# Die Rolle des EGFR/HER2-Signalwegs in Gehirnmetastasen des Mammakarzinoms

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades "Doctor rerum naturalium" an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

INA HOHENSEE

aus Gernsbach

Hamburg 2014

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Frau Dr. H. WIKMAN-KOCHER Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. T. BURMESTER Tag der Disputation: 07. März 2014

Hamburg, den 20. Februar 2014

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie Für meine Eltern

Gutachter der Dissertation:Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Burmester<br/>Dr. habil. Harriet Wikman-KocherEingereicht am:09.01.2014Datum der Disputation:07.03.2014

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Metastasierung epithelialer Tumore	3
1.1.1	Mechanismen der Metastasierung epithelialer Tumore	4
1.1.2	Organotropie	5
1.1.3	Gehirnmetastasierung	7
1.2	Das Mammakarzinom	8
1.2.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms	8
1.2.2	Klassifikation des Mammakarzinoms	9
1.2.3	Tumorgenese des Mammakarzinoms	10
1.2.4	Therapie des Mammakarzinoms	13
1.2.5	Gehirnmetastasen des Mammakarzinoms	15
1.3	Der EGFR/HER2-Signalweg im Mammakarzinom	16
1.3.1	Rezeptortyrosinkinasen der ERBB-Familie	17
1.3.2	Das Onkogen PI3K	19
1.3.3	Der Tumorsuppressor PTEN	20
2	Fragestellung	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Material	23
3.1.1	Patientenmaterial	23
3.1.2	Zelllinien und Kulturmedien	25
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	28
3.1.4	Geräte	32
3.1.5	Verbrauchsmaterial	32
3.1.6	Software, Onlinetools und Datenbanken	33
3.2	Methoden	34
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	34
3.2.2	Histochemische Methoden	58
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	60
3.2.4	Zellbiologische Methoden	64
3.2.5	Informatische und bioinformatische Methoden	70
4	Ergebnisse	71
4.1	Untersuchung des EGFR-HER2-Signalwegs an Gewebe von primären Mammakarzinom- patientinnen und Mammakarzinompatientinnen mit Gehirnmetastasen	71
4.1.1	Der EGFR-Status	71
4.1.2	Der HER2-Status	86
4.1.3	Der PTEN-Status	89
4.1.4	Der PIK3CA-Mutationstatus	. 102
4.1.5	Analyse des EGFR/HER2-Signalwegs	. 108
4.2	Funktionelle Untersuchung von PTEN im Zellkulturmodell	. 113
4.2.1	Differentielle PTEN-Expression in Mammakarzinomzelllinien	. 113

4.2.2	Knockdown der PTEN-Expression in MCF-10A Zellen	114
4.2.3	PTEN-Überexpression in MDA-MB-231 BR Zellen	115
5	Diskussion	127
5.1	Die klinische Rolle des EGFR/HER2-Signalwegs in der Gehirnmetastasierung von	
	Mammakarzinompatientinnen	127
5.1.1	Klinische Relevanz von EGFR-Alterationen im Mammakarzinom	128
5.1.2	Klinische Relevanz von HER2-Alterationen im Mammakarzinom	133
5.1.3	Klinische Relevanz von PTEN-Alterationen im Mammakarzinom	135
5.1.4	Klinische Relevanz von PIK3CA-Mutationen im Mammakarzinom	138
5.1.5	Assoziation des Mammakarzinomsubtyps mit Alterationen des EGFR/HER2-Signalwegs und Metastasierungsprofilen	140
5.2	Die funktionelle Rolle von PTEN in der Gehirnmetastasierung des Mammakarzinoms	142
5.2.1	Induktion eines weniger aggressiven Phänotyps einer in gehirnmetastatischen Mammakarzinomzelllinie durch PTEN-Überexpression	143
5.2.2	Auswirkungen der Interaktion einer in gehirnmetastatischen Mammakrzinomzelllinie mit Gliazellen	144
5.3	Ausblick	147
6	Zusammenfassung	148
7	Summary	150
8	Literaturverzeichnis	152
9	Anhang	163
9.1	Zusätzliche Tabellen	163
9.2	Oligonukleotide	175
9.3	Verwendete shRNA-Sequenzen	176
9.4	Verwendete Plasmide	177
9.5	Chemikalien	179
9.6	Kit-Systeme	180
9.7	Geräte	181
10	Eigene Veröffentlichungen	183
11	LebenslaufFehler! Textmarke nicht defini	iert.
12	Danksagung	184
13	Eidesstattliche Versicherung	185

## Einleitung

Krebs ist eine allgemeine Bezeichnung für eine große Gruppe von Erkrankungen, die alle Organsysteme betreffen kann. Der Begriff Krebs definiert sich durch eine bösartige Gewebeneubildung (Tumor), die durch ausuferndes Zellwachstum über die natürlichen Grenzen hinaus hervorgerufen wird und zur Invasion umliegender Gewebe bis hin zur Ausbreitung in anderen Organen führen kann. Dieses Verhalten wird durch genetische Veränderungen hervorgerufen, deren Ursachen vererbt oder durch Kontakt mit chemischen bzw. physikalischen Noxen oder onkogenen Viren induziert sein können. Der Tumorentstehung liegen eine in mehreren Schritten ablaufende Transformation von normalem Gewebe und die klonale Expansion der veränderten Zellpopulation zugrunde. Als Kennzeichen des malignen Wachstums gelten neben der Aufrechterhaltung proliferativer Signalwege die Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren sowie die Inaktivierung des programmierten Zelltodes (Apoptose). Ferner ist die Fähigkeit zur Blutgefäßneubildung (Angiogenese), zur unbegrenzten Teilungsfähigkeit (replikative Immortalität) und die Invasion in das umliegende Gewebe sowie die anschließende Metastasierung in andere Organe als kennzeichnend zu nennen. Zusätzlich werden die Dysregulation von Stoffwechselvorgängen, das Auftreten von tumorunterstützenden Entzündungsreaktionen und die Fähigkeit sich der Zerstörung durch das Immunsystem zu entziehen hinzugezählt. Des Weiteren führt genomische Instabilität zur Bildung von Mutationen. Tumore lassen sich zunächst grob in Wucherungen von Zellen aus Organsystemen (solide) und von Blut- oder Knochenmarkszellen bzw. Zellen des lymphatischen Systems (hämatopoetisch) und anschließend nach der Art ihres Ursprungsgewebes unterteilen. Epitheliale werden beispielsweise Tumore als Karzinome bezeichnet <sup>1,2</sup>.

#### 1.1 Metastasierung epithelialer Tumore

Die Mortalitätsrate von Patientinnen vieler unterschiedlicher epithelialer Tumorentitäten, wie beispielsweise Brustkrebs, ist trotz erfolgreicher Behandlungsmethoden der Primärtumore noch immer hoch. Ursächlich hierfür sind häufig nicht die Primärtumore selbst, sondern die klinischen Folgen der aus ihnen entstandenen Fernmetastasen <sup>3</sup>. Die Disseminierung von Tumorzellen kann bereits in einer frühen Phase der Tumorgenese erfolgen, jedoch kann die Ausbildung solider Fernmetastasen Jahre oder Jahrzehnte im Anschluss an eine Latenzphase erfolgen <sup>4,5</sup>. Die Fernmetastasierung ist ein hochselektiver, mehrstufiger Prozess, dessen molekularen Grundlagen jedoch noch weitestgehend unbekannt sind <sup>6,7</sup>. In dieser Arbeit wurde Gewebe von Mammakarzinompatientinnen untersucht, weshalb sich alle Beschreibungen weitestgehend auf diese Entität beschränken.

#### 1.1.1 Mechanismen der Metastasierung epithelialer Tumore

Solide Tumore sind nur bis zu einem Durchmesser von etwa 1 mm in der Lage sich ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen aus ihrer direkten Umgebung zu versorgen. Daher induzieren sie die Bildung neuer Blutgefäße, welche die Versorgung des Tumors sicherstellen und so das weitere Tumorwachstum ermöglichen. Durch diese Angiogenese erlangt der Tumor Zugang zum hämatopoetischen und lymphatischen System, eine Grundvoraussetzung zur Metastasierung<sup>8</sup>. Den ersten Schritt auf dem Weg zur Fernmetastasierung bildet die Migration von Tumorzellen aus dem Zellverband in das umliegende Stroma (Invasion), bevor die Zellen in das Gefäßsystem eintreten. Zur Überwindung der Basalmembran von Endothelzellen werden proteolytische Enzyme (z. B. Matrix-Metalloproteasen) ausgeschüttet. Zusätzlich nehmen die Zellen in einem als epithiale-mesenchymale Transition (EMT) bezeichneten Prozess einen mesenchymalen Phänotyp an, der u.a. mit einer verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. E-Cadherin) einhergeht. Sind die Zellen in das Gefäßsystem eingetreten (Intravasion), müssen sie Scherkräften und Attacken des Immunsystems widerstehen. Sie müssen außerdem im Stande sein Apoptose zu umgehen, die durch Verlust von Zell-Zell-Kontakt induziert wird <sup>3</sup>.

Nachdem die Tumorzellen in das umgebende Gewebe invadiert sind werden zwei Wege der Metastasierung unterschieden. Auf dem hämatogenen Weg werden sogenannte zirkulierende Tumorzellen (CTCs) über das Blutgefäßsystem zu entfernten Organen transportiert<sup>8</sup>. Sie stellen über Adhäsionsproteine (z. B. Selektine, Integrine) Kontakt mit dem Kapillarbett des Zielorgans her und treten nach Durchdringen des Endothels aus dem Blutgefäßsystem aus (Extravasion), wonach sie eine zumindest partielle mesenchymale-epitheliale Transition (MET) durchlaufen. Nach der Ansiedlung im Zielorgan stellen sie dort zunächst eine minimale residuelle Erkrankung dar. Vor allem bei Mammakarzinomerkrankungen gehen häufig sogenannte disseminierte Tumorzellen (DTC) anschließend in einen Ruhezustand über, bei dem das Wachstum und die Progression zum Stillstand kommen (Dormanz). Noch ist nicht geklärt welche Faktoren diesen Latenzzustand über Jahre hinweg aufrechterhalten und wodurch die Tumorzellen angeregt werden dieses inaktive Stadium verlassen, um durch Proliferation, Neoangiogenese und Anpassung an die vorherrschende Mikroumgebung schlussendlich zu soliden Metastasen auszuwachsen (Kolonisation)<sup>9</sup>. Treten die Zellen in das Lymph- statt in das Blutgefäßsystem ein, disseminieren sie in Lymphknoten und bilden dort solide Metastasen aus, bevor sie durch den Anschluss an Blutgefäße hämatopoetisch in entfernte Organe disseminieren und sekundäre Metastasen bilden können. Andererseits können Sekundärmetastasen auch aus primären Fernmetastasen entstehen. Dies ist ein teilweise langwieriger Prozess, da zunächst am primären Metastasierungsort Metastasen auswachsen, die Zellen disseminieren und am sekundären Zielort wieder Metastasen – nach möglicher Dormanz – ausgebildet werden <sup>8</sup>.



Abb. 1.1: Schema der metastatischen Kaskade. Die Disseminierung einzelner Zellen aus dem Primärtumor kann sowohl über die lymphatische (graue Pfeile) als auch über die hämatogene Route (schwarze Pfeile) erfolgen. Über hämatogene Disseminierung wandern Zellen aus dem Primärtumor, aus Lymphknoten- oder von Fernetastasen über das Blutgefäßsystem in andere Organe ein. Lymphatisch disseminierende Zellen wandern zunächst in lokale Lymphknoten ein und proliferieren dort zu soliden Metastasen, bevor sie in distante Organe disseminieren und sekundäre Metastasen bilden (gestrichelte Pfeile). Modifiziert nach Pantel & Brakenhoff, 2004, <sup>8</sup>.

#### 1.1.2 **Organotropie**

Primäre Zielgewebe von Metastasen befinden sich in der Regel stromabwärts im Blutkreislauf. Daher kann die Entstehung der meisten Fernmetastasen durch Intravasion der tumorableitenden Gefäße erklärt werden. Demnach fungieren beispielsweise bei Tumoren der Körperwand oder der Extremitäten Lunge und Gehirn als solche Ziele. Der Lymphfluss läuft über die Lymphbahnen zu den Lymphknoten. Diese sind häufig nahe einem Tumor lokalisiert. Im Falle des Mammakarzinoms befinden sie sich beispielsweise in der Achselhöhle<sup>1</sup>. Bei einigen Tumorentitäten wird dieses primäre Zielgewebe übergangen und eine primäre Metastase an einem normalerweise sekundären, weiter stromabwärts gelegenen Gewebe ausbildet. Dies wird als Organotropie oder *Homing* bezeichnet und trifft u.a. in der Metastasierung epithelialer Tumore zu. Bislang konnten die zugrunde liegenden Mechanismen des *Homings* nicht abschließend geklärt werden<sup>10</sup>. Parallel zu Organen mit diagnostizierten Fernmetastasen können in die Dormanz eingetretene Zellen auch in anderen Geweben vorhanden sein. DTCs

aus Kolonkarzinomen werden beispielsweise häufige im Knochenmark detektiert, jedoch bilden sich Metastasen selten im Knochen aus. Dies weist auf eine Streuung einzelner Tumorzellen in andere, möglicherweise sogar alle, Organe ohne zwingende Ausbildung solider Metastasen hin <sup>11</sup>.

Ewing berichtete bezüglich des Mammakarzinoms bereits 1928 von einem Befall benachbarter Lymphknoten, der durch die Lokalisation der Lymphabflusswege bedingt ist <sup>12</sup>. Es schließt sich ein weiterer Abfluss über die Lunge an, wo die Tumorzellen vereinzelt oder im Zusammenschluss mit Lymphozyten und Thrombozyten im Kapillarbett anheften oder nach einer systemischen Streuung in der Leber ansiedeln. Die Ewingsche Theorie bietet jedoch keine hinreichende Erklärung für das häufige Auftreten von Knochenmarksmetastasen beim Mammakarzinom. Hier greift die sogenannte *seed and soil*-Hypothese, die 1989 von Paget postuliert wurde <sup>13</sup>. Sie besagt, dass sich metastasierende Tumorzellen als "Saatgut" (*seed*) im Zielorgan nur dann ansiedeln können, wenn vor sie Ort ein geeignetes Milieu der Mikroumgebung vorfinden – einen sogenannten "Ackerboden" (*soil*).

Ferner scheint organspezifisches *Homing* von CTCs eine besondere Rolle zu spielen. Tumorzellen sind in der Lage durch die Expression chemokinrezeptorvermittelter Signale Lymphozyten zu imitieren, um ihren Transport zum Zielorgan sicherzustellen. Beispielsweise ist der *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1), der Ligand des CXC-Motiv-Chemokinrezeptors 4, häufig im Knochenmark anzutreffen. Chemokine sind kleine chemische, proinflammatorische Lockstoffe, die an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Chemokinrezeptoren) binden, welche die wichtigsten Regulatoren im Zelltransport darstellen <sup>14</sup>. Die Expression von SDF-1 durch Tumorzellen deutet eine Beteiligung des Chemokin-vermittelten Signalwegs am *Homing* an <sup>15,16</sup>. Für verschiedene epitheliale Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom, Prostata- oder Bronchialkarzinom stellt das Knochenmark offenbar ein bevorzugtes *Homing*-Organ dar <sup>17</sup>.

#### 1.1.3 Gehirnmetastasierung

Gehirnmetastasen sind stellen die häufigste Art von Gehirntumoren in Erwachsenen dar und werden als Endstadium von Krebserkrankungen mit extrem schlechter Prognose angesehen. Bronchialkarzinome metastasieren gefolgt von Mammakarzinomen, am häufigsten in das Gehirn. Bislang existiert keine Möglichkeit zur Heilung. Die Erkrankung kann mit aktuell verfügbaren Therapien nur für einige Monate, in wenigen Fällen einige Jahre, kontrolliert werden <sup>18–20</sup>.

Um erfolgreich solide Gehirnmetastasen ausbilden zu können, müssen Tumorzellen aus dem Primärtumorgewebe oder aus Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn zunächst in das Blutgefäßsystem eintreten, von wo aus sie dann bis zu den Endothelzellen der Mikrovaskulatur des Gehirns transportiert werden und sich dort anheften. Anschließend treten sie über Extravasion in das Gehirnparenchym ein, wo sie mit der vorherrschenden Mikroumgebung in Kontakt treten und die Angiogenese wie auch die Proliferation induzieren (Abb. 1.2). Bereits beim Eintritt in das Gehirnparenchym müssen sich die Tumorzellen mit der dort vorherrschenden Mikroumgebung auseinandersetzen<sup>21</sup>. Zwei gehirnspezifische Zelltypen, Astrozyten und Mikroglia, spielen nachweislich eine wichtige Rolle in diesem Prozess. Beide Zelltypen können durch von Tumorzellen sekretierte Moleküle aktivert werden. Nach eingeschlägiger Literatur wirken Astrozyten unterstützend auf Tumorzellen, die sich im Gehirn ansiedeln, wohingegen für Mikroglia sowohl fördernde als auch inhibierende Funktionen in diesem Zusammenhang berichtet wurden<sup>22</sup>. Eine detailliertere Beschreibung der Gehirnmetastasierung des Mammakarzinoms folgt in Abschnitt 1.2.5.



**Abb. 1.2: Schema der Gehirnmetastasierung.** Nachdem die Tumorzellen aus dem Zellverband ausgetreten sind, migrieren sie in Richtung eines Blutgefäßes, dessen Wand sie penetrieren und eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen. Durch den Blutstrom werden sie in das Gehirn transportiert, wo sie nach einer mesenchymalen-epithelialen Transition (MET) die Blut-Hirn-Schranke durchbrechen müssen, bevor sie sich im Parenchym ansiedeln können (Kolonisation).

## 1.2 Das Mammakarzinom

## 1.2.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist der weltweit häufigste maligne Tumor in der weiblichen Bevölkerung. Eine von acht Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens daran. Im Jahr 2008 wurden bei etwa doppelt so vielen Frauen Mammakarzinome diagnostiziert als 1950 (72.000 Fälle). Noch immer ist eine stetig ansteigende Inzidenz zu verzeichnen, welche hauptsächlich durch die Alterung in der Bevölkerung verursacht wird. Jedoch ist die Sterblichkeit mittlerweile deutlich geringer als noch vor 20 Jahren (17.000 Sterbefälle in 2008). Dies ist weitestgehend auch auf eine therapeutische Weiterentwicklung zurückzuführen. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate ist mit 78 % im Vergleich zu anderen Entitäten verhältnismäßig hoch. Die Rezidivbildung setzt beim Mammakarzinom jedoch relativ spät ein, weshalb die Mortalität unter Mammakarzinompatientinnen fünf Jahre nach Diagnosestellung deutlich höher als die der Allgemeinbevölkerung ist <sup>23</sup>.



Abb. 1.3: Häufigkeitsverteilung der verschieden Krebsentitäten in der männlichen und weiblichen Bevölkerung in Deutschland. Die prozentualen Anteile männlicher (links) und weiblicher (rechts) Krebspatienten sind innerhalb der Balken angegeben, deren Länge proportional der Prozentzahl ist. Entnommen aus "Krebs in Deutschland 2007/2008"<sup>23</sup>.

#### 1.2.2 Klassifikation des Mammakarzinoms

Um Prognosen abschätzen und Therapien anpassen zu können, wurde nach Vorgaben der Internationalen Union gegen Krebs eine histopathologische Einteilung (pTNM-Klassifizierung, *Staging*) von Tumorentitäten definiert. Sie setzt sich aus der Tumorgröße (pT), dem Status der regionalen Lymphknoten (pN) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (pM) zum Zeitpunkt der Diagnose zusammen. Der pT-Status wird nach steigender Tumorgröße und der pN-Status nach der Anzahl betroffener Lymphknoten eingeteilt. Zusätzlich wird seit der 6. Auflage auch das Vorhandensein von Mikrometastasen (pN1mi) beurteilt <sup>24</sup>.

Tabelle 1.1: pTNM-Klassifikation. Dargestellt ist die Einteilung von Mammakarzinomen nach der Tumorgröße (pT), des Lymphknotenstatus (pN), dem Vorhandensein von Mikrometastasen (pN1mi) oder von Fernmetastasen (pM).

рТ	Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumordurchmesser 2 cm oder weniger
pT2	Tumordurchmesser mehr als 2 cm, aber weniger als 5 cm
рТ3	Tumordurchmesser mehr als 5 cm
pT4	Tumordurchmesser jeder Größe mit Infiltration auf Brustwand oder Haut
рN	Lymphknotenmetastasen
pN0	keine Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in 1-3 axillären Lymphknoten, mindestens eine größer als 2 mm im Durchmesser
pN2	Metastasen in 4-9 axillären Lymphknoten oder in Lymphknoten der A. mammaria interna, min- destens eine größer als 2 mm im Durchmesser
pN3	Metastasen in 10 oder mehr axillären Lymphknoten oder in infraklavikulären Lymphknoten oder in Lymphknoten der A. <i>mammaria interna</i> , mindestens eine größer als 2 mm im Durchmesser
pN1mi	Mikrometastasen von 0,2 - 2 mm Durchmesser
рМ	Fernmetastasen
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Die Stadieneinteilung erfolgt durch Kombination des *Stagings* mit dem histologischen Differenzierungsgrad (*Grading*), welches zur Beurteilung der Malignität und der Gewebedifferenzierung invasiver Karzinome dient. Es bezieht sich auf das Ausmaß von Tubulusbildung, die Kernpleomorphologie sowie die Mitoserate und wird in drei Stufen (G1-3) von gut nach schlecht differenziert eingeteilt. Das Staging ist von großer Bedeutung für die Überlebensspanne der Patientinnen. So weisen Patientinnen der Stadien I und II eine hohe Fünf-Jahres-Überlebensrate von 83-88 % auf, wohingegen nur ein Viertel der Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium (Stadien III & IV) nach dieser Zeitspanne noch am Leben ist <sup>25,26</sup>. Ein weiteres Kriterium zur Charakterisierung von Tumoren stützt sich auf den immunhistochemisch bestimmten Expressionsstatus der Rezeptoren für Östrogen und Progesteron. Im gesunden Brustgewebe regulieren die beiden Hormone das Zellwachstum, fördern jedoch unter Expression der entsprechenden Rezeptoren auch das Wachstum von Tumoren. Gleiches gilt für den Expressionsstatus des humanen epidermalen Wachstumsrezeptors 2 (ERBB2 / HER2), der in einem Viertel aller Brustkrebspatientinnen stark exprimiert vorliegt (detailliere Angabe siehe Abschnitte 1.2.3.1 und 1.3.1.3). Gegen die Expression dieser Rezeptoren existieren mittlerweile wirksame Therapiemöglichkeiten, weshalb das Wissen über ihren Status von großer Bedeutung ist <sup>27–29</sup>.

#### 1.2.3 Tumorgenese des Mammakarzinoms

Die weibliche Brustdrüse besteht hauptsächlich aus von Nerven, Blut- und Lymphgefäßen durchzogenem Fettgewebe, in dem die Milchgänge (Duktuli) ein enges, zur Brustwarze gerichtetes Netzwerk ausbilden. Nicht alle Tumore der Brust sind bösartig (maligne). Langsam wachsende Wucherungen, die nicht auf das umgebende Gewebe übergreifen, werden als gutartige (benigne) Veränderungen der Brust bezeichnet. Zu ihnen zählen Geschwülste des Drüsen-, Binde-, Milchgangsgewebes oder Mischformen. Bösartige Gewebsneubildungen epithelialen Ursprungs weisen dagegen meist ein schnelles Wachstum auf und werden als Karzinome bezeichnet <sup>30</sup>.

Der Großteil der Mammakarzinome ist im Übergang der Drüsenläppchen (Lobuli) zu den Milchgängen (duktulo-lobuläre Einheit) lokalisert <sup>31</sup>. Invasive Mammakarzinome entstehen häufig stufenweise aus diversen Vorstufen, deren Ursache in Ansammlungen (epi-)genetischer Veränderungen der Epithelzellen liegt. Die erste Stufe der Mammakarzinomentstehung stellt klassischerweise die Differenzierung von Brustgewebszellen in einen anderen Zelltyp dar (Metaplasie), welche die Grundlage für größere Umbauten der Gewebestruktur (Dysplasien) bilden. Eine Anhäufung von Dysplasien zieht die Entstehung eines Karzinoms nach sich, welches noch eine intakte Basalmembran besitzt (*carcinoma in situ*, CIS) und auf die Duktuli (DCIS) oder Lobuli begrenzt ist (LCIS). Vorläufer maligner lobulärer Mammakarzinome sind jedoch nicht klar identifizierbar <sup>30,31</sup>. Die Geschwulst kann in der Folge das Drüsengewebe durchbrechen und in das umgebende Brustgewebe einwachsen (invasives Karzinom). Nach der Manifestierung eines solches malignen Tumors können sich im weiteren Verlauf der Tumorprogression einzelne Zellen vom Primärtumor ablösen und über das Blut- oder Lymphgefäßsystem in distante Organe gelangen, wo sie schlussendlich zu Metastasen heranwachsen können <sup>32</sup>.

Neben lobulären Karzinomen oder Mischformen, stellen duktale Karzinome, die aus den inneren Schichten der Milchgänge hervorgehen, mit ca. 85 % den Hauptanteil unter Tumorerkrankungen der Brust dar <sup>32</sup>.

#### 1.2.3.1 Molekulare Ursachen

Der Entwicklung einer Krebsgeschwulst liegt zunächst die maligne Transformation benigner Zellen zu Tumorzellen zugrunde. Diese kann durch Mutationen von Genen mit einer Schlüsselrolle in der Tumorgenese hervorgerufen werden. Man unterscheidet hierbei drei Kategorien von Genen<sup>33–35</sup>. Protoonkogene kodieren für Proteine, die Zellwachstum, -teilung und Differenzierung regulieren. Aus ihnen entstehen durch aktivierende Mutationen sogenannte Onkogene, deren Überexpression die Dysregulation der zuvor genannten Funktionen nach sich zieht. Ein Beispiel hierfür ist die HER2-Amplifikation, die u.a. zu einer gesteigerten Proliferation führt <sup>2,34</sup>. Dagegen kodieren Tumorsuppressorgene für Proteine, die in genomisch geschädigten Zellen durch Regulation von Prozessen wie dem Zellzyklus unkontrollierte Teilung unterdrücken und so die Entstehung maligner Läsionen verhindern können. Ein prominentes Beispiel eines Tumorsuppressorgens ist das Tumorprotein p53, dessen Funktionsverlust mit der Unfähigkeit zur Einleitung des induzierten Zelltods (Apoptose) einhergeht <sup>36</sup>. Für DNA-Reparaturgene ist der Funktionsverlust von Proteinen charakteristisch, die in DNA-Reparaturmechanismen involviert sind. Der Funktionsverlust führt dazu, dass karzinogene Mutationen nicht länger repariert werden können und somit indirekt die Tumorentstehung ausgelöst wird. Ein häufig bei Mammakarzinompatientinnen mutiert vorliegendes DNA-Reparaturgen ist breast cancer 1, early onset (BRCA1)<sup>37</sup>. Dieses Gen ist vor allem mit erblichem (hereditärem) Mammakarzinom assoziiert. Etwa 10 % aller Mammakarzinomerkrankungen entstehen auf der Grundlage hereditärer Faktoren. In dieser Arbeit wurden jedoch nur Patientinnen betrachtet, die in der Familienanamnese keine hereditären Mammakarzinomfälle aufwiesen und deren Tumore somit auf Grund von aus Neumutationen entstanden sind. Solche nichterblichen Tumoren werden als sporadisch bezeichnet <sup>1</sup>.

Es ist jedoch anzumerken, dass generell von einem Modell der Mehrschrittkarzinogenese ausgegangen wird. Es besagt, dass verschiedene Stufen der Tumorgenese durch die sequenzielle Akkumulation von Mutationen ausgelöst werden. Die Iniitierung ist beispielsweise durch eine veränderte biologische Potenz einer Zelle gekennzeichnet. Während der Promotionsphase kommen Mutationen hinzu, die durch klonale Expansion eine erhöhte Proliferation induzieren. Die maligne Transformation wird durch das Auftreten von Mutationen ausgelöst, die unkontrolliertes Wachstum und genetische Instabilität nach sich ziehen. Zusätzliche Mutationen unterstützen die Blutgefäßneubildung und nachfolgende Mutationen sind wiederum richtungsweisend für verschiedene Schritte der Metastasierung <sup>38</sup>.

Während der verschiedenen Stadien der Tumorgenese sind folglich die Anzahl betroffener Gene, die Art der vorliegenden Mutationen und die Interaktion der betroffenen Genprodukte stetigen Veränderungen unterworfen und sehr heterogen. Basierend auf Mikroarray-Analysen lassen sich

Mammakarzinome in molekulare Untergruppen (Subtypen) untergliedern, die durch verschiedene immunhistochemische Marker charakterisierbar sind. Die Untergliederung nach Perou teilte Mammakarzinome in die vier Subtypen *basal-like*, HER2-*enriched*, luminal und *normal-like* ein <sup>39</sup>. Eine entsprechende Einteilung, die auf immunhistochemischen (IHC) Analysen basiert, wurde zuletzt bei der 12. internationalen St. Gallen-Konferenz für Brustkrebs festgehalten und gilt derzeit als Standard für Therapieempfehlungen in der klinischen Praxis<sup>27</sup>. Die Einteilung der Subtypen nach Genexpressionsanalysen ist jener nach IHC in Tabelle 1.2 gegenübergestellt. Tumore mit luminalem Expressionsmuster weisen häufig messbare Proteinspiegel der Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron auf. Sie entwickeln sich möglicherweise aus den luminalen Zellen der Brustdrüse. Abhängig von der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 können diese Tumore weiter in luminal A und B unterteilt werden, die sich in ihrer Prognose unterscheiden. HER2-positive Tumoren weisen eine hochgradig amplifizierte HER2-Genregion und erhöhte Proteinspiegel auf. Sie sprechen in der Regel gut auf die Behandlung mit HER2-spezifischen Therapeutika an. Der basal-like Subtyp besteht fast ausschließlich aus Hormonrezeptor- (HR-) und HER2-negativen Tumoren, die auch als triple-negativ bezeichnet werden, zeigen jedoch häufig messbare Proteinspiegel von Zytokeratin 5/6 oder epidermalem Wachstumfaktorrezeptor (EGFR) <sup>40</sup>. Spätere Studien identifizierten claudin-low und apokrin als weitere Subtypen von *triple*-negativen Mammakarzinoms, deren klinische Relevanz bislang unklar ist <sup>41,42</sup>.

Tabelle	1.2:	Klassifizierung	des	Mammakarzinoms	nach	molel	kularen	Subtypen.	Dargestellt	sind d	ie Einteilun	g von
Mamma	ıkarzi	nomen in auf	Gene	xpressionsanalysen	basier	enden	Subtype	en (luminal	, HER2-posi	tiv und	basal-like)	sowie
deren D	efinit	ion auf immunh	istoc	hemischer Ebene (IH	IC-Klas	sifikati	ion).					

Subtyp	IHC Klassifikation	
Luminal	Östrogenrezeptor und/oder Progesterorezeptor HER2	positiv negativ
HER2 positiv	Östrogenrezeptor und/oder Progesterorezeptor	positiv
(nicht luminal)	HER2	positiv
Basal-like	Östrogenrezeptor und Progesterorezeptor	negativ
(triple-negativ)	HER2	negativ

Aufgrund ihrer spezifischen biologischen Besonderheiten zeigen die molekularen Subtypen des Mammakarzinoms ausgeprägte Unterschiede im Krankheitsverlauf und im Ansprechen auf ihre Behandlung. Die schnell proliferierenden *basal-like*-Karzinome, welche eine schlechter Prognose aufweisen, haben in diesen Zusammenhang einen besonderen Stellenwert, da ihre weitere molekulare Charakterisierung von großer klinischer Bedeutung ist <sup>43,44</sup>.

Im Laufe der Jahre stellte sich heraus, dass die Einteilung des Mammakarzinoms in molekulare Subtypen deutlich komplexer ist als initial angenommen <sup>39,45</sup> und vor allem bezüglich auf die Therapieempfehlungen für die klinische Anwendung stetig überarbeitet werden müssen.

#### 1.2.4 Therapie des Mammakarzinoms

Aktuelle Therapieansätze von Mammakarzinomen beinhalten eine Kombination aus operativer sowie systemischer Behandlung und röntgenbasierter Bestrahlung, die zu einer wesentliche Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zur früher üblichen radikalen Mastektomie beiträgt <sup>28</sup>. Bislang untersuchte Marker des Mammakarzinoms beschränken sich weitestgehend auf klassische Prognosefaktoren wie die Tumorgröße, Differenzierungsgrad und axillären Lymphknotenbefall. Aus der Anzahl und Lokalisation betroffener Lymphknoten lässt sich am zuverlässigsten eine direkte Auswirkung auf die Überlebensrate ablesen <sup>46</sup>. Von prognostischer Relevanz sind darüber hinaus die histologische Klassifizierung, vorhandene Invasion des Blutgefäßsystems sowie das Alter der Patientinnen. Die wichtigsten Marker stellen jedoch der Expressionsstatus des Östrogen- und Progesteronrezeptors dar. Patientinnen, die eine messbare Östrogenrezeptor-Expression aufweisen können durch den Einsatz von Tamoxifen oder Aromataseinhibitoren behandelt werden <sup>47</sup>. Mammakarzinome, die keine Hormonrezeptoren exprimieren, bilden vermehrt Rezidive und stehen vor allem einer endokrinen Therapie nicht zur Verfügung <sup>33</sup>.

Neben klassischen Chemotherapeutika und der Hormontherapie östrogenrezeptorpositiver Tumore kommen im Zeitalter der Genetik auch immer häufiger sogenannte gezielte Therapien (Targeted-Therapien) zum Einsatz, bei welchen das Medikament gezielt gegen ein bestimmtes Protein gerichtet ist. Zum einen werden hierfür Antikörper verwendet, die mit den Liganden um die Bindestelle an den Rezeptoren konkurrieren. Eines der bekanntesten Beispiele hierfür ist der gegen HER2 gerichtete Antikörper Trastuzumab, der erfolgreich zur Therapie von Primärtumoren und Fernmetastasen des Mammakarzinoms eingesetzt wird <sup>48,49</sup>. Eine erhöhte HER2-Expression korreliert mit einem höheres Rezidivrisiko sowie kürzeren Überlebensraten und wurde daher ursprünglich als Prognosemarker genutzt. Mittlerweile fällt die Detektion von HER2-Amplifikationen (eine ausführlichere folgt in Abschnitt 1.3.1.3) unter die Routinediagnostik und stellt einen wichtigen Schritt auf dem Weg zu einem zielgerichteten Therapiemanagement dar 47,49. Da viele krebsrelevante Mutationen in Genen für intrazelluläre Proteine vorliegen, besagte Antikörper jedoch nur oberflächenexponierte Ziele binden können, bilden die zweite Gruppe aktuell eingesetzter Therapeutika sog. small molecule-Inhibitoren. Es handelt sich hierbei um kleine Moleküle, die in der Lage sind die Zellmembran zu überwinden, im Zellinneren an ihre Zielproteine zu binden und diese beispielsweise durch Besetzen des aktiven Zentrums zu inaktivieren (z. B. Erlotinib, Lapatinib, Afatinib, und Gefitinib) <sup>50–54</sup>. Mittlerweile können neben den Primärtumoren auch viele Fernmetastasen des Mammakarzinoms erfolgreich behandelt werden. Dennoch gelten metastasierende Mammakarzinome aufgrund ihrer komplexen genomischen Ausstattung noch immer als unheilbar.

Durch die Erfolge systemischer Behandlungsmethoden und verbesserter Bildgebungsverfahren ist eine steigende Inzidenz von Gehirnmetastasen zu verzeichnen. Daher repräsentiert der Umgang mit der Erkrankung an Gehirnmetastasen ein Gebiet mit wachsendem wissenschaftlichem Interesse der Erforschung organspezifischer Metastasierung <sup>55–59</sup>. Ein Grund hierfür die steigende Inzidenz ist u.a. das größenbedingte Unvermögen von Antikörper-Präparaten die Bluthirnschranke zu passieren, während *small molecules* hingegen häufig von Effluxpumpen wieder aus dem Gehirn heraus transportiert werden <sup>60</sup>. Die mangelnde Therapierbarkeit von Hirnmetastasen des Mammakarzinoms (*breast cancer brain metastases*, BCBM) ist eine vermehrt auftretende klinisch relevante Problematik, weshalb die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen von außerordentlicher Bedeutung für die Weiterentwicklung gezielter Therapiemaßnahmen ist (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Transport von Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke.** Die verschiedenen Transportmöglichkeiten von Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke sind schematisch nach Chen & Liu 2012 illustriert <sup>60</sup>. Wasserlösliche Agenzien können durch die *Tight Junctions* hindurch diffundieren (**A**). Lipid-lösliche Agenzien können die Lipiddoppelschicht der Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) passieren und so aus dem Blutstrom in das Gehirnparenchym gelangen (**B**). Moleküle wie Zucker, Aminosäuren oder Nukleoside werden über Transportproteine durch die BHS geleitet (**C**). Wachstumsfaktoren wie Insulin, Transferrin oder Albumin sowie ganze Zellen, wie mit Liposomen beladene Monozyten, werden mittels Transzytose durch die BHS transportiert.

#### 1.2.5 Gehirnmetastasen des Mammakarzinoms

Das metastasierende Mammakarzinom ist eine heterogene Erkrankung, die sich in verschiedenen klinischen Auswüchsen manifestiert, welche von einzelnen bis zu diffusen metastatischen Läsionen und der Beteiligung multipler Organe reicht. Neben Knochen, Lunge und Leber bildet das Gehirn eines der bevorzugten Metastasierungsgewebe des Mammakarzinoms<sup>61,62</sup>.

Die Inzidenz symptomatischer BCBMs liegt zwischen 10-16 % <sup>63,64</sup>. Analysen an Autopsiematerial offenbarten jedoch einen Anteil von ca. 30 % <sup>63,65–68</sup>. Die Ausbildung solider BCBM setzt im Durchschnitt erst zwei bis drei Jahre nach der Primärtumordiagnose ein und stellt generell ein spätes Ereignis in der Tumorgenese dar, dem häufig Metastasen in Knochen, Lunge oder Leber vorangehen <sup>69–71</sup>. Die Ein- bzw. Zwei-Jahres-Überlebensrate der Patientinnen liegt bei 20% bzw. 2 %. Die mittlere Überlebenszeit beträgt zwischen 2-16 Monaten und ist abhängig von der Behandlungsmethode <sup>72</sup>. Nichtsdestotrotz stellen Patientinnen mit BCBM eine heterogene Gruppe dar, von denen einige längere Überlebensspannen aufweisen. Diese günstigere Prognose trifft auf Patientinnen mit solitären BCBM zu <sup>73–75</sup>.

Eine der Risikogruppen für die Entwicklung von BCBM bilden junge Patientinnen <sup>65,76</sup>. Ferner wurde in einigen Studien, neben weiteren Faktoren, eine Assoziation zwischen BCBM und negativem HR-Status, basalem Brustkrebssubtyp oder *BRCA1*-Mutationen belegt <sup>77,78</sup>. Weiterhin sind BCBM häufig mit einer HER2-Überexpression assoziiert, für die eine steigende Inzidenz zu verzeichnen ist <sup>79–82</sup>. Zugrunde liegt hier neben einem Organotropismus für BCBM das Unvermögen von Trastuzumab, dem derzeitigen Standard in der Behandlung HER2-positiver Patientinnen, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren. Dies bedeutet, dass zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns bereits im Gehirn angesiedelte DTCs nicht durch die Therapie erreicht werden und zu Metastasen auswachsen können <sup>58,59</sup>.

Das Vorhandensein von BCBM stellt für die Therapie einer metastastischen Mammakarzinomerkrankung eine Hürde dar, weil 50 % der BCBM-Patientinnen an den neurologischen Folgen der BCBM-Erkrankung versterben <sup>83</sup>. Hieraus erwächst die Notwendigkeit zur lokalen Kontrolle der BCBM, um das Langzeitüberleben der Patientinnen zu steigern. Es ist daher von außerordentlicher klinischer Bedeutung ihre molekulare Ursache der BCBM zu erforschen, um das Risiko für die Entwicklung von BCBM vorhersagen und wirksame Therapien entwickeln zu können.

#### 1.3 Der EGFR/HER2-Signalweg im Mammakarzinom

Da Krebserkrankungen allgemein, besonders aber auch dem Mammakarzinom, multigenische Ursachen zugrunde liegen, sind verschiedenste Signalwege dysreguliert. Etwa 32.000 der menschlichen Gene kodieren für Proteine, die teilweise an der Weiterleitung zellulärer Signale (Signaltransduktion) beteiligt sind. Zu ihnen zählen unter anderem über 520 Proteinkinasen, die in Tyrosin- und Serin / Threonin-Spezifität unterteilt werden - darunter 58 transmembrane Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), die sich wiederum in 20 Klassen untergliedern <sup>84</sup>. Die RTKs haben eine tragende Rolle bei der Regulation des Wachstums, der Differenzierung, Migration und dem Zelltod, daher nehmen sie eine Schlüsselrolle in vielen Krebs-assoziierten Prozessen ein <sup>85–88</sup>.

RTKs sind Zelloberflächenproteine, die nach Ligandenbindung Homo- bzw. Heterodimere ausbilden. Dies begünstigt die sterische Anordnung der beiden intrazellulären Domänen zueinander und ermöglicht eine Aktivierung der Tyrosinkinasedomänen (TKD) mit anschließender Autophosphorylierung von Tyrosinresten in der carboxyterminalen Region <sup>89,90</sup>. Hierdurch werden Signalproteine rekrutiert und ebenfalls aktiviert, was nach einer Signaltransduktionskaskade hintereinander geschalteter biochemischer Reaktionen (*downstream signaling*) schlussendlich Prozesse wie Zellwachstum, Migration und Differenzierung reguliert <sup>88,91</sup>.

Die Vertreter der Familie der humanen epidermalen Wachstumsrezeptoren (nach *HUGO* Gennomenklatur ERBB, alias HER) sind im Zusammenhang mit Mammakarzinomerkrankungen am besten beschriebenen <sup>92,93</sup>. Zu den wichtigsten ERBB-bezogenen Signalwegen zählen die JAK/STAT- (Januskinase / signal transducer and activator of transcription), MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*), Proteinkinase C und PI3K/AKT- (Phosphoinositol-3-Kinase / Proteinkinase B) Routen <sup>85</sup>. In dieser Arbeit liegt das Augenmerk jedoch auf dem über PI3K/AKT-regulierten Signalweg (Abb. 1.5).

Im PI3K/AKT-Signalweg rekrutieren die Rezeptoren die PI3K, auf die dort ein Phosphatrest übertragen wird. Die katalytische Untereinheit der aktivierten PI3K katalysiert die Umsetzung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP<sub>3</sub>). Dies vermittelt die Rekrutierung der Serin- / Threoninkinase AKT an die Plasmamembran, wo diese ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert wird (pAKT). pAKT phosphoryliert eine Reihe von Zielproteinen, die in eine Vielzahl von Prozessen involviert sind, zu denen Überleben, Proliferation, Migration, Zellzyklus, Glykolyse, Angiogenese, Proteinsynthese und die Inhibition von Apoptose zählen <sup>94,95</sup>. Die Signalweiterleitung induziert folglich die meisten an der Tumorgenese beteiligten Prozesse. Unter Normalbedingungen katalysiert das Phosphatase- und Tensinhomolog (PTEN) die Gegenreaktion der durch PI3K vermittelten Lipid-Phosphorylierung und wirkt somit als Tumorsuppressor regulierend auf die durch pAKT induzierten Prozesse <sup>96</sup>. Um einen genaueren Einblick in die Funktionen der in dieser Studie untersuchten EGFR, HER2, PTEN und PI3K im Mammakarzinom zu erhalten, werden diese nachfolgend einzeln eingeführt.



