierungsrelevante Kandidatengene herauszufiltern, die auch als therapeutische Zielstruktur dienen könnten. Hierfür wurden Zellsuspensionen aus frischen Gewebeproben hergestellt und einzelne Tumorzellen nach einer Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gegen CD44v6, CK5 und CK14 identifiziert. Anschließend wurden Marker-positive Zellen mithilfe des Fluoreszenz-aktivierten-Zell-Sorting (FACS) oder der Mikromanipulation isoliert. Das Genom der isolierten Einzelzellen wurde über eine Adapter-Linker-PCR amplifiziert und mithilfe der Array basierten Comparativen-Genomischen-Hybridisierungs-Technik (aCGH, 4 x 180k) wurden SCNA-Profil erstellt. Insgesamt konnten für 82 Tumorzellen von fünf Patienten SCNA-Profil ausgewertet werden. Interessanterweise zeigte jede der analysierten Tumorzellen individuelle genetische Veränderungen neben den gemeinsamen Veränderungen. Auffallend war, dass die Zellen der Metastasen einen niedrigeren Grad an Heterogenität im Vergleich zu den Zellen aus autologen Primärtumoren aufwiesen. Darüber hinaus konnte in den Metastasen im Vergleich zu den Primärtumoren die Region 8q24 als signifikant häufiger zugewonnen identifiziert werden. Mit Hilfe der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH), konnte dieser Zugewinn anhand des in 8q24 lokalisierten Gene *MYC*, in einem Kollektiv von 28 HNSCC Primärtumor/Metastasen-Paaren, bestätigt werden. Um die Relevanz des 8q24-Zugewinns in den Metastasen zu überprüfen, wurden die Expressionsprofile der in 8q24 lokalisierten Gene in 13 Primärtumor/Metastasen-Paaren analysiert. Dadurch konnten zehn Gene, einschließlich *ASAP1*, identifiziert werden, deren Überexpression mit dem in der aCGH detektierten 8q24-Zugewinn übereinstimmen. Darüber hinaus konnte für *ASAP1* eine Bedeutung für die Zellmigration von Kopf-Hals Tumorzellen in einem *in vitro* Migrationsassays festgestellt werden.

## 8 Abstract

Genetic variation of single tumor cells contributes significantly to the complexity of cancer and imposes significant challenges for therapy and molecular diagnostics. The aim of this study was to identify potentially therapeutic targets within the known genetic heterogeneity of HNSCC by SCNA-profiling of single cells. Cellular suspensions were generated from fresh biopsy specimens and single epithelial tumor cells were isolated by fluorescence-activated-cell-sorting (FACS) or micromanipulation after double-immunofluorescence staining against CD44v6, CK5, and CK14. The whole genome of isolated single cells was amplified via an adapter-linker-PCR and subsequently analyzed for SCNA by array comparative genomic hybridization (aCGH, 4 x 180k). In total, 82 informative genetic profiles from single tumor cells from five different patients could be obtained. Notably, it was observed that each analyzed tumor cell presented unique as well as common aberrations. Beyond that, metastases displayed a lower degree of heterogeneity at the single cell level compared to matched primary tumors. Further, it was possible to identify the region 8q24 as being significantly more affected by chromosomal gains in metastatic cells. This observation could be confirmed by fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) for the *MYC*-locus in 28 additional HNSCC patient-matched pairs of primary tumors and metastases samples. In order to better understand the relevance of 8q24 for metastasis, the expression of all genes coded by that region using mRNA-expression microarrays in 13 primary tumor/metastasis pairs was analyzed. Thereby, ten genes could be identified, which expression correspond positively with the amplification status of 8q24, including *ASAP1*. Using an *in vitro* migration assays it could be demonstrated that *ASAP1* has a relevance for cellular migration.

## 9 Literaturverzeichnis

Almendo V, Marusyk A, Polyak K (2013) Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annual review of pathology* **8**: 277-302

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL (2008) Head and neck cancer. *Lancet* **371**(9625): 1695-709

Arteaga CL, Baselga J (2004) Tyrosine kinase inhibitors: why does the current process of clinical development not apply to them? *Cancer Cell* **5**(6): 525-31

Bae JH, Schlessinger J (2010) Asymmetric tyrosine kinase arrangements in activation or autophosphorylation of receptor tyrosine kinases. *Molecules and cells* **29**(5): 443-8

Bardelli A, Siena S (2010) Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**(7): 1254-61

Barnes LL (2005) Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. . In *IARC Press, Lyon*

Becker MT, Shores CG, Yu KK, Yarbrough WG (2004) Molecular assay to detect metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* **130**(1): 21-7

Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL (2013) Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* **501**(7467): 355-64

Ben-Yaacov E, Eldar YC (2008) A fast and flexible method for the segmentation of aCGH data. *Bioinformatics* **24**(16): i139-45

Benhamou CA, Laraqui N, Touhami M, Chekkoury A, Benchakroun Y, Samlali R, Kahlain A (1992) [Tobacco and cancer of the larynx: a prospective survey of 58 patients]. *Revue de laryngologie - otologie - rhinologie* **113**(4): 285-8

Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I (2001) Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural brain research* **125**(1-2): 279-84

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih I M, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD,

Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA, Jr. (2014) Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science translational medicine* **6**(224): 224ra24

Binder V, Bartenhagen C, Okpanyi V, Gombert M, Moehlendick B, Behrens B, Klein HU, Rieder H, Ida Krell PF, Dugas M, Stoecklein NH, Borkhardt A (2014) A new workflow for whole-genome sequencing of single human cells. *Human mutation* **35**(10): 1260-70

Bockmuhl U, Schluns K, Schmidt S, Matthias S, Petersen I (2002) Chromosomal alterations during metastasis formation of head and neck squamous cell carcinoma. *Genes, chromosomes & cancer* **33**(1): 29-35

Boeckx C, Weyn C, Vanden Bempt I, Deschoolmeester V, Wouters A, Specenier P, Van Laer C, Van den Weyngaert D, Kockx M, Vermorken JB, Peeters M, Pauwels P, Lardon F, Baay M (2014) Mutation analysis of genes in the EGFR pathway in Head and Neck cancer patients: implications for anti-EGFR treatment response. *BMC research notes* **7**: 337

Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**(2): 185-93

Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR (2012) Treatment choice for locally advanced head and neck cancers on the basis of risk factors: biological risk factors. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23 Suppl 10**: x173-7

Braakhuis BJ, Senft A, de Bree R, de Vries J, Ylstra B, Cloos J, Kuik DJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2006) Expression profiling and prediction of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of clinical pathology* **59**(12): 1254-60

Burrell RA, Swanton C (2014) The evolution of the unstable cancer genome. *Current opinion in genetics & development* **24**: 61-7

Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (1999) Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* **9**(12): M57-60

Cairns J (1975) Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* **255**(5505): 197-200

Cakir A, Gonul, II, Uluoglu O (2012) Metaplastic breast carcinomas and their relationship with basal-like phenotype. *Turk patoloji dergisi* **28**(2): 134-41

Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA, Morsberger LA, Latimer C, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal SA, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Griffin CA, Burton J, Swerdlow H, Quail MA, Stratton MR, Iacobuzio-Donahue C, Futreal PA (2010) The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* **467**(7319): 1109-13

Cancer Genome Atlas N (2015) Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **517**(7536): 576-82

Chen YJ, Lin SC, Kao T, Chang CS, Hong PS, Shieh TM, Chang KW (2004) Genome-wide profiling of oral squamous cell carcinoma. *The Journal of pathology* **204**(3): 326-32

Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, Jarrett C, Carter J, Murphy BA, Netteville J, Burkey BB, Sinard R, Cmelak A, Levy S, Yarbrough WG, Slebos RJ, Hirsch FR (2006) Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**(25): 4170-6

Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, Butterfoss D, Xiang D, Zanation A, Yin X, Shockley WW, Weissler MC, Dressler LG, Shores CG, Yarbrough WG, Perou CM (2004) Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer cell* **5**(5): 489-500

Cooke SL, Ng CK, Melnyk N, Garcia MJ, Hardcastle T, Temple J, Langdon S, Huntsman D, Brenton JD (2010) Genomic analysis of genetic heterogeneity and evolution in high-grade serous ovarian carcinoma. *Oncogene* **29**(35): 4905-13

Cooke SL, Temple J, Macarthur S, Zahra MA, Tan LT, Crawford RA, Ng CK, Jimenez-Linan M, Sala E, Brenton JD (2011) Intra-tumour genetic heterogeneity and poor chemoradiotherapy response in cervical cancer. *British journal of cancer* **104**(2): 361-8

Cotterman R, Jin VX, Krig SR, Lemen JM, Wey A, Farnham PJ, Knoepfler PS (2008) N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor. *Cancer research* **68**(23): 9654-62

Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, D'Orazio J, Fung CY, Schanbacher CF, Granter SR, Fisher DE (2007) Central role of p53 in the sunburn response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* **128**(5): 853-64

Czyz ZT, Hoffmann M, Schlimok G, Polzer B, Klein CA (2014) Reliable single cell array CGH for clinical samples. *PloS one* **9**(1): e85907

de Bourcy CF, De Vlaminc I, Kanbar JN, Wang J, Gawad C, Quake SR (2014) A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods. *PloS one* **9**(8): e105585

De Luca A, Normanno N Predictive biomarkers to tyrosine kinase inhibitors for the epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer. *Curr Drug Targets* **11**(7): 851-64

Denis N, Kitzis A, Kruh J, Dautry F, Corcos D (1991) Stimulation of methotrexate resistance and dihydrofolate reductase gene amplification by c-myc. *Oncogene* **6**(8): 1453-7

Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, Ritchey JK, Young MA, Lamprecht T, McLellan MD, McMichael JF, Wallis JW, Lu C, Shen D, Harris CC, Dooling DJ, Fulton RS, Fulton LL, Chen K, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, Magrini VJ, Cook L, McGrath SD, Vickery TL, Wendl MC, Heath S, Watson MA, Link DC, Tomasson MH, Shannon WD, Payton JE, Kulkarni S, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, Mardis ER, Wilson RK, DiPersio JF (2012) Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* **481**(7382): 506-10

Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, Galloway DA, Gu W, Gautier J, Dalla-Favera R (2007) Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* **448**(7152): 445-51

Driemel C, Kremling H, Schumacher S, Will D, Wolters J, Lindenlauf N, Mack B, Baldus SA, Hoya V, Pietsch JM, Panagiotidou P, Raba K, Vay C, Vallbohmer D, Harreus U, Knoefel WT, Stoecklein NH, Gires O (2013) Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene*

Driemel C, Kremling H, Schumacher S, Will D, Wolters J, Lindenlauf N, Mack B, Baldus SA, Hoya V, Pietsch JM, Panagiotidou P, Raba K, Vay C, Vallbohmer D, Harreus U, Knoefel WT, Stoecklein NH, Gires O (2014) Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene* **33**(41): 4904-15

el-Naggar AK, Hurr K, Luna MA, Goepfert H, Hong WK, Batsakis JG (1997) Intratumoral genetic heterogeneity in primary head and neck squamous carcinoma using microsatellite markers. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B* **6**(6): 305-8

el-Naggar AK, Lopez-Varela V, Luna MA, Weber R, Batsakis JG (1992) Intratumoral DNA content heterogeneity in laryngeal squamous cell carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* **118**(2): 169-73

Escote X, Fajas L (2015) Metabolic adaptation to cancer growth: From the cell to the organism. *Cancer letters* **356**(2): 171-5

Fawcett TN (2005) An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters* **Volume 27**,

Fisher RA (1922) On the interpretation of  $\chi^2$  from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society*

Freier K, Hofele C, Knoepfle K, Gross M, Devens F, Dyckhoff G, Plinkert P, Lichter P, Herold-Mende C (2010) Cytogenetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma cell lines as model systems for the functional analyses of tumor-associated genes. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* **39**(5): 382-9

Gatenby RA, Silva AS, Gillies RJ, Frieden BR (2009) Adaptive therapy. *Cancer research* **69**(11): 4894-903

Georgiades IB, Curtis LJ, Morris RM, Bird CC, Wyllie AH (1999) Heterogeneity studies identify a subset of sporadic colorectal cancers without evidence for chromosomal or microsatellite instability. *Oncogene* **18**(56): 7933-40

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C (2012a) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of medicine* **366**(10): 883-92

Gerlinger M, Santos CR, Spencer-Dene B, Martinez P, Endesfelder D, Burrell RA, Vetter M, Jiang M, Saunders RE, Kelly G, Dykema K, Rioux-Leclercq N, Stamp G, Patard JJ, Larkin J, Howell M, Swanton C (2012b) Genome-wide RNA interference analysis of renal carcinoma survival regulators identifies MCT4 as a Warburg effect metabolic target. *The Journal of pathology* **227**(2): 146-56

Gotte K, Riedel F, Schafer C, Coy JF, Hormann K (2002) Genetic discordance between primary tumours and metastases of head and neck cancer detected by microsatellite analysis. *Oncology reports* **9**(4): 829-34

Gotte K, Schafer C, Riedel F, Arens N, Hormann K (2004) Intratumoral genomic heterogeneity in primary head and neck cancer and corresponding metastases detected by dual-FISH. *Oncology reports* **11**(1): 17-23

Gotte K, Tremmel SC, Popp S, Weber S, Hormann K, Bartram CR, Jauch A (2005) Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer detected by comparative genomic hybridization. *Advances in oto-rhino-laryngology* **62**: 38-48

Grandis JR, Tweardy DJ (1993) TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer. *Journal of cellular biochemistry Supplement* **17F**: 188-91

Grossmann J (2002) Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **7**(3): 247-60

Hama T, Yuza Y, Saito Y, J Ou, Kondo S, Okabe M, Yamada H, Kato T, Moriyama H, Kurihara S, Urashima M (2009) Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma. *The oncologist* **14**(9): 900-8

