

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

Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. T. Knoefel

**Genomische Veränderungen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas:
Eine Microarray-basierte Analyse von 18 Primärtumoren und deren autologer Metastasen.**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Valentin Rausch
2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. N. H. Stoecklein

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. I. Esposito

Meiner Familie und Oda.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Valentin Rausch, Andreas Krieg, Jordi Camps, Bianca Behrens, Manfred Beier, Darawalee Wangsa, Kerstin Heselmeyer-Haddad, Stephan E. Baldus, Wolfram T. Knoefel, Thomas Ried, Nikolas H. Stoecklein (2017). Array comparative genomic hybridization of 18 pancreatic ductal adenocarcinomas and their autologous metastases. *BMC Research Notes*, 10(1), 560¹.

Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist heute die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland. Aufgrund der konstanten Mortalität und steigender Inzidenz der Erkrankung ist davon auszugehen, dass dieser Tumor weiter an Bedeutung zunimmt.

Trotz moderner Chemotherapie konnten bisher die Überlebensraten nicht verbessert werden. Hohe Raten bereits bei Erstdiagnose metastasierter Tumore und häufige Rezidive sind klinische Hinweise auf die hohe Invasivität dieses Tumors, die für die schlechten Überlebensraten verantwortlich gemacht werden.

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass Primärtumoren und Metastasen distinkte und unterschiedliche genetische Veränderungen tragen. Solche Veränderungen innerhalb eines Falles sind ein Hinweis für vermehrte intratumorale Heterogenität. Mit intratumoraler Heterogenität sind unterschiedliche genetische Veränderungen innerhalb eines Tumors gemeint. Dies wird durch genetische Instabilität verursacht. Vermehrte genetische Instabilität eines Tumors wiederum ist mit vermehrter Resistenz gegenüber Chemotherapeutika assoziiert und geht mit einer schlechteren Prognose des Karzinoms einher.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mithilfe der Array-CGH unterschiedliche Aberrationen von Primärtumoren und Metastasen des Pankreaskarzinoms nachzuweisen. Hierdurch sollte einerseits der Grad der intratumoralen Heterogenität bestimmt und andererseits Aberrationen gefunden werden, die in Metastasen angereichert sind und somit Hinweise auf Metastasen-relevante Signalwege liefern.

In dieser Untersuchung wurden 18 duktale Adenokarzinome des Pankreas, 39 korrespondierende Lymphknoten- und 5 Fernmetastasen nach chirurgischer Resektion, die in kurativer Absicht erfolgte, untersucht. Aus Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Tumorproben erfolgte dann, nach manueller Mikrodisektion, die DNA-Extraktion und Analyse mit aCGH-8x60k Mikroarrays. Die Metastasen des Pankreaskarzinoms zeigten mehr Alterationen als der Primärtumor mit der höchsten Anzahl genetisch numerischer Aberrationen in den Fernmetastasen (OM: Median=42, LNM: Median=23, PT: Median=17). Im Vergleich der Aberrationsprofile zeigte sich eine Anreicherung amplifizierter genetisch numerischer Aberrationen in Lymphknotenmetastasen auf den Chromosomenbereichen 8q11.23-q24.3, 12q14.1, 17p12.1, 21q22.12 und eine Anreicherung deletierter Bereiche auf 3p21.31, 4p14, 8p23.3-p11.21, 17p12-11.2. Gene auf diesen

hinzugewonnenen Arealen steuern Signalwege, die für die Regulation des Zellzyklus, Apoptose oder Angiogenese entscheidend sind. Unter anderem ist hiervon auch der *Wnt*-Signalweg betroffen, der für die Regulation des Zellzyklus und den Prozess der Metastasierung eine essentielle Rolle spielt. Neben diesen Anreicherungen konnten Beispiele für eine hohe intratumorale Heterogenität zwischen Primärtumor und korrespondierenden Metastasen gefunden werden. Hierdurch werden Hinweise anderer Studien bestätigt, die eine frühe Metastasierung und weitestgehend unabhängige Entwicklung der Metastasen nahelegen.

Abstract

Genomic alterations in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Array comparative genomic hybridization of 18 primary tumors and their autologous metastases

Today, pancreatic cancer is the 4th most common cause of cancer-related death in Germany. Due to the rising incidence and constant mortality, it has to be assumed that this cancer will become increasingly relevant in the future.

Despite novel chemotherapy, survival rates did not improve in the last decades. High rates of tumors that have already spread when first diagnosed and high rates of recurring disease hint to the invasiveness of this tumor resulting in poor survival rates.

The hypothesis of the presented study is that primary tumors and metastases bear different and distinct genetic changes. Those changes indicate intratumoral heterogeneity. Intratumoral heterogeneity means different genetic alterations within a specific tumor. This is caused by genetic instability. Higher degrees of genetic instability are associated with higher rates of resistance to chemotherapy which again is associated with worse survival outcomes in cancer.

The goal of the presented study was to investigate genetic alterations in primary tumors and their autologous metastases with use of array-comparative genomic hybridization. It was intended to find the degree of intratumoral heterogeneity and specific alterations enriched in metastases. Moreover, enriched alterations could hint to altered, cancer-related pathways relevant for tumor metastasis.

In this study, 18 pancreatic ductal adenocarcinomas, including 39 lymph node and 5 distant metastases after surgical resection in curative intent were investigated. DNA was extracted from formaline-fixated, paraffin-embedded tumor specimens after manual microdissection. Then, analysis was performed with use of array-based comparative genomic hybridization (Agilent 8x60k Mikroarrays).

Metastases acquire a higher frequency of CNAs with the highest in distant metastasis (OM: median=42, LNM: median=23, PT: median=17). In LNM, gains were prevalent on chromosome bands 8q11.23-q24.3, 12q14.1, 17p12.1, 21q22.12, and losses on 3p21.31, 4p14, 8p23.3-p11.21, 17p12.1-11.2. Genes on amplified regions are involved in important cancer-related pathways, essential for the regulation of the cell-cycle, apoptosis or angiogenesis. Among others, *Wnt*-

signaling, a key regulator in metastasization is affected by these alterations. Besides these specific alterations enriched in metastases, a high degree of intratumoral heterogeneity between primary tumors and their autologous metastases could be shown. These findings support findings of other studies that propose an early metastasization and independent progression of tumor metastases.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren.....	1
1.2. Pathologie.....	2
1.3. Therapie.....	3
1.4. Genetik	4
1.4.1. Arten genetischer Veränderungen und Telomerinstabilität.....	4
1.4.2. Häufige genetische Veränderungen im Pankreaskarzinom.....	5
1.4.3. Progressionsmodell und Chromothripsis.....	7
1.4.4. Intratumorale Heterogenität.....	8
1.4.5. Bedeutung der verschiedenen genetischen Erklärungsansätze für die vorliegende Arbeit.....	9
1.5. Hypothesen.....	10
1.6. Ziele der Arbeit	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Klinische Fälle.....	11
2.2. DNA-Extraktion.....	12
2.3. Array-basierte komparative Genom-Hybridisierung.....	17
2.4. Datenanalyse	19
3. Ergebnisse	22
3.1. Genetisch numerische Aberrationen von Primärtumoren und Metastasen	22
3.2. Vergleich genetisch numerischer Aberrationen von Primärtumoren und korrespondierender Metastasen.....	36
4. Diskussion	40

4.1. Genetisch numerische Aberrationen beim duktalem Pankreas-Adenokarzinom	40
4.2. Bedeutung angereicherter CNA in Metastasen	40
4.3. Intratumorale Heterogenität und Metastasierungszeitpunkt beim Pankreaskarzinom	43
4.4. Limitationen der Studie	45
4.5. Ziele und Hypothesen.....	46
5. Literaturverzeichnis.....	48

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren

In Deutschland starben im Jahr 2015 insgesamt 17.156 Menschen am Pankreaskarzinom^{2,3}. Dies entspricht einer altersspezifischen Mortalität von 20,1/100.000^{2,3}. Aufgrund der hohen Sterblichkeit entsprach 2013 mit insgesamt 17.505 Neuerkrankten die Inzidenz etwa der Mortalität (16.601 Verstorbene im Jahr 2013) der Erkrankung^{3,4}. Männer (Inzidenz: 15,1/100.000) waren hiervon mit einer Ratio von 1,4:1 im Jahr 2013 in der BRD deutlich häufiger betroffen als Frauen (Inzidenz: 10,5/100.000)³. Im Jahr 2014 lag die relative 10-Jahres-Überlebensrate des Pankreaskarzinoms bei 8%⁵. Die Inzidenz der Erkrankung nimmt weiterhin kontinuierlich zu. Im Vergleich zu 2003 ist innerhalb von 10 Jahren die Inzidenz um ca. 58,9%, die Sterblichkeit im gleichen Zeitraum um 30,86% gestiegen^{3,4}. In den vergangenen 40 Jahren haben sich die Sterbefälle an dieser Erkrankung mehr als verdoppelt, in den vergangenen 20 Jahren hat diese Steigerungsrate aber deutlich abgenommen². Diese steigenden Raten werden nicht hinreichend durch eine Zunahme älterer Menschen in der Bevölkerung erklärt, da im 10-Jahres-Vergleich auch die altersstandardisierte Neuerkrankungsrate von 8,6/100.000 für Frauen und 13,2/10.000 auf 10,7/100.000 für Frauen und 14,5/10.000 für Männer zugenommen hat^{5,6}. Demnach ist auch weiterhin von einer steigenden Anzahl an Erkrankten und somit einer Zunahme der Bedeutung dieses Karzinoms zu rechnen. Insgesamt stellt das Pankreaskarzinom eine der häufigsten Krebstodesursachen dar und machte im Jahr 2015 7,58% aller Krebstoten in Deutschland aus⁷. Damit ist dieses Karzinom in Deutschland die vierthäufigste zum Tode führende Krebsart bei Männern und Frauen⁷.

Im internationalen Vergleich stehen die steigenden Raten der altersstandardisierten Neuerkrankung in Deutschland eher konstanten Raten beispielsweise in Skandinavien oder nur minimal steigenden Raten in den USA gegenüber, die sich aber insgesamt aber auf ähnlichem Niveau bewegen^{5,9}. Die höchsten Neuerkrankungsraten sind generell in den hoch entwickelten Ländern zu finden, wobei Nordamerika Spitzenreiter ist⁸. Bezogen auf die ethnische Herkunft zeigt sich die höchste Inzidenz weltweit bei der schwarzen Bevölkerungsgruppe, während die niedrigste Inzidenz bei der weißen asiatischen Bevölkerung zu finden ist¹⁰.

Gesicherte und relevanteste Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom sind das Rauchen, ein starkes Übergewicht sowie der Diabetes mellitus¹¹⁻¹³. Ein erhöhtes Risiko wird ferner bedingt durch hereditäre Erkrankungen, die durch bekannte Genmutationen wie beispielsweise beim Peutz-Jeghers-Syndrom, beim familiären atypischen multiplen Muttermal und Melanom (FAMMM)-Syndrom, der Ataxia teleangiectasia, dem Lynch-Syndrom, oder der BRCA-1/2-Mutation beim hereditären Brustkrebs ausgelöst werden sowie durch bisher unbekannte Veränderungen, die jedoch durch eine familiäre Häufung dieser Erkrankung auffallen¹⁴⁻²⁰.

1.2. Pathologie

Mit über 95% machen die Tumore des exokrinen Pankreas zusammengefasst den größten Teil aller Pankreastumore aus^{21,22}. 69-89% aller Pankreastumore werden histologisch als duktales Adenokarzinom (PDAC) klassifiziert^{21,23-25}. Die nächst häufigeren histologischen Varianten sind das neuroendokrine Karzinom (2-7%) oder die intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) mit invasivem Karzinom (2-6%)^{21,23}. Andere Karzinome sind mit $\leq 1\%$ (beispielsweise das adenosquamöse Karzinom oder das Azinarzellkarzinom) noch weitaus seltener²¹. Prognostisch verhalten sich insbesondere die neuroendokrinen Tumore mit 5-Jahres-Überlebensraten von 33-47% deutlich günstiger als das PDAC²⁶.

Eine charakteristische Eigenschaft des Pankreaskarzinoms ist das sogenannte desmoplastische Wachstum²⁴. Maligne Zellen sind in reichlich fibrotischem Gewebe bestehend aus α SMA-exprimierenden Myofibroblasten und Kollagen Typ I eingebettet^{24,27}.

Das Pankreaskarzinom zeichnet sich außerdem durch ein sehr invasives Wachstum aus. In einem Großteil der Fälle liegt bei Diagnosestellung bereits eine Invasion von Gefäßen, Lymphbahnen und Nerven vor²⁸. Darüber hinaus können beim Pankreaskarzinom häufig bereits bei Erstdiagnose Metastasen gefunden werden. Häufigste Lokalisationsorte sind Leber (76-80%), Lunge (45-48%) und Peritoneum (48-59%)^{29,30}. Weniger häufig können Metastasen auch in abdominellen oder thorakalen Lymphknoten, Knochen oder der Nebenniere gefunden werden³⁰.

1.3. Therapie

Einzigste kurative Therapie des Pankreaskarzinoms ist weiterhin die chirurgische Resektion des Tumors³¹. Sollten Fernmetastasen in Leber, Peritoneum, Omentum majus etc. nachgewiesen worden sein, ist eine kurative Resektion nicht mehr durchführbar³². Einbeziehung umliegender Gefäße oder Invasion in benachbarte Organe können ebenfalls eine kurative Resektion unmöglich machen^{32,33}. Ist der Tumor resezierbar und der Patient für diese Therapie geeignet, wird eine Pankreatikoduodenektomie durchgeführt. Neben der konventionellen ‚Whipple‘-OP, bei der neben dem Pankreaskopf das Duodenum, die Gallenblase, der Ductus choledochus und der distale Magen reseziert wird, existieren Pylorus-erhaltende oder Magen-erhaltende Operationen, die in geeigneten Fällen die Komorbidität senken. Etabliert ist außerdem eine adjuvante Chemotherapie, derzeit vor allem mit Gemcitabine oder 5-Fluorouracil (5-FU), während eine neoadjuvante (Radio-)chemotherapie primär resezierbarer Tumore nur in Studien empfohlen wird^{34,35}. Eindeutige Empfehlungen zur adjuvanten Radiochemotherapie von Patienten nach Tumorresektion gibt es bisher aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse ebenfalls nicht^{34,35}. In Grenzfällen kann zum Erreichen einer Resezierbarkeit eine neoadjuvante (Radio-)chemotherapie überlegt werden^{34,35}. Allerdings sind Überlebensraten auch nach R0-Resektion des Pankreaskarzinoms weiterhin ernüchternd. Zwar ist durchgängig die perioperative Mortalität auf unter 4% gesunken, eine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate konnte allerdings bisher nicht erreicht werden³⁶⁻³⁸. Größter negativer Einflussfaktor des Langzeitüberlebens ist der positive Lymphknotenstatus. Lymphknoten-negative Tumoren zeigen eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 30%, während diese bei Lymphknoten-positiven Tumoren lediglich bei 10% liegt³⁹⁻⁴¹. Ein Grund für die schlechte Prognose sind wahrscheinlich die unspezifischen Symptome dieser Erkrankung. Diese könnten auch erklären, warum zum Zeitpunkt der Diagnose häufig bereits Metastasen vorhanden sind, die hochresistent gegen Chemotherapie sind⁴². Insgesamt werden daher Pankreaskarzinome selten früh diagnostiziert. Zwischen 2006 und 2012 waren nur ca. 9% der Pankreaskarzinome bei Diagnose in einem lokalisierten Stadium²⁵. Die Diagnose nach Auftreten krebspezifischer Symptome wird im Median nach 2 Monaten gestellt, wonach das Überleben im Mittel nur 4-6 Monate beträgt⁴³.

1.4. Genetik

1.4.1. Arten genetischer Veränderungen und Telomerinstabilität

Generell sind verschiedene Möglichkeiten in der Krebsentstehung bekannt, die zu einer veränderten Expression tumorrelevanter Gene führen. Bereits epigenetische Veränderungen können ohne Veränderung der DNA über Demethylierung oder die Histonmodifikation die Expression regulierender Gene verändern^{44,45}. Im Genom selbst können wiederum strukturelle Änderungen, wie Polyploidie, Deletionen oder Amplifikationen einzelner Regionen vorliegen⁴⁶. Zudem können durch Punktmutationen einzelne Basen der DNA deletiert, inseriert oder ausgetauscht werden⁴⁶. Letztere Veränderungen können stumm sein oder alternativ zu einer Aktivierung beziehungsweise einer Inaktivierung des betroffenen kodierenden Areals führen.

Eine zentrale Rolle bei der Entstehung genetischer Veränderungen spielen die Telomere, die mit Sequenzen repetitiver DNA die Enden der Chromosomen bilden. Telomere verkürzen sich physiologisch bei der Zellteilung. Wenn die Länge der Telomere im Rahmen der fortwährenden Zellteilung eine kritische Größe unterschreitet, führt dies in der Regel zum Sistieren der Zellteilung und zum Tod der Zelle. Die hierfür erforderlichen Mechanismen können aber außer Kraft gesetzt sein. In der Folge können die dann instabilen Telomere zur Fusion mit benachbarten Chromosomen neigen. Eine erneute Spaltung dieser Fusion an anderer Stelle kann dann zu Amplifikationen (über Replikationen oder Aneuploidie) oder Deletionen (über Aneuploidie oder Heterozygotieverlust (loss of heterozygosity, LOH)) der DNA führen⁴⁷. Diese Fusion und anschließende Spaltung wird als ‚breakage-fusion-bridge‘-Zyklus (BFB) bezeichnet⁴⁷. Die hieraus entstehenden Veränderungen in der Anzahl vorhandener Kopien eines Gens können dann zu einer veränderten Aktivität des Gens führen. Deletionen können dabei Tumorsuppressorgene, deren hierdurch verminderte Aktivität beispielsweise Tumorzellen ein ungestörtes Durchschreiten des Zellzyklus ermöglichen kann, betreffen. Beispielhaft ist das Tumorsuppressorgen *TP53* als Kontrollmechanismus für die Induktion von Apoptose, DNA-Reparatur oder Zellzyklus-Arrest verantwortlich, sodass eine Deletion zu einer Inaktivierung dieser Kontrollmechanismen führen kann⁴⁸. Die Amplifikation von Genen hingegen kann durch eine vermehrte Anzahl vorhandener Kopien zu einer höheren Aktivität des betroffenen Gens führen⁴⁹. Veränderungen in der Anzahl der Kopien lassen sich interindividuell aber auch physiologisch im Genom finden. Diese werden als ‚Copy Number

Variations' (CNV) bezeichnet⁴⁹. Sind allerdings Regionen betroffen, die krebsrelevante Gene kodieren und die im Vergleich zu physiologischen Zellen des Körpers in der Kopienanzahl verändert sind (deletiert oder amplifiziert), werden diese ‚Copy Number Alterations' (CNA) genannt⁴⁹. Experimentell kann die Analyse dieser Regionen im Vergleich zu einer Referenz-DNA daher Hinweise auf bei der Krebsentstehung beteiligte Mechanismen liefern⁴⁹. Um Proben auf Punktmutationen zu untersuchen, werden inzwischen vor allem Sequenzieretechniken benutzt. Zur Detektion von CNA eignen sich hingegen verschiedene Verfahren wie die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) und besonders komparative Verfahren wie die Array-basierte komparative Genom-Hybridisierung (aCGH).