Abb. 1.5: Schema der PI3K/AKT-Signaltransduktionskaskade. Nach Dimerisierung und folgender Autophosphorylierung der RTKs EGFR und HER2, erfolgt durch Übertragung einer Phosphatgruppe die Aktivierung von PI3K, welches an der Plasmamembran die Umsetzung von PIP2 zu PIP3 veranlasst. Hierdurch wird AKT an die Plasmamembran rekrutiert und ebenfalls phosphoryliert. Es kommt zur Ausbildung eines Komplexes mit PDK1, was mTOR inhibiert. Ferner wird über einen Rückkopplungs-Regulationsmechanismus die Expression des PI3K-Antagonisten PTEN herauf reguliert. Diese Signalweiterleitung beeinflusst das Überleben und die Proliferation der Zellen. Ferner ist die Signalweiterleitung über HER2 in Tumorentstehung und Progression involviert.

## 1.3.1 Rezeptortyrosinkinasen der ERBB-Familie

Die ERBB-Familie besteht aus den hochkonservierten und zueinander stark homologen Monomeren ERBB1 (EGFR/HER1), ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3) und ERBB4 (HER4) <sup>97</sup>. Die Liganden dieser Rezeptoren setzen sich aus EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren und Neuregulinen zusammen, die über ihre bevorzugte Bindung an bestimmte Rezeptoren der ERBB-Familie die Bildung unterschiedlicher Rezeptor-tor-Dimere hervorrufen und somit verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren <sup>98–100</sup>.

## 1.3.1.1 Tumorgenese und onkogene Mutationen Rezeptortyrosinkinasen der ERBB-Familie

Alle vier Mitglieder der ERBB-Familie werden als klassische Onkogene bezeichnet. Die Aktivierung dieser Rezeptoren kann durch verschiedene Prozesse ausgelöst werden. Eine Genamplifikation bedingt einen Konzentrationsanstieg des aktiven Proteins. Als Beispiel kann die *HER2*-Genamplifikation angeführt werden, die häufig in Mammakarzinomen auftritt <sup>101</sup>. Mutationen oder kleine Deletionen führen zu einem Funktionsgewinn. Beispielsweise entsteht das EGFRvIII-Transkript durch eine Deletion der Exone 2-7, was den Verlust der Ligandenbindedomäne und eine konstitutive Aktivierung der RTK zur Folge hat. Eine Überexpression kann ferner durch Rückkopplungsmechanismen ausgelöst werden. Unter PI3K-Inhibition HER2-positiver Tumoren tritt z. B. eine gesteigerte HER3-Phosporylierung auf <sup>102–104</sup>.

#### 1.3.1.2 Das Onkogen EGFR

Der EGF-Rezeptor ist das am längsten bekannte und am ausführlichsten untersuchte Mitglied der Familie und verfügt über eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität <sup>105</sup>. In der carboxyterminalen Region verfügt er über mehrere Autophosphorylierungsstellen, von denen die Tyrosinreste Tyr1148, Tyr1068 und Tyr1173 nach Ligandenbindung und Dimerisierung am häufigsten phosphoryliert werden <sup>106,107</sup>. Zahlreiche Studien belegen neben dem Mammakarzinom eine EGFR-Überexpression in unterschiedlichen Tumorentitäten wie dem Kolon-, Bronchial-, Ovarial- oder dem Pankreaskarzinom <sup>108–111</sup>. Eine Überexpression von EGFR führt zu einer gesteigerten Zellproliferation, Angiogenese und Metastasierungsrate und vermindert zugleich die Apoptoserate. Aktuell werden *Targeted*-Therapien gegen EGFR bereits zur Behandlung von Bronchial- oder Kolonkarzinomen eingesetzt <sup>112,113</sup>.

Die Ursachen für eine gesteigerte EGFR-Aktivierung sind vielfältig. Für das primäre Mammakarzinom ist eine eng begrenzte, den *EGFR*-Lokus umgebende Amplifikation der chromosomalen Region 7p11.2 in <5 % der Fälle beschrieben <sup>114–116</sup>. Die Amplifikation wird durch Doppelstrangbrüche an speziellen Sollbruchstellen und anschließende homologe Rekombination der Bruchstücke über einen sogenannten *Breakage Fusion Bridge*-Zyklus hervorgerufen <sup>117</sup>. Das vermehrte Vorliegen des *EGFR*-Gens führt zur gesteigerten Expression <sup>118</sup>.

Eine gesteigerte Aktivierung von EGFR wird ferner durch das Vorliegen des bereits oben erwähnten EGFRvIII-Transkripts hervorgerufen. Der Verlust der Ligandenbindedomäne führt zu einer Konformation, welche die Dimerbildung ohne gebundenen Liganden begünstigt und somit eine gesteigerte Signalweiterleitung induziert. Das EGFRvIII-Transkript ist vor allem mit dem Gehirntumor *Glioblastoma multiforme* assoziiert und wurde nur selten ( $\leq 4$  %) im Mammakarzinom nachgewiesen<sup>119–121</sup>.

Überdies wird eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors in verschiedenen Tumorentitäten durch Punktmutationen in der TKD ausgelöst. Am häufigsten tritt diese Art der Rezeptor-Aktivierung in Bronchialkarzinomen auf <sup>122</sup>. Die Mutationen sind hauptsächlich in der Nukleotidbinde- auf Exon 19 und in der Aktivierungsschleife auf Exon 21 lokalisiert. Sie rufen eine Konformationsänderung der dreidimensionalen Struktur hervor, die in der Wildtypform von EGFR durch Ligandenbindung initiiert wird. Diese Konformationsänderung verursacht durch die dauerhafte Ermöglichung der Dimerbildung und nachfolgende Autophosphorylierung die konstitutive Aktivierung von EGFR <sup>123</sup>. TK-Mutationen werden in Mammakarzinomen ebenfalls verhältnismäßig selten ( $\leq$ 11 %) detektiert <sup>124,125</sup>.

#### 1.3.1.3 Das Onkogen HER2

Auch HER2 verfügt über eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, jedoch nicht über eine Ligandenbindedomäne, weshalb es nur als Dimerisierungspartner fungiert <sup>99</sup>. Aufgrund seiner häufig auftretenden Überexpression im Mammakarzinom (ca. 25 %) ist HER2 von großer Bedeutung für die Diagnose und Therapie dieser Entität <sup>126</sup>. Eine HER2-Überexpression wird entweder durch eine Amplifikation des *HER2*-Genlokus' (17q11.2-q12) oder durch Aneuploidie des gesamten Chromosoms 17 ausgelöst. Die genetischen Mechanismen welche die *HER2*-Amplifikation hervorrufen sind komplex und schließen den Abbruch der Telomere, wiederholte Fusion der Bruchstücke und anschließende Brüche innerhalb des Chromosoms während der Zellteilung sowie die Aufnahme multipler Sequenzen anderer Chromosomen mit ein. Aufgrund dessen variiert das sogenannte *HER2*-Amplikon in Größe und Anzahl der Replikate. Ferner umfasst es neben *HER2* weitere Gene, die ebenfalls dysreguliert sind und daher auch in der Krebsentstehung mitwirken können <sup>117,127,128</sup>. Trotz erfolgreicher Behandlung von *HER2*überexprimierenden Mammakarzinompatientinnen mit dem gegen HER2 gerichteten Antikörper Trastuzumab liegt für diese Patientinnen eine schlechte Prognose vor<sup>48,49</sup>. Ein Grund hierfür ist die bereits erwähnte häufig im Zusammenhang mit HER2-Überexpression berichtete Gehirnmetastasierung und das Unvermögen von Trastuzumab die Bluthirnschranke zu überqueren <sup>129</sup>.

#### 1.3.2 Das Onkogen PI3K

Die Kinase PI3K katalysiert die Phosphorylierung bestimmter plasmamembranständiger Phospholipide an der 3'-OH Position des Inositolrings und schaltet so die Signaltransduktion über den AKT-Signalweg an <sup>94</sup>. Die PI3K-Famile setzt sich aus diversen strukturell verwandten Enzymen zusammen, die nach der Proteindomänenstruktur ihrer katalytischen Untereinheiten in drei funktionellen Klassen mit insgesamt acht Isoformen unterteilt werden <sup>130</sup>. Eine Assoziation mit Krebserkrankungen, u.a. mit dem Mammakarzinom, wurde für Mitglieder der Klasse IA und besonders für seinen Vertreter p110α nachgewiesen <sup>131–133</sup>. Funktionelles PI3K setzt sich aus einer katalytischen (PIK3CA) und einer regulatorischen Untereinheit (PIK3R) zusammen, das unter basalen Bedingungen inaktiv vorliegt. Die katalytische Untereinheit wird erst aktiviert, nachdem durch die Bindung von PIK3R an der TKD von ERBB-Familienmitgliedern eine Konformationsänderung ausgelöst wird. Die 1068 Aminosäuren umfassende, katalytische PIK3CA-Untereinheit dissoziiert von der regulatorischen Untereinheit ab und überträgt an der Plasmamembran einen Phosphatrest auf das Phospholipid PIP2. Die PIK3CA-Untereinheit besteht aus fünf Domänen. Die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Bindedomäne dockt an das Phospholipid an. Die Phosphatasedomäne enthält das katalytische Zentrum, dessen Signaturmotif sich auf dem Boden der durch das aktive Zentrum gebildeten Tasche befindet. Der große Durchmesser in Kombination mit einer positiven Ladung dieser Substratbindestelle macht die effiziente Aufnahme von Phosphoinositiden erst möglich. Die C2-Domäne ist in der Lage an Phospholipidmembranen zu binden während die PDZ-Domäne die Bindung an andere Proteine unterstützt. Die helikale Domäne bildet eine Brücke zwischen der Kinase- und der C2-Domäne und interagiert zusätzlich mit der regulatorischen Untereinheit. Letzteres bedingt den inhibitorischen Effekt der regulatorischen Untereinheit auf die PI3K-Akitivität <sup>134</sup>.

Mutationen im *PIK3CA*-Gen (3q26.3) treten zu variierenden Frequenzen (15-45 %) in primären Mammakarzinomtumoren auf <sup>135–141</sup>. Es ist belegt, dass sich diese Mutationen in bestimmten Regionen anhäufen, die auf Exon 9 (E542, E545, Q546) und Exon 20 lokalisiert sind (H1047) <sup>142</sup>, welche für die helikale bzw. katalytische Domäne kodieren. Diese Regionen werden auch als *Hotspots* bezeichnet. Die Mutationen liegen alle oberflächenexponiert an Positionen, die mit PIK3R interagieren und imitieren die durch Bindung eines physiologischen Aktivators ausgelöste Konformationsänderung. Dies führt zu einer konstitutiven Aktivierung von PI3K, was eine verstärkte Signalweiterleitung in dem angeschlossenen AKT-Signalweg zur Folge hat <sup>143</sup>.

#### 1.3.3 Der Tumorsuppressor PTEN

Das 403 Aminosäuren umfassende PTEN-Protein enthält zwei funktionelle Domänen und drei strukturgebende Regionen. Über das katalytische Signaturmotif in der Phosphatasedomäne ist PTEN in der Lage Serin-, Threonin- und Tyrosinreste hochgradig saurer Substrate zu dephosphorylieren <sup>144,145</sup>. Die C2-Domäne des Proteins vermittelt, wie auch bei PI3K, die Rekruitierung von PTEN an die Plasmamembran, wo es durch seine Lipidphosphataseaktivität als PI3K-Antagonist wirkt <sup>144,146</sup>. Ferner verfügt es über eine N-terminale PIP2-Bindedomäne und C-terminale, regulatorische PEST-Sequenzen, gefolgt von einem PDZ-Motif, welches ebenfalls in die Regulation der PTEN-Aktivität involviert ist <sup>144</sup>. Neben der mit diversen Krebsentitäten assoziierten Lipidphosphataseaktivität ist PTEN auch in der

Lage Proteine zu dephosphorylieren <sup>147,148</sup>. Über diese Proteinphophastaseaktivität ist PTEN beispielsweise durch negative Regulation von Cyclin D1 an der Zellzykluskontrolle beteiligt <sup>149</sup>.

PTEN-Funktionsverlust ist mit diversen epithelialen Tumorentitäten wie dem Prostata- und Mammakarzinom, sowie Gehirntumoren wie dem *Glioblastoma multiforme* (GBM) assoziiert <sup>150–153</sup>. Im Zusammenhang mit PTEN-Funktionsverlust spricht man von Haploinsuffizienz <sup>154</sup>. Dies bedeutet, dass schon verringerte Proteinlevels für Defekte in den durch PTEN regulierten Prozessen führen.

Der Funktionsverlust von PTEN kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Er ist sowohl im GBM (90 %) als auch im primären Mammakarzinom (15-37 %) ein häufiges Ereignis und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert <sup>150,153,155–158</sup>. Zu den auslösenden Mechanismen zählen Verlust des *PTEN*-Genlokus (10q23.3), Mutationen oder Methylierung. Eine häufige genomische Ursache für den Funktionsverlust von PTEN ist eine hetero- oder homozygote Deletion des *PTEN*-Genlokus. Eine Deletion nur eines Allel, zieht einen Verlust der Heterozygotie nach sich <sup>159</sup>. Im Normalfall liegen für jedes Gen beim Menschen zwei verschiedene Allele vor, auch als Mischerbigkeit (Heterozygotie) bezeichnet. Bei dem Verlust eines Allels spricht man dementsprechend von einem Verlust der Heterozygotie (allelische Imbalanz, AI). AI des PTEN-Lokus' auf dem Chromosomenabschnitt 10q23.3 tritt in 70 % der GBM-Patienten auf, wurde jedoch auch häufig für das Mammakarzinom (25-40%) berichtet <sup>160–163</sup>. Treten zusätzlich im zweiten Allel Mutationen auf, welche die katalytische Aktivität beeinträchtigen oder sind Methylierungen vorhanden, kommt es zum vollständigen Verlust von funktionsfähigem PTEN.

Eine weitere Ursache für den PTEN-Funktionverlust sind Mutationen im *PTEN*-Gen selbst. Berichtet sind sowohl Punktmutationen als auch großflächige Deletionen, die mehrere Exone umfassen. Die Lokalisation der Mutationen ist über die gesamte PTEN-Sequenz verteilt, allerdings tritt in Mammakarzinomen und Gehirntumoren eine Anhäufung im Bereich um die Exone 3 und 5, wo sich u.a. das katalytische Zentrum befindet <sup>96,164</sup>. *PTEN*-Mutationen stellen in primären Mammakarzinomen mit  $\leq$ 10 % eine relativ seltene Alteration dar <sup>136,140,165,166</sup>.

Neben Alterationen in der PTEN-Sequenz ist die Methylierung der *PTEN*-Genlokus ursächlich für einen Funktionsverlust <sup>167</sup>. Ziel von Methylierungen ist die Promotorregion, wodurch das Ablesen der Sequenz unterbunden wird <sup>168</sup>. Methyliertes PTEN wurde in 30 % von Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen <sup>168,169</sup>.

## Fragestellung

Trotz der Weiterentwicklung systemischer Therapie steigt die Inzidenz von Gehirnmetasasen des Mammakarzinoms (BCBM) stetig. Die Tumorzelldisseminierung von Tumorzellen stellt ein frühes Ereignis in der Metastasierung dar. Dennoch entstehen im Gehirn zumeist erst Jahre nach der Primärtumordiagnose solide Metastasen aus einzelnen DTCs, die in einer Art Ruhezustand die Zeit überdauert haben. Diese Zellen werden ggf. durch Therapeutika aus strukturellen Gründen nicht erreicht bzw. die in Dormanz eingetretenen Zellen sprechen nicht auf die Behandlung an, da sie nicht proliferieren. BCBM führen durch Auswirkungen auf lebenswichtige Gehirnfunktionen unweigerlich zum Tode der Betroffenen, da derzeitige Therapeutika nur ineffizient wirken. Da die Nichtbehandelbarkeit von BCBM ein völlig neues klinisches Problem darstellt, ist die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen und involvierten Proteine von außerordentlicher Bedeutung für die Weiterentwicklung gezielter Therapiemaßnahmen.

Der EGFR/HER2-Signalweg ist in diverse Prozesse involviert, die an verschiedenen Schritten der Tumorgenese beteiligt sind. Die Mitglieder des Signalwegs werden aktuell als potentielle Ziele von *Targeted*-Therapieansätzen, im Speziellen für metastatische Erkrankungen, intensiv erforscht. Die kombinierte Inhibition mehrerer Proteine desselben oder in parallelen Signalwegen könnte die Effizienz der Therapie deutlich steigern. Daher ist die Analyse möglicher gleichzeitig dysregulierter Signalwegsmitglieder von außerordentlicher Bedeutung. Diverse Studien belegen häufige Alterationen von EGFR, HER2, PTEN und PIK3CA in BCBM. Dies ist jedoch die erste vergleichende Studie, die sich der Untersuchung aller vier genannter Signalwegsmitglieder in primären Mammakarzinomen und Gehirnmetastasen sowie Metastasen in andere Organe gemeinsam zum Ziel gesetzt hat. Hierbei sollten Alterationen anhand molekularbiologischer Methoden ermittelt und mit Patientendaten verglichen werden. Eine gleichzeitige gehirnspezifische Alteration mehrerer Mitglieder des EGFR/HER2-Signalwegs würde die Behandlung in einem frühen Stadium der Gehirnmetastasen mit einer kombinierten *Targeted*-Therapie sowie mit Therapeutika, die bereits zur Therapie von Gehirntumoren eingesetzt werden, unterstützen.

In dem letzten funktionellen Teil der Arbeit, sollte geklärt werden, welche funktionelle Rolle PTEN in der Gehirnmetastasierung des Mammakarzinoms hat. Dies sollte anhand von Studien an Zellkulturmodellen geschehen. Es sollte überprüft werden ob, eine Herunterregulation der PTEN-Expression in nicht-invasiven Brustepithelzellen bzw. eine Überexpression in aggressiven Zellen, die Gehirnmetastasen bilden, Auswirkungen auf das Proliferations- und Migrationsverhalten hat. Zusätzlich sollte durch Kokultivierung mit Gehirnzellen ermittelt werden, ob PTEN-spezifische Interaktionen mit der Mikroumgebung des Gehirns vorliegen.

## **Material und Methoden**

## 3.1 Material

## 3.1.1 **Patientenmaterial**

Das Untersuchungsmaterial und die Patientendaten wurden durch die Klinik und Poliklinik für Gynäkologie, die Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, das Institut für Pathologie und das Institut für Neuropathologie (Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf, UKE) zur Verfügung gestellt. Alle klinischen Untersuchungen wurden nach den Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Eine Einwilligungserklärung aller Patientinnen für die Verwendung ihrer Gewebe zu Forschungszwecken sowie eine entsprechende Genehmigung der zuständigen Ethikkommission liegt vor.

Im Zuge der Studie wurde Gewebe von 60 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom und 29 Patientinnen mit Gehirnmetastasen aus Brustkrebstumoren (*breast cancer brain metastases*, BCBM) analysiert, die zwischen 1989-2011 operiert wurden. Die Kohorte schloss zwei verschiedene Gehirnmetastasen einer Patientin mit ein, die im Abstand von zwölf Monaten entfernt wurden. Neun Patientinnen mit primärem BC entwickelten in einem späteren Stadium eine Gehirnmetastase. In zwölf Patientinnen traten Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn auf, hierunter elf Knochen-, vier Bauchwand-, drei viszerale und vier Metastasen in andere Organe. Es waren zudem vier Paare von primärem BC und BCBM-Gewebe aus jeweils derselben Patientin verfügbar. In weiteren sechs Fällen waren Areale mit duktalem *Carcinoma in situ* neben dem Tumorgewebe vorhanden. Als Referenz wurde Normalgewebe der Brust oder Blut der Patientinnen verwendet.

Die histologische und klinische Einteilung der Tumoren wurden anhand von Gewebeproben nach den Richtlinien der TNM-Klassifikation der *International Union Against Cancer* (UICC) erstellt <sup>24</sup>. Frisches Tumorgewebe wurde in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Des Weiteren wurden Gewebe-*Microarrays* (*tissue microarray*, TMA) aus Stanzen von primären Mammakarzinomen durch das Institut für Pathologie (UKE) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über die Patienteninformationen und die klinischen Parameter.

Brimärtumoren Ge	hirnn
Tabelle 3.1: Patientencharakteristika. Verändert nach Hohensee et an	/. <sup>198</sup>

	Pri	märtumoren	Gehirnme	etastasen <sup>4)</sup>	andere Metastasen <sup>4)</sup>		
	n	(%)	п	(%)	n	(%)	
Alter bei PT <sup>1)</sup>							
Median [a]	56		50		56		
Bereich [a]	17,5 - 8	31,3	32 - 70,2		50,7 - 62,8		
Alter bei Rezidiv							
Median [a]	-		56		58,01		
Bereich [a]	-		38,7 - 76		50,2 - 72,5		
Tumorstatus							
pT1	19	(32,2)	7	(36,8)	0	(0,0)	
pT2	32	(54,2)	10	(52,6)	2	(66,7)	
pT3+4	8	(13,6)	2	(10,5)	1	(33,3)	
Lymphknotenstatus							
pN0	32	(55,2)	7	(36,8)	1	(50,0)	
pN+	26	(44,8)	12	(63,2)	1	(50,0)	
Metastasierungsstatus <sup>2)</sup>							
pM0	54	(91,5)	15	(88,2)	1	(50,0)	
pM1	5	(8,5)	2	(11,8)	1	(50,0)	
Differenzierungsgrad							
G1+2	26	(44,1)	5	(35,7)	3	(60,0)	
G3	33	(55,9)	9	(64,3)	2	(40,0)	
Tumortyp							
Duktal	41	(68,3)	10	(76,9)	2	(25,0)	
Lobulär	9	(15,0)	1	(7,7)	1	(12,5)	
andere	10	(16,7)	2	(15,4)	5	(62,5)	
HR-Status PT <sup>1,3)</sup>							
Negativ	16	(27,6)	5	(27,8)	2	(100,0)	
Positiv	42	(72,4)	13	(72,2)	0	(0,0)	
HR-Status Metastasen <sup>1</sup>							
Negativ	-		9	(32,1)	0	(0,0)	
Positiv	-		19	(67,9)	1	(100,0)	
HER2-Status PT <sup>1</sup>							
Negativ	49	(84,5)	13	(68,4)	1	(50,0)	
Positiv	9	(15,5)	6	(31,6)	1	(50,0)	
HER2-Status Metastasen							
Negativ	-		17	(58,6)	9	(81,9)	
Positiv	-		12	(41,4)	2	(18,1)	
Subtyp PT <sup>1)</sup>							
HR-positiv	32	(57,1)	7	(41,2)	0	(0,0)	
<i>Triple</i> -negativ	15	(26,8)	4	(23,5)	1	(50,0)	
HER2	9	(16,1)	6	(35,3)	1	(50,0)	
Subtyp Metastasen							
HR-positiv	-		9	(32,1)	1	(100,0)	
Triple-negativ	-		7	(25.0)	0	(0.0)	
LED2	_		12	(42.9)	0	(0,0)	

1) PT: Primärtumor

2) Metastasierungsstatus wurde zum Zeitpunkt der PT-Operation ermittelt

3) HR: Hormonrezeptor

4) Tumor, Lymphknoten und Metastasierungsstatus, Differenzierungsgrad und Tumortyp, HR PT, HER2 PT und Subtyp PT sind Informationen über den Primärtumor

## 3.1.2 Zelllinien und Kulturmedien

## Nährmedien für die Kultur eukaryotischer Zellen

Zellkulturmedium 1	90 % 10 % 2 mM 200 U/ml	(v/v) (v/v)	DMEM-Medium (4,5 g/l D-Glucose) Fetales bovines Serum (FBS) L-Glutamin (200 mM) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)
Zellkulturmedium 2	90 % 10 % 2 mM 200 U/ml	(v/v) (v/v)	RPMI 1640- Medium (4,5 g/l D-Glucose) FBS L-Glutamin (200 mM) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)
Zellkulturmedium 3 (MCF10A)	90 % 5 % 100 ng/ml 20 ng/ml 500 ng/ml 10 µg/ml 200 U/ml	(v/v) (v/v)	DMEM/F12 (4,5 g/l D-Glucose) Pferdeserum Choleratoxin (500 µg/ml) EGF (500 µg/ml) Hydrocortison (1 mg/ml) Insulin (10 mg/ml) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)
<b>Zellkulturmedium 4</b> (Astrozyten)	90 % 20 % 2 mM 200 U/ml	(v/v) (v/v)	DMEM (4,5 g/l D-Glucose) FBS L-Glutamin (200 mM) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)
<b>Zellkulturmedium 5</b> (Mikroglia)	90 % 10 % 2 mM 200 U/ml	(v/v) (v/v)	MEM (6 g/l D-Glucose) FBS L-Glutamin (200 mM) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)
Einfriermedium	90 % 10 %	(v/v) (v/v)	Zellkulturmedium 1-5 DMSO

## Nährmedien für die Bakterienkultur

Teriffic broth -Medium (TB-Medium):

TB-Lösung 1	12 g	Bactotrypton
	24 g	Hefeextrakt
	4 ml	Glycerin
	in 900 ml	destilliertes Wasser
		autoklavieren
TB-Lösung 2	17 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
(pH 7,2)	72 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		autoklavieren
TB-Lösung 1 und 2 nach dem Autoklavi	ieren in einem \	/erhältnis von 10:1 vereinen
	25 μg/ml	Chloramphenicol (25 mg/ml)
Luria Broth-Medium (I.B. Medium):	1 %	Bactotrunton
	1 %	Hefeevtrakt
	1 %	NaCl
	170	Autoklavieren
	25 μg/ml	Chloramphenicol (25 mg/ml) bzw.
	50 μg/ml	Ampicillin (100mg/ml)
LB-Agarplatten:	1,5 %	Bactoagar
	in 1l	_ LB-Medium (ohne Antibiotikum)
		Autoklavieren

## Zelllinien

Bezeichnung	Тур	Ursprungs- gewebe	Metastasen	Kultur- Medium	Literatur
BT-20 <sup>1)</sup>	Adenokarzinom der Brust	Brustdrüse	Ja	1	170
BT-549 <sup>2)</sup>	duktales Mammakarzinom	Primärtumor	Lymphknoten	2	171
GI-101 <sup>3)</sup>	duktales Mammakarzinom	Rezidiv	Nein	1	172
HEK-293T 1)	Nierenkarzinom	Nierenepithel	Nein	1	173
MCF-7 <sup>4)</sup>	duktales Mammakarzinom	Pleuraerguss	Ja	1	174
MCF 10A	nicht-tumorigenes Epithel der Brust	Fibrozystische Erkrankung	Nein	4	175
MDA-MB-231 WT <sup>1)</sup>	Adenokarzinom der Brust	Pleuraerguss	Ja	1	176
MDA-MB-231 SA <sup>¶</sup>	Adenokarzinom der Brust	Pleuraerguss	Klon, der Metastasen im Knochen ausbildet	1	177
MDA-MB-231 BR <sup>¶</sup>	Adenokarzinom der Brust	Pleuraerguss	Klon, der Metastasen im Gehirn ausbildet	1	178
MDA-MB-468 <sup>2)</sup>	Adenokarzinom der Brust	Pleuraerguss	Ja	1	179
CHME3 <sup>6)</sup>	Humane Mikroglia	Gehirn	Nein	5	180

1) erhalten von der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA

2) erhalten von Cell Lines Service, Eppelheim

3) erhalten von Dr. J. Hurst, Goodwin Institut for Cancer Research, Plantation, Florida, USA

4) erhalten aus der Zellkulturbank des ICRF Laboratory, St Thomas' Hospital, London, UK

5) erhalten von VTT, Sirkku Pollari, Finnland;

6) erhalten von Dr. Alexander Schulte, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

#### **Primäre Zellen**

Bezeichnung	Тур	Ursprungs- gewebe	Metastasen	Kultur- Medium	Herkunft
Astrozyten	Primäre humane Astrozyten	Gehirn	Nein	4	N7805-100, Life Technologies

## 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

## 3.1.3.1 Chemikalien

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien sind im Anhang aufgeführt (siehe Kapitel 9.5). Die Lösungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit demineralisiertem Wasser angesetzt. Sollten Lösungen für Arbeiten mit RNA verwendet werden, wurden sie mit Diethylenpyrocarbonat (DEPC, Sigma) behandeltem Wasser angesetzt.

## 3.1.3.2 Größenstandards

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten in Agarosegelen (siehe Kapitel 3.2.1.3.2) wurden folgende Größenstandards verwendet:

Bezeichnung	Bereich [bp]	Hersteller/Vertreiber
100 bp DNA Molecular Weight Marker XIV	100-2642	Roche Diagnostics, Mannheim
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	100-3000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hyperladder I	200-10.000	Bioline, Luckenwalde

Das Molekulargewicht von Proteinen im SDS-Gel (siehe Kapitel 3.2.3.3.1) wurde mit Hilfe des folgenden Größenstandards ermittelt:

Bezeichnung	Bereich [kDa]	Hersteller/Vertreiber	
Page Ruler™ Plus	10-250	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	

## 3.1.3.3 *Oligonukleotide*

Eine vollständige Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang (siehe Kapitel 0). Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Aldrich bezogen und mit dem Reinheitsgrad HPSF (High Purity Salt Free) im 0,025 μmol-Maßstab synthetisiert.

		Ursprungs-		
Antigen	Klon	organismus	Hersteller	Verdünnung*
<u>Primärantikörper</u>				
Akt	-	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main	1:1.000 (WB)
Phospho Akt (S473)	D9E	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main	1:2.000 (WB)
Anti-GFP	II	Maus	Torben Lübke, Universität Bielefeld	1:1.000 (WB)
Anti-human EGFR	E30	Maus	Dako, Glostrup Dänemark	1:20 (IHC)
Anti-human ErbB-2 Onkoprotein	NCL-CB11	Maus	Novocastra Laboratories, Newcastle Upon Tyne, Eng- land	1:80 (IHC)
EGFR	1005	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg	1:3.000 (WB)
HSC 70	B-6	Maus	Santa Cruz, Heidelberg	1:10.000 (WB)
PTEN	138G6	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main	1:100 (IHC), 1:1.000 (WB)
Sekundärantikörper:				
APAAP-Komplex (Alkalische- Phosphatase-Anti-Alkalische- Phosphatase)		Maus	Dako, Glostrup Dänemark	1:100
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immuno- globulins/HRP		Kaninchen	Dako, Glostrup Dänemark	1:2 000 (WB)
Polyclonal Swine Anti-Mouse Immuno- alohulins/HRP		Schwein	Dako, Glostrup Dänemark	1:2 000 (WB)

\* eingesetzte Verdünnung für die Immunhistochemie (IHC) und im Western Blot (WB).

## 3.1.3.5 *Puffer und Lösungen*

#### Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

DNA-Beladungspuffer	6 ml 100mM 0,15 % 0,15 %	Glycerin (60 % ) EDTA Bromphenolblau <i>Xylene Cyanol FF</i>
<b>3 M Natriumacetat</b> (pH 5,2)	3 M	Natriumacetat
TE-Puffer	10 mM	Trizma Base
(pH 7)	1mM	EDTA
50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)	2 M	Trizma Base
(pH 8,5)	50 mM	EDTA

FISH-Fixierungslösung	2 %	37% Formaldehyd
(FISH: Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung)	in 100 ml	Methanol
50 % Formamid / 2 x SSC-Putter	50 %	Formamid
(pH 7)	10 %	20 x SSC-Puffer
(SSC: <i>saline-sodium citrate</i> )		
Hybridisierungspuffer	20 %	Dextransultat
(pH 7)	50 %	Formamid
	20 %	20 x SSC-Puffer
		bei 70 °C lösen
		aliquotieren und bei -20 °C lagern
20 x SSC-Puffer	3 M	Natriumchlorid (NaCl)
	0.2 M	
(pn 7)	0,3 101	
		autoklavieren
2 x SSC / 0,3 % NP-40-Puffer	10 %	20 x SSC-Puffer
(pH 7)	0.3 %	Nonidet P-40
(b)	0,0 /0	

## Puffer und Lösungen für FISH-Analysen

## Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

10x PBS	1,54 M	NaCl
(pH 7,4)	0,08 M	Na2HPO4 x 2 H2O
	0,02 M	KH2PO4
TBST-Puffer	0,5 M	Trizma base
(pH 7,6)	1,5 M	NaCl
(TBST: Tris-Buffered Saline mit Tween 20)	0,5 %	Tween-20

## 3.1.3.6 *Kit-Systeme*

Eine Übersicht der verwendeten käuflichen Systeme ist im Anhang aufgeführt(siehe Kapitel 9.6).

#### 3.1.3.7 BAC-Klone und FISH-Sonden

Die rekombinanten *Escherichia coli-* (*E. coli-*) Stämme mit den verwendeten *bacterial artificial chromosome* (BAC-) Klonen wurden vom *German Resource Center for Genome Research* (RZPD, Berlin) bezogen. Die Kultivierung der *E. coli-*Stämme erfolgte in TB-Medium unter Selektion mit Chloramphenicol (25 µg/ml). Die BAC-Sonden wurden mit Hilfe des *Large Construct Kits* (Qiagen) isoliert und anschließend mit *Spektrum Orange*-markierten dUTPs markiert. Die fluoreszenzmarkierten Zentromersonden wurden von der Firma Vysis (Downer Glove, USA) bezogen. Die BAC- und Zentromersonden wurden zur Untersuchung der Kopienanzahl der zu analysierenden Gene in Fluoreszenz*in situ*-Hybridisierungs (FISH)-Analysen eingesetzt (siehe Kapitel 0).

#### Tabelle 3.2: BAC-Klone und Zentromer-Sonden.

Klon/Sonde	Bindungsstelle	Lokalisation	Markierung
RP5-1091E12	7p11.2	EGFR	Spektrum Orange
LSI HER-2/neu 1)	17q11.2-12	HER2	Spektrum Orange
CEP 4	4p11.1-q11.1	Zentromer 4	Spektrum Aqua
CEP 7	7p11.1-q11.1	Zentromer 7	Spektrum Aqua
CEP 17 <sup>1,2)</sup>	17p11.1-q11.1	Zentromer 17	Spektrum Green

1) aus dem PathVysion HER-2 DNA Probe Kit II (Abbott Laboratories)

2) CEP: Zentromersonde

#### 3.1.3.8 shRNAs und Vektoren

Die rekombinanten *E. coli*-Stämme mit den verwendeten PTEN-spezifischen *short hairpin* RNA (shRNA) Sequenzen in dem lentiviralen Vektor p.LKO\_TRC005 wurden ebenso wie die Sequenz der Kontroll-shRNA in dem lentiviralen Vektor p.LKO.1 von Sigma Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. Über die Expression PTEN-spezifischer shRNAs sollte die PTEN-Expression unterdrückt werden (*Knock-down*). Die Kontrollsequenz war gegen keine menschliche mRNA gerichtet. Somit sollte ihre Einführung in humane Krebszelllinien keine Veränderungen in der Genexpression auslösen. Alle shRNA-Sequenzen wurde inklusive des humanen U6-Promotors in einen lentiviralen Vektor kloniert, der das grün fluoreszierende Protein (GFP) sowie eine Puromycin-Resistenz zur Positivselektion exprimiert (LeGO-G-puro+ kloniert).

shRNA	Ziel-Gen	Lokalisation	Vektor
shPTEN1	PTEN	3'-UTR	p.LKO_TRC005
shPTEN2	PTEN	3'-UTR	p.LKO_TRC005
NTC	Non-target control	-	p.LKO.1

Tabelle 3.3: shRNA-Vektoren.

Zur Überexpression von PTEN wurde die kodierende Sequenz (CDS) aus dem Vektor pCDNA3.1 in den lentiviralen GFP-Vektor LeGO-iG2 sowie den Puromycin-selektierbaren und Tetrazyklin-induzierbaren ZsGreen-Vektor piZs2puro++tTRKRAB+kloniert. Die Vektorkarten aller verwendeten Plasmide befinden sich im Anhang (siehe Kapitel 0). Die Knockdown- sowie Überexpressionskonstrukte wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und die produzierten Viruspartikel zur Untersuchung der funktionellen Relevanz von PTEN in Mammakarzinom- bzw. Brustepithelzelllinien eingesetzt.

## 3.1.4 Geräte

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte sind im Anhang detailliert aufgelistet (siehe Kapitel 9.7).

## 3.1.5 Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders beschrieben, wurden Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Falconröhrchen und Reaktionsgefäße von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht), Greiner Bio One (Frickenhausen) und VWR (Darmstadt) verwendet.
# 3.1.6 Software, Onlinetools und Datenbanken

# 3.1.6.1 *Software*

- Realplex Software V2.02 (Eppendorf): Quantitative PCR Steuerungs- und Auswertungssoftware
- GeneMapper (Applied Biosystems): Auswertungssoftware für PCR-Fragmentanalysen
- Sequence Analysis Tool (Applied Biosystems): Auswertungssoftware für Sequenzierungen
- FinchTV (<u>www.geospiza.com/finchtv/</u>): Freie Software zur Visualisierung von Sequenzierungsdateien (.asf).
- ClustalW V2.0 (<u>www.ebi.ac.uk/clustalw/</u>): Onlinetool zum Abgleichen (Alignment) einer oder mehrerer Proben mit einer Referenzsequenz.
- Primer3plus (<u>www.bioinformatics.nl/cgi-bin/Primer3plus/Primer3plus.cgi</u>): Onlinesoftware zum Design von Oligonukleotiden f
  ür Detektion, Sequenzierung, quantitative Assays uvm.
- VectorNTI Advanced 10 (Invitrogen): Software zum Design von Sequenzen, Plasmiden, Oligonukleotiden und zur *in vitro*-Simulation von Restriktionsverdau, Agarosegelelektrophorese etc.
- Mendeley Desktop (Mendeley Ltd.): Freies Literaturverwaltungsprogramm
- Image J (NIH): Freie wissenschaftliche Bildbearbeitungssoftware
- GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.): wissenschaftliche Software zur Erstellung von 2D-Graphiken und zur statistischen Analyse
- Gene Runner (Hastings Software, Inc.): Freies Programm zum Design von Oligonukleotiden
- Pymol (DeLano Scientific LLC): Freie 3D-Grafiksoftware zur Darstellung von Biomolekülen
- SPSS Version 19 (SPSS Inc.): Statistikprogramm

# 3.1.6.2 Onlinetools und Datenbanken

- NCBI (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov</u>): Literatur, DNA, RNA, Proteindatenbanken, BLAST Tools zum Sequenzabgleich etc.
- UCSC (<u>http://genome.ucsc.edu/</u>): DNA, RNA, Proteindatenbank, PCR-Primer Test tool etc.
- COSMIC (<u>http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/</u>): Datenbank über somatische, krebsassoziierte Mutationen
- Ensembl (<u>http://www.ensembl.org/index.html</u>): Datenbank über das eukaryotische Genom incl. Transkriptvarianten und genetischer Variationen

\_

# 3.2 Methoden

# 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 3.2.1.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus FFPE-Gewebeschnitten

Die entparaffinierten und rehydrierten, sowie Toluidinblau-gefärbten (siehe Kapitel 3.2.2.3.2) Gewebestücke wurden zunächst in 0,01 % Triton X100 in H<sub>2</sub>O dissektiert und in 100 % Ethanol (EtOH) 5 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm wurde das luftgetrocknete Pellet nochmals in zwei Schritten für 10 min bei 65 °C in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden EtOH-Reihe (100 %, 90 %, 70 %, 50 %) rehydriert. Die Desoxyribonukleinsäure- (DNA-) Isolierung erfolgte mit geringen Abweichungen nach den Angaben des Herstellers mit dem *innuPREP DNA Micro Kit* (Analytik Jena Bio Solutions) aus dem luftgetrocknetem Pellet. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde in 50 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Die Qualität und Quantität wurde mit dem *NanoDrop* Spektrophotometer (PeqLab) bestimmt (siehe Kapitel 3.2.1.3.1). Die Ausbeute an genomischer DNA betrug ca. 30 µg (komplette Tumorgewebeschnitte) bzw. 15 µg (manuell dissektierte Gewebeschnitte). Einzelheiten zur manuellen Dissektion von Tumorarealen sind in Kapitel 3.2.2.4 beschrieben. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.1.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus nicht-fixiertem Gewebe

Die DNA-Isolierung aus nicht-fixiertem Patientenmaterial (*fresh frozen*-Gewebeschnitte oder EDTA-Blut) wurde dem *QIAmp® DNA Micro* (<1 µg) oder *QIAmp® DNA Mini* Kit (Qiagen) mit leichten Abwandlungen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Gewebestücke wurden in 180 µl Lyse-Puffer und 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) abweichend vom Herstellerprotokoll für 48 h bei 56° C inkubiert. Die verlängerte Inkubation führte zu einer erheblich gesteigerten Ausbeute an hochmolekularer DNA. Vor der Elution der DNA wurde die Säule mit 25 µl bzw. 60 µl DNase-freiem Wasser für 3 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und diese anschließend bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Qualität und Quantität der genomischen DNA wurde mit dem *NanoDrop* Spektrophotometer (PeqLab) bestimmt (siehe Kapitel 3.2.1.3.1). Die Ausbeute betrug ca. 30 µg (Tumorgewebeschnitte) bzw. 5 µg (manuell dissektierte Gewebeschnitte). Bis zur weiteren Verwendung wurde die genomische DNA bei -20°C gelagert.

### 3.2.1.1.3 Isolation von Sonden-DNA

Vor die Isolation der DNA-Sonden (RP5-1091E12, LSI HER-2/neu) für FISH-Analysen wurde eine modifizierte Form der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly geschaltet <sup>181</sup>. Diese beinhaltet einen Verdau mit ATP-abhängiger Exonuklease und eine anschließende Anionenaustauschchromatographie. Daraufhin erfolgte die DNA-Isolation mit dem *Large Construct* Kit (Qiagen) mit geringen Abweichungen von den Herstellerangaben. Zunächst wurde eine E. coli-Kolonie über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in 500 ml TB-Medium mit dem Selektionsantibiotikum Chloramphenicol (25 μg/ml) kultiviert. Im Unterschied zum Herstellerprotokoll wurde in jedem nachfolgenden Schritt die doppelte Puffermenge verwendet. Die Sonden-DNA wurde nach der Elution von der Säule in dem 0,6-fachen Volumen Isopropanol für 30 min bei 1800 x g und 4 °C gefällt. Hierfür wurde die Lösung auf 1,5 ml Röhrchen verteilt und das Gefäß mit einem sichtbaren DNA-Faden markiert. Nach der Aufreinigung der DNA mittels EtOH-Fällung (siehe Kapitel 3.2.1.4.1) wurden die Pellets über Nacht bei 4 °C in dH<sub>2</sub>O gelöst und mit Ausnahme des markierten Gefäßes gepoolt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit dem *NanoDrop* (siehe Kapitel 3.2.1.3.1). Bis zur weiteren Verwendung wurden DNA-Sonden bei -20 °C gelagert.