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70

Hashimoto S, Hirose M, Hashimoto A, Morishige M, Yamada A, Hosaka H, Akagi K, Ogawa E, Oneyama C, Agatsuma T, Okada M, Kobayashi H, Wada H, Nakano H, Ikegami T, Nakagawa A, Sabe H (2006) Targeting AMAP1 and cortactin binding bearing an atypical src homology 3/proline interface for prevention of breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(18): 7036-41

Heng HH, Stevens JB, Bremer SW, Liu G, Abdallah BY, Ye CJ (2011) Evolutionary mechanisms and diversity in cancer. *Advances in cancer research* **112**: 217-53

Heppner GH (1984) Tumor heterogeneity. *Cancer research* **44**(6): 2259-65

Huang Q, Yu GP, McCormick SA, Mo J, Datta B, Mahimkar M, Lazarus P, Schaffer AA, Desper R, Schantz SP (2002) Genetic differences detected by comparative genomic hybridization in head and neck squamous cell carcinomas from different tumor sites: construction of oncogenetic trees for tumor progression. *Genes, chromosomes & cancer* **34**(2): 224-33

Hunt JL, Barnes L, Lewis JS, Jr., Mahfouz ME, Slootweg PJ, Thompson LD, Cardesa A, Devaney KO, Gnepp DR, Westra WH, Rodrigo JP, Woolgar JA, Rinaldo A, Triantafyllou A, Takes RP, Ferlito A (2014) Molecular diagnostic alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck and potential diagnostic applications. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies* **271**(2): 211-23

Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR (2005) Profiling early head and neck cancer. *Nature reviews Cancer* **5**(2): 127-35

Hupe P, Stransky N, Thiery JP, Radvanyi F, Barillot E (2004) Analysis of array CGH data: from signal ratio to gain and loss of DNA regions. *Bioinformatics* **20**(18): 3413-22

Hurst LD, Pal C, Lercher MJ (2004) The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. *Nature reviews Genetics* **5**(4): 299-310

Jarvinen AK, Autio R, Haapa-Paananen S, Wolf M, Saarela M, Grenman R, Leivo I, Kallioniemi O, Makitie AA, Monni O (2006) Identification of target genes in laryngeal squamous cell carcinoma by high-resolution copy number and gene expression microarray analyses. *Oncogene* **25**(52): 6997-7008

Jin Y, Jin C, Lv M, Tsao SW, Zhu J, Wennerberg J, Mertens F, Kwong YL (2005) Karyotypic evolution and tumor progression in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* **156**(1): 1-7

Jin Y, Jin C, Wennerberg J, Hoglund M, Mertens F (2001) Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization characterization of chromosome 8 rearrangements in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer genetics and cytogenetics* **130**(2): 111-7

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW (1992) ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(12): 5321-5

Kalyankrishna S, Grandis JR (2006) Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**(17): 2666-72

Kato Y, Uzawa K, Saito K, Nakashima D, Kato M, Nimura Y, Seki N, Tanzawa H (2006) Gene expression pattern in oral cancer cervical lymph node metastasis. *Oncology reports* **16**(5): 1009-14

Kazi JU, Kabir NN, Ronnstrand L (2015) Role of SRC-like adaptor protein (SLAP) in immune and malignant cell signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **72**(13): 2535-44

Kimura M (1991) The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Idengaku zasshi* **66**(4): 367-86

Klein CA (2006) Random mutations, selected mutations: A PIN opens the door to new genetic landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(48): 18033-4

Klein CA (2009) Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature reviews Cancer* **9**(4): 302-12

Klein CA (2013) Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature* **501**(7467): 365-72

Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G (1999) Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(8): 4494-9

Klein CA, Stoecklein NH (2009) Lessons from an aggressive cancer: evolutionary dynamics in esophageal carcinoma. *Cancer Res* **69**(13): 5285-8

Klein J, Livergant J, Ringash J (2014) Health related quality of life in head and neck cancer treated with radiation therapy with or without chemotherapy: a systematic review. *Oral oncology* **50**(4): 254-62

Knijnenburg J, van der Burg M, Tanke HJ, Szuhai K (2007) Optimized amplification and fluorescent labeling of small cell samples for genomic array-CGH. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **71**(8): 585-91

Koch WM, Ridge JA, Forastiere A, Manola J (2009) Comparison of clinical and pathological staging in head and neck squamous cell carcinoma: results from Intergroup Study ECOG 4393/RTOG 9614. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* **135**(9): 851-8

Konings P, Vanneste E, Jackmaert S, Ampe M, Verbeke G, Moreau Y, Vermeesch JR, Voet T (2012) Microarray analysis of copy number variation in single cells. *Nature protocols* **7**(2): 281-310

Kroepil F, Fluegen G, Vallbohmer D, Baldus SE, Dizdar L, Raffel AM, Hafner D, Stoecklein NH, Knoefel WT (2013) Snail1 expression in colorectal cancer and its correlation with clinical and pathological parameters. *BMC cancer* **13**: 145

Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ, Marra MA (2009) Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome research* **19**(9): 1639-45

Kundu SK, Nestor M (2012) Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **33**(3): 707-21

La Vecchia C, Franceschi S, Favero A, Talamini R, Negri E (1999) Alcohol intake and cancer of the upper digestive tract. Pattern of risk in Italy is different from that in Denmark. *Bmj* **318**(7193): 1289-90; author reply 1291

Laakso M, Loman N, Borg A, Isola J (2005) Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **18**(10): 1321-8

Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, Kiezun A, Hammerman PS, McKenna A, Drier Y, Zou L, Ramos AH, Pugh TJ, Stransky N, Helman E, Kim J, Sougnez C, Ambrogio L, Nickerson E, Shefler E, Cortes ML, Auclair D, Saksena G, Voet D, Noble M, DiCara D, Lin P, Lichtenstein L, Heiman DI, Fennell T, Imielinski M, Hernandez B, Hodis E, Baca S, Dulak AM, Lohr J, Landau DA, Wu CJ, Melendez-Zajgla J, Hidalgo-Miranda A, Koren A, McCarroll SA, Mora J, Lee RS, Crompton B, Onofrio R, Parkin M, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Roberts CW, Biegel JA, Stegmaier K, Bass AJ, Garraway LA, Meyerson M, Golub TR, Gordenin DA, Sunyaev S, Lander ES, Getz G (2013) Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* **499**(7457): 214-8

Lee A, Caron F, Doucet A, Holmes C (2012) Bayesian sparsity-path-analysis of genetic association signal using generalized t priors. *Statistical applications in genetics and molecular biology* **11**(2)

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews Cancer* **11**(1): 9-22

Lin D, Watahiki A, Bayani J, Zhang F, Liu L, Ling V, Sadar MD, English J, Fazli L, So A, Gout PW, Gleave M, Squire JA, Wang YZ (2008) ASAP1, a gene at 8q24, is associated with prostate cancer metastasis. *Cancer research* **68**(11): 4352-9