1.4.2. Häufige genetische Veränderungen im Pankreaskarzinom

Das Muster genetischer Veränderungen des Pankreaskarzinoms ist inzwischen gut bekannt⁵⁰⁻⁵⁶. Mittels Sequenzierung des Tumorgenoms konnten Jones et al 2008 erstmals das gesamte Exom des Pankreaskarzinoms bestehend aus 20.661 Protein-kodierenden Genen an 24 Karzinomen entschlüsseln⁵⁰. Sie konnten im Mittel 48 somatische Mutationen im Pankreaskarzinom nachweisen. Hiervon konnten sie insgesamt 198 verschiedene homozygote Deletionen neben vielen Regionen mit Deletionen einzelner Genkopien sowie 144 high-copy Amplifikationen neben weniger häufigen Amplifikationen größerer Regionen oder ganzer Chromosomen finden⁵⁰. Nach Selektion von Mutationen, die für einen Progress des Karzinoms relevant sind, konnten weiterhin 69 Gene in 12 krebsrelevanten Signalwegen herausgefiltert werden, die in 67-100% der Tumoren verändert waren⁵⁰. Ähnliche Ergebnisse wurden in weiteren Untersuchungen gezeigt, die Sequenzierungen von Pankreaskarzinomen beschreiben^{51,52}. Signalwege, bei denen mindestens ein alteriertes Gen in jedem Pankreaskarzinom zu finden war, sind unter anderem die Apoptose, die Regulation der G₁/S-Phase-Transition, der *KRAS*-Signalweg, der *TGF-β*-Signalweg und der *Wnt/Notch*-Signalweg⁵⁰. Aus diesen Erkenntnissen schlussfolgern Jones et al einen Vorschlag für einen Therapieansatz, der eher spezifische Signalwege als einzelne alterierte Gene ansprechen soll⁵⁰. Beispielsweise könnten dann als Ziele einer potentiellen Therapie auch seltenere genetische Alterationen, wie beispielsweise eine Amplifikation von *CDK6*, berücksichtigt werden, da sie durch Chemotherapie bereits effektiv adressiert werden können^{29,52,57,58}.

Die Analyse häufiger Alterationen kann aber auch zur Bewertung von Progress und Prognose des Karzinoms herangezogen werden. Bereits bekannte, häufige genetische Veränderungen konnten auch in der obigen Arbeit von Jones et al bestätigt werden. Die vier häufigsten genetischen Alterationen des Pankreaskarzinoms, die beobachtet wurden sind *KRAS*, *P16/CDKN2A*, *TP53* und *SMAD4 (DPC4)*. Diese werden im Folgenden kurz beschrieben.

KRAS ist ein Onkogen und auf Chromosom 12p lokalisiert. Eine Veränderung dieses Gens ist bei >90% der Pankreaskarzinome vorhanden^{50,59}. *KRAS* wird meist durch Punktmutation aktiviert. *KRAS* kodiert ein Gen aus der Familie der Guanodin Triphosphat (GTP)-bindenden Proteine, die eine Reihe zellulärer Funktionen wie beispielsweise Proliferation, Überleben der Zelle oder Motilität vermitteln⁶⁰. Eine Mutation führt meist zur dauerhaften Aktivierung dieses Gens, die wiederum die Aktivität nachgeschalteter Signalwege beeinflusst⁶⁰.

P16/CDKN2A ist auf Chromosom 9p lokalisiert, die Inaktivierung dieses Tumorsuppressorgens findet sich ebenfalls in >90% der Pankreaskarzinome^{61,62}. Für die Inaktivierung sind Deletion, inaktivierende Punktmutation oder inaktivierende Hypermethylierung verantwortlich⁶¹. Hierdurch wird dieser wichtige Regulator des Zellzyklus außer Kraft gesetzt, der ansonsten die Transition der G₁/S-Phase verhindern kann⁶⁰. Mutationen in *KRAS* und *CDKN2A* sind darüber hinaus klinisch mit einer signifikant höheren Rate an Oligometastasen im Pankreaskarzinom verbunden²⁹.

TP53, ein Tumorsuppressorgen, ist auf Chromosom 17p lokalisiert. In über 70% der Pankreaskarzinome ist dieses Gen meist durch Mutation des Gens verbunden mit einer Deletion des zweiten Allels inaktiviert^{50,59,63}. Wichtige hierdurch veränderte Signalwege sind unter anderem die Apoptose, die Regulation des G₁/S-Checkpoint und der G₂/M-Arrest⁶⁰.

SMAD4 (DPC4) ist auf Chromosom 18q lokalisiert. Eine Inaktivierung dieses Tumorsuppressorgens zeigt sich in über 50% aller Pankreaskarzinome⁶⁴⁻⁶⁶. *SMAD4* dient als Transmitter im *TGF-β*-Signalweg. Daher führt eine Inaktivierung unter anderem zu einer fehlenden *TGF-β*-induzierten Wachstumshemmung bei malignen Zellen. Darüber hinaus konnte bei metastasierten Pankreaskarzinomen eine erhöhte Rate von *SMAD4*-Deletionen nachgewiesen werden, die gleichzeitig mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet sind^{30,67}.

1.4.3. Progressionsmodell und Chromothripsis

Aus der Erkenntnis dieser gehäuften Mutationen wurde ein sogenanntes Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms entwickelt. Danach wird ein mehrstufiger Prozess beschrieben, bei dem schrittweise Mutationen spezifischer Gene hinzugewonnen werden. Als morphologisches Korrelat sollen diese Mutationen über intraepitheliale Neoplasien (PanIN-Läsionen) zum invasiven Karzinom führen^{65,68-70}. Nach bisherigen Untersuchungen tragen allerdings nur ca. 37% der Pankreaskarzinome alle Driver-Mutationen, die in diesem Modell vorgeschlagen werden (*KRAS*, *SMAD4*, *CDKN2A* und *TP53*). Zudem korreliert die Abwesenheit dieser Mutationen in dem Karzinom nicht mit dem Langzeitüberleben^{29,71}. Dieses Modell kann daher nur einen Teil der invasiven Karzinome erklären.

Weitere Zweifel an diesem klassischen Modell einer graduellen Entwicklung werden durch ein neu beobachtetes Phänomen im Pankreaskarzinom bestärkt. Analysen genetischer Daten des Pankreaskarzinoms legen nahe, dass DNA-Veränderungen in einem relativ kurzen Zeitfenster und möglicherweise bereits früh in der Tumorgenese akquiriert werden⁷². Frühe Veränderungen in der Tumorzell-DNA, wie beispielsweise die Chromothripsis, werden auch durch die oben beschriebene Telomerinstabilität erklärt⁷³. Das Phänomen der Chromothripsis wurde erstmalig von Stephens et al gezeigt. Er zeigte, dass bei Fusion von Telomeren zweier benachbarter Chromosomen dizentrische Chromosome entstehen, die auch in der Mitose nicht getrennt werden⁷⁴. Dadurch entstehen Chromatinbrücken, die die Zellkerne zweier Zellen verbinden⁷⁴. Durch Auflösen dieser Brücken wird die darin befindliche DNA durch spezifische Nucleasen fragmentiert und kann dann als Einzelstrang-DNA in die genomische DNA integriert werden⁷⁴. Durch diese ‚katastrophalen‘ Ereignisse, können eine Vielzahl genetischer Veränderungen in einem einzigen Zellzyklus induziert werden^{75,76}. Auswirkungen solcher ‚katastrophalen‘ Ereignisse lassen sich in 65% der Pankreaskarzinome finden⁷². Das Auftreten von Chromothripsis wird besonders durch ein instabiles Genom begünstigt, da sich hierdurch bedingte Veränderungen in polyploiden Zellen signifikant häufiger finden lassen als in diploiden Zellen⁷². Zudem ist das Auftreten dieser Ereignisse mit einer signifikant schlechteren Prognose beim Pankreaskarzinom vergesellschaftet⁷².

Hieraus ergeben sich verschiedene Implikationen. Zum einen scheint das Phänomen der Chromothripsis insgesamt ein wichtiger Schritt in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms und

anderer aggressiver Tumore zu sein⁷⁶⁻⁷⁸. Ein Grund für die besondere Rolle dieses Mechanismus beim Pankreaskarzinom konnte bisher nicht beschrieben werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte unter anderem das desmoplastische Wachstum des Tumors sein. Dieser ausgeprägten Fibrose um den Tumor konnte eine protektive Wirkung nachgewiesen werden, da sie die Entwicklung eines Karzinoms unterdrückt²⁷. Dadurch könnte wiederum ein erhöhter Selektionsdruck zugunsten höher maligner Zellen entstehen⁷².

1.4.4. Intratumorale Heterogenität

Nach der klassischen Theorie der Tumorprogression von Nowell gehen Tumorzellen klonal von einer veränderten Zelle aus⁷⁹. Die verschiedenen oben genannten Mechanismen, insbesondere die hohe Instabilität des Chromosoms, führen aber darüber hinaus zu fortwährenden Mutationen der Tumorzellen^{72,80,81}. Die hierdurch entstehenden verschiedenartigen Tumorzellen unterliegen einem kontinuierlichen Selektionsdruck, wodurch sie expandieren oder wieder verschwinden können⁸². Die sich dabei entwickelnden, verschiedenartigen Tumorzellen werden aufgrund der klonalen Expansion als Subklone bezeichnet. Das Phänomen der morphologischen Heterogenität eines Tumors ist zwar bereits lange bekannt, gentechnische Verfahren, wie die aCGH oder die Sequenzierung des gesamten Genoms, können diese Veränderungen aber auch auf genomischer Ebene nachvollziehbar machen^{83,84}. Das hierbei beobachtete Phänomen verschiedenartig veränderter Tumorzellen innerhalb eines Tumors ist als intratumorale Heterogenität (ITH) bekannt⁸⁵.

Hinweise für ein hohes Maß an Heterogenität konnte auch in anderen Tumoren wie beispielsweise im renalen Klarzellkarzinom gefunden werden, bei dem in allen untersuchten Fällen eine intratumorale Heterogenität nachgewiesen werden konnte⁸⁶. In Pankreaskarzinomen konnte ITH bereits durch Campbell et al nachgewiesen werden, die ca. 1/3 aller Mutationen nur in Subklonen nachweisen konnten⁸⁰. Auch Machen-Moore et al konnten ein hohes Maß an Heterogenität im Pankreaskarzinom finden, gleichzeitig konnten sie aber bei den bekannten ‚Driver‘-Mutationen (*KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *ARID1A*, *ATM*) in korrespondierenden Proben eines Falles eine erstaunliche Uniformität zeigen, sollten diese mutiert sein⁸⁷. Aus dieser ITH ergibt sich auch ein klinisches Diagnoseproblem, da durch eine Biopsie zur Entscheidung gezielter Therapie nur einen Teil der mutierten Ergebnisse erfassen könnte⁸². Neben dieser klassischen ITH im Sinne

heterogener Veränderungen des Tumors zwischen verschiedenen Zellen sind ferner auch Veränderungen eines Tumors über die Zeit nachweisbar. Mittels FISH-Untersuchungen konnten Anderson et al genetische Unterschiede in Tumorzellen bei der akuten Leukämie nachweisen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht wurden⁸⁸. Dieser Nachweis einer Heterogenität über die Zeit würde insbesondere die Anpassungsmöglichkeiten maligner Tumore an Bedingungen ihrer Umgebung erklären. Dies könnte auch Teile einer Chemotherapieresistenz oder Rezidive maligner Zellen begründen. Zwar konnten solche Mechanismen beim Pankreaskarzinom bisher noch nicht nachgewiesen werden, Untersuchungen am kolorektalen Karzinom konnten aber eine ungünstigere Prognose bei chromosomal instabilen Tumoren nach Chemotherapie zeigen⁸⁹. Intratumorale Heterogenität konnte generell beim Pankreaskarzinom zwar in einigen Studien mit kleineren Fallzahlen bereits nachgewiesen werden. Untersuchungen von genetisch numerischen Alterationen sind in größerer Fallzahl allerdings noch nicht durchgeführt worden. Derartige Untersuchungen könnten Hinweise auf Genomregionen geben, die von der Heterogenität besonders betroffen sind und somit Ansatzpunkte für weitere gezielte Untersuchungen liefern. Ferner könnten so auch Hinweise auf den Metastasierungszeitpunkt gefunden werden. Hieraus gewonnene Erkenntnisse hätten direkten Einfluss auf zukünftige Therapiestrategien, die Metastasen-spezifische Mechanismen zum Ziel haben.

Zusammengefasst ist ITH damit ein entscheidendes Phänomen in der Tumorgenetik, insbesondere aufgrund der klinisch bedeutsamen Implikationen für Diagnose und Therapie.

1.4.5. Bedeutung der verschiedenen genetischen Erklärungsansätze für die vorliegende Arbeit

Insgesamt eröffnen Untersuchungen zur Genetik von Pankreaskarzinomen neue Erklärungsansätze für die ungünstige Prognose dieser Tumore. Entgegen des klassischen Verständnisses einer graduellen Entwicklung, könnten frühe ‚katastrophale‘ Veränderungen im Genom eine frühzeitige Entwicklung von Zellen ermöglichen, die dann metastasieren können. Dieses Phänomen könnte auch die wichtige Feststellung erklären, warum ein Großteil der Pankreaskarzinome bereits bei früher Diagnosestellung Metastasen gebildet hat. Hier liegt ein wesentlicher Diskussionspunkt in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms, da der Zeitpunkt der Metastasierung weiterhin unklar aber für einen wesentlichen Teil der Letalität verantwortlich ist.

Campbell et al konnten zeigen, dass verschiedene Subklone des Pankreaskarzinoms für Metastasen verantwortlich sind⁸⁰. Chromothripsis und andere genetische Phänomene, die für eine frühzeitige Befähigung zur Metastasierung sprechen, könnten die Hypothese einer frühen Metastasierung und parallelen Entwicklung verschiedener Subklone des Pankreaskarzinoms bestätigen. Unterstützt wird diese These durch Daten, die für andere Karzinome gewonnen wurden und die eine frühe Metastasierung und parallele Entwicklung von Primärtumor und korrespondierenden Metastasen nahelegen^{85,90}. Neben diesen prinzipiellen Überlegungen könnten aber auch spezifische Veränderungen krebsrelevanter Gene eine besondere Rolle in diesem Prozess spielen. Eine Mutation in einer Lungenmetastase, die zur Amplifikation des Onkogens *MYC* führt, konnte beispielsweise durch Campbell et al in einem Pankreaskarzinom nachgewiesen werden, während diese in einer korrespondierenden abdominalen Metastase nicht zu finden war⁸⁰.

1.5. Hypothesen

Die Hypothesen der vorliegenden Arbeit sind, dass (1) das duktales Adenokarzinom des Pankreas ein hohes Maß intratumoraler Heterogenität aufweist, die sich in genetisch unterschiedlichen Primärtumoren und Metastasen widerspiegelt, (2) genetische Veränderungen distinkt für Lymphknoten- beziehungsweise Fernmetastasen sind und (3) genetisch distinkte Veränderungen der Metastasen Alterationen von Genen tragen, die den Prozess der Metastasierung beeinflussen können.

1.6. Ziele der Arbeit

Ziele der Arbeit waren es, mithilfe der genomweiten Untersuchung numerischer Aberrationen von korrespondierenden Tumorproben (1) Unterschiede zwischen korrespondierenden Tumorzellen nachzuweisen, die Hinweise auf die intratumorale Heterogenität geben und (2) Unterschiede zwischen Tumorproben nach Lokalisation nachzuweisen, die Hinweise auf metastasenspezifische genetische Veränderungen geben. Damit soll nachgewiesen werden, dass sich bereits früh in der Entwicklung des Pankreaskarzinoms Metastasen bilden, die sich unabhängig von dem Primärtumor entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1. Klinische Fälle

Für diese Studie wurden alle Patienten aus der Tumordatenbank der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchsucht. Selektiert wurden Patienten, die in kurativer Absicht zwischen 2002 und 2009 an einem histologisch gesicherten duktalem Adenokarzinom des Pankreas operiert wurden. Die lokale Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität votierte die Untersuchung von Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Tumorproben positiv (Votum No.: 3821).

Einschlusskriterien für diese retrospektive Untersuchung waren:

- Mikroskopisch bestätigtes duktales Adenokarzinom des Pankreas mit Metastasen in mehr als einem Lymphknoten (UICC-Stadium IIb)
- Operative Resektion des Pankreas in kurativer Absicht (bspw. als Whipple-Operation sowie Pylorus-erhaltende Pankreatikoduodenektomie)

Ausschlusskriterien waren:

- Maligne Erkrankungen in der Vorgeschichte des Patienten
- Andersartige Pankreastumore
- Neoadjuvante Radio- oder Chemotherapie
- Sehr kleine Lymphknotenmetastasen (<0,3 cm)

Die Resezierbarkeit des Primärtumors wurde in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt, sodass auch unvollständig resezierte Tumore eingeschlossen wurden (R1-Resektion). Insgesamt konnten so 52 Patienten in die vorliegende Studie eingeschlossen werden. Da die Qualität des FFPE-Materials sehr heterogen ist, wurde eine makroskopische Qualitätskontrolle durchgeführt. Hiernach wurden 18 Patienten selektiert, von denen FFPE-Material der Primärtumore (PT) vorlag. In 16 Fällen war der Tumor im Pankreaskopf lokalisiert, ein Tumor reichte vom Pankreaskopf in den –korpus, ein Tumor schloss den Pankreasschwanz ein. Der Pankreasschwanztumor wurde mittels Resektion des distalen Pankreas, der Milz und des Colon transversum mit linker

Colonflexur behandelt. Zehn Patienten unterzogen sich einer Whipple-Operation (Pankreatikoduodenektomie), sieben Patienten wurden mittels Pylorus erhaltender Pankreatikoduodenektomie behandelt. In allen Operationen wurde eine Lymphknotenresektion durchgeführt, hierbei konnten im Median 23 Lymphknoten reseziert werden (Spannweite: 12-55). In der pathologischen Aufarbeitung der Lymphknoten wurden Metastasen im Median in sieben der resezierten Lymphknoten gefunden (Spannweite: 3-41). Tumorfremie Resektionsränder des Primärtumors konnten in 11 Fällen nachgewiesen werden.

