

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

# Mutationsanalysen zirkulierender Tumorzellen bei Mammakarzinom- Patientinnen

Dissertation

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

Vorgelegt von

Susanne Schömer

2018

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Homey

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- Neumann, M.H., Schneck, H., Decker, Y., Schömer, S., Franken, A., Endris, V., Pfarr, N., Weichert, W., Niederacher, D., Fehm, T., Neubauer, H., Isolation and Characterization of Circulating Tumor Cells using a novel Workflow combining the CellSearch® System and the CellCelector, Biotechnol Prog. 2017 Jan;33(1):125-132, Pubmed ID 27126369

## Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist mit 71 640 Neuerkrankungen jährlich die häufigste Tumorerkrankung von Frauen in Deutschland. Der Großteil der Todesfälle wird nicht durch den Primärtumor, sondern durch dessen Metastasierung in andere Organe verursacht. Die nach Ablösung vom Primärtumor im Blut zirkulierenden Tumorzellen (CTC) erfahren derzeit große Aufmerksamkeit in Klinik und Forschung. Aktuell wurde die hohe Relevanz der CTC als prognostischer Marker in Bezug auf das Gesamtüberleben, die Länge des progressionsfreien Intervalls, sowie als Indikator für Therapieerfolg gezeigt. Primärtumor, metastatische Läsionen sowie CTC zeigen häufig eine Divergenz bezüglich der Expression molekularer Marker. Bisher beruht die Therapieentscheidung in den meisten Fällen ausschließlich auf den molekularen Merkmalen des Primärtumors. Die intratumorale Heterogenität und die Heterogenität zwischen Primärtumor, Metastasen und CTC kann aus klinischen Gründen oft nicht berücksichtigt werden. Die Analyse spezifischer Marker von CTC ist im Hinblick auf diese Fragestellung von großer Bedeutung und könnte als „liquid biopsy“ Verwendung finden. Sie ist jederzeit einfach durchführbar und spiegelt den Status der Erkrankung zum Zeitpunkt der Blutentnahme wider.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die Analyse und die Charakterisierung von CTC aus dem Blut von Patientinnen der DETECT III/IV-Studien mit metastasiertem Mammakarzinom. Der Schwerpunkt der Untersuchung liegt auf einer Mutation des Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PIK3) Signalwegs. Dieser Signalweg ist wichtig für die Zelldifferenzierung und –proliferation. Aufgrund der Mutation des *PIK3CA*-Gens liegt der PI3K-Signalweg in vielen Tumorentitäten dysreguliert vor. Diese Dysregulation hat möglicherweise eine Resistenz gegen anti-Her-2/neu gerichtete Therapeutika zur Folge.

In der vorliegenden Arbeit wird die Etablierung eines Arbeitsablaufes vorgestellt, der mittels CellSearch<sup>®</sup>, CellCelector, *Whole Genome Amplification* (WGA), genspezifischer PCR und Sanger-Sequenzierung eine Charakterisierung von CTC in Bezug auf vier mögliche *Hotspot*-Mutationen im *PIK3CA*-Gen ermöglicht. Es wurden 55 CTC aus 9 Patientinnen analysiert. Patientin 8 zeigte auf 2 von 8 CTC eine Mutation des *Hotspots* E545K (Exon 9) und auf 3 von 8 CTC wildtypische DNA. Patientin 3 wies auf 5 von 22 CTC die *Hotspot*-Mutation E545A, auf 2 von 22 CTC die Mutation E545K (Exon 9) und auf 4 von 22 CTC wildtypische DNA auf. Es wurde eine Detektionsrate von 16,4% (9/55 CTC) erreicht, was dem aktuellen Standard anderer Arbeiten entspricht. Ebenfalls wurde der Nachweis erbracht, dass Heterogenität bezüglich des Vorliegens der *Hotspot*-Mutationen innerhalb einer CTC-Population derselben Patientin bestehen kann. Diese Heterogenität bestätigt die Relevanz der Charakterisierung von CTC im Hinblick auf eine individualisierte Therapieentscheidung. Die Analyse der DNA Sequenz könnte in Zukunft neben dem *PIK3CA*-Gen auf andere therapeutisch relevante Gene wie *PTEN* oder *ER* ausgedehnt werden. Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Korrelation der Morphologie von CTC mit der Qualität der PCR-Produkte nach WGA. So kann in Zukunft früher abgeschätzt werden, welche Zellen eine hohe Qualität im weiteren Prozess zeigen werden, was die Effizienz des Arbeitsablaufes steigern wird. Die vorliegende Arbeit bildet die Grundlage zur Charakterisierung und Analyse von CTC auf Einzelzellebene am Beispiel des *PIK3CA*-Gens.

## Abstract

With 71,460 new cases every year, breast cancer is the most common malignancy among women in Germany. Currently, circulating tumor cells (CTC) that shed from the primary tumor into the blood stream, are receiving great attention in clinical research. The high relevance of CTC as a prognostic marker in terms of progression-free and overall survival and as an indicator of treatment response has been already demonstrated in several studies. Primary tumor, metastatic lesions and CTC often show a divergence in the expression of molecular markers. However, the treatment decision is based mostly on the molecular characteristics of the primary tumor so far. The intratumoral heterogeneity and the heterogeneity between the primary tumor, metastases and CTC can often not be considered in this decision. Thus, direct analysis of molecular markers of CTC could be used as "liquid biopsy". This new biopsy would be easy to perform at any time and reflects the status of the disease in real-time.

This work focuses on the analysis of CTC of metastatic breast cancer patients from the DETECT III / IV studies, in particular on the detection of mutations of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) pathway. The PI3K- /Akt pathway plays an important role in cellular processes such as cell differentiation and proliferation. Due to the mutation of the PIK3CA gene, especially mutations of the hotspot regions E545A / E545K / E542K and H1047R, on exons 9 and 20, the PI3K signaling pathway is often dysregulated. This may cause drug resistance, e.g. against human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-targeted therapy of breast cancer patients.

The establishment of a workflow is presented in this work, which enables the detection of four possible hotspot mutations in the PIK3CA gene using Cell-Search®, CellCelector, Whole Genome Amplification (WGA), gene-specific PCR and Sanger sequencing.

A total of 55 CTC from 9 patients were analyzed. In patient 8, a mutation of the E545K hotspot (exon 9) was detected on 2 out of 8 CTC, 3 out of 8 CTC showed wild-type DNA. On patient 3, the hotspot mutation E545A (exon 9) was found on 5 out of 22 CTC, the mutation E545K (exon 9) on 2 out of 22 CTC and wild-type DNA on 4 out of 22 CTC. Overall, a detection rate of 16.4% (9/55 CTC) was achieved, which corresponds to the current standard of other work. Also, the present work demonstrated that heterogeneity may exist within a CTC population of the same patient. This heterogeneity emphasizes the relevance of characterizing CTC for an individualized treatment decision that reflects the heterogeneous characteristics of CTC and the primary tumor. In the future, this analysis could be extended to other therapeutically relevant genes such as PTEN or ER. An additional focus of this work is the correlation of the morphology of CTC with the quality of PCR products after WGA. This correlation enables to estimate in advance which cells will show a high quality in the further process. The efficiency of the workflow can be significantly increased. By means of this work, the technical basis for the characterization and analysis of CTC at the single cell level could be established using the example of the PIK3CA gene.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
APC	Allophycocyanin
Array-CGH	Array based- comparative genomic hybridization
BMFZ	Biologisch-medizinische Forschungszentrum der HHU Düsseldorf
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2
CK	Zytokeratin
CTC	Circulating tumor cells
DAPI	4,6 Diamidin-2 phenylindol
DCIS	Duktales Karzinom in situ
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTC	Disseminated tumor cells
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EpCAM	Epithelial cellular adhesin molecule
ER	Östrogenrezeptor
GII	Genome Integrity Index
H <sub>2</sub> O	Wasser
LCIS	Lobuläres Karzinom in situ
MET	Mesenchymale-epitheliale Transition
Min	Minute
ml	Milliliter
mTOR	Mammalian target of rapamycin
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
NST	No-special-type
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent-kinase</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
pg	<i>Pikogramm</i>
PI3K	<i>Phosphatidyinositol-3-Kinase</i>
PIP2	<i>Phosphatidyinositol-4,5-biphosphat</i>
PIP3	<i>Phosphatidyinositol-3,4,5-triphosphat</i>
PR	<i>Progesteronrezeptor</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>
QC	<i>Quality Control</i>
SMA	<i>Smooth muscle actin</i>
TGF $\alpha$	<i>Transforming growth factor alpha</i>
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
V	<i>Volt</i>
WGA	<i>Whole Genome Amplification</i>
WT	<i>Wildtyp</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Krebserkrankungen .....	1
1.2 Mammakarzinom.....	2
1.2.1 Inzidenz und Risikofaktoren .....	2
1.2.2 Histologie und Klassifizierung.....	2
1.2.3 Therapiemöglichkeiten .....	4
1.3 Metastasierung.....	5
1.4 Prognostische und klinische Relevanz von CTC.....	8
1.5 Heterogenität von Primärtumor und CTC.....	9
1.6 Detektion und Isolation von CTC.....	10
1.7 Der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg .....	11
1.7.1 Funktionsweise des PI3K-Signalweges .....	11
1.7.2 Rolle des PI3K-Signalweges im Mammakarzinom und in CTC.....	13
1.8 Einzelzellanalyse .....	14
1.9 DETECT III/IV-Studien .....	15
1.10 Ziele der Arbeit.....	16
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1 Material.....	17
2.1.1 Geräte .....	17
2.1.2 Kommerzielle Kits .....	17
2.1.3 Verwendete Reagenzien und Puffer .....	17
2.1.4 Primer.....	17
2.2 Patientinnen und Blutproben aus den DETECT III/IV-Studien.....	17
2.3 Zelllinien und Zellkultur .....	18
2.3.1 Zelllinien .....	18
2.3.2 Zellkultur .....	18
2.3.3 Bestimmung der Zellzahl .....	19
2.4 Mutationsanalyse zirkulierender Tumorzellen aus den DETECT III/IV-Studien.....	19
2.4.1 Anreicherung EpCAM <sup>POS</sup> -Zellen mittels CellSearch <sup>®</sup> .....	19
2.4.2 CD45-Nachfärbung.....	21
2.4.3 Isolation von Einzelzellen mit dem CellCelector <sup>TM</sup> .....	22
2.4.4 Whole Genome Amplification.....	23
2.4.5 Qualitätskontrolle der PCR.....	27
2.4.6 Agarosegelelektrophorese .....	29
2.5 Sanger-Sequenzierung der CTC.....	30
2.5.1 Genspezifische PCR der Exone 9 und 20 .....	30
2.5.2 Aufreinigung mit Exo-Sap .....	32
2.5.3 DNA-Quantifizierung mittels Nano-Drop und anschließende Sequenzierung in Kooperation mit dem BMFZ.....	32
2.6 Bilderanalyse der CellCelector-Aufnahmen .....	33
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1 Klinische Patientendaten .....	34
3.2 Anreicherung und Isolation von CTC .....	35
3.2.1 CellSearch <sup>®</sup> .....	35
3.2.2 Klassifizierung der HER2/neu Expression auf CTC .....	35
3.2.2 Einzelzellisolation und Amplifikation der genomischen DNA auf Einzelzellebene ....	36
3.3 Ergebnisse der Bildanalysen .....	38
3.3.1 Einteilungen der Kategorien.....	38
3.3.2 Auswertung der Bildanalysen.....	39

3.4 WGA-Ergebnisse .....	41
3.5 Ergebnisse der genspezifischen PCR.....	44
3.6 Ergebnisse des Sanger-Sequenzierens.....	48
3.7 Klinische Daten der Patientinnen mit PIK3CA-Mutation .....	52
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>53</b>
4.1 Vorbemerkung .....	53
4.2 Diskussion der Ergebnisse einzelner Untersuchungsaspekte.....	54
4.2.1 WGA-/QC-Ergebnisse .....	54
4.2.2 Genspezifische PCR .....	55
4.2.3 Sequenzierverfahren.....	57
4.2.4 Genotypische Heterogenität der CTC innerhalb einer Patientin .....	59
4.2.5 Korrelation mit klinischen Daten .....	62
4.2.6 Bilderanalysen .....	62
4.3 Limitationen der Arbeit .....	63
4.4 Zusammenfassung und Ausblick.....	65
<b>5 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
<b>6 Anhang .....</b>	<b>72</b>
6.1 TNM-Klassifikation und UICC-Stadien .....	72
6.2 Material.....	73
6.3 PCR Protokolle.....	74
6.3.1 WGA .....	74
6.3.2 QC-PCR .....	77
6.3.3 Genspezifische PCR .....	78
6.4 Primer.....	78
6.5 Klinische Patientendaten .....	79
6.6 Nukleotidabfolge der Hotspotregionen von Exon 9 und 20, des Pseudogens und der Primer.....	81
6.7 Abbildungen der Sequenziererergebnisse.....	82

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebserkrankungen

Mit rund 482 470 Neuerkrankungen und 223 093 Todesfällen im Jahr 2013 (1) gehören Krebserkrankungen nach den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zu den zweithäufigsten Todesursachen in ganz Deutschland. Die Hälfte dieser Erkrankungen fällt auf die Krebsformen Prostata-, Brust-, Darm- und Lungenkrebs (1). Umgangssprachlich fasst der Begriff Krebs verschiedene maligne Neoplasien beziehungsweise Tumore zusammen, welche durch unkontrollierte Proliferation körpereigener Zellen entstehen. Maligne Tumore zeichnen sich durch ein unkontrolliertes Wachstum in das umliegende Gewebe (Invasion) aus, welches dadurch infiltriert und zerstört wird. Überdies können sich Zellen vom Primärtumor lösen und in entfernten Organen Metastasen bilden. Im Gegensatz dazu stehen benigne Neubildungen, welche ebenfalls eine unkontrollierte Zellteilung aufweisen, die jedoch langsamer fortschreitet, lokal begrenzt bleibt und nicht das umliegende Gewebe infiltriert [(2),(3),(4)].

In einem gesunden Organismus besteht ein Gleichgewicht zwischen den Zellen, die sich vermehren und den Zellen, die aufgrund verschiedener Mechanismen wie z.B. Apoptose oder Autophagie zugrunde gehen. Ist dieses Gleichgewicht durch den Wegfall hemmender Tumorsuppressorgene oder die Verstärkung wachstumsfördernder Signale durch Onkogene gestört, so entsteht eine unkontrollierte Zunahme der Tumorzellmasse (3). Tumorzellen weisen häufig genomische Aberrationen beispielsweise durch Mutationen, Translokationen oder Deletionen auf, welche die Ursache für das oben genannte Ungleichgewicht darstellen können. Diese können sporadisch auftreten oder z.B. bei Mutationen durch fehlende Reparatur der veränderten Desoxyribonukleinsäure (DNA) verursacht sein. Doch auch toxische Effekte, wie zum Beispiel chemische Noxen (Benzol, polyzyklische Kohlenwasserstoffe), physikalische Noxen (UV-Strahlung, radioaktive Strahlung) oder der Lebensstil (Nikotin, erhöhter Body-Mass-Index) können eine Ursache für genomische Aberrationen darstellen. Eine solche pathologische Veränderung kann alle Zellen des Körpers betreffen. Entwickeln sich Tumore aus dem Epithel (Oberflächengewebe) von Organen wie der Brustdrüse, des Darmes oder der Lunge, spricht man von Karzinomen [(2),(3)].

## 1.2 Mammakarzinom

### 1.2.1 Inzidenz und Risikofaktoren

Mit jährlich 71 640 Neuerkrankungen deutschlandweit ist das Mammakarzinom die mit Abstand häufigste Krebserkrankung und Todesursache bei Frauen (1). Auf der Basis aktueller Inzidenzraten zeigt sich, dass eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens am Mammakarzinom erkrankt und fast drei von zehn Frauen bei Erstdiagnose jünger als 55 Jahre sind. Nach Einführung des Routine-Mammographie-Screenings für alle Frauen ab 50 Jahren seit 2005 sind die Detektionsraten zunächst stark angestiegen, haben sich jedoch seit 2009 wieder rückläufig entwickelt (1). Die höhere Detektionsrate ist wahrscheinlich auch durch die Diagnose von Tumoren bedingt, die ohne *Screening*-Maßnahmen unerkannt geblieben wären. Trotz der gestiegenen Zahl an Neuerkrankungen sterben heutzutage weniger Frauen an Brustkrebs als vor 10 Jahren, was auf verbesserte Therapiemaßnahmen zurückzuführen ist [(1), (5)].

Als Risikofaktoren für ein Mammakarzinom gelten eine frühe Menarche und späte Menopause, ein höheres Alter bei Erstgeburt sowie Kinderlosigkeit. Eine Hormonersatztherapie in den Wechseljahren, insbesondere mit einer Kombination aus Gestagen und Estrogenpräparaten, steigert ebenfalls das Risiko, ebenso wie eine genetische Disposition, zum Beispiel eine Mutation in den Genen *Breast-Cancer-1/2* (BRCA1/2). Hierdurch wird die Wahrscheinlichkeit, an Brustkrebs zu erkranken, um 45-80 % erhöht. In Studien wurde auch ein erhöhtes Risiko für Frauen mit Übergewicht und Bewegungsmangel nachgewiesen, Alkohol und Nikotin sind ebenfalls als Risikofaktoren belegt [(1), (5)].

### 1.2.2 Histologie und Klassifizierung

Histologisch werden je nach Ursprungsgewebe unterschiedliche Karzinome definiert. Es gibt vom Milchgangepithel (duktale) oder von Drüsenläppchen ausgehende (lobuläre) Tumore (6). Für beide Formen ist ein intraepithelial wachsendes *in-situ*-Karzinom als Vorläuferläsion bekannt (duktales Karzinom *in situ*, DCIS; lobuläres Karzinom *in situ*, LCIS). Der häufigste Tumortyp beim Mammakarzinom

ist mit 70-80 % das Adenokarzinom (vom Drüsenepithel ausgehend) ohne besondere Merkmale („no special type“, NST). Es handelt sich um eine heterogene Gruppe invasiver Tumore, deren gemeinsames Merkmal ist, keine ausreichenden Charakteristika aufzuweisen, um einem bestimmten Typ zugeordnet zu werden (7). Die Definition des NST-Mammakarzinoms ist identisch mit der des invasiv duktales Mammakarzinoms. Seltener sind der invasiv lobuläre Typ (10-15 %) sowie das invasiv tubuläre, muzinöse, papilläre Karzinom [(6),(7)].

Die histologischen Tumorguppen werden anhand struktureller Marker und ihrer Kernteilungsraten in drei Differenzierungsgrade (Grading, G1 bis G3) eingeteilt. G1 steht für gut differenziertes, G2 für mäßig differenziertes und G3 für gering differenziertes Tumorgewebe. Je geringer differenziert das Gewebe ist, desto schlechter fällt die Prognose für den Patienten aus (5).

Die TNM-Klassifikation berücksichtigt die Tumorgöße (T), den Lymphknotenbefall (N) und die Metastasierung (M) (siehe Anhang 6.1, Tabelle 20).

Die Stadieneinteilung erfolgt nach der *Union for International Cancer Control* (UICC) und ist im Anhang 6.1, Tabelle 21 wiedergegeben.

Der Hormonrezeptorstatus wird immunhistochemisch festgestellt, indem der Prozentsatz der Zellen bestimmt wird, die den Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER) und die Progesteronrezeptoren (PR) A und B exprimieren. Zur Bestimmung des PR- und ER-Status wird zusammen mit der Färbeintensität der 12-stufige Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner errechnet. Liegt der Nachweis dieser Rezeptoren oberhalb des Schwellenwerts, liegt ein ER-/PR-positiver Tumor vor. Diese Hormonrezeptor-positiven Tumore werden einer adjuvanten endokrinen Therapie zugeführt mit beispielsweise Tamoxifen oder Aromatasehemmern.

Zur Bestimmung des Her-2/neu-Rezeptorstatus wird ein 4-stufiger Her-2 Score angewandt, der sich nach der immunhistochemischen Färbeintensität richtet. Score 0 steht für einen negativen Her-2/neu-Rezeptorstatus, Score 3+ für ein Her-2/neu-positives Tumorgewebe (5). Ab Score 2 wird mittels der Fluoreszenz-in-situ-Färbung (FISH) die Positivität des Scores überprüft, indem die Amplifikation des Her-2/neu-Gens überprüft wird.

Für eine spätere Therapieentscheidung ist diese Einteilung hochrelevant, da dann Antikörper oder Inhibitoren des betreffenden Signalweges eingesetzt werden können (5), wie zum Beispiel Trastuzumab (Antikörper, s.Kapitel 1.2.3) und Lapatinib (Tyrosinkinaseinhibitor, s. Kapitel 1.2.3).

### 1.2.3 Therapiemöglichkeiten

Bis heute beruhen die Therapieentscheidungen ausschließlich auf der Gewebepathologie, den molekularen Merkmalen des Primärtumors und der klinischen Symptomatik der Patientin. Gemäß der S3-Leitlinie für das Mammakarzinom sind prognostische Faktoren, wie das TNM-Stadium, der Hormonrezeptorstatus, der Her-2/neu-Status, das Grading, das Alter mit Menopausenstatus und die Vorerkrankungen der Patientin bei der Wahl der Therapie ebenfalls ausschlaggebend. Eine möglichst vollständige chirurgische Resektion des Primärtumors sowie die Strahlentherapie von Restgewebe oder Lymphknotenmetastasen sollen vor allem eine lokale Tumorkontrolle bewirken. Im Vorfeld der Operation kann eine neoadjuvante Therapie (Chemo- und/oder Bestrahlungstherapie) erfolgen, um eine Verkleinerung des Tumors zu erreichen und damit seine Operabilität zu verbessern. Die adjuvante Systemtherapie wird bei Patientinnen nach der Operation ohne manifeste Metastasen eingesetzt. Diese drei Säulen – Operation, Radiatio und Systemtherapie – stellen das multimodale Therapiekonzept der modernen Brustkrebsbehandlung dar [(5),(8)]. Im Folgenden wird vor allem die Systemtherapie erläutert, da die Substanzen dieser Therapiegruppe für die weitere Fragestellung von Bedeutung sind.

Die klassischen Chemotherapeutika, denen das Prinzip der schnell proliferierenden Tumorzellen zugrunde liegt, verhindern durch Interkalierung in die DNA die Teilung einer Tumorzelle. Die Anti-Hormontherapie mit z.B. Tamoxifen oder Aromataseninhibitoren kommt bei Hormonrezeptor-positiven Tumoren zum Einsatz. Bei Her2/neu überexprimierenden Tumoren ist Trastuzumab ein Beispiel für eine zielgerichtete Therapie. Trastuzumab blockiert als Antikörper die extrazelluläre Domäne des Her-2/neu-Rezeptors. Daneben kann mit z.B. mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib die Weiterleitung der Signale des Her2/neu Rezeptors intrazellulär blockiert werden. Das dritte Prinzip der Systemtherapie beruht auf der Milieumodifikation. Mit Therapeutika dieser Wirkungsweise wird die direkte Umgebung der Tumorzellen verändert, indem beispielsweise durch eine Behandlung mit Bevacizumab die Gefäßneubildung (Angiogenese) gehemmt und so die Tumorpheriferation vermindert wird. (9).

### 1.3 Metastasierung

Ca. 90 % aller krebsbedingten Todesfälle sind durch die fortschreitende Metastasierung weiterer Organe und nicht durch den Primärtumor selbst bedingt [(10),(11)]. Die Ausbildung solcher Metastasen erfolgt durch die Ablösung einzelner Tumorzellen aus dem Verband des Primärtumors, das Eindringen der Zelle in die Blut- oder Lymphbahn (Intravasation), die Extravasation aus dem Blut- oder Lymphgefäß in die distanten Organe und die dortige Ansiedlung der Tumorzellen [(10),(11),(12)].

Normalerweise unterliegen epitheliale Zellen, die sich aus ihrem Verband herauslösen, dem Prozess der Anoikis, also einem Vorgang, bei dem Zellen, die den Zell-Matrix-Kontakt verloren haben, an dem programmierten Zelltod zu Grunde gehen (11). Tumorzellen, die diesen Prozess des Herauslösens aus dem Primärtumor durchlaufen, geben deshalb einige ihrer epithelialen Eigenschaften zugunsten eines mesenchymalen Zelltyps ab [(13),(14),(15)]. Mesenchymale Zellen zeigen eine höhere Zellmotilität, erhöhte migratorische Fähigkeiten und ein höheres Proliferationspotential als epitheliale Zellen (16). Diese Umwandlung ist als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bekannt und tritt physiologisch in der Embryonalentwicklung und Wundheilung auf. Zellen, die die EMT durchlaufen, verlieren zum Beispiel ihre Zellpolarität und interzellulären Adhäsionsmoleküle (Desmosomen, E-Cadherine, Occludine), [(14),(15),(16),(17)]. Im Gegenzug exprimieren sie verstärkt mesenchymale Proteine wie Vimentin und *Smooth muscle actin* (SMA) aus, welche zu einem flexibleren Zytoskelett und einer erhöhten Motilität führen. So erlangt die Zelle die Fähigkeit, aus dem Tumor in das umliegende Stroma zu migrieren und in die Gefäße des Blut-/Lymphsystems zu gelangen [(15),(16),(18)]. Welche Faktoren diese Transition auslösen, ist noch weitgehend unbekannt; es wird vermutet, dass unter anderem Wachstumsfaktoren wie EGF, *Scatter factor* (SF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF) und Kollagen Teil der Ursache-Wirkungskette sind (15). Im weiteren Verlauf muss die betreffende Zelle den vorherrschenden Scherkräften der Blutzirkulation und dem Immunsystem widerstehen, die Fähigkeit besitzen, der Anoikis zu entgehen und damit eine erhöhte Resistenz gegen Apoptose zeigen (11). Zellen, die im

Lymphsystem zirkulieren, können Metastasen in Lymphknoten bilden, während die im Blutstrom zirkulierenden Tumorzellen durch die kleinen Kapillaren innerhalb der Organe physisch gebremst werden, sich an das Endothel des Blutgefäßes anlagern und in das Zielgewebe migrieren können (Extravasation) (18). Um im Zielgewebe einen neuen, stabilen Zellverband zu bilden, nimmt die Zelle wieder ihren epithelialen Phänotyp an, dieser Prozess wird mesenchymale-epitheliale Transition genannt (MET) (13). Es ist davon auszugehen, dass nur einzelne Zellen des Primärtumors die Fähigkeiten besitzen, diesen komplexen Metastasierungsprozess zu durchlaufen und Fernmetastasen zu bilden (18). Gegenwärtig gibt es mehrere Theorien bezüglich der Frage, ob die Streuung von Tumorzellen zu einem frühen oder späten Zeitpunkt stattfindet, und sie werden kontrovers diskutiert. Das Modell der linearen Progression geht davon aus, dass einzelne Zellen des Primärtumors den genetischen Veränderungsprozess hin zu höherer Malignität innerhalb des Primärtumors durchlaufen, um dann am Ende dieses Prozesses zu disseminieren und metastatische Läsionen zu bilden. Dagegen postuliert das Modell der parallelen Progression, dass Tumorzellen den Verband des Primärtumors schon relativ früh in der Tumorgenese verlassen, um dann erst den malignen Phänotyp der Metastasierung an ektopischen Stellen zu erreichen [(2),(19),(20)]. Abbildung 1 stellt den Prozess der Metastasierung vereinfacht dar.