Liu Y, Yerushalmi GM, Grigera PR, Parsons JT (2005) Mislocalization or reduced expression of Arf GTPase-activating protein ASAP1 inhibits cell spreading and migration by influencing Arf1 GTPase cycling. *The Journal of biological chemistry* **280**(10): 8884-92

Lorz A, Lorenzi T, Clairambault J, Escargueil A, Perthame B (2015) Modeling the effects of space structure and combination therapies on phenotypic heterogeneity and drug resistance in solid tumors. *Bulletin of mathematical biology* **77**(1): 1-22

Macaulay IC, Voet T (2014) Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS genetics* **10**(1): e1004126

Mack B, Gires O (2008) CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *PLoS One* **3**(10): e3360

Maeda T, Jikko A, Hiranuma H, Fuchihata H (1999) Analysis of genomic instability in squamous cell carcinoma of the head and neck using the random amplified polymorphic DNA method. *Cancer letters* **138**(1-2): 183-8

Maley CC, Galipeau PC, Finley JC, Wongsurawat VJ, Li X, Sanchez CA, Paulson TG, Blount PL, Risques RA, Rabinovitch PS, Reid BJ (2006) Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nature genetics* **38**(4): 468-73

Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipek C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ (2009) Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* **361**(11): 1058-66

Marur S, Forastiere AA (2010) Update on role of chemotherapy in head and neck squamous cell cancer. *Indian journal of surgical oncology* **1**(2): 85-95

Marusyk A, Almendro V, Polyak K (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature reviews Cancer* **12**(5): 323-34

Marusyk A, Polyak K (2010) Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica et biophysica acta* **1805**(1): 105-17

Marusyk A, Polyak K (2013) Cancer. Cancer cell phenotypes, in fifty shades of grey. *Science* **339**(6119): 528-9

Mendez E, Fan W, Choi P, Agoff SN, Whipple M, Farwell DG, Futran ND, Weymuller EA, Jr., Zhao LP, Chen C (2007) Tumor-specific genetic expression profile of metastatic oral squamous cell carcinoma. *Head & neck* **29**(9): 803-14

Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC (2006) Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature reviews Cancer* **6**(12): 924-35

Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani

E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D, Bardelli A (2012) Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* **486**(7404): 532-6

Mohlendick B, Bartenhagen C, Behrens B, Honisch E, Raba K, Knoefel WT, Stoecklein NH (2013) A robust method to analyze copy number alterations of less than 100 kb in single cells using oligonucleotide array CGH. *PloS one* **8**(6): e67031

Möhlendick B, Bartenhagen C, Behrens B, Honisch E, Raba K, Knoefel WT, Stoecklein NH (2013) A robust method to analyze copy number alterations of less than 100 kb in single cells using oligonucleotide array CGH. *PloS one* **8**(6): e67031

Molden T, Kraus I, Skomedal H, Nordstrom T, Karlsen F (2007) PreTect HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *Journal of virological methods* **142**(1-2): 204-12

Moll R (1998) Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *Subcell Biochem* **31**: 205-62

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**(1): 11-24

Moody CA, Laimins LA (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews Cancer* **10**(8): 550-60

Morton NE (1991) Parameters of the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(17): 7474-6

Muller T, Stein U, Poletti A, Garzia L, Rothley M, Plaumann D, Thiele W, Bauer M, Galasso A, Schlag P, Pankratz M, Zollo M, Sleeman JP (2010) ASAP1 promotes tumor cell motility and invasiveness, stimulates metastasis formation in vivo, and correlates with poor survival in colorectal cancer patients. *Oncogene* **29**(16): 2393-403

Müller T, Stein U, Poletti A, Garzia L, Rothley M, Plaumann D, Thiele W, Bauer M, Galasso A, Schlag P, Pankratz M, Zollo M, Sleeman JP (2010) ASAP1 promotes tumor cell motility and invasiveness, stimulates metastasis formation in vivo, and correlates with poor survival in colorectal cancer patients. *Oncogene* **29**(16): 2393-403

Nagel S, Schneider B, Meyer C, Kaufmann M, Drexler HG, Macleod RA (2012) Transcriptional deregulation of homeobox gene ZHX2 in Hodgkin lymphoma. *Leukemia research* **36**(5): 646-55

Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, Cook K, Stepansky A, Levy D, Esposito D, Muthuswamy L, Krasnitz A, McCombie WR, Hicks J, Wigler M (2011) Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* **472**(7341): 90-4

Navin NE (2014) Cancer genomics: one cell at a time. *Genome biology* **15**(8): 452

Nguyen ST, Hasegawa S, Tsuda H, Tomioka H, Ushijima M, Noda M, Omura K, Miki Y (2007) Identification of a predictive gene expression signature of cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Cancer science* **98**(5): 740-6

Nie Z, Hirsch DS, Luo R, Jian X, Stauffer S, Cremesti A, Andrade J, Lebowitz J, Marino M, Ahvazi B, Hinshaw JE, Randazzo PA (2006) A BAR domain in the N terminus of the Arf GAP ASAP1 affects membrane structure and trafficking of epidermal growth factor receptor. *Current biology : CB* **16**(2): 130-9

Ning L, Liu G, Li G, Hou Y, Tong Y, He J (2014) Current challenges in the bioinformatics of single cell genomics. *Frontiers in oncology* **4**: 7

Nowak MA, Michor F, Iwasa Y (2006) Genetic instability and clonal expansion. *Journal of theoretical biology* **241**(1): 26-32

O'Donnell RK, Kupferman M, Wei SJ, Singhal S, Weber R, O'Malley B, Cheng Y, Putt M, Feldman M, Ziober B, Muschel RJ (2005) Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncogene* **24**(7): 1244-51

Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H (2005) A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular systems biology* **1**: 2005 0010

Onodera Y, Hashimoto S, Hashimoto A, Morishige M, Mazaki Y, Yamada A, Ogawa E, Adachi M, Sakurai T, Manabe T, Wada H, Matsuura N, Sabe H (2005) Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *The EMBO journal* **24**(5): 963-73

Pardue ML, Gall JG (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **64**(2): 600-4

Parkin DM (2001) Global cancer statistics in the year 2000. *The lancet oncology* **2**(9): 533-43

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians* **55**(2): 74-108

Parris TZ, Kovacs A, Hajizadeh S, Nemes S, Semaan M, Levin M, Karlsson P, Helou K (2014) Frequent MYC coamplification and DNA hypomethylation of multiple genes on 8q in 8p11-p12-amplified breast carcinomas. *Oncogenesis* **3**: e95

Pelucchi C, Talamini R, Negri E, Levi F, Conti E, Franceschi S, La Vecchia C (2003) Folate intake and risk of oral and pharyngeal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **14**(11): 1677-81

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE (2007) Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(3): 973-8

Randazzo PA, Hirsch DS (2004) Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cellular signalling* **16**(4): 401-13

Rautava J, Soukka T, Inki P, Leimola-Virtanen R, Saloniemi I, Happonen RP, Heikinheimo K (2003) CD44v6 in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. *Oral Oncol* **39**(4): 373-9