Neben den 18 Primärtumor-Proben wurden insgesamt 39 Lymphknotenmetastasen (LNM) für diese Studie analysiert. In vier Fällen wurden zudem intraoperativ Fernmetastasen (OM) in der Leber gefunden. Insgesamt standen so fünf Lebermetastasen für die weitere Analyse zur Verfügung.

Das mediane Alter der untersuchten Patienten betrug 64 Jahre (Spannweite: 44-81 Jahre) (siehe *Tabelle 1*).

2.2. DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion aus dem Probenmaterial wurden zunächst, jeweils abhängig von der Probengröße, 20-30 Schnitte mit einer Dicke von 10 µm von dem FFPE-Block angefertigt und auf einen Objektträger gebracht. Zur Fixierung der Schnitte auf dem Objektträger wurden diese zunächst für 20 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend zweimal für fünf Minuten in Xylol gegeben. Danach wurden sie für jeweils 30 Sekunden zuerst in eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 95 %, 70 %) und dann in deionisiertes Wasser gegeben. Zuletzt verblieben die Proben dann für mindestens 30 Sekunden in einer 3 prozentigen Glycerinlösung. Der jeweils erste und letzte Schnitt wurde mit einer Dicke von 5 µm angefertigt, mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt und das geplante Resektionsareal mit Tumorzellen unter dem Mikroskop markiert (siehe *Abbildung 1A-C*). Das jeweilige Areal wurde danach von einem Pathologen überprüft (Prof. S. E. Baldus, Institut für Pathologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf). Zur Gewinnung von Referenz-DNA jeweils desselben Patienten wurden gesunde Lymphknoten mikroskopisch aufgesucht, markiert und ebenfalls von demselben Pathologen bestätigt (siehe *Abbildung 1D*). Die Präparation der Objektträger erfolgte analog zu der Präparation der

Tumorproben. Somit konnten falsch-positive Ergebnisse in den folgenden Untersuchungen durch Copy Number Variations (CNV) in nicht-pathologischen Arealen vermieden werden.

TABELLE 1: Klinische und pathologische Daten (TNM-Klassifikation, Grading, Resektionsstatus, UICC-Stadium) der eingeschlossenen Patienten

Patient (ID)	Geschlecht	Alter bei OP	LNM* (Nr.)	LN ** gesamt (Nr.)	OM*** (Nr.)	T	N	M	Grad.	R	Stadium	Lokalisation	Operation
2	w	54	10	18	1	4	1	1	2	0	IV	Pankreaskopf	Whipple-Operation
8	m	62	30	37	1	3	1	1	3	0	IV	Pankreaskopf	Whipple-Operation
19	w	76	7	35	0	3	1	0	3	0	IIb	Pankreaskopf	Whipple-Operation
24	m	44	7	19	1	3	1	1	3	1	IV	Pankreaskopf	PPPD ^I
28	w	65	3	39	1	3	1	1	3	0	IV	Pankreaskopf	PPPD ^I
33	w	67	6	27	1	3	1	1	3	1	IV	Pankreaskopf	PPPD ^I
41	m	66	7	22	0	3	1	0	2	0	IIb	Pankreaskopf	Whipple-Operation
42	w	75	3	23	0	3	1	0	3	0	IIb	Pankreaskopf und -korpus	Whipple-Operation
44	m	55	8	16	0	3	1	0	3	0	IIb	Pankreaskopf	PPPD ^I
45	m	62	41	55	1	3	1	1	2	1	IV	Pankreaskopf	Whipple-Operation
47	w	81	7	12	0	3	1	0	3	1	IIb	Pankreaskopf	Whipple-Operation
48	m	64	9	32	0	4	1	0	3	1	III	Pankreaskopf	PPPD ^I
49	m	79	17	50	1	3	1	1	3	1	IV	Pankreaskopf	Whipple-Operation
50	m	47	4	22	1	3	1	1	3	1	IV	Pankreaskopf	PPPD ^I
51	m	59	4	24	1	3	1	0	3	0	IV	Pankreaskopf	PPPD ^I
52	m	61	8	12	0	3	1	0	3	0	IIb	Pankreaskopf	Whipple-Operation
53	w	61	3	36	1	3	1	1	2	0	IV	Pankreasschwanz	Distale Pankreatektomie
54	m	72	5	23	0	3	1	0	3	0	IIb	Pankreaskopf	Whipple-Operation
*	LNM: Lymphknotenmetastasen												
**	LN: Lymphknoten												
***	OM: Fernmetastasen												
I	PPPD: Pylorus-erhaltende Pankreatikoduodenektomie												

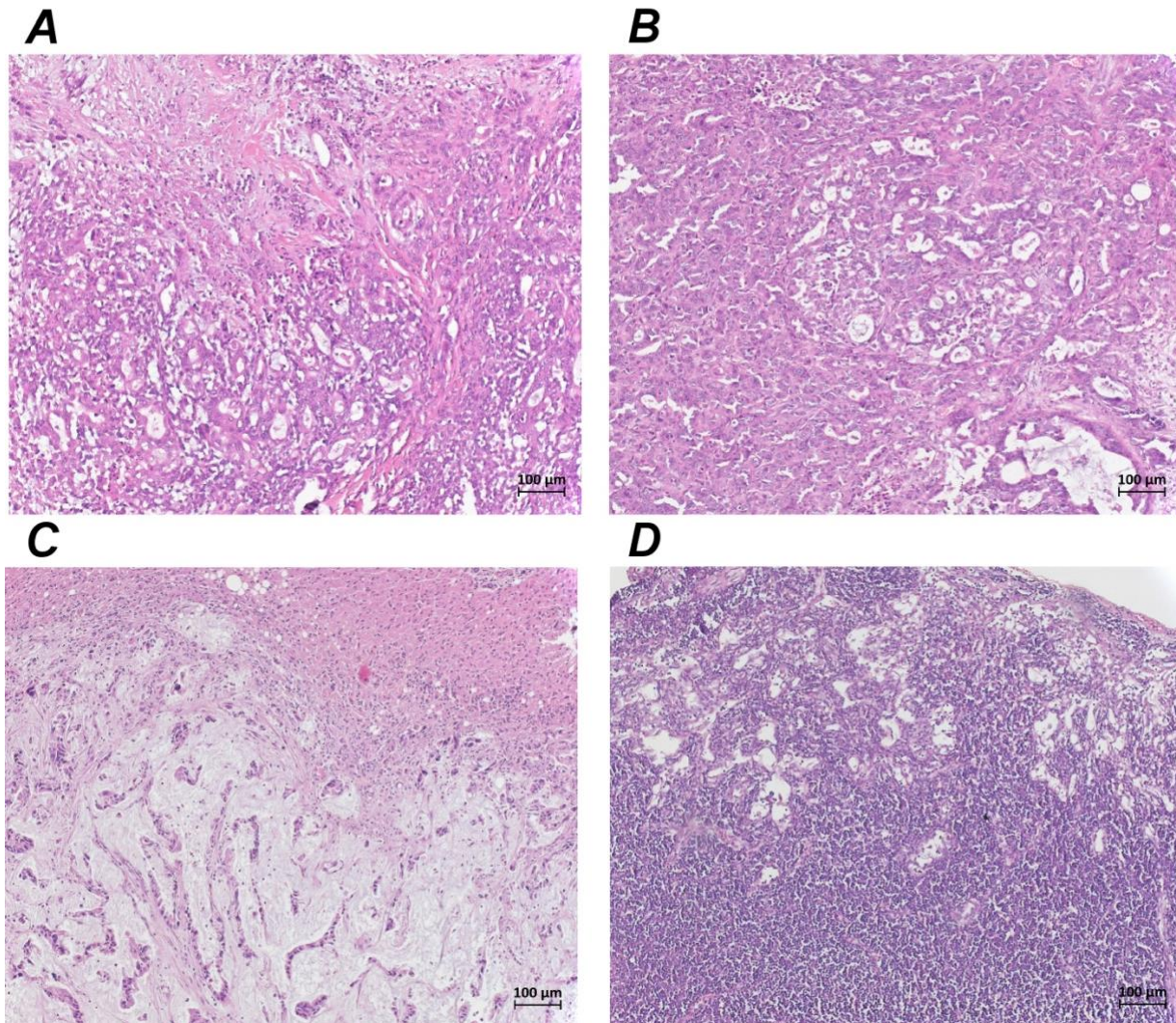


ABBILDUNG 1: H&E-gefärbte Proben eines Pankreaskarzinoms. **(A):** Schnitte einer Primärtumor-Probe (*Fall 33*) **(B):** Schnitte einer Lymphknotenmetastasen-Probe (*Fall 33*) **(C):** Schnitte einer Fernmetastasen-Probe (Lunge) (*Fall 33*) **(D):** Schnitte eines Referenz-Lymphknotens (nicht tumorbefallen) (*Fall 33*)

Entsprechend der Markierung wurde dann das Tumormaterial unter dem Mikroskop mit einer Kanüle von den Objektträgern gekratzt.

Die DNA wurde mit Hilfe des Qiagen DNA FFPE Tissue Kits (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert (siehe auch <http://www.qiagen.com>). Hierfür wurde zunächst das gekratzte FFPE-Material in ein 2 ml Reaktionsgefäß verbracht und 1 ml Xylol hinzugefügt. Anschließend wurde

das Gemisch für 10 Sekunden ausführlich mit dem Vortexmischer vermischt. Das Xylol dient der Lösung der Proben aus dem Paraffin. Hiernach wurden die Proben mit 14.000 g für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig mit der Pipette entfernt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, das am Boden befindliche Pellet intakt zu belassen. Dem verbliebenen Pellet wurde dann 1 ml 100 prozentiger Äthylalkohol hinzugefügt und dies erneut für 10 Sekunden mit dem Vortexmischer vermischt. Der Äthylalkohol diente zur sicheren Entfernung von verbliebenem Xylol. Nach Hinzufügen des Alkohols wurde die Probe erneut mit 14.000 g für 2 Minuten zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand mit der Pipette entfernt. Um sicherzustellen, dass der Alkohol dann in Gänze entfernt ist wurde die Probe für 10 Minuten bei 37 °C im Inkubatorschrank mit offenem Deckel inkubiert.

Das so verbliebene getrocknete Pellet wurde dann in 180 µl ATL-Puffer des Qiagen-Kits resuspendiert. Hierzu wurden 20 µl Proteinase K hinzugefügt und auf dem Vortexmixer für 10 Sekunden vermischt. Um eine komplette Lyse der Probe zu erreichen, wurde die Probe dann für mindestens eine Stunde bei 56 °C inkubiert. Dieser Inkubationsschritt dient zur optimalen Wirkung der Proteinase K. Die Probe wurde dann auf vollständige Lyse makroskopisch überprüft. Anschließend folgte ein weiterer Inkubationsschritt: Die Probe wurde für eine weitere Stunde bei 90 °C inkubiert. Hierdurch wird die Qualität der DNA verbessert, da durch die Formalineinbettung Qualitätseinbußen in der DNA verursacht werden⁹¹. Eine folgende, kurze Zentrifugation bringt Kondensstropfen von Wand und Deckel des Mikroreaktionsgefäßes zurück in die Lösung. Da für die folgenden Schritte eine RNA-freie DNA zu besseren Ergebnissen führt, wurde an dieser Stelle die Lösung zum ersten Mal mit 2 µl RNase A (RNase DNase free, Fa. Roche, USA) behandelt. Darauf wurden 400 µl einer zuvor angesetzten Suspension aus dem AL-Puffer des Qiagen-Kits und 100 prozentigem Äthylalkohol (in der Ratio 1:1) der Suspension zugefügt. Die Proben wurden dann erneut kurz zentrifugiert, um an Wand und Deckel befindliche Tropfen zurück in die Suspension zu bringen. Das so entstandene Lysat wurde dann zusammen mit dem Qiagen AW1-Puffer auf die Qiagen QIAamp MinElute-Säulen aufgebracht und für eine Minute bei 6000 g zentrifugiert. Zuvor wurden die MinElute-Säulen in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß gesteckt, indem der durchgeflossene Überstand gesammelt wurde. Dieser wurde anschließend verworfen und den MinElute-Säulen anschließend mit 500 µl AW2-Puffer hinzugefügt. Diese Suspension wurde erneut für eine Minute bei 6000 g zentrifugiert, der durchgeflossene Überstand in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß gesammelt und verworfen. Nachdem die MinElute-Säulen wiederum in leere

2 ml Reaktionsgefäße gestellt wurden, wurden diese für drei Minuten bei 14.000 g zentrifugiert, um sicher verbliebenen Alkohol aus den Säulen zu entfernen. Die Reaktionsgefäße wurden erneut verworfen und die MinElute-Säulen in neue 2 ml Reaktionsgefäße gestellt. Nach Hinzufügen von 50 µl Qiagen ATE-Puffer wurden die Säulen zunächst ca. eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann für eine Minute bei 14.000 g zentrifugiert. Die Integrität der DNA wurde auf einem 1,5 prozentigen Agarose-Gel überprüft und die DNA-Konzentration zuvor spektrometrisch untersucht (NanoDrop 2000, Fa. Thermo Scientific, USA).

2.3. Array-basierte komparative Genom-Hybridisierung

Die Array-basierte komparative Genom-Hybridisierung (aCGH) ist eine Weiterentwicklung der konventionellen komparativen Genom-Hybridisierung (CGH) und ermöglicht eine Untersuchung des ganzen Genoms auf numerische Alterationen⁸⁴. Hierbei werden insbesondere Amplifikationen oder Deletionen einzelner Regionen oder ganzer Gene einer Tumor-DNA im Vergleich zu einer Referenz-DNA angezeigt. Physiologische interindividuelle numerische Veränderungen des Genoms werden als ‚Copy Number Variations‘ (CNV), Veränderungen im Genom von Tumorzellen als ‚Copy Number Alterations‘ (CNA) bezeichnet. Im Gegensatz zu der konventionellen CGH werden bei der aCGH anstatt ganzer Chromosome Oligonukleotide auf einen Objektträger gedruckt und als Hybridisierungsbasis genommen. Die Verteilung der Oligonukleotide erfolgt mithilfe einer Datenbank, die nach einem empirischen Modell durch den Hersteller der Arrays erstellt wurde⁹². Für diese Untersuchung wurden 8x60k Mikroarrays (SurePrint G3 Human CGH 8x60k Mikroarray Kit) der Firma Agilent verwendet (Fa. Agilent Technologies, USA; siehe *Abbildung 2*). Die mediane Probengröße beträgt bei diesen Mikroarrays 41.448 Basenpaare (bp), sodass das Genom hochauflösend bis auf Gen-Ebene untersucht werden kann⁹². Jeder einzelne Punkt auf dem bedruckten Mikroarray wird als Feature bezeichnet.

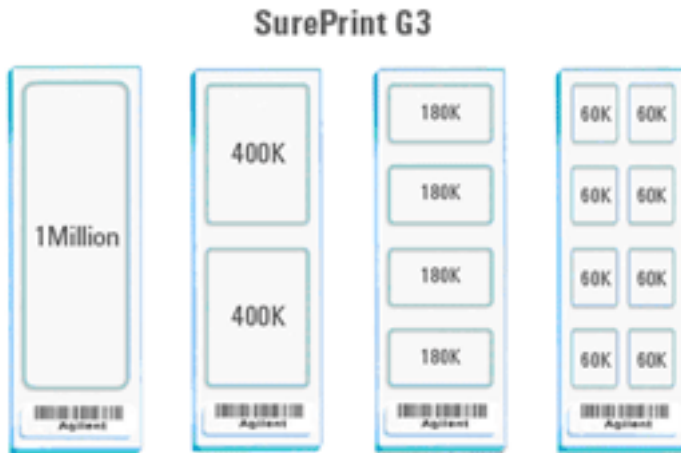


ABBILDUNG 2: Agilent aCGH Mikroarrays. Für die vorliegende Untersuchung wurden die rechts dargestellten 8x60k Arrays benutzt. (Quelle: <http://www.genomics.agilent.com>)

Die Markierung und Hybridisierung erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. Vor Anfertigung der aCGH wurde die extrahierte DNA nochmals mit RNase behandelt. Danach wurden die Proben nicht-enzymatisch markiert. Hierfür wurde das Universal Linkage System (ULS) von Kreatech (Fa. Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande) benutzt. Mit diesem System lassen sich zwei verschiedene DNA-Proben unterschiedlich farblich markieren, hierfür werden die Cyanin-Farbstoffe (Cy3 und Cy5) verwendet. Die Proben der Tumor-DNA wurden in dieser Studie mit ULS-Cy3, die Referenz-DNA mit ULS-Cy5 markiert. Da die benutzten FFPE-Proben bereits durch die Formalin-Fixierung fragmentiert wurden, war eine erneute Hitze-fragmentierung nicht erforderlich. Die zuvor gewonnene DNA wurde nun auf insgesamt 8 μ l pro Probe reduziert beziehungsweise verdünnt. Jede Probe wurde nun mit einem Gemisch aus DNase-freiem Wasser, ULS-Cy3 beziehungsweise ULS-Cy5 und der labeling-solution (insgesamt 2 μ l in der Ratio 0,75:0,25:1) versehen, sodass pro Probe nun ein Gemisch von insgesamt 10 μ l entstand. Nun wurden die Proben in einem Thermocycler zunächst bei 85 °C für 30 Minuten und dann bei 4 °C für 3 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert, um Tropfen von Wand und Deckel des Reaktionsgefäßes zu lösen. Nun wurde das nicht-reaktive ULS-Cy3 beziehungsweise ULS-Cy5 entfernt. Hierfür wurden die Agilent KREApure-Säulen benutzt. Zur Vorbereitung wurden diese zunächst mit dem Vortexmixer kurz re-suspendiert, danach zunächst für eine Minute bei 14.000 g für eine Minute zentrifugiert und nach Hinzugabe von 300 μ l Nuclease-freiem Wasser erneut für eine Minute bei 14.000 g zentrifugiert. Die vorbereiteten Säulen wurden nun in einen neuen 2,0 ml Reaktionsgefäß platziert, die 10 μ l gelabelt DNA hinzugefügt

und erneut für 1 Minute bei 14.000 g zentrifugiert. Die Effizienz des labelings wurde nun spektrophotometrisch getestet (NanoDrop 2000, Fa. Thermo Scientific, USA). Hierfür wurden 1,5 µl der Probe entnommen. Nach Kombination der gelabelten Tumorprobe mit der gelabelten Referenzprobe wurden die entstandenen 17 µl mittels Vakuumtrockner auf insgesamt 9 µl konzentriert.