## 3.2.1.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Anzucht einer Vorkultur erfolgte über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in 5 ml LB-Medium mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin (50 µg/ml, LB-Amp-Medium) aus einer *E. coli*-Kolonie, welche die gewünschte Plasmid-DNA enthielt. Zur Verwendung der Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurden 4 ml dieser Bakteriensuspension anschließend nach dem Protokoll des Herstellers für *high copy*-Plasmide mit dem *NucleoSpin*<sup>®</sup> Plasmid Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt und in 50 µL AE-Puffer eluiert.

Zur Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm eine Bakterienkultur aus 100µl Vorkultur in 100 ml LB-Amp-Medium angezogen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend nach dem Protokoll für *high copy*-Plasmide des Herstellers mit dem *NucleoBond® Xtra Midi/Maxi* Kit (Macherey-Nagel). Das Volumen des Tris-EDTA-Puffers (TE-Puffer) wurde der Größe des DNA-Pellets angepasst (≥100 µl) und die DNA über Nacht bei 4 °C gelöst.

Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wurden photometrisch mit dem *NanoDrop* bestimmt (siehe Kapitel 3.2.1.3.1) und die DNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.2.1.1.5 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolation erfolgte unter RNase-freien Bedingungen und für alle Lösungen wurde DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet.

Alle Isoformen von Ribonukleinsäuren (Gesamt-RNA) wurden aus Patientenmaterial mit dem *RNeasy® Micro* (<1 µg) bzw. *Mini Kit* (Qiagen) nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Das Tumorgewebe wurde in 250 µl Lyse-Puffer (1 % β-Mercaptoethanol) homogenisiert. Zunächst erfolgte ein Zellaufschluss über *QlAshredder*-Säulen (Qiagen). Um hochreine RNA ohne DNA-Kontaminationen zu erhalten wurde für 15 min bei RT mit 30 U DNase (Qiagen) verdaut. Die RNA wurde in 14 µl bzw. 60 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert.

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zelllinien wurde nach einer Lyse in 350 μL RA1-Puffer mit dem *NucleoSpin® RNA II* Kit (Macherey-Nagel) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte in 40 μL RNase-freiem H<sub>2</sub>O.

Die Menge und Qualität der RNA wurden mit dem NanoDrop Spektrophotometer bestimmt (siehe Kapitel 3.2.1.3.1). Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei --80 °C gelagert.

## 3.2.1.2 Herstellung von DNA-Sonden

Es wurden DNA-Sonden für die Chromosomenabschnitte 7p11.2 und 17q11.2-12 hergestellt. Die Vermehrung der BAC-Klone LSI HER-2/neu und RP5-1091E12 erfolgte in rekombinanten *E. coli*-Stämmen in TB-Medium. Anschließend wurden die BAC-Klone isoliert (siehe Kapitel 0) und durch die Methode des "*Random Primings*" Fluoreszenz-markiert.

# 3.2.1.2.1 Markierung der DNA-Sonden durch Random Priming

Die DNA-Sonden wurde durch "*Random Priming*" unter Verwendung des *BioPrime DNA Labeling* Systems (Invitrogen) markiert <sup>182</sup>. Hierfür wurde 1 µg Sonden-DNA für 5 min bei 100 °C denaturiert und Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), *Random*-Hexamere und das *Klenow*-Fragment der DNA-Polymerase I sowie 2,5 mM mit *Spektrum Orange*-markierten dUTPs (Invitrogen) hinzugegeben. Die Markierung erfolgte für 2 h bei 37 °C durch den Einbau der Fluoreszenz-markierten Desoxyuraciltriphosphate (dUTPs) während der Synthese eines neuen Doppelstranges mit Hilfe des *Klenow*-Fragments, wobei die Hexanukleotide als Oligonukleotide an die DNA hybridisierten. Im Anschluss wurden nichtgebundene Nukleotide durch Filtrierung über *Bio-Spin 30 Tris*-Säulen (Biorad) nach Anweisung des Herstellers entfernt. Die Resuspension der DNA in Hybridisierungspuffer erfolgte nach einer EtOH-Aufreinigung (siehe Kapitel 3.2.1.4.1). Die markierten Sonden wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

# 3.2.1.3 Quantitäts- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

### 3.2.1.3.1 Photometrische Messung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben wurde mit je 1 µl Probe am *NanoDrop ND-1000*-Spektrophotometer (PeqLab) durchgeführt. Der Absorptionsquotient A<sub>260nm/280nm</sub> einer reinen DNA-Lösung sollte 1,8 und für eine reine RNA-Lösung 2,0 betragen. In dem Wellenlängenbereich von 220 nm bis 350 nm konnten zusätzlich Substanzen wie Alkohole und Verunreinigungen durch Proteine detektiert werden, welche die Absorptionsmessung beeinflussen.

## 3.2.1.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren für analytische sowie präparative Zwecke wurde in horizontalen Elektrophoreseapparaturen durchgeführt. Je nach Länge der zu analysierenden Nukleinsäurefragmente wurden 0,8 – 2 %-ige (w/v) TAE-Agarosegele mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die DNA-Proben wurden in 0,2 Vol DNA-Ladepuffer aufgetragen und bei einer Spannung von 120 V (analytisch) bzw. 90 V (präparativ) aufgetrennt. Zur Kalkulation der Fragmentlänge wurde in demselben Gel parallel ein DNA-Standard (Roche, Fermentas oder Bioline) aufgetrennt und anschließend die DNA über die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids durch einen Transilluminator (Anregungswellenlänge 234 nm) sichtbar gemacht. Die Gele wurden schlussendlich zur Dokumentation mit dem Geldokumentationssystem *Gene Genius 2* (Syngene, Cambridge, UK) fotografiert.

#### 3.2.1.4 Aufreinigung von Nukleinsäuren

# 3.2.1.4.1 Ethanolfällung

Zur Aufreinigung und ggf. Ankonzentrierung wurde die DNA mit 2,5 Vol. 100 % EtOH sowie 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,4) versetzt und 1 h bei -20 °C ausgefällt. Nach der Pelletierung für 30 min bei 14000 x g wurden Salz- und wasserlösliche Substanzen mit 70 % EtOH ausgewaschen. Die luftgetrocknete DNA wurde in Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O gelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Fällung von DNA-Sonden wurde die gewünschte Menge der aufzureinigenden Sonde zusammen mit je 1 µl humaner Plazenta-DNA, die mit repetitiven Sequenzen einer Länge von 50-100bp angereichert ist (Cot 1-DNA) sowie reiner humaner Plazenta-DNA vermischt und gemeinsam gefällt. Hierbei dienten die Cot 1- und die Plazenta-DNA im späteren FISH-Ansatz zur Blockierung repetitiver DNA-Abschnitte, die besonders an den Zentromeren und Telomeren auftreten. Der Waschschritt in 70 % EtOH entfiel. Die pelletierte DNA wurde nach dem Trocknen bei Dunkelheit für 4 h bei 300 rpm und 37 °C im Thermocycler in 9,25 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert und direkt weiterverarbeitet.

### 3.2.1.4.2 DNA-Extraktion aus dem PCR-Ansatz

Um überschüssige Oligonukleotide, Oligonukleotiddimere oder nichtpolymerisierte dNTPs aus dem PCR-Ansatz zu entfernen, wurden die PCR-Produkte aufgereinigt. Zunächst wurden 2µl des PCR-Ansatzes in einem Agarosegel (siehe Kapitel 3.2.1.3.2) aufgetrennt. War bei der Detektion unter UV-Licht (250nm) nur ein spezifischen Produkt zu erkennen, wurde dieses mit dem *PCRExtract Kit* (5Prime) nach dem Hersteller-Protokoll direkt aus dem PCR-Ansatz isoliert. Als einzige Abweichung wurden beide Elutionsschritte mit 50µl auf 56 °C vorgewärmtem dH<sub>2</sub>O durchgeführt. Die isolierte DNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 3.2.1.4.3 DNA-Extraktion aus dem Agarosegel

Waren nach der Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.2.1.3.2) neben dem spezifischen PCR-Produkt bzw. nach einem Restriktionsverdau noch weitere Banden in dem Agarosegel vorhanden, wurde der Rest der PCR-Ansatzes in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte Produkt unter UV-Licht (250nm) aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung von PCR-amplifizierter Patienten-DNA geschah mit dem *Agarose GelExtract Kit* (5Prime) nach den Angaben des Herstellers mit der Abweichung, dass beide Elutionsschritte mit 30µl auf 56 °C vorgewärmtem dH<sub>2</sub>O durchgeführt wurden. Die Isolierung von PCR-amplifizierter DNA aus Zelllinien oder Plasmiden sowie von Restriktionsenzym-verdauter Plasmid-DNA geschah mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* Kit (Macherey-Nagel) nach den Herstellerangaben unter Verwendung des optimierten Protokolls für die Aufreinigung hochmolekularer DNA. Die DNA-Konzentration wurde mit dem *NanoDrop* (siehe Kapitel 3.2.1.3.1) bestimmt und die isolierte DNA bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.1.5 Erststrang cDNA-Synthese

Zur Analyse der mRNA-Expression mittels PCR und qPCR sowie für die Mutationsanalyse wurde Gesamt-RNA mit dem *cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, St. Leon-Rot) unter Verwendung von *Random Hexamer*-Oligonukleotiden nach Anleitung des Herstellers in komplementäre DNA (cDNA) konvertiert. Bei der gleichzeitigen Umschreibung mehrerer RNA-Proben durch eine reverse Transkriptase wurde je ein Mastermix der Oligonukleotide in dH2O sowie ein Mastermix der restlichen Komponenten des Ansatzes angesetzt (Enzymmix). Der Oligonukleotid-Mix wurde mit den RNA-Proben vermischt und direkt vor der Konvertierung wurde der Enzym-Mix zugesetzt. Es wurden 500 ng Gesamt-RNA in einem 10 µl-Ansatz konvertiert. Dies entspricht einem halben Ansatz aus dem Herstellerprotokoll. Die cDNA-Synthese ergab somit Konzentrationen von 10 - 50 ng/µl. Für die weiteren Analysen wurde die cDNA 1:2 bis 1:10 in dH<sub>2</sub>O zu Gebrauchslösungen verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.2.1.6 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifizierung spezifischer Nukleinsäure-Fragmente, welche in zu geringen Mengen für weiterführende Analysen vorliegen. Der DNA-Doppelstrang der zu untersuchenden Probe (*Template*) wird hierfür durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert. An die entstandenen Einzelstränge können sich nun für den 5'- und 3'-Bereich der Zielsequenz spezifische kurze Nukleotidesequenzen (Oligonukleotide) anlagern (*Annealing*). Eine Polymerase ist in der Lage an die gebundenen Oligonukleotide anzudocken und die fehlende Sequenz des Gegenstranges aus den dem Ansatz beigefügtem dNTPs zu synthetisieren. Die *Annealing*-Temperatur ist von dem Gehalt an Guanin-Cytosin-Paaren in den Oligonukleotiden abhängig, da diese im Ansatz doppelsträngig vorliegen und zum *Annealing* zunächst denaturiert werden müssen. Die Denaturierung von Guanin-Cytosin-Paare benötigt aufgrund der vorliegenden 3-fachen Wasserstoffbrückenbindung im Vergleich zu jener von Adenin-Thymin-Paaren mit einer 2-fachen Wasserstoffbrückenbindung mehr Energie. Hieraus ergibt sich eine für jede Oligobnukleotidsequenz spezifische Schmelztemperatur. Die Länge des zu amplifizierenden Sequenzabschnittes bestimmt die zur Strangverlängerung (Elongation) benötigte Zeit, da die Polymerase nur eine bestimmte Anzahl an pro Zeiteinheit ablesen kann. Diese Lesegeschwindigkeit variiert je nach Art der verwendeten Polymerase<sup>183</sup>.

#### 3.2.1.6.1 Design von Oligonukleotiden für die PTEN-Mutationsanalyse

Für das Design von Oligonukleotiden zur Amplifikation der PTEN cDNA und für die Sequenzierung musste die Sequenzhomologie zu dem Pseudogen *PTENP1* in die Überlegungen miteinbezogen werden. Die *PTENP1*-Sequenz weist eine Homologie von 93 % zu der PTEN-mRNA auf <sup>164</sup>. Daher wurden die Oligonukleotidsequenzen für die Amplifikation der PTEN-mRNA in Bereiche gelegt, die keine 100 %-ige Homologie zu der PTENP1-Sequenz aufwiesen (siehe Abb. 3.1). Da die Intronsequenzen der *PTEN*-Gensequenz in jener von *PTENP1* nicht enthalten sind, wurden die Oligonukleotide zur Amplifikation von *PTEN* aus DNA-Proben in Intronbereichen von *PTEN* gelegt.



Abb. 3.1: Alignment der PTEN- und der PTENP1-mRNA Sequenzen. Dargestellt ist der Abgleich der PTEN mRNA-Sequenz (Query, NM\_000314.4) gegen die PTENP1 mRNA-Sequenz (Sbjct, NR\_023917.1) über das Alignment-Werkzeug der NCBI-Datenbank. In beiden Sequenzen identische Basen sind in der Sbjct-Zeile als Punkte und sich unterscheidende Basen in Form des Symbols für die jeweilige Base illustriert. Die Zahlen am linken Rand geben die Position der ersten Base und jene auf der rechten Seite die Position der letzten Base in der jeweiligen Zeile an. Die Oligonukleotide zur Amplifikation der PTEN-cDNA (PTEN CDS\_F1 und PTEN CDS\_R2) sind als rote Pfeile eingepflegt. A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin.

# 3.2.1.6.2 Amplifikation von Patienten-DNA für Mutationsanalysen

Zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente für Mutationsanalysen wurden die Amplifikationen unter Verwendung der *AmpliTaq Gold DNA-Polymerase* (Applied Biosystems) durchgeführt. Es wurden PCR-Ansätze unter Verwendung eines einzelnen Oligonukleotidpaares (einfache PCR) sowie Ansätze, die mehrere Oligonukleotidpaare enthielten (Multiplex-PCR) eingesetzt. Zur Etablierung von PCR-Protokollen wurde zunächst die optimale *Annealing*-Temperatur für selbst-entworfene Oligonukleotidpaare über eine Gradienten-PCR mit verschiedenen *Annealing*-Temperaturen im Abstand von je 2 °C ermittelt. Anschließend wurde der PCR-Ansatz ggf. unter Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration oder der eingesetzten Menge an Polymerase bzw. dNTPs optimiert.

Zur Amplifikation der EGFRvIII-Variante und der TK-Domäne sowie der PTEN CDS wurde eine einfache PCR-Reaktion an cDNA durchgeführt. Für die EGFR-Analyse wurden 30ng und für das PTEN-Screening 60ng *Template* eingesetzt. Die *Hotspot*-Regionen für Mutationen um Exon 9 und Exon 20 des PIK3CA-Gens sowie die Exone 3 und 5 des PTEN-Gens wurden unter Verwendung von jeweils zwei Oligonuk-leotidpaaren mittels Multiplex-PCR amplifiziert. Hierbei wurden zwei spezifische PCR-Produkte generiert. Zur Vervielfältigung wurden 10 ng genomisches DNA-*Template* bzw. 30ng cDNA-*Template* eingesetzt.

# Einzel-Ansatz:

Vol	umen	Reagenz	Konzentration
2 2,4	μl μl	PCR-Puffer MgCl2	(10x) (3,5 mM)
3	μl	dNTP	(8 mM, Roche Diagnostics)
1	μl	Forward-Primer	(100 pmol/μl)
1	μl	Reverse-Primer	(100 pmol/μl)
0,5	μl	DNA-Polymerase	(5 U/μl)
2	μl	DNA (10 ng/μl)	(2 μl cDNA 1:10*)
		dH₂O auf 20 μl	

\* für die Mutationsanalyse an PTEN wurde die cDNA unverdünnt eingesetzt

# Multiplex-Ansatz:

Volumen		Reagenz	Konzentration
2	μl	PCR-Puffer	(10x)
2	μl	MgCl2	(3,5 mM)
2	μl	dNTP	(8 mM)
1	μl	Forward-Primer	(100 pmol/µl)
1	μl	Reverse-Primer	(100 pmol/µl)
0,25	μl	DNA-Polymerase	(5 U/μl)
2	μl	DNA (10 ng/μl)	(2 μl cDNA 1:10)
		$dH_2O$ auf 20 $\mu$ l	

PCR-Protokoll:

Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1x	Initiale Denaturierung	95	10:00
35-40x	Denaturierung	95	0:30
	Annealing	Variation A	0:30
	Extension	72	Variation B
1x	Finale Amplifikation	72	7:00
	Kühlung	8	~

Variation A: Annealing-Temperatur lag zwischen 54 °C und 64 °C und wurde abhängig vom AT-Gehalt der jeweiligen Oligonukleotide variiert (siehe Kapitel 0).

Variation B: Die Extensionszeit lag zwischen 0:30 min und 1:30 min und wurde je nach erwarteter Länge des PCR-Produktes variiert (siehe Kapitel 0).

### 3.2.1.6.3 Amplifikation von Plasmid-DNA

Für die Klonierung von cDNA-Fragmenten oder shRNAs in Vektoren wurde die *Pfu DNA Polymerase* (Fermentas) verwendet. An die PTEN-CDS wurden mittels *Add-on*-PCR am 5'-Ende eine *EcoR*I-Restriktionsschnittstelle und eine Kozak-Sequenz (CCACC) sowie eine *Not*I-Schnittstelle am 3'-Ende angehängt. Die Schnittstellen dienten zur Ligation in den Zielvektor und die Kozak-Sequenz als Erkennungsmerkmal für Ribosomen zum Start der Translation. Die Etablierung von PCR-Protokollen fand ebenfalls zunächst durch die Bestimmmung der optimalen Annealingtemperatur der selbstentworfenen Oligonukleotidpaare über eine Gradienten-PCR (siehe Abschnitt 3.2.1.6.1) ermittelt. Anschließend wurde der PCR-Ansatz ggf. durch Zusetzen von 5-10% DMSO optimiert. DMSO unterstützt die Auflösung von Sekundärstrukturen, wie z.B. die Haarnadel- (*hairpin-*) Strukturen von shR-NAs.

#### Ansatz:

Volumen		Reagenz	Konzentration
5	μΙ	PCR-Puffer (incl. MgCL₂)	(10x)
10	μl	dNTP	(8 mM)
х	μl	DMSO	(100%)
2,5	μl	Forward-Primer	(100 pmol/µl)
2,5	μl	Reverse-Primer	(100 pmol/µl)
0,5	μl	DNA-Polymerase	(5 U/μl)
у	μl	DNA	(Endkonzentration: 100ng/μl)
		$dH_2O$ auf 20 $\mu$ l	

#### PCR-Protokoll:

Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1x	Initiale Denaturierung	95	3:00
35-40x	Denaturierung	95	1:00
	Annealing	Variation A	1:00
	Extension	72	Variation B
1x	Finale Amplifikation	72	5:00
	Kühlung	8	∞

Variation A: Annealing-Temperatur lag zwischen 53 °C und 57 °C und wurde abhängig vom AT-Gehalt der jeweiligen Oligonukleotide variiert (siehe Kapitel 0).

Variation B: Die Extensionszeit lag zwischen 0:50 min und 1:30 min und wurde je nach erwarteter Länge des PCR-Produktes variiert (siehe Kapitel 0).

### 3.2.1.7 Quantitative Realtime-PCR

Eine quantitative *Realtime*-PCR (qPCR)-Analyse ermöglicht im Gegensatz zur klassischen PCR den direkten quantitativen Nachweis der Anzahl von DNA-Kopien oder von cDNA in Echtzeit (*realtime*). Dies wird durch den Einsatz DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoffmarkierter Sonden ermöglicht, die mit hoher Spezifität in die kleine Furche doppelsträngiger DNA interkalieren <sup>184</sup>. Bei der hier genutzten Variante der Methode wurde das Ausgangsprodukt über *Template*-spezifische Oligonukleotide amplifiziert. Während jedes Zyklus' lagerte sich der nicht-gekoppelte Farbstoff *SYBR-Green* an die entstandenen Produkte an <sup>184</sup>. Die Quantifizierung erfolgte direkt über die Bestimmung der Signalstärke der *SYBR-Green*-Emission am Ende jedes Zyklus', die proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produkts ist.

Der Verlauf einer PCR ist in eine frühe, eine exponentielle (Log-Phase) und eine Plateau-Phase unterteilt. In der frühen Phase werden die Signale des PCR-Produkts von der Intensität der Hintergrundsignale (Threshold) überstrahlt. Ein spezifisches Signal wird ab einem bestimmten Schwellenwert während der linearen Log-Phase detektiert, welche eine optimale Amplifikationsrate aufweist. Dieser Schwellenwert stellt jenen Zyklus dar, in welchem die Signalintensität des PCR-Produkts signifikant über jene des Hintergrundsignals ansteigt und wird als Ct-Wert (Threshold Cycle) bezeichnet. Der Vergleich der Ct-Werte der untersuchten Proben während der Log-Phase ermöglicht den quantitativen Rückschluss auf die Ausgangsmenge an Ziel-DNA. Je geringer die Ausgangsmenge, desto später wird der Schwellenwert erreicht, was einen späten Ct-Wert zur Folge hat (siehe Abb. 3.2 A). Anschließend wurde zur indirekten Bestimmung der Spezifität der gebildeten Produkte eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Jedes PCR-Produkt besitzt aufgrund unterschiedlicher Fragmentlängen und Nukleotidzusammensetzung eine spezifische Schmelztemperatur. Durch die kontinuierliche Steigerung der Temperatur von 60 °C auf 90 °C, werden die doppelsträngigen PCR-Produkte bei Erreichen dieser Schmelztemperatur denaturiert und die hierdurch ausgelöste Freisetzung des SYBR-Green-Farbstoffes wurde als Fluoreszenzabnahme erfasst. Unspezifische Oligonukleotiddimere können von spezifischen PCR-Produkten unterschieden werden, da sie im Allgemeinen einen niedrigeren Schmelzpunkt besitzen (siehe Abb. 3.2 B).



**Abb. 3.2: Darstellung der Amplifikationsmenge und der Schmelzkurven einer qPCR.** Die Amplifikationskurven (A) geben die Menge an PCR-Produkt nach jedem Zyklus an und werden aus der logarithmierten Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensität (FI) gegen die Zykluszahl erstellt. Der Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert in der exponentiellen Phase (graue Box) stellt den Ct-Wert dar. Die Schmelzkurvenanalyse (B) dient der Überprüfung der Spezifizität des gebildeten PCR-Produktes anhand dessen Schmelztemperatur und Größe. Der Quotient aus der FI und der Zeit wurde gegen die Temperatur dargestellt. Der Schwellenwert entspricht jenem aus der Darstellung der Amplifikationskurven.

Die qPCR-Analysen wurden im *Mastercycler S Realplex* (Eppendorf) unter Verwendung des *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Fermentas) unter den unten aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Im Zuge dieser Studie wurde die EGFR-Kopienanzahl anhand genomischer DNA bestimmt. Die Expression von PTEN-Transkripten wurde an cDNA-Proben von Mammakarzinom-Zelllinien ermittelt, in denen PTEN überexprimiert bzw. die Expression über shRNA-Knockdown herabreguliert wurde. Alle Proben wurden in Triplikaten analysiert.

Ansatz unter Verwendung des Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix

Volumen		Reagenz	Konzentration	
7,5 0,4	μl μl	Mastermix <i>Forward</i> -Primer	(2x) (100 pmol/µl)	
0,4	μl	Reverse-Primer	(100 pmol/µl)	
2	μl	DNA add dH2O 15 μl	(10 ng/µl)	

### PCR-Protokoll:

Zyklen	Schritt	Temperatur [ °C]	Zeit [min]
1x	Initiale Denaturierung	95	15:00
35-40x	Denaturierung	95	0:15
	Annealing	Variation A	0:30
	Extension	68	0:30
1x	Denaturierung	95	0:15
1x	Schmelzkurvenanalyse	60	0:15
	(Gradient)		20:00
		95	0:15

Variation A: Annealing-Temperatur lag zwischen 58 °C und 64 °C und wurde abhängig vom AT-Gehalt der jeweiligen Oligonukleotide variiert (siehe Kapitel 0).

## 3.2.1.7.1 Auswertung der Messdaten

Eine relative Quantifizierung <sup>185</sup> setzt identische Reaktionseffizienz der zu vergleichenden Analysen voraus. Daher wurde im Vorfeld die Effizienz jedes verwendeten Oligonukleotidpaares mit Hilfe einer Standardreihe ermittelt. Aus den C<sub>t</sub>-Werten der Standardreihe kann eine Eichgerade gebildet werden, welche durch folgende Geradengleichung definiert wird:

$$y = m \cdot x + c$$

Die Standardgerade gibt den linearen Zusammenhangzwischen den Ct-Werten und dem Logarithmus der Konzentration des Standards wieder (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3: Standardgerade zur Berechnung der Effizienz.** Hierbei wurden die Log2-Werte der eingesetzten Template-Menge gegen die gemessenen Mittelwerte des  $C_T$  aus der Dreifachbestimmung aufgetragen. Der R2-Wert gibt die Abweichung der Messpunkte von der Geradengleichung an und ist somit ein direktes Maß für die Qualität der Standardgeraden. Ein Wert von 1 entspricht 100%-iger Übereinstimmung der Werte mit der Gleichung. Je geringer die Abweichung hiervon, desto genauer ist die Angabe der DNA-Konzentration der gemessenen Proben.

Die Steigung (m) gibt die prozentuale Reaktionseffizienz der PCR wieder und wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$Effizienz(E) = 10^{\frac{-1}{m}} \cdot 100$$

In den durchgeführten Analysen wurden nur Oligonukleotidpaare mit einer Effizienz von >95% verwendet.

Die Resultate der qPCR-Analyse können durch Störfaktoren beeinflusst werden, welche durch Verschiebung der Zyklen zu einer Fehlinterpretation der ermittelten Kopienanzahl- bzw. Expressionsprofile führen können. Zur Korrektur dieser Faktoren müssen die Ct-Werte normalisiert werden. Zur Kalkulation von Unterschieden in der Kopienanzahl bzw. der Expression wurde hier auf die sogenannte ΔΔCt-Methode zurückgegriffen.

Bei Untersuchungen auf DNA-Ebene wird die Kopienanzahl des Zielgens auf jene eines chromosomalen Referenzabschnittes (*Housekeeper*) normalisiert, die unter den experimentellen Bedingungen nicht variieren sollte. In dieser Studie diente die chromosomale Region 2q31.1 als Referenzabschnitt für die Analyse der Kopienanzahl.

Bei der Analyse der mRNA-Expression wird die Expression des Zielgens in Abhängigkeit von der Expression eines Referenzgens angegeben, das konstitutiv exprimiert wird und dessen Expression unter den experimentellen Bedingungen nicht variieren sollte. Die Expression von *Housekeeper*-Genen ist im Allgemeinen zur Erhaltung der Zellfunktion lebensnotwendig <sup>186</sup>. In dieser Studie diente die große Untereinheit des ribosomalen Proteins (*ribosomal protein, large, PO;* RPLPO) als Referenzgen für die Expressionsanalyse.

In dem ersten Normalisierungsschritt wurde ein einfach normalisierter Ct-Wert für die analysierte Probe (*Target*) und den verwendeten *Housekeeper* erstellt:

$$\Delta C_t = (Mittelwert C_{t Target}) - (Mittelwert C_{t Housekeeper})$$

Es folgt ein Normalisierungsschritt, der den  $\Delta C_t$ -Wert des Targets auf jenen der Referenzprobe mit bekannter Kopienanzahl bzw. Expressionshöhe bezieht:

$$\Delta\Delta C_t = (\Delta C_{t \, Target}) - (\Delta C_{t \, Referenz})$$

Das Verhältnis der Kopienanzahl bzw. der Expression (*fold change*) wurde durch Einsetzen in folgende Formel errechnet, die sich auf die Verdoppelung des *Templates* in jedem Zyklus stützt:

Ratio = 
$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Bei der Analyse der Kopienanzahl des *EGFR*-Gens diente Leukozyten-DNA eines gesunden Probanden als Referenzprobe für eine normale Kopienanzahl verwendet. Subklone der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-468 dienten als Referenz für *high-level* (Kopienanzahl ca. 40) oder moderate *EGFR*-Amplifikation (Kopienanzahl = 5). In die Expressionsanalysen wurde cDNA einer *Universal Human Reference mRNA* (UHR) als Referenz für unveränderte mRNA-Expression einbezogen <sup>187</sup>. Eine EGFR-Kopienanzahl von 1,7-2,0 wurden als normal, 2,1-5,0 als Zugewinn und  $\geq$ 5 als Amplifikation definiert.

# 3.2.1.8 Mikrosatellitenanalyse

Für jedes Gen liegen beim Menschen zwei Allele vor. Je eines stammt von einem Elternteil, weshalb man in diesem Zusammenhang von Mischerbigkeit (Heterozygotie) spricht. Heterozygotie wird als Verlust eines Allels definiert (allelische Imbalanz, AI) bezeichnet. Die AI kann durch die Analyse von sogenannten Mikrosatelliten (*short tandem repeats*) nachgewiesen werden. Mikrosatelliten sind in nicht-kodierenden Abschnitten repetitiver DNA lokalisiert und stellen Wiederholungen von 2-4 Nukleotiden dar. Sie können als informative Marker für den Verlust eines Chromosomenabschnittes in Krebspatienten genutzt werden.

Für die hier durchgeführten Analysen wurde für die DNA-Proben nur Tumorgewebe verwendet, dass anteilig  $\geq$  70 % Tumorzellen aufwies. Die Isolation der DNA erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1.1.1 beschrieben. DNA aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes oder nicht-malignes Brustgewebe der jeweiligen Patientin diente als Referenz. Die chromosomale Region 10q23 wurde durch die Analyse der Mikrosatelliten D10S541 und D10S1765 auf das Vorhandensein von Als analysiert (siehe Abschnitt 9.2 im Anhang) <sup>188</sup>. Für die Amplifikation der DNA-Abschnitte wurden 5'-Oligonukleotide eingesetzt, die an ihrem 5'-Ende mit 6-Carboxyflourescein- (FAM) oder HEX-markiert (hexachloriertes FAM) waren. Die 3'-Oligonukleotide waren nicht Fluoreszenz-markiert.

Ansatz:

Volumen		Reagenz	Konzentration
1 1	μl μl	PCR-Puffer MgCl2	(10x) (3,5 mM)
1	μl	dNTP	(8 mM, Roche Diagnostics)
0,5	μΙ	Forward-Primer	(100 pmol/µl)
0,5	μl	Reverse-Primer	(100 pmol/µl)
0,1	μΙ	DNA-Polymerase	(5 U/μl)
2	μΙ	DNA (5 ng/µl)	
		dH <sub>2</sub> O auf 10 μl	

## PCR-Protokoll:

Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1x	Initiale Denaturierung	95	10:00
35-40x	Denaturierung	95	0:30
	Annealing	Variation A	0:30
	Extension	72	0:30
1x	Finale Amplifikation	72	7:00
	Kühlung	8	∞

Variation A: Annealing-Temperatur lag zwischen 54 °C und 64 °C und wurde abhängig vom AT-Gehalt der jeweiligen Oligonukleotide variiert (siehe Abschnitt 9.2).

Die entstandenen PCR-Produkte wurden 1:20 in HPLC-aufgereinigtem H<sub>2</sub>O verdünnt, ein Ansatz mit einem internen Standard (*GenescanRox*) in ultrareinem HiDi-Formamid hergestellt und nach einer Denaturierung für 2 min bei 94 °C sofort für 10 min auf Eis abgekühlt.

Ansatz:

Vol	umen	Reagenz
1	μl	verdünntes PCR-Produkt
0,1	μl	GenescanRox
20	μΙ	HiDi-Formamid

Die Proben wurden in eine 96-well Platte überführt und über ein Kapillarelektrophorese-System mit einem *Genetic Analyzer 3130* aufgetrennt. Die Länge und die Fluoreszenzintensität der PCR-Produkte wurden anschließend über die *GeneScan Software* (Applied Biosystems) in einem Ektropherogramm dargestellt, welches die Größe bzw. Menge der Fragmente jedes Datenpunktes widergibt. Die Analyse der Messung erfolgte anschließend anhand der grafischen Präsentation der Profile und der Ermittlung des maximalen Fluoreszenzintensität (*Peak*) jeder Probe mit der *GeneMapper Software* (Applied Biosystems) (siehe Abb. 3.4). Es wurde ein Verhältnis (*Ratio*) der Fläche unter dem höchsten Peak von Tumor- zu Normal-DNA gebildet.



Abb. 3.4: Elektropherogramm eines Mikrosatellitenmarkers. Dargestellt sind Signale eines amplifizierten Mikrosatelliten von Proben, in der dieser Marker heterozygot (links) oder ein Verlust der Heterozygotie (AI, Mitte) vorliegt. Rechts ist eine Probe mit nicht informativen Signalen illustriert. Die Signale im oberen Bereich stammen aus Kontroll-DNA, jene im unteren Bereich von Tumor-DNA.

$$Ratio = \frac{(Fläche Allel 1)_{Tumor} / (Fläche Allel 2)_{Tumor}}{(Fläche Allel 1)_{Normal} / (Fläche Allel 2)_{Normal}}$$

Werte  $\geq 2$  oder  $\leq 5$  wurden als AI und Werte < 2 als unverändert definiert.

Die Mikrosatellitenanalyse an DNA-Proben der meisten Fälle aus der verwendeten Kohorte wurde bereits vor Beginn dieser Studie durchgeführt <sup>189</sup>. Im Zuge dieser Studie wurde der AI-Status für noch fehlende Fälle soweit als möglich komplettiert und durch Jolanthe Kropidlowski umgesetzt.

## 3.2.1.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

#### 3.2.1.9.1 *Restriktionsverdau*

Die aus dem PCR-Ansatz aufgereinigten (siehe Abschnitt 3.2.1.4.2) amplifizierten CDS- bzw. shRNA-Sequenzen wie auch die entsprechenden Vektoren wurden als Vorbereitung auf eine anschließende Ligation (siehe Abschnitt 3.2.1.9.2) einem Verdau durch Restriktionsendonukleasen unterzogen, die spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und diese schneiden. Die CDS-Sequenz und die Überexpressions-Vektoren wurden mit den Enzymen *EcoR*I und *Not*I, der Knockdownvektor dagegen mit *Xba*I und *Xho*I verdaut. Die shRNA-Sequenzen wurden mit *Xba*I und *Sal*I geschnitten. Optimal wäre ein Verdau mit *Xho*I statt *Sal*I gewesen, dies was jedoch durch das Vorhandensein einer *Xho*I-Schnittstelle im Loop der shRNAs nicht möglich. Daher wurde als Ersatz *Sal*I gewählt, welches einen homologen Überhang produziert (AGCT). Die Verwendung zwei verschiedener Restriktionsendonukleasen gewährleistet im Anschluss eine gerichtete Klonierung. Zur Überprüfung eines Plasmides auf den Einbau eines Inserts wurden die *Knockdown*-Konstrukte mit *EcoR*I und die Überexpressions-Konstrukte mit *Nhe*I verdaut, da in beiden Fällen durch den Einbau der jeweiligen *Inserts* eine zusätzliche Restriktionsschnitte entstehen sollte. Die DNA wurde mit jeweils 20 U Enzym (New England BioLabs) in einem 20 µl bzw. 40 µl Restriktionsansatz mit dem entsprechenden Restriktionspuffer in 1-facher Konzentration und 10µg BSA für 2-14 h bei 37 °C einem Verdau unterzogen. Für den Verdau wurden max. 2 µg DNA eingesetzt und eine Konzentration von 5% Glycerol im Ansatz wurde nicht überschritten. Zur weiteren Verwendung wurden die Fragmente in einem 0,8-2%-igen Agarosegel aufgetrennt, die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA extrahiert (siehe Abschnitt 3.2.1.4.3).

# 3.2.1.9.2 Ligation

Zur Unterbindung der Religation der Plasmide wurde 1 µg restriktionsverdaute Plasmid-DNA mit 2,5 U antarktischer Phosphatase (Fermentas) in einem 10 µl Ansatz mit 1fach-konzentriertem Puffer für 15 min bei 37 °C dephosphoryliert und anschließend das Enzym für 5 min bei 65 °C deaktiviert. Restriktionsverdaute (siehe Abschnitt 3.2.1.9.1) CDS- bzw. shRNA-Sequenzen wurden in einem mole-kularen Verhältnis von 5:1 (Insert : Vektor) in die entsprechenden Vektoren kloniert. Um ein Konstrukt mit dosis-abhängiger PTEN-Überexpression zu erhalten, wurde die *PTEN* CDS aus dem LeGO-iG2- in das pZspuro++tTRKRAB-System kloniert. Zur Nutzung einer GFP-Markierung wurden shRNAs (NTC, shPTEN1, shPTEN2) aus dem pLKO-TRC005- in das LeGO-G/Puro+-System eingebracht. Die gerichtete Ligation wurde in 10 µl Reaktionsansätzen mit 2.000 U T4-DNA-Ligase und 1x Ligationspuffer (New England Biolabs) 1 h bei RT oder alternativ für 16 h bei 16 °C durchgeführt. Die entstandenen Plasmide wurden zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

### 3.2.1.9.3 Transformation

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde ein Aliquot chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen des Stammes DH5α (siehe Abschnitt 3.2.4.5) auf Eis aufgetaut, 1 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA hinzugefügt und der Ansatz durch vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze gemischt. Die Aufnahme der DNA in die *E. coli*-Zellen erfolgte für 30 min auf Eis und anschließenden Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C. Die Zellen wurden sofort für 5min auf Eis gekühlt und danach für 1 h bei 37 °C und 200 rpm in 200 µl LB-Medium inkubiert, um die Expression der Antibiotikaresistenzgene zu gewährleisten. Der vollständige Transformationsansatz wurde auf LB-Platten mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin ausplattiert und maximal 16 h bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden Einzelklone gepickt und für eine Vorkultur im analytischen Maßstab in 5ml LB-Amp-Medium für ebenfalls max. 16 h bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. 300 µl dieser Kultur wurden zum Herstellen von Glycerolstocks mit 700 µl Glycerol vermischt und bei -80 °C gelagert. Der Rest der Kultur wurde für eine Übernachtkultur im präparativen Maßstab in 100 ml LB-Amp-Medium oder direkt für die Isolation der Plasmid-

DNA (siehe Abschnitt 3.2.1.1.4) verwendet. Nachfolgend wurden die Plasmide zunächst per Restiktionsverdau (siehe Abschnitt 3.2.1.9.1) auf den Einbau des *Inserts* überprüft und anschließend die Inserts per Sequenzierung (siehe Abschnitt 3.2.1.13) auf Mutationen überprüft.

# 3.2.1.10 Herstellung von GFP-codierenden Knockdown-Konstrukten

Zur Herstellung von Plasmiden für die gleichzeitige Expression PTEN-spezifischer shRNAs und dem GFP-Protein als Fluoreszenzmarker wurden die shRNAs aus dem ursprünglichen pLKO-TRC005-Plasmid in das LeGO-G/Puro+-Plasmid umkloniert (zur Verfügung gestellt von Prof. Boris Fehse, Klinik für Stammzelltransplantation, UKE). Hierfür wurden die shRNA-Sequenzen zunächst über eine *Addon*-PCR amplifiziert, in der im 5'-Bereich eine *Xba*l- und im 3'-Bereich eine *Sal*I-Restriktionschnittstelle angefügt wurden (Abb. 3.5 A). Die PCR-Produkte wurden anschließend einem Doppelrestriktionsverdau mit diesen beiden Enzymen unterzogen, bevor sie in den *Xba*l- und *Xho*I-verdauten LeGO-*G*/puro+-Vektor kloniert wurden (Abb. 3.5 B). Da die Haarnadelstruktur der shRNAs eine *Xho*I-Schnittstelle enthält, war ein Verdau der shRNAs mit diesem Enzym nicht möglich. Allerdings produzieren *Xho*I und *Sal*I einen homologen Überhang, so dass eine gerichtete Klonierung möglich war. Die transformierten Konstrukte LeGO-G/Puro+\_shNTC, Plasmide LeGO-G/Puro+\_shPTEN1 und Plasmide LeGO-G/Puro+\_shPTEN2 wurden einem Testverdau mit *EcoR*I unterzogen, durch den nach erfolgreichem Einbau des Inserts zwei Fragmente der Größen von 6200 bp und 1900 bp entstehen sollten. Wie in Abb. 3.5 C dargestellt, konnten alle shRNAs erfolgreich in das LeGO-G/Puro+-Plasmid eingebracht werden.



Abb. 3.5: Produkte der Add-on-PCR und des Testverdaus der Knockdown-Konstrukte im LeGO-G/Puro\*-System. Dargestellt sind die PCR-Produkte der Add-on-PCR auf die pLKO-TRC005-Konstrukte (A), das Produkt der Linearisierung des LeGO-G/Puro-Plasmids (B) und die entsprechenden Produkte des Testverdaus der LeGO-G/Puro+-Konstrukte (C) in einem 0,75 %igen Agarosegel. Zur Bestimmung der Sequenzlänge wurde ein DNA-Standard verwendet.

# 3.2.1.11 Herstellung von GFP-kodierenden Überexpressions-Konstrukten

Um die Selektion erfolgreich transduzierter Zellklone über Durchflusszytometrie zu ermöglichen, wurde die PTEN-cDNA aus einem pCDNA3.1-System (zur Verfügung gestellt von Dr. Alexander Schulte, Institut für Neurochirurgie, UKE) in das für das GFP-Protein kodierende LeGO-iG2-Plasmid umkloniert (zur Verfügung gestellt von Prof. Boris Fehse, Klinik für Stammzelltransplantation, UKE). Hierfür wurde die cDNA-Sequenz über eine *Add-on-*PCR amplifiziert, in der im 5'-Bereich eine *EcoR*I-Schnittstelle und eine Kozak-Sequenz sowie im 3'-Bereich eine *Not*I-Schnittstelle angefügt wurden (Abb. 3.6 A). Die PCR-Produkte wurden anschließend einem Restriktionsverdau mit diesen beiden Enzymen unterzogen, bevor sie in den auf die gleiche Art verdauten LeGO-iG2-Vektor kloniert wurden (Abb. 3.6 B). Das transformierte Konstrukt LeGO-iG2/PTEN wurde einem Testverdau mit *Nhe*I unterzogen. Bei erfolgreicher Insertion sollten hierbei zwei Fragmente der Größen von 7459 bp und 1528 bp entstehen. Wie in Abb. 3.6 C dargestellt, war die Klonierung erfolgreich.



Abb. 3.6: Produkte der Add-on-PCR und des Testverdaus des Überexpressions-Konstrukts im LeGO-iG2-System. Dargestellt sind die PCR-Produkte der Add-on-PCR auf das pCDNA3.1-Konstrukte (A), das Produkt der Linearisierung des LeGOiG2-Plasmids (B) und das entsprechende Produkt des Testverdaus des LeGO-iG2-Konstrukts (C) in einem 0,75 %-igen Agarosegel. Zur Bestimmung der Sequenzlänge wurde ein DNA-Standard verwendet.