## Heterogener Primärtumor

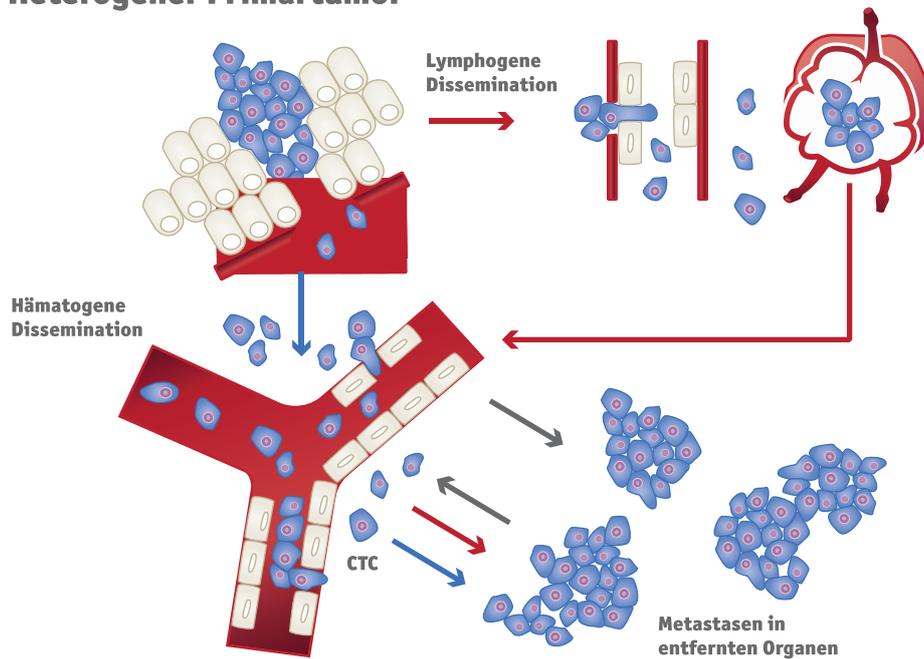


Abbildung 1: Prozess der Metastasierung. CTC lösen sich ab vom Primärtumor und treten in die Blut- und Lymphbahnen über. Einige dieser Zellen können im Verlauf Fernmetastasen bilden. (Eigene Darstellung in Anlehnung an Pantel et. al, Nat Rev Cancer, 2004 (21))

Einzelne Tumorzellen oder kleine Zellaggregate, die nach der vollständigen Resektion des Primärtumors im Körper verbleiben, sind als sogenannte *Minimal Residual Disease* bekannt (22). Sie sind weder mit Hilfe von Routinediagnostik noch mit Hilfe von hochauflösenden modernen Bildgebungsverfahren detektierbar. Sie sind z.B. im Knochenmark als sogenannte disseminierte Tumorzellen (DTC) nachweisbar und bilden wahrscheinlich die Grundlage für das erneute Auftreten der Krebserkrankung in Form von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen [(21),(22)]. Zirkulieren Tumorzellen in der Blutbahn, werden sie zirkulierende Tumorzellen (CTC) genannt. Das Vorkommen von CTC und DTC wird mit einer schlechteren Prognose für die betroffene Patientin, wie einem geringeren Gesamtüberleben, assoziiert (23). Aus diesem Grund sind heute die Detektion und Analyse dieser Zellen von großem Interesse in der Krebsforschung.

## 1.4 Prognostische und klinische Relevanz von CTC

Bis zum heutigen Tag stützen sich Entscheidungen über die Therapie von Mammakarzinompatientinnen vor allem auf die durch eine Gewebebiopsie festgestellten molekularen Merkmale des Primärtumors. Die Gewebebiopsie wird zu einem einmaligen Zeitpunkt punktuell durchgeführt. Eine Metastasenbiopsie wird gemäß den aktuellen Leitlinien empfohlen, ist aber nicht immer klinisch realisierbar (5). Die Biopsie spiegelt aus diesem Grund nicht unbedingt alle Merkmale der verschiedenen Subpopulationen des Tumors und seiner Metastase(n) wider. Die Progression einer Metastase kann zudem viele Jahre nach Resektion des Primärtumors auftreten. In der Zwischenzeit können durch Selektionsdruck neue, heterogene Subpopulationen von Tumorzellen entstanden sein, die nicht mehr dieselben Marker wie der Primärtumor exprimieren (24). Die Analyse dieser Zellen kann wichtige Informationen erbringen, auf deren Grundlage eventuell gezieltere Therapieansätze möglich werden.

Hier bietet sich die Analyse von CTC an, da für dieses Verfahren nur eine minimal-invasive Blutentnahme notwendig ist, die zu beliebigen Zeitpunkten wiederholt werden kann (*Liquid Biopsy*). So können die Veränderungen des Tumors/der Metastase und der CTC in Echtzeit wiedergespiegelt werden. Zudem ist die Methode leicht durchführbar und mit minimalen Risiken für die Patientin verbunden (24).

Aus diesem Grund ist die Forschung an CTC darauf ausgerichtet, das Verständnis des Metastasierungsprozesses zu verbessern, neue therapeutische Ziele zu identifizieren, individualisierte Therapieentscheidungen in Echtzeit zu ermöglichen und Methoden zu entwickeln, die eine genauere Einschätzung der metastatischen Progression erlauben (prognostische Information). Die prognostische Signifikanz von CTC im peripheren Blut von Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs wurde durch mehrere klinische Studien belegt. Unter anderem zeigten Christofanilli *et al.* und Bidard *et al.*, dass metastasierte Brustkrebspatientinnen mit  $\geq 5$  CTC in 7,5 ml Blut im Vergleich zu Patientinnen mit  $< 5$  CTC/7,5 ml Blut ein kürzeres medianes progressionsfreies Intervall (2,7 Monate vs. 7 Monate (23)) und ein kürzeres Gesamtüberleben (10,1 Monate vs.  $> 18$  Monate (23)) aufwiesen [(23),(25)]. Der Nachweis von CTC kann also als unabhängiger Prognosefaktor für metastasierte Brustkrebspatientinnen dienen, ebenso wie für andere Tumorentitäten, wie Prostatakarzinom (26) und kolorektales Karzinom (27).

Die prognostische Relevanz der CTC als Indikator für Therapieerfolg und Gesamtüberleben konnte inzwischen ebenfalls für die neoadjuvante und adjuvante Therapie gezeigt werden [(28),(29)]. Kasimir-Bauer *et al.* konnten außerdem nachweisen, dass Tumorzellen im Knochenmark auch nach einer Hochdosis-Chemotherapie noch nachweisbar waren (30). Dies stellt die Bedeutung der Detektion immuntherapeutischer Ziele auf CTC heraus, um in Zukunft diese Zellen eventuell mit einer kombinierten Immun-Chemotherapie zu eliminieren.

Die CTC-Zahl im peripheren Blut könnte ebenfalls als Marker für den Erfolg einer Therapie eingesetzt werden, da sich erwiesen hat, dass sie die Wirkung einer Therapie verlässlicher voraussagt als herkömmliche radiologische Begutachtungen [(31, 32)].

### **1.5 Heterogenität von Primärtumor und CTC**

Die bisherigen Therapieentscheidungen stützen sich vor allem auf die molekularen Merkmale des Primärtumors, wie die Einleitung einer endokrinen Therapie bei ER-/PR-positiven Tumoren (5). Zwischen CTC und Primärtumor kann jedoch häufig eine Divergenz in Bezug auf diese molekularen Marker festgestellt werden. Fehm *et al.* zeigten die Heterogenität der CTC untereinander und von CTC und Primärtumor anhand des Hormonrezeptorstatus sowie des Her-2/neu-Status. In nur 53 % der Vergleiche ergab sich eine Konkordanz zwischen dem Her-2/neu-Rezeptorstatus der untersuchten CTC und des korrespondierenden Primärtumors. In 29 % der Fälle stimmten der ER-status und in 25 % der Fälle der PR-status von Primärtumor und CTC überein, so dass hier große Divergenzen entstehen können (33). Meng *et al.* wiesen in Einzelfällen nach, dass bei metastasierten Mammakarzinompatientinnen mit einem Her-2/neu-negativen Primärtumor Her-2/neu-positive CTC im Blut zirkulierten. Diese Patientinnen könnten von einer Therapie mit Anti-Her-2/neu-Therapeutika profitieren [(34, 35)]. Der Nachweis der Heterogenität zwischen Primärtumor und CTC legt nahe, dass durch eine frühzeitige Charakterisierung der CTC die Therapie personalisiert werden könnte, wodurch beispielsweise eine Eindämmung der Metastasierung erreicht werden könnte. (35). Vor diesem Hintergrund wird die klinische Relevanz der Einzelzellanalyse deutlich. Analyse und Charakterisierung des Primärtumors

und der CTC könnten in Zukunft wichtige Anhaltspunkte für Therapieentscheidungen bereitstellen. Die phänotypischen Unterschiede beschränken sich nicht nur auf den Hormonstatus des Primärtumors beziehungsweise der CTC, sondern bestehen auch bei Markern wie dem Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC I), der bei CTC häufig supprimiert ist (36) oder in der Expression proliferationsassoziiierter Marker, zum Beispiel EGF-Rezeptoren (37). Auch genomische Aberrationen, wie Mutationen des *PIK3CA*-Gens (38), zeigen eine Divergenz zwischen Primärtumor und CTC ebenso wie Heterogenität innerhalb einer CTC-Population aus derselben Patientin (39).

### **1.6 Detektion und Isolation von CTC**

Mit ca. 10 CTC unter  $6 \times 10^6$  Leukozyten,  $2 \times 10^8$  Thrombozyten und  $4 \times 10^9$  Erythrozyten pro ml Blut sind dies selten vorkommende Zellen [(40, 41)]. Für eine erfolgreiche Detektion der CTC müssen sensitive Methoden zur Anreicherung und zum Nachweis zur Verfügung stehen. Hierbei werden von verschiedenen Systemen unterschiedliche Zelleigenschaften ausgenutzt. Die Zellseparation kann physikalisch anhand von Größe und/oder Zelldichte erfolgen, zum Beispiel durch Filtration. Zum anderen können charakteristische Oberflächenmarker der CTC (vor allem *Epithelial Cell Adhesion Molecule*, EpCAM) zur Separation genutzt werden, da der Tumor und damit die CTC epithelialen Ursprungs sind (42),(43).

Das einzige von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene System ist derzeit das CellSearch<sup>®</sup>-System (s. Anhang 6.2, Tabelle 22) [(23),(44)]. Die Anreicherung und Detektion der epithelialen CTC erfolgt anhand der EpCAM-Oberflächenmarker. Immunomagnetische Partikel, gekoppelt an Antikörper gegen EpCAM, binden an diese Oberflächenmarker und durch Anlegen eines magnetischen Feldes können die CTC von den anderen EpCAM-negativen Blutzellen getrennt werden. Weitere Kriterien des CellSearch<sup>®</sup>-Systems sind eine Positivität für die Zytokeratine 4-6, 8, 10, 13, 18 und 19 (45), eine Positivität für 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), welches die DNA des Zellkerns anfärbt. Weiterhin erfolgt der Ausschluss von Leukozyten durch Negativität des hämatopoietischen Markers CD45 als Negativkontrolle. Der Zellkern sollte mindestens zu 50 %

innerhalb des Zytoplasmas liegen und sollte einen Durchmesser von mindestens 4  $\mu\text{m}$  (44) haben. Da die CTC-Bestimmung mit dem CellSearch-System weitestgehend automatisiert und standardisiert erfolgt, zeichnet sie sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate aus (44). Die prognostische Relevanz der CTC-Bestimmung mittels des CellSearch<sup>®</sup>-Systems konnte in großangelegten Studien gezeigt werden (23). Der Nachteil dieses System besteht darin, dass nur EpCAM-positive CTC angereichert und detektiert werden können. Zur Isolierung einzelner CTC können diese nach ihrer Detektion mit Hilfe verschiedener Methoden vereinzelt werden. In diesem Projekt wurde hierzu mit dem CellCelector (s. Anhang 6.2, Tabelle 22) ein automatisierter Mikromanipulator erfolgreich eingesetzt.

## 1.7 Der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg

### 1.7.1 Funktionsweise des PI3K-Signalweges

Die PI3K sind intrazelluläre Kinasen, deren primäre Funktion es ist, Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>) umzusetzen, welches die Serin-/Threoninkinase Akt (auch Proteinkinase B) und die *Phosphoinositide-dependent-kinase* (PDK1) aktiviert. Diese sind für zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, -migration und Apoptoseinhibition verantwortlich [(46),(47)].

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K-) Signalweg spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Tumorentitäten. Mutationen, die diesen Signalweg betreffen, treten häufig bei verschiedenen Krebserkrankungen auf und haben unter anderem eine verstärkte Resistenzentwicklung gegen auf Her-2/neu gerichtete Therapeutika zur Folge [(48),(49),(50)]. Auch beim Mammakarzinom spielt dieser Signalweg eine wichtige Rolle und ist daher seit mehreren Jahren von großem Interesse für die Brustkrebsforschung.

Die PI3K-Familie besteht aus drei funktionellen Klassen, die wiederum aus insgesamt acht Isoformen bestehen (47). Im Folgenden wird die Funktion der Klasse IA beschrieben. Die Klasse IA-Kinase besteht aus zwei Untereinheiten, der katalytischen Untereinheit p110 $\alpha$  und der regulatorischen Untereinheit p85 $\alpha$ . Die Aktivierung der Kinase erfolgt nach der Bindung von Liganden wie *Epidermal*

*Growth Factor* (EGF) oder *Transforming Growth Factor*  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) an eine transmembrane Rezeptortyrosinkinase der Familie der epithelialen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR), zu der auch der Her-2/neu-Rezeptor gehört [(46),(47)]. Das Binden der entsprechenden Liganden führt zu einem Wegfallen der inhibitorischen Wirkung von p85 $\alpha$  auf die Untereinheit p110 $\alpha$ , es erfolgt die volle Aktivierung der PI3K. Die aktivierte Kinase katalysiert die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3, welches die zentrale Bindestelle für Akt und PDK1 darstellt. Diese Kinasen vermitteln wichtige zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Zellzyklusregulation und Apoptose über die Aktivierung des *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Zusätzlich zu dem aktivierenden Signalweg gibt es auch einige inhibitorische Komponenten, wie zum Beispiel *phosphatase and tensin homologue* (PTEN). PTEN dephosphoryliert PIP3 zu PIP2 und ein Verlust der PTEN-Funktion ist mit einem deregulierten PI3K-Signalweg assoziiert [(46),(47)]. Abbildung 2 stellt den Zusammenhang graphisch dar.

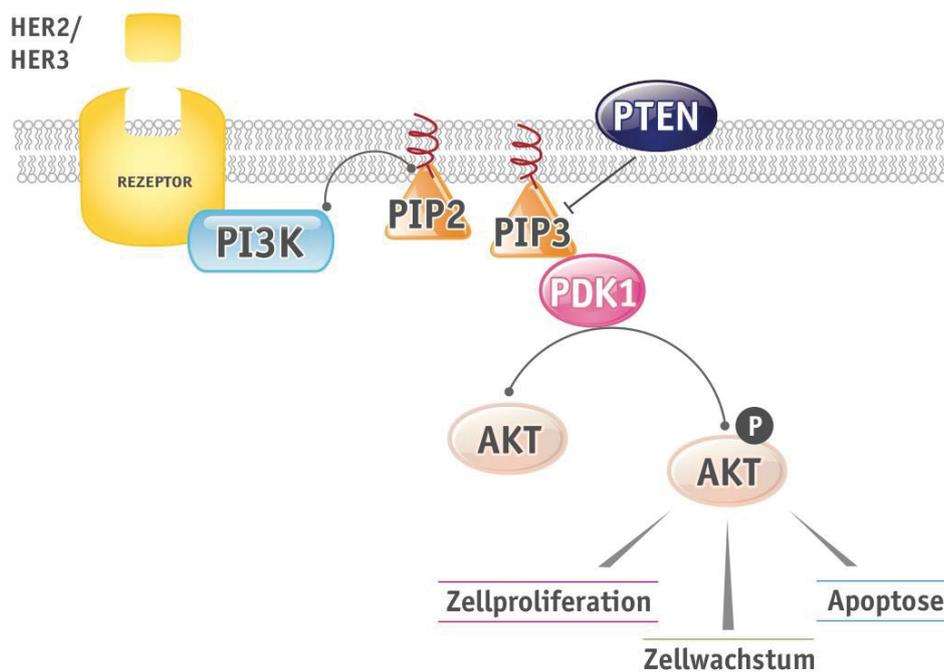


Abbildung 2: Dargestellt ist der PI3K-Signalweg. Die Bindung eines extrazellulären Liganden an die transmembranäre Rezeptortyrosinkinase führt zu einer Aktivierung der PI3-Kinase. Es folgt die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3. PIP3 ist die zentrale Bindestelle für Kinasen wie AKT und PDK1, die wiederum über intrazelluläre Signalwege Zellproliferation, Zellwachstum und Apoptose regulieren. PTEN dephosphoryliert PIP3 zu PIP2 und stellt eine inhibitorische Komponente dar. (Eigene Darstellung in Anlehnung an A. Greife, W. A. Schulz, HHU Düsseldorf)

### 1.7.2 Rolle des PI3K-Signalweges im Mammakarzinom und in CTC

Gene, die für Proteine des PI3K-Signalwegs kodieren, sind in Brustkrebszellen häufig mutiert. Die Mutationen betreffen meistens das Gen *PIK3CA*, welches für die katalytische Untereinheit p110 $\alpha$  kodiert. Vor allem vier Hotspotregionen sind von Interesse, E542K, E545A und E545K der katalytischen Domäne in Exon 9 und H1047R der Kinase-Domäne in Exon 20 (47). Treten hier Mutationen auf, die zum Aminosäureaustausch führen, erhöht sich die enzymatische Funktion, der Akt/mTOR-Signalweg wird dauerhaft aktiviert und die onkogene Transformation von Zellen wird vorangetrieben [(51),(52),(53)]. Insgesamt zeigen sich Mutationen in den oben genannten Hotspots in 20-25 % aller Brustkrebsarten (54). Bei Hormonrezeptor-positiven Subtypen treten die Mutationen besonders häufig auf (30 %), ebenso wie bei Her-2/neu-positiven Tumoren (22,7 %), wohingegen sie in *triple*-negativen Subtypen weniger häufig (8,3 %) vorkommen (54).

Die klinische Relevanz der *PIK3CA*-Mutationen ist zurzeit von großem Interesse für die Krebsforschung aller Entitäten. Samuels *et al.* zeigen in ihrer Veröffentlichung, dass durch die genannten Mutationen in den drei Hotspots des *PIK3CA*-Gens die Kinasefunktion konstitutiv aktiviert und der Akt-Signalweg angeschaltet wird. Zellen mit *PIK3CA*-Mutation weisen eine von Wachstumsfaktor-unabhängige Zellproliferation sowie eine Resistenz gegen Apoptose auf, wenn diese von bestimmten Faktoren eingeleitet wird, sowie eine erhöhte Fähigkeit zur Zellmigration und -invasion (55).

Einer der wichtigsten Gründe für die *PIK3CA*-Analysen ist das Auftreten der *PIK3CA*-Mutation und ein Funktionsverlust der inhibitorischen Phosphatase *PTEN*, was mit einer schlechteren Prognose nach Trastuzumab-Therapie assoziiert ist, da derart mutierte Zellen gegen Her-2/neu-gerichtete Medikamente resistent sind [(48),(56)]. Hanker *et al.* zeigten bei Mäusen mit sowohl Her-2/neu-positiven als auch *PIK3CA*-mutierten Tumorzellen eine Resistenz gegenüber einer Therapie mit Trastuzumab sowie ein schnelleres Tumorwachstum in der Brustdrüse. Bei den Tiermodellen mit Her-2/neu-positiven und *PIK3CA*-mutierten Zellen konnte zudem eine höhere Tumorlast und ein häufigeres Auftreten von Lungenmetastasen nachgewiesen werden als bei Mäusen mit Wildtyp *PIK3CA*

(49). Auch eine verstärkte Resistenz gegen Lapatinib wurde in Zellkulturexperimenten nachgewiesen (50).

Die hohe klinische Bedeutung des PI3K-Signalweges zeigt sich auch an den zahlreichen Ansätzen zur Entwicklung von PI3K-Inhibitoren, die sich in verschiedenen Phasen der klinischen Testung befinden. Sie gruppieren sich in verschiedene Klassen: von reinen PI3K-Inhibitoren über Stoffe, die sowohl PI3K als auch mTOR inhibieren, zu reinen mTOR-Inhibitoren und schließlich Medikamenten, die den Akt-Signalweg hemmen (47).

*PIK3CA*-Hotspotmutationen auf Exon 9 und 20 sind häufig in CTC von metastasierten Brustkrebspatientinnen zu detektieren, sie liegen in 16-35 % der CTC vor [(57),(38),(39),(58)]. Markou *et al.* zeigten, dass sich der *PIK3CA*-Mutationsstatus während des Krankheitsverlaufes ändern kann und dass das Vorliegen von *PIK3CA*-Mutationen mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ist (57).

### **1.8 Einzelzellanalyse**

Die molekulare Analyse und Charakterisierung von Zellen auf Einzelzellebene liefert nicht nur Einblicke in die molekularen Merkmale von Subpopulationen des Primärtumors, sondern dient vor allem dem Nachweis seltener genetischer Veränderungen in einzelnen Tumorzellen. So könnte beispielsweise die *PIK3CA*-Mutation bei einer herkömmlichen Gewebebiopsie eines heterogenen Primärtumors unentdeckt bleiben, mittels Einzelzellanalyse auf CTC-Basis jedoch entdeckt werden. Dies könnte in Zukunft, sollten Therapieentscheidungen aufgrund des Geno-/Phänotyps der CTC getroffen werden, einen großen Unterschied für die Wahl des richtigen Therapeutikums der betreffenden Patientin ausmachen. Aufgrund der sehr geringen DNA-Menge von ca. 7 pg stellt die Einzelzellanalyse eine methodische Herausforderung dar. In der hier vorliegenden Arbeit wird aus diesem Grund zunächst die DNA mittels *Whole Genome Amplification* vervielfältigt, dann erfolgen genspezifische PCR-Amplifikationen der Exone 9 und 20 und anschließend die Sequenzierung der Amplifikate mittels Sanger-Sequenzierung (59).

## 1.9 DETECT III/IV-Studien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Blutproben stammen aus den DETECT III/IV-Studien, deren Ziel eine Evaluation der Wirksamkeit von Therapieentscheidungen ist, die auf der Phänotypisierung von CTC beruhen. Die DETECT III-Studie schließt metastasierte Mammakarzinompatientinnen ein, die mindestens eine Her-2/neu positive CTC aufweisen bei einem Her-2/neu-negativen Primärtumor und/oder einer Her-2/neu-negativen metastatischen Läsion. Es soll festgestellt werden, ob Patientinnen mit einem Her-2/neu-negativen Primärtumor und Her-2/neu-positiven CTC von einer Anti-Her-2/neu-gerichteten Therapie profitieren können. Es handelt sich um eine multizentrische, prospektiv randomisierte, zweiarmige Phase-III-Studie. Eine randomisierte Studiengruppe erhält die Standardtherapie zuzüglich einer Lapatinib-Therapie über 12 Monate, die andere Studiengruppe erhält die Standardtherapie (Chemo- oder antihormonelle Therapie) (60).

Die DETECT IV-Studie ist eine multizentrische, prospektive, offene Phase-II-Studie für Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom mit Her-2/neu-negativem Primärtumor und Her-2/neu-negativen CTC. Die Kohorte der Studie IVa umfasst postmenopausale Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven, Her-2/neu-negativen Primärtumoren mit Indikation für eine endokrine Standardtherapie. Sie erhalten zusätzlich zur endokrinen Standardtherapie für 12 Monate den m-TOR-Inhibitor Everolimus, um dessen Effektivität zur Verhinderung des Krankheitsprogresses zu evaluieren. Die Kohorte der Studie IVb umfasst Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven, Her-2/neu-negativen Primärtumoren mit Indikation zur Chemotherapie oder Patientinnen mit *triple*-negativem Mammakarzinom. Diese Patientinnen erhalten für 12 Monate das Zytostatikum Eribulin, um ebenfalls dessen Effektivität zur Verhinderung einer Krankheitsprogression zu evaluieren (60).