Reshmi SC, Gollin SM (2005) Chromosomal instability in oral cancer cells. *Journal of dental research* **84**(2): 107-17

Reshmi SC, Saunders WS, Kudla DM, Ragin CR, Gollin SM (2004) Chromosomal instability and marker chromosome evolution in oral squamous cell carcinoma. *Genes, chromosomes & cancer* **41**(1): 38-46

Richardson JS (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Advances in protein chemistry* **34**: 167-339

Roepman P, Wessels LF, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, Tilanus MG, Koole R, Hordijk GJ, van der Vliet PC, Reinders MJ, Slootweg PJ, Holstege FC (2005) An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nature genetics* **37**(2): 182-6

Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, Basu D, Gimotty P, Vogt T, Herlyn M (2010) A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* **141**(4): 583-94

Rothenberg SM, Ellisen LW (2012) The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *The Journal of clinical investigation* **122**(6): 1951-7

Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G (2013) Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* **32**(43): 5129-43

Sabe H, Hashimoto S, Morishige M, Ogawa E, Hashimoto A, Nam JM, Miura K, Yano H, Onodera Y (2009) The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. *Traffic* **10**(8): 982-93

Sakuma K, Aoki M, Kannagi R (2012) Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(20): 7776-81

Salahshourifar I, Vincent-Chong VK, Kallarakkal TG, Zain RB (2014) Genomic DNA copy number alterations from precursor oral lesions to oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology* **50**(5): 404-12

Salk JJ, Fox EJ, Loeb LA Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annu Rev Pathol* **5**: 51-75

Salk JJ, Fox EJ, Loeb LA (2010) Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annual review of pathology* **5**: 51-75

Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Cassingena A, Venturini F, Funaioli C, Cipani T, Amatu A, Pietrogiovanna L, Schiavo R, Di Nicolantonio F, Artale S, Bardelli A, Siena S (2010) Therapeutic implications of resistance to molecular therapies in metastatic colorectal cancer. *Cancer treatment reviews* **36 Suppl 3**: S1-5

Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA (2003) From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(13): 7737-42

Severin J, Lizio M, Harshbarger J, Kawaji H, Daub CO, Hayashizaki Y, Consortium F, Bertin N, Forrest AR (2014) Interactive visualization and analysis of large-scale sequencing datasets using ZENBU. *Nature biotechnology* **32**(3): 217-9

Shackleton M (2010) Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. *Seminars in cancer biology* **20**(2): 85-92

Sheu JJ, Hua CH, Wan L, Lin YJ, Lai MT, Tseng HC, Jinawath N, Tsai MH, Chang NW, Lin CF, Lin CC, Hsieh LJ, Wang TL, Shih Ie M, Tsai FJ (2009) Functional genomic analysis identified epidermal growth factor receptor activation as the most common genetic event in oral squamous cell carcinoma. *Cancer research* **69**(6): 2568-76

Shin DM, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN (1994) Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer research* **54**(12): 3153-9

Shoab M, Baconnais S, Mechold U, Le Cam E, Lipinski M, Ogryzko V (2008) Multiple displacement amplification for complex mixtures of DNA fragments. *BMC genomics* **9**: 415

Sing T, Sander O, Beerenwinkel N, Lengauer T (2005) ROCr: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics* **21**(20): 3940-1

Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, Ponzetti A, Cremolini C, Amatu A, Lauricella C, Lamba S, Hobor S, Avallone A, Valtorta E, Rospo G, Medico E, Motta V, Antoniotti C, Tatangelo F, Bellosillo B, Veronese S, Budillon A, Montagut C, Racca P, Marsoni S, Falcone A, Corcoran RB, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Siena S, Sartore-Bianchi A, Bardelli A (2015) Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nature medicine* **21**(7): 795-801

Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* **3**: Article3

Snijders AM, Nowak N, Segreaves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG (2001) Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nature genetics* **29**(3): 263-4

Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavare S (2013) Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(10): 4009-14

Soussi T (2007) p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* **26**(15): 2145-56

Spiegelberg D, Kuku G, Selvaraju R, Nestor M (2014) Characterization of CD44 variant expression in head and neck squamous cell carcinomas.

*Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **35**(3): 2053-62

Squire JA, Bayani J, Luk C, Unwin L, Tokunaga J, MacMillan C, Irish J, Brown D, Gullane P, Kamel-Reid S (2002) Molecular cytogenetic analysis of head and neck squamous cell carcinoma: By comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and expression array analysis. *Head & neck* **24**(9): 874-87

Sriamporn S, Parkin DM, Pisani P, Vatanasapt V, Suwanrungruang K, Kamsard P, Pengsaa P, Kritpetcharat O, Pipitgool V, Vatanasapt P (2005) A prospective study of diet, lifestyle, and genetic factors and the risk of cancer in Khon Kaen Province, northeast Thailand: description of the cohort. *Asian Pac J Cancer Prev* **6**(3): 295-303

Stoecklein NH, Erbersdobler A, Schmidt-Kittler O, Diebold J, Schardt JA, Izbicki JR, Klein CA (2002) SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *The American journal of pathology* **161**(1): 43-51

Stoecklein NH, Hosch SB, Bezler M, Stern F, Hartmann CH, Vay C, Siegmund A, Scheunemann P, Schurr P, Knoefel WT, Verde PE, Reichelt U, Erbersdobler A, Grau R, Ullrich A, Izbicki JR, Klein CA (2008) Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell* **13**(5): 441-53

Stoecklein NH, Klein CA (2010) Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *International journal of cancer Journal international du cancer* **126**(3): 589-98

Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, Kryukov GV, Lawrence MS, Sougnez C, McKenna A, Shefler E, Ramos AH, Stojanov P, Carter SL, Voet D, Cortes ML, Auclair D, Berger MF, Saksena G, Guiducci C, Onofrio RC, Parkin M, Romkes M, Weissfeld JL, Seethala RR, Wang L, Rangel-Escareno C, Fernandez-Lopez JC, Hidalgo-Miranda A, Melendez-Zajgla J, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Golub TR, Garraway LA, Grandis JR (2011) The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* **333**(6046): 1157-60

Stylli SS, Kaye AH, Lock P (2008) Invadopodia: at the cutting edge of tumour invasion. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **15**(7): 725-37

Su KY, Chen HY, Li KC, Kuo ML, Yang JC, Chan WK, Ho BC, Chang GC, Shih JY, Yu SL, Yang PC (2012) Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor

response duration in patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**(4): 433-40

Sun PC, el-Mofty SK, Haughey BH, Scholnick SB (1995) Allelic loss in squamous cell carcinomas of the larynx: discordance between primary and metastatic tumors. *Genes, chromosomes & cancer* **14**(2): 145-8

Swanton C (2012) Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer research* **72**(19): 4875-82

Syrjanen S, Lodi G, von Bultzingslowen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz C, Zhou HM, Maeda H, Miller C, Jontell M (2011) Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral diseases* **17 Suppl 1**: 58-72