# 3.2.1.12 Herstellung von ZsGreen-kodierenden, induzierbaren Überexpressions-Konstrukten

Da die konstitutive PTEN-Überexpression das Absterben infizierter Zellen zur Folge hatte, wurde für weitere Analysen ein alternatives Expressionssystem gewählt, in welchem eine dosisabhängige induzierbare Überexpression möglich ist (pZspuro++tTRKRAB, zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Horn, Klinik für Stammzelltransplantation, UKE). In diesen Vektor wurde für eine Überexpression die PTENcDNA eingeführt. Die Expression wird in diesem System dosisabhängig durch Doxycyclin-Gabe eingeleitet (pZspuro++tTRKRAB/PTEN tet-on). Als Negativkontrolle diente der Leervektor (pZspuro++tTRKRAB/leer tet-on). Die PTEN-cDNA wurde durch einen Doppelverdau mit EcoRI und Notl aus der LeGO-iG2-Konstrukt geschnitten und gerichtet in den ebenfalls mit diesen beiden Restriktionsenzymen verdauten pZspuro++tTRKRAB-Vektor kloniert Abb. 3.7 A). Ein Testverdau mit Nhel brachte zwei Fragmente in den gewünschten Größen von 9240 bp und 1523 bp hervor (Abb. 3.7 B).



Abb. 3.7: Produkte der Umklonierung der Überexpressions-Konstrukte in das pZspuro++tTRKRAB-System. Dargestellt sind das Produkt der Linearisierung des LeGO-iG2\_PTEN CDS-Plasmids (A) und das entsprechende Produkt des Testverdaus des pZspuro++tTRKRAB-Konstrukts (B) in einem 0,75 %-igen Agarosegel. Zur Bestimmung der Sequenzlänge wurde ein DNA-Standard verwendet.

# 3.2.1.13 Sequenzierung von DNA-Fragmenten nach Sanger

Durch eine Sequenzierung wird mittels Anlagerung von vier unterschiedlich fluoreszenz-markierten Didesoxy-Analoga die Sequenz von Nukleinsäuren bestimmt und kann grafisch dargestellt werden. Hier wurde die Sequenzierung nach der klassischen Didesoxy-Methode unter Verwendung des *BigDye® Terminator v. 1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* Kits (Applied Biosystem) durchgeführt <sup>190</sup>. Der *BigDye*-Mix enthielt *AmpliTaq*-Polymerase, dNTPs und die vier fluoreszenz-markierten Didesoxy-Analoga. Für den folgenden 20  $\mu$ l-Ansatz wurden 100 ng aufgereinigte DNA bzw. cDNA pro 1000 bp in maximal 13  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O eingesetzt.

Volumen	Reagenz	Konzentration	_
4 μΙ	Sequenzierungspuffer	(5x)	
2 μΙ	BigDye		
1 µl	Oligonukleotide	(100 pmol/µl)	
x μl	DNA bzw. cDNA	(100 ng pro 1000 bp)	
	$dH_2O$ auf 20 $\mu$ l		

#### Anschließend wurde folgende Sequenzierungsreaktion im Thermocycler durchgeführt:

Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1x	Initiale Denaturie-	96	2:00
	rung		
30x	Denaturierung	96	0:30
	Annealing	50	0:15
	Extension	60	Variation A
1x	Kühlung	4	8

Variation A:Die Extensionszeit betrug 2 - 4min und wurde der Läge des zu sequenzierenden DNA-Abschnitts angepasst (siehe Kapitel 0).

Überschüssige Oligonukleotide, Oligonukleotiddimere, nichtpolymerisierte dNTPs und ddNTPs wurden über eine Gelfiltration durch *Sephadex G50 Superfine* (Abgene) mit dem *Multi Screen Assay-System* entfernt. Hierfür wurde portioniertes Sephadex in *Multi Screen HV Platten* für 2 h bei RT in HPLC-H<sub>2</sub>O gequollen. Nach einem Waschschritt mit HPLC-H<sub>2</sub>O konnten die fluoreszenz-markierten Proben aufgetragen mittels Zentrifugation für 5 min bei 910 x g in eine 96-well Platte aufgereinigt werden. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente folgte anschließend über den *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) unter Verwendung des Polymers POP7 und 36 cm-langen Kapillaren (Applied Biosystems). Die Auswertung der Sequenzanalysen erfolgte mit der *Sequence Analysis Software V3.07* (Applied Biosystems) und *FinchTV V1.4*. Über das Online Alignment Tool *NCBI BLAST* wurden die ermittelten Sequenzen mit Referenzsequenzen aus der NCBI-Datenbank bzw. mit den Plasmidsequenzen abgeglichen.

#### 3.2.1.13.1 Mutationsanalyse an Patientenmaterial

Mutationen im *EGFR*-Gen sind bei in anderen Tumorentitäten als dem Mammakarzinom bekannt, wurden bislang im Mammakarzinom selten beschrieben. Hierzu zählen Punktmutationen in der Tyrosinkinasedomäne (TK) (z.B. Bronchialkarzinom) sowie die EGFRvIII-Variante, bei der die Exone 2-7 deletiert sind (Glioblastom). Um zu verifizieren, ob Mutationen auch in BCBM vorkommen, wurden die Exone 17-21 in cDNA-Proben von 17 BCBM-Patientinnen auf Basenpaarsubstitutionen in der TK-Domäne untersucht und Proben von 14 BCBM-Patientinnen auf die Anwesenheit der EGFRvIII-Variante analysiert. Für die Mutationsanalyse der TK-Domäne dienten Mammakarzinomzelllinien mit bekannten Mutationen (BT-549 und T47D) dienten hierbei als Kontrolle. Ein Plasmid mit humanen EGFRvIII-Variante (pCDNA3.1+/EGFRvIII) diente in der EGFRvIII-Analyse als Positivkontrolle (zur Verfügung gestellt von Dr. Alexander Schulte, Institut für Neurochirurgie, UKE)<sup>191</sup>.

Im *PTEN*-Gen sind ebenfalls diverse Mutationen bekannt, die mit Mammakarzinom korrelieren. Um zu überprüfen, ob dies auch in BCBM zutrifft, wurde die vollständige CDS in cDNA-Proben von 11 BCBM-Patientinnen auf Mutationen überprüft. Zusätzlich wurden die Exone 3 und 5 in genomischer DNA von 22 BCBM, drei BCOM und 33 Primärtumorproben untersucht, da dort eine Häufung der Mutationen auftritt. Als Kontrollen wurden hier die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und GI-101 genutzt.

Im PIK3CA-Gen sind zwei *Hotspot*-Regionen bekannt, in denen Mutationen zu finden sind, die mit Mammakarzinom korrelieren. Aus diesem Grund wurde die Exone 6-10 sowie 19-20 auf cDNA-Ebene sowie die Exone 9 und 20 in genomischen DNA-Proben von 26 BCBM, fünf BCOM und 57 Primärtumoren analysiert. Hier dienten die Mammakarzinomzelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und T47D als Kontrollen.

Detektierte Mutationen wurden durch erneute Sequenzierung derselben Probe in Gegenrichtung bestätigt. Bislang unbekannte Mutationen wurden als Einzelnukleotidepolymorphismen (SNPs) durch zusätzliche Sequenzierung von DNA aus Blut der jeweiligen Patientin ausgeschlossen. Ein SNP stellt eine häufig in der Bevölkerung auftretende Sequenzvariante dar, die nicht mit einer Erkrankung assoziiert ist. Alle für die Mutationsanalysen verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang in Kapitel 0 aufgeführt.

55

### 3.2.1.14 Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung

Die Verwendung einer *Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung* (FISH) macht den numerischen und strukturellen Nachweis chromosomaler Regionen möglich. Hierzu wird eine Fluoreszenz-markierte DNA-Sonde mir dem entsprechend vorbehandelte zu analysierende Material hybridisiert. Die Art der Vorbehandlung ist abhängig von der DNA-Sonde sowie dem zu analysierenden Material. Daher ist eine Etablierung der Vorbehandlung für jede Sonde und unterschiedliches Ausgangsmaterial notwendig. Um ein spezifisches Signal zu erhalten, ist eine Minimierung des Verlustes an Nukleinsäuren der zu analysierenden Zellen erforderlich. Nichtsdestotrotz muss die DNA-Sonde in das Gewebe eindringen können ohne Veränderungen in der Gewebemorphologie hervorzurufen.

Zur Verifizierung der IHC-Ergebnisse (siehe Kapitel 3.2.3.4) von Fällen mit heterogenen Proteinlevels wurden FISH-Analysen mit der Sonde RP5-1091E124q21 an FFPE-Schnitten von BCBM-Patientinnen durchgeführt. Der HER2-Status aller Fälle mit einem Immunoscore von 2+ wurden unter Verwendung des *PathVysion HER-2 DNA Probe Kit II* (Abbott Laboratories) verifiziert.

## 3.2.1.14.1 FISH an Paraffingewebe

Alle FISH-Analysen dieser Studie wurden an FFPE-Gewebe durchgeführt. Hierfür wurden die entparaffinierten und rehydrierten FFPE-Schnitte (siehe Kapitel 3.2.2.2) zunächst bei -20 °C für 10 min in 2 % Formaldehyd (in Methanol) fixiert. Nach einem Waschschritt in PBS bei RT folgte eine Denaturierung von Proteinen für 10 min bei 95 °C in *Spot-Light Tissue Heat Pretreatment Puffer* (Invitrogen) und eine anschließende Abkühlung bei RT für 15 min. Das Gewebe von Gehirnmetastasen wurde für 15 min denaturiert und 11 min abgekühlt. Ein weiterer Waschschritt schloss sich vor einem Pepsinverdau bei 37 °C in einer feuchten Kammer an. Gewebe von Primärtumoren wurde 10 min verdaut, wohingegen das Gewebe von Gehirnmetastasen 13 min inkubiert werden musste. Nach einem weiteren Waschschritt wurde das Gewebe in einer aufsteigenden EtOH-Reihe (70 %, 80 %, 90 % und 100 % EtOH) dehydriert.

Für die Hybridisierung mit der *Spektrum Orange*-markierten DNA-Sonde wurde folgender Probenansatz verwendet:

Reagenz	Volumen [µl]
Spektrum Orange-markierte, gefällte DNA-Sonde	9,25
Spektrum Aqua-markierte Zentromersonde	0,75
Gesamtvolumen	10

Für die Hybridisierung mit der kombinierten HER2/Cep17 DNA-Sonde wurden 10µl des direktmarkierten Sondengemisches eingesetzt. Der Probenansatz wurde auf die getrockneten Gewebeschnitte gegeben, bevor das Gewebe mit einem Deckgläschen eingedeckelt und mit Fixogum versiegelt wurde. Nach der Denaturierung für 5 min bei 75 °C (*EGFR*) bzw. für 3 min bei 95 °C (*HER2*) folgte die Hybridisierung für 16 h bei 37 °C. Nach dem Ablösen des Deckgläschens folgte ein Waschschritt in 2x SSC/0,3% NP-40 für je 2 min bei 70 °C sowie in 2x SSC/0,3% NP-40 und PBS bei RT. Nach einer Dehydrierung in einer aufsteigenden EtOH-Reihe wurden die Schnitte mit Vectashield-DAPI eingedeckelt und bis zur Auswertung im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

#### 3.2.1.14.2 Auswertung der FISH-Analysen

Die Auswertung der FISH-Gewebeschnitte bzw. -Metaphasechromosomen erfolgte über ein Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) mit dem Bilddokumentationsprogramm ISIS (Applied Imaging).

Tumorareale wurden anhand HE-gefärbter Gewebeschnitte identifiziert, bevor diese auf den FISH-Gewebeschnitten mit Hilfe des DAPI-Filters lokalisiert wurden. Für die Auswertung der FISH-Analysen wurden anschließend nicht-überlappende Tumorareale mit morphologisch intakten Tumorzellen mit dem DAPI-Filter bestimmt. Nachfolgend wurden die Hybridisierungssignale für jede Sonde mit dem entsprechenden Filter für *Spektrum Orange* (eigene Sonden) und *Spektrum Aqua* bzw. *Spektrum Green* (Zentromersonde) separat bei einer 630- oder 1000-fachen Vergrößerung ausgewertet (siehe Abbildung xx). Im Durchschnitt wurden von jeder Probe die Fluoreszenzsignale von 50 Tumorzellen ausgezählt und das Verhältnis der Signale von der DNA-Sonde zu jenen der Zentromer-Sonde errechnet. Ein Verhältnis von > 5 wurde als *EGFR*-Amplifikation,  $\ge 2,5$  als DNA-Gewinn und  $\le 0,75$  als DNA-Verlust definiert. Bei der Auswertung der *HER2*-Analyse wurde, in Übereinstimmung mit bestehenden Standards, ein Verhältnis von >2,2 als HER2-positiv interpretiert <sup>192</sup>. Des Weiteren wurde aus der Anzahl der Zentromersignale der Grad der Ploidie bestimmt. Zusätzlich zu den Tumorarealen wurden Signale von normalen Zellen außerhalb des Tumorbereiches betrachtet. Diese Negativkontrolle diente zur Definition der Abgrenzung von Veränderungen in der Kopienanzahl zum Normalzustand.



Abb. 3.8: Beurteilung von FISH-Signalen. Auswertbare Zellen enthielten je zwei oder mehr Signale von beiden Sonden in sich nicht überlappenden Nuclei (A). Zellen wurden als nicht auswertbar deklariert, wenn sich ihre Nuclei überlappten (B). Konnten Signale einer Sonde nicht klar voneinander abgegrenzt werden, so wurden sie als ein Signal gewertet (C) und diffuse Signale (D) gingen nicht in die Auswertung mit ein (nach Vysis).

### 3.2.2 Histochemische Methoden

#### 3.2.2.1 Gewebe-Aufarbeitung

#### 3.2.2.1.1 Histologie an kryokonserviertem Gewebe

Eine Variante der Haltbarmachung von frischem Gewebe ist die Kryokonservierung durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff. Dies geschah direkt nach der Operation mit den Patientenproben aus der Klinik für Gynäkologie und der Klinik für Neurochirurgie. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die so behandelten Gewebe bei –80 °C im Institut für Tumorbiologie (ITB) gelagert. Zur Erstellung von Kryoschnitten wurden die Gewebe auf einen Halter mit Gewebeeinbettmedium aufgebracht und bei ca. -20 °C an einem Kryotom (durch Jolanthe Kropidlowksi) 3-10 µm-dicke Gewebeschnitte angefertigt, die auf sterile, positiv geladene Objektträger (Superfrost Plus) gezogen und getrocknet wurden. Die Gewebeschnitte wurden entweder bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet. Für letzteres folgte eine Fixierung in Aceton oder Methanol für etwa 2-10 min. Die Kryoschnitte wurden für IHC-Färbungen sowie zur Isolation von DNA und RNA verwendet.

#### 3.2.2.1.2 Histologie an FFPE-Gewebe

Zur Beurteilung der Gewebearchitekur ist es notwendig die Gewebestrukturen in einem möglichst ursprünglichen Stadium zu erhalten. Hierfür bietet sich die Herstellung von FFPE-Gewebe (*formalinfixed paraffin-embedded*) über eine Formalin-Fixierung zur Quervernetzung von Proteinen mit anschließender Stabilisierung der Gewebestruktur durch Einbettung der dehydrierten Gewebe in Paraffin an. Diese Behandlung erfolgte an Patientenproben aus dem Institut für Pathologie und dem Institut für Neuropathologie. Bis zur weiteren Verwendung wurden die FFPE-Gewebe im ITB bei RT gelagert. Zur Erstellung von FFPE-Schnitten wurden die Gewebe zunächst auf -20 °C gekühlt und bei RT mit einem Mikrotom (durch Jolanthe Kropidlowksi) 2-10 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in einem 45 °C-warmen Wasserbad inkubiert bis sie sich glatt gezogen hatten. Anschließend wurden sie auf positiv geladene Objektträger (*Superfrost Plus*) gezogen und über Nacht bei 56 °C getrocknet. Die FFPE-Schnitte wurden bei RT gelagert und für IHC-Färbungen, FISH-Analysen sowie zur Isolation von DNA und RNA verwendet.

#### 3.2.2.2 Entparaffinierung von FFPE-Gewebeschnitten

Zur Verarbeitung von FFPE-Schnitten muss das Gewebe zunächst entparaffiniert werden. Hierfür wurden die Schnitte über Nacht bei 56 °C im Ofen inkubiert, um das Paraffin zu verflüssigen, bevor es durch drei Waschschritte für je 10 min mit Xylol gelöst wurde. Es schloss sich eine absteigende EtOH-Reihe an, um das Xylol zu entfernen und die Schnitte durch Rehydrierung auf nachfolgende Behand-lungen vorzubereiten.

#### 3.2.2.3 Färbungen von Gewebeschnitten

#### 3.2.2.3.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE-Färbung) handelt es sich um eine kombinierte Kern- und Plasmafärbung. Die Färbung führt zu einer kontrastreichen Darstellung beider Kompartimente. Hämatoxylin färbt Zellkerne in einem blauen Farbton, wohingegen das Plasma der Zellen durch Eosin rötlich angefärbt wird. Entparaffinierte und rehydrierte FFPE-Schnitte sowie Aceton-fixierte Kryoschnitte wurden 1-2 min in filtrierter Mayer's Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Nach kurzem Spülen in 3%iger Salzsäure in EtOH folgte unter fließendem Leitungswasser durch die Erhöhung des pH-Wertes ein Bläuen bis zur erwünschte Farbintensität. Es schlossen sich eine Färbung in Eosin für 10 sec und ein Waschvorgang in H<sub>2</sub>O zur Beseitigung von Farbresten an. Nachfolgend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden EtOH-Reihe (80%, 96% und 100%) je 1 min dehydriert und 2xfür 10 min in Xylol inkubiert, um die Schnitte auf das Eindeckeln mit Eukitt vorzubereiten.

## 3.2.2.3.2 Toluidinblau/Methylenblau-Färbung

Die Toluidinblau/Methylenblau-Färbung bietet einen sehr guten Kontrast, da Tumorzellen durch die vergrößerten Zellkerne dunkelblau und das Stroma schwach rosa angefärbt werden. Daher fand sie im Zuge dieser Studie Anwendung zur Vorbereitung von entparaffinierten FFPE-Schnitten sowie E-tOH-fixierten und Kryoschnitten auf die Mikrodissektion. Vor der Isolation von genomischer DNA oder Gesamt-RNA aus Tumorzellen wurden die Schnitte zunächst rehydriert und anschließend für 30 sec in filtrierter Toluidinblau/Methylenblau-Lösung (1 % (w/v) Toluidinblau, 0,2 % (w/v) Methylenblau in dH<sub>2</sub>O) gefärbt. Nach dem Auswaschen von Farbresten in H<sub>2</sub>O wurden die Schnitte in 75% und 100%igem EtOH dehydriert. Für eine nachfolgende RNA-Isolation wurden alle Lösungen in DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt. Die Gewebeschnitte wurden direkt zur Dissektion der Tumorzellen verwendet (siehe Kapitel 3.2.1.1.1 bzw. 0).

### 3.2.2.4 Manuelle Dissektion von Tumorgewebe

Mammakarzinome stellen eine heterogene Gruppe von Tumoren dar, die von Stroma, Bindegewebe und Lymphozyten durchzogen sein können. Dies führt bei der Isolation zu einer Verunreinigung der Tumor-DNA und –RNA. Zur Gewinnung hochreiner Tumor-DNA und –RNA mit einem Anteil von mindestens 70% Tumorzellen, wurden abhängig von der Homogenität der Tumorgewebeschnitte, entweder ganze Tumorgewebeschnitte verwendet oder mittels manueller Dissektion homogene Tumorareale aus dem Gesamttumor gewonnen. Hierfür wurden Tumorareale anhand von HE-gefärbten Gewebeschnitten lokalisiert und markiert. Weitere 10 µm dicke Gewebeschnitte wurden angefertigt (siehe Kapitel 3.2.2.1.1 bzw. 0) und entsprechend gefärbt (siehe Kapitel 3.2.2.3.1). Für die manuelle Dissektion wurden die Tumorzellen mit einer sterilen 27 G Injektionsnadel (Braun) unter einem inversen Lichtmikroskop (Hund Wetzlar) dissektiert und in den jeweiligen Puffer für die DNA- bzw. für die RNA-Isolierung überführt (siehe Kapitel 0).

# 3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

## 3.2.3.1 Herstellung von Ganzzellextrakten

Proteinlysate zur Analyse im Western Blot wurden aus Ganzzellextrakten gewonnen. Hierfür wurden ca. 2 x  $10^6$  adhärente Zellen in 6 cm-Zellkulturschale ausgesäht, so dass sie nach 24h >50 % konfluent waren. Die Zellen wurden mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen, in 1 ml mittels Zellschaber vom Boden des Gefäßes abgelöst und bei 750 x g für 3 min pelletiert. Das Pellet wurde in einem angemessenen Volumen 1x RIPA-Lysepuffer incl. Protease- und Phosphataseinhibitoren (150-200 µl) für 30 min auf Eis aufgeschlossen. Im Lysat enthaltene genomische DNA wurde per Sonifizierung mit einem Ultraschallprozessor bei einem Zyklus von 1 und einer Amplitude von 80-100 % für 10 Sekunden degradiert. Mit 10 µl Lysat wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.3.2) und der Rest des Lysates mit 1:4 mit 4x Laemmli Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2% SDS-Lysepuffer	2 %	(v/v)	SDS (20 %)
	63mM		Tris/HCl (1M, pH 6,8)
	10 %	(v/v)	Glycerin auf 100 ml mit H <sub>2</sub> O
	10%	(v/v)	Protease-Inhibitoren
	10%	(v/v)	Phosphatase-Inhibitoren
	(Haltbar für max. 1 Woche bei 4°C)		1 Woche bei 4°C)
direkt vor der Verwendungzugeben:	1mM		100mM PMSF

## 3.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten (DC-Assay)

Die Proteinkonzentration in Gesamtzelllysaten wurde über den Lowry-Test mit dem DC-Assay (Biorad) ermittelt. Hierfür wurde zunächst eine Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung (10 µg/µl) in RIPA-Puffer hergestellt und je 5 µl BSA-Verdünnung sowie Lysat in Duplikaten für Proteinbestimmung eingesetzt. Da der Lysepuffer Detergenz enthielt, wurde Lösung S in Verhältnis 1:50 in Lösung A verdünnt und je 25 µl der entstandenen Lösung A' sowie 200 µl Lösung B zu dem Lysat in einer 96-well Platte gegeben. Nach einer Inkubation für 15 min bei RT wurde die Extinktion bei 650 nm bestimmt, die Extinktion des Lysepuffers als Hintergrund von den anderen Proben subtrahiert und aus der Geradengleichung der Verdünnungsreihe die Proteinkonzentration in den Zelllysaten mittels linearer Regression ermittelt.

4x Laemmli-Probenpuffer	0,4%	w/v	Bromnphenolblau
	4%	v/v	SDS (20 %)
	40%	v/v	Glycerin
	250mM		Tris/HcL (1M, pH 6,8)

# 3.2.3.3 Proteinanalyse von Zelllysaten mittels Western-Blot-Analyse

#### 3.2.3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteingemische aus den Zelllysaten wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit einem diskontinuierlichen Puffersystem über ein Sammelgel oberhalb des Trenngels in einem elektrischen Feld gebündelt und anschließend ihrer Größe nach aufgetrennt, um ihre Detektion im Immunoblot zu ermöglichen. Voraussetzung hierfür ist die Denaturierung der Proteine mittels Sodiumdodecylsulfat (SDS) und kochen für 5 min bei 95 °C. Das SDS versieht gleichzeitig durch Anlagerung an hydrophobe und kationische Seitengruppen alle Proteine mit einer gleichstarken negativen Überschussladung, wodurch kleine Ladungsunterschiede unterschiedlicher Proteine vernachlässigbar werden. Das auspolymerisierte Trenngel wurde mit einem Sammelgel überschichtet. Nachdem auch dieses ausgehärtet war, wurden 50 µg Proteinlysat eingesetzt und zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Auftrennung aller Proben wurden leere Taschen des Gels mit Probenpuffer beladen. Als Größenstandard wurden 3 µl Page Ruler™ Plus (Thermo Scientific) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in Minigelkammern Model SE250 der Firma Hoefer bei einer Stromstärke 25 mA/Gel für 1 h durchgeführt. Die Analyse der Elektrophorese erfolgte anschließend durch Immunoblot (siehe Abschnitte 3.2.3.3.2, 3.2.3.3).

Trenngel	8 bzw. 10% 400mM 0,05% 0,05%		Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) Tris/HCl (pH 8,8) SDS Ammoniumpersulfat
Sammelgel	5% 400mM 0,05% 0,05%		Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) Tris/HCl (pH 8,8) SDS Ammoniumpersulfat
Laemmli-Laufpuffer	192mM 0,1% 25mM	v/v	Glycin SDS Tris/HcL (pH 8,5)

# 3.2.3.3.2 Semi-Dry-Transfer aufgetrennter Proteine auf eine Trägermembran

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit einer Blotapparatur (BioRad) über einen Semi-Dry-Transfer auf eine Hybond-ECL Nitrocellulosemembran (GE-Healthcare) übertragen. Auf die Anodenplatte wurden zunächst zwei in Transferpuffer getränkte 3MM-Whatman-Filterpapiere (VWR), dann die ebenfalls in Transferpuffer äqulibrierte Membran, hierauf das Trenngel und zuletzt nochmals zwei puffergetränkte Whatman-Filter passgenau und luftblasenfrei gestapelt. Die Apparatur wurde durch auflegen der Kathodenplatte komplettiert und der Proteintransfer mit einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 2 h durchgeführt.

Transferpuffer	48 mM	Tris
	39 mM	Glycin
	0,04 % v/v	20% SDS
	20 % v/v	Methanol

### 3.2.3.3.3 Western-Blot-Analyse

Der Nachweis einzelner auf einer Membran immobilisierter Proteine ist mit spezifischen gegen Epitope des zu untersuchenden Proteins gerichteten Primärantikörpern (pAK) in einer Immunoblot-Analyse (Western Blot) möglich. Die Visualisierung des Signals des pAKs erfolgt mit einem gegen diesen gerichteten Sekundärantikörper (sAK, DAKO), an dessen FC-Teil eine Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert wurde. Der Nachweise der Protein geschieht durch Inkubation in einer Luminol enthaltenden Lösung (*enhanced chemoluminscence*, ECL). Durch die HRP wird Luminol chemilumineszent umgesetzt und das Signal belichtet die entsprechenden Regionen eines Röntgenfilms (FUJIFILM). Die unspezifischen Bindestellen wurden durch Inkubation der Membran mit einer 5 %-igen Blockierlösung aus Milchpulver (MP) in TBS-T für 1 h bei RT blockiert. Der pAK wurde dann in einer für jeden Antikörper individuellen Verdünnung in entweder 5% BSA oder 5% MP in TBS-T über Nacht bei 4 °C an das zu analysierende Protein gebunden. Die Membran wurde anschließend dreimal für 5 min in TBS-T gewaschen und dann mit dem sAK (1:2.000 in Blockierlösung) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in TBS-T wurde die Membran mit frisch angesetzter ECL-Lösung für 2 min inkubiert und vorhandene Signale durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert. Der Film wurde im Filmentwickler Model Hyperprocessor (Amersham) für je 1 min zunächst in Entwicklerlösung, dann in Fixierer (Agfa) und zuletzt in Wasser geschwenkt, bevor er getrocknet wurde. Zur Auswertung der Signale wurde der Film mit dem Epson 1680 (Epson) eingescannt und die Intensität der Signale mit der ImageJ Software semiquantitativ bestimmt.

## 3.2.3.4 Immunhistochemische Färbung auf Patientenmaterial

Die Proteinlevels von EGFR und PTEN von 29 BCBM, 14 BCOM und 43 Primärtumorproben wurden mittels Immunhistochemie (IHC) bewertet. Der HER2-Status von 11 BCOM wurde ebenfalls immunhistochemisch bestimmt.

Die Immunfärbung von EGFR wurde nach einem bereits etablierten Protokoll durchgeführt. Hierfür wurde eine Antigen-Demaskierung in Proteinase K-Lösung (DAKO) für 6 min bei RT durchgeführt, gefolgt von einer Inkubation mit dem EGFR E30-Antikörper über Nacht bei 4°C. Die Färbung wurde mit dem EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB (DAKO) nach den Anweisungen des Herstellers sichtbar gemacht und die Nuclei mit Hämatoxylin gegengefärbt (siehe Kapitel 3.2.2.3.1 und REF xx).

Zum Nachweis von PTEN wurde eine Antigen-Demaskierung in Natriumcitrat-Puffer (Biogenex) durch kochen bei 120 °C für 5 min durchgeführt. Eine Inkubation mit dem PTEN 138G6-Antikörper über Nacht bei 4 °C und eine Visualisierung über das Dako REAL<sup>™</sup> Detection System (DAKO) nach dem Herstellerprotokoll schlossen sich an. Die Spezifität der Färbung wurde an FFPE-fixierten Mammakarzinomzelllinien mit bekannter PTEN-mRNA-Expression überprüft.

Die HER2-Proteinlevels wurden über den Dako HercepTest (Dako) nach dem Herstellerprotokoll nachgewiesen, welches ebenfalls bereits im Institut etabliert war.

# 3.2.3.4.1 Auswertung der IHC-Analysen

Die EGFR-Membranfärbung und die cytoplasmatische PTEN-Färbung wurden nach folgenden Kriterien interpretiert: negativ (0), schwache (1+), moderate (2+) oder starke Färbung (3+). In den endgültigen statistischen Analysen wurden die Proteinlevels als entweder negativ (0) oder positiv (1+, 2+, 3+) definiert <sup>115</sup>. Die HER2-Membranfärbung wurde als negativ (0), schwach (1+), moderate (2+) oder stark (3+) nach Wolff *et al.* 2007 klassifiziert <sup>193</sup>. Fälle mit negativer oder starker Färbung wurden als negativ bzw. positiv definiert. Alle Fälle mit einem Immunoscore von 1+ und 2+ wurden über eine FISH-Analyse (siehe Kapitel 0) verifiziert.

63

# 3.2.4 Zellbiologische Methoden

# 3.2.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in sterilen Kulturflaschen in Hera150-Brutschränken (Kendro) bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre mit 10 % CO<sub>2</sub> (in Kulturmedium 1, 4 und 5) bzw. 5 % CO<sub>2</sub> (in Kulturmedium 2 und 3). Die Zelllinien wurden abhängig von der Zellteilungsrate ein- bzw. zweimal wöchentlich unter sterilen Bedingungen bei einer Konfluenz von ca. 80% passagiert. Die adhärent wachsenden Zellen wurden durch Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% / 0,02%) von der Kulturschale abgelöst. Da BSA die Effizienz des Trypsinverdaus vermindert, wurde im Medium enthaltenes BSA zuvor durch waschen der Zellen mit 37 °C-warmem PBS entfernt. Der Ablösevorgang wurde mit 2 Vol auf 37 °C vorgewärmtes Vollmedium gestoppt und die resuspendierten Zellen in einer Dichte von 20-30 % ausgesät.

# 3.2.4.2 Herstellung und Rekultivierung von kryokonservierten Zellen

Zur Unterbindung von Eiskristallbildung in eukaryotischen Zellen wurde den Zellen während des Einfriervorgangs durch Zusatz von 10 % stark hygroskopischem Dimethylsulfoxid (DMSO) zu dem jeweiligen Kulturmedium langsam das Wasser entzogen. Hierzu wurden 3 x 10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und zunächst für max. 2 h auf -20 °C gekühlt. Anschließend wurden die Zellen für 24 h weiter auf -80 °C abgekühlt und schlussendlich für die Langzeitlagerung bei -196 °C in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden kryokonservierte Zellen bei 37 °C solange im Wasserbad aufgetaut bis noch ein kleiner Eisklumpen vorhanden war und schnell in 10 Vol Vollmedium aufgenommen, um das toxische DMSO zu entfernen. Nach einer Pelletierung für 3 min bei 1200 rpm wurden die Zellen in Vollmedium resuspendiert und in T25-Zellkulturflaschen ausgesät.

### 3.2.4.3 Aktivierung von Gliazellen

Gliazellen stellen den zahlenmäßig größten Anteil der Zellpopulation des Zentralen Nervensystems dar und lassen sich in Makroglia ektodermalen Ursprungs (Oligodendrozyten und Astrozyten) sowie Mikroglia unterteilen, welche sich aus mesodermalen Makrophagen entwickeln. Mikroglia zählen zu den immunkompetenten Zellen und sind Mediatoren immunologischer Prozesse. Bespielsweise sind sie in der Lage als Reaktion auf pathologische Veränderungen des Gehirns durch Sekretion proinflammatorischer Substanzen eine Immunantwort zu vermitteln. Hierbei geht schnelle Umwandlung in einen aktivierten Phänotyp vonstatten, der durch die Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine einen Entzündungsprozess in Gang setzt <sup>194</sup>. Es ist wissenschaftlich belegt, dass durch Mikroglia sezernierte proinflammatorische Mediatoren, wie Zytokine, auch die Funktion von Astrozyten beeinflussen <sup>195,196</sup>. Primäre humane Astrozyten sowie Zellen der humanen immortalisierten Mikroglia-Zelllinie CHME3 wurden Zusatz von Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) zum Kulturmedium stimuliert, um sicherzustellen, dass beide Typen von Gliazellen im aktivierten Zustand vorlagen.

Am Tag vor der Stimulation wurden ca.  $5 \times 10^6$  Astrozyten bzw.  $3 \times 10^6$  CHME3-Zellen in 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät. Bei ca. 80 % Konfluenz erfolgte die Stimulation mit 20 ng/ml IFN  $\gamma$  sowie TNF $\alpha$  für 24 h bei 10 CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 3.2.4.4 Herstellung konditionierter Zellkulturüberstände

Es ist bekannt, dass sowohl Mikroglia als auch Astrozyten auf die Anwesenheit von Tumorzellen im Gehirnparenchym reagieren <sup>21</sup>. Um den Effekt der durch Gliazellen sezernierten Zytokine auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen im Zellkulturmodell zu analysieren, sollten die Tumorzellen in durch aktivierte Gliazellen konditioniertem Kulturmedium kultiviert werden. Primäre humane Astrozyten sowie Zellen der humanen immortalisierten Mikroglia-Zelllinie CHME3 wurden wie in Abschnitt 3.2.4.3 beschrieben stimuliert. Die Kulturüberstände wurden anschließend quantitativ abgenommen und Zelltrümmer sowie mögliche bakterielle oder virale Verunreinigungen über filtrieren durch einen 0,2 µm-Filter entfernt. Die konditionierten Überstände wurden entweder direkt zur Kultivierung von Tumorzellen verwendet oder bei -20 °C gelagert.

## 3.2.4.5 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Damit *E. coli* Zellen während der Transformation mit Plasmid-DNA in der Lage sind Fremd-DNA aufzunehmen, müssen die Bakterien zunächst kompetent gemacht werden. Hier wurde die Methode der chemischen Kompetenz gewählt. Es wurden 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikazusatz mit einer Kolonie von *E. coli* des Stammes DH5 $\alpha$  inokkuliert und bei 37 °C über Nacht (max. 16 h) bei 200 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurden 50 ml LB-Medium mit 500 µl der Übernachtkultur angeimpft und bei

65

37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,4-0,6 kultiviert. Die Bakterienkultur wurde dann für 45 min auf Eis gelagert und bei 4 °C mit 3000 x g für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen, das Pellet in 17 ml einer Kalium-/Calciumchlorid-Lösung (KCl/CaCl<sub>2</sub>-Lösung) resuspendiert und für weitere 40 min auf Eis gelagert. Nach erneuter Sedimentierung wurde das Pellet in 4 ml der (KCl/CaCl<sub>2</sub>-Lösung) resuspendiert und die Bakteriensuspension zu je 100 µl in auf Trockeneis stehende Reaktionsgefäße aliquotiert. Die kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

KCI/CaCl <sub>2</sub> -Lösung	100 mM		KCI
(pH 6,4)	50 mM		CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O
	10 %	v/v	Glycerol
	10 mM		Kaliumacetat
			sofort verwenden

# 3.2.4.6 Mycoplasmen-Kontaminationstest

Mycoplasmen stellen eine häufige, unter dem Lichtmikroskop nicht zu erkennende Kontamination in Zellkulturen dar, die die Resultate vieler Analysen beeinflussen kann. Unter Zuhilfenahme des *Venor GeM Mycoplasma Detection Kits* wurden die Zellkulturansätze vor der ersten Passage nach Rekultivierung nach den Angaben des Herstellers mittels PCR auf Mycoplasmenkontamination getestet. Mycoplasmen-kontaminierte Ansätze wurden umgehend entsorgt.

# 3.2.4.7 Zellzählung mit Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen nach dem Ablösen vom Boden der Zellkulturgefäße durch Trypsinieren in einem definierten Volumen Vollmedium aufgenommen. Es wurden 10 µl der Suspension zur Bestimmung abgestorbener Zellen mit 1 Vol Trypanblaulösung gefärbt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgebracht. Ein Quadrat der Kammer wurde ausgezählt und die ermittelte Zahl an ungefärbten Zellen zunächst mit dem Verdünnungsfaktor 2 und anschließend mit 10<sup>4</sup> multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu berechnen. Abschließend wurde mit dem Volumen an ml Medium der Zellsuspension multipliziert, um die Zellzahl im Ansatz zu bestimmen.

# 3.2.4.8 Herstellung lentiviraler Zellkulturüberstände

Für die Herstellung lentiviraler Zellkulturüberstande muss zunächst Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen eingeführt werden. Dies wurde hier über Lipofektion mit dem Reagenz *TurboFect* (Fermentas) vermittelt. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben in *OptiMEM*-Zellkulturmedium durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden ca. 4 x 10<sup>5</sup> bzw. 1,5 x 10<sup>6</sup> HEK293T Produzentenzellen in 25cm<sup>2</sup>- oder 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät. Bei ca. 50 % Konfluenz erfolgte die Transfektion mit einem Gemisch aus lentiviralem Expressions-, Verpackungs- (psPAX2) und Hüllplasmid (pMD2.G) in

66

einem Verhältnis von 4:3:1. Als Überexpressionskonstrukt wurde LeGO-iG2/PTEN oder pZspuro++tTRKRAB\_PTEN verwendet. LeGO-iG2 und pZspuro++tTRKRAB\_leer dienten als Negativ-kontrollen. Die Plasmide LeGO-G/Puro+\_shPTEN1 und LeGO-G/Puro+\_shPTEN2 fungierten als Knock-downkonstrukte mit LeGO-G/Puro+\_NTC als Kontrollvektor (siehe Abschnitt 9.4 im Anhang). Nach 16 h erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Zellkulturmedium 1. Nach weiteren 48 h wurde das Kulturmedium abgenommen, Zelltrümmer über Filtrieren durch einen Nitrozellulosefilter (Millipore) mit einer Porengröße von 0,45 µm entfernt und der so gewonnen virale Überstand entweder umgehend zur Infektion von Zielzellen (siehe Abschnitt 3.2.4.8) verwendet oder für eine spätere Verwendung zu je 500 µl aliquotiert, direkt auf Trockeneis transferiert und bei -80°C gelagert.

#### 3.2.4.9 Bestimmung des Virentiters

Am Tag vor der Infektion wurden die Zielzellen (MDA-MB-231 BR oder MCF-10A) in 48-well Platten in einer Dichte ausgesät, die am Tag der Infektion eine Konfluenz der Zellen zwischen 50-70 % bedingte. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und zur Infektion wurde eine Verdünnungsreihe (1:5, 1:50, 1:500, 1:5000) des Virusüberstandes (siehe Abschnitt 3.2.4.8) in 500 µl frischem Zellkulturmedium 1 oder 3 mit 4 µg/ml Hexadimetrinbromid (Polybrene) eingesetzt. MDA-MB-231 BR Zellen wurden mit Überexpressions- und den entsprechenden Kontrollkonstrukten infiziert. In MCF-10A Zellen wurde ein PTEN-Knockdown eingeführt. Die Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter 10 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach einem Waschschritt mit PBS wurde frisches Zellkulturmedium zur Induktion der Genexpression für die PTEN-Überexpression mit 1 µg/ml Doxycyclin versetzt. Diese Konzentrationen wurden zuvor ebenfalls durchflusszytometrisch am FACS ermittelt. 24h nach der Infektion (Knockdown) bzw. nach weiteren 72 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert (siehe Abschnitt 3.2.4.1) und in 500 µl PBS in FACS-Röhrchen überführt. Die GFP- bzw. ZsGreen-Expression wurde bei einer Wellenlänge von 488nm detektiert und anhand des Anteils der transduzierten Zellen (fluoreszierende Zellen, P), des eingesetzten Volumens an Virusüberstand (V) und der Anzahl der ausgesähten Zellen (N) der Virentiter nach folgender Formel ermittelt.

$$T = N \times P \div V$$

Zur Bestimmung des Titers wurde die Verdünnung eingesetzt, welche zu einem Anteil transduzierter Zellen zwischen 5-20 % resultiert. Höhere Transduktionsraten führen zu multiplen Integrationen, welche eine Fehlinterpretation des Titers zur Folge haben.

## 3.2.4.10 Gentransfer mittels RNA-Interferenz

Am Tag vor der Infektion wurden die Zielzellen (MDA-MB-231 BR oder MCF-10A) in 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen so ausgesät, dass die Konfluenz der Zellen am Tag der Infektion zwischen 50-70 % betrug. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und zur Infektion wurde 1/10 Vol Virusüberstand (siehe Abschnitt 3.2.4.8) auf frisches Zellkulturmedium 1 oder 3 mit 4 µg/ml Hexadimetrinbromid (Polybrene) getropft. MDA-MB-231 BR Zellen wurden mit Überexpressions- und den entsprechenden Kontrollkonstrukten infiziert. In MCF-10A Zellen wurde ein PTEN-Knockdown eingeführt. Die Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter 10 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach einem Waschschritt mit PBS wurde in den Knockdownzellen die Puromycin-Selektion gestartet. In den Überexpressionszellen wurde zunächst (wie in Abschnitt 3.2.4.9 beschrieben) die Expression über Doxycyclin-Gabe induziert, bevor nach 72 h ebenfalls nicht-infizierte Zellen über die Puromycin-Resistenz der infizierten Zellen negativ selektiert wurden. Hierbei wurde für MDA-MB-231 BR Zellen Zellkulturmedium 1 mit 1 µg/ml und für MCF-10A Zellen Zellkulturmedium 3 mit 4 µg/ml Puromycin verwendet (Selektionsmedium). Nach 72h wurde das Selektionsmedium mit frischem Zellkulturmedium 1 bzw. 3 ersetzt (Kulturmedium) und die Zellen für anschließende Assays in entsprechender Dichte ausgesät.

### 3.2.4.11 **Proliferations-Assay (MTT-Assay)**

Der MTT-Assay ist eine kolorimetrische Bestimmung der Stoffwechselaktivität lebender Zellen in Korrelation zur Zellzahl. Gemessen wird die Aktivität der Succinatdehydrogenase, eines mitochondrialen, zur Atmungskette zählenden NADH+-abhängigen Enzyms. Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, MTT) wird durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase reduziert und sein Tetrazoliumring gespalten. Hierdurch entstehen wasserunlösliche blaufarbene Formazankristalle, deren Extinktion spektralfotometrisch bestimmt werden kann. Die Höhe der Extinktion ist direkt proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen und zur eingesetzten Zellzahl.

Es wurden ca. 1 x 10<sup>3</sup> (MDA-MB-231 WT, BR/basal oder MDA-MB-231 WT, BR/PTEN) in Quintruplikaten in 96-well Platten ausgesät. Nach 24, 48 und 72 h wurden 20 μl MTT-Lösung/well zugegeben und für 3 h im Brutschrank inkubiert. Zur Analyse der Auswirkungen des Gliazell-Kulturmediums bzw. der durch Gliazellen sezernierten Zytokine auf die Proliferation von Tumorzellen, wurde nach 24 h ein Mediumwechsel mit frischen bzw. konditioniertem Gliazell-Medium vorgenommen. Nach weiteren 24, 48 h wurden ebenfalls 20 μl MTT-Lösung/well zugegeben und für 3 h im Brutschrank inkubiert.