## 1.10 Ziele der Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Analyse und Charakterisierung von CTC aus dem Blut von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom aus den DETECT III/IV-Studien. Der Schwerpunkt liegt auf der Detektion der Mutation des *PIK3CA*-Gens, insbesondere der Hotspotregionen E545A/E545K/E542K und H1047R auf Exon 9 und 20. Das Vorliegen dieser Mutation kann zu einer dysregulierten Zellproliferation und zu einer Resistenz gegen Apoptose führen (55). Klinisch relevant ist die mögliche Resistenzentwicklung gegen Her-2/neu gerichtete Medikamente wie Trastuzumab [(48, 49)].

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Arbeitsablauf von der CTC-Anreicherung mit dem CellSearch<sup>®</sup>-System bis hin zur Sequenzierung der Einzelzellen im Labor der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zu etablieren und die oben genannten *PIK3CA*-Hotspotmutationen zu untersuchen. Zusätzlich sollte festgestellt werden, inwieweit CTC derselben Patientin abweichende oder übereinstimmende genomische Mutationen zeigen, also wie heterogen die CTC-Populationen einer Patientin sind.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Korrelation der Morphologie der CTC mit der Qualität der WGA-Produkte, um mit Hilfe dieser Information in Zukunft abschätzen zu können, bei welchen Zellen eine hohe Qualität in den weiteren Analysen zu erwarten ist. Dies würde die Effizienz des Charakterisierungsprozesses erheblich steigern.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Geräte**

Eine detaillierte Auflistung der Geräte findet sich im Anhang 6.2, Tabelle 22.

#### **2.1.2 Kommerzielle Kits**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits sind im Anhang 6.2, Tabelle 23 aufgeführt.

#### **2.1.3 Verwendete Reagenzien und Puffer**

Die Auflistung der verwendeten Reagenzien und Puffer ist unter Anhang 6.2, Tabelle 24 zu finden.

#### **2.1.4 Primer**

Informationen über die hier verwendeten *Primer* sind dem Anhang 6.4, Tabelle 39 zu entnehmen.

### **2.2 Patientinnen und Blutproben aus den DETECT III/IV-Studien**

Die verwendeten Blutproben wurden im Rahmen der DETECT III/IV-Studie entnommen und nach Genehmigung durch eine Ethikkommission für die Verwendung zu Forschungszwecken auf Basis des vorliegenden Ethikantrags unter den Aktenzeichen 525/2011AMG1, Datum: 08.12.2011, MC-LKP-668, Datum: 17.12.2013 freigegeben. Die Anonymität der Patientinnen wurde zu jedem Zeitpunkt gewahrt. Die Blutentnahmen wurden von geschultem Personal in assoziierten Kliniken und Zentren durchgeführt, welches die Proben bei Entnahme in *CellSave Tubes* (s. Anhang 6.2, Tabelle 22) überführte.

Die Proben wurden im Rahmen der *Screening-* und *Follow-up-*Untersuchungen der DETECT III/IV-Studien im Labor der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität prozessiert.

Die Einschlusskriterien der DETECT Studien sind nachzulesen in den DETECT Synopsen [(61, 62)].

## **2.3 Zelllinien und Zellkultur**

### **2.3.1 Zelllinien**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Mammakarzinomzelllinien T47D (ATCC-Nr.: HTB-133) und MCF7 (ATCC-Nr.: HTB-22) verwendet. Die T47D-Zelllinie wurde aus dem Pleuraerguss einer 54 Jahre alten Patientin mit duktalem Mammakarzinom generiert und enthält die heterozygote Mutation des *PIK3CA*-Gens im Hotspot H1047R in Exon 20 (63). Die MCF7-Zelllinie stammt von einer kaukasischen, 69 Jahre alten Frau mit Adenokarzinom, die Zellen wurden ebenfalls aus einem Pleuraerguss isoliert und zeigen die Mutation des *PIK3CA*-Gens im Hotspot E545K in Exon 9 (63).

### **2.3.2 Zellkultur**

Alle Zellen wurden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und vor Erreichen der Konfluenz durch Behandlung mit 0,5% Trypsinlösung zur weiteren Kultivierung abgelöst. Dies beinhaltete eine fünfminütige Inkubation bei 37 °C, die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium terminiert.

Das Medium setzte sich aus 426,5 ml RPMI, 50 ml Fetales Kälberserum (10 %), 5 ml Penicillin/Streptomycin (1 %), 5 ml Natriumpyruvat, 5 ml HEPES und 5 ml Glucose zusammen. Medien, FCS, Trypsin und Antibiotika wurden von Gibco, Karlsruhe, Deutschland bezogen.

### 2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Es wurden 10 µl der verdünnten Zellsuspension zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert. Nach Auszählung der vier Quadranten wurde die Zellzahl in Zellen/µl wie folgt berechnet:

$$\frac{N}{(A * h * d)}$$

Dabei sind N = Zellzahl, A = Fläche in mm<sup>2</sup>, h = Tiefe der Kammer in mm und d = Verdünnung als Faktor.

## 2.4 Mutationsanalyse zirkulierender Tumorzellen aus den DETECT III/IV-Studien

### 2.4.1 Anreicherung EpCAM<sup>pos</sup>-Zellen mittels CellSearch<sup>®</sup>

Die Anreicherung der selten vorhandenen CTC erfolgte mit dem CellSearch<sup>®</sup>-System (s. Anhang 6.2, Tabelle 22). Die Blutproben wurden bei der Blutabnahme in *Cell-Save Tubes* überführt, welche 300 µl CellSave (s. Anhang 6.2, Tabelle 24) enthalten. CellSave dient als Zellstabilisierungspuffer, der eine Fixierung der Zellen bewirkt. Anschließend erfolgte die immunomagnetische Separation und Anreicherung von Zellen, die den Oberflächenmarker EpCAM exprimieren.

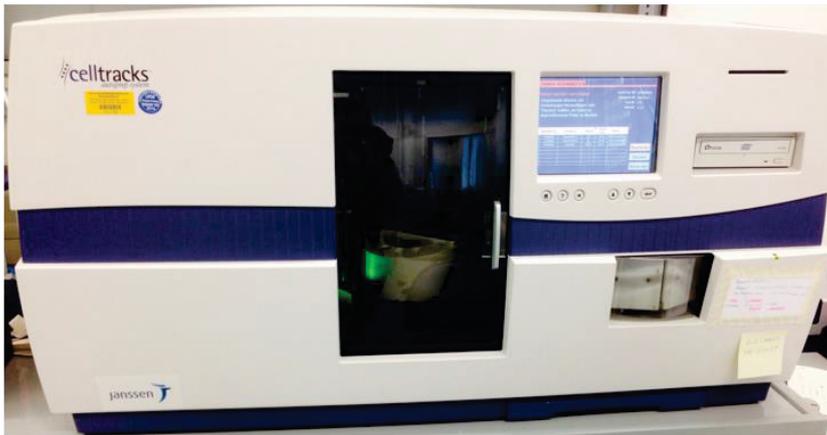
Hierbei wurde immunomagnetisches Ferrofluid, das an einen gegen EpCAM gerichteten Antikörper gekoppelt ist, zur Blutprobe hinzugefügt. Nachdem die Antikörper/Ferrofluid-Suspension eine stabile Bindung mit den EpCAM-positiven Zellen eingegangen sind, wurden durch Anlegen eines magnetischen Feldes die EpCAM<sup>pos</sup>-Zellen immobilisiert und die restlichen Blutbestandteile weitestgehend durch einen Waschschrift entfernt. Als nächster Schritt erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung. Zur späteren Identifikation und Charakterisierung wurden die Zellen mit gegen die Zytokeratine 4-6, 8, 10, 13, 18 und 19 gerichteten Antikörpern (45), welche mit Phycoerythrin (PE) markiert sind, und einem gegen CD45 gerichteten, mit Allophycocyanin (APC) markierten Antikörper gefärbt (44). Die doppelsträngige DNA des Nukleus wurde mit DAPI angefärbt (s. Anhang 6.2,

Tabelle 24). Die so prozessierte Probe wurde in einer Kartusche in einen Magnethalter, das MagNest (s. Anhang 6.2, Tabelle 22), überführt. Durch die Wirkung des Magnetfeldes gelangten die Zellen an die Oberfläche der Kartusche und konnten im nächsten Schritt von dem CellTracks-Analyzer (s. Anhang 6.2, Tabelle 22) gescannt werden. Die Kriterien dafür, ein Ereignis als CTC zu definieren, umfassen eine positive Kernfärbung (DAPI), CD45-Negativität (APC), eine positive Zytokeratinfärbung (PE) sowie einen Durchmesser von 4-40  $\mu\text{m}$ . Diese Ereignisse wurden manuell ausgewertet und im entsprechenden Fall als CTC markiert.

Die Probenbearbeitungszeit vom Eintreffen der Blutprobe bis zum Analysieren durch den CellTrack-Analyzer betrug weniger als 96 h und die Bearbeitung der Proben wurde von geschultem Personal durchgeführt. Die Probe wurde nach der CellSearch<sup>®</sup>-Prozessierung im Dunkeln bei 4 °C gelagert und innerhalb einer Woche weiterverarbeitet. Aufgrund der Instabilität der CD45-Färbung wurden Proben, die länger als eine Woche gelagert wurden, erneut mit diesem gefärbt.

Abbildung 3 zeigt den CellSearch<sup>®</sup> des Labors der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität (A) ebenso wie ein repräsentatives Beispiel für eine gescannte CTC (B). In den kombinierten Fluoreszenzsignalen (links, Zytokeratin+Nukleus) ist das Kernsignal (weiß) umgeben von Zytokeratin (grün) erkennbar. Die weiteren Bilder zeigen die Anfärbung des Zytokeratins, Nukleus und die erwartungsgemäß negative CD45-Expression mit Hintergrundrauschen. Die Belichtungszeiten sind vom Hersteller standardisiert (CK-PE: 200 ms, Nukleus-DAPI: 30 ms, CD45-APC: 600 ms, Her2-DiOC: 800 ms).

A



B

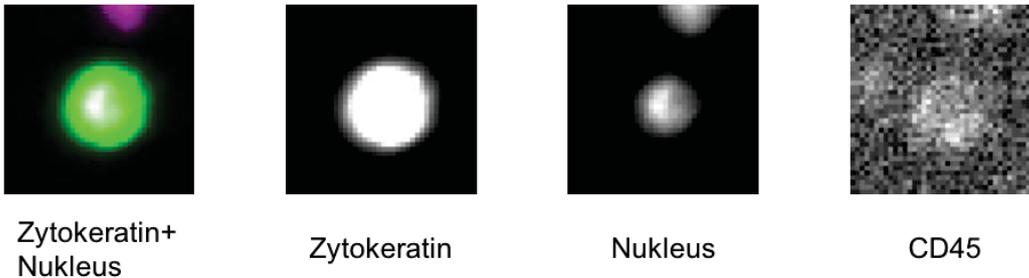


Abbildung 3: (A) zeigt den CellSearch mit den repräsentativen Bildern einer gescannten CTC, (B) mit Merge (Überlappung von CK- und Nukleusfärbung), Zytokeratin-, Nukleus- und CD45-Färbungen

#### 2.4.2 CD45-Nachfärbung

Die Kartuschen wurden fünf Minuten im Magnethalter inkubiert, um die EpCAM<sup>pos</sup>-Zellen zu immobilisieren. Der entfernte Puffer wurde durch eine Lösung aus 12µl αCD45-Antikörper (Klon 35-ZS, Alexa Fluor® 647 konjugiert), 280µl Antikörperdiluent und 10µl DAPI (s. Anhang 6.2, Tabelle 24) ersetzt.

Die Kartuschen wurden, aus dem Magnethalter entfernt, für vier Stunden bei 4 Grad Celsius auf einem Taumelschüttler (s. Anhang 5.2, Tabelle 22) inkubiert. Nach erneuter Immobilisierung im Magnethalter wurden die Zellen mit 300µl CellSearch Puffer für fünf Minuten auf dem Taumelschüttler gewaschen. Der Puffer wurde durch 300µl PBS (s. Anhang 6.2, Tabelle 24) ersetzt.

### 2.4.3 Isolation von Einzelzellen mit dem CellCelector™

Mittels des CellCelectors (s. Anhang 6.2, Tabelle 22) erfolgte die Isolation der Einzelzellen im Rahmen der Laborroutine. Die Probe, die die CTC enthielt, wurde auf einen Glasträger übertragen. Der Glasträger war an den Seiten mit einer Teflonbeschichtung versehen, um ein Auslaufen der Flüssigkeit zu verhindern.

Anschließend wurde die Probe in 40facher Vergrößerung (Olympus CKX 41; Kamerasystem: CCD-Kamera XM10-IR, s. Anhang 6.2, Tabelle 22; ALS CellCelector-Software 3.0, s. Anhang 6.2, Tabelle 22) in folgenden Fluoreszenzkanälen gescannt: DAPI (Nukleus), TRITC (Zytokeratin) und Cy5 (CD45). Nach dem Scanvorgang wurde eine Liste mit möglichen Ereignissen erstellt, die die folgenden Merkmale aufweisen mussten: CD45-Negativität, DAPI-Positivität, Zytokeratin-Positivität, Durchmesser 4-40  $\mu\text{m}$ , FITC/TRITC Grey-Value-Mean Wert von  $\geq 2000$ . Die Wellenlängenbereiche der verwendeten Filter sind für die oben genannten Farbstoffe geeignet.

Diese Ereignisse wurden entsprechend den genannten Kriterien ausgewertet und als CTC für den Isolationsvorgang markiert. Die Bilder wurden für eventuelle spätere Aufzeichnungen archiviert. Die Isolation erfolgte durch Aufnahme von 9  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (s. Anhang 6.2, Tabelle 24) in die Glaskapillare und anschließende Aspiration der CTC mit 20-100 nl Volumen. Die isolierte einzelne Zelle wurde in ein 0,1-ml-PCR-Tube (s. Anhang 6.2, Tabelle 22) überführt. Hierbei spülen die 9  $\mu\text{l}$  Puffer die Zelle in das Zielgefäß. Um das Volumen auf 1  $\mu\text{l}$  zu reduzieren, wurden die Proben mit den abgelegten Einzelzellen 5 min bei 370 G in einer Tischzentrifuge (s. Anhang 6.2, Tabelle 22) zentrifugiert, der Überstand bis auf 1  $\mu\text{l}$  abgenommen und anschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

In Abbildung 4 wird der CellCelector (A) gezeigt, mit dem automatischen Mikromanipulator (1) auf der linken Seite, welcher aus einem schwenkbaren Arm mit Glaskapillaren besteht. Das optische System (2) setzt sich aus einem Mikroskop (Olympus-CKX41) und einer monochromen CCD-Kamera (s. Anhang 5.2, Tabelle 22) auf der rechten Seite zusammen. Die Bilder zeigen die Isolation einer Einzelzelle mit DAPI-Färbung (B) und als Durchlichtaufnahme (C).

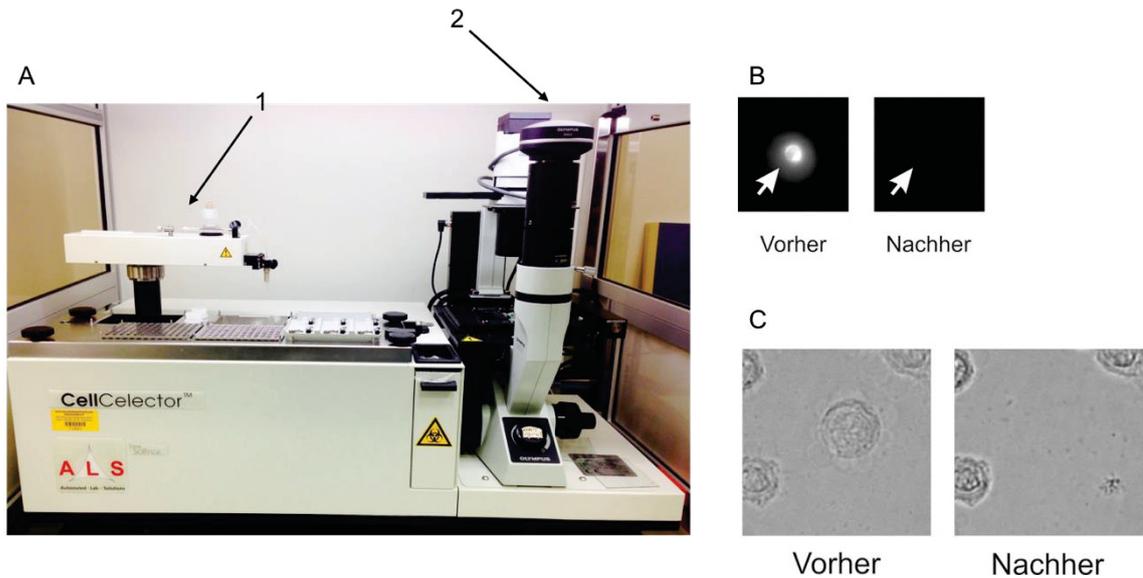


Abbildung 4: (A) zeigt den CellCelector (B) mit (1) dem automatischen Mikromanipulator und (2) dem optischen System. (B) zeigt eine CTC vor Isolation und nach erfolgreicher Isolation mit DAPI-Färbung und (C) den Isolationsvorgang als Durchlichtaufnahme.

#### 2.4.4 Whole Genome Amplification

Um eine umfassende Analyse der genomischen DNA einer einzelnen CTC durchzuführen, muss zunächst die Amplifikation der geringen DNA-Menge von ca. 7 pg und somit eine Amplifikation des gesamten Genoms durchgeführt werden. Diese WGA erfolgte mit Hilfe des Ampli 1™ WGA Kit (s. Anhang 6.2, Tabelle 23) nach Angaben des Herstellers. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis.

Als Negativkontrolle diente H<sub>2</sub>O, als Positivkontrolle genomische DNA der Zelllinien MCF7 und T47D.

##### Schritt 1: Zelllyse

Im ersten Schritt der WGA wurden die isolierten Zellen lysiert, um die DNA aus den Zellkernen freizusetzen. Das Ausgangsvolumen der Probe betrug 1 µl. Es wurde wie vom Hersteller empfohlen ein *Master-Mix* von mindestens 10 Reaktionen hergestellt, auch wenn weniger Proben prozessiert wurden. Der *Master-Mix* hatte folgende Zusammensetzung: 2 µl des Reaktionspuffers 1, jeweils 1,3 µl von Reaktionspuffer 2 und 3 sowie 2,6 µl Enzym 1 und 12,8 µl H<sub>2</sub>O (siehe Tabelle 1).

2 µl des *Master-Mixes* wurden jeder Probe beigefügt. Die Zellyse wurde bei 42 °C für 45 Minuten, 65 °C für 30 Minuten und abschließend 80 °C für 15 Minuten durchgeführt (siehe Tabelle 2, Thermocycler s. Anhang 6.2, Tabelle 22).

Tabelle 1: Benötigte Reagenzien für Schritt 1 der WGA, die Zellyse

Reagenz	Volumen/10 Reaktionen (µl)
<i>Ampli1™ Reaction Buffer 1</i>	2
<i>Ampli1™ Reaction Buffer 2</i>	1,3
<i>Ampli1™ Reaction Buffer 3</i>	1,3
<i>Ampli1™ Enzyme 1</i>	2,6
<i>Ampli1™ Water</i>	12,8

Tabelle 2: Inkubationsprogramm für die Zellyse der WGA

Temperatur (°C)	Zeit
42	45 Minuten
65	30 Minuten
80	15 Minuten
4	∞

#### Schritt 2a: Verdau

Der Verdau der DNA erfolgt durch das Restriktionsenzym *Mse1*, das an der DNA-Sequenz T<sup>^</sup>TAA den Doppelstrang in mehrere Fragmente mit entsprechenden *Sticky Ends* an beiden Fragment-Enden zerschneidet. Jeweils 2 µl des *Master-Mixes* aus 0,2 µl des Reaktionspuffers 1 und des Enzyms 2 sowie 1,6 µl H<sub>2</sub>O, entsprechend Tabelle 3 wurden jeder Probe hinzugefügt (Vol<sub>ges.</sub>: 5 µl) und bei 37 °C für fünf Minuten, gefolgt von 65 °C für weitere fünf Minuten, inkubiert.

Tabelle 3: Benötigte Reagenzien für Schritt 2a der WGA

Reagenz	Volumen/Reaktion (µl)
<i>Ampli1<sup>TM</sup> Reaction Buffer 1</i>	0,2
<i>Ampli1<sup>TM</sup> Enzyme 2</i>	0,2
<i>Ampli1<sup>TM</sup> Water</i>	1,6

### Schritt 2b: *Preannealing*

Für Schritt 2b wurden jeweils 0,5 µl Reaktionspuffer 1, Reagenz 4 und 5 sowie 1,5 µl H<sub>2</sub>O (Tabelle 4) vermischt und gemäß Tabelle 5 inkubiert.

Tabelle 4: Mastermix von Schritt 2b

Reagenz	Volumen/Reaktion (µl)
<i>Ampli<sup>TM</sup> Reaction Buffer 1</i>	0,5
<i>Ampli<sup>TM</sup> Reagent 4</i>	0,5
<i>Ampli<sup>TM</sup> Reagent 5</i>	0,5
<i>Ampli<sup>TM</sup> Water</i>	1,5

Tabelle 5: Inkubationsprogramm von Schritt 2b

Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit
1	65	1 Minute
	↓	1 Minute
	15	1 Minute
	15	∞

### Schritt 3: Ligation

Bei der Ligation binden Adapter an die Überhänge der *Sticky Ends* der Fragmente, an denen später die spezifischen *Primer* für die PCR ansetzen können.

Verwendete Reagenzien sind in Tabelle 6 aufgelistet:

Tabelle 6: Reagenzien des 3. Schrittes der WGA, der Ligation

Reagenz	Volumen/Reaktion ( $\mu\text{l}$ )
<i>Preannealing Mix</i>	3
<i>Ampli1<sup>TM</sup> Reagent 6</i>	1
<i>Ampli1<sup>TM</sup> Enzyme 3</i>	1

Jeweils 5  $\mu\text{l}$  des *Master-Mixes* wurde zu den Proben gegeben ( $\text{Vol}_{\text{ges}}$ : 10  $\mu\text{l}$ ) und die Ligation lief bei 15 °C für eine Stunde im Thermocycler ab.

### Schritt 4: Primäre PCR

Mit einem spezifischen *PCR Primer*, der an die Adapter bindet, erfolgt in diesem Schritt die Vervielfältigung der gesamten DNA.

Bei 94 °C wird die doppelsträngige DNA denaturiert, bei 57 °C lagern sich die *Primer* an die DNA an und bei 68°C synthetisiert die DNA-Polymerase einen komplementären Strang in 5'–3'-Richtung. Das Reaktionsgemisch von Schritt 4 enthielt 3  $\mu\text{l}$  des Reaktionspuffers 7, 2  $\mu\text{l}$  Reagenz 8, 1  $\mu\text{l}$  Enzym 4 und 34  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O (Tabelle 7). Von diesem wurde jeweils 40  $\mu\text{l}$  zu den Proben hinzugefügt ( $\text{Vol}_{\text{ges.}}$ : 50  $\mu\text{l}$ ) und gemäß Tabelle 8 inkubiert.

Tabelle 7: Benötigte Reagenzien für den 4. Schritt, die primäre PCR

Reagenz	Volumen/Reaktion (µl)
<i>Ampli1™ Reaction Buffer 7</i>	3
<i>Ampli1™ Reagent 8</i>	2
<i>Ampli1™ Enzyme 4</i>	1
<i>Ampli1™ Water</i>	34

Tabelle 8: Inkubationsprofil der primären PCR der WGA

Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit
	68	3 Minuten
14	94	40 Sekunden
	57	30 Sekunden
	68	90 Sekunde +1 Sek/Zyklus
8	94	40 Sekunden
	57	30 Sekunden +1°C/Zyklus
	68	105 Sekunden +1Sek/Zyklus
22	94	40 Sekunden
	65	30 Sekunden
	68	113 Sekunden +1 Sek/Zyklus
1	68	3 Min 40 Sekunden

Die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

#### 2.4.5 Qualitätskontrolle der PCR

Zur Überprüfung der Qualität der zuvor durchgeführten WGA wurde das Ampli1™ QC Kit (s. Anhang 6.2, Tabelle 23) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden vier unterschiedlich lange DNA-Abschnitte vervielfältigt und mittels Gelelektrophorese dargestellt. Die Länge der vier Abschnitte variierte zwischen 91 und 614 Basenpaaren. Die Qualität der WGA korreliert mit der Anzahl der

verschiedenen Amplifikate der QC-PCR, hohe Qualität mit vier oder drei, niedrige Qualität mit zwei, einem oder keinem Amplifikat.

Die Anzahl der Amplifikate kann als *Genome Integrity Index* nach Polzer *et al.* (38) definiert werden und steht in Zusammenhang mit dem Erfolg der weiteren Analysen.

Als Negativkontrolle diente 1 µl H<sub>2</sub>O. 6,5 µl Wasser wurden mit 1 µl Reaktionspuffer, 0,2 µl dNTP, 1 µl *Primer-Mix*, 0,2 µl BSA und 0,1 µl Polymerase gemischt, um den *Master-Mix* für die QC zu erstellen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Reagenzien des Mastermixes der QC

Reagenz	Volumen/ 1Reaktion (µl)
<i>Ampli1™ PCR Water</i>	6,5
<i>Ampli1™ PCR Reaction Buffer</i>	1
<i>Ampli1™ PCR dNTP</i>	0,2
<i>Ampli1™ Primermix</i>	1
<i>Ampli1™ PCR BSA</i>	0,2
<i>Ampli1™ PCR Taq Polymerase</i>	0,1

9 µl des *Master-Mixes* und 1 µl Probe (Vol<sub>ges.</sub>: 10 µl) wurden auf die Reagenzgefäße verteilt und gemäß Tabelle 10 inkubiert.

Tabelle 10: Inkubationsprofil der QC

Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit
1	95	4 Minuten
32	95	30 Sekunden
	58	30 Sekunden
	72	90 Sekunden
1	72	7 Minuten
	4	∞

Alle PCR-Programme sind nochmals im Anhang unter 6.3 zu finden.