Tabor A, Watt HC, Wald NJ (2002) Endometrial thickness as a test for endometrial cancer in women with postmenopausal vaginal bleeding. *Obstetrics and gynecology* **99**(4): 663-70

Taneja C, Allen H, Koness RJ, Radie-Keane K, Wanebo HJ (2002) Changing patterns of failure of head and neck cancer. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* **128**(3): 324-7

Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* **13**(3): 718-25

Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, Lang W, Issa JP, Lee JJ, Mao L (2007) Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**(16): 2164-70

Tremmel SC, Gotte K, Popp S, Weber S, Hormann K, Bartram CR, Jauch A (2003) Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics* **144**(2): 165-74

van Hal NL, van Dongen GA, Stigter-van Walsum M, Snow GB, Brakenhoff RH (1999) Characterization of CD44v6 isoforms in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* **82**(6): 837-45

Van Loo P, Voet T (2014) Single cell analysis of cancer genomes. *Current opinion in genetics & development* **24**: 82-91

van Oijen MG, Slootweg PJ (2000) Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **9**(3): 249-56

Vogelstein B (1990) Cancer. A deadly inheritance. *Nature* **348**(6303): 681-2

Wang C, Chen J (2003) Phosphorylation and hsp90 binding mediate heat shock stabilization of p53. *The Journal of biological chemistry* **278**(3): 2066-71

Wang SJ, Wong G, de Heer AM, Xia W, Bourguignon LY (2009) CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *The Laryngoscope* **119**(8): 1518-30

Wang Y, Waters J, Leung ML, Unruh A, Roh W, Shi X, Chen K, Scheet P, Vattathil S, Liang H, Multani A, Zhang H, Zhao R, Michor F, Meric-Bernstam F, Navin NE (2014) Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature* **512**(7513): 155-60

Watabe K, Ito A, Asada H, Endo Y, Kobayashi T, Nakamoto K, Itami S, Takao S, Shinomura Y, Aikou T, Yoshikawa K, Matsuzawa Y, Kitamura Y, Nojima H (2001) Structure, expression and chromosome mapping of MLZE, a novel gene which is preferentially expressed in metastatic melanoma cells. *Japanese journal of cancer research : Gann* **92**(2): 140-51

Welkoborsky HJ, Bernauer HS, Riazimand HS, Jacob R, Mann WJ, Hinni ML (2000) Patterns of chromosomal aberrations in metastasizing and nonmetastasizing squamous cell carcinomas of the oropharynx and hypopharynx. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* **109**(4): 401-10

Whitney M (1947) On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of mathematical Statistics*

Wilting SM, Smeets SJ, Snijders PJ, van Wieringen WN, van de Wiel MA, Meijer GA, Ylstra B, Leemans CR, Meijer CJ, Brakenhoff RH, Braakhuis BJ, Steenbergen RD (2009) Genomic profiling identifies common HPV-associated chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of cervix and head and neck. *BMC medical genomics* **2**: 32

Wiseman SM, Stoler DL, Anderson GR (2004) The role of genomic instability in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Surgical oncology clinics of North America* **13**(1): 1-11

Wittekind C (2010) [2010 TNM system: on the 7th edition of TNM classification of malignant tumors]. *Der Pathologe* **31**(5): 331-2

Wolff E, Girod S, Liehr T, Vorderwulbecke U, Ries J, Steininger H, Gebhart E (1998) Oral squamous cell carcinomas are characterized by a rather uniform pattern of genomic imbalances detected by comparative genomic hybridisation. *Oral oncology* **34**(3): 186-90

Xu K, Tang Y, Grifo JA, Rosenwaks Z, Cohen J (1993) Primer extension preamplification for detection of multiple genetic loci from single human blastomeres. *Hum Reprod* **8**(12): 2206-10

Xu X, Hou Y, Yin X, Bao L, Tang A, Song L, Li F, Tsang S, Wu K, Wu H, He W, Zeng L, Xing M, Wu R, Jiang H, Liu X, Cao D, Guo G, Hu X, Gui Y, Li Z, Xie W, Sun X, Shi M, Cai Z, Wang B, Zhong M, Li J, Lu Z, Gu N, Zhang X, Goodman L, Bolund L, Wang J, Yang H, Kristiansen K, Dean M, Li Y, Wang J (2012) Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor. *Cell* **148**(5): 886-95

Xu YM, Zhu F, Cho YY, Carper A, Peng C, Zheng D, Yao K, Lau AT, Zykova TA, Kim HG, Bode AM, Dong Z (2010) Extracellular signal-regulated kinase 8-mediated c-Jun phosphorylation increases tumorigenesis of human colon cancer. *Cancer research* **70**(8): 3218-27

Ylstra B, van den Ijssel P, Carvalho B, Brakenhoff RH, Meijer GA (2006) BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic acids research* **34**(2): 445-50

Yoshioka S, Tsukamoto Y, Hijjiya N, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Takeuchi I, Seto M, Kawano K, Moriyama M (2013) Genomic profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. *PloS one* **8**(2): e56165

Zariwala M, Schmid S, Pfaltz M, Ohgaki H, Kleihues P, Schafer R (1994) p53 gene mutations in oropharyngeal carcinomas: a comparison of solitary and multiple primary tumours and lymph-node metastases. *International journal of cancer Journal international du cancer* **56**(6): 807-11

Zhang XC, Xu C, Mitchell RM, Zhang B, Zhao D, Li Y, Huang X, Fan W, Wang H, Lerma LA, Upton MP, Hay A, Mendez E, Zhao LP (2013) Tumor evolution and intratumor heterogeneity of an oropharyngeal squamous cell carcinoma revealed by whole-genome sequencing. *Neoplasia* **15**(12): 1371-8

Zhou X, Temam S, Oh M, Pungpravat N, Huang BL, Mao L, Wong DT (2006) Global expression-based classification of lymph node metastasis and extracapsular spread of oral tongue squamous cell carcinoma. *Neoplasia* **8**(11): 925-32

Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, Mathew A, Shanta V, Varghese C, Boffetta P (2003) Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **105**(5): 681-6

zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews Cancer* **2**(5): 342-50

## 10 Appendix

**Tabelle 10.1:** Gegenüberstellung der aCGH und FISH Ergebnisse. Absolute und relative Häufigkeiten der mittels FISH und aCGH detektierten Zugewinne bzw. Verluste der Genloci *CDKN2A*, *CCND1*, *MYC* und *EGFR* in allen analysierten Einzelzellen der fünf untersuchten HNSCC Primärtumor/Metastasen-Paare.