Nach Lyse der Zellen in 150 µl MTT-Lysepuffer pro well wurde die Extinktion photometrisch bei 540 nm (E<sub>540</sub>) bestimmt. Die Extinktion bei 650 nm (E<sub>650</sub>) diente als Referenz und wurde von E<sub>540</sub> subtrahiert. Die Mittelwerte wurden als Maß für das Proliferationsverhalten der Zellen gegen die Zeit aufgetragen. Anschließend wurde das Verhältnis der Werte der Zellen mit basaler PTEN-Expression (MDA-MB-231 BR/basal) bzw. jener mit PTEN-Überexpression (MDA-MB-231 BR/PTEN) an Tag 1 zu jenen von Tag 2 und 3 gebildet.

68
$$Ratio_{2/1} = \frac{Mittelwert_{E540} (48 h)}{Mittelwert_{E540} (24 h)}$$
$$Ratio_{3/1} = \frac{Mittelwert_{E540} (72 h)}{Mittelwert_{E540} (24 h)}$$

Zusätzlich wurden die Verhältnisse von Tag 1 zu Tag 3 aus MDA-MB-231 BR/basal mit denen aus MDA-MB-231 BR/PTEN bzw. jene Verhältnisse der Kultivierung in frischem mit denen jener in konditioniertem Kulturmedium in Bezug gesetzt.

 $\Delta PTEN = Ratio_{3/1} (basal) - Ratio_{3/1} (PTEN)$ 

 $\Delta Medium = Ratio_{3/1}$  (konditioniert) -  $Ratio_{3/1}$  (frisch)

MTT-Lösung	5mg/ml	Tetrazoliumbromid				
_	-	In PBS				
		steril filtrieren				
		zu je 500μl aliquotieren und bei -20°C lagern				
MTT-Lysepuffer	4mM	HCI				
	0,4%	NP-40 in Ispropanol				
		Lagerung bei RT				

### 3.2.4.12 Zell-Migrations-Assay (Transwell-Assay)

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens wurde ein sogenannter *Boyden-Chamber-Assay* durchgeführt <sup>197</sup>. Hierfür wurden 500 µl Zellkulturmedium 1 mit einem chemischen Lockstoff (10% FBS) in 24well Platten vorgelegt. Um den Effekt der Aktivierung des EGFR/HER2-Signalwegs auf das Migrationsverhalten der Tumorzellen zu analysieren wurde dem Kulturmedium zusätzlich 10 ng/ml EGF zugesetzt. Für die Analyse des Gliazell-Kulturmediums auf das Migrationsverhalten von Tumorzellen wurde Gliazell-Kulturmedium als Lockstoff verwendet. Der Effekt der von Gliazellen sezernierten Zytokine sollte in konditioniertem Gliazell-Kulturmedium in untersucht werden. Hierfür wurden 72 h vor Aussaat der Tumorzellen 1 x 10<sup>5</sup> primäre humane Astrozyten in Kulturmedium 4 oder CHME3-Zellen in Kulturmedium 5 in 24-well Platten ausgesät, so dass sie am Tag der Durchführung des Migrations-Assays zu etwa 80 % konfluent waren. Anschließend wurden 1 x 10<sup>4</sup> (MDA-MB-231 BR/basal bzw. PTEN) Zellen in Zellkultureinsätze mit 8 µm Porendurchmesser in mit 1 µg/ml Doxycyclin versetztem Aussaatmedium ohne FBS ausgesät. Die Analysen wurden in Duplikaten durchgeführt. Nach 24 h wurde das Medium aus den *Inserts* quantitativ abgenommen, nicht-migrierte Zellen mit einem Wattestäbchen aus der Innenseite der Inserts entfernt und die Zellen auf der Unterseite des *Inserts* für 15 min bei RT in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nach einem Waschschritt in PBS wurden die Zellen in 0,1 % Kristallviolett in H<sub>2</sub>O für 15 min gefärbt und anschließend 4x in H<sub>2</sub>O gespült, um überschüssige Farbe zu entfernen. Das Wasser wurde aus den *Inserts* quantitativ entfernt und die Innenseite nochmals mit einem Wattestäbchen gesäubert, bevor die *Inserts* mit der Unterseite nach oben 5 min getrocknet wurden. Die Membran wurde vorsichtig mit einem Skalpell herausgetrennt, mit der Zellseite nach oben in einem Tropfen Immersionsöl auf einem Objektträger abgelegt und mit einem Deckglas Luftblasen-frei eingedeckelt. Unter dem Durchlichtmikroskop (Zeiss) wurde die Zellzahl in 5 Regionen der Membran mit 10x Vergrößerung bestimmt und die berechneten Mittelwerte graphisch gegeneinander aufgetragen. Anschließend wurde das Verhältnis der Zellzahl des MDA-MB-231 BR/basal- zu jener des MDA-MB-231 BR/PTEN bzw. der Zellzahl aus konditioniertem zum jener aus frischen Kulturmedium gebildet.

$$\Delta PTEN = \frac{Mittelwert (basal)}{Mittelwert (PTEN)}$$

 $\Delta Medium = \frac{Mittelwert (konditioniert)}{Mittelwert (frisch)}$ 

### 3.2.5 Informatische und bioinformatische Methoden

#### 3.2.5.1 Statistik

Der  $\chi$ -Quadrat-Test und der exakte Test nach Fisher wurden verwendet, um Unterschiede zwischen PT und BCBM in Bezug auf Kopienanzahl, Mutationsstatus und Proteinlevel zu berechnen sowie die Korrelation aller untersuchter Gene mit den klinischen Daten zu analysieren. In der Signalwegsanalyse wurde die Patientenkohorte der anderen Metastasen (BCOM) aufgrund fehlender Daten ausgeschlossen. Überlebenswerte wurden durch Kaplan-Meier-Kurven und Unterschiede zwischen normalen und veränderten Proben mit dem Log-Rank-Test kalkuliert. Fälle mit M1-Status wurden aus den Analysen des rezidivfreien Überlebens (RFS) ausgeschlossen. Die Analysen wurden mit dem Programm IBM SPSS Statistics (Version 19, IBM) durchgeführt. Der Student'sche t-Test wurde angewendet, um Unterschiede in Proliferation und Migration zwischen Zellen mit basaler PTEN-Expression (tet-off) und solchen mit PTEN-Überexpression (tet-on) bzw. zwischen verschiedenen Kulturbedingungen mit dem Programm GraphpadPrism (Version 5, GraphPad Software, Inc.) zu bestimmen.

# Ergebnisse

# 4.1 Untersuchung des EGFR-HER2-Signalwegs an Gewebe von primären Mammakarzinompatientinnen und Mammakarzinompatientinnen mit Gehirnmetastasen

Die molekularen Grundlagen der Gehirnmetastasierung des Mammakarzinoms sind bislang weitestgehend unbekannt. Im translationalen Teil dieser Arbeit sollte die Rolle des EGFR/HER2-Signalwegs in der Gehirnmetastasierung des Mammakarzinoms durch Analysen an Tumormaterial von Mammakarzinompatientinnen mit BCBM sowie BCOM und Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen, mit BCBM oder mit BCOM (incl. Knochenmetastasen) untersucht werden. Der Großteil der in dieser Arbeit beschriebenen Resultate aus den translationalen Untersuchungen an Patientenmaterial wurde bereits veröffentlicht <sup>188,198</sup>.

### 4.1.1 **Der EGFR-Status**

### 4.1.1.1 Ermittlung der EGFR-Kopienanzahl

Eine Überexpression von EGFR tritt selten im primären Mammakarzinom, jedoch häufig im GBM häufig auf. Die häufigste Ursache hierfür ist, insbesondere beim GBM, die Amplifikation eines eng begrenzten Abschnittes auf der Chromosomenregion 7p, die den *EGFR*-Lokus mit einschließt. Sie wird durch eine erhöhte chromosomale Instabilität des den *EGFR*-Lokus umgebenden Bereiches ausgelöst <sup>117</sup>. Um die Kopienanzahl des *EGFR*-Genlokus in BCBM-, BCOM-Patientinnen, Patientinnen aus den Primärtumorsubgruppen sowie deren DCIS-Arealen zu ermitteln, wurden qPCR-Analysen mit spezifischen Primern für das *EGFR*-Gen auf genomischer DNA durchgeführt. Als Referenzabschnitt diente der Chromosomenabschnitt 2p31.1, da sich dieser in vorangestellten CGH-Array Analysen sowohl in Primärtumor- als auch in BCBM-Gewebe als stabil und nicht mutiert herausgestellt hatte. Wenn möglich, wurden die qPCR-Resultate mittels FISH-Analysen über eine Sonde gegen den *EGFR*-Lokus verifiziert. Als Referenz in den FISH-Analysen wurde eine Sonde gegen das *Zentromer 7 (CEP7*) eingesetzt.

Im Zuge dieser Analyse wurde die *EGFR*-Kopienanzahl in Tumorgewebe von insgesamt 29 BCBM, sechs BCOM, 60 Primärtumorpatientinnen und sechs DCIS-Arealen bestimmt. In dem untersuchten Patientenkollektiv wurden diploid vorliegendes *EGFR* sowie *EGFR*-Zugewinne wie auch -Amplifikationen detektiert. In Abb. 4.1 ist beispielhaft eine FISH-Analyse von diploiden Tumorzellen mit einer normalen (diploiden) *EGFR*-Kopienanzahl (Abb. 4.1A) illustriert. Des Weiteren sind Tumorzellen (*CEP7*) mit einem Zugewinn von *EGFR* (vier Signale, Abb. 4.1B) bzw. einer *EGFR*-Amplifikation dargestellt (sieben Signale, Abb. 4.1B, C).



**Abb. 4.1: FISH-Analyse der EGFR-Kopienanzahl an Mammakarzinompatientinnen.** Dargestellt sind Tumorzellen mit diploid vorliegendem Zentromer 7 (CEP7) und einer normalen (diploiden) *EGFR*-Kopienanzahl (A), mit einem Zugewinn der *EGFR*-Genkopien (B) sowie mit einer *EGFR*-Amplifikation (C). Die Signale der *EGFR*-Sonde sind in rot und die der CEP7 in grün illustriert und wurden in 1000-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die verschiedenen Varianten der *EGFR*-Kopienanzahl stellen sich in einer qPCR-Analyse wie folgt dar (siehe Abb. 4.2). Die Signalintensität einer Probe mit diploid vorliegendem *EGFR* (DNA isoliert aus Blut gesunder Probanden) diente als Referenz und überschreitet im Beispiel die Intensität der Hintergrundsignale bei Zyklus 26 (Ct). Im Vergleich hierzu wurde das Signal einer Probe mit moderater bzw. hochgradiger Amplifikation bei Ct 22,5 bzw. Ct 20 detektiert. Da sich bei jedem Zyklus der PCR-Reaktion das amplifizierte Produkt verdoppelt, liegt somit in der Probe mit moderater Amplifikation ein 6-faches und bei der Probe mit hochgradiger Amplifikation ein 32-faches der *EGFR*-Kopienanzahl vor. In den durchgeführt Analysen wurde dieses Verhältnis mit dem Ct –Wert des Kontrollabschnittes (Chr2) verrechnet. Die Berechnung eines Verhältnisses des *EGFR*-Kopienstatus zum jeweiligen Kontrollabschnitt (*EGFR*-Ratio) ist in Abschnit 3.2.1.7.1 und 3.2.1.14.2 ausführlich beschrieben.

Eine *EGFR*-Amplifikation (Ratio > 5) wurde in vier Proben von BCBM-Gewebe (14 %) und in drei Primärtumorproben (5 %) identifiziert Abb. 4.3 A). Von Letzteren wiesen zwei Patientinnen (22 %) BCBM auf (Abb. 4.3 B). Dagegen wurde bei keiner der Patientinnen mit BCOM und keiner der Primärtumorpatientinnen ohne Metastasen oder mit Knochenmetastasen eine Genamplifikation detektiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Subgruppen von Patientinnen bezüglich einer *EGFR*-Amplifikation ermittelt werden. Zugewinne der *EGFR*-Kopienanzahl (Ratio zwischen 2-5) trugen elf BCBM-Patientinnen (38 %) (Abb. 4.3 C, D). Die Hälfte der BCOM-Kohorte sowie zehn Primärtumorproben (17 %), davon knapp ein Drittel der Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, wiesen ebenfalls einen Zugewinn von *EGFR*-Kopien auf (Abb. 4.3 D). Des Weiteren wurden Zugewinne in jeweils fünf Primärtumorproben ohne Metastasen (22 %) und Primärtumorproben mit BCOM gefunden (17 %). Somit trat ein Zugewinn der EGFR-Kopienanzahl in BCBM-Patientinnen signifikant häufiger auf als in Primärtumorpatientinnen, im Speziellen in solchen mit BCOM (beides p < 0,05). Alle untersuchten DCIS-Areale wiesen eine normale (diploide) EGFR-Kopienanzahl auf (siehe Abb. 4.5 sowie Tabelle 9.2 im Anhang).



**Abb. 4.2: qPCR-Analyse an genomischer DNA von Tumorgewebe.** Die logarithmierte Fluoreszenzintensität der Signale der EGFR-spezifischen PCR-Produkte (*Fluorescence*) wurde dem Zyklus der PCR-Reaktion (*Cycle*) gegenübergestellt. Da die Menge an PCR-Produkt direkt proportional zur Fluoreszenzintensität ist, kann über den Zeitpunkt (Zyklus), an dem die Signalintensität das Hintergrundrauschen (horizontale Linie) überschreitet, auf die eingesetzte DNA-Menge rückgeschlossen werden. Dargestellt sind eine Probe mit diploidem *EGFR* (Zyklus 26), mit *EGFR*-Zugewinn (22,5) und mit EGFR-Amplifikation (Zyklus 20) sowie eine Negativkontrolle ohne DNA (Signale rechts im Bild, die nicht die Markierung überschreiten).

Nachfolgend wurden sowohl ein Zugewinn als auch eine Amplifikation als veränderter Status der *EGFR*-Kopienanzahl gewertet (Abb. 4.4). Zusammengenommen wies etwa die Hälfte der BCBM- und BCOM-Patientinnen (52 % und 50 %) einen veränderten *EGFR*-Kopienstatus auf, verglichen mit 22 % der Primärtumorpatientinnen (Abb. 4.4 A). Aus der Kohorte der Primärtumorpatientinnen trugen je 22 % der nicht-metastasierten Fälle und der BCBM-Patientinnen sowie 20 % der Fälle mit nachfolgend entwickelten BCOM – hiervon 29 % der Patientinnen mit späteren Knochenmetastasen – eine veränderte *EGFR*-Kopienanzahl (Abb. 4.4 B). Ein statistisch signifikanter Unterschied der *EGFR*-Kopienanzahl wurde zwischen BCBM- und Primärtumorpatientinnen beobachtet, der besonders die Patientinnen ohne Metastasen bzw. mit BCOM betraf (alle p ≤ 0,05).



Abb. 4.3: Häufigkeit von Zugewinnen und Amplifikationen der *EGFR*-Genkopien in den untersuchten Kohorten und deren Subgruppen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe mit einem Zugewinn (A, B) oder einer Amplifikation (C, D) der *EGFR*-Kopien ist auf der y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen, *PT brain-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT bone-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen). Die Summe aller untersuchten Patientinnen der jeweiligen Kohorte ist auf der Abszissenachse dargestellt. \*: p < 0,05.



Abb. 4.4: Kombinierter Status der EGFR-Genkopienanzahl in den untersuchten Kohorten und deren Subgruppen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe (A, B) einem EGFR-Zugewinn oder einer -Amplifikation ist als kombinierter Status auf der y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all:* Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen, *PT brain-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochennetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen). \*: p < 0,05.

In der Analyse der *EGFR*-Kopienanzahl konnten alle vier Primärtumorproben untersucht werden, zu denen ebenfalls BCBM-Gewebe verfügbar war. Drei der vier analysierten korrespondierenden Primärtumor- und BCBM-Proben wiesen identisch viele *EGFR*-Kopien auf. Davon verfügten zwei Patientinnen über eine normale *EGFR*-Kopienanzahl und ein Fall wies eine *EGFR*-Amplifikation auf. Die letzte Patientin zeigte einen Umschlag von diploid vorliegendem *EGFR* im Primärtumor zu einem *EGFR*-Zugewinn in der Metastase (siehe Abb. 4.5 A). Auch die beiden BCBM-Proben aus einer Patientin wiesen identische Kopienanzahlen auf. Alle sechs untersuchten Patientinnen, für die sowohl DCIS- als auch invasives Tumorgewebe verfügbar war, verfügten über eine diploide *EGFR*-Kopienanzahl in bei den Läsionen (siehe Abb. 4.5 B).



**Abb. 4.5: EGFR-Kopienanzahl in gepaarten Tumorproben.** Dargestellt ist die Kopienanzahl in Primärtumor- (linke y-Achse) und gepaarten BCBM-Proben (rechte y-Achse, A) bzw. DCIS-Arealen derselben Patientin (rechte y-Achse, B). Proben mit diploider Kopienanzahl, einem Zugewinn oder einer Amplifikation sind mit einem Wert von 2, 4 bzw. 5 dargestellt. A: diploides *EGFR* in Primärtumor- und BCBM (n = 2) bzw. Zugewinn in der BCBM (n = 1), Amplifikation in Primärtumor- und BCBM (n = 1), B: diploides Gewebe in Tumor- und DCIS-Arealen (n = 6).

Zusammenfassend ist anzumerken, dass eine erhöhte *EGFR*-Kopienanzahl signifikant häufiger in Patientinnen mit BCBM sowie Primärtumorpatientinnen mit BCBM, jedoch auch in Patientinnen mit BCOM sowie Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen in hoher Frequenz auftritt. Weiterhin war in einem Großteil der Patientinnen, von denen korrespondierendes Primärtumor- als auch Gehirn- bzw. DCIS-Gewebe zur Verfügung stand, die *EGFR*-Kopienanzahl aus dem BCBM-Gewebe bereits im Primärtumor vorhanden.

### 4.1.1.2 EGFR-Mutationsanalyse

Eine weitere Variante der Grundlage einer EGFR-Überexpression sind Mutationen innerhalb des *EGFR*-Genlokus. Der Rezeptor setzt sich aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne (Exon 1-15), einer Transmembrandomäne (Exon 16) und einem intrazellulären Abschnitt zusammen. Der intrazelluläre Abschnitt besteht aus einer Juxtamembrandomäne (Exon 17), einer TKD (Exon 17-23) und einer regulatorischen Domäne (Exon 24-27).

In Bronchialkarzinomen treten häufig Punktmutationen in der TKD auf, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führen <sup>122</sup>. Sie befinden sich hauptsächlich in Abschnitten auf Exon 19 und Exon 21, die für die Nukleotidbindeschleife die Aktivierungsschleife kodieren. Da Anhäufungen von Mutationen in der TKD auch im primären Mammakarzinom beschrieben sind (Abb. 4.6), über ihr Auftreten in BCBM jedoch Unklarheit herrscht, lag ein Fokus dieser Arbeit auf der Analyse dieser Region an BCBM-Proben.



**Abb. 4.6: Histogramm von EGFR-Mutationen im primären Mammakarzinom.** Im oberen Bereich ist auf der y-Achse die Anzahl belegter Fälle mit Punktmutationen (*Substitutions*) im Mammakarzinom gegen deren Position in der EGFR-Proteinsequenz illustriert. Darunter ist die Lokalisation der einzelnen Domänen in der Proteinsequenz abgebildet (Pfam). Grün: Ligandenbinde-Domänen (*Recep L domain*), rot: Cystein-reiche Domäne I (*Furin-like*), blau: Cystein-reiche Domäne I (*EGF recep IV*), gelb: Tyrosinkinasedomäne (*Pkinase Tyr*). Ferner ist die Anzahl der Fälle komplexen Mutationenund deren Lokalisation (*Complex*) sowie die Lokalisation belegter Insertionen (blau) und Deletionen (rot) (Ins/del) dargestellt. Die Daten wurden aus der COSMIC Datenbank entnommen und veranschaulichen die Anhäufung von Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne<sup>164</sup>.

Eine großflächige Deletion ist häufig bei GBM-Patienten zu finden und wird als EGFRvIII-Transkript bezeichnet. Die Deletion schließt die Exone 2-7 mit ein (p.del6-273), was zum Verlust eines Teils der extrazellulären Domäne (vollständige Ligandenbindedomäne 1 und Großteil der Cystein-reichen Domäne 1) führt <sup>199</sup>. Das Auftreten des EGFRvIII-Transkripts wurde auch in Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen <sup>116</sup>. Nach der *Seed-and-Soil*-Hypothese legen diese beiden Fakten nahe, dass das Vorhandensein dieser Mutation den Tumorzellen einen Selektionsvorteil in der Mikroumgebung des Gehirns verschafft. Daher wurde in dieser Studie die BCBM-Kohorte mittels PCR an cDNA auf die Deletion des mRNA-Abschnittes von Exon 2-8 (EGFRvIII-Transkript) untersucht.

Die EGFR TKD wurde aus cDNA-Proben durch eine PCR-Reaktion über Oligonukleotide in den Exonen 17 und 22 amplifiziert und anschließend mittels *Sanger*-Sequenzierung auf Mutationen untersucht. Auf diese Weise wurden Proben von 17 BCBM-Patientinnen analysiert (siehe Tabelle 4.1). Nur eine der analysierten Proben wies eine stille Mutation (c.2508C>T) in Kombination mit einem bereits dokumentierten Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) auf (c.2361G>A, Abb. 4.7 A), wohingegen alle verbleibenden Patientinnen nur einen c.2361G>A SNP trugen (siehe Abb. 4.7 B). Da ein SNP eine häufig in der Bevölkerung auftretende Keimbahnvariante in einem Gen dargestellt, die nicht mit einer Erkrankung assoziiert ist, und die detektierte Mutation nicht zu einem Aminosäureaustausch führt, wurden betroffene Patientinnen als nicht-mutiert eingestuft.

**Tabelle 4.1: EGFR-Mutationen in BCBM-Patientinnen.** Die Lokalisation der detektierten Mutationen in der codierenden Sequenz (c.) sind auf mRNA-Ebene (mRNA) für die jeweilige Patientin in einer Zeile dargestellt. Die Auswirkungen der Mutationen auf Proteinebene (Protein, p.) sind dem gegenüber gestellt. Ein Austausch ist mit einem stilisierten Pfeil (>) illustriert. Der Mutationsstatus (Status) wurde in Basenpaartausche untergliedert, die auch in Normalgewebe detektiert wurden (SNP) bzw. keine Auswirkungen auf Proteinebene haben (stille Mutation). A: Adenin, BCBM: Mammakarzinompatientin mit Gehirnmetasasen, C: Cytosin, G: Guanin, Q: Glutamin, R: Arginin, T: Thymin

Patientin	EGFR-Mutationen							
	mRNA	Protein	Status					
BCBM-02	c.2361G>A	p.Q787Q	SNP					
BCBM-04	c.2361G>A	p.Q787Q	SNP					
BCBM-05	c.2361G>A	p.Q787Q	SNP					
BCBM-06	c.2361G>A	p.Q787Q	SNP					
BCBM-08	c.2361G>A	p.Q787Q	SNP					
BCBM-17	c.2361G>A	p.Q787Q	SNP					
BCBM-18	c.2361G>A	p.Q787Q	SNP					
BCBM-21	c.2361G>A	p.Q787Q	SNP					
BCBM-22	c.2361G>A	p.Q787Q	SNP					
BCBM-23	c.[2361G>A, 2508C>T]	p.[Q787Q, R836R]	SNP, stille Mutation					
BCBM-24	c.2361G>A	p.Q787Q	SNP					
BCBM-26	c.2361G>A	p.Q787Q	SNP					

Das Vorhandensein des EGFRvIII-Transkripts in BCBM-Patientinnen wurde über spezifische Primer gegen Exon 1 (überspannt die 5'-untranslatierte Region und den Anfang von Exon 1) und Exon 8 mittels PCR-Analyse ermittelt. Die Amplifikation der Exone 1-8 der EGFR-Wildtypsequenz in cDNA führte zu einem Produkt mit der Größe von 1034 bp und in der EGFRvIII-Variante zu einem 230 bp umfassenden Produkt (siehe Abb. 4.8). Ein Plasmid mit der humanen EGFRvIII-Sequenz (pCDNA3.1/ EGFRvIII) fungierte als Positivkontrolle für das EGFRvIII-Transkript und cDNA der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 wurde als Wildtypkontrolle eingesetzt. Sie verfügt zwar über eine *EGFR*-Amplifikation, jedoch liegt keine EGFRvIII-Deletion bevor, so dass ein PCR-Produkt in der Größe der Wildtypsequenz zu erwarten war. In keiner der 19 untersuchten BCBM-Proben war eine Deletion der Exone 2-7 nachweisbar. Von fünf Proben war eine Amplifikation der cDNA nicht möglich. 4 Ergebnisse



**Abb. 4.7: Chromatogramme von Mutationen in der TKD der EGFR-mRNA in BCBM-Patientinnen.** A: Dargestellt ist die Wildtypsequenz der EGFR mRNA-Region um c.2361G und die den SNP c.2361G>A umgebende Sequenz in hetero- bzw. homozygoter Ausprägung. B: Illustration des EGFR-mRNA Bereiches der Wildtypsequenz um c.2508C sowie um die stille Mutation c.2508C>T in ihrer heterozygoten Variante. Die genaue Lokalisation der betroffenen Base ist mit einem abwärts gerichteten Pfeil und ein Basenpaaraustausch mit einem stilisierten Pfeil (>) illustriert. A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin.



**Abb. 4.8: PCR-Analyse auf die EFGRvIII-Variante in BCBM-Patientinnen.** Produkte einer PCR-Amplifikation der *EGFR*-Genregion zwischen Exon 2-8 aus der cDNA von BCBM-mRNA Proben im 2 %igen Agarosegel. pCDNA3.1/EGFRvIII: Plasmid mit dem humanen EGFRvIII-Sequenz, MDA-MB-468: Mammakarzinomzelllinie mit Wildtyp-EGFR-Gensequenz, BCBM: Patientin mit einer Gehirnmetastase des Mammakarzinoms.

Zusammenfasend kann davon ausgegangen werden, dass Mutationen in der TKD und die Deletions-

variante EGFRvIII in BCBM eine untergeordnete Rolle spielen.

### 4.1.1.3 Analyse des EGFR-Proteinlevels

Erhöhte EGFR-Proteinspiegel treten verhältnismäßig häufig in Mammakarzinomprimärtumoren und im GBM auf. Hohe EGFR-Proteinspiegel sind im GBM sowie im primären Mammakarzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert <sup>200–202</sup>. Größere Mengen des Rezeptors führen zu mehr Bindestellen für Dimerisierungs-induzierende Liganden und somit zu erhöhter Signalweiterleitung. Dies begünstigt u.a. das Zellwachstum und die Proliferation <sup>85</sup>. Zur Ermittlung der EGFR-Proteinspiegel in den BCBMund den BCOM-Proben sowie den Proben der Patientinnen aus den Primärtumorsubgruppen wurden IHC-Färbungen mit einem gegen das EGFR-Protein gerichteten Antikörper angefertigt, dessen Signal mit einer DAB-Färbung sichtbar gemacht wurde. Als Gegenfärbung der Zellkerne diente eine Hämalaun-Färbung. Da es sich bei EGFR um einen transmembranären Rezeptor handelt, wird das Signal typischerweise in der Membran detektiert. Konnte keine Membranfärbung in Tumorarealen detektiert werden, wurde die Probe als EGFR-negativ eingestuft (Abb. 4.9 A). Signale in starker, moderater und schwacher Intensität wurden als EGFR-positiv gewertet (Abb. 4.9 B-D, siehe Anschnitt 3.2.3.4.1).



**Abb. 4.9: IHC-Analyse der EGFR-Proteinspiegel an Mammakarzinomproben.** Dargestellt sind Tumorareale ohne detektierbare EGFR-Proteinspiegel (negativ, A), mit schwacher (1+, B), moderater (2+, C) sowie starker (3+, D) Signalintensität des EGFR-Antikörpers an der Zellmembran, EGFR-Signal: braun, Nukleus: blau. Die Präparate wurden mikroskopisch bei 200facher Vergrößerung beurteilt und dokumentiert.

EGFR-Proteinspiegel konnte in 28 BCBM-, 13 BCOM- und 39 Primärtumorproben ermittelt werden. Eine Membranfärbung wurde in zehn BCBM- (36%), einer BCOM (8%) und vier Primärtumorpatientinnen (10%) detektiert (Abb. 4.10 A). Je zwei der untersuchten Primärtumorproben mit BCBM (25%) bzw. mit BCOM (10%) wiesen messbare EGFR-Proteinspiegel auf (Abb. 4.10 B). Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde zwischen den EGFR-Proteinspiegel der BCBM-Proben und Primärtumorproben, besonders jener ohne Metastasen oder BCOM, nachgewiesen (beide  $p \le 0,05$ ).



**Abb. 4.10: EGFR-positive Fälle aus den untersuchten Kohorten und deren Subgruppen.** Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe mit EGFR-positivem Proteinspiegel (A, B) ist auf der y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen, *PT brain-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT bone-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen). \*: p < 0,05.

Alle drei verfügbaren korrespondierenden Primärtumor- und BCBM-Proben zeigten übereinstimmende Proteinspiegel (siehe Abb. 4.11). In Proben von zwei Patientinnen waren keine detektierbaren EGFR-Proteinspiegel nachweisbar. Unter ihnen war auch der Fall mit abweichendem EGFR-Zugewinn im korrespondierenden BCBM-Gewebe. Dagegen war das Tumorgewebe einer Patientin EGFRpositiv.



**Abb. 4.11:** EGFR-Proteinspiegel in allen untersuchten gepaarten BCBM- und Primärtumorproben. Dargestellt sind die EGFR-Proteinspiegel in Primärtumorpatientinnen (linke y-Achse) gegen die Spiegel ihrer gepaarten Metastasen (rechte y-Achse). Nicht detektierbare Proteinspiegel wurden als Wildtyp interpretiert und als Wert von 0 im Diagramm dargestellt. Jegliche messbare Proteinspiegel wurden als erhöhte Spiegel beurteilt und als Wert von 1 illustriert. Patientinnen mit EGFR-negativem Primärtumor- und BCBM-Gewebe (n = 3), EGFR-positives Primärtumor- und BCBM-Gewebe (n = 1).

Zusammenfassend kann angeführt werden, dass EGFR-positive Fälle signifikant häufiger unter den BCBM-Patientinnen und Primärtumorpatientinnen mit BCBM, jedoch nicht unter den Primärtumorpatientinnen ohne Rezidive oder mit Knochenrezidiven zu finden sind. Ferner ist in allen Patientinnen, von denen sowohl Primärtumor- als auch BCBM-Gewebe verfügbar waren, der in der BCBM detektierte Proteinspiegel bereits im Primärtumor vorhanden. Dies impliziert eine Organotropie EGFR-positiver Zellen primärer Mammakarzinome für das Gehirn.

#### 4.1.1.4 *Korrelation der EGFR-Kopienanzahl mit dem EGFR-Proteinlevel*

Das Patientenkollektiv wurde mittels qPCR- und FISH-Analysen auf Veränderungen der *EGFR*-Kopienanzahl untersucht. Ferner wurden IHC-Analysen zur Bestimmung der EGFR-Proteinspiegel durchgeführt. Anschließend wurden die Resultate beider Analysen verglichen und der Grad der Überstimmung der Kopienanzahl und der Proteinspiegel ermittelt. Zusammengenommen wiesen daher alle Proben mit einer *EGFR*-Amplifikation, für die sowohl die Kopienanzahl als auch der Proteinspiegel verfügbar waren (n = 7), eine eindeutige EGFR-Membranfärbung auf (Abb. 4.12). Im Gegensatz hierzu waren in 4% (2/45) der Patientinnen mit normaler Kopienanzahl messbare EGFR-Proteinspiegel nachweisbar. In Tumorproben mit *EGFR*-Zugewinn wurden variable EGFR-Proteinspiegel nachgewiesen. In 32% dieser Patientinnen (6/19) war eine starke Membranfärbung detektierbar, während 13 Patientinnen negativ für EGFR waren.



**Abb. 4.12: Vergleich der EGFR-Kopienanzahl und der Proteinspiegel in allen untersuchten Proben.** Dargestellt ist die Kopienanzahl (linke y-Achse) gegen die Proteinspiegel derselben Proben (rechte y-Achse) in allen untersuchten Proben, für die Resultate beider Analysen verfügbar waren (n = 47). Linke y-Achse: Proben mit diploid vorliegendem EGFR, einem EGFR-Zugewinn und einer -Amplifikation sind mit einem Wert von 2, 4 bzw. 5 illustriert. Rechte y-Achse: Nicht detektierbare Proteinspiegel sind als Wert von 0 und schwache, moderate oder hohe Proteinspiegel als Werte von 1, 2 oder 3 dargestellt. Diploides EGFR wurde mit nicht-detektierbaren Proteinspiegel gleichgestellt. Dasselbe gilt für einen Zugewinn und moderate Proteinspiegel bzw. eine Amplifikation und hohe Proteinspiegel. Daher wurden die entsprechenden Werte auf denselben Höhen der jeweiligen Achsen angeordnet. Patientinnen mit diploider *EGFR*-Kopienanzahl und EGFR-negativem Tumorgewebe (n = 44) bzw. hohen EGFR-Proteinspiegel (n = 2), mit *EGFR*-Zugewinn und EGFR-negativem Tumorgewebe (n = 13) bzw. moderaten oder hohen Proteinspiegel (n = 2) bzw n = 4) sowie mit *EGFR*-Amplifikation und schwachen Proteinspiegel (n = 1) bzw. hohen Proteinspiegel (n = 6).

Ferner waren in drei BCBM-Patientinnen heterogene EGFR-Proteinspiegel nachweisbar (siehe Tabelle 9.4 im Anhang). Alle verfügten über eine *EGFR/Chr2*-Ratio von 2-5 in den qPCR-Analysen. In einer FISH-Analyse konnten in Tumorgewebe klar abgegrenzte Regionen mit *EGFR*-Zugewinn und – Amplifikationen nachgewiesen werden, die in der IHC-Analyse niedrigen und hohen Proteinspiegel zugeordnet werden konnten.

Somit kann summiert werden, dass sich Analysen der Kopienanzahl und des Proteinspiegels generell gut ergänzen, jedoch ein Zugewinn der *EGFR*-Kopienanzahl (auch innerhalb des Tumorgewebes einer Patientin) zu variablen Proteinspiegeln und somit verfälschten Werten der qPCR-Analyse führt.



**Abb. 4.13**: **Darstellung der FISH- und der IHC-Analyse einer BCBM-Patientin mit heterogenen EGFR-Proteinspiegeln.** FISH-Analyse eines Tumorareals mit *EGFR*-Zugewinn (A) bzw. mit einer -Amplifikation (B) sowie diploidem *Zentromer 7 (CEP7)*. Die Signale der *EGFR*-Sonde sind in rot und die des *CEP7* in grün dargestellt. Der Vergrößerungsfaktor ist 1000x.Die IHC-Analyse derselben Tumorareale zeigt entsprechende schwache (C) bzw. starke EGFR-Membranfärbung. Verändert nach Hohensee *et al.* <sup>198</sup>

### 4.1.1.5 Kombinierter EGFR-Status

Im Zuge dieser Studie wurde die *EGFR*-Kopienanzahl, -Mutationen sowie der EGFR-Proteinspiegel an einer Kohorte aus 29 BCBM, 15 BCOM und 60 primären MaCa Proben analysiert. Aus den Resultaten beider Analysen wurde ein kombinierter EGFR-Status erstellt, da die Ergebnisse aus den qPCR- und den IHC-Analysen sich gegenseitig bestätigen und um den Abgleich mit anderen untersuchten Faktoren zu erleichtern. Der kombinierte EGFR-Status basierte primär auf dem Proteinspiegel. Wenn jedoch keine Resultate der IHC-Analyse verfügbar waren, wurden Patientinnen mit einer *EGFR*-Amplifikation als "Mutante" (MUT) definiert. Der EGFR-Status war von allen 29 BCBM- und 60 Primärtumorpatientinnen sowie von 14 BCOM-Proben verfügbar (siehe Tabelle 9.4, Tabelle 9.5 und Tabelle 9.6 im Anhang).

Etwa ein Drittel (35 %) der BCBM-Patientinnen wies einen veränderten EGFR-Status auf. Dies war dagegen bei nur 7 % der BCOM- und Primärtumorpatientinnen der Fall. Unter den Primärtumorpatientinnen ohne Rezidivbildung (0 %) oder mit BCOM (7 %), insbesondere unter jenen mit späteren Knochenmetastasen (0 %), war eine Veränderung des EGFR-Status signifikant seltener als unter den BCBM-Patientinnen (alle p < 0,05, siehe Abb. 4.14).



**Abb. 4.14:** Häufigkeiten von EGFR-Alterationen in den untersuchten Kohorten und deren Subgruppen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe mit verändertem EGFR-Status (A, B) ist auf der Y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT bone-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT bone-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen). \*: p < 0,05; \*\* p < 0,01.

Wie sich schon in der Analyse der Proteinspiegel angedeutet hat, wurde auch im kombinierten Status nachgewiesen, dass Patientinnen mit verändertem EGFR signifikant häufiger unter den BCBM-Patientinnen und Primärtumorpatientinnen mit BCBM, jedoch nicht unter Primärtumorpatientinnen ohne Rezidive oder mit Knochenrezidiven zu finden sind. Dies unterstützt die These der gehirnspezifischen Metastasierung EGFR-alterierter, primärer Mammakarzinome.

#### 4.1.1.6 Korrelation des EGFR-Status mit klinischen Daten

Der EGFR-Status von Primärtumor- und BCBM-Patientinnen wurde mit den klinischen Daten in Beziehung gesetzt. Für die Parameter Alter bei Primärtumor- bzw. bei Rezidivresektion, Tumor-, Lymphknoten- bzw. Metastasierungsstatus, Differenzierungsgrad und Tumortyp war keine Korrelation zu verändertem EGFR-Status nachweisbar. Der HR-Status sowie der Mammakarzinomsubtyp wiesen eine signifikante Korrelation zu EGFR-Alterationen auf. BCBM-Patientinnen mit verändertem EGFR-Status wurden in 86% der Gruppe mit *triple*-negativem Mammakarzinom (TNBC) detektiert, jedoch nur in 17% der HER2- sowie in 22% der HR-positiven Patientinnen (p < 0,01). Auch unter Primärtumorpatientinnen trat ein veränderter EGFR-Status hauptsächlich bei TNBC-Fällen (20%) auf, verglichen mit 0% der HER2- bzw. 3% der HR-positiven Patientinnen (p = 0,063) (siehe Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2:** Korrelation des kombinierten EGFR-Status mit Brustkrebssubtyp und Hormonstatus in primärem BC und BCBM. Dargestellt ist die Anzahl und der Prozentsatz (in Klammern) von Primärtumor- und BCBM-Patientinnen mit positivem (HR+) bzw. negativem (HR-) Hormonreptorstatus sowie mit HR+, HER2-positivem (HER2+) oder *triple*-negativem (HR- und HER2-negativ, TNBC) Brustkrebssubtyp aus den Fällen mit Wildtyp- (WT) bzw. verändertem-EGFR-Status. Die Signifikanz wurde in Form eines p-Wertes illustriert. p < 0,05 entspricht hierbei einem signifikantem und p < 0,01 einem hochsignifikanten Wert. Nicht signifikante Werte wurden als n.s. angegeben. Verändert nach Hohensee *et al.*<sup>198</sup>

	Hormonrezeptor				Subtyp							
	р	ositiv	n	egativ	p-		HR+	F	IER2+	1	NBC	p-
	n	(%)	n	(%)	Wert	n	(%)	n	(%)	n	(%)	Wert
Primärtumoren												
EGFR												
WТ	40	(97,6)	13	(81,3)	n.s.	31	(96,9)	9	(100,0)	12	(80,0)	n.s.
mutiert	1	(2,4)	3	(18,7)		1	(3,1)	0	(0,0)	3	(20,0)	
					Geh	irnme	etastasen					
EGFR												
WT	15	(78,9)	3	(33,3)	< 0,05	7	(77,8)	10	(83,3)	1	(14,3)	< 0,01
mutiert	4	(21,1)	6	(66,7)		2	(22,2)	2	(16,7)	6	(85,7)	

Zur Datenerhebung für Überlebensanalysen wurden im Zuge der Nachsorge Informationen über das Überleben bzw. Versterben der Patientinnen gesammelt und der Rezidivierungsstatus in Erfahrung gebracht. Ausschließlich für die Kohorte der Primärtumorpatientinnen waren Nachsorgeinformationen verfügbar. Die mittlere Zeitspanne der Nachsorge (*Follow-up*) betrug 57 Monate (Zeitspanne: 0,5-140 Monate, siehe Tabelle 9.7 im Anhang). Die mittlere Zeitspanne von der Primärtumorresektion bis zur Resektion des Rezidivs in der gesamten Primärtumorkohorte lag bei 31 Monaten, während die mittlere Zeitspanne bis zum Versterben der Primärtumorpatientinnen 40 Monate betrug. Die mittlere Zeitspanne bis zur Resektion des Rezidivs in der BCBM-Kohorte lag bei 63 Monaten (siehe Tabelle 9.8 im Anhang). Die Überlebensanalyse der Primärtumorpatientinnen ergab eine signifikante Korrelation von verkürztem progressionsfreien Überleben (*recurrence-free survival*, RFS) mit einem erhöhten EGFR-Proteinspiegel, sowie mit Veränderungen der -Kopienanzahl und des -Status (alle p < 0,001). Auch die Gesamtüberlebenszeit (*overall survival*, OS) zeigte eine signifikante Assoziation mit dem EGFR-Proteinspiegel sowie dem kombinierten -Status (alle p < 0,001) (siehe Abb. 4.15).



**Abb. 4.15: Assoziation von EGFR mit dem Überleben der PT-Kohorte.** Die Auswirkung der *EGFR*-Kopienanzahl (A, n = 48), des -Proteinspiegel (B, n = 34) sowie des kombinierten -Status' (C, n = 48) auf das progressionsfreie Überleben (RFS) wurden über den LOG-Rank-Test ermittelt und in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Zusätzlich ist die Korrelation des EGFR-Proteinspiegel (D, n = 36) und des kombinierten -Status' (E, n = 52) auf das Gesamtüberleben (OS) abgebildet. Eine durchgehende Linie illustriert eine normale Kopienanzahl, eine gepunktete Linie einen Zugewinn und eine gestrichelte Linie eine Amplifikation (A). Nicht-messbare EGFR-Proteinspiegel bzw. ein normaler Status (WT) sind durch eine durchgängige Linie und eine erhöhte Proteinspiegel bzw. ein alterierter Status sind als gestrichelte Linie wiedergegeben. Verändert nach Hohensee *et al.*<sup>198</sup>

Es kann somit geschlussfolgert werden, dass bereits ein Zugewinn der *EGFR*-Kopienanzahl zu einem verminderten progressionsfreiem Überleben führt und daher die Analyse der *EGFR*-Kopienanzahl unter Einbeziehung eines (moderaten) Zugewinns und nicht nur der Betrachtung einer hochgradigen Amplifikation möglicherweise Eingang in der Routinediagnostik finden sollte.