#### 2.4.6 Agarosegelelektrophorese

Der Nachweis der Amplifikate erfolgte mittels Gelelektrophorese. Die DNA-Fragmente können bei diesem Verfahren unter Anlegen eines elektrischen Feldes aufgrund ihrer unterschiedlichen Geschwindigkeit bei der Wanderung vom Minus- zum Pluspol je nach Größe aufgetrennt werden. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in 3%igen Agarosegelen. Die Agarose (s. Anhang 6.2, Tabelle 24) wurde dafür in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und in die Gelapparatur gegossen. Die DNA wurde mit dem Farbstoff Gel-Red (s. Anhang 6.2, Tabelle 24) (Verhältnis 1:10000) versetzt, welcher die doppelsträngige DNA durch Interkalierung anfärbt. Um der Lösung mit den DNA-Fragmenten eine höhere Dichte zu verleihen und in die Taschen des Gels zu überführen sowie eine Lauffront zu visualisieren, wurde die Probe mit TriTrack (s. Anhang 6.2, Tabelle 24) versetzt. Als zusätzlich aufgetragener Größenstandard wurde GeneRuler, 1kb Ladder (s. Anhang 6.2, Tabelle 24) verwendet, welcher Fragmente zwischen 80 und 1031 bp enthält. Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes von 100 V für ca. 40 Minuten. Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Gel-Dokumentationsgeräts (s. Anhang 6.2, Tabelle 22) sichtbar gemacht und dokumentiert.

## 2.5 Sanger-Sequenzierung der CTC

Die Sanger-Sequenzierung beruht auf dem zufälligen Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTP) während der Polymerasekettenreaktion. Die zu sequenzierende DNA wird durch Hitze denaturiert und aufgetrennt, sodass nur noch Einzelstränge vorliegen. Als *Primer*-Bindestelle muss eine Sequenz im Genom bekannt sein, hier bindet der zuvor erstellte *Primer*, an den dann die Polymerase binden kann, welche die Elongation verursacht.

Neben den Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) für die Bildung des komplementären Stranges enthält der PCR-Ansatz ebenfalls die ddNTP, die aufgrund des fehlenden 3'OH-Endes nach Einbau in den DNA-Strang zum Abbruch der Kettenreaktion führen.

Die ddNTP sind fluoreszenzmarkiert und werden an Stelle ihrer analogen Desoxynukleotide im Zufallsprinzip eingebaut. So entstehen unterschiedlich lange DNA-Stücke, die gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Mit Hilfe eines Detektors werden die Fluoreszenzsignale gemessen und als vollständige Sequenz wiedergegeben.

### 2.5.1 Genspezifische PCR der Exone 9 und 20

Vor der Sequenzierung des *PIK3CA*-Gens wurde jeweils eine genspezifische PCR für Exon 9 und Exon 20 durchgeführt. Die PCR zur Vervielfältigung einzelner Abschnitte der genomischen DNA läuft in mehreren Zyklen von jeweils drei Schritten ab. Als erster Schritt erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei ca. 96 °C, im zweiten Schritt lagern sich die spezifischen *Primer* an die nun einzelsträngige DNA an (*Primerannealing*). Im dritten Schritt schließlich erfolgt die Elongation der Einzelstränge und somit die Amplifikation des gewünschten Abschnittes. Diese Schritte laufen in mehreren Zyklen hintereinander ab und die DNA-Menge vermehrt sich exponentiell bis zum Abbruch der PCR. Dieses Prinzip wurde hier für spezifische Abschnitte der Exone 9 und 20 angewendet, auf denen sich die Hotspots der gesuchten Mutationen des *PIK3CA*-Gens befinden. Dazu wurden Amplifikations-*Primer* (siehe Tabelle 13, bzw. Anhang 6.4, Tabelle 39) erstellt, die kurz vor der Hotspotregion an die DNA binden und so gewährleisten, dass der gewünschte Abschnitt amplifiziert wird. Das

Reaktionsgemisch der genspezifischen PCR setzt sich wie in Tabelle 11 aufgeführt zusammen:

Tabelle 11: Mastermix der genspezifischen PCR der Exone 9 und 20

Reagenz	Volumen/Ansatz (µl)
<i>DreamTaq Polymerase</i>	12,5
<i>Primer reverse</i>	1
<i>Primer forward</i>	1
H <sub>2</sub> O	10,5
<i>Template</i>	1

Tabelle 12: Inkubationsprofil der genspez. PCR

Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit
1	95	5 min
45	95	45 sec
	58	45sec
	72	45 sec
1	72	10 min
	4	∞

Tabelle 12 zeigt das Inkubationsprofil der genspezifischen PCR, bei 95 °C für eine Minute findet die initiale Denaturierung statt, darauf folgen 45 Sekunden bei 95°C. Das *Primerannealing* erreicht ein Temperaturoptimum bei 58 °C für 45 Sekunden, die Elongation findet bei 72 °C für 45 Sekunden statt. Die Kühlung erfolgt bei 4 °C. Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte anschließend mittels Gelelektrophorese, wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben.

Als Positivkontrolle diente 1 µl genomische MCF7-/T47D-DNA mit einer Konzentration von 100 ng/µl und als Negativkontrolle 1 µl H<sub>2</sub>O.

Tabelle 13: Sequenzabfolge der Primer mit Produktgröße in Basenpaaren

Primer genspezifische PCR	Sequenz	Produktgröße (Basenpaare)
<i>Exon 9 forward</i>	CATCCGATGTACCTGATTGAACTGCATGCAGACAAAGAACAGCTCAAAGCAA	160
<i>Exon 9 reverse</i>	CATTCCTTAGATAGCTCGGAAGTCCATTGCATTTTAGCACTTACCTGTGAC	
<i>Exon 20 forward</i>	CATCCGATGTACCTGATTGAACTGCATGCATTGATGACATTGCATACATTCCG	194
<i>Exon 20 reverse</i>	CATTCCTTAGATAGCTCGGAAGTCCATTGCGTGGAAGATCCAATCCATTT	
Sequenzierprimer forward	TCCGATGTACCTGATTGAAC	
Sequenzierprimer reverse	TTCCTTAGATAGCTCGGAAG	

### 2.5.2 Aufreinigung mit Exo-Sap

Das PCR-Produkt wurde mit 2 µl ExoSap-IT® (s. Anhang 6.2, Tabelle 24) auf 5 µl Post-PCR-Produkt nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Dazu wurde es 15 min bei 37 °C, danach 15 min bei 80 °C inkubiert.

ExoSap-IT® enthält zwei Enzyme, Exonuklease 1 und *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), die überschüssige dNTP sowie *Primer* entfernen.

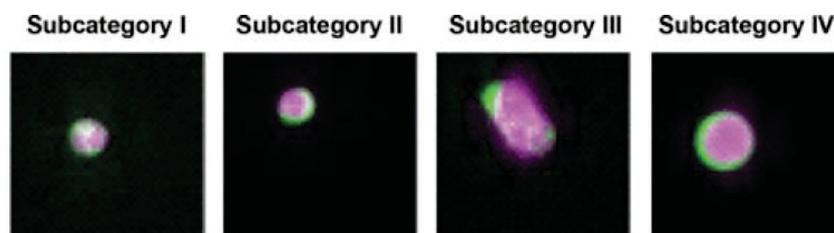
### 2.5.3 DNA-Quantifizierung mittels Nano-Drop und anschließende Sequenzierung in Kooperation mit dem BMFZ

Die DNA-Konzentration der Proben konnte spektrophotometrisch mit dem Nano-Drop-Gerät (s. Anhang 6.2, Tabelle 22) gemessen werden, indem 1,5 µl der Proben eingesetzt wurden. Als Leerwert wurde 1,5 µl Wasser verwendet.

In Zusammenarbeit mit dem biologisch-medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde die DNA der Proben mit den in Tabelle 13 spezifizierten *Primern* sequenziert.

## 2.6 Bilderanalyse der CellCelector-Aufnahmen

Die analysierten CTC wurden nach morphologischen Kriterien beurteilt, um diese mit der Qualität der Amplifikate nach erfolgter WGA zu korrelieren und festzustellen, ob deren Qualität schon bei der Isolation am CellCelector oder am CellSe-arch<sup>®</sup> voraussagbar ist. Die hierfür verwendeten Bilder stammten aus dem Archiv des CellCelectors. Als morphologische Kriterien dienten ein Nukleus-Index, ein Zytoplasma-Index und ein Durchmesser-Index (beschrieben im Ergebnisteil in Kapitel 3.3.1). Der Durchmesser der CTC wurde mit Hilfe von ImageJ (Vers.1.46r) bestimmt. Außerdem wurden die Subkategorien I-IV nach Polzer *et al.* (38) erfasst. In Abbildung 5 sind die verschiedenen Subkategorien aus der Publikation von Polzer *et al.* dargestellt: Die Subkategorie I beschreibt einen kleinen, fragmentierten Partikel von zellähnlicher Erscheinung, Subkategorie II zeigt einen kleinen Partikel mit einer intakten Zellarchitektur. Subkategorie III enthält große Ereignisse mit unregelmäßiger Zellmorphologie und Subkategorie IV große, intensiv gefärbte Zellen (38). Erkennbar ist der lila gefärbte Nukleus, der in einer Überlagerung der zwei Färbungen von grün fluoreszierendem Zytoplasma umgeben ist.



*Subcategory I: small particles of fragmented cell-like appearance*

*Subcategory II: small events with intact cellular morphology*

*Subcategory III: large events with irregular cellular morphology*

*Subcategory IV: intensely stained large cells*

Abbildung 5: Einteilung der CTC nach morphologischen Kriterien (Größe, Zellmorphologie) in vier Subkategorien nach Polzer *et al.* Erkennbar ist der lila gefärbte Nukleus, umgeben von grün-fluoreszierendem Zytoplasma. Von links nach rechts erfolgt die Einteilung in die Kategorien I-IV. I steht für einen kleinen Partikel mit zellähnlicher Erscheinung und IV für eine große, intensiv angefarbte Zelle mit intakter Zellmorphologie. Quelle: Polzer *et al.* (38).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klinische Patientendaten

Für die Mutationsanalyse mittels Sanger-Sequenzierung des *PIK3CA*-Gens wurden die Blutproben von neun Patientinnen der DETECT III- und IV-Studie untersucht.

Das durchschnittliche Alter der Patientinnen betrug 59 Jahre bei Erstdiagnose und 66 Jahre bei dem CTC-Erst-*Screening* mittels CellSearch<sup>®</sup>. Die durchschnittlich festgestellte Anzahl der CTC in 7,5 ml Blut lag bei 115, mit einer Verteilung von 13-392. Bei 5/9 Patientinnen (55,6 %) lag ein Tumorstadium T<sub>2</sub> vor, bei 3/9 (33,3 %) T<sub>3</sub>, 1/9 (11,1 %) wiesen Stadium T<sub>1</sub> auf. Eine Infiltration der Lymphknoten ( $\geq N_1$ ) wurde in 7/9 (77,8 %) Fällen nachgewiesen, keine Infiltration (N<sub>0</sub>) bei 2/9 (22,2 %). Primäre Metastasen lagen bei 1/9 (11,1 %) Patientinnen vor. Bei drei von neun Patientinnen lag das Tumorstadium IIA von (33,3), bei 2/9 (22,2%) Stadium IIB, bei 3/9 (33,3%) Stadium IIIA und bei einer von neun Patientinnen (11,1%) Stadium IV. Alle Patientinnen bis auf eine, bei der keine Angaben vorlagen, wiesen ein Grading  $\geq G_2$  (6/8 (75,0 %), 2/8 (25,0 %) G<sub>3</sub> auf, ebenso waren alle Primärtumore ER-positiv und 7/9 (77,8 %) PR-positiv. Bei zwei Patientinnen war der Her-2/neu-Status nicht angegeben, von den restlichen sieben zeigten 100 % einen negativen Her-2/neu-Rezeptorstatus.

Bei drei von neun Patientinnen war der Hormonrezeptorstatus der Metastasen unbekannt, von den restlichen sechs waren 5/6 (83,3 %) PR-negativ, 1/6 (16,7%) PR-positiv. 2/6 (33,3 %) der metastatischen Läsionen waren ER-negativ, 4/6 (66,7%) ER-positiv. 5/6 (83,3 %) Patientinnen zeigten Her-2/neu-negative und 1/6 (16,7%) Her-2/neu-positive Metastasen. Alle weiteren Daten sind im Anhang 6.5, Tabelle 40 zu finden.

## **3.2 Anreicherung und Isolation von CTC**

### **3.2.1 CellSearch®**

Für die Quantifizierung der CTC-Anzahl wurden die Blutproben der Patientinnen mit dem CellSearch®-System prozessiert. Hierbei werden die EpCAM<sup>pos</sup> CTC mit immunomagnetischem Ferrofluid angereichert und durch Anlegen eines magnetischen Feldes immobilisiert. Dadurch können die EpCAM<sup>pos</sup> CTC von den restlichen Blutbestandteilen separiert werden.

Eine Auflistung der Kriterien, die ein Ereignis als CTC definieren, sowie eine ausführliche Beschreibung des CellSearch®-Prozesses werden in Kapitel 2.4.1 dargestellt.

Im Erst-*Screening* der Patientinnen wurden insgesamt 1104 CTC und durchschnittlich 115 CTC erkannt, mit einer Verteilung von 13 CTC bei Patientin 5 und 392 CTC bei Patientin 7. 3/9 (33,3 %) der Patientinnen wiesen im *Screening* nur Her-2/neu-negative CTC auf und 6/9 (66,6%) Patientinnen zeigten mindestens eine Her-2/neu-positive CTC.

Abbildung 6 zeigt exemplarisch die Darstellung von vier CTC einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom, wie sie mit dem CellSearch ausgewertet werden.

### **3.2.2 Klassifizierung der HER2/neu Expression auf CTC**

Die Her-2/neu-Antikörperfärbung des CellSearch® wurde verwendet, um die Her-2/neu-Expression der CTC zu kategorisieren. Die Intensität der Her-2/neu-Expression wurde in 0 (negativ), 1 (schwaches Signal), 2 (mittleres Signal) und 3 (starkes Signal) unterteilt (64). Die Belichtungszeiten sind vom Hersteller standardisiert (CK-PE: 200 ms, Nukleus-DAPI: 30 ms, CD45-APC: 600 ms, Her2-DiOC: 800 ms).

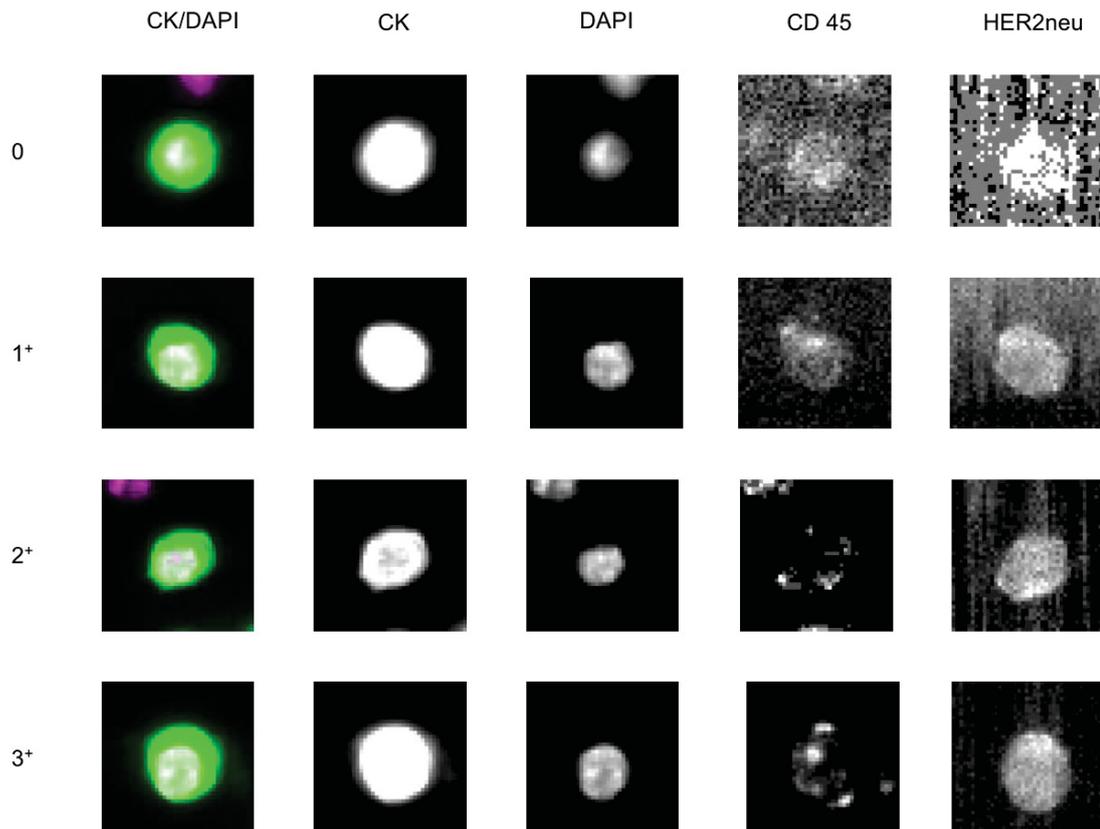


Abbildung 6: Gezeigt werden vier CTC einer metastasierten Mammakarzinom-Patientin mit unterschiedlich starker HER-2/neu-Expression, visualisiert durch den CellSearch/CellTracks Analyzer Scan. Die HER-2/neu-Expression wird in vier Kategorien von 0 (kein Signal) bis 3<sup>+</sup> (starkes Signal) eingeteilt (64) (siehe linker Bildrand). Deutlich erkennbar ist (von links nach rechts) der Zellkern (DAPI), umgeben von Zytokeratin (CK, grünes Fluoreszenzsignal) in der Überlagerung von Kern- und Zytokeratinsignal (CK/DAPI). Die entsprechenden Einzelaufnahmen (CK, DAPI, CD45, HER-2/neu) folgen rechts. Die CTC exprimieren erwartungsgemäß kein CD45, dementsprechend ist im APC-Kanal nur ein Hintergrundsignal zu sehen.

### 3.2.2 Einzelzellisolation und Amplifikation der genomischen DNA auf Einzelzellebene

Zur weiteren Analyse der CTC wurden die Kartuschen aus dem CellSearch mit Hilfe des CellCelectors gescannt: von den 1104 im CellSearch<sup>®</sup> erkannten CTC wurden exemplarisch die 94 morphologisch intaktesten Zellen mit dem Cell-Selector isoliert und analysiert. Ausgeschlossen wurden Zellkonglomerate, apoptotische Zellen, sowie Zellen mit uneindeutiger Färbung. Die Zellen mussten einen DAPI<sup>pos</sup>-, CD45<sup>neg</sup>- und CK<sup>pos</sup>-Phänotyp aufweisen. Anschließend erfolgte die Isolation der CTC mit Extraktion und Amplifikation der genomischen DNA. Abbildung 4 in Kapitel 2.4.3 zeigt die Isolation einer Einzelzelle mit dem Cell-Selector.

Im Anschluss erfolgten eine Qualitätskontrolle für den Erfolg der WGA und die Amplifikation der Hotspot-Bereiche der Exone 9 und 20 des *PIK3CA*-Gens. Zunächst wurde dieser Arbeitsablauf mit MCF7- und T47D-Zelllinien etabliert: die Hotspotmutation E545K liegt in Exon 9 der MCF7-Zelllinie, die H1047R-Hotspotmutation in Exon 20 der T47D-Zelllinie. Bei jedem Isolationsschritt wurde eine *No-Cell-Control* durchgeführt, also eine Negativkontrolle prozessiert, die keine CTC, sondern nur H<sub>2</sub>O enthielt, um falsch positive, durch Kontamination der Pufferlösung mit freier DNA verursachte Ergebnisse auszuschließen.

Die MCF7-Zelllinie enthält eine heterozygote Mutation des *PIK3CA*-Gens in Exon 9 (E545K), die T47D-Zelllinie in Exon 20 (H1047R) [(38, 63)].

Die untenstehende Tabelle 14 gibt eine Zusammenfassung über alle aus Patientenproben isolierten Einzelzellen sowie die Zelllinien MCF7 und T47D und die Anzahl der durchgeführten WGA und QC.

*Tabelle 14: Auflistung der einzelnen Arbeitsschritte von der Isolation bis zur QC mit Anzahl der prozessierten CTC je Patientin. Beispielsweise wurden acht Einzelzellen der Zelllinie T47D am CellCelector isoliert und in einzelne PCR-Gefäße abgelegt, in welchen dann die WGA sowie die QC durchgeführt wurden.*

Patientin	Anzahl isolierter CTC		
	am CellCelector	WGA	QC
1	3	3	3
2	16	16	16
3	24	24	24
4	8	8	8
5	8	8	8
6	8	8	8
7	11	11	11
8	8	8	8
9	8	8	8
<b>Summe CTC</b>	<b>94</b>	<b>94</b>	<b>94</b>
<b>MCF7</b>	20	20	20
<b>T47D</b>	8	8	8
<b>Summe gesamt</b>	<b>122</b>	<b>122</b>	<b>122</b>

### 3.3 Ergebnisse der Bildanalysen

Nach Isolation der CTC am CellCelector wurden die Bilder der Zellen archiviert. Diese Aufnahmen dienten dazu, die Qualität der PCR-Produkte nach erfolgter WGA mit den morphologischen Merkmalen der Zellen zu vergleichen, um Rückschlüsse auf die Vorhersagbarkeit der Qualität einer WGA zu ziehen.

Als morphologische Merkmale der CTC diente der Durchmesser in  $\mu\text{m}$ , die Zellkernmorphologie, die Zellmorphologie sowie die vier Subkategorien nach Polzer *et al.* (38), welche im Methodenteil in Kapitel 2.6 beschrieben sind.

#### 3.3.1 Einteilungen der Kategorien

Die Durchmesser der CTC schwankten zwischen 7 und 26  $\mu\text{m}$ . Ein Index (Durchmesser-Index) wurde bestimmt und für einen Durchmesser  $< 11 \mu\text{m}$  Kategorie eins, für 11-18  $\mu\text{m}$  Kategorie zwei und für  $> 18 \mu\text{m}$  Kategorie drei bestimmt.

Die Kernmorphologie (Nukleus<sub>morph</sub>) wurde optisch begutachtet und der Nukleus musste mindestens zu 50 % in der Zelle liegen. Die Nuklei wurden in drei Kategorien eingeteilt, wobei Kategorie III für einen intakten, runden/ovalen Zellkern, Kategorie II für einen intakten, mit Ausläufern versehenen Zellkern und Kategorie I für einen fragmentierten Zellkern steht (Abbildung 7).

Die Zellmorphologie (Cytokeratin<sub>morph</sub>) wurde ebenfalls in drei Untergruppen eingeteilt: Kategorie III steht für eine intakte, runde/ovale Zelle, Kategorie II für eine intakte Zelle mit unregelmäßigem Zytoplasma und/oder zytoplasmatischen Ausläufern und Kategorie I stellt eine fragmentierte Zelle dar (Abbildung 7).

Die vier Subkategorien nach Polzer *et al.* („Polzer-Index“) zeigen in Subkategorie I einen kleinen Partikel mit einer fragmentierten, zellähnlichen Erscheinung, Subkategorie II umfasst einen kleinen Partikel mit einer intakten Zellmorphologie, Subkategorie III beinhaltet einen großen Partikel mit einer unregelmäßigen Zellmorphologie und Subkategorie IV zeigt einen großen Partikel einer intakten, intensiv angefärbten Zelle (38). Diese Bilderanalysen wurden bei 30 CTC, für die archivierte Bilder vorlagen, durchgeführt. Für diese Zellen existierte je ein Bild vor der Isolation vor, auf dem die Zelle zu sehen war, sowie ein Bild nach der Isolation. Die Aufnahme der Kernfärbung (DAPI) und eine Färbung des

Zytokeratins (PE) dienen zur Einteilung in die verschiedenen Kategorien (Nukleus<sub>morph</sub>, Cytokeratin<sub>morph</sub>, Durchmesser-Index, Polzer-Index).

Die Einteilung nach Polzer *et al.* erfolgte ursprünglich anhand einer Übereinanderlagerung von CK und DAPI-Färbung. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen anhand der einzelnen CK- und DAPI-Färbungen beurteilt.