Zur Vorbereitung der Hybridisierung auf den Objektträgern wurde nun ein Master-Mix hergestellt, der pro Probe aus 2 µl Cot-1 DNA, 0,5 µl Agilent 100x Blocking Agent und 22,5 µl Agilent 2x Hi-RPM Hybridization Puffer bestand. Nach Hinzufügen des Labeling Mix entstanden so 34 µl Hybridisierungsmix. Nach einer Inkubation der Proben für 3 Minuten bei 95 °C und dann für 30 Minuten bei 37 °C, einer kurzen Zentrifugation und dem Hinzufügen von 11 µl Agilent-CGHblock, wurde der finale Mix mit insgesamt 45 µl auf die Kammern des Agilent 8x Mikroarray aufgetragen, mit einem Deckglas versehen und in der Agilent SureHyb-Hybridisierungskammer verklemmt. Durch vorsichtiges vertikales Rotieren wurde die Mobilität des Arrays und die Mobilität des Hybridisierung-Mixes im Array sichergestellt. Die Hybridisierung fand für 40 Stunden bei 65 °C im Hybridisierungsofen statt. Nach Hybridisierung wurden die Mikroarrays in vorgewärmter Waschlösung abgewaschen und getrocknet. Die getrockneten Arrays wurden dann mit dem Agilent SureScan Mikroarray Scanner-System gescannt.

2.4. Datenanalyse

Nach dem Scannen wurden die Daten mit der Agilent Feature Extraction Software extrahiert (Fa. Agilent Technologies, USA). Hierfür wurde zunächst eine Qualitätskontrolle durchgeführt, die Daten normalisiert und schließlich als Log10-Ratios für jedes Feature extrahiert.

Vor der weiteren Untersuchung wurden die zuvor extrahierten Log10-Ratios in Log2-Ratios umgewandelt. Zudem wurde eine erneute Qualitätskontrolle durchgeführt, die mit ähnlichen Kriterien gearbeitet hat, wie das Feature Extraction-Tool von Agilent. Über- oder untersättigte Features wurden entfernt ($gIsSaturated=1$ oder $rIsSaturated=1$), ebenfalls wurden unplausible Features, die nicht ausreichend homogen waren, entfernt ($gIsFeatNonUnifOL=1$ oder $rIsFeatNonUnifOL=1$). Sollte das Signal-Rausch-Verhältnis unzureichend gewesen sein, wurde bereits durch das Feature Extraction-Tool von Agilent der $Log\ Ratio=0$ gesetzt. Diese Features wurden ebenfalls aus der Analyse ausgeschlossen. Die weitere bioinformatische Datenanalyse

erfolgte mit einer R-pipeline, die mit dem Bioconductor-Addon (<http://www.bioconductor.org>) und CRAN (<https://cran.r-project.org>) ausgestattet wurden^{93,94}. Für die Bruchpunktanalyse wurde der lawsglad-Algorithmus der GLAD-Funktion in R verwendet^{95,96}. Eine Zentrierung der Daten erfolgte bereits vor Einspeisen in unsere Pipeline, sodass der Parameter mediancenter=FALSE gesetzt wurde. Um falsch positive Signale zu vermeiden wurden nur Veränderungen gezählt, die von mindestens drei Oligonukleotiden abgedeckt wurden und eine minimale absolute Veränderung einer log2ratio von 0,2 zeigten. Darüber hinaus wurden die Standardparameter der GLAD-Funktion verwendet. Für eine Übersicht der Genomveränderungen wurden die Daten mit einer modifizierten Plot-Version des „aCGH“-Pakets der Bioconductor pipeline verwendet⁹⁴. Eine veränderte Region (amplifiziert oder deletiert), die gleichartig in zwei oder mehr Proben gefunden werden konnte, wurde als „shared“ klassifiziert. Sollte eine Region nur in einer Probe verändert gewesen sein (amplifiziert oder deletiert), wurde diese als „private“ klassifiziert.

Statistische Unterschiede in der Anzahl der CNA wurden mit nichtparametrischer Testung (Mann-Whitney-U-Test) detektiert. Ein P-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant definiert.

Eine Anreicherung spezifischer Veränderungen in Proben aus metastatischen Zellen wurde durch den Vergleich der CNA der Primärtumore, deren korrespondierender Lymphknotenmetastasen oder ggf. Fernmetastasen gefunden. Die Anreicherung wurde als statistisch signifikanter Unterschied in der Häufigkeit spezifischer CNA in den aCGH-Daten zweier korrespondierender Proben definiert. Signifikanz wurde mithilfe des exakten Tests nach Fisher über eine 3x2 Kontingenztafel (gain, loss, keine Veränderung in zwei Proben) erfasst. Signifikant veränderte Regionen (P-Wert=<0,05), die in >25% der Proben gefunden werden konnten, wurden mit dem Panther classification-system untersucht (<http://www.pantherdb.org>)⁹⁷.

Um die genetische Distanz zwischen zwei Proben zu quantifizieren, wurde die asymmetrische binäre Distanz zwischen allen Proben berechnet und in einer Matrix aufgezeichnet. Die binäre Distanz wird durch Division aller als „private“ klassifizierten Regionen durch alle segmentierten Regionen berechnet. Das Ergebnis ist eine dimensionslose Verhältniszahl zwischen 0,0 und 1,0. Ein höherer Wert deutet dabei auf eine höhere binäre Distanz hin, ein niedriger Wert entsprechend auf eine niedrigere binäre Distanz. Eine größere binäre Distanz lässt auf eine höhere Heterogenität zweier Proben schließen. Die sich hieraus ergebende Matrix der binären Distanzen zwischen den Proben wurde für die Berechnung der mittleren binären Distanz zwischen individuellen Gruppen benutzt. Unterschiede in der mittleren binären Distanz wurden erneut mit nichtparametrischer

Testung (Mann-Whitney-U-Test) auf statistische Signifikanz getestet. Im Folgenden wird neben der klassischen Definition der ITH als Ausmaß der Unterschiedlichkeit zwischen einzelnen Tumorzellen der Begriff der ITH auch für die Unterschiedlichkeit zwischen Aberrationsprofilen von Zellverbänden innerhalb eines Falles, wie sie bei der aCGH erfasst wird, verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Genetisch numerische Aberrationen von Primärtumoren und Metastasen

Die Übersicht der Aberrationsprofile zeigt Amplifikationen oder Deletionen der DNA aller Primärtumoren und Metastasen (siehe *Abbildung 3A*). Lediglich eine Probe (VR49) musste ausgeschlossen werden, da die vorhandenen Veränderungen weniger als drei Oligonukleotide umfassten. Diese Probe blieb entsprechend für die folgenden Datenanalysen unbeachtet.

Die größte Zahl CNA konnte in den Fernmetastasen gefunden werden (OM, n=5; Median CNA: 42, Spannweite: 1 - 124), gefolgt von Aberrationen in Lymphknotenmetastasen (LNM, n=39; Median CNA: 23, Spannweite: 1 - 104) und Primärtumoren (PT, n=18; Median CNA: 17, Spannweite: 0 - 66) (siehe *Abbildung 3B*).

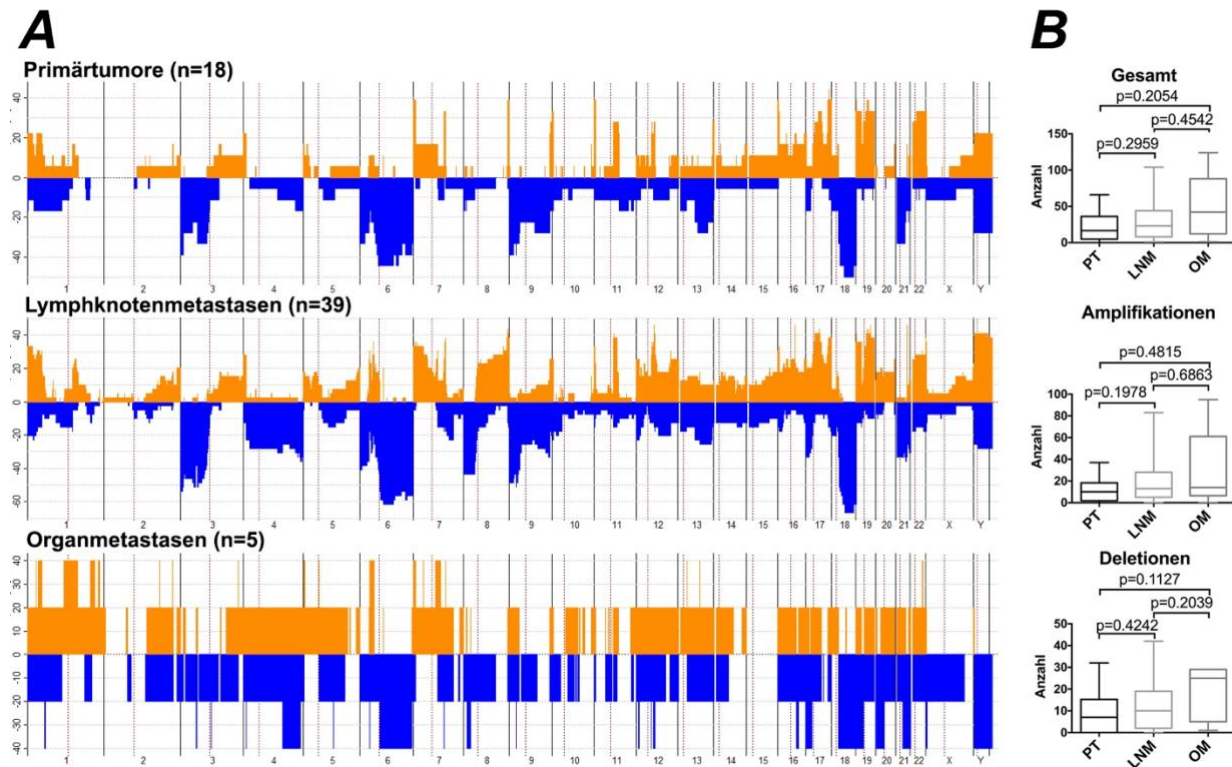
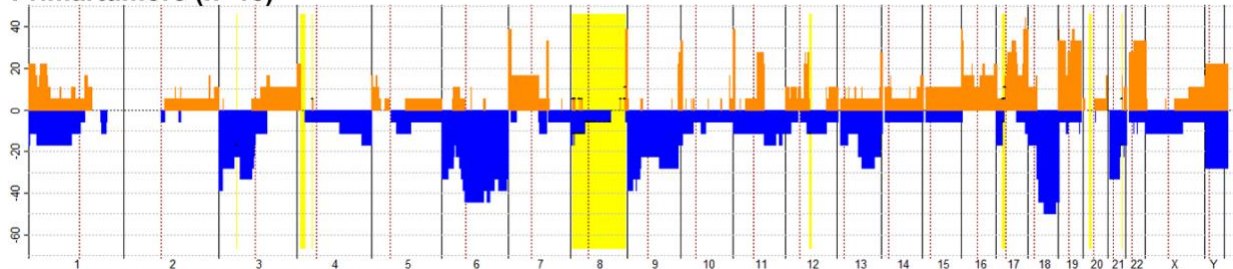


ABBILDUNG 3 (A): Die kumulative Darstellung der Kopienanzahl-Veränderung in dem sogenannten "Frequenz-Plot": Genomisch numerische Aberrationen werden je nach genomischer Lokalisation und nach Häufigkeit des Auftretens aufgetragen. **(B):** Anzahl der gesamten Aberrationen, Amplifikationen und Deletionen bei Primärtumoren (PT), Lymphknotenmetastasen (LNM) und Fernmetastasen (OM)¹.

Der Unterschied in der Zahl der CNA war jedoch nicht statistisch signifikant. In den Primärtumoren konnte eine Tendenz ($p=0,0709$) zu vermehrten genetischen Amplifikationen gefunden werden: Im Median zeigten sich 13 hinzugewonnene Regionen (Spannweite: 0 - 95) gegenüber im Median 9,5 deletierte Regionen (Spannweite: 0 - 42).

Die häufigsten bei den Primärtumoren amplifizierten Bereiche waren auf den Chromosomen 17q25.1 (44,4%), 7p22.3 (38,9%), 8q24.3 (38,9%), 11p15.5 (38,9%), 16p13.3 (38,9%), 17q24.3-q25.3 (38,9%), 19p13.3 (38,9%), 19q13.12-q13.2 (38,9%) lokalisiert. Die häufigsten deletierten Bereiche bei den Primärtumoren waren auf Chromosom 18q12.3-q22.3 (50%), 6p11.2-q13 (44,4%), 6q13-q22.31 (44,4%), 18q12.1-q12.3 (44,4%), 18q22.3-q23 (44,4%) lokalisiert.

Primärtumore (n=18)



Lymphknotenmetastasen (n=39)

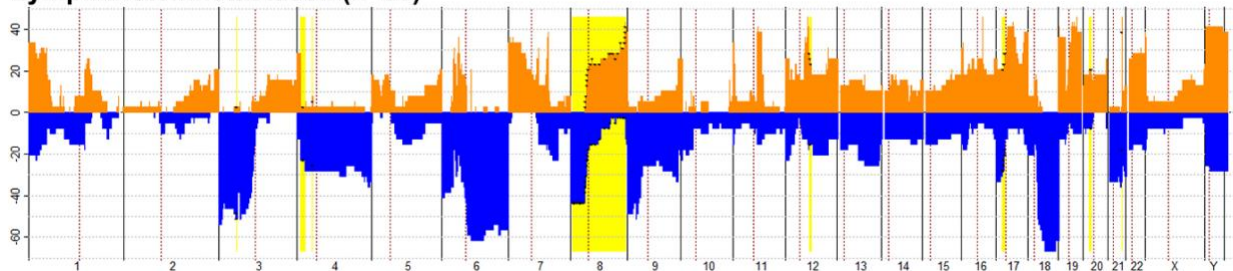


ABBILDUNG 4: Die kumulative Darstellung der Kopienanzahl-Veränderung in dem sogenannten "Frequenz-Plot". Dargestellt sind die kumulativen Veränderungen von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen. Signifikant unterschiedlich veränderte Alterationen sind gelb markiert¹.

Nachfolgend wurden die CNA aller Primärtumore, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen, die in mehr als 25% der Proben hinzugewonnen waren verglichen (siehe *Tabelle 2A-G*). Hierdurch sollten Hinweise auf genetische Veränderungen ermittelt werden, die für die Tumorentwicklung oder Metastasierung relevant sind. Bei dem Vergleich angereicherter amplifizierter Regionen zeigte sich, dass die Chromosomenbereiche 8q11.23-q24.3, 12q14.1, 17p12.1 und 21q22.12 in den Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu den Primärtumoren angereichert waren. Deletierte Regionen waren in den Lymphknotenmetastasen auf den Chromosomenbereichen 3p21.31, 4p14,

8p23.3-p11.21 und 17p12-11.2 angereichert (siehe *Abbildung 4*). In Fernmetastasen konnten Amplifikationen auf den Chromosomenbereichen 1q32.1-q42.2 und 5q11.1 sowie Deletionen auf 4q28.1-q32.3, 16q21, 17p11.2 und 20p13-q11.21 beobachtet werden, die nicht in den korrespondierenden Primärtumoren gefunden werden konnten. Der Vergleich von Deletionen und Amplifikationen zwischen verschiedenen Metastasen zeigte Deletionen der Chromosomenbereiche 3p26.1-25.3 und 18q21.1-23, die in den hier untersuchten Proben spezifisch für Lymphknotenmetastasen (im Vergleich zu Fernmetastasen) waren, Deletionen der Bereiche 1p13.1-12 und 1q32.1-q41 und Amplifikationen von 20p11.1-p11.21 waren hingegen exklusiv in den Fernmetastasen (im Vergleich zu Lymphknotenmetastasen) verändert.

Die Analyse beteiligter Signalwege mithilfe der Gen-Ontologie-Datenbank Panther zeigte insgesamt 38 Signalwege, die durch die angereicherten Amplifikationen in den Lymphknotenmetastasen verändert waren sowie 42 Signalwege, die durch angereicherte Deletionen in den Lymphknotenmetastasen verändert waren. Nach Selektion der Signalwege, die von mindestens zwei der angereicherten deletierten Gene beeinflusst wurden, zeigten sich die folgenden Signalwege betroffen: FGF-Signalweg, Apoptose-Signalweg, Angiogenese, p53-Signalweg, Wnt-Signalweg, und Gonadotropin releasing hormone receptor (GNRHR)-Signalweg. Durch mehr als zwei der angereicherten hinzugewonnenen Gene war nur der Wnt-Signalweg betroffen (siehe *Tabelle 3A-B*).

TABELLE 2(A): Zugewonnene Regionen, die in LNM gegenüber PT angereichert waren (prozentualer Anteil der veränderten Proben, Spannweite, und beteiligte Gene)¹.