### 4.1.2 Der HER2-Status

### 4.1.2.1 Ermittlung des HER2-Status'

Eine *HER2*-Überexpression tritt in etwa einem Viertel aller primären Mammakarzinomtumore auf <sup>126</sup>. Die Ursache hierfür liegt in den meisten Fällen in der Amplifikation des Chromosomenabschnittes, der den HER2-Lokus umgibt <sup>128</sup>. Die Bestimmung des HER2-Status ist mittlerweile Bestandteil der klinischen Routine zur Definition eines Mammakarzinomsubtyps. Sie erfolgt primär immunhistochemisch über die Ermittlung des HER2-Proteinspiegels und wird über FISH-Analysen verifiziert, wenn das Resultat der IHC-Analysen keine eindeutige Zuordnung zulässt <sup>193</sup>.

Um zu klären, ob amplifiziertes *HER2* schon im Primärtumorgewebe von BCBM vorliegt und ob Patientinnen mit *HER2*-Amplifikation zielgerichtet in bestimmte Gewebe metastasieren, wurden, wie für die Ermittlung der EGFR-Proteinspiegel, IHC-Analysen über einen gegen HER2 gerichteten Antikörper durchgeführt. Eine starke Signalintensität wurde als HER2-positiv gewertet. Proben ohne detektierbare Signale oder mit schwachen Signalen wurden als Wildtyp eingestuft (Abb. 4.16). Proben mit einer moderaten Signalintensität wurden mittels FISH-Analyse validiert, da eine *HER2*-Genamplifikation als Hauptursache der *HER2*-Überexpression im Mammakarzinom belegt ist. Eine Kopienanzahl von n > 2,2 wurde basierend auf klinischen Standards als Amplifikation gewertet<sup>193</sup>. In der untersuchten BCBM-Patientenkohorte wurden je drei Primärtumor- und BCBM-Proben mit moderaten HER2-Proteinspiegeln detektiert, denen kein klarer HER2-Status zugeordnet werden konnte. Alle Proben wurden in einer FISH-Analyse als HER2-negativ verifiziert.



Abb. 4.16: FISH-Analysen von HER2. Dargestellt sind diploide Zellen mit diploid vorliegendem HER2 (A), einem Zugewinn (B) und hochgradig amplifiziertem HER2 (C) sowie Zellen mit einer Polysomy des Chromosoms 17 (D).

Der HER2-Status wurde in insgesamt 29 BCBM-, 11 BCOM- und 58 Primärtumorproben ermittelt, von denen 12 BCBM- (41 %), zwei BCOM- (18 %) und neun Primärtumorpatientinnen (16 %) als HER2-positiv eingestuft wurden. In der Primärtumorkohorte wurden *HER2*-Amplifikationen in drei der Patientinnen ohne Rezidiv, einer Patientin mit BCBM (beide 13 %) und in sechs Patientinnen mit BCOM (21 %) detektiert. Von Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen verfügten zwei über *HER2*-Amplifikationen (15 %). Diese Verteilung entspricht einer signifikant höheren Frequenz in BCBM- als in Primärtumorproben, was besonders auf den Vergleich mit Primärtumoren ohne Rezidivbildung zutrifft (beides p < 0,05) (siehe Abb. 4.17).



Abb. 4.17: Häufigkeit von HER2-positiven Patientinnen in den untersuchten Kohorten und deren Subgruppen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe mit verändertem HER2-Status (A, B) ist auf der Y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen, *PT brain-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT bone-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen). \*: p < 0,05. Verändert nach Hohensee *et al.*<sup>198</sup>

Für diese Analyse des HER2-Status standen insgesamt 18 Paare von korrespondierendem Primärtumor- und BCBM-Gewebe zur Verfügung, an denen abgelesen werden konnte, ob der HER2-Status zwischen Primärtumor- und BCBM-Stadium variierte (Tabelle 4.3). Die Resultate der gepaarten Primärtumor- und BCBM-Gewebe waren zu 83 % identisch. Drei Patientinnen wiesen jedoch eine *de novo* auftretende HER2-Expression im BCBM-Gewebe auf (Abb. 4.18).

Zusammenfassend sollte erwähnt werden, dass HER2-positive Fälle signifikant häufiger in BCBM- als in Primärtumorpatientinnen vorkamen, wo sie in den Subgruppen ohne Rezidive, mit BCBM oder Knochenmetastasen etwa gleichstark vertreten waren. Auch unter den BCOM-Patientinnen traten erhöhte HER2-Proteinspiegel auf. Generell war der HER2-Status zwischen Primärtumor- und BCBM-Gewebe kongruent, allerdings wurde in 17 % der BCBM-Patientinnen ein *de novo* auftretender HER2positiver Status nachgewiesen. Patientinnen mit einem solchen HER2-Expressionsmuster würden der Behandlung mit HER2-spezifischen Therapeutika entgehen. **Tabelle 4.3: HER2-Status der analysierten BCBM-Proben und ihren gepaarten Primärtumorgeweben.** Der HER2-Status in Primärtumorgewebe (PT) und BCBM-Proben (BCBM) der jeweiligen Patientin wurde als normal (WT) oder amplifiziert (AMP) angegeben.

Patientin	HER2-Status					
	РТ	BCBM				
BCBM-01	WT	AMP				
BCBM-02	AMP	AMP				
BCBM-03	WT	WT				
BCBM-04	AMP	AMP				
BCBM-07	WT	WT				
BCBM-08	AMP	AMP				
BCBM-09	WT	WT				
BCBM-10	WT	AMP				
BCBM-12	WT	AMP				
BCBM-13	WT	WT				
BCBM-14	WT	WT				
BCBM-15	AMP	AMP				
BCBM-16	WT	WT				
BCBM-18	AMP	AMP				
BCBM-19	WT	WT				
BCBM-20	WT	WT				
BCBM-24	WT	WT				
BCBM-26	WT	WT				



**Abb. 4.18: HER2-Status der verfügbaren gepaarten BCBM- und Primärtumorproben.** Dargestellt ist der HER2-Status in Primärtumorpatientinnen (linke Y-Achse) gegen den Status ihrer gepaarten Metastasen (rechte Y-Achse). HER2-negative Fälle wurde als 0 und HER2-positive Fälle als 1 illustriert. Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor- und BCBM-Gewebe (n = 10), HER2-positivem Primärtumor- und BCBM-Gewebe (n = 5) bzw. HER2-negativem Primärtumor- und HER2-positivem BCBM-Gewebe (n = 3).

#### 4.1.2.2 Korrelation des HER2-Status mit klinischen Daten

Der HER2-Status von Primärtumor- und BCBM-Patientinnen wurde mit den klinischen Daten in Beziehung gesetzt. Für die Parameter Alter bei Primärtumor- bzw. bei Rezidivresektion, Tumor-, Lymphknoten- bzw. Metastasierungsstatus, Differenzierungsgrad und Tumortyp war keine Korrelation zu verändertem HER2-Status nachweisbar. Weiterhin bestand keine Korrelation mit dem Gesamtüberleben oder dem progressionsfreiem Überleben.

#### 4.1.3 Der PTEN-Status

#### 4.1.3.1 Analyse der allelischen Imbalanz des PTEN-Gens

Im Normalfall liegen für jedes Gen beim Menschen zwei Allele vor, die von beiden Elternteilen vererbt werden. Man spricht hierbei von Heterozygotie. Kommt es durch Deletion zum Verlust eines Allels, wird dies als allelische Imbalanz (AI) bezeichnet. AI des *PTEN*-Lokus' auf dem Chromosomenabschnitt 10q23.3 ist ein häufig auftretendes Merkmal im Mammakarzinom und GBM<sup>160,162,163,203</sup>. Generell wird der Verlust eines Allels von dem gesunden Allel kompensiert, jedoch wurde belegt, dass bezüglich *PTEN* ein Dosiseffekt vorliegt <sup>204</sup>.

Die Heterozygotie von Genen kann durch die Analyse von Mikrosatelliten, auch als *short tandem repeats* bezeichnet, bestimmt werden. Mikrosatelliten sind nicht-kodierende Abschnitte repetitiver DNA mit Wiederholungen von 2-4 Nukleotiden, die als informative Marker für den Verlust eines Chromosomenabschnittes genutzt werden können. Hierzu werden die Genabschnitte ausgewählter Mikrosatelliten aus Tumor- und korrespondierender DNA aus Normalgewebe mittels PCR amplifiziert und ein Quotient der Längen der entstandenen spezifischen Produkte gebildet. In dieser Studie wurden die den Lokus des Tumorsuppressorgens *PTEN* (chr10: 89.623.195-89.728.532) umgebenden Mikrosatellitenmarker D10S541 (chr10:89.891.492-90.091.846) und D10S1765 (chr10: 89.891.492-90.091.846) untersucht. Werte von >2 wurden als AI gewertet. Die zugrundeliegende Berechnung wurde in Abschnitt 3.2.1.8 ausführlich erläutert.

Die Mikrosatellitenanalyse der meisten Fälle wurde bereits vor Beginn dieser Studie durchgeführt<sup>189</sup>. Im Zuge dieser Studie wurde der Al-Status für die untersuchte Kohorte soweit als möglich komplettiert. Der Al-Status aus der Mikrosatellitenanalyse wurde mit dem bereits vor Beginn dieser Studie durch komparative genomische Hybridisierung (CGH) ermittelten Status des *PTEN*-Lokus' zu einer *PTEN*-Genkopienanzahl abgeglichen. Die Resultate beider Analysen stimmten in 92 % aller untersuchten Fälle überein. In den beiden Fällen mit abweichenden Resultaten wurde die *PTEN*-Genkopienanzahl basierend auf der CGH-Analyse definiert.

89

**Tabelle 4.4: Resultate der Mikrosatelliten- und CGH-Analyse.** Der Mikrosatelliten-Status und der Status des *PTEN*-Lokus aus der CGH-Analyse in den untersuchten BCBM- (BCBM) und Primärtumorpatientinnen (PT) ist hier vergleichend dargestellt. Der Mikrosatelliten-Status bzw. der Status aus der CGH-Analyse sind als normal (heterozygot bzw. diploid) oder als mutiert (AI bzw. Verlust) dargestellt.

Patientin	Mikrosatelliten	CGH							
Gehirnmetastasen									
BCBM-01	AI	Verlust							
BCBM-02	heterozygot	diploid							
BCBM-03	heterozygot	Verlust							
BCBM-04	AI	Verlust							
BCBM-05	AI	Verlust							
BCBM-06	AI	Verlust							
BCBM-07	AI	Verlust							
BCBM-21	AI	Verlust							
	Primärtumore								
PT-004	heterozygot	diploid							
PT-005	AI	diploid							
PT-007	heterozygot	diploid							
PT-010	heterozygot	diploid							
PT-013	AI	Verlust							
PT-014	heterozygot	diploid							
PT-015	heterozygot	diploid							
PT-016	heterozygot	diploid							
PT-017	heterozygot	diploid							
PT-018	AI	Verlust							
PT-019	heterozygot	diploid							
PT-020	heterozygot	diploid							
PT-021	heterozygot	diploid							
PT-022	heterozygot	Verlust							
PT-023	AI	diploid							
PT-024	AI	diploid							
PT-036	AI	diploid							

Die PTEN-Kopienanzahl wurde 21 BCBM- und 5 BCOM-Patientinnen sowie 50 Primärtumorpatientinnen, bestimmt. Zwölf Patientinnen aus der BCBM-Kohorte (57%), vier der BCOM- (80%) und elf Primärtumorpatientinnen (22%) wiesen einen *PTEN*-Verlust auf. Dagegen wurde ein Verlust in drei der Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen (15%) und vier Patientinnen mit BCOM (17%) nachgewiesen – davon zwei Patientinnen mit Knochenmetastasen (15%). In fünf Primärtumorpatientinnen mit BCBM (63%) lag ebenfalls eine AI vor. Diese Verteilung legt einen signifikant höheren Anteil von BCBM-Patientinnen mit *PTEN*-Verlust im Vergleich zu Patientinnen mit primärem Mammakarzinom dar (p < 0,01), was auf alle Subgruppen außer Patientinnen, die im weiteren Krankheitsverlauf BCBM entwickelten, zutrifft (p < 0,05 und p < 0,01).



Abb. 4.19: Häufigkeit eines Verlustes der *PTEN*-Genkopienanzahl in den untersuchten Kohorten und deren Subgruppen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe (A,B) mit einem Verlust ist auf der Y-Achse dargestellt . BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen, *PT brain-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT bone-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen). Die Summe aller untersuchten Patientinnen der jeweiligen Kohorte ist auf der Abszissenachse dargestellt. \*: p < 0,05, \*\*: p < 0,01

Zusammenfassend sollte erwähnt werden, dass der Verlust der PTEN-Kopienanzahl signifikant häufiger in BCBM-Patientinnen und Primärtumorpatientinnen mit BCBM auftritt, jedoch sogar in einer höheren Frequenz unter BCOM auftritt.

### 4.1.3.2 **PTEN-Mutationsanalyse**

Neben dem Verlust des vollständigen *PTEN*-Lokus sind auch Punktmutationen mit einer schlechten Prognose im primären Mammakarzinom und GBM assoziiert <sup>205</sup>. Viele der Mutationen sind in der katalytischen Domäne und dort hauptsächlich in den Exonen 3 und 5 lokalisiert (siehe Abb. 4.20). Sie führen zu einer Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität von PTEN. Um zu überprüfen, ob in der analysierten Kohorte Mutationen in der für PTEN kodierenden Region vorliegen, wurde die vollständige CDS aus Tumorgewebe von elf BCBM-Patientinnen über spezifische Oligonukleotide mittels PCR-Reaktion amplifiziert und nach einer Sanger-Sequenzierung auf Mutationen untersucht. Zusätzlich wurde Tumor-DNA von 12 BCBM-, drei BCOM- und 31 Primärtumor-Proben auf Mutationen in den beiden Exonen mit der zum Zeitpunkt der Analyse höchsten bekannten Mutationsrate (Exon 3 und 5) nach PCR-Amplifikation der betreffenden Bereiche ebenfalls über eine Sequenzierung nach Sanger analysiert.



**Abb. 4.20: Histogramme von PTEN-Mutationen im primären Mammakarzinom und Gehirntumoren.** Im oberen Bereich ist die Anzahl belegter Fälle mit Punktmutationen (*Substitutions*) im primären Mammakarzinom (A) und Gehirntumoren (Überblick über alle Entitäten, B) auf der Y-Achse gegen deren Position in der PTEN-Proteinsequenz auf der Abszisse illustriert. Darunter ist die Lokalisation der einzelnen Domänen sowie der Exone in der Gesamtproteinsequenz abgebildet (*Pfam*). Grün: katalytische Domäne (*DSPc*), rot: Membran-bindende C2-Domäne (*PTEN C2*), grau: Exone. Ferner ist die Lokalisation komplexer Mutationen (*Complex*) sowie von Insertionen (blau) und Deletionen (rot) (*Ins/del*) auf der Abszisse dargestellt. Die Daten wurden aus der COSMIC Datenbank entnommen und veranschaulichen die Anhäufung von Mutationen im Bereich der Exone 3 und 5 sowohl im Mammakarzinom als auch in Gehirntumoren<sup>164</sup>.

*PTEN*-Mutationen wurden in vier BCBM-Patientinnen (17 %), aber in keiner der Primärtumorpatientinnen detektiert. Somit traten Mutationen im Vergleich zu den Primärtumoren signifikant häufiger in BCBM-Patientinnen auf (p < 0,05, siehe Tabelle 4.5). In einer Patientin fand sich die Basenpaarsubstitution c.389G>T (p.R130L) in Exon 5. Drei Patientinnen wiesen umfangreiche Deletionen auf. Eine Patientin trug eine 39 bp umfassende-Deletion, welche die Spliceakzeptorstelle von Exon 4 miteinschloss (g.72586del39). Dies verursacht den Verlust des gesamten Exon 4 auf Transkriptebene und führt somit zu einem trunkierten Protein (p.L70fs\*7)<sup>206</sup>. Eine weitere Patientin trug eine heterozygote Deletion, die Teile von Exon 5 sowie die vollständigen Exone 6-9 umfasste und bei bp 424 der 3'untranslatierten Region (3'-UTR) endete, was ein verkürztes Protein zur Folge hat (c.476del737, p.V165fs\*7). Bei der dritten Patientin wurde ein komplexes Mutationsmuster detektiert, das sich aus einer Deletion der Exone 4-6 auf dem einen Allel und einem Austausch (Konversion) der Exone 1-3 mit den Exonen 3-5 sowie einem deletierten Exon 6 auf dem zweiten Allel zusammensetzte (siehe Abb. 4.21). **Tabelle 4.5: Mutationen in der für das PTEN-Protein kodierenden Sequenz.** Die Lokalisation der detektierten Mutationen in der genomischen (g.), codierenden Sequenz (c.) sind auf mRNA-Ebene (mRNA) für die jeweilige Patientin in einer Zeile dargestellt. Die Auswirkungen der Mutationen auf Proteinebene (Protein, p.) sind dem gegenüber gestellt. Ein Austausch ist mit einem stilisierten Pfeil (>) illustriert. Deletierte Sequenzabschnitte sind mit einem Unterstrich (\_) verbunden. Der Mutationsstatus (Status) wurde in Verluste von Basen (Deletion), in die Vertauschung von Sequenzabschnitten (Konversion) und in Basenpaaraustausche in der kodierenden Sequenz (CDS-Mutation) untergliedert. BCBM: Mammakarzinompatientin mit Gehirnmetasasen, con: Konversion des vorangestellten mit dem nachstehenden Sequenzabschnittes, del: Deletion der Anzahl nachfolgender Basen, fs: Leserasterverschiebung um die Anzahl nachfolgende Aminosäuren, G: Guanin (in der CDS) bzw. Glycin (in der Proteinsequenz), L: Leucin, R: Arginin, T: Thymin, +: Kombination zweier Sequenzabschnitte, \*: neu ent-standener Stopcodon, ‡: neue Mutation

Patientin	PTEN-Mutationen									
	mRNA	Protein	Status							
BCBM-6	g.72586del39	p.L70fs*7	Deletion							
BCBM-7	c.[209_634del426]+[1_208con165_492; 165_492con1_208; 493_634del142]	nicht bekannt	Deletion, Konversion							
BCBM-8	c.389G>T	p.R130L	CDS-Mutation							
BCBM-24	c.493del720	p.G165_*404del	Deletion							



**Abb. 4.21: Mutationen in der PTEN mRNA.** Im oberen Abschnitt ist die Wildtypsequenz der PTEN mRNA dargestellt. Der mittlere Teil schematisiert die heterozygote Deletion von Teilen des Exons 5 sowie der vollständigen Exone 6-9 bis in die 3'-untranslatierte Region hinein. Im unteren Teil ist die Sequenz einer PTEN-Mutante illustriert, bei der auf dem einen Allel eine Deletion der Exone 4-6 (Allel 1) und auf dem anderen Allel eine Konversion der Exone 1-3 mit den Exonen 3-5 vorliegt, die eine Duplikation des Exons 3 sowie eine Deletion des Exons 6 mit einschließt.

Von einer Patientin war auf Transkriptebene kein PCR-Produkt von PTEN produzierbar, obwohl alle anderen parallel durchgeführten PCRs tadellose Ergebnisse lieferten. Des Weiteren war es nicht möglich eine Mutation in den Exonen 1, 3, 5 oder 9 oder in der Promotorregion zu identifizieren. Daher ging dieser Fall als nicht-mutiert in den *PTEN*-Mutationsstatus ein. Jedoch waren keine messbaren Proteinspiegel vorhanden, so dass dieser Fall im summierten PTEN-Status wiederum als mutiert eingestuft wurde.

Die einzige Patientin mit gepaartem Primärtumor und BCBM-Gewebe trug in beiden Proben keine *PTEN*-Mutation. Die zwei BCBM-Proben einer anderen Patientin trugen hingegen dieselbe Mutation. Von dieser Patientin war jedoch kein Primärtumorgewebe verfügbar.

Somit kann zusammengefasst werden, dass *PTEN*-Mutationen häufig in BCBM auftreten und der Mutationsstatus höchstwahrscheinlich bereits im Primärtumorgewebe vorhanden ist, da die Patientin mit zwei verschiedenen Gehirnmetastasen dieselbe Mutation trug.

### 4.1.3.3 Analyse des PTEN-Proteinstatus'

Da bei einem *PTEN*-Verlust ein Dosiseffekt eintritt, löst schon eine verminderte Menge an funktionellem PTEN-Protein eine erhöhte Aktivierung des PI3K-Signalwegs aus. Sollte ein Verlust von funktionellem PTEN im Primärtumorgewebe vorliegen, der mit BCBM assoziiert ist, würden betroffene Patientinnen von einer Therapie mit Inhibitoren profitieren, die auf Mitgliedern des PI3K-Signalswegs zielen. Bei erfolgreicher Behandlung könnte dies eine verbesserte Prognose nach sich ziehen. Um zu ermitteln, ob verringerte PTEN-Proteinspiegel in der untersuchten Kohorte vorliegen und zu einer zielgerichteten Metastasierung führen, wurden IHC-Analysen mit einem gegen PTEN gerichteten Antikörper durchgeführt und die Signale durch DAB visualisiert.



Abb. 4.22: IHC-Analyse der PTEN-Proteinspiegel. Dargestellt sind Tumorareale ohne detektierbare PTEN-Signale umgeben von PTEN-positiven Stromazellen (A) und Tumorareale mit schwachem (C), moderatem (D) oder starkem PTEN-Signal (D). Die Bilder wurden mit 20x-Vergrößerung aufgenommen.

Nicht-detektierbare (0) zytoplasmatische bzw. nukleäre Signale wurden als PTEN-Verlust und schwache (1+), moderate (2+) sowie starke Signale (3+) wurden als normale PTEN-Proteinspiegel eingestuft (Abb. 4.22). Eine genaue Beschreibung der immunhistochemischen PTEN-Analyse findet sich in Abschnitt 3.2.3.4.1. Die PTEN-Proteinspiegel von 9 BCBM-, 14 BCOM- und 43 Primärtumorproben wurden einer IHC-Analyse unterzogen. In neun BCBM (31 %), drei BCOM (21 %) und acht Primärtumor-Proben (19 %) wurde der Verlust der zytoplasmatischen Proteinexpression nachgewiesen. Zwei Primärtumorpatientinnen mit BCBM (25 %) sowie drei mit BCOM (14 %) bzw. ohne Rezidivbildung (19 %) wiesen ebenfalls einen Verlust der Proteinexpression auf (Abb. 4.23). Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des PTEN-Proteinspiegels zwischen des untersuchten Subgruppen der Patientinnen ermittelt werden.



Abb. 4.23: Häufigkeiten verminderter, zytoplasmatischer PTEN-Proteinspiegel in den untersuchten Kohorten und deren Subgruppen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe mit verminderten Proteinspiegel im Zytoplasma (A, B) ist auf der Y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen, *PT brainrelapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen).

Zwei der drei verfügbaren gepaarten Primärtumor- und BCBM-Proben wiesen identische PTEN-Proteinspiegel auf, während im BCBM-Gewebe der dritten Patientin überraschenderweise abweichende, im Primärtumor nicht detektierbare, Proteinspiegel ermittelt wurden (siehe Abb. 4.24).



**Abb. 4.24: PTEN-Proteinspiegel in allen untersuchten gepaarten BCBM- und Primärtumorproben.** Dargestellt sind die PTEN-Proteinspiegel in Primärtumorpatientinnen (linke Y-Achse) gegen die Spiegel ihrer gepaarten Metastasen (rechte Y-Achse). Moderate und hohe Proteinspiegel wurden als Wildtyp interpretiert und als Wert von 0 im Diagramm dargestellt. Nicht detektierbare oder geringe Proteinspiegel wurden als verminderte Spiegel beurteilt und als Wert von 1 illustriert. Patientinnen mit detektierbaren PTEN-Proteinspiegel in Primärtumor- und BCBM-Gewebe (n = 2) bzw. nicht detektierbaren Spiegel im BCBM-Gewebe (n = 1).

Die PTEN-Proteinspiegel wiesen in einigen Proben intratumorale Heterogenität auf. Heterogene Signalintensitäten wurden in 17 % der BCBM- und 21 % der BCOM sowie in 12 % der Primärtumorpatientinnen nachgewiesen. Unter Letzteren trat dies am häufigsten in Patientinnen mit BCBM (25 %) bzw. Knochenmetastasen auf (33 %) und war in Patientinnen mit BCOM zu 14 % zuverzeichnen. Dagegen wiesen nur 2 % der Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen heterogene PTEN-Spiegel auf (Abb. 4.25).



Abb. 4.25: Häufigkeiten heterogener, cytoplasmatischer PTEN-Proteinspiegel in den untersuchten Kohorten und deren Subgruppen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe mit heterogenen Proteinspiegeln in verschiedenen Tumorarealen (A, B) ist auf der Y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen, *PT brain-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT bone-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen). p < 0,05.

Neben der zytoplasmatischen Funktion als Lipidphosphatase verfügt PTEN über eine Proteinphosphataseaktivität, die mit der Zellzykluskontrolle in Zusammenhang steht und eine nukleäre Lokalisation des Enzyms bedingt <sup>207</sup>. Daher wurde neben der zytoplasmatischen auch die nukleäre Lokalisation betrachtet. Der Verlust nukleärer PTEN-Signale wurden in 38 % der BCBM- und 43 % der BCOM-sowie in 45 % der Primärtumorpatientinnen nachgewiesen (siehe Abb. 4.26 A). Unter Letzteren war dies am häufigsten in Patientinnen mit BCBM (75 %) der Fall. In den anderen Primärtumorsubgruppen lag ein Verlust nukleär lokalisierten PTENs etwa gleichhäufig vor (nicht rezidiviert: 50 %, BCOM: 52 %, Knochenmetastasen: 55 %; Abb. 4.26 B). Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich heterogener PTEN-Proteinspiegel zwischen den untersuchten Subgruppen der Patientinnen festgestellt werden.



Abb. 4.26: Häufigkeiten verminderter, nukleärer PTEN-Proteinspiegel in den untersuchten Kohorten und deren Subgruppen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe mit verminderten Proteinspiegel im Nucleus (A, B) ist auf der y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen, *PT brain-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT bone-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT otherrelapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen).

Alle bis auf einen Fall wiesen einen kombinierten PTEN-Verlust zytoplasmatisch und nukleär lokalisierten PTENs auf (Tabelle 4.6). Ein Verlust von ausschließlich nukleär lokalisiertem PTEN trat in drei BCBM- (10 %), vier BCOM- (21 %) und 16 Primärtumorpatientinnen (37 %) auf. Unter letzteren war dies am seltensten unter Patientinnen ohne Rezidive Fall (31 %) und mit BCOM (38 %). Unter den anderen Subgruppen wies etwa die Hälfte ausschließlich einen Verlust nukleären PTEN auf.

Es kann somit geschlossen werden, dass der Verlust zytoplasmatischen PTENs nicht in Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen auftritt, jedoch in allen anderen untersuchten Primärtumorsubgruppen sowie in BCBM und BCOM verhältnismäßig häufig vorkommt. Ferner wiesen vorrangig metastasische Mammakarzinome, besonders Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, heterogene Proteinspiegel auf. Der Verlust zytoplasmatischen PTENs ging nahezu immer mit dem gleichzeitigen Verlust nukleär lokalisierten PTENs einher. Zusätzlich wurde der Verlust von nukleärem PTEN am häufigsten unter Primärtumorpatientinnen mit BCBM, jedoch am seltensten in BCBM-Patientinnen nachgewiesen. Dies spiegelt möglicherweise eine Kopplung der Rolle von PTEN als Metastasensuppressor mit dem AKT-Signalweg wider, der durch zytoplasmatisches PTEN reguliert wird. **Tabelle 4.6: Mammakarzinompatientinnen mit divergierendem nukleärem und zytoplasmatischem PTEN-Proteinspiegel.** Der nukleäre (Nukleus) und der zytoplasmatische (Zytoplasma) PTEN-Proteinspiegel in den untersuchten BCBM-, BCOMund Primärtumorpatientinnen (PT) ist hier vergleichend dargestellt. Proteinspiegel sind als normal (1+, 2+, 3+) oder als Verlust (0) illustriert.

Patientin	Rezidiv	Proteinspiegel									
		Zytoplasma	Nukleus								
	Gehirnmetastasen										
BCBM-01	BCBM	0	1+								
BCBM-27	BCBM	2+	0								
BCBM-29	BCBM	2+	0								
BCBM-31	BCBM	1+	0								
	andere Meta	stasen									
BCOM-09	BCOM	1+	0								
BCOM-11	BCOM	1+	0								
BCOM-15	BCOM	2+	0								
	Primärtumore										
PT-004	Keines	2+	0								
PT-005	Knochen	2+	0								
PT-010	Andere	1+	0								
PT-020	Keines	3+	0								
PT-021	Keines	1+	0								
PT-028	Gehirn	1+	0								
PT-042	Gehirn	1+	0								
PT-071	Knochen	2+	0								
PT-073	Gehirn	2+	0								
PT-075	Andere	1+	0								
PT-077	Knochen	2+	0								
PT-099	Knochen	1+	0								
PT-100	Gehirn + Knochen	2+	0								
PT-101	Keines	1+	0								
PT-103	Andere	2+	0								
PT-104	Keines	1+	0								

# 4.1.3.4 Korrelation der PTEN-Kopienanzahl mit dem Mutationsstatus und dem Proteinlevel

In 39 Fällen waren Resultate von allen drei Analysen (Kopienanzahl, Mutation, Proteinspiegel) verfügbar. Übereinstimmende Resultate der Mutations- und der IHC-Analyse waren in 24 Fällen (62 %) vorhanden. In Tumorgewebe der Patientin mit einer heterozygoten Punktmutation (BCBM-08) ohne zusätzliche AI wurden messbare Proteinspiegel detektiert, wohingegen die anderen drei Mutationsträgerinnen keine PTEN-Expression aufwiesen. In elf Fällen mit heterozygotem Verlust der *PTEN*-Kopienanzahl waren dagegen normale Proteinspiegel nachweisbar, während drei Patientinnen mit unveränderter *PTEN*-Kopienanzahl und ohne Mutation dennoch kein PTEN exprimierten (Tabelle 4.7). In diesen drei Patientinnen lag möglicherweise zusätzlich eine Promotormethylierung vor. Allerdings wurden in jeweils vier Patientinnen mit heterozygotem Verlust der *PTEN*-Kopienanzahl auf die die PTEN-Expression. **Tabelle 4.7: Resultate der Analysen von Kopienanzahl, Mutationsstatus und Proteinspiegel.** Die PTEN-Kopienanzahl, der -Mutationsstatus und die -Proteinspiegel in den untersuchten BCBM- (BCBM) und Primärtumorpatientinnen (PT) ist hier vergleichend dargestellt. Kopienanzahl, Mutationsstatus bzw. Proteinspiegel sind als unverändert (diploid, WT bzw. 1+, 2+ und 3+) oder als mutiert (Verlust, MUT bzw. 0) aufgelistet.

Dationtin	Donidiu	PTEN							
Patientin	Rezidiv	Mutation	Proteinspiegel						
Gehirnmetastasen									
BCBM-01	Gehirn	Verlust	WT	1+					
BCBM-02	Gehirn	diploid	WT	2+					
BCBM-03	Gehirn	Verlust	WT	0					
BCBM-04	Gehirn	Verlust	WT	2+					
BCBM-05	Gehirn	Verlust	WT	2+					
BCBM-06	Gehirn	Verlust	MUT	0					
BCBM-07	Gehirn	Verlust	MUT	0					
BCBM-08	Gehirn	diploid	MUT	3+					
BCBM-09	Gehirn	Verlust	WT	0					
BCBM-10	Gehirn	diploid	WT	2+					
BCBM-11	Gehirn	Verlust	WT	3+					
BCBM-12	Gehirn	diploid	WT	0					
BCBM-13	Gehirn	diploid	WT	2+					
BCBM-14	Gehirn	Verlust	WT	0					
BCBM-15	Gehirn	diploid	WT	3+					
BCBM-16	Gehirn	diploid	WT	2+					
BCBM-19	Gehirn	diploid	WT	0					
BCBM-20	Gehirn	Verlust	WT	2+					
BCBM-21	Gehirn	Verlust WT		0					
BCBM-26	Gehirn	diploid	MUT	0					
		andere Metasta	sen						
BCOM-03	andere	Verlust	WT	3+					
BCOM-04	andere	Verlust	WT	3+					
BCOM-05	andere	Verlust	WT	0					
		Primärtumor	е						
PT-013	andere	Verlust	WT	1+					
PT-014	keines	diploid	WT	2+					
PT-017	andere	diploid	WT	2+					
PT-018	andere	Verlust	WT	2+					
PT-021	keines	diploid	WT	3+					
PT-022	keines	Verlust	WT	1+					
PT-023	keines	diploid	WT	2+					
PT-024	keines	diploid	WT	2+					
PT-025	keines	diploid	WT	3+					
PT-029	Gehirn	Verlust	WT	1+					
PT-036	andere	diploid	WT	2+					
PT-045	keines	diploid	WT	0					
PT-093	andere	diploid	WT	1+					
PT-101	keines	diploid	WT	2+					
PT-102	andere	diploid	WT	2+					
PT-104	keines	diploid	WT	1+					

Hieraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Analysen der Kopienanzahl und des Mutationsstatus für sich genommen den PTEN-Status nicht vollständig widergeben. Eine klare Aussage über diesen kann nur über Analysen der Proteinspiegel getroffen werden.

### 4.1.3.5 Kombinierter PTEN-Status

Wie auch bei EGFR wurde für weiterführende Analysen ein kombinierter PTEN-Status erstellt. Dieser setzte sich hier aus der Kopienanzahl, dem Mutationsstatus und dem Proteinspiegel zusammen. Der PTEN-Status war von 29 BCBM-, 14 BCOM- und 59 Primärtumorproben verfügbar. Wie auch bei dem EGFR-Status wies ein Drittel (31 %) der BCBM-Patientinnen einen veränderten PTEN-Status auf. Dies traf auch auf den Anteil in der BCOM-Kohorte zu (36 %). Unter den Primärtumoren waren PTEN-Alterationen dagegen seltener (17 %). Der größte Anteil der Patientinnen mit PTEN-Verlust fand sich unter den Primärtumorpatientinnen mit BCBM (25 %). Die Primärtumorpatientinnen mit BCOM und insbesondere jene mit späteren Knochenmetastasen wiesen selten PTEN-Alterationen auf (beide 7 %, siehe Abb. 4.27). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Subgruppen der Patientinnen ermittelt werden.



Abb. 4.27: Häufigkeit der Patientinnen mit PTEN-Alteration in den untersuchten Kohorten und deren Subgruppen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe mit PTEN-Verlust (A, B) ist auf der y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT bone-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass etwa in Drittel der BCBM-, BCOM- und Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen einen PTEN-Verlust aufwiesen, jedoch Patientinnen mit BCBM unter den Primärtumorsubgruppen den größten Anteil mit PTEN-Verlust stellten. Dies impliziert eine Organotropie PTEN-alterierter Zellen primärer Mammakarzinome für das Gehirn sowie eine Assoziation dieser Alterationen mit BCBM.

### 4.1.3.6 Korrelation des PTEN-Status mit klinischen Daten

Der Vergleich des PTEN-Status' mit dem Alter bei Primärtumor- bzw. bei Rezidivresektion, dem Tumor-, Lymphknoten- bzw. Metastasierungsstatus, Differenzierungsgrad und Tumortyp lieferte keine Anhaltspunkte für die Korrelation mit einem der klinischen Parameter. Es war jedoch eine signifikante Assoziation von verändertem PTEN-Status in Primärtumor- als auch in BCBM-Patientinnen mit dem TNBC-Subtyp (71% und 33 %, p < 0,05) sowie ein Trend zur Korrelation mit einem HR-negativen Status zu beobachten, wohingegen Wildtyp-PTEN hauptsächlich in HR-positiven Patientinnen nachgewiesen wurde(siehe Tabelle 4.8).

**Tabelle 4.8: Korrelation des kombinierten PTEN-Status mit Brustkrebssubtyp und Hormonstatus in primärem BC und BCBM.** Dargestellt ist die Anzahl und der Prozentsatz (in Klammern) von Primärtumor- und BCBM-Patientinnen mit positivem (HR+) bzw. negativem (HR-) Hormonreptorstatus sowie mit HR+, HER2-positivem (HER2+) oder *triple*-negativem (HR- und HER2-negativ, TNBC) Brustkrebssubtyp aus den Fällen mit Wildtyp- (WT) bzw. verändertem-PTEN-Status. Die Signifikanz wurde in Form eines p-Wertes illustriert. p < 0,05 entspricht hierbei einem signifikantem Wert. Nicht signifikante Werte wurden als n.s. angegeben. Verändert nach Hohensee *et al.*<sup>198</sup>

	Hormonrezeptor				Subtyp							
	р	ositiv	n	egativ	p-	I	HR+*	н	ER2+ <sup>†</sup>	т	'NBC <sup>‡</sup>	p-
	n	(%)	n	(%)	Wert	n	(%)	n	(%)	n	(%)	Wert
					Pr	imärt	umoren					
PTEN												
WT	37	(90,2)	11	(68,8)	n.s.	30	(93,7)	8	(88,9)	10	(66,7)	< 0,05
mutiert	3	(9,8)	5	(31,3)		2	(6,3)	1	(11,1)	5	(33,3)	
					Geh	irnme	etastasen					
PTEN												
WT	15	(78,9)	4	(44,4)	n.s.	6	(66,7)	11	(91,7)	2	(28,6)	< 0,05
mutiert	4	(21,1)	5	(55,6)		3	(33,3)	1	(8,3)	5	(71,4)	

Es kann somit zusammengefasst werden, dass verändertes PTEN in einer Subpopulation von *triple*negativen Primärtumoren auftritt, die in der Lage sind zu BCBM bilden.

### 4.1.4 Der PIK3CA-Mutationstatus

### 4.1.4.1 **PIK3CA-Mutationsanalyse**

Funktionelles PI3K setzt sich aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit zusammen. Mutationen im *PIK3CA*-Gen treten häufig in primären Mammakarzinomen auf. Es ist belegt, dass sich diese Mutationen in sogenannten *Hotspots* anhäufen, die in der helikalen Domäne auf Exon 9 (E542, E545, Q546) und in der katalytischen Domäne auf Exon 20 lokalisiert sind (H1047, siehe Abb. 4.28). Die Mutationen liegen alle oberflächenexponiert an Positionen, die mit der regulatorischen Untereinheit interagieren und imitieren eine durch die Bindung eines physiologischen Aktivators ausgelöste Konformationsänderung. Dies führt zu einer konstitutiven Aktivierung von PI3K, was eine verstärkte Signalweiterleitung in dem angeschlossenen AKT-Signalweg zur Folge hat. Um zu überprüfen, ob in der in dieser Studie untersuchten Patientenkohorte PIK3CA-Mutationen vorliegen, wurden die Exone 9 und 20 über spezifische Oligonukleotide aus genomischer DNA und cDNA von Tumorarealen mittels PCR-Reaktion amplifiziert und nach anschließender *Sanger*-Sequenzierung auf Mutationen untersucht. Diese Analyse wurde an genomischer DNA von 10 BCBM, fünf BCOM- und 30 Primärtumorproben sowie an cDNA von 19 BCBM- und 31 Primärtumorproben durchgeführt.



Abb. 4.28: Histogramm belegter PIK3CA-Punktmutationen im Mammakarzinom. Im oberen Bereich ist die Anzahl belegter Fälle mit Punktmutationen (*Substitutions*) im primären Mammakarzinom auf der y-Achse gegen deren Position in der PIK3CA-Proteinsequenz auf der Abszisse illustriert. Darunter ist die Lokalisation der einzelnen Domänen sowie der Exone in der Gesamtproteinsequenz abgebildet (*Pfam*). Grün: p85-Bindedomäne, rot: RBD-Domäne, blau: C2-Domäne, gelb: helikale Domäne, lila: Kinasedomäne. Die Daten wurden aus der COSMIC Datenbank entnommen und veranschaulichen die Anhäufung von Mutationen in zwei Hotspot-Bereichen in der helikalen und der Kinasedomäne.

In sechs Patientinnen mit BCBM (23 %), einem Fall mit BCOM (20 %) und 13 Primärtumorpatientinnen wurden Mutationen detektiert. In den Primärtumorsubgruppen waren fünf Patientinnen ohne Rezidivbildung (22 %), acht Patientinnen BCOM (29 %) und eine Patientin mit Knochenmetastasen (8 %) Trägerinnen eines Basenpaaraustausches (siehe Abb. 4.29). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Subgruppen der Patientinnen festgestellt werden.



Abb. 4.29: Häufigkeit der Patientinnen mit PIK3CA-Mutationen in den untersuchten Kohorten und deren Subgruppen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe mit PIK3CA-Mutationen (A, B) ist auf der y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen, *PT brain-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT bone-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen).

Die Mutationen von 17 % aller untersuchten Proben (15/88) befanden sich in bekannten *Hotspot*-Regionen (c.1624A>G, c.1633G>A, c.1633G>C, c.3140A>G). Drei Mutationen (1658G>A, c.3104C>T und c.3132T>G) wurden zuvor in Krebserkrankungen der Schilddrüse, des Dickdarms und Endometriums nachgewiesen, jedoch bislang nicht im Mammakarzinom <sup>208–210</sup>.

Des Weiteren trugen eine BCBM- und drei Primärtumorpatientinnen bisher unbekannte Mutationen. Die neuen Mutationen der Primärtumorpatientinnen waren allesamt in der helikalen Domäne lokalisiert. Eine der Primärtumorpatientinnen trug die Basenpaarsubstitution c.1612G>T, die einen Austausch von einer sauren zu einer polaren Aminosäure hervorruft (Abb. 4.30 A). Im Gewebe der zweiten Primärtumorpatientin wurde die Basenpaarsubstitution c.1697C>T detektiert, die zu einem Aminosäureaustausch an der Position p.P566L Domäne führt (Abb. 4.30 B). Das Tumorgewebe der dritten Primärtumorpatientin wies eine Dreifachmutation auf, die sich aus einer Basenpaarsubstitution in einem *Hotspot* (c.1633G>A), einem seltenen Austausch (1658G>A) und einer neuen Mutation an der Position c.1543A>G (Abb. 4.30 C) zusammensetzte. Letzteres führt zu einem Austausch von einer polaren zu einer sauren Aminosäure an der Position p.N515D.

Im Tumorgewebe einer BCBM-Patientin wurde eine Splicevariante detektiert, die ein zusätzliches 83 bp-langes Exon zwischen Exon 19 und 20 an der Position c.2937G enthielt. Hierdurch entsteht ein alternatives Stopcodon, was zu einem verkürzten Protein ohne Exon 20 führt (Abb. 4.30 D).





Abb. 4.30: Chromatogramme neuer Mutationen in der für die katalytische Untereinheit des PIK3CA-Proteins kodierenden Sequenz. A-D: Punktmutationen in Exon 9 (A) und Exon 20 (B) des PIK3CA-Gens. E: Insertion einer Sequenz aus Intron 19 zwischen Exon 19 und 20 in der PIK3CA mRNA. Verändert nach Hohensee *et al.*<sup>198</sup>

Zwei Primärtumorpatientinnen mit BCOM trugen Basenpaarsubstitutionen in der 3'-UTR von PIK3CA (g.85871T>C und g.85875G>A). Diese Patientinnen wurden in der Auswertung jedoch nicht als mutiert gewertet, da sich die Substitutionen außerhalb der kodierenden Region befinden und keine Voraussage darüber möglich ist, ob sie einen Einfluss auf die Expression haben könnten. Alle identifizierten Mutationen sind in Tabelle 4.9 aufgelistet.