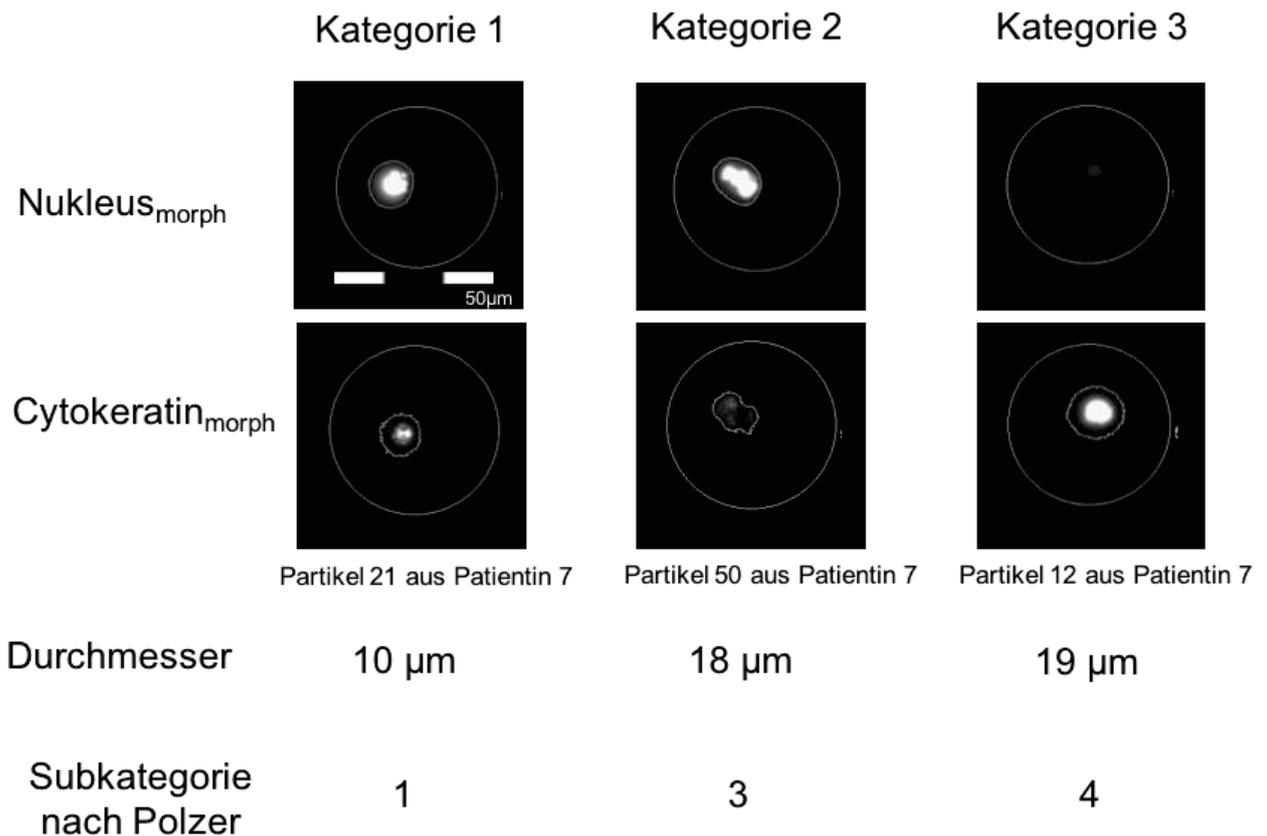


Abbildung 7: Beispielbilder der Bildanalysen mit den Kategorien 1, 2 und 3 (von links nach rechts) des Nukleus-Index, Zellmorphologie-Index, Durchmesser-Index und den Polzer-Subkategorien (von oben nach unten), gefärbt mit TRITC und DAPI in 40facher Vergrößerung. 1 steht für eine(n) fragmentierte(n) Zelle/Zellkern und 3 für eine intakte Morphologie mit intaktem Zellkern. Kategorie 2 entspricht Subkategorie 2/3 nach Polzer.

### 3.3.2 Auswertung der Bildanalysen

Ziel der Bildanalysen war es, eine Korrelation der Amplifikate nach erfolgter WGA mit den zuvor beschriebenen Kategorien durchzuführen. Sollte eine positive Korrelation auftreten, kann schon bei der Isolation mittels des CellCelectors durch Beurteilung der Zellmorphologie eine Vorhersage zur Qualität der amplifizierten genomischen DNA getroffen werden.

Diagramm (A) der Abbildung 8 zeigt die positive Korrelation des QC Ergebnisses mit den drei Kategorien der Nukleus-Morphologie mit einem Korrelationskoeffizienten  $r = 0,68$ . In Diagramm (B) ist die Korrelation des QC-Ergebnisses mit der Morphologie der Zelle mit  $r = 0,81$  aufgeführt. Diagramm (C) zeigt die QC-Banden in Korrelation mit den vier Subkategorien nach Polzer *et al.* (38), mit  $r = 0,40$ . (D) beschreibt den Zusammenhang zwischen der QC und dem Durchmesser der CTC, eingeteilt in die drei Kategorien eins (Durchmesser  $< 11 \mu\text{m}$ ), zwei (Durchmesser  $11-18 \mu\text{m}$ ) und drei (Durchmesser  $> 18 \mu\text{m}$ ). Der Korrelationseffizient beträgt  $r = 0,37$ .

Alle Kategorien zeigten eine positive Korrelation, wobei die Korrelation des QC-Ergebnisses mit der Morphologie der Zelle (Cytokeratin<sub>morph</sub>Index) mit  $r = 0,81$  den höchsten Korrelationskoeffizient erreicht und somit am ehesten die spätere WGA-Qualität vorhersagen kann. Gefolgt wird dieses Ergebnis von den Kategorien Nukleusmorphologie mit  $r = 0,68$ , der Subkategorien nach Polzer *et al.* mit  $r = 0,40$  und dem Durchmesserindex der Zellen ( $r = 0,37$ ).

Zellen mit einem QC-Ergebnis von null Amplifikaten wurden in die untenstehende Analyse nicht mit eingebunden, da nicht sicher entschieden werden kann, ob das Ergebnis durch eine schlechte Qualität der WGA oder durch eine fehlerhafte Ablage der Zelle im Rahmen der Einzelzellisolierung bedingt ist.

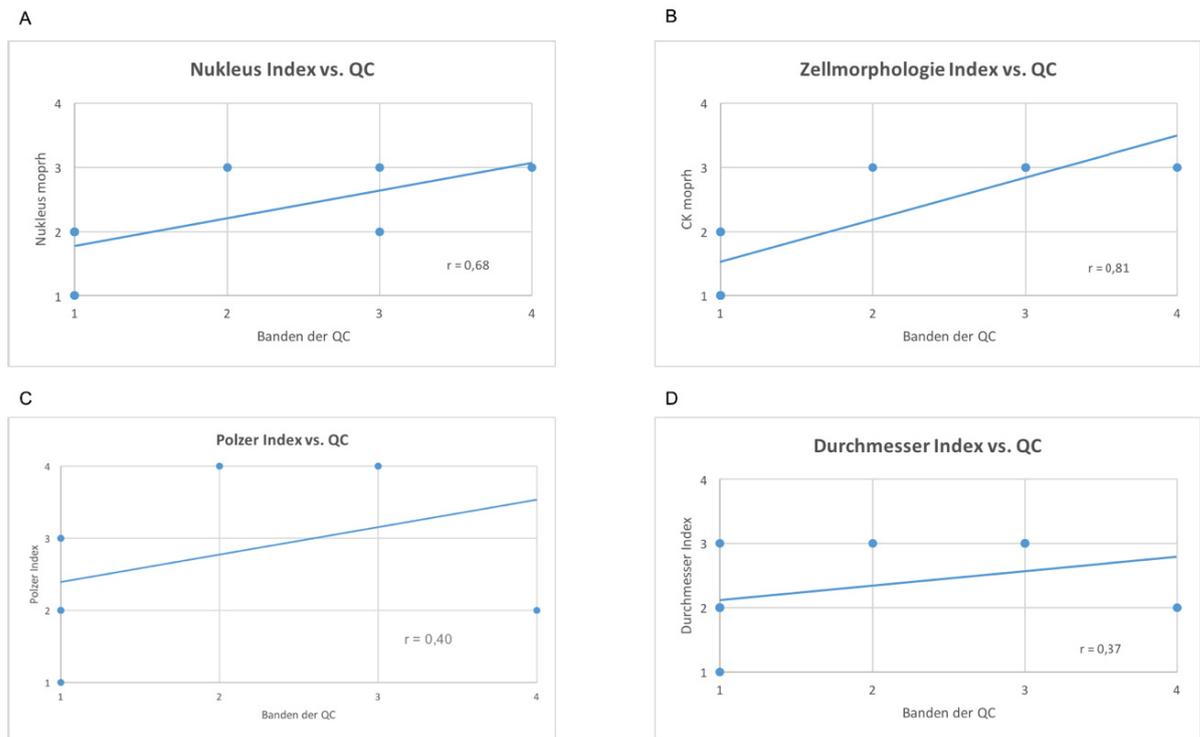


Abbildung 8: (A), (B), (C) und (D) zeigen die Korrelation der QC-Ergebnisse (x-Achse) mit den Kategorien Nukleus-Morphologie, Cytokeratin-Morphologie, Polzer-Subkategorien und Durchmesser-Index (y-Achse).

### 3.4 WGA-Ergebnisse

Im Anschluss an die Einzelzellisolation wurde die genomische DNA mittels WGA amplifiziert, um Ausgangsmaterial für die darauffolgende Analyse des *PIK3CA*-Gens zu erhalten.

Die Qualität der amplifizierten genomischen DNA korrelierte in der folgenden Qualitätskontrolle direkt mit der Anzahl erfolgreicher Amplifikationen in der Multiplex-PCR. Von den 94 isolierten und in der WGA amplifizierten CTC hatten 11,7 % vier Amplifikate in der QC, was für die höchste Qualität der WGA steht. 5,3 % hatten drei Amplifikate, 6,3 % zwei Amplifikate, 25,5 % ein Amplifikat sowie 51,0 % kein Amplifikat. Die genannten Ergebnisse beziehen sich auf die Analyse der Patientenproben. Von den MCF7-Zellen zeigten 4/20 (20 %) Zellen vier, 7/20 (35 %) ein und 9/20 (45 %) Zellen null Amplifikate. 2/8 T47D-Zellen (25 %) zeigten 4 Amplifikate, 1/8 Zellen (12,5 %) drei sowie 2/8 (25 %), 0/8 (0 %) und 3/8 (37,5 %) zwei, ein und null Amplifikate. Nach der Anzahl der Amplifikate wurde von Polzer *et al.* (38) der *Genome Integrity Index (GII)* definiert, um den Erfolg der weiteren Analysen vorherzusagen. Vier und drei Amplifikate stehen hierbei

für die bestmögliche Qualität im weiteren Prozess. Zwei, ein und null Amplifikate gelten als Hinweis auf geringere DNA-Qualität und sollten zur weiteren Eignung für Analysen überprüft werden. Tabelle 15 zeigt alle Zellen mit dem Ergebnis der QC.

Tabelle 15: Verteilung der CTC auf den Genome Integrity Index nach Polzer et al. (38).

Genome Integrity Index (nach Polzer et al.)						
Patient	Zelltyp	4	3	2	1	0
1	3 CTC	1 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66,6%)
2	16 CTC	0 (0%)	1 (6,2%)	3(18,7%)	8 (50%)	4 (25,5)
3	24 CTC	6 (25%)	2 (8,3%)	1 (4,1%)	5 (20,8%)	10(41,6%)
10	8 CTC	1 (12,5%)	1 (12,5%)	0 (0%)	1 (12,5%)	5 (62,5%)
5	8 CTC	1 (12,5%)	1 (12,5%)	0 (0%)	2 (25%)	4 (50%)
6	8 CTC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)
7	11 CTC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (27,2%)	8 (72,7%)
	1 Leukozyt	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
8	8 CTC	2 (25%)	0 (0%)	1 (12,5%)	2 (25%)	3 (37,5%)
9	8 CTC	0 (0%)	0 (0%)	1 (12,5%)	3 (37,5%)	4 (50,0%)
<b>Summe</b>	94 CTC	11 (11,7%)	5 (5,3%)	6 (6,3%)	24 (25,5%)	48 (51,0%)
<b>MCF 7</b>	20 Zellen	4 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (35%)	9 (45%)
<b>T47D</b>	8 Zellen	2 (25%)	1 (12,5%)	2 (25%)	0 (0%)	3 (37,5%)

Abbildung 9 zeigt die Verteilung der isolierten CTC in Prozent, bezogen auf den *Genome Integrity Index* nach Polzer *et al.*(38).

Auf der x-Achse ist der Index von null bis vier aufgeführt, auf der y-Achse sind die prozentualen Anteile in den jeweiligen Kategorien der CTC aufgetragen.

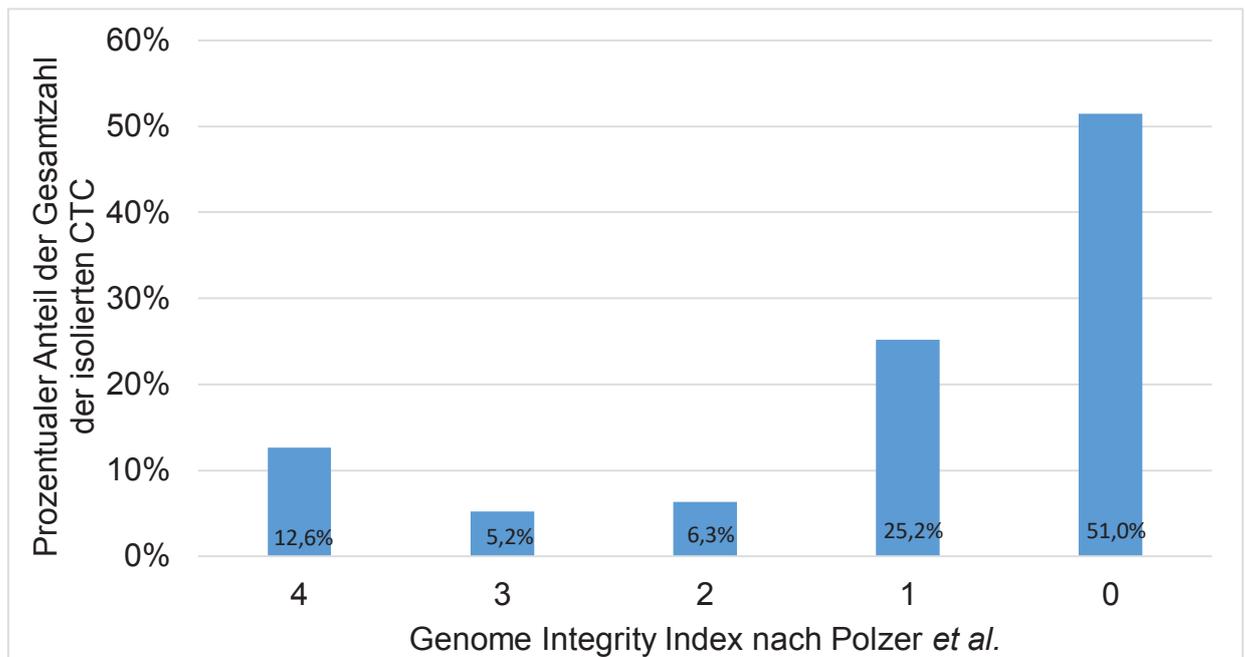


Abbildung 9: Verteilung der CTC auf die Kategorien des *Genome Integrity Index*

In Abbildung 10 wird eine Gelelektrophorese dargestellt, die die QC einer zuvor durchgeführten WGA von MCF7-Zellen (A1, B2), T47D-Zellen (A1, C1) und einer *No-Cell-Control* zeigt. Ebenso abgebildet sind sechs isolierte CTC (A2-F2). Als Positivkontrolle diente jeweils genomische DNA der MCF7- und T47D-Zelllinien, als Negativkontrolle wurde H<sub>2</sub>O verwendet.

Die maximale Bandenanzahl (4/4) zeigt, dass vier von vier Amplifikaten unterschiedlicher Größe (91-614 Basenpaare) vervielfältigt wurden. Zellen mit weniger als vier Amplifikaten sind hier nicht dargestellt.

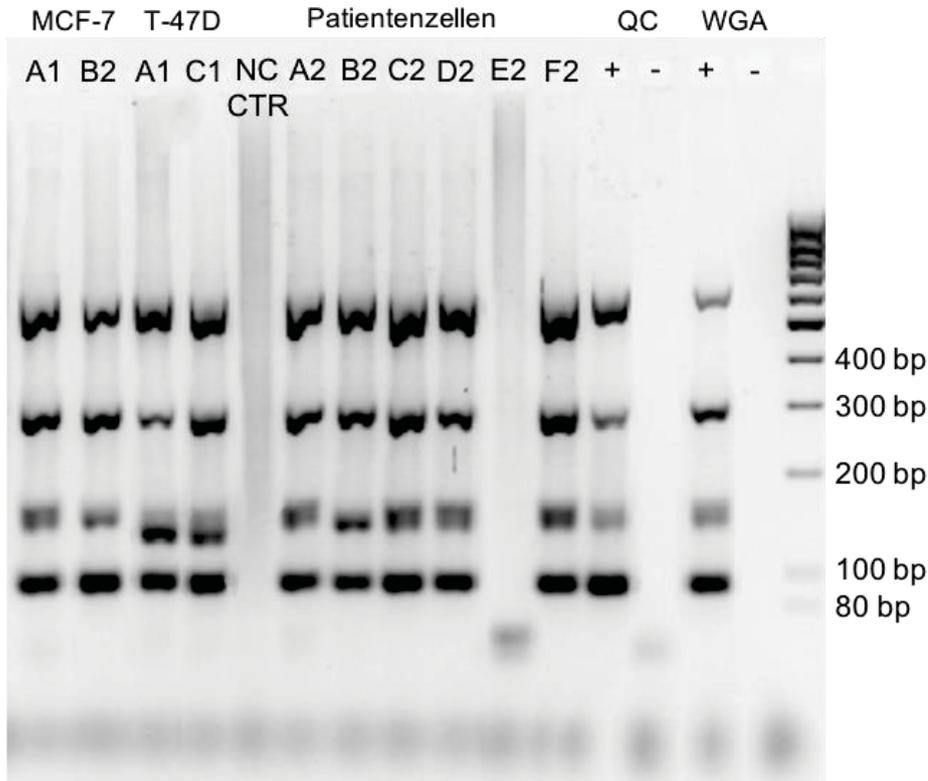


Abbildung 10: Bild einer Gelelektrophorese der QC von Einzelzellen (A2-F2), MCF7 (A1, B2) und T47D (A1, C1) und einer No-Cell-Control. Ganz rechts zu sehen sind die Positiv- und Negativkontrollen der QC und WGA und der Größenstandard.

### 3.5 Ergebnisse der genspezifischen PCR

Nach der WGA erfolgten genspezifische PCRs für die Exone 9 und 20 des *PIK3CA*-Gens.

Beim Design des *Primers* für Exon 9 war die Existenz eines Pseudogens zu beachten, welches auf Chromosom 22 lokalisiert ist und eine große Ähnlichkeit zum Hotspot des *PIK3CA*-Gens in Exon 9 aufweist.

Durch das Erstellen des *Reverse Primers*, welcher exakt an der Base endet, die das Pseudogen von der Hotspotregion des *PIK3CA*-Gens unterscheidet, konnte sichergestellt werden, dass lediglich das *PIK3CA*-Gen amplifiziert wird. Daraus resultiert eine weitere Schwierigkeit bei der Sequenzierung, da aufgrund der in den ersten Nukleotiden auftretenden Unschärfe des Sanger-Sequenzierens ein

gewisser Abstand zwischen *Primer*-Bindestelle und zu sequenzierender Region liegen muss. Durch die vorgegebene Bindestelle des *Reverse Primers* ergibt sich hier ein Abstand von lediglich 23 Nukleotiden. Vor dem Hotspot tritt ebenfalls eine begrenzte Bindemöglichkeit des *Primers* durch eine benachbarte *MseI*-Schnittstelle auf, auch hier beträgt der Abstand lediglich 23 Nukleotide. Gelöst wurde diese Herausforderung durch eine Verlängerung des Amplifikations-*Primers*, in Abbildung 11 ist die Bindestelle blau dargestellt. Dieser Amplifikations-*Primer* bietet nun die Möglichkeit, gleichzeitig als Bindestelle für den Sequenzierungs-*Primer* (gelb) zu fungieren.

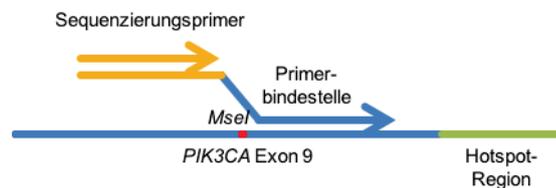


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Hotspotregion von Exon 9 des *PIK3CA*-Gens mit Bindestelle des Amplifikations-Primers (blau), der gleichzeitig die Bindestelle des Sequenzierprimers (gelb) enthält.

Eine genaue Darstellung der Nukleotidabfolge der *Hotspotregion* mit den dazugehörigen genspezifischen *Primern*, den Sequenzierungsprimer von Exon 9 und Exon 20 und des Pseudogens ist im Anhang unter 6.6, Abbildung 16 zu finden. Bei 67 Einzelzellen der insgesamt 94 CTC konnten die Amplikons für die Exone 9 und 20 des *PIK3CA*-Gens amplifiziert werden. (Tabelle 16). Diese Zahl übersteigt die Anzahl der Zellen mit einer GC von 4, weil auch einige der Zellen mit null Amplifikaten in der QC-PCR exemplarisch weiter prozessiert wurden um herauszufinden, ob sie generell von jeder weiteren Analyse auszuschließen sind oder ob auch Zellen von niedriger WGA-Qualität der genspezifischen PCR zugeführt werden können. Von den 67 Einzelzellen konnten 55 Amplikons sequenziert werden, da bei 12 CTC nach der genspezifischen PCR kein Amplifikat vorlag. Die CTC wurden nach absteigender Qualität geordnet prozessiert, angefangen mit CTC, die vier Amplifikate in der QC zeigten, gefolgt von den CTC mit drei, zwei und einem Amplifikat in der QC. Von den Zellen ohne Amplifikat in der QC

wurden 21 exemplarisch ausgewählt, um mittels genspezifischer PCR und Sequenzierung ihre Eignung für die weitere Mutationsanalyse abzuschätzen.

*Tabelle 16: Anzahl der prozessierten CTC mit Auflistung der Arbeitsschritte von der Isolation bis zur Sequenzierung*

Patient	Anzahl isolierter CTC am CellCelector	WGA	QC	PCR	Sequenzierung
1	3	3	3	1	1
2	16	16	16	15	13
3	24	24	24	22	17
4	8	8	8	4	4
5	8	8	8	6	3
6	8	8	8	2	2
7	11	11	11	3	3
8	8	8	8	8	7
9	8	8	8	6	5
<b>Summe CTC</b>	<b>94</b>	<b>94</b>	<b>94</b>	<b>67</b>	<b>55</b>
<b>MCF7</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
<b>T47D</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>Summe gesamt</b>	<b>122</b>	<b>122</b>	<b>122</b>	<b>79</b>	<b>67</b>

Bei den elf Zellen mit vier Amplifikaten in der QC konnten die *Hotspot*-Regionen von Exon 9 und Exon 20 des *PIK3CA*-Gens in allen Fällen erfolgreich amplifiziert werden, ebenso wie bei den fünf CTC mit drei Amplifikaten in der QC. Bei zwei der sechs Einzelzellen (33,3%) mit einer geringeren Qualität (zwei Amplifikate) konnte die *Hotspot*-Region von Exon 9 nicht amplifiziert werden, doch ließ sich Exon 20 vervielfältigen. Von 24 Einzelzellen mit einem Amplifikat in der QC wurde bei neun Zellen Exon 9 nicht vervielfältigt (37,5%), drei Zellen (12,5%) zeigten weder in Exon 9 noch in Exon 20 Amplifikate. Von 21 CTC mit null Amplifikaten in der QC zeigten neun CTC (42,8 %) kein Ergebnis in der Gelelektrophorese

nach der genspezifischen PCR. Zwei Zellen (9,5 %) konnten nicht für Exon 20 sowie fünf (23,8 %) nicht für Exon 9 amplifiziert werden. Fünf CTC (23,8 %) ohne Amplifikate in der QC konnten erfolgreich analysiert werden (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Korrelation der QC mit den Ergebnissen der genspezifischen PCR, welche entweder erfolgreich war oder eine fehlerhafte Amplifikation in Exon 9 und/oder 20 aufwies.

	QC				
	4	3	2	1	0
<b>Anzahl erfolgreicher Amplifikationen</b>	11/11	5/5	4/6	12/24	5/21
<b>Exon 20 kein Amplifikat</b>	0	0	0	0	2
<b>Exon 9 kein Amplifikat</b>	0	0	2	9	5
<b>Exon 9 &amp; 20 kein Amplifikat</b>	0	0	0	3	9

Abbildung 12 zeigt die genspezifische PCR der Exone 9 und 20.

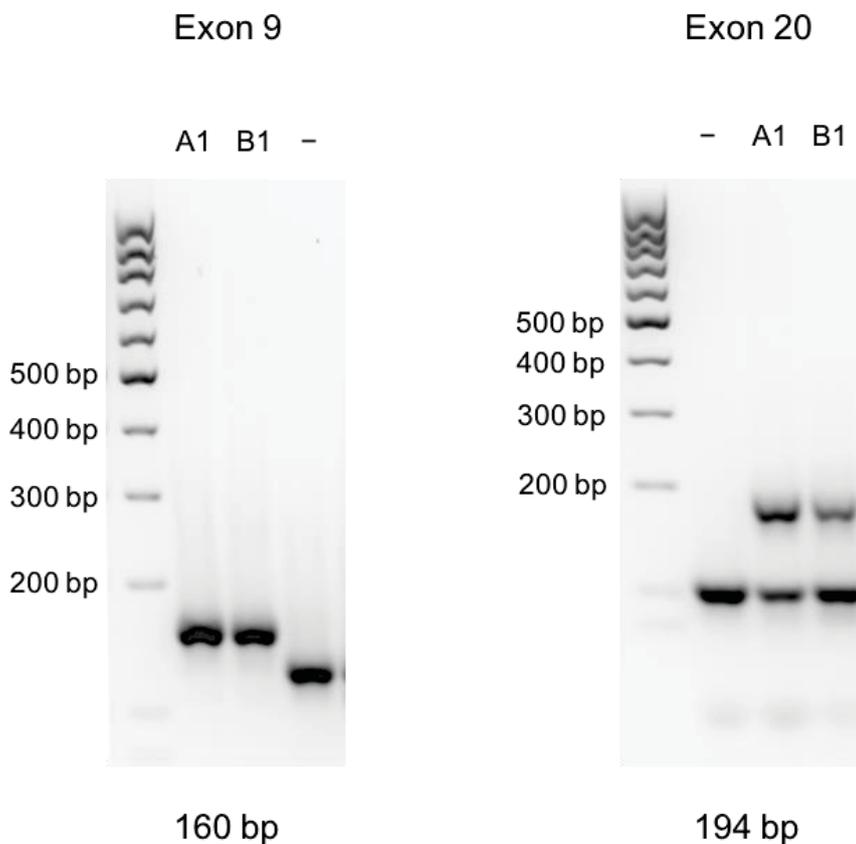


Abbildung 12: Bild einer genspezifischer PCR zweier Patientenproben (A1 und B1) von Exon 9 und 20 mit Negativkontrolle. Jeweils links aufgetragen ist der Größenstandard.

### 3.6 Ergebnisse des Sanger-Sequenzierens

Zur Mutationsanalyse des *PIK3CA*-Gens erfolgte nach der genspezifischen PCR der *Hotspot*-Regionen von Exon 9 und Exon 20 deren Sequenzierung nach Sanger.