Chromosom	Bande	Spannweite	Amplifikationen	Prozent der Amplifikationen	der p-Wert	Gene
8	q11.23 — q12.1	55351769.5-55937767.5	10	25.64	0.012	SOX17, RP1
8	q21.11 — q22.1	77900045-96891578	10	25.64	0.031	PXMP3, PKIA, FAM164A, IL7, STMN2, HEY1, MRPS28, TPD52, PC-1, ZBTB10, ZNF704, PAG1, FABP5, PMP2, FABP9, FABP12, IMPA1, SLC10A5, ZFAND1, CHMP4C, SNX16, RALYL, LRRCC1, E2F5, CA3, CA13, CA1, CA2, REXO1L1, PSKH2, ATP6V0D2, SLC7A13, FAM82B, CPNE3, CNGB3, CNBD1, DCAF4L2, MMP16, RIPK2, OSGIN2, NBN, DECR1, CALB1, TMEM64, NECAB1, TMEM55A, OTUD6B, LRRC69, SLC26A7, RUNX1T1, MTG8, FAM92A1, RBM12B, TMEM67, PDP1, CDH17, GEM, RAD54B, FSBP, ESRP1, DPY19L4, INTS8, CCNE2, TP53INP1, PLEKHF2
8	q22.1 — q22.2	96891578-101091408,5	11	28.21	0.025	GDF6, UQCRB, MTERFD1, PTDSS1, SDC2, PGCP, TSPYL5, MTDH, LYRIC, MATN2, RPL30, SNORA72, POP1, NIPAL2, KCNS2, STK3, OSR2, VPS13B, COX6C, RGS22
8	q22.2 — q22.3	101091408,5-102327670	11	28.21	0.02	RGS22, FBXO43, SPAG1, RNF19A, Dorfin, ANKRD46, SNX31, PABPC1, YWHAZ, ZNF706
8	q22.3 — q23.3	102327670-115205131	11	28.21	0.015	FKSG17, GRHL2, RRM2B, p53R2, UBR5, ODF1, KLF10, AZIN1, ATP6V1C1, BAALC, FZD6, Hfz6, CTHRC1, SLC25A32, DCAF13, WDSOF1, RIMS2, TM7SF4, DPYS, LRP12, ZFPM2, OXR1, ABRA, ANGPT1, RSPO2, EIF3E, EIF3S6, TTC35, TMEM74, TRHR, NUDCD1, ENY2, PKHD1L1, EBAG9, RCAS1, GOLSYN, AX748380, KCNV1, CSMD3
8	q23.3	115205131-116107960	10	25.64	0.017	
8	q23.3 — q24.21	116107960-127984152	11	28.21	0.015	EIF3H, UTP23, RAD21, SLC30A8, MED30, EXT1, SAMD12, TNFRSF11B, COLEC10, MAL2, NOV, ENPP2, TAF2, DSCC1, DEPDC6, COL14A1, MRPL13, MTBP, SNTB1, HAS2, HAS2AS, ZHX2, DERL1, WDR67, FAM83A, HCCC11, ZHX1, ATAD2, WDYHV1, FBXO32, KLHL38, ANXA13, FAM91A1, FER1L6, TMEM65, TRMT12, RNF139, TATDN1, NDUFB9, MTSS1, ZNF572, NSMCE2, TRIB1, FAM84B
8	q24.21	128113227.5-128440461.5	13	33.33	0.029	POU5F1P1

Chromosom	Bande	Spannweite	Amplifikationen	Prozent der Amplifikationen	p-Wert	Gene
8	q24.21 — q24.23	128593489,5-139124113,5	12	30.77	0.007	MYC, TMEM75, CCDC26, GSDMC, FAM49B, ASAP1, DDEFIIT1, ADCY8, EFR3A, OC90, HHLA1, KCNQ3, HPRG1, LRRC6, TMEM71, PHF20L1, TG, SLA, WISP1, NDRG1, Cap43, TARG1, ST3GAL1, ZFAT, KIAA1485, ZFATAS, KHDRBS3
8	q24.23	139314964,5-139359304,5	13	33.33	0.029	FAM135B
8	q24.23	139359304,5-139783966	14	35.90	0.029	FAM135B
8	q24.23 — q24.3	139783966-140362716,5	15	38.46	0.014	COL22A1
8	q21.11 — q22.1	77900045-96891578	10	25.64	0.031	PXMP3, PKIA, FAM164A, IL7, STMN2, HEY1, MRPS28, TPD52, PC-1, ZBTB10, ZNF704, PAG1, FABP5, PMP2, FABP9, FABP12, IMPA1, SLC10A5, ZFAND1, CHMP4C, SNX16, RALYL, LRRCC1, E2F5, CA3, CA13, CA1, CA2, REXO1L1, PSKH2, ATP6V0D2, SLC7A13, FAM82B, CPNE3, CNGB3, CNBD1, DCAF4L2, MMP16, RIPK2, OSGIN2, NBN, DECR1, CALB1, TMEM64, NECAB1, TMEM55A, OTUD6B, LRRC69, SLC26A7, RUNX1T1, MTG8, FAM92A1, RBM12B, TMEM67, PDP1, CDH17, GEM, RAD54B, FSBP, ESRP1, DPY19L4, INTS8, CCNE2, TP53INP1, PLEKHF2
8	q24.3	140362716,5-140529080	15	38.46	0.043	
8	q24.3	140529080-140734665,5	16	41.03	0.04	KCNK9
12	q14.1	60336177,5-60747303,5	11	28.21	0.015	
12	q14.1	60747303,5-62595734	10	25.64	0.037	FAM19A2
17	p11.2	21473804,5-21657791	11	28.21	0.004	
17	p11.2	21657791-21873657	11	28.21	0.014	FAM27L
17	p11.2	21873657-22006089,5	11	28.21	0.02	

TABELLE 2(B): *Deletierte Regionen, die in LNM gegenüber PT angereichert waren (prozentualer Anteil der veränderten Proben, Spannweite, und beteiligte Gene)¹.*

Chromosom	Bande	Spannweite	Amplifikationen	Prozent der Amplifikationen	p-Wert	Gene
3	p21.31	44404945-44614829,5	-20	51.28	0.024	ZFP
3	p21.31	44614829,5-44767114,5	-19	48.72	0.026	
3	p21.31	44767114,5-45851843	-20	51.28	0.024	KIAA1143, KIF15, TMEM42, TGM4, ZDHHC3, EXOSC7, CLEC3B, CDCP1, TMEM158, LARS2, LIMD1, SACM1L, SLC6A20
4	p14	39833222,5-39876120	-10	25.64	0.039	PDS5A
8	p23.2 — p23.1	5124853-8288690	-17	43.59	0.014	MCPH1, ANGPT2, AGPAT5, LPAAT-e, XKR5, DEFB1, DEFA5, DEFB109, DEFB103B, SPAG11B, DEFB104A, DEFB106A, DEFB105A, DEFB107B, FAM90A7, SPAG11A, HE2, DEFB103A, DEFB4, FAM66E, PRAGMIN
8	p23.1	9225833,5-11769424,5	-17	43.59	0.014	TNKS, MSRA, UNQ9391, RP1L1, SOX7, PINX1, XKR6, MTMR9, AMAC1L2, TDH, FAM167A, BLK, GATA4, NEIL2, FDFT1, CTSS
8	p23.1 — p21.3	11769424,5-21892674	-17	43.59	0.018	DEFB136, DEFB135, DEFB134, DEFB130, ZNF705D, FAM66D, USP17L2, FAM86B1, FAM86B2, FAM66A, DEFB109, LONRF1, DLC1, TUSC3, HRF2, MSR1, SR-A, FGF20, EFHA2, ZDHHC2, CNOT7, VPS37A, MTMR7, SLC7A2, PDGFRL, MTUS1, FGL1, LFIRE1, PCM1, ASAH1, NAT1, NAT2, PSD3, SH2D4A, ChGn, CSGALNACT1, INTS10, LPL, SLC18A1, LZTS1, GFRA2, DOK2, XPO7, NPM2
8	p21.3	21892674-22107335	-17	43.59	0.014	NPM2, FGF17, EPB49, FAM160B2, NUDT18, HR, hairless, REEP4, LGI3, SFTPC, BMP1, PHYHIP, POLR3D
8	p21.3 — p21.2	22107335-26606169	-17	43.59	0.018	PIWIL2, SLC39A14, PPP3CC, SORBS3, PDLIM2, BIN3, FLJ14107, EGR3, PEBP4, RHOBTB2, TNFRSF10B, MGC31957, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF10A, CHMP7, R3HCC1, LOXL2, ENTPD4, HT015, NKX3-1, NKX3A, NKX2-6, STC1, ADAM28, ADAMDEC1,

Chromosom	Bande	Spannweite	Amplifikationen	Prozent der Amplifikationen	p-Wert	Gene
						ADAM7, NEFM, NEFL, DOCK5, PPP2R2A, GNRH1, KCTD9, CDCA2, EBF2, NIX, BNIP3L, PNMA2, DPYSL2, ADRA1A
8	p21.2 — p12	26606169-30678565	-17	43.59	0.014	ADRA1A, RB3, STMN4, TRIM35, PTK2B, CHRNA2, EPHX2, CLU, SCARA3, CCDC25, ESCO2, PBK, SCARA5, ELP3, PNOC, ZNF395, FBXO16, FZD3, INTS9, RC74, HMBOX1, KIF13B, DUSP4, TMEM66, foap-7, MBOAT4, DCTN6, RBPMS, GTF2E2, GSR, UBXN8
8	p12	30678565-35597435	-17	43.59	0.018	TEX15, PURG, WRN, NRG1, FUT10, MAK16, RNF122, DUSP26, UNC5D
8	p11.23	36943201-37611965,5	-15	38.46	0.011	ZNF703, ERLIN2
8	p11.23	37611965,5-37936139	-14	35.90	0.029	PROSC, BRF2, RAB11FIP1, GOT1L1, ADRB3, EIF4EBP1
8	p11.23	37936139-37982498,5	-13	33.33	0.027	ASH2L
8	p11.23 — p11.21	37982498,5-41143422	-12	30.77	0.041	LSM1, CaSm, BAG4, DDHD2, PPAPDC1B, WHSC1L1, LETM2, FGFR1, MST123, RNF5, TACC1, PLEKHA2, HTRA4, TM2D2, ADAM9, ADAM32, tMDC II, tMDC, ADAM18, ADAM2, INDO, IDO2, INDOL1, ZMAT4, SFRP1
8	p11.21	41938473-41994239	-10	25.64	0.039	
17	p12 — p11.2	14870853,5-18646233	-11	28.21	0.025	TEKT3, CDRT4, FAM18B2, CDRT1, TRIM16, ZNF286A, TBC1D26, ADORA2B, ZSWIM7, TTC19, NCOR1, PIGL, UBB, TRPV2, VRL, SNORD49B, SNORD49A, SNORD65, ZNF287, ZNF624, CCDC144A, FAM106A, TACI, MPRIP, PLD6, BHD, FLCN, COPS3, SGN3, NT5M, MED9, RASD1, RAI1, SMCR5, SREBF1, TOM1L2, LRRC48, ATPAF2, DRG2, MYO15A, ALKBH5, LLGL1, FLII, SMCR7, TOP3A, SMCR8, SHMT1, EVPLL, LGALS9C, t1132, CCDC144B, TBC1D28, ZNF286B, FKHRL1P2, TRIM16L
17	p11.2	18646233-18846105,5	-10	25.64	0.004	FBXW10, FAM18B, PRPSAP2

TABELLE 2(C): Zugewonnene Regionen, die in OM gegenüber PT angereichert waren (prozentualer Anteil der veränderten Proben, Spannweite, und beteiligte Gene)¹.

Chromosom	Bande	Spannweite	Amplifikationen	Prozent der Amplifikationen	p-Wert	Gene
1	q32.1 — q32.2	200835836-207247629,5	2	40	0.006	GPR25, KIF21B, CACNA1S, TMEM9, IGFN1, PKP1, TNNT2, HNTN1, LAD1, TNNI1, PHLDA3, CSRP1, RPS10P7, NAV1, IPO9, SHISA4, LMOD1, TIMM17A, RNPEP, ELF3, GPR37L1, ARL8A, PTPN7, PTPRV, LGR6, PPP1R12B, SYT2, KDM5B, RABIF, KLHL12, ADIPOR1, PAQR1, CYB5R1, B5R.1, TMEM183B, TMEM183A, PPFIA4, ADORA1, A1, FMOD, MYBPH, CHI3L1, CHIT1, BTG2, OPTC, ATP2B4, U42379, SNORA77, LAX1, ZC3H11A, SNRPE, SOX13, ETNK2, KISS1, GOLT1A, PLEKHA6, PPP1R15B, PIK3C2B, MDM4, MDMX, LRRN2, NFASC, CNTN2, TMEM81, RBBP5, DSTYK, TMCC2, NUAKE2, KLHDC8A, LEMD1, PCTK3, MFSD4, SLC45A3, RAB7L1, SLC41A1, PM20D1, SLC26A9, FAM72A, AVPR1B, CTSE, NRG2, SRGAP2, IKBKE, RASSF5, LGTN, HCA56, DYRK3, RED, IL10, IL19, IL20, IL24, FAIM3, TOSO, PIGR, FCAMR, YOD1, PFKFB2
1	q32.2 — q41	207247629.5-214785617.5	2	40	0.04	C4BPB, CD55, DAF, CR2, CR1, CR1L, CD46, CD34, PLXNA2, CAMK1G, LAMB3, HSD11B1, TRAF3IP3, IRF6, SYT14, SERTAD4, HHAT, KCNH1, PX19, RCOR3, TRAF5, RD3, SLC30A1, NEK2, INTS7, DTL, PPP2R5A, SNORA16B, TMEM206, NENF, WA1, ATF3, FAM71A, BATF3, NSL1, TATDN3, LQK1, VASH2, ANGEL2, RPS6KC1, RPK118, PROX1, SMYD2, PTPN14, CENPF, FAM108A6
1	q42.12 — q42.2	225992013.5-231340035.5	2	40	0.04	EPHX1, TMEM63A, LEFTY1, P5CR2, PYCR2, LEFTY2, H3F3B, ACBD3, MIXL1, LIN9, PARP1, ITPKB, PSEN2, CABC1, CDC42BPA, ZNF678, JMJD4, SNAP47, PRSS38, WNT9A, ARF1, MRPL55, GUK1, GJC2, OBSCN, TRIM11, TRIM17, HIST3H3, HIST3H2A, HIST3H2BB, RNF187, RHOA, RAB4A, SPHAR, NUP133, ABCB10, TAF5L, URB2, GALNT2, PGBD5, COG2, AGT, CAPN9, TTC13, ARV1, FAM89A, TRIM67

Chromosom	Bande	Spannweite	Amplifikationen	Prozent der Amplifikationen	p-Wert	Gene
5	q11.1	50638150.5-50689187.5	2	40	0.04	CR604031, ISL1

TABELLE 2(D): Deletierte Regionen, die in OM gegenüber PT angereichert waren (prozentualer Anteil der veränderten Proben, Spannweite, und beteiligte Gene)¹.

Chromosom	Bande	Spannweite	Amplifikationen	Prozent der Amplifikationen	p-Wert	Gene
4	q28.1 — q32.3	126323705-167698361	-2	40	0.048	FAT4, INTU, SLC25A31, HSPA4L, PLK4, MFSD8, LARP1B, PGRMC2, PHF17, SCLT1, PABPC4L, PCDH18, SLC7A11, CCRN4L, ELF2, NDUFC1, NARG1, RAB33B, SETD7, MGST2, MAML3, SCOC, CLGN, ELMOD2, UCP1, TBC1D9, RNF150, ZNF330, IL15, IL-15, INPP4B, USP38, GAB1, SMARCA5, GYPE, BC029578, GYPB, GYPA, HHIP, ANAPC10, ABCE1, OTUD4, SMAD1, MMAA, C4orf51, ZNF827, lsm6, SLC10A7, POU4F2, TTC29, EDNRA, ETA, TMEM184C, PRMT10, ARHGAP10, graf-2, NR3C2, MR, DCLK2, LRBA, MAB21L2, RPS3A, SNORD73A, SH3D19, FAM160A1, PET112, FBXW7, TMEM154, TIGD4, ARFIP1, FHDC1, TRIM2, ANX2P2, MND1, TLR2, TIL4, RNF175, SFRP2, DCHS2, PLRG1, FGB, FGA, FGG, LRAT, RBM46, MGC27016, MAP9, GUCY1A3, GUCY1B3, GC-S-beta-1, ACCN5, TDO2, CTSO, PDGFC, GLRB, GRIA2, GRIA4, TMEM144, RXFP1, LGR7, ETFDH, PPID, FNIP2, RAPGEF2, CR595965, FSTL5, NAF1, NPY1R, NPY5R, TKTL2, MARCH1, TRIM61, TRIM60, TRIM75, TMEM192, KLHL2, GK, SC4MOL, CPE, TLL1, SPOCK3, N-Tes
16	q21	58769135-65737157	-2	40	0.045	CDH8, CDH11

Chromosom	Bande	Spannweite	Amplifikationen	Prozent der Amplifikationen	p-Wert	Gene
17	p11.2	18646233-19629716	-2	40	0.021	FBXW10, FAM18B, PRPSAP2, SLC5A10, FAM83G, GRAP, EPN2, B9D1, MAPK7, MFAP4, RNF112, SLC47A1, SNORA59B, ALDH3A2, SLC47A2
20	p13	60761-4413347,5	-2	40	0.021	DEFB125, DEFB126, DEFB127, DEFB128, DEFB129, DEFB132, ZCCHC3, SOX12, NRSN2, TRIB3, RBCK1, TBC1D20, CSNK2A1, TCF15, SRXN1, SCRT2, FAM110A, F10, ANGPT4, RSPO4, PSMF1, RAD21L1, SDCBP2, SITAC18, FKBP12-Exip2, NSFL1C, SIRPB2, SIRPD, SIRPB1, SIRPG, PDYN, STK35, TGM3, TGM6, SNRPB, SNORD119, ZNF343, TMC2, NOP56, SNORD110, SNORA51, SNORD86, SNORD56, SNORD57, IDH3B, CPXM1, FAM113A, VPS16, PTPRA, GNRH2, MRPS26, OXT, AVP, FASTKD5, ProSAPiP1, DDRGK1, ITPA, SLC4A11, ATRN, GFRA4, ADAM33, SIGLEC1, HSPA12B, SPEF1, CENPB, CDC25B, MAVS, VISA, PANK2, RNF24, SMOX, ADRA1D
20	p13	4413347.5-4669522.5	-2	40	0.04	
20	p13 — p12.1	4669522.5-17444991.5	-2	40	0.04	PRNP, PRND, M8, RASSF2, SLC23A2, PCNA, CDS2, PROKR2, RP5-1022P6.2, CHGB, TRMT6, MCM8, CRLS1, LRRN4, FERMT1, DTGCU2, BMP2, HAO1, TMX4, PLCB1, PLCB4, PAK7, ANKRD5, SNAP25, MKKS, JAG1, BTBD3, SPTLC3, ISM1, TASP1, ESF1, SEL1L2, MACROD2, FLRT3, KIF16B, SNRPB2, OTOR, PCSK2
20	p12.1 — p11.1-q11.21	17444991.5-28038135.5	-2	40	0.006	PCSK2, BFSP1, DSTN, RRBP1, BANF2, SNX5, SNORD17, OVOL2, CSRP2BP, ZNF133, POLR3F, SEC23B, DTD1, HSPC072, SLC24A3, RIN2, NAT5, CRNKL1, INSM1, RALGAPA2, PLK1S1, XRN2, NKX2-4, NKX2-2, PAX1, FOXA2, SSTR4, THBD, CD93, AX747171, NXT1, GZF1, NAPB, CSTL1, CST11, CST8, CSTT, CST9L, CST9, CST3, CST4, CST1, CST2, CST5, GGTL1, TMEM90B, CST7, ACSS1, VSX1, ENTPD6, CD39L2, PYGB, ABHD12, GINS1, NINL, NANP, ZNF337, FAM182B, FAM182A

TABELLE 2(E): *Deletierte Regionen, die in LNM gegenüber OM angereichert waren (prozentualer Anteil der veränderten Proben, Spannweite, und beteiligte Gene)¹. **

Chromosom	Bande	Spannweite	Amplifikationen	Prozent der Amplifikationen	p-Wert	Gene
3	p26.1 — p25.3	8299114-9306948,5	-19	48.72	0.013	LMCD1, CAV3, OXTR, RAD18, SRGAP3
3	p25.3	9306948,5-10507498,5	-18	46.15	0.022	THUMPD3, SETD5, LHFPL4, MTMR14, CPNE9, BRPF1, OGG1, CAMK1, TADA3, ARPC4, ARC20, TTLL3, RPUSD3, CIDEA, CICE, IL17RE, IL17RC, CRELD1, PRRT3, TMEM111, FANCD2, VHL, IRAK2, TATDN2, GHRL, GHRLOS, SEC13, ATP2B2
3	p25.3	10507498,5-10893953	-17	43.59	0.044	ATP2B2, SLC6A11
3	p25.3 — p25.1	11298486-15559523,5	-17	43.59	0.022	HRH1, ATG7, VGLL4, SYN2, TIMP4, PPARG, TSEN2, MKRN2, RAF1, TMEM40, CAND2, RPL32, IQSEC1, NUP210, HDAC11, FBLN2, TPRXL, CHCHD4, TMEM43, XPC, SLC6A6, GRIP2, FGD5, NR2C2, MRPS25, ZFYVE20, DIVA, CAPN7, SH3BP5, METTL6, EAF1, COLQ
18	q21.1	43880883-46590878,5	-26	66.67	0.02	RNF165, LOXHD1, ST8SIA5, PIAS2, TCEB3CL, TCEB3C, TCEB3B, HDHD2, IER3IP1, SMAD2, ZBTB7C, SMAD7, DYM
18	q23	77049870-78029687	-24	61.54	0.041	ATP9B, NFATC1, CTDP1, KCNG2, PQLC1, HSBP1L1, TXNL4A, ADNP2, PARD6G

* Signifikant veränderte Amplifikationen in LNM gegenüber OM konnten nicht nachgewiesen werden.