Keine der neuen Mutationen wurden in der Analyse von Lymphozyten-DNA des jeweiligen Patienten nachgewiesen. Dies impliziert einen somatischen Urspung dieser *PIK3CA*-Mutationen. In zwei Patientin tinnen aus der Primärtumorkohorte konnten multiple Mutationen detektiert werden. Eine Patientin trug je eine Basenpaarsubstitution in beiden *Hotspots* (c.1633G>C, c.3140A>G). Die andere Patientin wies zwei Mutationen in Exon 20 auf (c.3140A>G, c.3143A>G). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem *PIK3CA*-Mutationsstatus der BCBM- und der BCOM- bzw. der Primärtumorkohorte ermittelt werden. Dies gelang ebenso wenig, wenn nur Basenpaarsubstitutionen in *Hotspot*-Regionen als Mutationen definiert wurden.

Alle vier verfügbaren gepaarten Primärtumor- und BCBM-Gewebe sowie die beiden BCBM-Proben von einer Patientin hatten einen identischen nicht-mutierten PIK3CA-Status (siehe Abb. 4.31).
**Tabelle 4.9: PIK3CA-Mutationen in den analysierten Patientinnen.** Die Lokalisation der detektierten Mutationen in der genomischen (g.), kodierenden Sequenz (c.) sind auf mRNA-Ebene (mRNA) für die jeweilige Patientin in einer Zeile dargestellt. Die Auswirkungen der Mutationen auf Proteinebene (Protein, p.) sind dem gegenüber gestellt. Ein Austausch ist mit einem stilisierten Pfeil (>) und ein Fall, bei welchem die Mutation ausserhalb des kodierenden Bereiches in Form eines Minuszeichens (-) illustriert. Der Mutationsstatus (Status) wurde in Basenpaartausche untergliedert, die auch in Normalgewebe detektiert wurden (SNP), in der kodierenden (CDS-Mutationen) bzw. der nicht-kodierenden Region lokalisiert sind (3' UTR-Mutationen). BCBM: Mammakarzinompatientin mit Gehirnmetasasen, A: Adenin (auf mRNA-Ebene) bzw. Alanin (auf Proteinebene), C: Cytosin, D: Aspartat, E: Glutamat, fs: Leserasterverschiebung um die nachfolgend angegebene Anzahl von Aminosäuren, G: Guanin, H: Histidin, K: Lysin, L: Leucin, N: Asparagin, P: Prolin, PT: Primätumorpatientin, Q: Glutamin, R: Arginin, S: Serin, T: Thymin, V: Valin, Y: Tyrosin, \*: neu entstandener Stopcodon, ‡: neue Mutation

Patientin	PIK3CA-Mutationen								
	mRNA	Protein	Status						
Gehirnmetastasen									
BCBM-8	c.3075C>T	p.1025	SNP						
BCBM-11	c.1637A>T	p.Q546L	CDS-Mutation						
BCBM-13	c.2937ins83	p.R979fs*21	CDS-Mutation‡						
BCBM-16	c.1633G>A	p.E545K	CDS-Mutation						
BCBM-22	c.3140A>G	p.H1047R	CDS-Mutation						
BCBM-24	c.1624A>G	p.E542K	CDS-Mutation						
BCBM-26	c.1633G>A	p.E545K	CDS-Mutation						
Primärtumore									
PT-10	c.3104C>T	p.A1035V	CDS-Mutation‡						
PT-14	c.1697C>T	p.P566L	CDS-Mutation‡						
PT-16	c.3132T>G	p.N1044K	CDS-Mutation‡						
PT-19	c.[1633G>C, 3140A>G]	p.[E545Q, H1047R]	CDS-Mutation						
PT-23	c.3140A>G	p.H1047R	CDS-Mutation						
PT-36	c.1633G>A	p.E545K	CDS-Mutation						
PT-60	c.3140A>G	p.H1047R	CDS-Mutation						
PT-74	g.85871T>C	-	3' UTR-Mutation						
PT-75	c.[1543A>G, 1633G>A, 1658G>A]	p.[N515D, E545K, S553N]	CDS-Mutation‡						
PT-77	g.85875G>A	-	3' UTR-Mutation						
PT-93	c.[3140A>G, 3143A>G]	p.[H1047R, H1048R]	CDS-Mutation						
PT-101	c.3140A>G	p.H1047R	CDS-Mutation						
PT-103	c.1612G>T	p.D538Y	CDS-Mutation‡						



**Abb. 4.31: PIK3CA-Mutationsstatus in allen untersuchten gepaarten BCBM- und Primärtumorproben.** Dargestellt ist der PIK3CA-Mutationsstatus in Primärtumorpatientinnen (linke y-Achse) gegen die Spiegel ihrer gepaarten Metastasen (rechte y-Achse). Fälle ohne Mutationen wurde als 0 und Fälle mit Mutationen als 1 illustriert. n = 4.

Es kann somit zusammengefasst werden, dass hauptsächlich Mutationen in den *Hotspot*-Regionen detektiert wurden und dass PIK3CA-Mutationen etwa gleichhäufig in BCBM- und Primärtumorpatientinnen auftreten, jedoch nicht bei Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen nachgewiesen werden konnten.

## 4.1.4.2 Korrelation des PIK3CA-Status mit klinischen Daten

Der *PIK3CA*-Mutationsstatus lieferte keine Anhaltspunkte für die Korrelation mit dem Alter bei Primärtumor- bzw. bei Rezidivresektion, dem Tumor-, Lymphknoten- bzw. Metastasierungsstatus, Differenzierungsgrad und Tumortyp. Es ergab sich jedoch eine signifikante Assoziation mit dem Brustkrebssubtyp. In den BCBM-Patientinnen wurde eine Korrelation von mutiertem PIK3CA mit HRpositivem Subtyp (57 %) im Vergleich mit 17 % in HER2-positiven und 0 % der TNBC-Patientinnen nachgewiesen (p < 0,05) (siehe Tabelle 4.10).

**Tabelle 4.10**: Korrelation des PIK3CA-Status mit Brustkrebssubtyp und Hormonstatus in primärem BC und BCBM. Dargestellt ist die Anzahl und der Prozentsatz (in Klammern) von Primärtumor- und BCBM-Patientinnen mit positivem (HR+) bzw. negativem (HR-) Hormonrezeptorstatus sowie mit HR+, HER2-positivem (HER2+) oder *triple*-negativem (HR- und HER2negativ, TNBC) Brustkrebssubtyp aus den Fällen mit Wildtyp- (WT) bzw. verändertem PIK3CA-Status (mutiert). Die Signifikanz wurde in Form eines p-Wertes illustriert. p < 0,05 entspricht hierbei einem signifikantem Wert. Nicht signifikante Werte wurden als n.s. angegeben. Verändert nach Hohensee *et al.*<sup>198</sup>

	Hormonrezeptor				Subtyp							
	positiv		negativ		p-	- HR+*		HER2+ <sup>†</sup>		TNBC <sup>‡</sup>		p-
	n	(%)	n	(%)	Wert	n	(%)	n	(%)	n	(%)	Wert
Primärtumoren												
РІКЗСА												
WT	29	(72,5)	13	(86,7)	n.s.	23	(74,2)	6	(66,7)	12	(85,7)	n.s.
mutiert	11	(27,5)	2	(13,3)		8	(25,8)	3	(33,3)	2	(14,3)	
Gehirnmetastasen												
РІКЗСА												
WT	11	(64,7)	8	(100,0)	n.s.	3	(42,9)	10	(83,3)	6	(100,0)	< 0,05
mutiert	6	(35,3)	0	(0,0)		4	(57,1)	2	(16,7)	0	(0,0)	

Zusätzlich waren PIK3CA-Mutationsträgerinnen der Primärtumorkohorte mit pT1 assoziiert (44 %), während nur 13 % mit pT3+4 PIK3CA-Mutationen trugen (p < 0,05, Tabelle 4.11).

**Tabelle 4.11**: Korrelation des PIK3CA-Status mit der Tumorgröße in primärem BC und BCBM. Dargestellt ist die Anzahl und der Prozentsatz (in Klammern) von Primärtumor- und BCBM-Patientinnen mit einem Tumordurchmesser  $\leq 2$  cm (pT1), zwischen 2 bis  $\leq 5$  cm (pT2) bzw. >5 cm (pT3) aus den Fällen mit Wildtyp- (WT) bzw. verändertem PIK3CA-Status (mutiert). Die Signifikanz wurde in Form eines p-Wertes illustriert. p < 0,05 entspricht hierbei einem signifikantem Wert. Nicht signifikante Werte wurden als n.s. angegeben.

				Tumorgr	öße			
	pT1		pT2		F	отз	p-	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	Wert	
Primärtumoren								
РІКЗСА								
WT	10	(55,6)	27	(87,1)	7	(87,5)	< 0,05	
mutiert	8	(44,4)	4	(12,9)	1	(12,5)		
Gehirnmetastasen								
ΡΙΚ3ϹΑ								
WT	6	(85,7)	8	(80,0)	1	(50,0)	n.s.	
mutiert	1	(14,3)	2	(20,0)	1	(50,0)		

Diese Ergebnisse implizieren eine Assoziation von PIK3CA-Mutationsträgerinnen mit primären, nichtmetastasierenden Mammakarzinomen, welche mit einem HR-positiven Status und geringer Tumorgröße eine Gruppe mit einer besseren Prognose darstellen. PIK3CA-Mutationsträgerinnen bilden keine BCBM und selten Knochenmetastasen aus.

### 4.1.5 Analyse des EGFR/HER2-Signalwegs

Um einen Eindruck über die Verteilung der Veränderungen im EGFR/HER2-vermittelten Signalweg zu erhalten, wurden die kombinierten Resultate zu den einzelnen Genen in verschiedenen Kombinationen zusammengefügt, so dass sich diverse Varianten für einen Signalwegsstatus ergaben. Die Verteilung der Mutationsfrequenzen auf die untersuchten Subgruppen wurde für jede gebildete Variante eines Signalwegsstatus' ermittelt. Patientinnen, die in mindestens einem Status eine Veränderung aufwiesen, wurden in dem jeweiligen kombinierten Status ebenfalls als Mutante eingestuft. Patientinnen, für die nicht alle der betrachteten Resultate verfügbar waren, wurden aus dem jeweiligen Status ausgeschlossen.

#### 4.1.5.1 Kombinierter EGFR/PTEN-Status

Der EGFR/PTEN-Status kombiniert die Resultate des EGFR- und des PTEN-Status. EGFR/PTEN-Mutanten wurden in 52% der BCBM-, 20% der BCOM und 22% der Primärtumorpatientinnen ermittelt (siehe Abb. 4.32). Unter den Primtumorpatientinnen stellten 44 % der Fälle mit BCBM Mutanten dar, während dies bei nur einer Patientin mit späteren Knochenmetastasen (7 %) der Fall war (p < 0.01 im Vergleich mit BCBM-Patientinnen). Weiterhin wurden signifikante Unterschiede der Mutanten-Häufigkeit zwischen BCBM- und Primärtumorpatientinnen ohne Rezidiv und solchen mit BCOM (beide 17 %) beobachtet (p < 0.05 und p < 0.01). Dies impliziert, dass EGFR/PTEN-alterierte primäre Mammakarzinome eine Subpopulation von TNBC darstellen, die mit BCBM assoziiert sind.



**Abb. 4.32: Verteilung der EGFR/PTEN-Mutanten unter den analysierten Kohorten und deren Subgruppen.** Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe mit EGFR/PTEN-mutierten Patientinnen (A, B) ist auf der y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen, *PT brain-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT obne-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen). \*: p < 0,05; \*\* p < 0,01. Verändert nach Hohensee *et al.* <sup>198</sup>

#### 4.1.5.2 Der EGFR-Signalwegsstatus

Der EGFR-Signalwegsstatus setzt sich aus dem EGFR-, dem PTEN sowie dem PIK3CA-Status zusammen. EGFR-Signalwegsmutanten wurden in 66 % der BCBM-, 33 % der BCOM- und 42 % der Primärtumorpatientinnen detektiert (siehe Abb. 4.35). Auch hier waren Mutanten unter den Primärtumorpatientinnen mit BCBM (44 %) etwa gleich häufig wie in der BCBM-Kohorte und wurden unter den Primärtumoren mit Knochenmetastasen (14 %) in signifikant niedrigerer Frequenz nachgewiesen (p < 0.01). Mutanten waren ebenfalls unter den BCOM-Fällen seltener als unter BCBM-Fällen, jedoch erreicht dies aufgrund der niedrigen Anzahl untersuchter Patientinnen keine statistische Signifikanz.



**Abb. 4.33: Verteilung der EGFR-Signalwegsmutanten unter den analysierten Kohorten und deren Subgruppen.** Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe mit Alterationen im EGFR-Signalweg (A, B) ist auf der y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen, *PT brain-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT obne-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen). \*: p < 0,05; \*\* p < 0,01. Verändert nach Hohensee *et al.*<sup>198</sup>

### 4.1.5.3 Der HER2-Signalwegsstatus

Der HER2-Signalwegsstatus wurde analog zu dem EGFR-Signalwegsstatus aus den Resultaten des HER2-, des PTEN- und des PIK3CA-Status definiert. HER2- Signalwegsmutanten wurden in 79% der BCBM-, 40 % der BCOM- und 47% der Primärtumorpatientinnen identifiziert. Mutanten waren in allen Primärtumorsubgruppen signifikant seltener als in den BCBM-Patientinnen (alle p < 0.05, Abb. 4.35). Die Frequenz der Mutanten unter den BCOM-Patientinnen erreichte auch hier aus demselben Grund wie im EGFR-Signalwegsstatus keine statische Signifikanz.



**Abb. 4.34: Verteilung der HER2-Signalwegsmutanten unter den analysierten Kohorten und deren Subgruppen.** Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe mit Alterationen im HER2-Signalweg (A, B) ist auf der y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen ohne Fernmetastasen, *PT brain-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT obne-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen). \*: p < 0,05; \*\* p < 0,01. Verändert nach Hohensee *et al.* <sup>198</sup>

## 4.1.5.4 Der EGFR/HER2-Signalwegsstatus

Es wurde zusätzlich ein Signalwegsstatus erstellt, der alle untersuchten Gene ausschließlich PIK3CA beinhaltete (EGFR-, HER2-, PTEN-Status), da die Untersuchungen von PIK3CA-Mutationsträgerinnen ebendiese als eine gesonderte Gruppe mit guter Prognose nahelegen. Dieser Status war von 88 Patientinnen verfügbar. Der Anteil von BCBM-Patientinnen mit Veränderungen (73 %) war höher als im EGFR- und niedriger als im HER2-Signalwegsstatus, wohingegen der Anteil von BCOM-Patientinnen (40 %) jenem im HER2-Signalwegsstatus entsprach. Mutanten traten in allen Primärtumorsubgruppen mit Ausnahme von Patientinnen mit späteren BCBM signifikant seltener als in BCBM-Patientinnen auf (p < 0,001). Unter Primärtumorpatientinnen mit BCBM (56 %) war der höchste Anteil und unter jenen mit Knochenmetastasen der geringste Anteil von Mutanten zu verzeichnen (21 %, siehe Abb. 4.35 A, B).

Der EGFR/HER2-Signalwegsstatus setzt sich aus den Resultaten der Analysen aller vier untersuchten Gene (EGFR-, HER2-, PTEN- und PIK3CA-Status) zusammen und war für ebenfalls 88 Patientinnen

verfügbar. Unter den BCBM-Patientinnen stellten fast alle EGFR/HER2-Signalwegsmutanten dar (93 %), wohingegen nur etwa die Hälfte der BCOM- (40 %) und der Primärtumorpatientinnen (52 %) von EGFR/HER2-Signalwegsmutationen betroffen war (siehe Abb. 4.35 C,D). Mutanten waren in allen Primärtumorsubgruppen signifikant seltener als in den Gehirnmetastasen. Dies galt im Speziellen für die Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen (29 %, p < 0,001).

Aus demselben Grund wie in dem EGFR- und dem HER2-Signalwegsstatus erreicht die im Vergleich zu den BCBM-Fällen verringerte Frequenz der Mutanten unter BCOM-Fällen keine statistische Signifikanz.



**Abb. 4.35: Verteilung der EGFR/HER2-Signalwegsmutanten unter den analysierten Kohorten und deren Subgruppen.** Der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe mit Alterationen im EGFR/HER2-Signalweg exklusive PIK3CA (A, B) bzw. EGFR/HER2-Signalweg inklusive aller Gene (C, D) ist auf der y-Achse dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der in dieser Analyse untersuchten Proben eingefügt. BCBM: Patientinnen mit Gehirnmetastasen, BCOM: Patientinnen mit Metastasen in anderen Organen als dem Gehirn, *PT all*: Primärtumorpatientinnen inkl. aller Subgruppen, *PT non-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Gehirnmetastasen, *PT bone-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Knochenmetastasen, *PT other-relapsed*: Primärtumorpatientinnen mit Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (inkl. Knochen). \*: p < 0,05; \*\* p < 0,01.; \*\*\* p < 0,001.

Folglich ist zusammenfassend zu erwähnen, dass nur eine einzige der BCBM-Patientinnen keine Mutation in einem der untersuchten Mitglieder des EGFR/HER2-Signalwegs trug, jedoch weniger als die Hälfte der BCOM-Patientinnen Mutationen in mindestens einem der Gene aufwiesen. Ferner traten unter den Primärtumorsubgruppen Alterationen am häufigsten unter den Patientinnen mit BCBM

auf. Die Signifikanz dieser Population unter Einbeziehung PIK3CA-mutierter Fälle verschwindet aufgrund der Assoziation dieser Alterationen mit allen Primärtumorsubgruppen außer jenen mit BCBM.

### 4.1.5.4.1 Multiple Alterationen der Mitglieder des EGFR/HER2-Signalwegs

Alle Kombinationen multipler Alterationen waren in dem analysierten Kollektiv sehr selten vorhanden (siehe Abb. 4.36). Eine gleichzeitige Veränderung aller vier Gene wurde in keiner Patientin beobachtet. Nur drei Patientinnen trugen Dreifachmutationen, hierunter eine Patientin mit einer EGFR/HER2/PIK3CA, eine mit einer EGFR/PTEN/PIK3CA- und eine mit einer HER2/PTEN/PIK3CA-Kombination. Doppelmutationen wurden in 13 % aller untersuchten Patientinnen diagnostiziert (13/104). Diese schlossen eine EGFR/HER2-, eine HER2/PTEN-, zwei PTEN/PIK3CA, drei HER2/PIK3CAund sechs EGFR/PTEN-Mutanten mit ein.



Abb. 4.36: Venn-Diagramm von parallel auftretenden Alterationen in der vollständigen untersuchten Kohorte von Mammakarzinompatientinnen. Jede Ellipse bildet alle detektierten Alterationen eines der analysierten Gene ab und ist farbliche illustriert. Die Überlappungen der einzelnen Ellipsen stellen Kombinationen aus Alterationen verschiedener Gene dar. Veränderungen im EGFR-Gen sind blau, im HER2-Gen gelb, im PIK3CA-Gen grün und im PTEN-Gen rot dargestellt. Mischfarben stellen Kombination von Alterationen dar.

Es kann demzufolge zusammengefasst werden, dass Kombinationen multipler Alterationen in den analysierten Mitgliedern des EGFR/HER2-Signalwegs grundsätzlich selten auftraten und die in den Abschnitten 4.1.1.6 und 0 beschriebene Korrelation mit dem Brustkrebssubtyp widerspiegeln. Daher traten Kombinationen von EGFR- und PTEN-Alterationen am häufigsten auf, jedoch schlossen sich Kombinationen beider Alterationen mit HER2-Überexpression fast vollständig gegenseitig aus.

### 4.2 Funktionelle Untersuchung von PTEN im Zellkulturmodell

Im translationalen Teil dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust von PTEN in *triple*-negativen Mammakarzinomen mit BCBM assoziiert ist. Bislang konnte nicht abschließend geklärt werden, in welchem Schritt der Gehirnmetastasierung des Mammakarzinoms der PTEN-Verlust von Bedeutung ist. Aus diesem Grunde sollte im funktionellen Teil die Rolle von PTEN in der Gehirnmetastasierung des Mammakarzinoms durch Herunterregulation (*Knockdown*) der PTEN-Expression in einer immortalisierten, nicht-invasiven Brustepithelzelllinie (MCF-10A) sowie durch PTEN-Überexpression in einer *triple*-negativen, in das Gehirn metastasierenden Mammakarzinomzelllinie (MDA-MB-231 BR) analysiert werden.

# 4.2.1 Differentielle PTEN-Expression in Mammakarzinomzelllinien

Zur Auswahl geeigneter Zellkultursysteme wurden die EGFR- und PTEN-Proteinspiegel verschiedener Zelllinien anhand einer Immunoblot-Analyse untersucht. Die nicht-invasive Brustepithelzelllinie MCF-10A und die luminale Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wiesen etwa gleichstarke, moderate PTEN-Spiegel auf, zeigten jedoch keine messbaren EGFR-Proteinspiegel. Unter den drei analysierten Subklonen der *triple*-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wies die parentale Zelllinie (MDA-MB-231 WT) die höchsten PTEN-Proteinspiegel auf. Im direkten Vergleich wurden in dem in den Knochen (MDA-MB-231 SA) bzw. das Gehirn metastasierenden Subklonen (MDA-MB-231 BR) verminderte PTEN-Proteinspiegel nachgewiesen. Für EGFR wurden gegenläufige Proteinspiegel detektiert. In der parentalen Zelllinie waren kaum messbare Proteinspiegel vorhanden, während in beiden Subklonen erhöhte Spiegel nachgewiesen wurden. In der *triple*-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 wurden durch eine beschriebene EGFR-Amplifikation extrem hohe EGFR-Expression, jedoch kein PTEN-Signal detektiert. Sie diente daher als Positivkontrolle für EGFR-Expression.



**Abb. 4.37: Immunoblot-Analyse verschiedener Mammakarzinomzelllinien.** Die Proteinspiegel von EGFR und PTEN in Gesamtproteinlysaten der Brustepithelzelllinie MCF-10A und den Mammakarzinomzelllinien MCF-7, MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231 SA, MDA-MB-231 BR, MDA-MB-468 und BT-549 wurden über einen EGFR- bzw. PTEN-spezifischen Antikörper nachgewiesen und bei 170 kDa sowie 54 kDa detektiert. Als Ladekontrolle diente das Signal des Hitzeschockproteins HSC-70 bei 72 kDa.

Die differenziellen EGFR- und PTEN-Proteinspiegel der metastatischen MDA-MB-231-Subklone im Vergleich zur parentalen Zelllinie weisen auf eine mögliche Rolle des PTEN-Verlustes und der EGFR-Überexpression in der Metastasierung des Mammakarzinoms hin.

## 4.2.2 Knockdown der PTEN-Expression in MCF-10A Zellen

Die translationalen Analysen dieser Arbeit belegen eine Assoziation von PTEN mit einem TNBC Subtyp. Um den Einfluss der PTEN-Expression auf das Verhalten von nicht-invasiven Zellen zu untersuchen, wurde die PTEN-Expression in der Brustepithelzelllinie MCF-10A über lentiviralen Gentransfer mittels PTEN-spezifischer shRNAs herunterreguliert.

# 4.2.2.1 Knockdown auf Proteinebene

Um einen PTEN-*Knockdown* hervorzurufen, wurden PTEN-spezifische shRNAs über lentiviralen Gentransfer in MCF-10A Zellen eingeführt. Hierfür wurden zwei PTEN-spezifische shRNAs (shPTEN1, shP-TEN2) und als Negativkontrolle eine shRNA verwendet, die gegen keine in Säugern exprimierte mRNA gerichtet ist (*non-target control*, NTC). Der *Knockdown* wurde über Immunoblot-Analysen überprüft. In beiden mit unterschiedlichen shRNA-infizierten Klonen (MCF-10A\_shPTEN1, MCF-10A\_shPTEN2) konnte im Vergleich zu dem mit einer Kontroll-shRNA infizierten Klon (MCF-10A\_shNTC) nur sehr schwache PTEN-Signale nachgewiesen werden. Dagegen war das GFP-Signal in allen drei Klonen detektierbar. Dies belegt eine erfolgreiche Infektion aller Klone mit dem Knockdownplasmid. Es konnte somit ein fast vollständiger Knockdown der PTEN-Expression in MCF-10A Zellen mittels lentiviralen Genstransfer durch zwei verschiedene PTEN-spezifische shRNAs hergestellt werden. Ferner ist die Selektion der Knockdown-Klone sowie des Kontrollklons in nachfolgenden Analysen über die GFP-Expression möglich.



**Abb. 4.38: Immunoblot-Analyse mit shRNA-infizierten MCF-10A Zellen.** Die PTEN- und GFP-Proteinspiegel in Gesamtproteinlysaten wurden in zwei mit PTEN-spezifischen shRNAs infizierten (shPTEN1, shPTEN2) MCF-10A-Klone und dem mit einer Kontroll-shRNA (shNTC) infizierten Klon über einen PTEN- bzw. GFP-spezifischen Antikörper bei 54 kDa und 29 kDa nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente das Signal des Hitzeschockproteins HSC-70 bei 72 kDa.

#### 4.2.3 PTEN-Überexpression in MDA-MB-231 BR Zellen

Der im Vergleich zu der parentalen Zelllinie verringerte PTEN-Proteinspiegel in dem ins Gehirn metastasierenden Subklon MDA-MB-231 legen eine mögliche Rolle der PTEN-Expression in BCBM nahe (siehe Abschnitt 4.2.1). Daher sollte in funktionellen Analysen der Effekt erhöhter PTEN-Proteinspiegel in MDA-MB-231 BR-Zellen auf zelluläre Prozesse u.a. in Kontext der Mikroumgebung des Gehirns untersucht werden. Hierfür wurde zunächst ein PTEN-Überexpressionskonstrukt lentiviral in MDA-MB-231 BR-Zellen eingeführt und anschließend die Auswirkungen auf den AKT-Signalweg sowie das Proliferations- und Migrationsverhalten ermittelt. Die Interaktion mit dem Gehirnmilieu wurde unter Kultivierung in durch Astrozyten bzw. Mikroglia konditioniertem Medium oder in Kokultur simuliert und analysiert.

## 4.2.3.1 PTEN-Überexpression im LeGO-iG2-System

Die Expressions-Konstrukte wurden über lentiviralen Gentransfer in MDA-MB-231 BR-Zellen eingeführt. Als Überexpressions-Konstrukt wurde das LeGO-iG2-System verwendet, in welches die PTENcDNA integriert wurde. Der Leervektor diente als Negativkontrolle für die nachfolgenden Analysen. Da das LeGO-iG2-System über keinen Marker zur Negativselektion verfügt, wurden die infizierten Zellen durchflusszytometrisch einer Positivselektion basierend auf der GFP-Expression unterzogen. Wie anhand von Abb. 4.39 veranschaulicht wird, exprimierten sowohl die mit dem Leervektor als auch die mit dem Überexpressions-Konstrukt infizierten Zellen den GFP-Marker. Daraus lässt sich schließen, dass die Einführung der Konstrukte in die Zellen erfolgreich war. Jedoch wiesen die mit dem Überexpressions-Konstrukt infizierten Zellen im Vergleich zu den mit Kontroll-Plasmid infizierten eine verminderte Fluoreszenzintensität auf.



Abb. 4.39: GFP-Expression der mit dem LeGO-iG2-System infizierten MDA-MB-231 BR- Zellen. Dargestellt ist die GFP-Intensität in Kontrollzellen (MDA-MB-231 BR/LeGO-iG2, A) und PTEN-überexprimierenden Zellen (MDA-MB-231 BR/LeGOiG2/PTEN CDS, B) gegen die Zellgröße einer durchflusszytometrischen Analyse.

Nach der Positivselektion zeigte das Kontrollplasmid keine Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten transduzierter Zellen, wohingegen mit dem Überexpressions-Konstrukt transduzierte Zellen abstarben (Abb. 4.40). Des Weiteren verdeutlicht diese Abbildung die bereits in der durchflusszytometrischen Analyse aufgefallene, verminderte GFP-Expression in PTEN-transduzierten Zellen. Da die Zellen innerhalb von 3 Tagen nach der Selektion abstarben, war ein anschließender Nachweis der PTEN-Überexpression auf Proteinebene nicht möglich.



Abb. 4.40: Mikrokopische Darstellung von mit dem LeGO-iG2-System infizierten MDA-MB-231 BR- Zellen. Dargestellt sind durchlichtmikroskopische (A, B) gegen Fluoreszenzaufnahmen (C, D) von Kontrollzellen (MDA-MB-231 BR/LeGO-iG2) (A, C) und PTEN-überexprimierenden Zellen (MDA-MB-231 BR/LeGO-iG2/PTEN CDS) (B, D).

Da PTEN als PI3K-Antagonist regulierend auf die Signaltransduktion im PI3K/AKT-Signalweg wirkt, liegt die Vermutung nahe, dass die PTEN-Überexpression der Auslöser für die erhöhte Apoptoserate der mit dem Überexpressionskonstrukt infizierten Zellen war.

# 4.2.3.2 Herstellung von ZsGreen-kodierenden, induzierbaren Überexpressionskonstrukten

Da die konstitutive PTEN-Überexpression das Absterben infizierter Zellen zur Folge hatte, wurde für weitere Analysen ein alternatives Expressionssystem gewählt, in welchem eine dosisabhängige induzierbare Überexpression möglich ist (pZspuro++tTRKRAB, zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Horn, Klinik für Stammzelltransplantation, UKE). In diesen Vektor wurde für eine Überexpression die PTENcDNA eingeführt. Die Expression wird in diesem System dosisabhängig durch Doxycyclin-Gabe eingeleitet (pZspuro++tTRKRAB/PTEN tet-on). Als Negativkontrolle diente der Leervektor (pZspuro++tTRKRAB/leer tet-on).

Wie anhand durchflusszytometrischer Analysen veranschaulicht, zeigten infizierte Zellen deutlich nachweisbare GFP-Signale und damit eine erfolgreiche, lentivirale Einführung des pZspuro++tTRKRAB-Systems in MDA-MB-231 BR-Zellen (Abb. 4.41). Die verminderte Expression des Fluoreszenzmarkers ZsGreen war jedoch auch in diesem System vorhanden (vgl. Abb. 4.41 mit Abb. 4.39). Nichtsdestotrotz konnte durch die dosisabhängige PTEN-Überexpression das Überleben der Zellen unter 1 µg/ml Doxycyclin gewährleistet werden. Diese Dosis war ausreichend, um eine mess-

bare PTEN-Überexpression zu induzieren, ohne den EGFR/HER2-Signalweg so stark herab zu regulieren, dass die Zellen in Apoptose gingen.



Abb. 4.41: GFP-Expression der mit dem pZspuro++tTRKRAB-System infizierten MDA-MB-231 BR- Zellen. Dargestellt ist die GFP-Intensität in Kontrollzellen (MDA-MB-231 BR, A) und PTEN-überexprimierenden Zellen (MDA-MB-231 BR/ pZspuro++tTRKRAB/PTEN CDS, B) gegen die Zellgröße einer durchflusszytometrischen Analyse.

## 4.2.3.3 **PTEN-Überexpression im pZspuro++tTRKRAB-System**

Die PTEN-Proteinspiegel in den beiden mit dem pZspuro++tTRKRAB-System infizierten Zellklonen (pZspuro++tTRKRAB/leer tet-on und pZspuro++tTRKRAB/PTEN tet-on) wurden in einer Immunoblot-Analyse jenen der parentalen Zelllinie MDA-MB-231 WT gegenübergestellt. Die PTEN-Überexpression konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Ferner erreichten die Proteinspiegel in pZspuro++tTRKRAB/PTEN tet-on Zellen fast das Niveau der *triple*-negativen parentalen Zelllinie.



Abb. 4.42: Immunoblot-Analyse der PTEN-Proteinspiegel in MDA-MB-231-Zelllinien. Die PTEN-Proteinspiegel der beiden mit dem pZspuro++tTRKRAB-System infizierten MDA-MB-231 BR-Zelllinien (PTEN, leer) sowie der parentalen MDA-MB-231 WT-Zelllinie wurden in Gesamtproteinlysaten über einen PTEN-spezifischen Antikörper bei 54 kDa nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente das Signal des Hitzeschockproteins HSC-70 bei 72 kDa.

### 4.2.3.4 Auswirkungen der PTEN-Überexpression auf den AKT-Signalweg

Die Auswirkungen der PTEN-Überexpression auf zelluläre Prozesse (*Downstream-Signaling*, Proliferation, Migration) sollten in verschiedenen Systemen untersucht werden. Da das Vorliegen von phosphoryliertem AKT ein Merkmal der Aktivierung des EGFR/HER2-Signalwegs ist, wurde zunächst der Effekt erhöhter PTEN-Proteinspiegel auf die Aktivierung des AKT-Signalwegs in MDA-MB-231 BR Zellen mittels Immunoblot analysiert.



Abb. 4.43: Immunoblot-Analyse der PTEN-Proteinspiegel in transduzierten MDA-MB-231 BR-Klonen. Die PTEN-Proteinspiegel sowie die Spiegel von Gesamt- (panAKT) und phosphoryliertem AKT-Protein (pAKT) wurden in Gesamtproteinlysaten beider mit dem pZspuro++tTRKRAB-System infizierten MDA-MB-231 BR-Klone (PTEN, leer) über einen PTENbzw. panAKT- sowie pAKT-spezifischen Antikörper bei 54 kDa und 60 kDa nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente das Signal des Hitzeschockproteins HSC-70 bei 72 kDa.

Vor der Präparation der Proteinlysate wurde die PTEN-überexprimierende sowie die Sublinie mit endogener PTEN-Expression hierfür 10 min mit 10 ng/ml EGF inkubiert und Immoblot-Analysen mit AKT-spezifischen Antikörpern durchgeführt. In Lysaten der PTEN-überexprimierenden Sublinie konnte eine verringerte AKT-Phosphorylierung an Serin 473 im Vergleich zu Lysaten aus Zellen mit endogenem PTEN-Spiegel nachgewiesen werden. Somit wurde gezeigt, dass verminderte PTEN-Proteinspiegel eine gesteigerte Aktivierung des EGFR/HER2-Signalwegs auslösen.

#### 4.2.3.5 Auswirkungen der PTEN-Überexpression auf das Proliferationsverhalten

Da die translationalen Untersuchungen sowie die differentielle PTEN-Expression in der parentalen MDA-MB-231 Zelllinie und der BR-Sublinie eine Rolle der PTEN-Expression in der Gehirnmetastasierung des Mammakarzinoms nahelegen, sollte das Zusammenspiel der PTEN endogen exprimierenden bzw. überexprimierenden BR-Sublinien mit kultivierten Gliazellen untersucht werden. Als Modelle für kultivierte Gliazellen dienten primäre humane Astrozyten und die immortalisierte Mikrogliazelllinie CHME3. Astrozyten wirken regulierend auf die empfindliche Mikroumgebung von Neuronen und haben eine Stützfunktion im zentralen Nervensystem. Mikroglia repräsentieren das Immunsystem des Gehirns<sup>211</sup>. Die zur Kultivierung der Astrozyten und Mikroglia verwendeten Medien unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung geringfügig von dem Tumorzellkulturmedium. Daher wurde zunächst untersucht, ob das Kulturmedium selbst Auswirkungen auf die Proliferationsraten der Sublinien hat.

Eine weitere Fragestellung war, ob die PTEN-Überexpression in der aggressiveren MDA-MB-231 BR Sublinie zu einem abgemilderten Phänotyp führt, der eher jenem der parentalen Zelllinie gleicht. Dies sollte ebenfalls anhand des Proliferationsverhaltens ermittelt werden.

Die Versuche wurden unter Kultivierung in Tumorzell- (DMEM), Astrozyten- und Mikrogliamedium durchgeführt. Nach 1, 3 und 5 d wurde die Proliferation mittels MTT-Assay photometrisch bestimmt. Anschließend wurde die Proliferationsrate ermittelt, in dem das Verhältnis der Absorptionswerte der parentalen MDA-MB-231 WT Zellen (WT), der MDA-MB-231 BR Zellen mit endogener PTEN-Expression (BR\_leer) bzw. jener mit PTEN-Überexpression (BR\_PTEN) an Tag 1 zu jenen von Tag 3 und 5 gebildet wurde (*Ratio*<sub>3/1</sub> bzw. *Ratio*<sub>5/1</sub>, siehe Abb. 4.44). Zusätzlich wurden diese *Ratios* des WT-Klons mit denen des BR\_leer- bzw. des BR\_PTEN-Klons verglichen und daraus die durch die Sublinie (BR leer) bzw. die PTEN-Überexpression (BR PTEN) bedingte Proliferationsänderung gebildet.

Die MDA-MB-231 BR Sublinie mit endogener PTEN-Expression proliferierte an Tag 5 unabhängig von den verwendeten Kulturmedien im Vergleich zu jener der parentalen Zelllinie deutlich stärker. Die PTEN-überexprimierende Sublinie wies zwar eine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zur parentalen Zelllinie, jedoch eine geringere Rate als die Sublinie mit endogener PTEN-Expression auf (Abb. 4.44 A-C). Die durch Kultivierung in verschiedenen Medien ausgelöste Veränderung der Proliferationsraten wurde durch den Abgleich der Proliferation in DMEM gegen jene in Astrozyten- (Ratio<sub>A/D</sub>) bzw. Mikroglia-Kulturmedium (Ratio<sub>M/D</sub>) ermittelt. Es wurde nachgewiesen, dass alle Subklone unter Kultivierung in Astrozyten-Medium stärker und in Mikroglia-Medium marginal schwächer proliferierten (Abb. 4.44 D). Die in Astrozyten-Medium vorliegende erhöhte FBS-Konzentration fördert somit die Proliferation aller untersuchten Zelllinien (1,5- bis 1,9-fach erhöht), wohingegen die von DMEM divergierende Zusammensetzung des Mikroglia-Mediums keine Auswirkungen auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinien hat.



**Abb. 4.44: Proliferationsunterschiede von MDA-MB-231 Sublinien in verschiedenen Kulturmedien.** Für die Proliferationsanalysen wurden 1 x 10<sup>3</sup> Zellen in 96-well Platten ausgesät. Die Versuche wurden in Quadruplikaten durchgeführt und die Proliferation nach 1, 3 und 5 Tagen mittels MTT-Assay photometrisch bestimmt. Die Verhältnisse der Proliferationsraten von Tag 3 bzw. Tag 5 zu Tag 1 (Ratio<sub>3/1</sub> bzw, Ratio<sub>5/1</sub>) wurden für die parentale MDA-MB-231-Zelllinie (WT) sowie für die Sublinien MDA-MB-231 BR/leer (endogen) und MDA-MB-231 BR/PTEN (PTEN) aufgetragen, die in DMEM (A) oder in unbehandeltem Astrozyten-Medium (B) bzw. Mikroglia-Medium kultiviert wurden (C). Die Proliferationsunterschiede der Zelllinien in DMEM verglichen mit Astrozyten- (Ratio<sub>A/D</sub>) bzw. Mikroglia-Kulturmedium (Ratio<sub>M/D</sub>) sind tabellarisch aufgeführt (D).

# 4.2.3.6 Auswirkungen der Aktivierung des EGFR/HER2-Signalwegs auf das Migrationsverhalten in Abhängigkeit der PTEN-Expression

Um die Auswirkungen der PTEN-Überexpression auf das Migrationsverhalten von MDA-MB-231 BR-Sublinien in Abhängigkeit des Aktivierungsstatus' des EGFR/HER2-Signalwegs zu untersuchen, wurden Transwell-Assays in einer Boyden-Kammer durchgeführt. Die Aktivierung des EGFR/HER2-Signalwegs wird durch eine über Ligandenbindung ausgelöste Rezeptordimersierung induziert. Um den EGFR/HER2-Signalweg in BR-Sublinien zu aktivieren, wurde EGF als Ligand des EGFR eingesetzt. Zur Analyse des Migrationsverhaltens wurde unbehandeltes oder mit 10 ng/ml EGF versetztes Kulturmedium vorgelegt und Zellen der MDA-MB-231 BR-Sublinien in Transwell-*Inserts* in Zellkulturmedium ohne FBS ausgesät. Nach 24 h wurde die Anzahl migrierter Zellen ermittelt.

Wurde nur FBS als Lockstoff eingesetzt, führte dies zu keiner Veränderung der Migrationsrate durch die Einführung der PTEN-Überexpression. EGF löste als Lockstoff in Zellen der Sublinie mit endogener PTEN-Expression eine 4,5-fach erhöhte Migration im Vergleich zu Zellen der PTEN-überexprimierenden Sublinie aus (Abb. 4.45 A). In Zellen der Sublinie mit endogener PTEN-Expression löste EGF selbst eine 27-fach gesteigerte Migration aus. In Zellen der PTEN-überexprimierenden Sublinie wurde die Migration nur um das 5-fache erhöht. Es wurden signifikante Unterschiede im Migrationsverhalten zwischen EGF-stimulierten und unstimulierten Zellen sowie zwischen EGF-stimulierten Zellen mit endogener PTEN-Expression und PTEN-Überexpression festgestellt. Somit wurde nachgewiesen, dass eine veränderte PTEN-Expression das Migrationsverhalten in Abhängigkeit des Aktivierungsstatus' des EGFR/HER2-Signalwegs steuert.



Abb. 4.45: Migrationsunterschiede von MDA-MB-231 BR/leer und MDA-MB-231 BR/PTEN in Kulturmedium. Für die Transwell-Assays in einer Boyden-Kammer wurde unbehandeltes oder mit 10 ng/ml EGF versetztes Kulturmedium in 24 well Platten vorgelegt und 1 x 10<sup>4</sup> Zellen in Transwell-*Inserts* in Zellkulturmedium ohne FBS ausgesät. Nach 24 h wurden die migrierten Zellen fixiert und gefärbt. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Die Anzahl migrierter Zellen wurden bei 10-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop in fünf verschiedenen Regionen jedes Inserts ermittelt. Die Anzahl migrierter MDA-MB-231 BR/leer- (endogen) und MDA-MB-231 BR/PTEN-Zellen (PTEN) unter Verwendung von unbehandeltem Medium wurde gegen die Anzahl in EGF-versetztem Kulturmedium (A) aufgetragen. Die Migrationsunterschiede der Sublinien in unbehandeltem gegen EGF-versetztes Medium ( $\Delta$ Medium) sind tabellarisch aufgeführt (B). Die statistsiche Signifikanz wurde mit Hilfe des student'schen t-Tests ermittelt. \*\*\*: p < 0,001.

# 4.2.3.7 Auswirkungen durch Astrozyten sezernierter Botenstoffe auf das Proliferationsverhalten in Abhängigkeit der PTEN-Expression

Gliazellen können in Anwesenheit von Tumorzellen aktiviert werden und in der Folge Zytokine sezernieren <sup>22,212–215</sup>. Um die Auswirkungen durch aktivierte Gliazellen sezernierter Substanzen auf das Proliferationsverhalten im Kontext der oben genannten MDA-MB-231 BR Sublinien zu analysieren, wurden diese in konditioniertem Gliamedium kultiviert. Dieses wurde gewonnen, indem dem Gliakulturmedium 20 ng/ml TNFα sowie 20 ng/ml IFNγ zugesetzt wurde und primäre humane Astrozyten sowie die immortalisierte Mikroglia-Zelllinie CHME-3 für 24 h darin kultiviert wurden.