Proben ID	CDKN2A			CCND1			MYC			EGFR		
	aCGH		FISH	aCGH		FISH	aCGH		FISH	aCGH		FISH
	Calling	Zell-Anzahl (%)	Zell-Anzahl (%)	Calling	Zell-Anzahl (%)	Zell-Anzahl (%)	Calling	Zell-Anzahl (%)	Zell-Anzahl (%)	Calling	Zell-Anzahl (%)	Zell-Anzahl (%)
<b>68 PT</b>	Keine Aberrationen detektiert			Keine Aberrationen detektiert			Zugewinn	1/10 (10%)	-	Keine Aberrationen detektiert		
<b>74 PT</b>	Verlust	3/8 (3%)	23/56 (41%)	Keine Aberrationen detektiert			Zugewinn	2/8 (25%)	39/78 (50%)	Zugewinn	3/8 (38%)	40/85 (47%)
<b>74 M</b>	Verlust	2/11 (18%)	9/58 (1%)	Keine Aberrationen detektiert			Zugewinn	5/11 (46%)	23/34 (68%)	Zugewinn	0/11 (0%)	2/31 (7%)
<b>98 PT</b>	Zugewinn	4/8 (50%)	28/67 (41.8%)	Zugewinn	6/8 (75%)	48/65 (74%)	Zugewinn	5/8 (63%)	70/82 (85%)	Zugewinn	1/8 (13%)	23/72 (32%)
<b>98 M</b>	Zugewinn	1/12 (8%)	3/28 (1%)	Zugewinn	2/12 (17%)	2/31 (7%)	Zugewinn	4/12 (33%)	24/65 (37%)	Zugewinn	1/12 (8%)	8/58 (14%)
<b>170 PT</b>	Verlust	5/10 (50%)	117/123 (95%)	Keine Aberrationen detektiert			Zugewinn	0/10 (0%)	15/78 (19%)	Keine Aberrationen detektiert		
<b>170 M</b>	Verlust	12/15 (80%)	112/112 (100%)	Keine Aberrationen detektiert			Zugewinn	6/15 (40%)	48/69 (70%)	Keine Aberrationen detektiert		
<b>178 M</b>	Zugewinn	6/12 (50%)	22/36 (61%)	Zugewinn	4/12 (33%)	45/65 (69%)	Zugewinn	10/12 (83%)	64/79 (81%)	Zugewinn	4/12 (33%)	22/66 (33%)

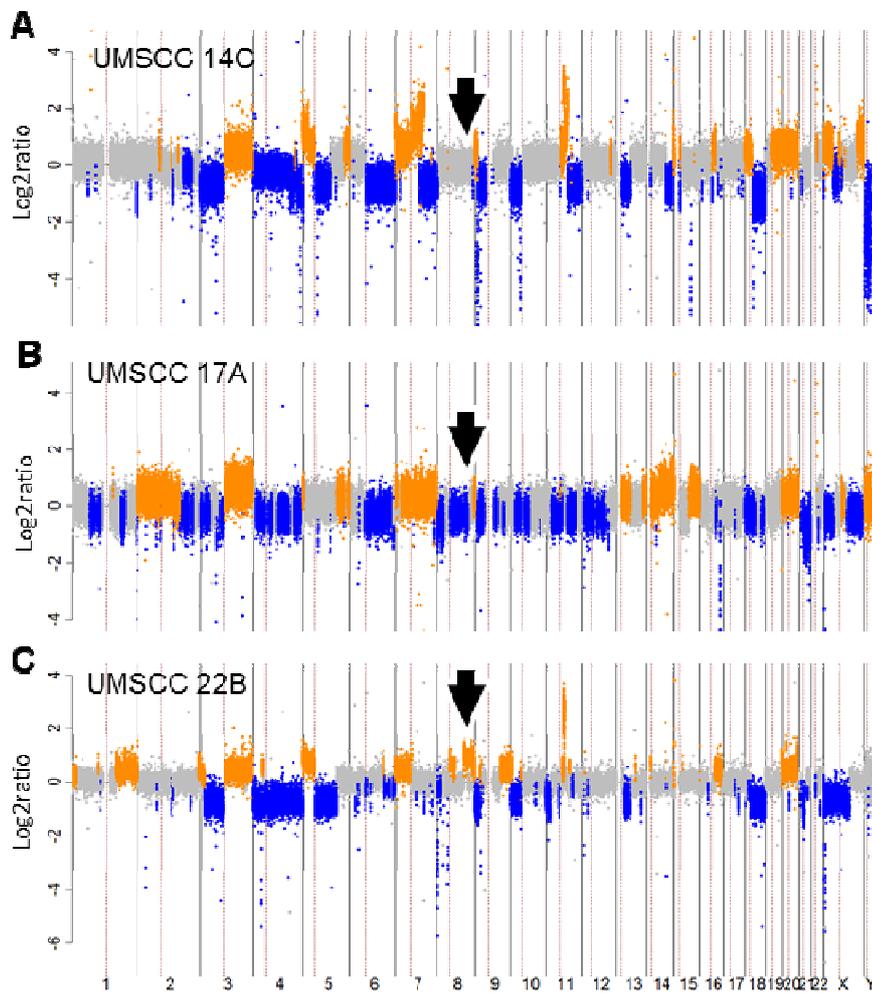
### Expressions-Foldchange in PT- vs. M- Geweben von 13 HNSCC Patienten

Patienten

ID: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



**Abbildung 10.1:** mRNA-Expressionsprofile von 140 Genen, welche auf 8q24 lokalisiert sind, ermittelt an insgesamt 13 HNSCC Primärtumor und Metastasen Paaren.



**Abbildung 10.2:** aCGH SCNA-Profile der HNSCC Zelllinien UM-SCC-14C (A), UM-SCC-17A (B) und UM-SCC-22B (C). Auf der Ordinate sind die Log2ratios aufgetragen und auf der Abzisse die Chromosomen 1-22, X und Y repräsentiert. Chromosomale Zugewinne sind in orange und Verluste in blau dargestellt.

## 11 Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Prof. Dr. Wolfram Knoefel danke ich für das Vertrauen und Unterstützung, welches er mir bei der Einstellung am Institut entgegenbrachte

Prof. Dr. Andreas Weber möchte ich für die Betreuung danken und die Bereitschaft sich als Doktorvater für diese Dissertation zur Verfügung zu stellen.

Prof. Dr. Nikolas Stoecklein hat mich zu jeder Zeit mit seinem Fundus an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen stets gefordert und gefördert. Besonders möchte ich mich für den freundschaftlichen und unkomplizierten Umgang bedanken, der es mir einfach machte, mich gut in das Projekt einzubringen um mich selbst zu entfalten. Darüber hinaus möchte ich mich für die Möglichkeiten der Teilnahme an internationalen Kongressen und Weiterbildungen bedanken sowie dass er mir eine sichere und langfristige Anstellung ermöglichte.

Dr. Dr. Christoph Sproll möchte ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit danken ohne die dieses Projekt nicht realisierbar gewesen wäre und dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Dr. Csaba Toth danke ich für die Kooperation zur Erstellung des HNSCC-TMA.

Prof. Dr. Jonathan Sleeman und Frau Dr. Kerstin Roensch möchte ich für die Durchführung des ASAP1 knockdown Assays danken.

Dipl. Ing. Manfred Beier möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bei der Etablierung sowie Anpassung der Datenanalyse-Pipeline bedanken.