TABELLE 2(F): Zugewonnene Regionen, die in OM gegenüber LNM angereichert waren (prozentualer Anteil der veränderten Proben, Spannweite, und beteiligte Gene)¹.

Chromosom	Bande	Spannweite	Amplifikationen	Prozent der Amplifikationen	p-Wert	Gene
1	p13.1 — p12	117370979.5-118497708.5	2	40	0.012	IGSF2, TTF2, TRIM45, VTCN1, MAN1A2, FAM46C, GDAP2, WDR3, SPAG17
1	p12	118497708.5-119959378.5	2	40	0.044	WDR3, SPAG17, WARS2, AK125759, BC063600, BC043601, HSD3B2
1	q32.1 — q32.2	200835836-207247629,5	2	40	0.006	GPR25, C1orf106, C1orf81, KIF21B, KIAA0449, BC016656, CACNA1S, TMEM9, IGFN1, PKP1, TNNT2, HNTN1, AK055533, LAD1, TNNI1, PHLDA3, CSRP1, AK055590, RPS10P7, AX747377, NAV1, IPO9, SHISA4, LMOD1, TIMM17A, RNPEP, ELF3, GPR37L1, ARL8A, PTPN7, PTPRV, LGR6, VTS20631, PPP1R12B, SYT2, KDM5B, LOC641515, AX721218, BC049825, LOC148709, RABIF, KLHL12, ADIPOR1, PAQR1, CYB5R1, B5R.1, TMEM183B, TMEM183A, C1orf37, CR591805, PPFIA4, KIAA0897, ADORA1, A1, FMOD, MYBPH, CHI3L1, AK095458, BC034684, FLJ00314, CHIT1, AK309664, AK024293, BTG2, OPTC, ATP2B4, U42379, SNORA77, LAX1, ZC3H11A, SNRPE, C1orf157, SOX13, ETNK2, HMFT1716, BC038769, KISS1, GOLT1A, PLEKHA6, KIAA0969, LOC127841, PPP1R15B, PIK3C2B, PIK3C2B variant protein, MDM4, MDMX, LRRN2, NFASC, KIAA0756, AX746920, CNTN2, TMEM81, RBBP5, DSTYK, TMCC2, NUA2, KLHDC8A, AX746481, LEMD1, LEMP1(a), DM004220, AK095633, PCTK3, LOC284578, MFSD4, DKFZp761N1114, AF321617, SLC45A3, DKFZp666D0110, RAB7L1, SLC41A1, AX748016, PM20D1, AK055746, SLC26A9, FAM72A, AVPR1B, C1orf186, CTSE, CatE, NRG2, SRGAP2, IKBKE, RASSF5, LGTN, HCA56, DYRK3, RED, IL10, IL19, IL20, IL24, FAIM3, TOSO, PIGR, FCAMR, C1orf116, pfkfb2, YOD1, PFKFB2
1	q32.2 — q32.3	207247629,5-212012050	2	40	0.015	pfkfb2, PFKFB2, C4BPB, AX229788, CD55, DAF, CR2, CR1, CR1L, CD46, EU154352, EU154351, LOC148696, AK123177, CD34, PLXNA2, LOC642587, DM004461, CAMK1G, LAMB3, HSD11B1,

Chromosom	Bande	Spannweite	Amplifikationen	Prozent der Amplifikationen	p-Wert	Gene
						TRAF3IP3, C1orf74, IRF6, C1orf107, SYT14, sytXIV, C1orf133, SERTAD4, HHAT, KCNH1, PX19, RCOR3, KIAA1343, TRAF5, C1orf97, RD3, SLC30A1, CR605189, NEK2
1	q32.3	212012050-212331984	2	40	0.021	INTS7, DKFZp434B168, DTL, BC010168
1	q32.3 — q41	212331984-214785617,5	2	40	0.011	PPP2R5A, SNORA16B, TMEM206, NENF, WA1, CR624623, ATF3, FAM71A, BATF3, NSL1, TATDN3, C1orf227, LQK1, VASH2, FLJ12505, ANGEL2, RPS6KC1, RPK118, AK092251, PROX1, SMYD2, HSKM-B, PTPN14, LMAN2/AP3S1 fusion, CENPF, FAM108A6

TABELLE 2(G): *Deletierte Regionen, die in OM gegenüber LNM angereichert waren (prozentualer Anteil der veränderten Proben, Spannweite, und beteiligte Gene) ¹.*

Chromosom	Bande	Spannweite	Amplifikationen	Prozent der Amplifikationen	p-Wert	Gene
20	p11.21	23935427- 25436449	-2	40	0.05	GGTLC1, AK090900, TMEM90B, CST7, C20orf3, ACSS1, VSX1, LOC284798, AX747658, ENTPD6, CD39L2, PYGB, BC128043, ABHD12, GINS1, NINL
20	p11.21 — p11.1- q11.21	25436449- 28038135,5	-2	40	0.018	NINL, NANP, ZNF337, FAM182B, AL096727, BC052952, LOC100134868, FAM182A, C20orf191, BC036544

3.2. Vergleich genetisch numerischer Aberrationen von Primärtumoren und korrespondierender Metastasen

Da sich bereits bei der ersten Betrachtung der Profile unterschiedliche Veränderungen der Primärtumore und der korrespondierenden Metastasen zeigten, wurden die Proben auf Veränderungen untersucht, die in mehreren Proben vorhanden waren („shared“) sowie auf Veränderungen, die nur in einem Fall vorlagen („private“). Hieraus ergab sich die Heterogenität zwischen Tumorproben verschiedener Lokalisationen eines Falles, da viele gemeinsame Veränderungen ein eher homogenes Kollektiv widerspiegeln, während exklusive Veränderungen für ein heterogenes Kollektiv sprechen. Um das Ausmaß der Heterogenität zu quantifizieren, berechneten wir die binäre Distanz zwischen verschiedenen Lokalisationen (binäre Distanz zwischen den Primärtumoren und den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen sowie die binäre Distanz zwischen Lymphknotenmetastasen aller Fälle) wie oben beschrieben (siehe *Abbildung 5*). Hieraus ergibt sich eine Verhältniszahl, die ohne Maßeinheit angegeben wird. Die mittlere binäre Distanz (auf einer dimensionslosen Skala von 0 bis 1, wobei 1 = keine gemeinsamen Veränderungen und 0 = alle Veränderungen gemeinsam bedeutet) zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen zeigte ein signifikant höheres Maß ($p=0,0128$) an Heterogenität (0,74; Spannweite 0,10 - 1,0) als zwischen verschiedenen Lymphknotenmetastasen über alle Fälle hinweg (0,87; Spannweite: 0,07 - 1,0). Die mittlere Heterogenität zwischen Lymphknotenmetastasen und korrespondierenden Fernmetastasen betrug 0,77 (Spannweite: 0,32 - 1,0). In Ergänzung zur allgemeinen Definition der intratumoralen Heterogenität wurde hier der Begriff intratumorale Heterogenität nicht nur für Heterogenität zwischen zwei einzelnen Tumorzellen sondern auch für die Unterschiedlichkeit zwischen dem gemeinsamen Aberrationsprofil mehrerer Zellen verwandt.

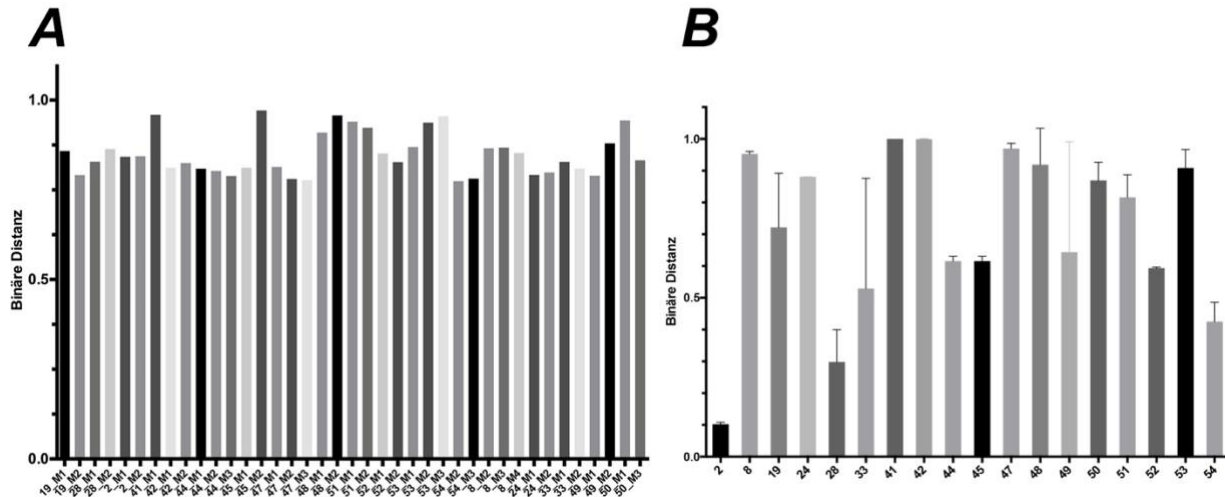


ABBILDUNG 5 (A): Mittlere binäre Distanz zwischen Lymphknotenmetastasen. **(B)** Mittlere binäre Distanz und Standardabweichung intratumoral (zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen).

In einzelnen Fällen konnten sowohl Beispiele für sehr heterogene wie auch gering heterogene Tumore gefunden werden: Die binäre Distanz in Fall 49 lag zwischen den Lymphknotenmetastasen und Primärtumor zwischen 0,96 und 1,0 und deutete somit auf eine sehr große Heterogenität zwischen den Tumoren. In Fall 24 beispielsweise lag die binäre Distanz zwischen den Proben dieses Falls bei 0,32 bis 0,35 und deutete somit nur auf ein geringes Maß an Heterogenität der verschiedenen Proben.

TABELLE 3(A): Veränderte Signalwege in angereicherten Amplifikationen (LNM vs. PT, >2 Gene)

Involvierter Signalweg	Gene	Proteinklasse
Wnt-Signalweg	RAD54B	
	MYC	Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktoren, Nukleinsäure-bindend
	CDH17	Zellkontaktprotein, Cadherin
	FZD6	Signalmolekül, G-Protein-gekoppelter Rezeptor

TABELLE 3(B): Veränderte Signalwege in angereicherten genetischen Deletionen (LNM vs. PT, >2 Gene)

Involvierter Signalweg	Gene	Proteinklasse
Angiogenese	FZD3	Signalmolekül, G-Protein-gekoppelter Rezeptor
	SFRP1	Signalmolekül, G-Protein-gekoppelter Rezeptor
	FGFR1	
	ANGPT2	Signalmolekül
	DOK2	
Apoptose-Signalweg	TNFRSF10B	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor
	BAG4	Chaperon
	TNFRSF10C	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor
	TNFRSF10A	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor
	TNFRSF10D	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor
CCKR-Signalweg	CLU	
	EIF4EBP1	Translationsfaktor
	PTK2B	Non-Rezeptor Tyrosin-Protein-Kinase
FGF-Signalweg	FGF17	Wachstumsfaktor

Involvierter Signalweg	Gene	Proteinklasse
	PEBP4	
	FGFR1	
	FGF20	Wachstumsfaktor
	PPP2R2A	Protein-Phosphatase
Gonadotropin releasing hormone receptor (GNRHR)-Signalweg	GATA4	Zink-Finger Transkriptionsfaktor, Nuklease
	GNRH1	Peptidhormon
	PTK2B	Non-Rezeptor Tyrosin-Protein-Kinase
Wnt-Signalweg	PPP3CC	Protein Phosphatase
	FZD3	Signalmolekül, G-Protein-gekoppelter Rezeptor
	SFRP1	Signalmolekül, G-Protein-gekoppelter Rezeptor
p53-Signalweg	TNFRSF10B	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor
	WRN	DNA-Helikase, Helikase
	TNFRSF10A	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor
	TNFRSF10D	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor

4. Diskussion

4.1. Genetisch numerische Aberrationen beim duktalem Pankreas-Adenokarzinom

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Amplifikationen und Deletionen bei Primärtumoren von duktalem Adenokarzinomen des Pankreas und deren korrespondierenden Lymphknoten- und Fernmetastasen mit Hilfe der Array-basierten CGH untersucht. Hierbei zeigte sich generell ein ähnliches Muster numerisch-genetischer Aberrationen (CNA), wie bereits für das Pankreaskarzinom beschrieben wurde⁵³⁻⁵⁶. Häufigste in der Literatur beschriebene Aberrationen sind u.a. Amplifikationen der Regionen 7p22, 8q12, 17q12, 13q und Deletionen der Regionen 9p24, 18q, 1p⁵³⁻⁵⁶. Diese Veränderungen decken sich mit den in der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Daten.

Die genetischen Aberrationen wurden in der vorliegenden Untersuchung dann in exklusive („private“) und geteilte („shared“) unterteilt. Anschließend wurden diese Aberrationen zueinander in Verhältnis gesetzt und ein Heterogenitätsindex bestimmt. Hierbei zeigten die aCGH-Daten eine höhere genetische Heterogenität zwischen Proben verschiedener Fälle als zwischen Proben desselben Falles. Dennoch unterschied sich auch das Muster numerisch genetischer Alterationen innerhalb eines Falles, d.h. die Muster zwischen den Primärtumoren und ihren korrespondierenden Metastasen deutlich. Die hierbei berechnete, hohe mittlere binäre Distanz von 0,74 zwischen Proben desselben Falles deutet auf eine hohe intratumorale Heterogenität hin. Darüber hinaus konnte mit einem Heterogenitätsindex von 0,87 ein hohes Maß an Heterogenität zwischen Tumorproben verschiedener Fälle sortiert nach Lokalisation (hier zwischen allen Lymphknotenmetastasen) in dieser Untersuchung nachgewiesen werden.

4.2. Bedeutung angereicherter CNA in Metastasen

Die Alterationen wurden dann nach Lokalisation und Häufigkeit sortiert. Die häufigsten Alterationen in Metastasen waren Amplifikationen der Chromosomenbereiche 8q24, 12q13, 16q12, 19q13, 21q22, 17q21. Deletionen wurden am häufigsten in den Chromosomenbereichen 18q und 6q13 gefunden. Im Anschluss wurden die Proben der einzelnen Fälle nach Alterationen in

den verschiedenen Lokalisationen (d.h. Primärtumor, Lymphknotenmetastase und ggf. Organmetastase) verglichen. Es wurde dabei nach Aberrationen gesucht, die signifikant häufiger in einer Lokalisation zu finden waren. Im Vergleich der Lymphknotenmetastasen zu ihren korrespondierenden Primärtumoren war die häufigste in diesen Metastasen angereicherte Veränderung dabei ein Zugewinn auf Chromosom 8q ($p=0,043$). Hiernach wurden diese betroffenen Genregionen auf die dort zu findenden, krebsrelevanten Gene untersucht. Auf dem Chromosomenarm 8q sind unter anderem einige krebsrelevante Gene wie beispielsweise *MYC* beherbergt. Durch Amplifikation dieses Gens auf Chromosom 8q könnten, wie von Jones et al beschrieben, Signalwege beeinflusst werden, die für die Krebsentwicklung bedeutsam sind⁵⁰. Die genannten Gene wären insbesondere interessante Kandidaten für einen therapeutischen Ansatz, da sie unter anderem mit einer Hochregulation des *Wnt/β-catenin*-Signalwegs assoziiert sind, der beim Pankreaskarzinom essentiell für dessen Entwicklung und Progress ist^{52,98}. Zhang et al konnten in einem transgenen Mausmodell durch Inhibition des *Wnt/β-catenin*-Signalweges nachweisen, dass die Aktivierung des *Wnt/β-catenin*-Signalweges essentiell ist, damit sich ein Pankreaskarzinom entwickeln kann⁹⁸. Dieser Signalweg ist außerdem in einer Vielzahl verschiedener Zellfunktionen wie Regeneration, Entwicklung, Proliferation und Tumorentwicklung involviert⁹⁹. Veränderungen in Genen wie *MYC* verdienen daher besondere Beachtung, da sie für die Regulation des Zellzyklus an wichtigen Kontrollstationen des Zellzyklus verantwortlich sind, insbesondere die Regulatoren an der G₁-S-Transition und am G₂-M-Checkpoint^{73,80}. Fehlt die Regulation des Zellzyklus, wird damit ein Mechanismus außer Kraft gesetzt, der die weitere Teilung von Zellen mit defekter DNA aufhält. Dies ist insbesondere relevant, wenn die betroffene Tumorzelle ein hohes Maß genetischer Instabilität zeigt, die ebenfalls assoziiert mit einer Überexpression von *MYC* ist¹⁰⁰⁻¹⁰⁵. Eine hohe genetische Instabilität führt zu einem vermehrten Auftreten von Mutationen, wodurch weitere Zellregulationsmechanismen wie beispielsweise Induktion von Apoptose oder DNA-Reparatur ausgeschaltet werden können. Das Pankreaskarzinom zeigt dabei eine besonders hohe Neigung zu genetischer Instabilität. Verantwortlich hierfür ist, wie oben bereits beschrieben, vor allem eine Telomerinstabilität, die zu einer deutlichen Verkürzung oder dem Verlust der Telomere führt⁷³. Hierdurch wird eine Fusion benachbarter Chromosomenarme begünstigt, die zusammen mit einer Trennung der Chromosomen an falscher Stelle als ‚breakage-fusion-bridge‘-Zyklus (BFB) bezeichnet werden⁷³. Im Ergebnis können hierbei fehlerhafte Fusionen und DNA-Brüche an falscher Stelle entstehen^{73,106}. Dies kann wiederum zu Deletionen, Amplifikationen oder

Translokationen führen⁷⁴. Auch die oben beschriebene Chromothripsis wird durch Telomerinstabilität verursacht. Zusammengenommen münden die vermehrten Mutationen, die unter anderem durch die Telomerinstabilität begünstigt werden, letztlich zum Auftreten verschiedener, nebeneinander existierender Subklone und damit zu einer hohen intratumoralen Heterogenität. Dieser Zusammenhang zwischen chromosomaler Instabilität und intratumoraler Heterogenität ist lange bekannt und konnte im Pankreaskarzinom bereits durch Campbell et al nachgewiesen werden^{80,85}.