Zur Verifizierung der Funktionsfähigkeit des Arbeitsablaufes wurden zunächst Einzelzellen der Zelllinien MCF7 und T47D sequenziert. Von den sieben MCF7-Zellen wiesen vier die gesuchte Mutation E545K in Exon 9, von fünf T47D-Zellen vier die Mutation H1047R in Exon 20 auf.

Die DNA von 55 CTC von neun Patientinnen ist in Kooperation mit dem BMFZ sequenziert worden. 20 CTC zeigten keine Mutation (Wildtyp, WT). 2 CTC aus Patientin 3 und 2 CTC aus Patientin 8 wiesen die heterozygote Mutation an *Hotspot* E545K (WT: GAG → AAG) in Exon 9 auf. 5 CTC der Patientin 3 zeigten die heterozygote Mutation an *Hotspot* E545A (WT: GAG → GCG) ebenfalls in Exon 9. Bei 16 CTC konnte nur Exon 20 analysiert werden, da Amplifikate der genspezifischen PCR von Exon 9 fehlten. Bei 8 CTC trat eine Sequenzüberlagerung in Exon 9 auf, Exon 20 konnte sequenziert werden und wies bei allen Zellen wildtypische DNA auf. Bei 2 CTC konnte Exon 9 amplifiziert werden (WT), Exon 20 aufgrund fehlender Amplifikation in der genspezifischen PCR jedoch nicht (Tabelle 18).

Tabelle 18: Ergebnisse der Sequenzierung

	Anzahl CTC
<b>Mutation E545A Exon 9</b>	5
<b>Mutation E545K Exon 9</b>	4
<b>Wildtyp Exon 9 und 20</b>	20
<b>Sequenzüberlagerung Exon 9, Wildtyp Exon 20</b>	8
<b>Kein Amplifikat Exon 9, Wildtyp Exon 20</b>	16
<b>Kein Amplifikat Exon 20, Wildtyp Exon 9</b>	2
<b>Summe</b>	55

Sechs der mutierten CTC wiesen in der QC vier Amplifikate auf, eine CTC drei, eine weitere CTC ein Amplifikat. Weiterhin befand sich eine der festgestellten E545K-*Hotspot*-Mutationen von Exon 9 in einer Zelle mit null Amplifikaten in der QC.

Patientin 3 zeigte von 22 sequenzierten CTC in zwei CTC Mutationen in *Hotspot* E454K in Exon 9, in fünf CTC Mutationen in *Hotspot* E545A, in vier CTC wurde keine Mutation detektiert (Wildtyp). Für die übrigen 11 CTC konnte der Status für Exon 9 nicht bestimmt werden, da nach der genspezifischen PCR kein Amplifikat vorlag. Exon 20 konnte in allen Fällen analysiert werden und zeigte keine Mutation.

Patientin 8 zeigte in acht sequenzierten CTC zwei Mutationen des *Hotspots* E545K in Exon 9, außerdem drei wildtypische Zellen, drei weitere konnten aufgrund von Sequenzüberlagerung und fehlenden Amplifikaten in der genspezifischen PCR von Exon 9 nicht analysiert werden. Auch hier konnte Exon 20 immer analysiert werden und zeigte keine Mutation (Tabelle 19).

Die Sequenziererergebnisse der beiden Patientinnen acht und drei sind im Anhang 6.7 unter Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19 zu finden.

Tabelle 19: Anzahl der festgestellten Mutationen im Hotspot E454K, E545A und der wildtypischen Zellen in den zwei Patientinnen 3 und 8 und deren Einordnung in den GI.

		QC				
		4	3	2	1	0
<b>Patientin 3</b>	<b>E545K</b>	1	1	0	0	0
	<b>E545A</b>	5	0	0	0	0
	<b>Wildtyp</b>	0	1	1	0	2
	<b>sequenzierte CTC gesamt</b>	22				
<b>Patientin 8</b>	<b>E545K</b>	0	0	0	1	1
	<b>E545A</b>	0	0	0	0	0
	<b>Wildtyp</b>	1	0	1	0	1
	<b>sequenzierte CTC gesamt</b>	8				

In Abbildung 13 sind die Sequenzierergebnisse der Zelllinien MCF7, T47D dargestellt. In der *Hotspot*-Region E545K in Exon 9 des *PIK3CA*-Gens der Zelllinie MCF7 ist die heterozygote Mutation an dem Doppel-*Peak* Guanin/Adenin (roter Pfeil) erkennbar. Die T47D-Zelllinie zeigt eine heterozygote Mutation im *Hotspot* H1047R durch einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin.

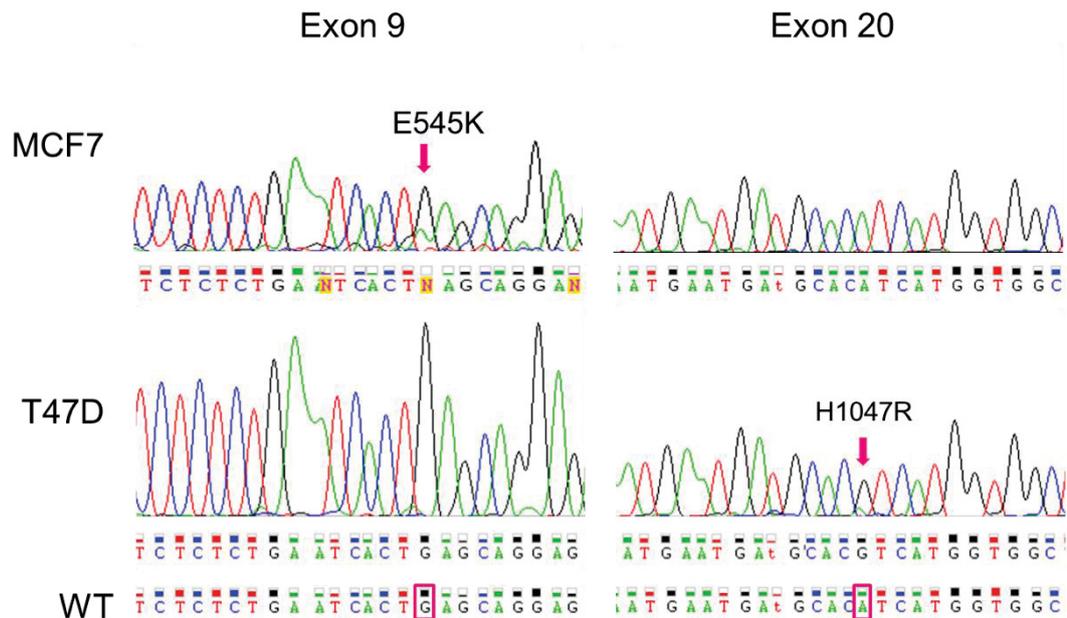
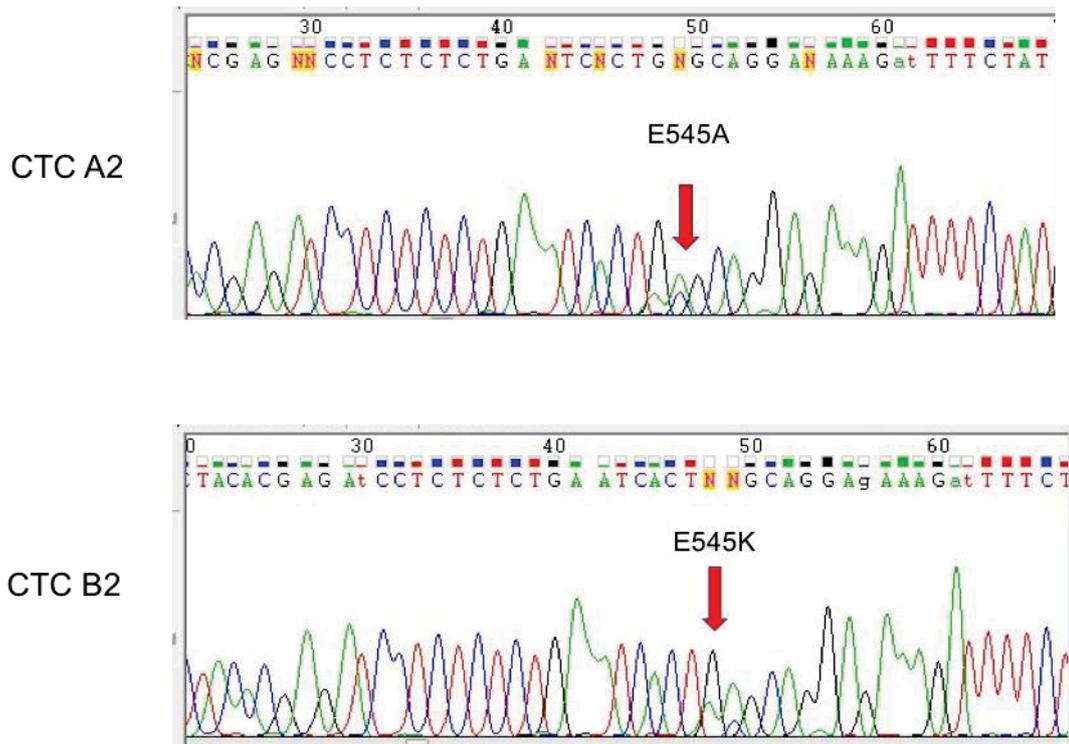


Abbildung 13: Beispielbilder von Sequenzierungen der *Hotspot*-Regionen E545K (G/A, Exon 9) der MCF7-Zelllinie und H1047R (A/G, Exon 20) der T47D-Zelllinie des *PIK3CA*-Gens.

In Abbildung 14 sind Beispielbilder der Sequenzierergebnisse von Patientin 3 und 8 zu sehen. Patientin 3 zeigt auf fünf Zellen die *Hotspot*-Mutation E545A, mit einem Basenaustausch von A zu C. Erkennbar ist dies an dem Doppel-*Peak* Adenin/Cytosin. Auf zwei Zellen trägt die Patientin die *Hotspot*-Mutation E545K (G/A), erkennbar an dem Doppel-*Peak* Guanin/Adenin. Bei Patientin 8 wurden zwei Zellen mit der *Hotspot*-Mutation E545K (G/A) detektiert.

### Patientin 3



### Patientin 8

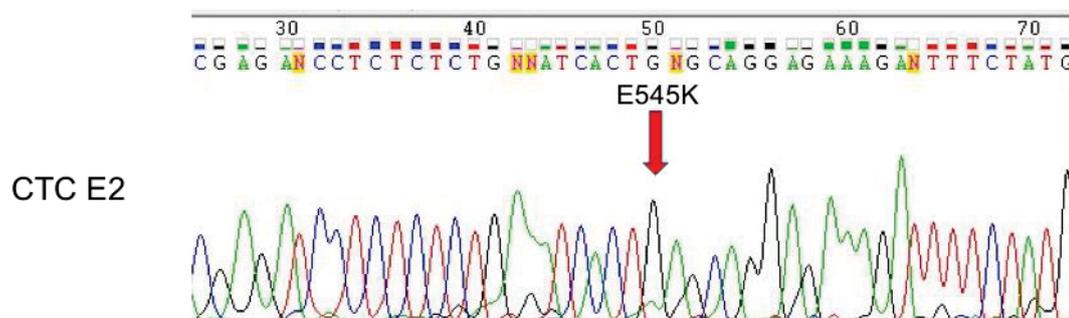


Abbildung 14: Beispielbilder von Sequenzierergebnissen der Patientinnen 3 und 8. Die Zelle A2 zeigt die Hotspot-Mutation E545A (A/C). Die Zellen B2 sowie E2 tragen die Hotspot-Mutation E545K (G/A) auf Exon 9. Gekennzeichnet sind die Mutationen mit den roten Pfeilen, die den Doppelpeak der heterozyoten Mutationen kennzeichnen.

Weiterhin zu beobachten war, dass bei zunehmend geringerer Qualität der QC häufiger eine Überlagerung der *Peaks* in der zu sequenzierenden Basenabfolge in Exon 9 auftrat (Abbildung 15). Die Auswertung der Sequenzierung von Exon 20 war nicht betroffen. Zwei Zellen mit drei Amplifikaten in der QC, eine Zelle mit zwei Amplifikaten, vier Zellen mit einem Amplifikat und zwei Zellen mit null

Amplifikaten wiesen eine Sequenzüberlagerung in Exon 9 auf. Vermutlich ist dies auf unspezifische Amplifizierungen während der genspezifischen PCR zurückzuführen, die bei abnehmender Qualität des WGA-Produktes vermehrt auftraten.

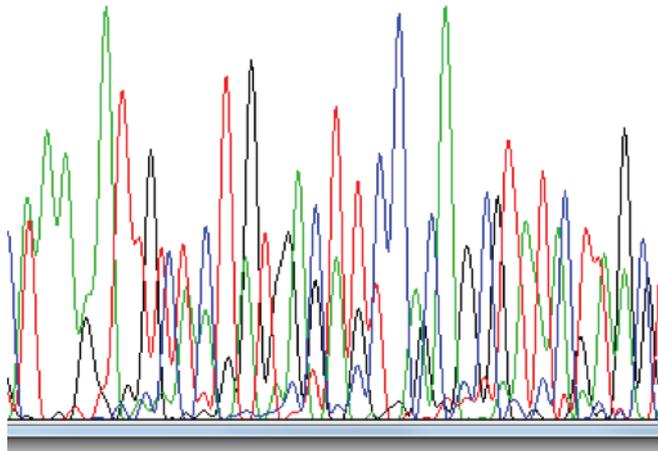


Abbildung 15: Sequenzüberlagerung bei einer CTC mit einer Ein-Banden-QC

### 3.7 Klinische Daten der Patientinnen mit PIK3CA-Mutation

Patientin drei mit einem Alter bei Erstdiagnose und Erst-Screening von 74 Jahren wies sieben mutierte CTC auf. Die Anzahl der CTC beim Erst-Screening lag bei 231 bei einer TumorgroÙe T3 und einem Nodalstatus N2. Sie war als Einzige der Patientinnen primär metastasiert bei einem Tumorstadium von IV, G2. Der Primärtumor war PR-/ER-positiv sowie Her-2/neu-negativ, für die Metastasen lag kein Hormonrezeptorstatus vor.

Bei Patientin acht konnten zwei mutierte CTC festgestellt werden; ihr Alter betrug 50 Jahre bei der Erstdiagnose und 57 Jahre beim Erst-Screening, bei dem 18 CTC nachgewiesen wurden. Die TumorgroÙe war T2, der Nodalstatus N1 und es lagen keine primären Fernmetastasen vor. Stadium II und Grading G2, positiver PR- und ER-Status und ein negativer Her-2/neu-Rezeptorstatus des Primärtumors waren weitere Merkmale dieses Tumors. Die metastatischen Läsionen zeigten einen *triple*-negativen Hormonrezeptorstatus.

## 4 Diskussion

### 4.1 Vorbemerkung

Bei den meisten Krebserkrankungen, so auch beim Mammakarzinom, ist die häufigste Todesursache die Metastasierung des Primärtumors in andere Organe [(10),(11)]. Der komplexe Mechanismus der Metastasierung ist noch zu großen Teilen unbekannt, es wird jedoch angenommen, dass im Blut zirkulierende Tumorzellen Vorläuferzellen der späteren metastatischen Läsionen darstellen [(12),(65)]. Die hohe prognostische Relevanz der Konzentration der CTC im peripheren Blut zeigt sich in Bezug auf das Gesamtüberleben, das progressionsfreie Intervall sowie bei der Überwachung des Therapieerfolgs [(23),(25),(27)].

Die molekulare Charakterisierung der CTC ist essentiell, da diese häufig andere ER-, Her-2/neu- und PR-Expressionsstatus aufweisen können als der Primärtumor, was darauf hindeutet, dass sich die Tumorbiologie im Verlauf der Krankheit ändern kann [(33),(34)]. Ist beispielsweise der Primärtumor Her-2/neu-negativ, können CTC dennoch Her-2/neu-positiv sein. In solchen Fällen könnten Patientinnen von einer gegen Her-2/neu gerichteten Therapie profitieren (33). Dies legt nahe, zu analysieren, ob sich durch eine frühzeitige Charakterisierung der CTC eine Therapie optimieren lässt, mit der eine Metastasierung eingedämmt werden könnte (35). Die Beantwortung dieser Frage ist derzeit Ziel verschiedener klinischer Studien, z.B. der DETECT-Studien (60).

Bei Mammakarzinomen und in CTC ist häufig die Aktivität des PI3-Kinase-Signalweges, der unter anderem über HER-2/neu aktiviert wird, verändert (54). Dieser Signaltransduktionsweg spielt eine essentielle Rolle in der Zellproliferation und -differenzierung und im Zellmetabolismus [(46),(47)].

Diese Veränderungen können dadurch auftreten, dass die Aktivität der PI3-Kinase durch Mutationen in Exon 9 und 20 des *PIK3CA*-Gens konstitutiv erhöht ist. Dies führt zu einer Deregulation der Enzymaktivität und zu einer verstärkten Resistenz gegen eine gegen HER-2/neu gerichtete Antikörpertherapie [(49),(50)]. Durch die Mutationen in den Exonen 9 und 20 des *PIK3CA*-Gens sind eventuell auch Resistenzen gegenüber Hormontherapien, zum Beispiel gegenüber einer Anti-Estrogentherapie, möglich (47). Die weiterführende Analyse von CTC und deren genomischen Mutationen stellt demnach ein wichtiges Feld der

Forschung dar und kann einen Beitrag zu einer Optimierung der Therapie und auch zu einem besseren Verständnis des Metastasierungsprozesses leisten.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse einzelner Untersuchungsaspekte**

### **4.2.1 WGA-/QC-Ergebnisse**

Da die Einzelzellanalyse aufgrund der geringen DNA-Menge von ca. 7 pg pro Zelle eine methodische Herausforderung darstellt, erfordert sie ein zur Amplifikation des gesamten Genoms geeignetes Protokoll, hier gegeben durch das Ampli1™ WGA Kit. Die mit diesem Kit durchgeführte WGA ist eine Adapter-Linker basierte PCR, die den geringen DNA-Gehalt einer Einzelzelle vervielfältigt, um mehr Ausgangsmaterial für die weiteren Analysen zu erlangen. Die DNA wird hierbei durch das Restriktionsenzym MseI an immer derselben Basenfolge (TTAA) in Fragmente geschnitten, danach wird ein Adapter ligiert, über den die geschnittenen Fragmente amplifiziert werden. Diese werden dann im nächsten Schritt amplifiziert (66). Bei Einsatz von MseI kann sichergestellt werden, dass die zu sequenzierenden *Hotspot*-Regionen nicht zufällig fragmentiert und so unbrauchbar für die spätere Sequenzierung gemacht werden. Ausschlaggebend für die weiteren Analysen ist die Qualität der amplifizierten Proben. Die Qualität wird dargestellt durch die Amplifikation von vier Bereichen mit Hilfe der QC-PCR. Bei einer Amplifikation von mindestens drei dieser Bereiche besteht die bestmögliche Qualität, während zwei oder weniger Amplifikate niedrige Qualität bedeuten. Eine geringe Anzahl an Amplifikaten in der QC kann bedeuten, dass nicht genügend Ausgangsmaterial aus der WGA vorliegt, um die Amplifikation der vier Bereiche der QC möglich zu machen, was auf eine fehlerhaft abgelaufene WGA hindeuten kann.

Polzer *et al.* definierten einen GII von 0 (niedrige Qualität) bis 4 (hohe Qualität), welcher die Qualität der DNA nach erfolgter WGA mit der Anzahl der Amplifikate der QC-PCR in Relation setzt (38).

Die Durchführung der WGA im Rahmen dieser Arbeit bei n = 94 CTC zeigte, dass 11,7 % der CTC einen GII von vier, 5,3 % von drei, 6,3 % von zwei, 25,5 % von eins und 51,0 % von null aufwiesen.

Dagegen zeigten Polzer *et al.* bei einer Probenzahl von  $n = 75$  CTC ( $> 1$  CTC/CellSearch<sup>®</sup>-Kartusche) einen GII von vier bei 42 % der CTC, von drei bei 14,6 %, von zwei bei 9,3 % und von null oder eins bei 32 % der Proben (38). Die im Vergleich zu den Daten bei Polzer *et al.* höhere Anzahl von Zellen mit einem GII von null kann zum einen damit begründet werden, dass die Technik der Mikromanipulation der Einzelzellen am CellSelector von der von Polzer *et al.* verwendeten Technik (DEPArray<sup>™</sup>) abwich. Die Zelle kann beispielsweise während der Aspiration an den Wänden der Kapillare des CellSelectors verbleiben, womit eine Ablage der CTC in das Zielgefäß ausbleiben würde. Eine weitere mögliche Fehlerquelle liegt in der Volumenreduktion der Probe nach der Mikromanipulation am CellSelector. Hier könnte das Abnehmen des Überstandes nach Zentrifugation zum Verlust der Zelle führen.

#### **4.2.2 Genspezifische PCR**

Nach der WGA erfolgte eine genspezifische PCR der Exone 9 und 20 des *PIK3CA*-Gens, um eine ausreichende Menge genomischer DNA zur Sequenzierung vorliegen zu haben.

Die Amplifikation der beiden Exone aus WGA-Produkten mit abnehmender QC-Qualität (zwei, ein und null Amplifikate) führte zu zunehmend schlechteren Resultaten. Bei Zellen mit einem GII von 4 und 3 gelang die genspezifische PCR in allen Fällen, wohingegen bei 2/6 (33,3 %) Zellen mit einem GII von 2 Exon 9 nicht amplifiziert werden konnte. 4/6 (66,6 %) der Zellen wiesen beide Fragmente nach der PCR auf. Bei Zellen mit einem GII von 1 war die genspezifische PCR in 12/24 (50,0 %) der Fälle erfolgreich, 9/24 (37,5 %) Zellen zeigten kein Exon 9 Amplifikat und in 3/24 (12,5 %) der Fälle konnte weder ein Amplifikat von Exon 9 noch von Exon 20 nachgewiesen werden. Von 21 exemplarisch bearbeiteten Zellen mit einem GII von 0 wiesen 5/21 (23,8 %) Zellen kein Amplifikat für Exon 9 auf, 2/21 (9,5 %) kein Amplifikat für Exon 20. Bei 9/21 (42,8 %) war weder Exon 9 noch Exon 20 amplifiziert und bei 5/21 (23,8 %) Zellen konnten beide Fragmente amplifiziert werden.

Gründe hierfür liegen in der zunehmend niedrigeren DNA-Qualität der amplifizierten Proben bei einem GII von 2-0. Für eine genspezifische PCR muss

genügend Ausgangsmaterial in guter Qualität vorliegen. Doch stellt sich die Frage, warum in einigen Fällen die genspezifische PCR auch bei Zellen mit einem GII von 0 erfolgreich war. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass im Rahmen der QC-PCR vier unterschiedliche *Primerpaare* zum Einsatz kommen, die vier Fragmente mit einer Länge von 91 bis 614 Basenpaaren amplifizieren (67). Wurden diese DNA-Abschnitte aufgrund von teilweise fehlerhaft abgelaufener WGA nicht amplifiziert, können die QC Primer nicht binden und es resultiert ein GII von 0. Der Abschnitt zum Beispiel des *PIK3CA*-Gens kann dennoch vervielfältigt worden sein. Aus diesem Grund kann auch bei einer QC-PCR mit nur einem oder null Amplifikaten DNA durch die zuvor durchgeführte WGA vorliegen. Aus der Anzahl der Amplifikate nach QC-PCR kann demzufolge eine generelle Tendenz der Qualität abgelesen werden, ohne dabei auf die Amplifikation einzelner Regionen zu schließen. Im Gegensatz zur Sanger Sequenzierung ist bei Verfahren wie der *Array-based Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH)* ein möglichst vollständiges Vorliegen der genomischen DNA nach WGA notwendig. In der hier vorliegenden Arbeit wurde jedoch aus den genannten Gründen auch exemplarisch bei 21 Zellen mit einem GII von 0 die genspezifische PCR durchgeführt, um die Erfolgsquote der weiteren Analysen dieser Zellen darzustellen. Von den insgesamt 67 amplifizierten CTC zeigten 16/67 (23%) kein Amplifikat von Exon 9 und 2/67 (2,9%) kein Amplifikat von Exon 20. Eine mögliche Erklärung könnte ein unterschiedlich hoher Guanin-/Cytosingehalt der DNA sein. Ein hoher Guanin-/Cytosingehalt der zu amplifizierenden DNA kann zu einer erschweren Primerbindung führen, da Guanin-/Cytosin-Paare drei Wasserstoffbrücken ausbilden, wohingegen zwischen Adenin- und Thyminpaaren zwei Wasserstoffbrücken bestehen (68). Dies erfordert eine höhere Schmelztemperatur des Primers. Sollte das nicht gegeben sein, ist eine erschweren Primerbindung die Folge (69).

In den hier vorliegenden Sequenzen jedoch beträgt der Guanin-/Cytosingehalt in Exon 9 33,0% und in Exon 20 38,4%, was die erschweren Amplifikation von Exon 9 somit nicht erklärt. In der Arbeit von R. Lampignano *et. al* (70) liegt kein Unterschied in der Amplifikationsrate von Exon 9 und 20 vor. Eventuell kann die unterschiedliche Amplifikation von Exon 9 und 20 in der hier vorliegenden Arbeit aufgrund der geringen Fallzahlen nicht repräsentativ für eine generelle Tendenz gewertet werden und müsste anhand größerer Fallzahlen überprüft werden.