Danken möchte ich auch dem Team des chirurgischen Forschungslabors und Angehörigen des Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für die vielen Hilfestellungen. Meinen Kollegen danke ich, neben der entspannten, lustigen und motivierten Arbeitsatmosphäre, auch für die immer zielführenden Diskussionen, die so manche gute Idee und thematische Wende für meinem Projekt und Dissertation brachten. Hier möchte besonders Dr. Rui Neves danken. Zusammen haben wir sehr viele interessante „Kaffee-Diskussionen“ quer durch alle Disziplinen und unsere Projekte geführt.

Auch meinen Freunden möchte ich für ihre ständige Bereitschaft mir bei zu stehen und mich aufzubauen danken.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit möchte ich besonders Dr. Simon Klapper, Gerd Ströcker und Dr. Birte Möhlendick danken.

Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Familie, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung und Fürsorge bedacht haben. Ihnen gilt mein besonderer Dank.

Meinem Ehemann Joe danke ich dafür, dass er mir immer wieder Mut gemacht hat und insbesondere für seinen bedingungslosen und liebevollen Rückhalt.

## 12 Lebenslauf

Name	Bianca Behrens
Geburtsdatum	14.02.1981
Geburtsort	Düsseldorf
Familienstand	verheiratet
1987 - 1991	Besuch der Matthias Claudius Grundschule, Düsseldorf
1991 - 1997	Besuch der Agnes-Miegel Realschule, Düsseldorf
1997 - 1999	Besuch des Georg-Büchner Gymnasium, Düsseldorf
2001 - 2003	Besuch der Privatschule Niederrhein, Krefeld
07.2003	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
08.2003 - 07.2006	Ausbildung zur staatlich anerkannten Sporttherapeutin an der Präha-Akademy, Düsseldorf
10.2006 - 10.2010	Biologie Studium an der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
11.2010	Diplom-Hauptprüfung „gut“ (1,7)
10.2009 - 11.2010	Diplomarbeit an der Klinik für Allgemeine-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikum zu Düsseldorf mit dem Thema „Untersuchungen auf Einzelzell-Ebene zur genetischen Heterogenität von kopf-Hals Karzinomen“
Seit 11.2010	Promotion zur Dr. rer. nat. an der Klinik für Allgemeine-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikum zu Düsseldorf unter der Betreuung von Prof. Dr. N. Stoecklein und Prof. Dr. A. Weber mit dem Thema „ Untersuchungen zur genetischen Heterogenität einzelner Tumorzellen von Kopf-Hals-Karzinomen“.

## 13 Publikationen und Auszeichnungen

*A robust method to analyze copy number alterations of less than 100 kb in single cells using oligonucleotide array CGH.* Möhlendick B, Bartenhagen C, **Behrens B**, Honisch E, Raba K, Knoefel WT, Stoecklein NH. PLoS One. 2013

*Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer.* Steinert G, Schölch S, Niemietz T, Iwata N, García SA, **Behrens B**, Voigt A, Kloor M, Benner A, Bork U, Rahbari NN, Büchler MW, Stoecklein NH, Weitz J, Koch M. Cancer Res. 2014

*Genomic high resolution profiling of single cell CK+/CD45- CTCs purified by flow-sorting from CellSearch samples of metastatic breast cancer.* R Neves, K Raba, E Honisch, H Neubauer, **B Behrens**, B Möhlendick, WT Knoefel, T Fehm, D Niederacher and NH Stoecklein. Clinical Chemistry. 2014

*A new workflow for whole-genome sequencing of single human cells.* V Binder, C Bartenhagen, V Okpanyi, M Gombert, B Moehlendick, **B Behrens**, H-U Klein, H Rieder, PIF Krell, M Dugas, NH Stoecklein and A Borkhardt. Genome Biology. 2014

12.10.2011	2. Preis	Eppendorf "IDEA Design-Contest"
27.01.2013	Posterpreis	6 <sup>th</sup> International Symposium on Metastases in Head & Neck Cancer, Marburg
16.04.2015	Posterpreis	3 <sup>rd</sup> Retreat, Düsseldorf School of Oncology

## 14 Präsentationen

### Vorträge

Behrens B, Sproll K, Möhlendick B, Alexander M, Baldus SE, Kübler NR, Knoefel WT, Brakenhoff RH, Stoecklein NH. Genetische Heterogenität von Kopf-Hals-Tumoren auf Einzelzell- Ebene. *179. Jahrestagung NRW Chirurgen; 2012, Nov. 29-30, Düsseldorf, Deutschland*

Behrens B, Sproll KC, Möhlendick B, Alexander M, Baldus SE, Kübler NR, Knoefel WT, Brakenhoff RH, Stoecklein NH. Einzelzellanalysen an Zellen aus Primär Tumoren und autologen Metastasen von Kopf-Hals-Karzinomen. *15. Chirurgische Forschungstage; 2011, Sep. 22-24, Dresden, Deutschland*

Behrens B, Neves R, Sproll KC, Roensch K, Beier M, Möhlendick B, Baldus SE, Kübler NR, Knoefel WT, Sleeman J, Stoecklein NH. Single cell analyses of HNSCC reveal a genetic selection during dissemination and identify ASAP1 as contributor for metastization. *15th Meeting Metastasis Research Society; 2014, Jun. 28 – 1 Jul., Heidelberg, Deutschland*

### Poster-Präsentationen

Behrens B, Neves R, Roensch K, Beier M, Möhlendick B, Baldus SE, Kübler NR, Knoefel WT, Sleeman J, Sproll KC, Stoecklein NH. Single cell analyses of HNSCC reveal a genetic selection during dissemination and identify ASAP1 as contributor for metastasis. *3rd Retreat der Düsseldorf School of Oncology; 2015, Apr. 16, Düsseldorf, Deutschland*

Behrens B, Sproll KC, Möhlendick B, Alexander M, Baldus SE, Kübler NR, Knoefel WT, Brakenhoff RH, Stoecklein NH. Single cell analysis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells isolated from primary tumors and matched nodal metastases. *6th International Symposium on Metastases in Head and Neck Cancer; 2013, Jan. 24-27, Marburg, Deutschland*

Behrens B, Sproll KC, Möhlendick B, Köhler D, Baldus SE, Kübler NR, Knoefel WT, Brakenhoff RH, Stoecklein NH. Comprehensive single cell analysis of primary tumors and matched metastases in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): selection of specific genomic aberrations during metastasis. *9th International Symposium on Minimal Residual Cancer; 2013, Sep. 25-27, Paris, Frankreich*

Behrens B, Sproll KC, Baldus SE, Kübler NR, Knoefel WT, Brakenhoff RH, Stoecklein NH. Single cell analysis of head and neck squamous cell carcinoma cells isolated from primary tumors and matched metastases. *178. Jahrestagung NRW Chirurgen; 2011, Okt. 20-21, Bochum, Deutschland*

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder aus anderweitigen fremden Äußerungen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, dass die Arbeit noch nicht in einem anderen Studiengang als Prüfungsleistung vorgelegt wurde.

Düsseldorf, den 20.08.2015

---

Bianca Behrens