Mutationen von bestimmten Genen, die unter anderem auf Chromosom 8q liegen, ermöglichen durch eine Deregulation des Zellzyklus überhaupt erst die chromosomale Instabilität und die folgende Heterogenität und sind daher besonders interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen, unter anderem, da damit die Progression des Tumors erklärt werden kann. Auch klinische Daten anderer Tumorentitäten sprechen dafür, dass insbesondere der Zugewinn von Chromosom 8q eine bedeutsame Veränderung in der Tumorentwicklung darstellt. Im oralen Plattenepithelkarzinom ist der Zugewinn von 8q mit einer erhöhten Rate von Lymphknotenmetastasierung assoziiert, im kolorektalen Karzinom konnte der Zugewinn häufiger in korrespondierenden Hirnmetastasen gefunden werden^{107,108}. Bei der Entwicklung des Brustkrebs bestimmt die Amplifikation von *MYC* den Übergang des präinvasiven Carcinoma in situ (DCIS) in das invasive duktales Karzinom¹⁰⁹. Im Vergleich mit diesen Erkenntnissen zur Relevanz einer *MYC*-Amplifikation in anderen Tumoren und der in der vorliegenden Untersuchung gezeigten Amplifikation von *MYC* beim Pankreaskarzinom könnte daher *MYC* ein interessanter Kandidat für eine ‚Driver‘-Mutationen auch im Pankreaskarzinom darstellen. Durch eine aktivierende Mutation oder Amplifikation der für *MYC* kodierenden Region könnte dieses Gen überexprimiert werden. Eine Folge von überexprimierten, für *MYC* kodierenden Regionen könnte, wie oben beschrieben, die Deregulation des Zellzyklus und eine vermehrte genetische Instabilität sein. Damit einhergehend könnten häufige Mutationen dann zur Bildung von vermehrten Subklonen führen, die auch die Fähigkeit zur Disseminierung in andere Organe oder zur weiteren Deregulation des Tumorwachstums beinhalten. Dieser Mechanismus könnte die höhere Rate von *MYC*-Amplifikationen in disseminierten Proben erklären, die in dieser Untersuchung gefundenen wurden.

4.3. Intratumorale Heterogenität und Metastasierungszeitpunkt beim Pankreaskarzinom

Hinweise auf die hier nachgewiesene intratumorale Heterogenität des Pankreaskarzinoms und der korrespondierenden Fernmetastasen ergeben sich auch aus weiteren Studien, die mithilfe von Sequenzierungstechniken neuerer Generation („next generation sequencing“, NGS) Untersuchungen am Pankreaskarzinom durchführten: Yachida et al untersuchten somatische Mutationen aus Proben verschiedener Metastasierungsorten in sieben Patienten mit Pankreaskarzinom im Rahmen eines ‚rapid autopsy‘ Programms⁸¹. So konnten sie einen Großteil der nachgewiesenen Mutationen (64 % im Mittel) zwar in allen Proben finden, ca. 1/3 der Mutationen konnten demnach aber nicht über alle Proben eines Falles hinweg gefunden werden⁸¹. Dies spricht bereits für eine hohe intratumorale Heterogenität. Ähnlich wie in der vorliegenden Untersuchung, wurde hierbei die intratumorale Heterogenität nicht zwischen einzelnen Zellen sondern auch zwischen Zellkonglomeraten des Tumors definiert. In zwei Patienten führten Yachida et al zusätzlich Untersuchungen an verschiedenen Lokalisationen des Primärtumors durch und konnten dort ebenfalls Heterogenität zwischen Subklonen nachweisen, die sie darüber hinaus in den Metastasen finden konnten⁸¹. Hieraus schlossen sie, dass Metastasierung erst spät in der Entwicklung des Tumors stattfindet. Im Gegensatz hierzu konnten Campbell et al, ebenfalls durch Sequenzierung von Primärtumoren und korrespondieren Metastasen, ‚Driver‘-Mutationen exklusiv in Metastasen nachweisen⁸⁰. Die aufwendigen Sequenziertechniken von Yachida & Campbell bieten den großen Vorteil, dass neben CNA auch Punktmutationen nachgewiesen werden können. Limitierend in diesen Studien ist allerdings – wie in der vorliegenden Untersuchung – die Untersuchung von Zellkonglomeraten sowie – anders als in der vorliegenden Untersuchung – die nur geringe Fallzahl. Allgemeingültige Folgerungen, die direkte klinische Relevanz haben würden, können trotz dieser aufwendigen Untersuchungsmethoden bei Yachida & Campbell nicht gezogen werden. Vielmehr handelt es sich bei diesen Arbeiten um grundlegende Untersuchungen eines Metastasierungsmodells, bei dem die Autoren auf eine späte Metastasierung schlossen. Experimentelle Daten aus einem transgenen Mausmodell beim Pankreaskarzinom werfen allerdings im Gegensatz dazu die Möglichkeit einer frühen Metastasierung auf, die dort bereits bei präneoplastischen Läsionen auftrat¹¹⁰. In der vorliegenden Untersuchung konnten wir sowohl Fälle finden, deren Metastasen große genetische Ähnlichkeit mit den korrespondierenden

Primärtumoren haben, wie auch Fälle, in denen korrespondierende Proben genetisch sehr heterogen sind (siehe *Abbildung 5*). Am ehesten scheinen daher prinzipiell beide Szenarien im Pankreaskarzinom denkbar zu sein, was die unterschiedlichen Alterationsmuster erklären könnte: (1) Tumorzellen, die (frühzeitig) den Primärtumor verlassen unterliegen zusätzlichen Veränderungen durch klonale Selektion und Anpassungsprozessen an dem Ort der Metastasierung und (2) ein Subklon innerhalb des Primärtumors entwickelt über die Zeit die Fähigkeit zur Metastasierung und wird zum dominanten Klon für entstehende Metastasen.

Im Vergleich dazu kann eine intratumorale Heterogenität bei anderen Tumoren interessanterweise auch über die Zeit beobachtet werden¹¹¹⁻¹¹⁵. Untersuchungen legen nahe, dass diese Heterogenität ein effektiver Anpassungsmechanismus an wechselnde Bedingungen sein kann, die zum Beispiel an Zielorten der Metastasierung notwendig sind¹¹⁶. Diese Mechanismen können zudem Grund für eine therapeutische Resistenz eines Tumors sein^{85,88,111}. Als klinisches Korrelat konnte entsprechend eine hohe intratumorale Heterogenität mit aggressiverem Verhalten des Tumors und kürzerem Überleben beim Ösophaguskarzinom nachgewiesen werden¹¹⁷. Möglicherweise könnte daher eine hohe intratumorale Heterogenität beim Pankreaskarzinom ein Hinweis auf ein hohes Adaptationspotential sein. Letzteres wäre mit schlechterem Ansprechen auf (Radio-)chemotherapie vergesellschaftet und könnte das ungünstige Outcome erklären.

Notta et al untersuchten das Phänomen der Chromothripsis im Pankreaskarzinom. Hierbei konnten sie feststellen, dass (a) Chromothripsis-Ereignisse durch größere genetische Instabilität häufiger in polyploiden Zellen als in diploiden Zellen auftreten, (b) genetische Mutationen den Chromothripsisereignissen häufig vorausgehen, (c) CNA (Deletionen und Amplifikationen) ebenfalls häufiger in polyploiden Zellen gefunden werden können⁷². Ein entscheidender Teil der Chromothripsisereignisse konnte außerdem in Regionen bekannter Onkogene gefunden werden. 11% aller Ereignisse traten auf Chromosom 18 auf, einhergehend mit einem Verlust von *SMAD4* sowie 8% auf Chromosom 12, assoziiert mit einer Amplifikation von *KRAS*⁷². Bei folgender Untersuchung waren die Metastasen ebenfalls polyploid und zeigten die Chromothripsisereignisse aus dem Primärtumor⁷². Die Autoren schlussfolgerten daher, dass der Metastasierung die genetische Instabilität im Pankreaskarzinom vorausgeht⁷². Auch die Ergebnisse dieser Untersuchungen sprechen gegen ein mehrstufiges Modell graduell angehäufter Mutationen, da Chromothripsisereignisse demnach in nur wenigen Mitosezyklen genetische Veränderungen (Mutationen und CNA) in Subklonen hervorbringen, die zu einem invasiven Karzinom mit der

Befähigung zur Metastasierung führen⁷². Interessanterweise konnte auch in der Studie von Notta et al bei der Untersuchung von Metastasen ein Chromothripsisereignis auf Chromosom 8 gefunden werden, das zu einer (20-40 fachen) Amplifikation von *MYC* führte⁷².

Aufgrund der in anderen Tumoren beschriebenen intratumoralen Heterogenität über die Zeit müsste bei Diagnosestellung oder zum Zeitpunkt einer Untersuchung der zur Metastasierung befähigte Subklon nicht mehr zwingend im Primärtumor dominant sein, wobei jedoch die bekannten ‚Driver‘-Mutationen in Metastasen uniform vorhanden zu sein scheinen^{87,90}. Auch Anpassungsmechanismen können dazu führen, dass ein metastasierungsfähiger Subklon zum Zeitpunkt der Tumoruntersuchung nicht (mehr) der dominante Klon im Primärtumor ist oder Metastasen selbst weiter disseminieren¹¹⁸⁻¹²¹.

Zusammengefasst spricht daher eine hohe intratumorale Heterogenität gepaart mit genetischen, krebsrelevanten Veränderungen, die spezifisch in Metastasen angereichert sind, gegen ein streng graduelles Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms. Unter Würdigung der genannten Studien geben die Daten der vorliegenden Untersuchung Hinweise dafür, dass Pankreaskarzinomzellen die Befähigung zur Metastasierung bereits früh in ihrer Entwicklung tragen.

Nach diesen Erkenntnissen muss außerdem für die Untersuchung von Tumorbiopsien folgendes gelten: Ein fehlender Nachweis von für die Metastasierung erforderlichen Veränderungen muss kein zwingendes Zeichen für eine fehlende Metastasierung sein. Gleichzeitig könnten diese Veränderungen wohl in einem Subklon des Primärtumors vorhanden sein. Vielmehr bleibt dann unklar, ob Metastasen bereits entstanden sind. Hierdurch ergeben sich direkte Implikationen für eine Therapie, da selbst das Fehlen metastasierungsspezifischer Veränderungen in einer Tumorprobe nicht als prognostisch positiver Tumormarker gewertet werden könnte.

4.4. Limitationen der Studie

In der vorliegenden Untersuchung wurden Pankreaskarzinome mithilfe der aCGH untersucht. Bisherige Untersuchungen am Pankreaskarzinom und autologer Metastasen wurden mittels Sequenzierung durchgeführt, wobei die Proben hierfür aus kultivierten Zellen oder im Rahmen schneller Autopsie-Programme nach Versterben der Patienten entnommen wurden^{80,81}.

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine andere Methodik verwendet. Dies könnte zu einem Teil der beobachteten Veränderungen geführt haben:

Die manuelle Mikrodisektion, die den Anteil nicht-maligner Zellen minimieren soll, kann eine Dilution durch nicht-tumorale DNA nicht ausschließen. Grund hierfür ist insbesondere das ausgeprägte desmoplastische Wachstum des Pankreaskarzinoms, mit dem das fibrotische Wachstums bestehend aus zahlreichen nicht-malignen Zellen, vor allem durch die α SMA-exprimierenden Myofibroblasten und reichlich Kollagen, gemeint ist.

Die geringere Zahl der gesamten Veränderungen in der DNA der Primärtumore könnte in Teilen außerdem durch die Verwendung von ‚bulk‘-DNA, also die Analyse der DNA eines Zellkonglomerats, erklärt werden. Die so erfolgte Analyse verschiedener, stark heterogener Subklone im Primärtumor mit verschiedenen Veränderungen kann zu einer Verminderung des mittleren Aberrationsprofils führen. Hierdurch würde bei weniger Aberrationen die Signifikanzschwelle überschritten und daher weniger Aberrationen gezählt werden.

Ferner wurden für die Analyse nur kleine Bereiche des Primärtumors untersucht, sodass prinzipiell nicht alle Subklone erfasst werden können.

Diese Probleme lassen sich jedoch derzeit theoretisch nur durch multiple Einzelzelluntersuchungen aus einer Tumorprobe gewährleisten, für die allerdings ebenfalls fehleranfällige Amplifikationsmethoden und idealerweise aufwendige Sequenzieretechniken genutzt werden müssten¹²².

Allerdings muss berücksichtigt werden, dass in den anderen genannten Studien am Pankreaskarzinom entweder kultivierte Zellen benutzt wurden, die ebenfalls nicht vollständig dem originären Tumormaterial entsprechen oder Zellen verwendet wurden, die im Rahmen schneller Autopsie-Programme entnommen wurden, bei dem ebenfalls nur eine Momentaufnahme erfolgen kann, die in der Regel am Ende der Entwicklung des Karzinoms steht. Letztlich wird eine Untersuchung aller Subklone des Primärtumors sowie der Metastasen äußerst schwierig bleiben und darüber hinaus nur genetische Veränderungen erfassen. Durch derartige Untersuchungsmethoden blieben grundsätzlich epigenetische Phänomene unberücksichtigt.

4.5. Ziele und Hypothesen

Im Ergebnis konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl (1) Unterschiede in genetisch numerischen Aberrationen zwischen korrespondierenden Tumorproben beim Pankreaskarzinom nachgewiesen werden und (2) Unterschiede in genetisch numerischen Aberrationen zwischen Proben

unterschiedlicher Tumore abhängig von der Lokalisation gefunden werden. Somit konnten Hinweise für die Bestätigung der zugrunde gelegten Hypothesen gefunden werden: Bei dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas liegt (1) ein hohes Maß intratumoraler Heterogenität vor, (2) Tumorproben desselben Tumors weisen erhebliche genetische Unterschiede je nach Lokalisation auf und (3) bei dem Prozess der Metastasierung scheinen spezifische genetisch numerische Aberrationen angereichert zu werden, die wichtige Mechanismen für den Progress des Karzinoms beinhalten. In zukünftigen Studien könnten diese Erkenntnisse, insbesondere in Bezug auf metastasenspezifische Veränderungen validiert werden. Hierfür könnten beispielsweise zunächst weitere Metastasen verschiedener Lokalisationen mit anderen Verfahren wie FISH auf numerische Aberrationen oder durch Sequenzierung zusätzlich auf Mutationen untersucht werden. Außerdem könnten die hier untersuchten Tumore in einem Zellkulturmodell etabliert werden und in weiteren Untersuchungen, beispielsweise in einem Xenograft-Modell, therapeutische Ansätze zur Beeinflussung der auf Chromosom 8q liegenden Gene geprüft werden.

Die in der Literatur zunehmende bestätigten Hinweise für eine intratumorale Heterogenität sollten mittelfristig auch bei Diagnostik und Therapie eine Rolle spielen, um eine effizientere Therapie zu ermöglichen.

5. Literaturverzeichnis

1. Rausch V, Krieg A, Camps J, et al. Array comparative genomic hybridization of 18 pancreatic ductal adenocarcinomas and their autologous metastases. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):560. doi:10.1186/s13104-017-2886-0.
2. Todesursachenstatistik Bauchspeicheldrüse. Tabellarische Darstellung 1980 bis 2015. Statistisches Bundesamt [Destatis]. http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_PROC?_XWD_2/3/xs_setsaeule/1/_XWD_28#SVG. Veröffentlicht 2017. Zugriff am 5. Januar 2018..
3. Krebsneuerkrankungen Bauchspeicheldrüse. Tabellarische Datenbankabfrage 2003 bis 2013. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID). http://gekid.de/Atlas/Tabellen/Tabellen_D.php?Method=INCIDENCE_EU&ICD10=C25&Year_from=2003&Year_to=2013&Men=on&Women=on&Rates=on&Cases=on. Veröffentlicht 2016. Zugriff am 5. Januar 2018.
4. Krebssterblichkeit Bauchspeicheldrüse. Tabellarische Datenbankabfrage 2003 bis 2013 Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID). http://gekid.de/Atlas/Tabellen/Tabellen_D.php?Method=MORTALITY_EU&ICD10=C25&Year_from=2003&Year_to=2013&Men=on&Women=on&Rates=on&Cases=on. Veröffentlicht 2016. Zugriff am 5. Januar 2018.
5. Krebs in Deutschland. Datenblatt Bauchspeicheldrüsenkrebs. Zentrum für Krebsregisterdaten. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html. Veröffentlicht 2017. Zugriff am 5. Januar 2018.
6. Krebs in Deutschland - Datenbankabfrage Bauchspeicheldrüsenkrebs. Zentrum für Krebsregisterdaten. https://www.krebsdaten.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe2_form.html. Veröffentlicht 2017. Zugriff am 5. Januar 2018.
7. Todesursachenstatistik bösartige Neubildungen. Tabellarische Darstellung 1980 bis 2015. Statistisches Bundesamt [Destatis]. http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=23909746&nummer=670&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=44682693. Veröffentlicht 2017. Zugriff am 5. Januar 2018.
8. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Altersstandardisierte Neuerkrankungsrate der Weltregionen. GLOBOCAN 2012 v1.0. http://globocan.iarc.fr/old/bar_sex_site.asp?selection=23090&title=Pancreas&statistic=2&populations=6&>window=1&grid=1&color1=5&color1e=&color2=4&color2e=&submit=Execute. Veröffentlicht 2013. Zugriff am 5. Januar 2018.

9. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:5-29. doi:10.3322/caac.21254.
10. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006.*; 2008.
11. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de González A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer.* 2005;92(11):2076-2083. doi:10.1038/sj.bjc.6602619.
12. Lynch SM, Vrieling A, Lubin JH, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *Am J Epidemiol.* 2009;170(4):403-413. doi:10.1093/aje/kwp134.
13. Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS. Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA.* 2001;286(8):921-929. doi:10.1001/jama.286.8.921.
14. Thompson D, Easton DF. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(18):1358-1365. doi:10.1097/00006254-200301000-00016.
15. Couch FJ, Johnson MR, Rabe KG, et al. The prevalence of BRCA2 mutations in familial pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(2):342-346.
16. Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, et al. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA.* 2009;302(16):1790-1795. doi:10.1001/jama.2009.1529.
17. Roberts NJ, Jiao Y, Yu J, et al. ATM mutations in patients with hereditary pancreatic cancer. *Cancer Discov.* 2012;2(1):41-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0194.
18. Vasen HF a, Gruis N a., Frants RR, Van Der Velden P a., Hille ETM, Bergman W. Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int J Cancer.* 2000;87(6):809-811.
19. Ghadirian P, Boyle P, Simard a, Baillargeon J, Maisonneuve P, Perret C. Reported family aggregation of pancreatic cancer within a population-based case-control study in the Francophone community in Montreal, Canada. *Int J Pancreatol.* 1991;10(3-4):183-196.
20. Su GH, Hruban RH, Bansal RK, et al. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am J Pathol.* 1999;154(6):1835-1840. doi:10.1016/S0002-9440(10)65440-5.
21. Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, et al. 1423 Pancreaticoduodenectomies for Pancreatic Cancer: A Single-Institution Experience. *J Gastrointest Surg.* 2006;10(9):1199-1211. doi:10.1016/j.gassur.2006.08.018.
22. Klimstra DS. Noductal neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol.* 2007;20 Suppl 1:S94-S112. doi:10.1038/modpathol.3800686.
23. Matsuno S, Egawa S, Fukuyama S, et al. Pancreatic Cancer Registry in Japan: 20 years of experience.

- Pancreas*. 2004;28(3):219-230. doi:10.1097/00006676-200404000-00002.
24. Klöppel G, Fitzgerald PJ. Pathology of nonendocrine pancreatic tumors. In: *The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease.*; 1993:871-897.
 25. National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program SSB. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>. Veröffentlicht 2017. Zugriff am 5. Januar 2018.
 26. Halfdanarson TR, Rabe KG, Rubin J, Petersen GM. Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival. *Ann Oncol*. 2008;19(10):1727-1733. doi:10.1093/annonc/mdn351.
 27. Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, et al. Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. *Cancer Cell*. 2014;25(6):719-734. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.005.
 28. Hruban R, Klimstra DS, Pitman MB. *AFIP Atlas of Tumor Pathology, Series IV*. Washington (DC): Armed Forces Institute of Pathology; 2006.
 29. Yachida S, White CM, Naito Y, et al. Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. *Clin Cancer Res*. 2012;18(22):6339-6347. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1215.
 30. Jacobuzio-Donahue CA, Fu B, Yachida S, et al. DPC4 Gene Status of the Primary Carcinoma Correlates With Patterns of Failure in Patients With Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(11):1806-1813. doi:10.1200/jco.2008.17.7188.
 31. Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg*. 2004;91(5):586-594. doi:10.1002/bjs.4484.
 32. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic Adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2014;371(11):1039-1049. doi:10.1056/NEJMra1404198.
 33. Tempero MA, Al-Hawary M, Bain A, et al. National Comprehensive Cancer Network, Clinical Practice Guidelines in Oncology, Pancreatic Adenocarcinoma, Version 1.2017. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/pancreatic.pdf. Zugriff am 5. April 2017.
 34. Seufferlein T, Bachet JB, Van Cutsem E, Rougier P. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2012;23(suppl 7):vii33-vii40. doi:10.1093/annonc/mds224.
 35. Khorana AA, Mangu PB, Berlin J, et al. Potentially Curable Pancreatic Cancer: American Society of Clinical

- Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2016;34(21):2541-2556. doi:10.1200/JCO.2016.67.5553.
36. Winter JM, Brennan MF, Tang LH, et al. Survival after Resection of Pancreatic Adenocarcinoma: Results from a Single Institution over Three Decades. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(1):169-175. doi:10.1245/s10434-011-1900-3.
 37. Balcom IV JH, Rattner DW, Warshaw AL, et al. Ten-Year Experience With 733 Pancreatic Resections. *Arch Surg*. 2001;136(4):391. doi:10.1001/archsurg.136.4.391.
 38. Crist DW, Sitzmann J V, Cameron JL. Improved hospital morbidity, mortality, and survival after the Whipple procedure. *Ann Surg*. 1987;206(3):358-365.
 39. Murakami Y, Uemura K, Sudo T, et al. Number of Metastatic Lymph Nodes, but Not Lymph Node Ratio, Is an Independent Prognostic Factor after Resection of Pancreatic Carcinoma. *J Am Coll Surg*. 2010;211(2):196-204. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2010.03.037.
 40. Strobel O, Hinz U, Gluth A, et al. Pancreatic Adenocarcinoma: Number of Positive Nodes Allows to Distinguish Several N Categories. *Ann Surg*. 2015;261(5):961-969. doi:10.1097/SLA.0000000000000814.
 41. Kang MJ, Jang J-Y, Chang YR, Kwon W, Jung W, Kim S-W. Revisiting the Concept of Lymph Node Metastases of Pancreatic Head Cancer: Number of Metastatic Lymph Nodes and Lymph Node Ratio According to N Stage. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(5):1545-1551. doi:10.1245/s10434-013-3473-9.
 42. Haeno H, Gonen M, Davis MB, Herman JM, Iacobuzio-Donahue CA, Michor F. Computational modeling of pancreatic cancer reveals kinetics of metastasis suggesting optimum treatment strategies. *Cell*. 2012;148(1-2):362-375. doi:10.1016/j.cell.2011.11.060.
 43. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, et al. Pancreatic Cancer–Associated Diabetes Mellitus: Prevalence and Temporal Association With Diagnosis of Cancer. *Gastroenterology*. 2008;134(1):95-101. doi:10.1053/j.gastro.2007.10.040.
 44. Berdasco M, Esteller M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Dev Cell*. 2010;19(5):698-711. doi:10.1016/j.devcel.2010.10.005.
 45. Jones PA, Issa J-PJ, Baylin S. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat Rev Genet*. 2016;17(10):630-641. doi:10.1038/nrg.2016.93.
 46. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. Second Edition. Garland science; 2013.
 47. O'Hagan R, Chang S, Maser R. Telomere dysfunction provokes regional amplification and deletion in cancer genomes. *Cancer Cell*. 2002.
 48. Pruitt K, Brown G, Tatusova T, Maglott D. Chapter 18 : The Reference Sequence (RefSeq) Database Database. In: *The NCBI Handbook*. 2002:1-22.
 49. McCarroll SA, Altshuler DM. Copy-number variation and association studies of human disease. *Nat Genet*.

2007;39(7s):S37-S42. doi:10.1038/ng2080.

50. Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* (80-). 2008;321(5897):1801-1806. doi:10.1126/science.1164368.
51. Biankin A V., Waddell N, Kassahn KS, et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*. 2012;491(7424):399-405. doi:10.1038/nature11547.
52. Waddell NN, Pajic M, Patch AM, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*. 2015;518(7540):495-501. doi:10.1038/nature14169.
53. Aguirre AJ, Brennan C, Bailey G, et al. High-resolution characterization of the pancreatic adenocarcinoma genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(24):9067-9072. doi:10.1073/pnas.0402932101.
54. Harada T, Baril P, Gangeswaran R, et al. Identification of genetic alterations in pancreatic cancer by the combined use of tissue microdissection and array-based comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer*. 2007;96(2):373-382. doi:10.1038/sj.bjc.6603563.
55. Harada T, Okita K, Shiraishi K, et al. Detection of genetic alterations in pancreatic cancers by comparative genomic hybridization coupled with tissue microdissection and degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction. *Oncology*. 2002;62(3):251-258. doi: 10.1159/000059573
56. Nowak NJN, Gaile D, Conroy JJM, et al. Genome-wide aberrations in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;161(1):36-50. doi:10.1016/j.cancergencyto.2005.01.009.
57. Fogelman DR, WolffRA, Kopetz S, et al. Evidence for the efficacy of Iniparib, a PARP-1 inhibitor, in BRCA2-associated pancreatic cancer. *Anticancer Res*. 2011;31(4):1417-1420.
58. Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, Knudsen ES. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(2):130-146. doi:10.1038/nrd4504.
59. Solcia E, Bonato M, Ranzani GN. K-ras and p53 Gene Mutations in Pancreatic Cancer: Ductal and Nonductal Tumors Progress through Different Genetic Lesions. *Cancer Res*. 1994;54(6):1556-1560.
60. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol*. 2008;3(1):157-188. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154305.
61. Schutte M, Hruban RH, Geradts J, et al. Abrogation of the Rb/p16 Tumor-suppressive Pathway in Virtually All Pancreatic Carcinomas. *Cancer Res*. 1997;57(15).
62. Caldas C, Hahn S a, da Costa LT, et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet*. 1994;8(1):27-32. doi:10.1038/ng0994-27.
63. Redston MS, Caldas C, Seymour AB, et al. p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res*. 1994;54(11):3025-3033.

64. Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Thiagalingam S. Frequency of Smad Gene Mutations in Human Cancers'. *CANCER Res.* 1997;57:2578-2580.
65. Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE. Genetic Progression in the Pancreatic Ducts. *Am J Pathol.* 2000;156:1821-1825. doi:10.1016/S0002-9440(10)65054-7.
66. Hahn S, Schutte M, Hoque T, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science.* 1996;271(5247):350-353. doi:10.1126/science.271.5247.350.
67. Blackford A, Serrano OK, Wolfgang CL, et al. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(14):4674-4679. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0227.
68. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(8):2969-2972.
69. Shi C, Daniels JA, Hruban RH. Molecular characterization of pancreatic neoplasms. *Adv Anat Pathol.* 2008;15(4):185-195. doi:10.1097/PAP.0b013e31817bf57d.
70. Basturk O, Hong S-M, Wood LD, et al. A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(12):1730-1741. doi:10.1097/PAS.0000000000000533.
71. Dal Molin M, Zhang M, de Wilde RF, et al. Very Long-term Survival Following Resection for Pancreatic Cancer Is Not Explained by Commonly Mutated Genes: Results of Whole-Exome Sequencing Analysis. *Clin Cancer Res.* 2015;21(8):1944-1950. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2600.
72. Notta F, Chan-Seng-Yue M, Lemire M, et al. A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature.* 2016;538(7625):378-382. doi:10.1038/nature19823.
73. Gisselsson D, Jonson T, Petersén A, et al. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(22):12683-12688. doi:10.1073/pnas.211357798.
74. Maciejowski J, de Lange T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(3):175-186. doi:10.1038/nrm.2016.171.
75. Kloosterman WP, Guryev V, van Roosmalen M, et al. Chromothripsis as a mechanism driving complex de novo structural rearrangements in the germline. *Hum Mol Genet.* 2011;20(10):1916-1924. doi:10.1093/hmg/ddr073.
76. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, et al. Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell.* 2011;144(1):27-40. doi:10.1016/j.cell.2010.11.055.
77. Rausch T, Jones DTW, Zapatka M, et al. Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell.* 2012;148(1-2):59-71. doi:10.1016/j.cell.2011.12.013.

78. Real FX. A “catastrophic hypothesis” for pancreas cancer progression. *Gastroenterology*. 2003;124(7):1958-1964. doi:10.1016/S0016-5085(03)00389-5.
79. Nowell P. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-28.
80. Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, et al. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature*. 2010;467(7319):1109-1113. doi:10.1038/nature09460.
81. Yachida S, Jones S, Bozic I, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*. 2010;467(7319):1114-1117. doi:10.1038/nature09515.
82. McGranahan N, Swanton C. Biological and Therapeutic Impact of Intratumor Heterogeneity in Cancer Evolution. *Cancer Cell*. 2015;27(1):15-26. doi:10.1016/j.ccell.2014.12.001.
83. Kallioniemi A, Kallioniemi O, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258(5083):818-822.
84. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998;20(2):207-211. doi:10.1038/2524.
85. Swanton C. Intratumor heterogeneity: Evolution through space and time. *Cancer Res*. 2012;72(19):4875-4882. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2217.
86. Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Publ Gr*. 2014;46(3). doi:10.1038/ng.2891.
87. Makohon-Moore AP, Zhang M, Reiter JG, et al. Limited heterogeneity of known driver gene mutations among the metastases of individual patients with pancreatic cancer. *Nat Genet*. 2017;49(3):358-366. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3764>.
88. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*. 2011;469(7330):356-361. doi:10.1038/nature09650.
89. Lee AJX, Endesfelder D, Rowan AJ, et al. Chromosomal instability confers intrinsic multidrug resistance. *Cancer Res*. 2011;71(5):1858-1870. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3604.
90. Stoecklein NH, Klein CA. Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *Int J Cancer*. 2010;126(3):589-598. doi:10.1002/ijc.24916.
91. Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol*. 1994;145(6):1301-1308.
92. Agilent SurePrint G3 Human Catalog CGH Microarrays. <https://www.agilent.com>. Zugriff am 5. Januar 2018.
93. Team R. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for

Statistical Computing; 2014.

94. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods*. 2015;12(2):115-121. doi:10.1038/nmeth.3252.
95. Ben-Yaacov E, Eldar YC. A fast and flexible method for the segmentation of aCGH data. *Bioinformatics*. 2008;24(16):i139-45. doi:10.1093/bioinformatics/btn272.
96. Hupe P, Stransky N, Thiery J-P, et al. Analysis of array {CGH} data: from signal ratios to gain and loss of {DNA} regions. *Bioinformatics*. 2004;20(18):3413-3422. doi:10.1093/bioinformatics/bth418.
97. Mi H, Thomas P. PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. *Methods Mol Biol*. 2009;563:123-140. doi:10.1007/978-1-60761-175-2_7.
98. Zhang Y, Morris JP, Yan W, et al. Canonical wnt signaling is required for pancreatic carcinogenesis. *Cancer Res*. 2013;73(15):4909-4922. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4384.
99. Logan CY, Nusse R. The Wnt Signaling Pathway In Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20(1):781-810. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.
100. Zhang L, Hou Y, Ashktorab H, et al. The impact of C-MYC gene expression on gastric cancer cell. *Mol Cell Biochem*. 2010;344(1-2):125-135. doi:10.1007/s11010-010-0536-0.
101. Dang C V. MYC on the path to cancer. *Cell*. 2012;149(1):22-35. doi:10.1016/j.cell.2012.03.003.
102. Wolf E, Lin CY, Eilers M, Levens DL. Taming of the beast: Shaping Myc-dependent amplification. *Trends Cell Biol*. 2015;25(4):241-248. doi:10.1016/j.tcb.2014.10.006.
103. Felsher DW, Bishop JM. Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(7):3940-3944. doi:10.1073/pnas.96.7.3940.
104. Felsher DW, Bishop JM. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell*. 1999;4(2):199-207. doi:10.1016/S1097-2765(00)80367-6.
105. Louis SF, Vermolen BJ, Garini Y, et al. c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(27):9613-9618. doi:10.1073/pnas.0407512102.
106. McClintock B. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics*. 1941;26(2):234-282. doi:10.1038/378739a0.
107. Yoshioka S, Tsukamoto Y, Hijiya N, et al. Genomic profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. *PLoS One*. 2013;8(2):e56165. doi:10.1371/journal.pone.0056165.
108. Gutenberg A, Gerdes JS, Jung K, et al. High chromosomal instability in brain metastases of colorectal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;198(1):47-51. doi:10.1016/j.cancergencyto.2009.12.006.

109. Bao L, Messer K, Schwab R, Harismendy O. Mutational Profiling Can Establish Clonal or Independent Origin in Synchronous Bilateral Breast and Other Tumors. *PLoS One*. 2015;10(11);e0142487.
110. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*. 2012;148(1-2):349-361. doi:10.1016/j.cell.2011.11.025.
111. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013;152(4):714-726. doi:10.1016/j.cell.2013.01.019.
112. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014;5:2997. doi:10.1038/ncomms3997.
113. Castellarin M, Milne K, Zeng T, et al. Clonal evolution of high-grade serous ovarian carcinoma from primary to recurrent disease. *J Pathol*. 2013;229(4):515-524. doi:10.1002/path.4105.
114. Schuh A, Becq J, Humphray S, et al. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood*. 2012;120(20):4191-4196. doi:10.1182/blood-2012-05-433540.
115. Johnson BE, Mazor T, Hong C, et al. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science*. 2014;343(6167):189-193. doi:10.1126/science.1239947.
116. Klein CA. Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature*. 2013;501(7467):365-372. doi:10.1038/nature12628.
117. Maley CC, Galipeau PC, Finley JC, et al. Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nat Genet*. 2006;38(4):468-473. doi:10.1038/ng1768.
118. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):323-334. doi:10.1038/nrc3261.
119. Gibson WJ, Hoivik EA, Halle MK, et al. The genomic landscape and evolution of endometrial carcinoma progression and abdominopelvic metastasis. *Nat Genet*. 2016;48(8):848-855. doi:10.1038/ng.3602.
120. Sanborn JZ, Chung J, Purdom E, et al. Phylogenetic analyses of melanoma reveal complex patterns of metastatic dissemination. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(35):10995-11000. doi:10.1073/pnas.1508074112.
121. Gudem G, Van Loo P, Kremeyer B, et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature*. 2015;520(7547):353-357. doi:10.1038/nature14347.
122. Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*. 2011;472(7341):90-94. doi:10.1038/nature09807.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich beim meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Nikolas Stoecklein für die Unterstützung dieses Projektes bedanken. Ferner möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Thomas Ried bedanken, der es mir zusammen mit meinem Doktorvater ermöglicht hat, diese Arbeit auch über die Grenzen hinaus in den USA zu verwirklichen.

Dank gebührt zudem der Hedwig und Waldemar Hort Stiftung und der Studienstiftung des deutschen Volkes, die bei der Erstellung dieser Arbeit finanzielle Unterstützung gewährt haben.