Die *Primer* der genspezifischen PCR wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor der Frauenklinik erstellt. Eine dabei bestehende Herausforderung ergab sich aus der Existenz eines Pseudogens auf Chromosom 22, welches eine mit der *Hotspot*-Region des *PIK3CA*-Gens nahezu identische Sequenzabfolge aufweist. Durch das Erstellen eines *Reverse Primers*, welcher genau an der Base endet, die bei beiden Genen differiert, wird sichergestellt, dass die *Hotspot*-Region des *PIK3CA*-Gens und nicht das Pseudogen amplifiziert wird. Da in den ersten Nucleotiden zwischen der zu sequenzierenden Region und der Bindestelle des *Primers* häufig eine gewisse Unschärfe auftritt, sollte ein Abstand zwischen dieser Region und der Bindestelle von 40 bis 50 Basenpaaren (71) eingehalten werden, hier jedoch konnte der Abstand nur 23 Basenpaare betragen. Aufgrund der Schnittstelle des Enzyms *MseI* wurde auch vor dem *Hotspot* im Bereich des *Forward Primers* die Zahl möglicher Bindestellen restringiert, hier konnte der Abstand zwischen zu sequenzierender Region und *Primer*-Bindestelle ebenfalls nur 23 Basenpaare betragen. Das Problem wurde durch Verwendung eines Amplifikations-*Primers* der genspezifischen PCR gelöst, welcher die *Primer*-Bindestelle des Sequenzierungs-*Primers* mit sich brachte (Abbildung 11, Kapitel 3.5).

#### 4.2.3 Sequenzierverfahren

Zur Validierung eines funktionierenden Arbeitsablaufes wurde die Sequenzierung zunächst mit Zellen der MCF7- und T47D-Zelllinien durchgeführt, die die E545K-Mutation in Exon 9 (MCF7) bzw. die H1047R-Mutation in Exon 20 (T47D) heterozygot tragen (63). Von 7 MCF7-Zellen wiesen 4 die gesuchte Mutation E545K auf Exon 9 auf, von 5 T47D-Zellen zeigten 4 die Mutation in *Hotspot* H1047R auf Exon 20. Die Detektion von Wildtyp-Sequenzen des untersuchten Gens innerhalb einer Zelllinie kann aus einem „*Allelic Dropout*“ resultieren. Darunter versteht man, dass während der PCR einzelne Allele nicht gleich stark amplifiziert werden, was eine falschen Homozygotie zur Folge haben kann. Dies würde in der vorliegenden Arbeit beispielsweise zu einem falsch negativen Ergebnis führen.

Die bei zwei Patientinnen festgestellten 4 Mutationen des *PIK3CA*-Gens des *Hotspots* E545K und die 5 Mutationen des *Hotspots* E545A in Exon 9 der Patientin

3 lagen in den Zellen jeweils heterozygot vor, das heißt, sowohl das Wildtyp-Allel als auch das punktmutierte Allel waren in der Sequenzierung nachweisbar. Die Detektionsrate von 16,4 % (9 von 55 Zellen) Mutationen im *PIK3CA*-Gen in 2 von 9 untersuchten Patientinnen (22,2%) entspricht ungefähr der Detektionsrate von Schneck *et al.*, die in 9 von 57 Blutproben (15,8 %) beziehungsweise in 7 von 44 metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen (15,9 %) mittels der SnaPshot-Analyse 12 *Hotspot*-Mutationen sowohl in Exon 9 (6 von 12) als auch in Exon 20 (6 von 12) nachweisen konnten (58). Diese Charakterisierung wurde jedoch im Unterschied zur Einzelzellanalyse mit Blutproben durchgeführt, die mehrere CTC und eventuelle Verunreinigungen durch Leukozyten enthielten, was die Mutationsanalyse erschwert haben könnte. Angewendet wurde hier die SnaPshot-Methode, welche auf dem Einbau von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden im Bereich der Punktmutationen beruht (58). Pestrin *et al.* konnten in 6 von 18 (33,0 %) Mammakarzinom-Patientinnen eine Mutation des *PIK3CA*-Gens auf Einzelzellebene mit CellSearch<sup>®</sup> und DEPArray<sup>™</sup> als Isolationsmethoden der CTC nachweisen (39).

Gasch *et al.* erreichte eine Detektionsrate der *Hotspot*mutationen des *PIK3CA*-Gens bei 36/114 (31,6%) der untersuchten CTC und 12/33 (36,4%) der Patienten. Sie verwendeten ebenfalls Blutproben aus der DETECT III Studie, welche nach CellSearch Analyse mittels eines Mikromanipulators isoliert wurden. Es erfolgte die WGA mit Hilfe des Ampli1<sup>™</sup> WGA Kit sowie mit dem GenomiPhi DNA Amplifikation Kit, eine genspezifische PCR und die anschließende Sequenzierung der Einzelzellen (72). Markou *et al.* detektierten in 8 von 57 (14,0 %) metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen ihrer Untersuchungsgruppe *PIK3CA*-Mutationen in Exon 9 und in 12 von 57 (21,1 %) in Exon 20. Die Mutationsanalyse wurde hier mit Hilfe einer Allel-spezifischen PCR und einer Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (57). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erreichte Detektionsrate von 16,5 % zeigt, dass die Analyse von Einzelzellen mittels dieses Workflows dem Standard anderer vergleichbarer Arbeiten entspricht. Auf Exon 20 konnte keine Mutation gefunden werden, eventuell aufgrund der geringen Probenanzahl. Aus diesem Grund ist eine Erhöhung der Probenanzahl dringend erforderlich.

#### 4.2.4 Genotypische Heterogenität der CTC innerhalb einer Patientin

In der hier vorliegenden Arbeit wurden in 5 von 22 CTC der Patientin 3 eine Mutation des *Hotspots* E545A detektiert, in 2 von 22 CTC eine Mutation des *Hotspots* E545K und 4 von 22 CTC wiesen wildtypische DNA auf. Der Status der restlichen 11 CTC konnte aufgrund fehlender Amplifikate nach genspezifischer PCR oder Sequenzüberlagerung bei der Auswertung (Diskussion folgt unten) nicht bestimmt werden. Patientin 8 zeigte in 2 von 8 CTC die Mutation E545K auf Exon 9 und in 3 von 8 wildtypische DNA, auch hier konnte für 3 CTC wegen fehlender Amplifikate nach der genspezifischen PCR kein Status bestimmt werden. Ungeachtet der geringen Fallzahl stellen diese Zahlen einen Hinweis auf eine stark ausgeprägte Heterogenität genomischer Mutationen am Beispiel des *PIK3CA*-Gens innerhalb einer Patientin auf Einzelzellebene dar. Diese Beobachtungen stimmen mit den Daten von Pestrin *et al.* überein, nach denen der Status von *PIK3CA*-Mutationen in CTC bei 2 von 8 (11 %) Patientinnen heterogen war (39). Bei Polzer *et al.* war dies bei 10 von 16 Patientinnen (62,5 %) der Fall (38), in der vorliegenden Arbeit bei 2 von 9 Patientinnen (22,2 %). Gasch *et al.* beschreibt ebenfalls Heterogenität bezüglich der *PIK3CA*-Mutation auf CTC innerhalb einer Patientin (72). Klinische Bedeutung kommt der Heterogenität bezüglich der *PIK3CA*-Mutation innerhalb einer CTC Population derselben Patientin unter anderem zu, weil sie die Notwendigkeit individualisierter Therapieentscheidungen deutlich macht. CTC, die eine Mutation des PI3K-Signalweges beherbergen, können gegen die Therapeutika Lapatinib und Trastuzumab resistent sein (50). Patientinnen, welche CTC mit der *PIK3CA*-Mutation in sich tragen, könnten daher von dem Einsatz alternativer Therapien, wie den in Entwicklung befindlichen Inhibitoren des PI3K-Signalweges, profitieren (47). Auch bezüglich klinischer Parameter wie Tumor-/Metastasenprogression zeigen Hanker *et al.* im Tiermodell, dass das Vorkommen von *PIK3CA*-Mutationen in Her-2/neu-positiven Tumoren eine verstärkte Progression von Metastasen sowie eine schnellere Entstehung von Mammakarzinomvorstufen mit sich bringt (49). CTC stellen eine Subpopulation von Zellen des Primärtumors dar, die die Fähigkeit zur Disseminierung in die Blutzirkulation zeigt. Nur einige der CTC werden später in der Lage sein, sich in distanten Organen anzusiedeln und

Fernmetastasen zu bilden [(10),(18)]. Inwieweit die Heterogenität der CTC die intratumorale Heterogenität des Primärtumors reflektiert, ist noch unklar. Zu analysieren wäre deshalb zukünftig auch der Mutationsstatus des Gewebes des Primärtumors der Patientinnen im Vergleich mit dem Mutationsstatus der CTC. Pestrin *et al.* verglichen in 6 Patientinnen den *PIK3CA*-Mutationsstatus des Primärtumors mit dem der CTC und fanden in allen Fällen Konkordanz vor, mit der Ausnahme von nur einer Patientin. Hier zeigten die CTC die *PIK3CA*-Mutation, der Primärtumor jedoch nicht (39). Insgesamt ist die Fallzahl aber sehr gering. Markou *et al.* beschreiben in ihrer Arbeit, dass *PIK3CA*-Mutationen in CTC mit einem geringeren *Overall Survival* einhergehen (57). Mit der hier vorliegenden Arbeit kann kein Bezug zum *Overall Survival* hergestellt werden, da die DETECT-Studien aktuell noch nicht abgeschlossen sind. Die Daten weisen darauf hin, dass sich der Mutationsstatus der CTC während des Krankheitsverlaufes ändern kann, was dafür spricht, eine regelmäßige Charakterisierung der CTC während des Krankheitsverlaufes in Form einer *Liquid Biopsy* durchzuführen.

Zusammenfassend demonstrieren die vorliegenden Daten, dass die Analyse genomischer DNA auf Einzelzellebene wertvolle Informationen zur Charakterisierung der CTC liefern und somit eventuell dabei helfen kann, auf das Krankheitsbild eines individuellen Patienten abgestimmte Therapieentscheidungen zu treffen.

Eine Mutation des *Hotspots* E545K auf Exon 9 wurde auf einer Zelle von Patientin drei mit einem GII von 0 gefunden. Dies gibt Grund zur Annahme, dass Zellen mit einer niedrigen Qualität, d. h. einem GII von 1 oder 0, nicht generell von jeder weiteren Analyse auszuschließen sind. Wie oben dargelegt, kann das Ausbleiben eines Amplifikats bei einer QC-PCR mehrere Gründe haben, die jedoch nicht ausschließen, dass dennoch eine partielle WGA stattgefunden hat und nur keine Amplifikation genau der Abschnitte vorliegt, an die die *Primer* der QC-PCR binden. Da aber die Mehrheit der Zellen mit einem GII von 1 bis 0 kein Amplifikat nach der genspezifischen PCR aufwiesen oder bei der Sequenzierung der DNA dieser Zellen problematische Sequenzüberlagerungen auftraten, ist der Arbeitsaufwand gegen den Nutzen abzuwägen. Dies führt zu der nächsten Beobachtung: der negativen Korrelation zwischen einem niedrigen GII (0 oder 1) und der Häufigkeit von Sequenzüberlagerungen. Dieses Problem zeigte sich bei der Auswertung der sequenzierten DNA durch gegenseitige Überlagerung der einzelnen

Nukleotide über die gesamte Probe (siehe Abbildung 15, Kapitel 3.6). Insgesamt 8 von 55 sequenzierten CTC, davon zwei Zellen mit einem GII von drei, eine Zelle mit einem GII von zwei, vier Zellen mit GII von eins und zwei Zellen mit einem GII von null zeigten die Sequenzüberlagerung in Exon 9. Eine Selbstamplifikation der Primer kann ausgeschlossen werden, da die Primerconcatamere beziehungsweise deren Primersequenz im Sequenzierergebnis nicht zu sehen war. Eine weitere Ursache könnte in der Sequenzierungssoftware liegen. Wenn die Menge der vorliegenden, amplifizierten DNA nicht ausreicht, versucht die Software dies zu kompensieren, indem sie sämtliche Signale auf ein höheres, detektierbares Level hebt. Dabei werden auch die Hintergrundsignale verstärkt, die dann die Signale der DNA überlagern. Bei Proben mit guter Qualität und hoher Signalstärke wird durch die Software nur in geringem Maße amplifiziert und das Hintergrundrauschen bleibt unterhalb des detektierbaren Levels. Die hier vorliegenden Beobachtungen bestätigen diese These, da Sequenzüberlagerungen häufiger bei CTC mit einem niedrigen GII, d. h. bei CTC mit einer niedrigen Qualität der Amplifikate nach WGA aufgetreten sind. Das Problem der Sequenzüberlagerung kann ebenfalls infolge von Kontamination beispielsweise durch Salze oder Phenole auftreten. Diese Reagenzien können die empfindliche Polymerase der Sequenzierungs-PCR inhibieren. Da eine erneute Aufreinigung der Proben die Überlagerungen nicht behoben hat, kann diese Ursache weitestgehend ausgeschlossen werden. Auch aus der PCR-Reaktion verbleibende, überschüssige *Primer* und dNTP können als Ursache der Sequenzüberlagerungen ausgeschlossen werden, da jede Probe vor der Sequenzierung aufgereinigt und verdünnt wurde, sodass keine Störungen durch Kontamination auftreten konnten.

#### 4.2.5 Korrelation mit klinischen Daten

Patientin 3 zeigte als einzige Patientin primäre Fernmetastasen und 7 CTC mit einer Mutation des *Hotspots* E545A/E545K des *PIK3CA*-Gens. Wegen der geringen Fallzahl sind aus diesen Beobachtungen keine allgemeingültigen Rückschlüsse zu ziehen, doch in weiteren Studien wäre es von Interesse festzustellen, ob die Patientinnen, die CTC mit *PIK3CA*-Mutation aufweisen, häufiger primäre Fernmetastasen und/oder Rezidive zeigen als Patientinnen ohne *PIK3CA*-Mutation.

#### 4.2.6 Bilderanalysen

Um die Qualität der Amplifikate nach erfolgter WGA mit morphologischen Merkmalen der entsprechenden CTC zu korrelieren, wurden wie im Ergebnisteil in Kapitel 3.3.1 beschrieben, drei Indices entwickelt (Nukleus<sub>morph</sub>, Cytokeratin<sub>morph</sub> und Durchmesser<sub>morph</sub>). Die Einteilung der CTC erfolgte in jeweils drei Kategorien (1 bis 3, nach aufsteigender Qualität) der einzelnen Indices (s. Kapitel 3.3.1, Abbildung 7). Die CTC wurden zusätzlich noch in die Subkategorien eins bis vier nach Polzer *et al.* eingeordnet (38). Diese Indices/Kategorien wurden dann mit dem GII der CTC korreliert, der Index Cytokeratin<sub>morph</sub> erreichte dabei den höchsten Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,81$  und kann somit am ehesten die spätere WGA-Qualität vorhersagen. Gefolgt wird der Korrelationskoeffizient von Cytokeratin<sub>morph</sub> von dem Index Nukleus<sub>morph</sub> mit  $r = 0,68$ , den Subkategorien nach Polzer *et al.* mit  $r = 0,40$  und dem Index „Durchmesser<sub>morph</sub>“ mit  $r = 0,37$ . Eine intakte Zell- bzw. Nukleusmorphologie ging mit einer guten Qualität der amplifizierten Produkte nach WGA einher. Beachtet werden muss hierbei allerdings, dass durch das Scannen der CTC mittels CellSearch<sup>®</sup> und CellCelector bereits eine Vorauswahl der CTC stattgefunden hat. Der CellCelector wird in der hier vorliegenden Arbeit dazu benutzt, Zellen zu isolieren, die eine intakte Morphologie zeigen. Zellen, die beispielsweise zum größten Teil schon fragmentiert sind, werden von dem Gerät nicht als CTC erkannt und somit auch nicht als Einzelzelle isoliert. Die gezeigten Zahlen geben demnach kein objektives Bild aller morphologischen Merkmale von CTC einer Patientenprobe.

Ein weiteres Problem stellen die CTC mit einem GII von 0 dar. Der GII von 0 kann zum einen durch eine fehlerhafte Ablage der CTC während des Isolationsvorgangs oder durch eine nur partiell erfolgreiche WGA verursacht sein. Sollen jedoch morphologische Merkmale von CTC miteinander und mit der Qualität des PCR-Produktes nach WGA verglichen werden, muss die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass CTC in diesen Vergleich einfließen, die durch eine fehlerhafte Isolation verloren gegangen sind. Wird dies nicht ausgeschlossen, kann die resultierende Vermischung zweier unabhängiger Effekte den Korrelationskoeffizienten verfälschen. Dementsprechend wurden alle CTC mit einem GII von 0 von der Korrelationsanalyse und den Bilderanalysen ausgeschlossen. Diese Arbeit möchte mit den Bilderanalysen den Machbarkeitsnachweis dafür erbringen, dass die Korrelation von CTC-Bildern des CellCelectors zur Einteilung der Zellen nach morphologischen Kriterien mit der Qualität der WGA-Produkte, dargestellt durch den GII nach Polzer *et al.*, möglich ist.

### **4.3 Limitationen der Arbeit**

Die hier vorliegende Arbeit stellt als Etablierungsarbeit einen neuen *Workflow* zur Sequenzierung von *PIK3CA*-Mutationen auf Einzelzellebene dar. Aus diesem Grund sind die Fallzahlen der analysierten Zellen gering. Um valide Aussagen über die Häufigkeitsverteilung der *PIK3CA*-Mutation zu treffen, sollten die Analysen in Zukunft eine größere Anzahl von CTC umfassen. Erst dann können statistisch relevante Aussagen über die Häufigkeit der vorliegenden Mutation getroffen werden.

Auch die Beurteilung der Ergebnisse der genspezifischen PCR unterliegt dieser Einschränkung. Die aufgetretenen Unterschiede in Bezug auf die Amplifikationsrate von Exon 9 und 20 sollten anhand einer größeren Kohorte amplifizierter CTC überprüft werden.

Die Tatsache, dass ein hoher Prozentsatz der Zellen einen niedrigen GII-Index von 0-2 aufweist, zeigt, dass wahrscheinlich ein Arbeitsschritt des *Workflows* die Qualität der DNA beeinträchtigt hat. Dieser Schritt muss gefunden und optimiert werden. Zwischenzeitlich wurde im Ampli1™ WGA Kit das Protokoll verändert und der MSEI-Verdau verlängert. Möglicherweise resultiert hieraus eine bessere

Qualität der DNA und insgesamt eine höhere Detektionsrate durch die Sequenzierung.

Den Bilderanalysen, die eine Korrelation der QC-Ergebnisse mit den Bildern der CTC aus dem CellCelector-*Workflow* darstellen, liegt ebenfalls eine niedrige Zahl von analysierten Einzelzellen zu Grunde. Um die Vorhersagbarkeit der QC-Qualität anhand morphologischer Merkmale der Zellen zu bestätigen, sollten die Analysen an einer größeren Anzahl von CTC durchgeführt werden. Die berechneten Korrelationen sind deshalb exemplarisch für weitere Analysen zu sehen.

#### 4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Bis heute werden Therapieentscheidungen im Hinblick auf Krebserkrankungen anhand der molekularen Marker des Primärtumors getroffen (5). Da jedoch Metastasen und CTC andere molekulare oder genetische Merkmale als der Primärtumor tragen können, ist eine Charakterisierung dieser Zellen von großer Bedeutung für eine individualisierte, zielgerichtete Therapieentscheidung [(33, 35)].

Mit Hilfe des etablierten Arbeitsablaufes kann die Heterogenität von *PIK3CA*-Hot-spot-Mutationen in einzelnen CTC innerhalb der CTC-Population einer Patientin detektiert werden. Dies kann als Grundlage für weitere Studien bezüglich einer individualisierten Therapieentscheidung dienen, auf deren Basis zukünftig PI3K-Inhibitoren eingesetzt und Resistenzen gegenüber Lapatinib und Trastuzumab frühzeitig festgestellt werden können. Die vorliegende Arbeit hat den Nachweis erbracht, dass eine solche Heterogenität innerhalb einer CTC-Population derselben Patientin beim *PIK3CA*-Gen bestehen kann. Die Ergebnisse bisheriger Forschung wurden damit bestätigt.

Die Analyse kann nicht nur für das *PIK3CA*-Gen durchgeführt werden, sondern ebenfalls für andere therapeutisch relevante Gene wie *PTEN*, *ER* oder *EGFR*. Außerdem können durch die Charakterisierung von CTC in Zukunft wertvolle Informationen zu den Grundlagen des Metastasierungsprozesses gewonnen werden.

Durch den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Arbeitsablauf kann in Zukunft die Analyse auf Einzelzellebene mittels CellSearch<sup>®</sup>, CellCelector, WGA, genspezifischer PCR und Sanger-Sequenzierung auch bei Proben mit geringer CTC-Anzahl einfach durchgeführt werden. Die für diesen Arbeitsablauf erforderliche periphere Blutentnahme ist ein minimal invasiver Eingriff und kann jederzeit zum Zweck einer Echtzeit-Biopsie wiederholt werden.

Für weitere Analysen wäre es von Interesse, anhand größerer Fallzahlen ebenfalls Gewebeproben des Primärtumors zu charakterisieren, um weitergehende Informationen über die Heterogenität von CTC und Primärtumor zu erhalten.

Die Beurteilung der CTC nach den in dieser Arbeit erstellten morphologischen Indices ermöglicht es, zukünftig schon früh im Arbeitsablauf abzuschätzen, ob eine CTC für eine WGA und/oder eine genspezifische PCR geeignet ist und akurate Ergebnisse zu erwarten sind. Dies optimiert den

Charakterisierungsprozess und damit den oben dargestellten Arbeitsablauf. Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit konnte die technische Grundlage für die Mutationsanalyse von CTC am Beispiel der *PIK3CA*-Mutation auf Einzelzellebene geschaffen werden.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Dr. Benjamin Barnes (verantwortlich) DKK, Nowossadeck E, Schönfeld I, Anne Starker AW, Dr. Ute Wolf. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016: Robert-Koch Institut, Nordufer 20 D-13353 Berlin; 2016.
2. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):453-8.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
4. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*. 2010;70(14):5649-69.
5. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) DKeVDuDKD. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. 2017.
6. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 2015;8:23-31.
7. Lebeau A, Kriegsmann M, Burandt E, Sinn HP. [Invasive breast cancer: the current WHO classification]. *Pathologe*. 2014;35(1):7-17.
8. Ali SM, Harvey HA, Lipton A. Metastatic breast cancer: overview of treatment. *Clin Orthop Relat Res*. 2003(415 Suppl):S132-7.
9. Aktories K. FU, Hoffmann F.-B., Starke K. *Pharmakologie und Toxikologie: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH*; 2013.
10. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(8):591-602.
11. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(6):449-58.
12. Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):274-84.
13. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
14. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci*. 2010;101(2):293-9.
15. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*. 2001;23(10):912-23.
16. Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res*. 2008;68(4):989-97.
17. Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res*. 2003;5(6):R217-22.
18. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(8):563-72.
19. Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):302-12.
20. Stoecklein NH, Klein CA. Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *Int J Cancer*. 2010;126(3):589-98.

21. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(6):448-56.
22. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(5):329-40.
23. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(8):781-91.
24. Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 2013;59(1):110-8.
25. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nole F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2014;15(4):406-14.
26. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(19):6302-9.
27. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3213-21.
28. Bidard FC, Michiels S, Riethdorf S, Mueller V, Esserman LJ, Lucci A, et al. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2018.
29. Janni WJ, Rack B, Terstappen LW, Pierga JY, Taran FA, Fehm T, et al. Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(10):2583-93.
30. Kasimir-Bauer S, Mayer S, Bojko P, Borquez D, Neumann R, Seeber S. Survival of tumor cells in stem cell preparations and bone marrow of patients with high-risk or metastatic breast cancer after receiving dose-intensive or high-dose chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2001;7(6):1582-9.
31. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(21):6403-9.
32. Cabel L, Proudhon C, Gortais H, Loirat D, Coussy F, Pierga JY, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility. *Int J Clin Oncol*. 2017;22(3):421-30.
33. Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D, et al. Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Res*. 2009;11(4):R59.
34. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):8152-62.
35. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(25):9393-8.
36. Mohme M, Riethdorf S, Pantel K. Circulating and disseminated tumour cells - mechanisms of immune surveillance and escape. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(3):155-67.

37. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(17):1419-24.
38. Polzer B, Medoro G, Pasch S, Fontana F, Zorzino L, Pestka A, et al. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med.* 2014;6(11):1371-86.
39. Pestrin M, Salvianti F, Galardi F, De Luca F, Turner N, Malorni L, et al. Heterogeneity of PIK3CA mutational status at the single cell level in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Mol Oncol.* 2015;9(4):749-57.
40. Coumans FA, Ligthart ST, Uhr JW, Terstappen LW. Challenges in the enumeration and phenotyping of CTC. *Clin Cancer Res.* 2012;18(20):5711-8.
41. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connolly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res.* 2004;10(20):6897-904.
42. Swennenhuis JF, Terstappen L. Sample Preparation Methods Following CellSearch Approach Compatible of Single-Cell Whole-Genome Amplification: An Overview. *Methods Mol Biol.* 2015;1347:57-67.
43. Wang H, Stoecklein NH, Lin PP, Gires O. Circulating and disseminated tumor cells: diagnostic tools and therapeutic targets in motion. *Oncotarget.* 2016.
44. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res.* 2007;13(3):920-8.
45. de Wit S, van Dalum G, Lenferink AT, Tibbe AG, Hiltermann TJ, Groen HJ, et al. The detection of EpCAM(+) and EpCAM(-) circulating tumor cells. *Sci Rep.* 2015;5:12270.
46. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002;296(5573):1655-7.
47. Baselga J. Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *Oncologist.* 2011;16 Suppl 1:12-9.
48. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell.* 2007;12(4):395-402.
49. Hanker AB, Pfefferle AD, Balko JM, Kuba MG, Young CD, Sanchez V, et al. Mutant PIK3CA accelerates HER2-driven transgenic mammary tumors and induces resistance to combinations of anti-HER2 therapies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(35):14372-7.
50. Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res.* 2008;68(22):9221-30.
51. Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY, Luo J, Brachmann SM, Pearlman RV, et al. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2005;65(23):10992-1000.
52. Bader AG, Kang S, Vogt PK. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(5):1475-9.

53. Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(3):802-7.
54. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*. 2008;68(15):6084-91.
55. Samuels Y, Diaz LA, Jr., Schmidt-Kittler O, Cummins JM, Delong L, Cheong I, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell*. 2005;7(6):561-73.
56. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*. 2004;6(2):117-27.
57. Markou A, Farkona S, Schiza C, Efstathiou T, Kounelis S, Malamos N, et al. PIK3CA mutational status in circulating tumor cells can change during disease recurrence or progression in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(22):5823-34.
58. Schneck H, Blassl C, Meier-Stiegen F, Neves RP, Janni W, Fehm T, et al. Analysing the mutational status of PIK3CA in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Mol Oncol*. 2013;7(5):976-86.
59. Arsenic R, Treue D, Lehmann A, Hummel M, Dietel M, Denkert C, et al. Comparison of targeted next-generation sequencing and Sanger sequencing for the detection of PIK3CA mutations in breast cancer. *BMC Clin Pathol*. 2015;15.
60. Schramm A, Friedl TW, Schochter F, Scholz C, de Gregorio N, Huober J, et al. Therapeutic intervention based on circulating tumor cell phenotype in metastatic breast cancer: concept of the DETECT study program. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293(2):271-81.
61. DETECT III Synopse. 2016. Contract No.: EUDRACT-NO: 2010-024238-46.
62. DETECT IV Synopse. 2016. Contract No.: EUDRACT-NR.: 2013-001269-18.
63. Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JH, Kallemeijn WW, Schutte M. Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Res*. 2007;5(2):195-201.
64. Riethdorf S, Muller V, Zhang L, Rau T, Loibl S, Komor M, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res*. 2010;16(9):2634-45.
65. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006;12(8):895-904.
66. Czyz ZT, Kirsch S, Polzer B. Principles of Whole-Genome Amplification. *Methods Mol Biol*. 2015;1347:1-14.
67. Biosystems S. Ampli 1 WGA Kit Brochure.
68. Yakovchuk P, Protozanova E, Frank-Kamenetskii MD. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(2):564-74.
69. Chuang LY, Cheng YH, Yang CH. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett*. 2013;35(10):1541-9.
70. Lampignano R, Yang L, Neumann MHD, Franken A, Fehm T, Niederacher D, et al. A Novel Workflow to Enrich and Isolate Patient-Matched EpCAMhigh

and EpCAM<sup>low</sup>/negative CTCs Enables the Comparative Characterization of the PIK3CA Status in Metastatic Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9).

71. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.

72. Gasch C, Oldopp T, Mauermann O, Gorges TM, Andreas A, Coith C, et al. Frequent detection of PIK3CA mutations in single circulating tumor cells of patients suffering from HER2-negative metastatic breast cancer. *Mol Oncol.* 2016;10(8):1330-43.

73. Cancer AJCo. Breast Cancer Staging, 7th Edition: American Joint Committee on Cancer; 2009 [Available from: <https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/Documents/BreastMedium.pdf>].

## 6 Anhang

### 6.1 TNM-Klassifikation und UICC-Stadien

Tabelle 20: TNM-Klassifikation des Mamma-Karzinoms nach dem American Joint Committee on Cancer, 7th Edition (73)

<b>T</b>	
<b>Tumorgröße</b>	
T0	kein Tumor nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ, nicht invasiv
T1	bis 2 cm
T1mic	Mikroinvasion bis 0,1 cm
T1a	>0,1 cm aber ≤ 0,5 cm
T1b	> 0,5 cm bis 1 cm
T1c	> 1 cm bis 2 cm
T2	> 2 cm bis 5 cm
T3	> als 5 cm
T4 a/b/c/d	jede Größe mit Ausdehnung auf die Brustwand oder Haut (a), mit Ödem/Ulzeration (b); (c) a und b; entzündliches Karzinom (d)
<b>N</b>	
<b>Befallene Lymphknoten</b>	
N0	keine
N1	Metastase beweglich in ipsilat.LK der Level I, II
N2 a/b	Metastase(n) in ipsilat., axillären LK der Level I,II untereinander/an anderen Strukturen fixiert oder entlang der A. mammaria int. In Abwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Metastasen
N3 a/b/c	Metastase(n) in ipsilat., infraklavikulären LK (Level III) mit/ohne Beteiligung der axillären LK der Level I, II oder LK entlang der A. mammaria int. oder Metastasen in ipsilat. supraklavikulären LK mit/ ohne Beteiligung der axillären LK
<b>M</b>	
<b>(Fern-) Metastasen</b>	
M0	keine nachweisbar
M1	nachweisbar (meist Lunge, Leber, Knochen)

(Quelle: American Joint Committee on Cancer, 7th Edition)

Tabelle 21: Stadieneinteilung von Mamma-Karzinomen anhand der Union for International Cancer Control (UICC)

<b>Stadium 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Stadium I</b>	T1	N0	M0
<b>Stadium IIA</b>	T0,T1	N1	M0
	T2	N0	M0
<b>Stadium IIB</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>Stadium IIIA</b>	T0,T1,T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
<b>Stadium IIIB</b>	T4	N0,N1,N2	M0
<b>Stadium IIIC</b>	Jedes T	N3	M0
<b>Stadium IV</b>	Jedes T	Jedes N	M1

(Quelle: American Joint Committee on Cancer, 7th Edition)

## 6.2 Material

Tabelle 22: Geräte mit Hersteller und Firmensitz

Geräte	Hersteller	Ort
Inkubationsschüttler	PeqLab, VWR	Pennsylvania, USA
Waage	Mettler Toledo	Gießen, Deutschland
Gelkammer	BioRad	California, USA
Thermocycler	Biometra	Göttingen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland Hessisch Oldendorf, Deutschland
Tischzentrifuge	Biozym	
ChemiDoc™	BioRad	California, USA
ABgene Thermo-Fast 96 PCR Detection	Thermo Scientific	Massachusetts, USA
CellSearch®	Janssen Diagnostics	New Jersey, USA
CellTracksAnalyzer®	Janssen Diagnostics	New Jersey, USA
CellCelector™	ALS	Jena, Deutschland
Olympus CKX 41 Kamerasystem	Olympus	Düsseldorf, Deutschland
CellSave Tubes®	Janssen Diagnostics	New Jersey, USA
MagNest®	Janssen Diagnostics	New Jersey, USA
PCR Tube 0,5/1,5ml	4titude	Wotton, England
Nano Drop™	Thermo Scientific	Massachusetts, USA
Magnest®	Menarini Silicon Biosystems	Bologna, Italien
Orbitalschüttler	CAT	Ballrechten-Dottingen, DE
<b>Analysesoftware</b>		
Sequenzierungsprogramm	Chromas 2.4	
ALS CellCelector Software 3.0		

Tabelle 23: Verwendete Kits mit Hersteller und Firmen Hauptsitz

Kommerzielle Kits	Hersteller	Ort
CellSearch® CTC Kit	Janssen Diagnostics	New Jersey, USA
Ampli 1™ WGA Kit	Silicon Biosystems	Bologna, Italien
Ampli1™ QC Kit	Silicon Biosystems	Bologna, Italien

Tabelle 24: Verwendete Reagenzien mit Hersteller und Firmen Hauptsitz

Reagenzien/Puffer	Hersteller	Ort
CellSave	Janssen Diagnostics	New Jersey, USA Karlsruhe, Deutschland
PBS Puffer	Gibco	
TAE Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer	
Gel Red™	QiaGen	Hilden, Deutschland
TriTrack	Thermo Scientific	Massachusetts, USA
Gene Ruler™	Thermo Scientific	Massachusetts, USA
DreamTaq Polymerase	Thermo Scientific	Massachusetts, USA
ExoSap IT	Affymetrix	Kalifornien, USA
Antikörper-Diluent	Dako	Santa Clara, USA
Alexa Fluor CD 45 Antikörper 647 konjugiert, clone 35-ZS	Thermo Scientific	Massachusetts, USA
DAPI	Roche Diagnostics	Rotkreuz, Schweiz
CellSearch Puffer	Menarini Silicon Biosystems	Bologna, Italien

## 6.3 PCR Protokolle

### 6.3.1 WGA

#### 1. Schritt: Lyse

Tabelle 25: Mastermix von Schritt 1 der WGA, Zellyse

Reagenz	Volumen/10 Reaktionen (µl)
Ampli1™ Reaction Buffer 1	2
Ampli1™ Reaction Buffer 2	1,3
Ampli1™ Reaction Buffer 3	1,3
Ampli1™ Enzyme 1	2,6
Ampli1™ Water	12,8

Tabelle 26: Inkubationsprofil von Schritt 1 der WGA

Temperatur (°C)	Zeit
42	45 Minuten
65	30 Minuten
80	15 Minuten
4	∞

## 2. Schritt Verdau

Tabelle 27: Mastermix von Schritt 2 der WGA

Reagenz	Volumen/Reaktion (µl)
Ampli1™ Reaction Buffer 1	0,2
Ampli1™ Enzyme 2	0,2
Ampli1™ Water	1,6

Tabelle 28: Inkubationsprofil von Schritt 2 der WGA

Temperatur (°C)	Zeit
37	5
65	5
4	∞

## 3. Schritt: Preannealing Mix

Tabelle 29: Mastermix von Schritt 3 der WGA

Reagenz	Volumen/Reaktion (µl)
Ampli™ Reaction Buffer 1	0,5
Ampli™ Reagent 4	0,5
Ampli™ Reagent 5	0,5
Ampli™ Water	1,5

Tabelle 30: Inkubationsprofil von Schritt 3 der WGA

Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit
1	65	1 Minute
	ê	1 Minute
	15	1 Minute
	15	∞

#### 4. Schritt: Ligation

Tabelle 31: Mastermix von Schritt 4, Ligation der WGA

Reagenz	Volumen/Reaktion (µl)
Preannealing Mix	3
Ampli1™ Reagent 6	1
Ampli1™ Enzyme 3	1

Tabelle 32: Inkubationsprofil von Schritt 4 der WGA

Temperatur (°C)	Zeit
15	1 Stunde
4	∞

#### 5. Schritt: Primäre PCR

Tabelle 33: Mastermix von Schritt 5 der WGA

Reagenz	Volumen/Reaktion (µl)
Ampli1™ Reaction Buffer 7	3
Ampli1™ Reagent 8	2
Ampli1™ Enzyme 4	1
Ampli1™ Water	34

Tabelle 34: Inkubationsprofil von Schritt 5 der WGA

Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit
	68	3 Minuten
	94	40 Sekunden
14	57	30 Sekunden
	68	90 Sekunde +1 Sek/Zyklus
	94	40 Sekunden
8	57	30 Sekunden +1°C/Zyklus
	68	105 Sekunden +1Sek/Zyklus
	94	40 Sekunden
22	65	30 Sekunden
	68	113 Sekunden
		+1 Sek/Zyklus
1	68	3 Min 40 Sekunden

### 6.3.2 QC-PCR

Tabelle 35: Mastermix der QC-PCR

Reagenz	Volumen/ 1Reaktion (µl)
Ampli1™ PCR Water	6,5
Ampli1™ PCR Reation Buffer	1
Ampli1™ PCR dNTP's	0,2
Ampli1™ Primer Mix	1
Ampli1™ PCR BSA	0,2
Ampli1™ PCR Taq Polymerase	0,1

Tabelle 36: Inkubationsprofil der QC-PCR

Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit
1	95	4 Minuten
	95	30 Sekunden
32	58	30 Sekunden
	72	90 Sekunden
1	72	7 Minuten
	4	∞

### 6.3.3 Genspezifische PCR

Tabelle 37: Mastermix der genspez. PCR

Reagenz	Volumen/Ansatz (µl)
DreamTaq Polymerase	12,5
Primer reverse	1
Primer forward	1
H <sub>2</sub> O	10,5
Template	1

Tabelle 38: Inkubationsprofil der genspez. PCR

Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit
1	95	5 min
45	95	45 sec
	58	45sec
	72	45 sec
1	72	10 min
	4	∞

### 6.4 Primer

Tabelle 39: Verwendete Primer der genspezifischen PCR, sowie der Sequenzierungsreaktion

Primer genspezifische PCR	Sequenz	Produktgröße (Basenpaare)
Exon 9 forward	CATCCGATGTACCTGATTGAACTGCATGCAGACAAAGAACAGCTCAAAGCAA	238
Exon 9 reverse	CATTCCTTAGATAGCTCGGAAGTCCATTGCATTTTAGCACTTACCTGTGAC	
Exon 20 forward	CATCCGATGTACCTGATTGAACTGCATGCATTGATGACATTGCATACATTCCG	175
Exon 20 reverse	CATTCCTTAGATAGCTCGGAAGTCCATTGCGTGGAAGATCCAATCCATTT	
Sequenzierprimer forward	TCCGATGTACCTGATTGAAC	
Sequenzierprimer reverse	TTCCTTAGATAGCTCGGAAG	

## 6.5 Klinische Patientendaten

Tabelle 40: Klinische Patientendaten

Patientin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Median	Mittelwert	in %
<b>Kit-Nummer</b>	1343	1654	5081	7143	1729	1158	1770	1755	1795			
<b>Erstdiagnose</b>	Jun 11	Okt 04	Okt 14	Jan 03	Dez 08	Okt 10	Apr 08	Nov 08	Jul 99			
<b>Alter bei Erstdiagnose</b>	64	53	74	68	31	55	73	50	61	61	59	
<b>Alter bei Erstscreening</b>	67	63	74	79	38	60	80	57	77	67	66	
<b>Anzahl CTC im Erstscreening</b>	25	206	231	42	13	160	392	18	17	42	115	
<b>HER-2/neu Status CTC im Erstscreening</b>												
davon Her-2/neu negativ	25	88	40	35	13	81	278	18	15			53,7
davon Her-2/neu 1+	0	89	146	7	0	52	94	0	2			35,3
davon Her-2/neu 2+	0	21	40	0	0	17	17	0	0			8,6
davon Her-2/neu 3+	0	8	5	0	0	10	3	0	0			2,4
<b>Primärtumor Lokalisation</b>												
links	1	0	1	0	1	0	1	0	1			55,6
rechts	0	1	0	1	0	1	0	1	0			44,4
<b>Tumorgroße</b>												
T1	0	1	0	0	0	0	0	0	0			11,1
T2	1	0	0	1	0	1	0	1	1			55,6
T3	0	0	1	0	1	0	1	0	0			33,3
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0,0
<b>Nodalstatus</b>												
N0	1	0	0	1	0	0	0	0	0			22,2
N1	0	1	0	0	1	0	1	1	1			55,6
N2	0	0	1	0	0	1	0	0	0			22,2
N3	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0,0
<b>Metastasen</b>												
M0	1	1	0	1	1	1	1	1	1			88,9
M1	0	0	1	0	0	0	0	0	0			11,1
<b>Stadium</b>												
0	n.a.	n.a.	0	n.a.	0	0	0	0	0			0,0
I	n.a.	n.a.	0	n.a.	0	0	0	0	0			0,0
II A/B	n.a.	n.a.	0	n.a.	0	0	0	1	1			33,3
III A/B/C	n.a.	n.a.	0	n.a.	1	1	1	0	0			50,0
IV	n.a.	n.a.	1	n.a.	0	0	0	0	0			16,7
<b>Histologie</b>												
Invasiv duktal	1	1	0	1	1	0	0	1	1			66,7
Invasiv lobulär	0	0	1	0	0	1	1	0	0			33,3
<b>Grading</b>												
G1	0	0	0	0	0	0	n.a.	0	0			0,0
G2	1	0	1	0	1	1	n.a.	1	1			75,0
G3	0	1	0	1	0	0	n.a.	0	0			25,0
<b>Primärtumor:</b>												
<b>Estrogenrezeptorstatus</b>												

negativ	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0,0
positiv	1	1	1	1	1	1	1	1	1			100,0
<b>Progesteronrezeptorstatus</b>												
negativ	1	0	0	0	0	0	0	0	1			22,2
positiv	0	1	1	1	1	1	1	1	0			77,8
<b>HER2neu Rezeptorstatus</b>												
negativ	1	1	1	n.a.	1	1	1	1	n.a.			100,0
positiv	0	0	0	n.a.	0	0	0	0	n.a.			0,0
<b>Metastasen:</b>												
<b>Estrogenrezeptorstatus</b>												
negativ	1	n.a.	n.a.	0	0	n.a.	0	1	0			33,3
positiv	0	n.a.	n.a.	1	1	n.a.	1	0	1			66,7
<b>Progesteronrezeptorstatus</b>												
negativ	1	n.a.	n.a.	0	1	n.a.	1	1	1			83,3
positiv	0	n.a.	n.a.	1	0	n.a.	0	0	0			16,7
<b>HER-2/neu Rezeptorstatus</b>												
negativ	1	n.a.	n.a.	1	1	n.a.	1	1	0			55,6
positiv	0	n.a.	n.a.	0	0	n.a.	0	0	1			11,1
<b>ECOG</b>												
0	n.a.	0	1	0	1	0	0	1	n.a.			42,9
1	n.a.	1	0	0	0	0	1	0	n.a.			28,6
2	n.a.	0	0	1	0	0	0	0	n.a.			14,3
3	n.a.	0	0	0	0	1	0	0	n.a.			14,3
4	n.a.	0	0	0	0	0	0	0	n.a.			0,0
5	n.a.	0	0	0	0	0	0	0	n.a.			0,0



## 6.7 Abbildungen der Sequenzierergebnisse

### Patientin 8

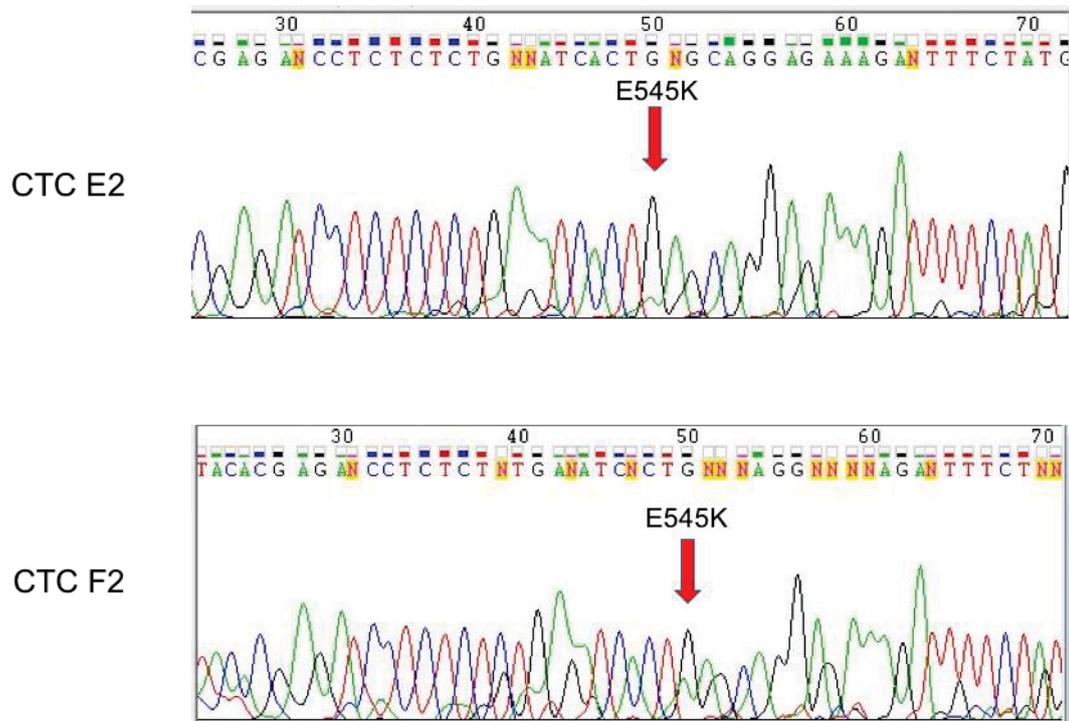


Abbildung 17: Bilder der Sequenzierergebnisse von Patientin 8. Die Zellen E2 und F2 zeigen die Mutation E545K (G zu A) auf Exon 9. Der rote Pfeil kennzeichnet den heterozygoten Doppelpeak.

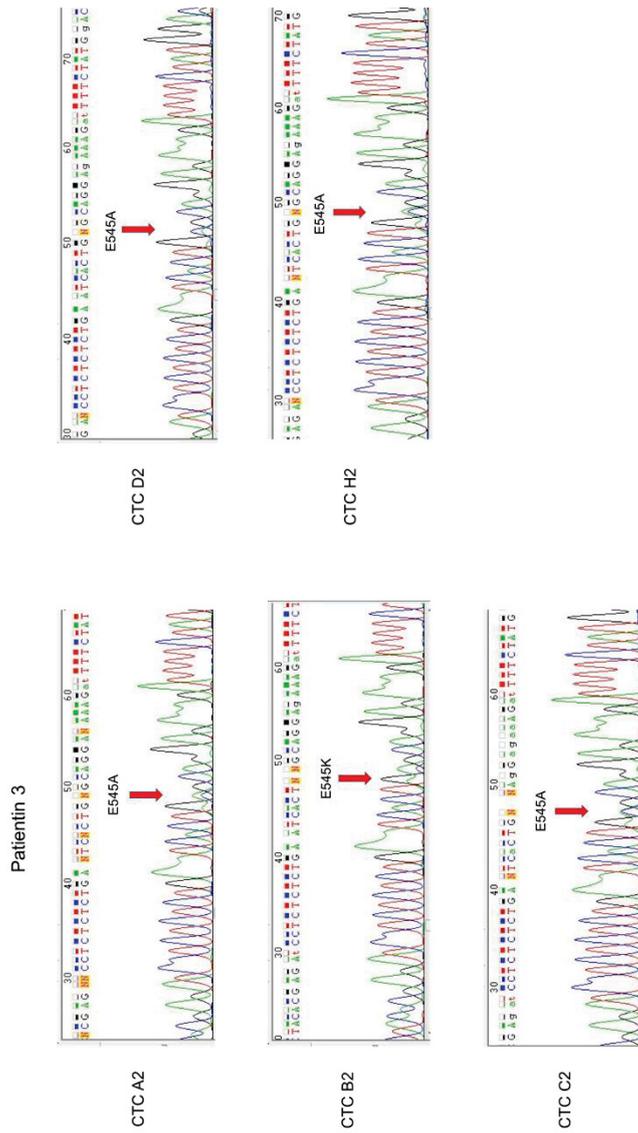


Abbildung 18: Bilder der Sequenzierergebnisse der Patientin 3. Die Zellen A2, C2, D2 und H2 zeigen die Mutation E545A (A zu C) auf Exon 9. Die Zelle B2 zeigt die Mutation E545K auf Exon 9. Erkennbar am roten Pfeil, der den Doppel-Peak der heterozygoten Mutation kennzeichnet.

### Patientin 3

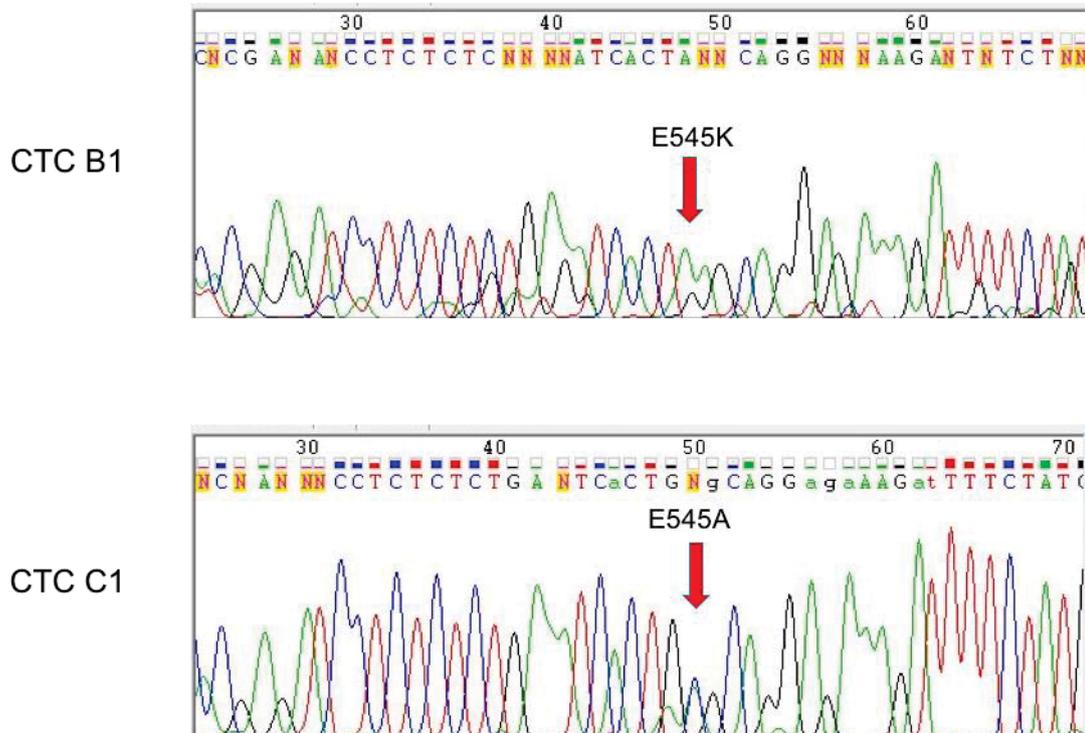


Abbildung 19: Sequenziererergebnisse der Patientin 3. Zu sehen ist in Zelle B1 die Mutation E545K und auf Zelle C1 die Mutation E545A, beide auf Exon 9.

## Danksagung

Mein Dank gilt dem Team des Labors für Frauenheilkunde, das mir jederzeit mit Rat, Tat und Aufmunterung zur Seite stand!

Ebenso möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, ohne die ich das ganze Studium inklusive Dissertation nur schwer überstanden hätte. Du warst und bist immer für mich da, ich danke dir von ganzem Herzen dafür.

Lieber Clemens, deine Hilfe und Unterstützung, ob in praktischen Dingen wie Korrekturlesen oder zusammen gegen Word zu kämpfen oder als seelischer Beistand, war und ist so wertvoll und möchte ich nie mehr missen!

Ein weiterer Dank geht an alle Mädels in Düsseldorf, mit denen zusammen ich gelacht und gelitten habe, ohne euch wäre es nur halb so schön gewesen!