Auswirkungen der PTEN-Überexpression auf das Proliferationsverhalten Um die von MDA-MB-231 BR-Zellen unter Einfluss von durch aktivierte Astrozyten sezernierte Stoffe zu analysieren, wurden Zellen in unbehandeltem bzw. durch aktivierte Astrozytenkulturen konditioniertem Medium kultiviert. Die Proliferation wurde wie in Abschnitt 4.2.3.5 bestimmt und die dort beschriebe-Berechnungen angestellt. Zusätzlich wurde der Proliferationsunterschied nen der MDA-MB-231 BR/leer- bzw. MDA-MB-231 BR/PTEN- zwischen der Kultivierung in unbehandeltem und konditioniertem Astrozytenmedium ermittelt.

Die Proliferationsratio der PTEN-überexprimierenden Sublinie an Tag 3 im Vergleich zu jener mit endogener PTEN-Expression war unter Kultivierung in unbehandeltem Astrozyten-Medium um einen Wert von 1,1 verringert (Abb. 4.46 A). Unter Kultivierung in konditioniertem Astrozyten-Medium war eine Verringerung um einen Wert von 0,6 zu verzeichnen (Abb. 4.46 B). Die Kultivierungsbedingungen in konditioniertem Astrozyten-Medium bewirkten an Tag 3 eine Verringerung der Proliferationsrate der Sublinie mit endogener PTEN-Expression um einen Wert von 1,7. Die Proliferationsrate der PTEN-überexprimierenden Sublinie war durch die Kultivierungsbedingungen um einen Wert von 1,1 verringert (Abb. 4.46 C). Da in Abschnitt 4.2.3.4 nachgewiesen werden konnte, dass in Zellen mit geringem PTEN-Proteinspiegel eine erhöhte Aktivierung des EGFR/HER2-Signalwegs vorliegt, kann nun geschlussfolgert werden, dass die durch aktivierte Astrozyten sezernierten Substanzen in diesen Zellen die Proliferation hemmen.



Abb. 4.46: Proliferationsunterschiede von MDA-MB-231 BR/leer und MDA-MB-231 BR/PTEN in Astrozyten-Kulturmedium. Für die Proliferationsanalysen wurden 1 x 10<sup>3</sup> Zellen in 96-well Platten ausgesät. Nach 24 h (Tag 1) erfolgte die erste Messung sowie ein Mediumwechsel mit unbehandeltem (A) bzw. durch aktivierte Astrozytenkulturen konditioniertem Medium (B). Nach weiteren 24 (Tag 2) und 48 h (Tag 3) erfolgten weitere Messungen. Die Versuche wurden in Quintruplikaten durchgeführt und die Proliferation mittels MTT-Assay photometrisch bestimmt. Die Verhältnisse der Proliferationsraten von Tag 2 bzw. Tag 3 zu Tag 1 (Ratio<sub>2/1</sub> bzw. Ratio<sub>2/1</sub>) wurden für MDA-MB-231 BR/leer (endogen) und MDA-MB-231 BR/PTEN (PTEN) aufgetragen, die in unbehandeltem (A) oder konditioniertem Astrozyten-Medium kultiviert wurden (B). Die Proliferationsunterschiede der MDA-MB-231 BR-Sublinien in unbehandeltem verglichen mit konditioniertem Astrozyten-Kulturmedium ( $\Delta$ Medium) sind tabellarisch aufgeführt (C).

# 4.2.3.8 Auswirkungen durch Astrozyten sezernierter Botenstoffe auf das Migrationsverhalten in Abhängigkeit der PTEN-Expression

Um die Auswirkungen der PTEN-Überexpression auf das Migrationsverhalten von MDA-MB-231 BR-Sublinien unter Einfluss von durch Astrozyten sezernierte Botenstoffe zu analysieren, wurden Transwell-Assays in einer Boyden-Kammer wie in Abschnitt 4.2.3.6 beschrieben durchgeführt. Für diese Fragestellung wurden allerdings primäre humane Astrozyten in die unteren Kammern ausgesät und die Migration gegen unbehandeltes Astrozytenmedium verglichen.

Unbehandeltes Astrozytenmedium als Lockstoff führte unter PTEN-Überexpression zu keiner Veränderung des Migrationsverhaltens. Die durch Astrozyten sezernierten Substanzen lösten hingegen eine 2,9-fach verringerte Migrationsrate der PTEN-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Zellen mit endogener PTEN-Expression aus (Abb. 4.47 A). Durch Astrozyten sezernierte Substanzen lösen in Zellen mit endogener PTEN-Expression eine 12,7x höhere Migrationsrate aus. In PTENüberexprimierenden Zellen wurde hierdurch nur eine 2,7x gesteigerte Migration induziert. Diese Ergebnisse bestätigen somit, dass PTEN-abhängige Migration einen anderen Stimulus als FBS benötigt. Es wurden signifikante Unterschiede im Migrationsverhalten zwischen der Kokultivierung mit Astrozyten und der Kultiverung in Medium sowie zwischen Zellen mit endogener PTEN-Überexpression und PTEN-Überexpression unter Astrozytenkokultur festgestellt. Es liegt somit nahe, dass Astrozyten-sezernierte Substanzen generell die Migration von Tumorzellen fördern, dieses Verhalten jedoch durch eine erhöhte PTEN-Expression in Tumorzellen eingeschränkt wird.



Abb. 4.47: Migrationsunterschiede von MDA-MB-231 BR/leer und MDA-MB-231 BR/PTEN in Astrozyten-Medium. Für die Transwell-Assays in einer Boyden-Kammer wurden 72 h vor Beginn des Assays 1 x 10<sup>5</sup> primäre humane Astrozyten in 24-well Platten ausgesät. Vor der Aussaat der zu analysierenden MDA-MB-231 BR-Sublinien wurde unbehandeltes Astrozytenmedium in zusätzliche Vertiefungen der 24 well Platte vorgelegt. 1 x 10<sup>4</sup> Zellen wurden in Transwell-Inserts in Zellkulturmedium ohne FBS ausgesät. Nach 24 h wurden die migrierten Zellen fixiert und gefärbt. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Die Anzahl migrierter Zellen wurden bei 10-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop in fünf verschiedenen Regionen jedes Inserts ermittelt. Die Anzahl migrierter MDA-MB-231 BR/leer (endogen) und MDA-MB-231 BR/PTEN-Zellen (PTEN) in unbehandeltem Astrozyten-Medium (Medium) und in Kokultur mit Astrozyten (Astrozyten-Kokultur) ist gegeneinander aufgetragen. Die Migrationsunterschiede der Sublinien in unbehandeltem Astrozyten-Medium gegen die Kokultur ( $\Delta$ Medium) sind tabellarisch aufgeführt (B). Die statistsiche Signifikanz wurde mit Hilfe des student'schen t-Tests ermittelt. \*\*\*: p < 0,001.

# 4.2.3.9 Auswirkungen durch Mikroglia sezernierte Botenstoffe auf das Proliferationsverhalten in Abhängigkeit der PTEN-Expression

Es konnte nachgewiesen werden, dass durch aktivierte Astrozyten sezernierte Substanzen die Proliferation von MDA-MB-231 BR-Zellen in Abhängigkeit der PTEN-Expression unterstützen. Nun sollte überprüft werden, ob durch aktivierte Mikroglia serzernierte Botenstoffe einen ähnlichen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von MDA-MB-231 BR-Zellen haben. Hierfür wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.4.11 beschrieben in unbehandeltem bzw. durch aktivierte Mikrogliakulturen konditioniertem Medium kultiviert. Die Proliferation wurde nach den in Abschnitt 4.2.3.7 beschriebenen Inkubationszeiten photometrisch bestimmt und die bereits erwähnten Berechnungen angestellt.

Unter unbehandeltem Mikrogliamedium war die Proliferationsratio der Zellen mit endogener PTEN-Expression an Tag 3 um einen Wert von 0,9 höheren als jene von PTEN-überexprimierenden Zellen. Gleiches war unter konditioniertem Mikrogliamedium der Fall (Abb. 4.48 A). Die Kultivierung unter konditioniertem Medium löste an Tag 5 eine Verringerung der Proliferationsratio sowohl der PTEN endogen exprimierenden als auch der PTEN-überexprimierenden Zellen um einen Wert von 0,3 aus. Es kann somit geschlossen werden, dass eine verringerte PTEN-Expression zu gesteigerter Proliferation führt, diese jedoch nicht über durch Mikroglia-sezernierte Substanzen beeinflusst wird.



Abb. 4.48: Proliferationsunterschiede von MDA-MB-231 BR/leer und MDA-MB-231 BR/PTEN in Mikroglia-Kulturmedium. Für die Proliferationsanalysen wurden 1 x 10<sup>3</sup> Zellen in 96-well Platten ausgesät. Nach 24 h (Tag 1) erfolgte die erste Messung sowie ein Mediumwechsel mit unbehandeltem (A) bzw. durch aktivierte Mikrogliakulturen konditioniertem Medium (B). Nach weiteren 24 (Tag 2) und 48 h (Tag 3) erfolgten weitere Messungen. Die Versuche wurden in Quintruplikaten durchgeführt und die Proliferation mittels MTT-Assay photometrisch bestimmt. Die Verhältnisse der Proliferationsraten von Tag 2 bzw. Tag 3 zu Tag 1 (Ratio<sub>2/1</sub> bzw, Ratio<sub>2/1</sub>) wurden für MDA-MB-231 BR/leer (endogen) und MDA-MB-231 BR/PTEN (PTEN) aufgetragen, die in unbehandeltem (A) oder konditioniertem Mikroglia-Medium kultiviert wurden (B). Die Proliferationsunterschiede der MDA-MB-231 BR-Sublinien in unbehandeltem verglichen mit konditioniertem Mikroglia-Kulturmedium ( $\Delta$ Medium) sind tabellarisch aufgeführt (C).

# 4.2.3.10 Auswirkungen durch Mikroglia sezernierter Botenstoffe auf das Migrationsverhalten in Abhängigkeit der PTEN-Expression

Um die Auswirkungen der PTEN-Überexpression auf das Migrationsverhalten von MDA-MB-231 BR-Zellen unter Einfluss von durch Mikroglia sezernierte Stoffe zu analysieren, wurden Transwell-Assays in einer Boyden-Kammer wie in Abschnitt 4.2.3.6 erwähnt durchgeführt. Für diese Experimente wurden allerdings 72 h vor Beginn des Assays 1 x 10<sup>5</sup> Zellen der humanen Mikrogliazelllinie CHME3 in 24-well Platten ausgesät. Vor der Aussaat der zu analysierenden MDA-MB-231 BR-Zellen wurde unbehandeltes Mikrogliamedium in zusätzliche Vertiefungen der 24-well Platte vorgelegt. Zur Analyse des Migrationsverhaltens wurden anschließend MDA-MB-231 BR-Zellen wie in Abschnitt 4.2.3.6 beschrieben in Transwell-*Inserts* ausgesät, über 24 h inkubiert und die Anzahl der migrierten Zellen bestimmt.

Unter Verwendung von Mikrogliamedium als Lockstoff migrierten kaum Zellen (ca. 10 Zellen/Abschnitt). Zudem wurden keine Unterschiede der Migrationsraten induziert. Die durch Mikroglia sezernierten Substanzen lösten in PTEN endogen exprimierenden Zellen eine 2,5x stärkere Migration als in PTEN-überexprimierenden Zellen aus (Abb. 4.49 A).



Abb. 4.49: Migrationsunterschiede von MDA-MB-231 BR/leer und MDA-MB-231 BR/PTEN in Mikroglia-Medium Für die Transwell-Assays in einer Boyden-Kammer wurden 72 h vor Beginn des Assays 1 x 10<sup>5</sup> CHME3-Zellen in 24-well Platten ausgesät. Vor der Aussaat der zu analysierenden MDA-MB-231 BR-Sublinien wurde unbehandeltes Mikrogliamedium in zusätzliche Vertiefungen der 24-well Platte vorgelegt. 1 x 10<sup>4</sup> Zellen wurden in Transwell-Inserts in Zellkulturmedium ohne FBS ausgesät. Nach 24 h wurden die migrierten Zellen fixiert und gefärbt. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Die Anzahl migrierter Zellen wurden bei 10-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop in fünf verschiedenen Regionen jedes Inserts ermittelt. Die Anzahl migrierter MDA-MB-231 BR/leer (endogen) und MDA-MB-231 BR/PTEN-Zellen (PTEN) in unbehandeltem Mikroglia-Medium (Medium) und in Kokultur mit Mikroglia (Mikroglia -Kokultur) ist gegeneinander aufgetragen. Die Migrationsunterschiede der Sublinien in unbehandeltem Mikroglia -Medium gegen die Kokultur ( $\Delta$ Medium) sind tabellarisch aufgeführt (B). Die statistsiche Signifikanz wurde mit Hilfe des student'schen t-Tests ermittelt. \*\*\*: p < 0,001.

Durch Mikroglia sezernierte Substanzen lösen in Zellen mit endogener PTEN-Expression eine 13x höhere Migrationsrate aus. In PTEN-überexprimierenden Zellen wurde hierdurch nur eine 4x gesteigerte Migration induziert. Diese Ergebnisse dienen als zusätzliche unabhängige Bestätigung dafür, dass PTEN-abhängige Migration einen anderen Stimulus als FBS benötigt. Die Ergebnisse implizieren, dass auch Mikroglia-sezernierte ähnlich wie Astrozyten-sezernierte Botenstoffe, die Migration von Tumorzellen fördern. Es wurden signifikante Unterschiede im Migrationsverhalten zwischen der Kokultivierung mit Mikroglia und der Kultivierung in Medium sowie zwischen Zellen mit endogener PTEN-Überexpression und PTEN-Überexpression unter Mikrogliakokultur festgestellt. Wie schon für Astrozyten gezeigt, wird dieser Effekt jedoch ebenfalls durch eine erhöhte PTEN-Expression in Tumorzellen vermindert.

# Diskussion

# 5.1 Die klinische Rolle des EGFR/HER2-Signalwegs in der Gehirnmetastasierung von Mammakarzinompatientinnen

Durch die Weiterentwicklung systemischer Therapie sind primäre Mammakarzinome mittlerweile zum größten Teil erfolgreich behandelbar. Dennoch ist eine steigende Inzidenz des Auftretens von BCBM mit Todesfolge zu verzeichnen. Dem liegt zugrunde, dass die Metastasierung an sich einen frühen Schritt in der Tumorgenese darstellt, die Tumorzellen nach Erreichen des Zielgewebes allerdings in einen Zustand der Dormanz eintreten, der oft Jahre andauern kann<sup>11</sup>. Es wird vermutet, dass bereits vor Therapiebeginn des Primärtumors ein minimale residuelle Erkrankung im Gehirn vorliegt, die ggf. durch die eingesetzten Therapeutika aus strukturellen Gründen nicht erreicht werden kann bzw. dormante Zellen nicht auf die Behandlung ansprechen, da sie nicht proliferieren. Unbehandelte BCBM führen durch Auswirkungen auf lebenswichtige Gehirnfunktionen unweigerlich zum Tode der Betroffenen. Da die Nichtbehandelbarkeit der meisten BCBM ein vermehrt auftretendes ein klinisches Problem darstellt, ist die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen und involvierten Proteine von außerordentlicher Bedeutung für die Weiterentwicklung gezielter Therapiemaßnahmen<sup>216</sup>.

Die genaue molekulare Basis der Gehirnmetastasierung ist nicht geklärt. Allerdings reguliert der durch die RTKs EGFR und HER2 angeschaltete PI3K-Signalweg diverse an der Tumorgenese beteiligte essentielle Zellfunktionen, u.a. Proliferation und Apoptose <sup>143</sup>. Involvierte Mitglieder werden als Ziele von *Targeted*-Therapieansätzen aktuell intensiv erforscht und Alterationen sind sowohl mit primärem Mammakarzinom als auch mit BCBMs assoziiert<sup>201,217–221</sup>. Die Effizienz der Therapie könnte durch eine kombinierte Inhibition mehrerer Proteine desselben oder in parallelen Signalwegen deutlich gesteigert und so das Auftreten sekundärer Resistenzen vermieden werden. Daher ist die Analyse möglicher gleichzeitig dysregulierter Signalwegsmitglieder von außerordentlicher klinischer Bedeutung. Diverse Studien belegen häufige Alterationen von EGFR, HER2, PTEN und PIK3CA in Mammakarzinomen. Dies ist jedoch die erste vergleichende Studie, die sich der Untersuchung aller vier Proteine in verschiedenen Subgruppen primärer Mammakarzinome, Gehirnmetastasen sowie Metastasen in andere Organe gemeinsam zum Ziel gesetzt hat.

#### 5.1.1 Klinische Relevanz von EGFR-Alterationen im Mammakarzinom

Die transmembrane RTK EGFR bildet den Startpunkt diverser Signalkaskaden zur Regulierung verschiedener zellulärer Mechanismen. Zahlreiche Studien belegen EGFR-Alterationen in unterschiedlichen Tumorentitäten wie dem Mamma-, Colon-, Ovarial- oder dem Pankreaskarzinom<sup>108–111</sup>. Die publizierten Daten sind extrem abhängig von den verwendeten Analysemethoden, dem zur Einteilung eingesetzten System sowie dem Grenzwert zur Bewertung der Befunde<sup>222</sup>. Bislang existiert trotz intensiver klinischer Forschung an EGFR keine Vereinheitlichung der Parameter zur Definition eines veränderten EGFR-Status' auf der Ebene der Kopienanzahl und des Proteinspiegels.

Die Detektionsmöglichkeiten chromosomaler Alterationen sind vielfältig. CGH-Analysen stellen ein gutes Hilfsmittel zum Screening des vollständigen Genoms auf Veränderungen der Kopienanzahl dar. Abhängig von der Art des verwendeten Arrays können Alterationen auf gewisse Regionen begrenzt werden, allerdings sind oft anschließende Analysen dort lokalisierter Gene notwendig. Detaillierte Informationen über die betroffenen DNA-Loci liefern PCR-Analysen spezifischer Bereiche oder Mikrosatellitenanalysen. Beide Methoden bieten die Möglichkeit, auch außerhalb von Genloci nach deletierten oder amplifizierten Regionen zu suchen, um die Begrenzung der betroffenen Bereiche festzulegen. Die beste Auflösung wird derzeit über *Next Generation Sequencing*-Analysen (NGS) erreicht, die es ermöglicht nahezu vollständige Sequenzinformation für das Genom, Exom oder weiter spezifizierte Bereiche zu erhalten. Diese Methodik bietet die Möglichkeit eines groben Screenings und zugleich der detaillierten Untersuchung spezifischer Genabschnitte auf Translokationen oder Mutationen<sup>183,223–226</sup>.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass *EGFR*-Zugewinne und –Amplifikationen signifikant häufiger in BCBM als in den anderen untersuchten Kohorten, mit Ausnahme von Primärtumoren mit BCBM, auftreten. Dagegen sind sie unter Primärtumorpatientinnen ohne Rezidive oder mit Knochenmetastasen fast nicht existent. Die Resultate der qPCR-Analysen belegen, dass bereits ein Zugewinn der *EGFR*-Kopienanzahl eine verfrühte Entwicklung von Rezidiven nach sich zieht, während Patientinnen mit einer *EGFR*-Amplifikation die schlechteste Prognose aufwiesen. Diese Arbeit belegt ebenfalls, dass Tumorproben mit einer über qPCR-Analysen bestimmten Ratio zwischen 2 und 5 Tumorareale mit heterogener EGFR-Kopienanzahl und –Proteinspiegeln aufwiesen. Da für die qPCR-Analysen jedoch eine Mischung verschiedener Tumorareale herangezogen wird, sind keine Aussagen über Veränderungen auf Einzelzellniveau möglich. Informationen über die Heterogenität der Alterationen innerhalb verschiedener Areale des Tumors können wiederrum über *in situ*-Hybrisidisierungs (ISH-) Analysen ermittelt werden, die auf einem Nachweis über Fluoreszenz (FISH) oder Chromogene (CISH) basieren<sup>227</sup>. Tatsächlich konnte durch Validierung der qPCR-Analysen bestimmten Ratio

zwischen 2 und 5 Tumorareale mit heterogener *EGFR*-Kopienanzahl aufwiesen und sich dies auf auch auf Proteinebene nachweisen ließ. Es wäre von klinischem Interesse zu wissen, ob unter Vorliegen heterogener EGFR-Expression im Primärtumorgewebe die Tumorzellen in BCBM eine einheitliche *EGFR*-Amplifikation aufweisen. In dieser Studie standen nur wenige Fälle mit korrespondierendem Primärtumor- und BCBM-Gewebe zur Verfügung. Jedoch konnte eine solche Korrelation in einem Fall in der Tat beobachtet werden. Dies legt nahe, dass Zellen mit *EGFR*-Amplifikation jene sind, die präferentiell in das Gehirn metastasieren. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die *EGFR*-Kopienanzahl in der vorliegenden Studie anhand von PCR-Analysen ermittelt wurde und nur in Einzelfällen zusätzlich FISH-Analysen durchgeführt wurden. Zu dem erwähnten Fall lag keine FISH-Analyse vor, weshalb leider keine exakte Aussage darüber getroffen werden kann, ob in BCBM-Gewebe tatsächlich eine einheitliche *EGFR*-Amplifikation vorlag oder der Anteil der Gesamttumormasse mit einem -Zugewinn im Vergleich zu Region mit -Amplifikationen schlicht unterrepräsentiert vorlag.

Die gängigen zur Analyse von EGFR-Amplifikationen verwendeten Methoden sind qPCR- und ISH-Analysen. Wie bereits erwähnt, existiert bislang kein einheitliches System zur Bewertung der vorliegenden Veränderungen, wie dies z.B. zur Diagnose einer HER2-Überexpression der Fall ist. Bei HER2 ist das Vorliegen einer Amplifikation klar als Ratio der *HER2/Cen17*-Kopienanzahl von ≥2,2 in mindestens 20 Zellen des gesamten Tumorbereiches definiert. Liegt die Ratio zwischen 1,8 und 2,1, wird das Verhältnis in weiteren 40 Zellen bestimmt<sup>193</sup>. Studien der EGFR-Kopienanzahl variieren stark in der von ihnen verwendeten Einteilung. Bhargava et al betrachten ein EGFR/Cen7-Verhältnis von >5 als Amplifikation, welche sie in 6 % des untersuchten Primärtumorkollektives detektierten. Von diesen 11 Fällen entwickelten drei Fernmetastasen<sup>114</sup>. Gumuskaya *et al* wiederum bezogen zudem zusätzlich eine Polysomie des Chromosoms 7 in ihre Bewertungen mit ein. Als Amplifikation wurden Cluster von EGFR-Signalen mit einer EGFR/CEP7-Ratio ≥2 oder ≥5 definiert. Sie beschrieben dadurch unter 62 Primärtumorfällen in 49 % Polysomie in verschiedenen Varianten und in 2 % Amplifikationen<sup>116</sup>. Demnach führt die reine Betrachtung des EGFR/Cen7-Verhältnisses zu Fehlinterpretationen, wenn eine Polysomie des Chromosoms vorliegt. Um das vermehrte Vorliegen des Chromosoms 7 in die Auswertung miteinzubeziehen, sollte die Anzahl vorliegender EGFR-Kopien zu einem Referenz-Chromosom in Bezug gesetzt werden, auf dem das EGFR-Gen nicht lokalisiert ist, welches jedoch unter Mammakarzinompatientinnen unverändert vorliegt. Dies gilt in den meisten Fällen für Chromosom 2. Alternativ sollte das Vorliegen einer Polysomie gesondert vom EGFR/Cen7-Verhältnis betrachtet werden, da bei dessen Berechnung eine Polysomie nicht als veränderte Kopienanzahl gewichtet wird.

Ferner sollte bei der Analyse von Primärtumoren kein Mindestanteil von Zellen mit *EGFR*-Alteration für die Definition eines *EGFR*-Zugewinns festgelegt werden, da in dieser Studie eine klare Assoziation mit BCBM nachgewiesen werden konnte. Sollten Zellen aus einem kleinen Tumorareal mit *EGFR*-Alteration bevorzugt in das Gehirn metastasieren, deren Anteil am Gesamttumor unterhalb einer solchen Mindestgrenze liegt, würde der Patientin wegen fehlender Indikation keine adäquate gegen EGFR-gerichtete Therapie zuteil. Da bei dieser Variante der *EGFR*-Überexpression der Rezeptor in seiner Wildtypform vorliegt, können zur Behandlung Therapeutika eingesetzt werden, welche die Ligandenbindestelle für das Andocken von Liganden blockieren und die Aktivierung des Rezeptors verhindern. Nach diesem Mechanismus funktioniert die zielgerichtete Behandlung HER2-positiver Patientinnen mit dem monoklonalen Antikörper Trastzumab. Als *Targeted*-Therapie gegen EGFR wird aktuell der monoklonale Antikörper Cetuximab in Kolonkarzinompatienten eingesetzt, ist jedoch für das Mammakarzinom nicht zugelassen. In der Behandlung primärer als auch metastasischer Mammakarzinome wird der small molecule-Inhibitor Lapatinib eingesetzt<sup>228</sup>.

Die EGFRvIII-Transkriptvariante führt im Gegensatz zu einer Amplifikation des *EGFR*-Genlokus' durch den Verlust der Ligandenbindedomäne zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors, da diese Mutation eine Konformation herbeiführt, welche die Dimerbildung begünstigt ohne dass eine Ligandenbindung notwendig ist <sup>119</sup>. Diese Konformation induziert in der Folge konstant aktivierte Signalweiterleitung. Die EGFRVIII-Deletionsvariante ist stark mit dem GBM assoziiert und wurde selten im Mammakarzinom nachgewiesen<sup>119–121</sup>. Das Vorliegen von EGFRvIII in BCBM würde eine molekulare Ähnlichkeit zum GBM andeuten und somit entsprechende Therapieoptionen eröffnen. In dieser Arbeit wurden keine BCBM-Fälle mit dem EGFRvIII-Transkript identifiziert. Hierdurch werden die Daten aus bereits publizierter Literatur bezüglich primäre Mammakarzinome bestätigt und eine untergeordnete Rolle dieser Mutante im Mammakarzinom nahegelegt. Zudem wird impliziert, dass zumindest bezüglich des EGFRvIII-Transkripts keine molekulare Ähnlichkeit von BCBM zum GBM vorliegt.

Punktmutationen in der TKD des *EGFR* sind besonders im Bronchial- und Kolonkarzinom eine häufige Ursache für die konstitutive Aktivierung des Rezeptors und treten ebenfalls eher selten im Mammakarzinom auf<sup>122,124,125</sup>. Die Mutationen rufen eine Konformationsveränderung hervor, welche in der Wildtypform von EGFR erst durch Ligandenbindung initiiert wird. Durch die veränderte Konformation wird die dauerhafte Dimerbildung ermöglicht und so eine konstitutive Autophosphorylierung eingeleitet<sup>123</sup>. Bezüglich Bronchial- und Kolonkarzinomen sind *small molecule*-Inhibitoren aktuell bereits im klinischen Einsatz. Die Assoziation von TKD-Mutationen mit BCBM würde ebenfalls neue Therapieoptionen eröffnen. Da in dieser Studie keine solchen Mutationen in BCBM nachgewiesen werden konnten, bestätigen die Resultate die publizierten Ergebnisse anderer Studien hinsichtlich einer untergeordneten Rolle von TKD-Mutationen im Mammakarzinom<sup>114,229</sup>.

Die unterschiedlichen Varianten genetischer Veränderungen von *EGFR* manifestieren sich auf Proteinebene sowohl in Hinsicht auf Proteinspiegel als auch posttranslationale Modifikation (Phosphorylierung). Wie bereits erwähnt, liegt der Rezeptor bei einer Amplifikation vermehrt in seiner Wildtypform vor. Daher bietet sich die immunhistochemische Detektion auf Proteinebene mittels Wildtyp-EGFR-spezifischer Antikörper an. Aufgrund der meist geringen verfügbaren Tumormasse ist die Detektion über Immunoblot praktisch ausgeschlossen, welche zudem keine Aussage über intratumorale Heterogenität ermöglicht. Bei Vorliegen konstitutiv aktivierten EGFRs ist eine die Detektion über phosphorylierungsspezifische Antikörper eine Option, die dementsprechend die aktivierte Form des Rezeptors nachweist. Da die bereits diskutierten genomischen Analysen keine Anhaltspunkte für das Vorliegen konstitutiv aktivierter EGFR-Varianten lieferten, wurde die Analyse des Proteinspiegels immunhistochemisch über einen gegen Wildtyp-EGFR gerichteten Antikörper durchgeführt<sup>183,230</sup>.

Wie auch auf genomischer Ebene exisitiert kein einheitliches Protokoll zur Festlegung des EGFR-Proteinstatus'. Yoshida et al unterschieden in negative Proben (keine Signale, 0), schwache (1+) und starke Signale (2+) ungeachtet des Anteils an der Tumormasse<sup>231</sup>. Teng et al führten zusätzlich eine moderate Signalintensität ein (0, 1+, 2+, 3+)<sup>125</sup>. Beide bildeten aus diesen Resultaten einen EGFR-Status, der sich in negativ und positiv untergliederte. Gumuskaya et al, Kersting et al, Collins et al, Yoshida et al sowie Nielsen et al definierten einen EGFR-positiven Status für jegliche messbare Signalintensität, wohingegen Tham et al nur starke Signale miteinbezog<sup>115,116,231–234</sup>. Bhargava et al, Grupka et al sowie Gaedcke et al wiederum teilten zusätzlich nach dem Anteil der Zellen mit einer definierten Signalintensität an der Gesamttumormasse ein<sup>114,235,236</sup>. Durch diese methodisch bedingte Heterogenität wurden durch verschiedene Studien EGFR-positive primäre Mammakarzinome zu variierenden Anteilen von 13-78 % beschrieben. Unter BCBM-Fällen wurde eine EGFR-Expression dagegen in ca. 40 % festgestellt<sup>235–237</sup>. Die in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektive wurden hinsichtlich der EGFR-Proteinspiegel analog zu der Klassifizierung von Teng et al eingeteilt und enthielten nur 10 % EGFR-positive Primärtumorfälle, jedoch wiesen 25 % der Primärtumorpatientinnen mit BCBM und 36 % der BCBM-Patientinnen EGFR-Expression auf. Somit fügen sich die Resultate dieser Arbeit gut in den Kontext der bestehenden Literatur ein.

Im Zuge dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass alle untersuchten Patientinnen mit *EGFR*-Amplifikationen messbare EGFR-Proteinspiegel aufwiesen. Im Gegensatz hierzu wurden in Fällen mit einer *EGFR/Cen7*-Ratio von 2-5 auf Proteinebene Areale mit unterschiedlich starken EGFR-Signalen nachgewiesen. Basierend hierauf kann keine genaue Aussage darüber getroffen werden, welche Kopienanzahl oder Proteinspiegel in die Definition EGFR-positiven Tumorgewebes einbezogen werden sollten. In einem Fall mit heterogenen Proteinspiegeln konnten jedoch Areale mit schwachen Pro-

teinspiegeln eine *EGFR/CEP7*-Ratio von 2 zugeordnet werden. Dies impliziert, dass eine Verdopplung der *EGFR*-Kopienzahl eine detektierbare EGFR-Expression zur Folge hat und daher als EGFR-positiv definiert werden sollte. Zudem sollten EGFR-positive Gebiete, ungeachtet ihres Anteils an der Gesamttumormasse, ein Kriterium für die Definition des EGFR-Status' bilden, da in dieser Arbeit, wie auch in anderen, eine Assoziation von EGFR-positivem Primärtumorgewebe mit BCBM festgestellt wurde<sup>235–237</sup>. Wie in der Diskussion der genomischen *EGFR*-Analyse bereits aufgegriffen, könnten schon einzelne EGFR-positive Zellen, in der Lage sein BCBM auszubilden, was wiederum Auswirkungen auf den Therapieerfolg haben könnte. Andererseits wurde über kontroverse Effekte der *EGFR*-Kopienanzahl auf der Proteinebene sowie die Therapie berichtet, weshalb sie aktuell nicht in die klinische Diagnosestellung einbezogen wird <sup>238</sup>. Diesbezüglich muss jedoch erwähnt werden, dass viele Studien nicht zwischen einem EGFR-Zugewinn, einer –Amplifikation oder einer Polysomy differenziert haben.

Autopsie-Studien belegen eine deutlich höhere Dunkelziffer nichtsymptomatischer im Vergleich zu symptomatischen BCBM. Da neben dieser Arbeit auch jüngste Studien eine Korrelation von EGFR-Alterationen mit BCBM bestätigen, sollte die Beurteilung des EGFR-Status' Eingang in die Primärtumordiagnostik finden<sup>235–237</sup>. Dennoch ist die Weiterentwicklung von Detektionsmethoden zur Früherkennung von Gehirnmetastasen wie beispielsweise die Analyse zirkulierender Tumorzellen von allergrößter Wichtigkeit. Dies ist insbesondere im Kontext des Umschlages zu einem EGFR-positiven Status zwischen korrelierenden Primärtumoren und BCBM in einigen Patientinnen von Bedeutung.

Zusammengenommen implizieren die hinsichtlich EGFR gewonnenen Erkenntnisse, dass Alterationen eine prognostische Relevanz in der Entwicklung von BCBM haben und nicht mit Knochenmetastasen assoziiert sind. Ferner werden veränderte EGFR-Proteinspiegel in metastatischen Mammakarzinomen weitestgehend durch eine erhöhte –Kopienanzahl ausgelöst und -Mutationen spielen eine untergeordnete Rolle. Zudem veranschaulichen die Resultate der EGFR-Analyse die außerordentliche Tragweite einer Unterscheidung zwischen *EGFR*-Amplifikationen und –Zugewinnen, da sich diese Differenzierung maßgeblich auf die anzuwendenden Therapiemaßnahmen auswirkt.

#### 5.1.2 Klinische Relevanz von HER2-Alterationen im Mammakarzinom

HER2 ist Startpunkt derselben Signalkaskaden wie auch EGFR, die regulierend auf verschiedene zelluläre Mechanismen wirken. Der Anteil HER2-positiver Fälle aus der in dieser Arbeit analysierten Primärtumorkohorte ist mit 16 % im Vergleich zu dem in der Literatur berichteten Anteil von ca. 20-25 % leicht unterrepräsentiert<sup>1,126</sup>. Der Anteil der HER2-positiven BCBM-Fälle fügt sich mit 41 % in die Resultate anderer Studien ein (33-50 %) und impliziert einen signifikant höheren Anteil HER2positiver Fälle unter BCBM- im Vergleich zu Primärtumorpatientinnen<sup>237,239,240</sup>. Dass jedoch auch in der BCOM-Kohorte HER2-positive Fälle nachgewiesen wurden (18 %), impliziert eine HER2-Überexpression als generellen Faktor einer schlechten Prognose.

In dieser Studie wurde ein *de novo* auftretender HER2-positiver Status in drei BCBM-Fällen (17%) nachgewiesen. Ein Umschlag des HER2-Status' zwischen dem Primärtumor und der zugehörigen Fernmetastase wird von verschiedenen Studien in variierenden Frequenzen berichtet (4-48 %)<sup>241-245</sup>. Gancberg et al detektierten in 6 % der untersuchten Fälle einen abweichenden HER2-positiven Status in den Fernmetastasen. Unter den analysierten Fällen befanden sich zwei BCBM, die beide keinen abweichenden HER2-Status zwischen Primärtumor und Metastase aufwiesen<sup>241</sup>. In der Studie von Lower et al wiesen 24 % der Metastasen einen vom Primärtumorgewebe abweichenden HER2positiven und 10 % einen abweichenden HER2-negativen Status auf, dabei wurde nicht näher auf die Lokalisation der untersuchten Metastasen eingegangen<sup>244</sup>. Die Studie von Zidan *et al* enthielt keine BCBM, wohingegen die Studien von Regitnig et al und Nishimura et al zwar BCBM-Proben enthielten, darauf jedoch bei der Betrachtung des HER2-Status' nicht Bezug genommen wurde<sup>242,243,245</sup>. Studien, die BCBM in größeren Umfang miteinschließen sind rar, belegen jedoch ebenso die Existenz von Veränderungen des HER2-Status' zwischen Primärtumoren und ihren korrrespnodierenden BCBM. Fuchs et al analysierten ausschließlich BCBM-Patientinnen und fanden unter 29 zugehörigen Primärtumorproben in nur eine, in welcher ein abweichender HER2-positiver Status detektiert wurde<sup>246</sup>. Bachmann et al belegten einen abweichenden HER2-positiven Status in 9 % und einen abweichenden HER2-negativen Status in 23 % der Primärtumoren im Vergleich zu ihren korrespondierenden BCBM<sup>240</sup>.

Ein Umschlag des HER2-Status' im Vergleich zum Primärtumor wurde interessanterweise auch in zirkulierenden Tumorzellen von Mammakarzinompatientinnen belegt<sup>247</sup>. Diese Funde implizieren, dass in einzelnen Zellen nach Verlassen des Primärtumors möglicherweise eine Konvertierung des HER2-Status' stattgefunden hat und die betroffenen Zellen den Subklon darstellen, aus dem sich die nachfolgende Metastase entwickelt hat. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit einer Heterogenität des HER2-Status' in Primärtumorgewebe mit einem HER2-positiven Subklon, der aufgrund seines geringen Anteils bei der Primärtumordiagnose übersehen wurde. HER2-positive Zellen werden gene-

rell als aggressiv angesehen. Da in diesem Fall keine gezielt gegen HER2-gerichtete Therapie der Patientinnen angewandt wurde, sind (analog zu EGFR) die Disseminierung und das Auswachsen dieser HER2-positiven Zellen zu Metastasen im Gehirn wahrscheinlich. Sollte ein HER2-positiver Subklon übersehen worden sein, ist eine sorgfältige Untersuchung des Primärtumorgewebes für die Diagnose umso wichtiger, da schon das Übersehen einzelner HER2-positiver Tumorzellen die Grundlage für BCBM bilden könnte. Genau dies bedingt jedoch die im Klinikalltag eingesetzte Bildung eines Mittelwertes aus den Werten der analysierten Tumorzellen, wodurch eine mögliche Tumorheterogenität nicht berücksichtigt wird<sup>193</sup>.

Eine Veränderung des HER2-Status' der Patientinnen im Laufe der Metastasierung wird durch die Analyse in CTCs von Mammakarzinomprimärtumorpatientinnen unterstützt, welche eine Heterogenität des HER2-Status' in CTCs belegten <sup>248–250</sup>. Diese Studien wiesen abhängig von der verwendeten Detektionsmethode einen vom Primärtumor abweichenden HER2-positiven Status in 6-48 % der CTCs auf Einzelzellniveau nach und zeigten, dass CTCs eines HER2-positven Primärtumors nicht zwingend einen übereinstimmenden Status aufweisen. Demnach könnte der CTC-Status als guter Indikator eines Umschlags im Tumorphänotyp dienen und eine Indikation zur Früherkennung BCBM bilden. Die betroffenen Patientinnen profitieren hinsichtlich der eingesetzten Therapie von einer Diagnose der BCBM in einem frühen Stadium. Patientinnen mit solitären Metastasen weisen ein deutlich längeres Gesamtüberleben auf, da diese oft operabel sind<sup>57,65,73,74</sup>. Wenn die HER2-Amplifikation sowohl in Primärtumoren als auch in deren korrespondierenden BCBM vorliegt, besteht die Möglichkeit durch engmaschigere Kontrollen der Patientinnen deren Überlebenszeit zu erhöhen. Die Weiterentwicklung der gezielten HER2-Therapie mit small molecule-Inhibitoren, welche in der Lage sind die Bluthirnschranke zu überqueren und direkt die BCBM anzugreifen, wäre insbesondere zur Behandlung HER2-positiver BCBM förderlich. Denn monoklonale Antikörper wie Trastuzumab sind aufgrund ihrer Größe nicht in der Lage die engen Zell-Zell-Kontakte der Endothelzellen des zentralen Nervensystemszu passieren<sup>48,60</sup>.

Zusammengenommen ist ein HER2-positiver Status generell mit einem metastatischen Mammakarzinomphänotyp und nicht ausschließlich mit BCBM assoziiert. Allerdings tritt in einem Anteil der Patientinnen während der Metastasierung mindestens einmal ein Umschlag des HER2-Status' auf. Zur Sicherstellung einer angemessenen Therapie der Metastasen könnte die zusätzliche Analyse von CTCs hilfreich sein. In diesem Kontext wird in Deutschland aktuell eine große Phase III Studie an HER2-positiven Patientinnen durchgeführt und eine weitere ist bereits abgeschlossen<sup>251–253</sup>.

#### 5.1.3 Klinische Relevanz von PTEN-Alterationen im Mammakarzinom

PTEN wirkt an der Plasmamembran über seine Lipidphosphatase-Aktivität als PI3K-Antagonist<sup>144,146</sup>. Der Funktionsverlust von PTEN kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Er ist sowohl im Glioblastom (90 %) als auch im primären Mammakarzinom (15-37 %) ein häufiges Ereignis und mit einer schlechten Prognose assoziiert<sup>150,153,155–158</sup>. Zu den auslösenden Mechanismen zählen Verlust des *PTEN*-Genlokus' (10q23.3), Mutationen der CDS oder Methylierung der Promotorregion. Eine häufige genomische Ursache für den Funktionsverlust von PTEN ist eine hetero- oder homozygote Deletion des *PTEN*-Genlokus'. Eine Deletion nur eines Allel, zieht einen Verlust der Heterozygotie nach sich<sup>159</sup>. Treten zusätzlich Mutationen im zweiten Allel auf, welche die katalytische Aktivität beeinträchtigen oder liegt das zweite Allel methyliert vor, kommt es zum vollständigen Verlust von funktionsfähigem PTEN. Generell wird der Verlust eines Allels von dem gesunden Allel kompensiert, jedoch liegt bezüglich *PTEN* ein Dosiseffekt der Haploinsuffizienz vor<sup>154,204,254,255</sup>.

Die Ermittlung chromosomaler Aberrationen kann mittels CGH- oder Mikrosatellitenanalyse erfolgen. CGH-Analysen eignen sich als Screeningmethoden für Fragestellungen mit unbekannter Lokalisation von Aberrationen. Bereiche mit über CGH-Analysen ermittelten Aberrationen können über Mikrosatelliten-Analysen weiter eingegrenzt werden. In Voruntersuchungen zu der vorliegender Studie konnten mittels Array-CGH-Analysen chromosomale Aberrationen des den *PTEN*-Lokus umgebenden Abschnittes 10q23.3 in Patientinnen mit primärem Mammakarzinom und BCBM nachgewiesen und über Mikrosatelliten-Analysen auf den *PTEN*-Lokus eingegrenzt werden<sup>188,189</sup>. Der Vergleich beider Analyse-Methoden belegt eine gute Übereinstimmung der Resultate, da in nur zwei der 25 untersuchten Proben ein Verlust des Chromosomenabschnittes 10q23.3, jedoch keine allelische Imbalanz (AI) des *PTEN*-Lokus' detektiert wurde. Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz ist, dass sich die deletierte chromosomale Region in diesen beiden Fällen ausschließlich auf den PTEN-Lokus erstreckte und die beiden Mikrosatelliten-Marker nicht enthielt.

Eine weitere Ursache für den PTEN-Funktionsverlust sind Mutationen im *PTEN*-Gen selbst. Berichtet sind sowohl Punktmutationen als auch großflächige Deletionen, die mehrere Exone umfassen<sup>164</sup>. *PTEN*-Mutationen stellen in primären Mammakarzinomen mit  $\leq$ 10 % eine relativ seltene Alteration dar<sup>136,140,166</sup>. Auch im Zuge der vorliegenden Studie konnten sie in keinem der untersuchten Gewebe aus der Primärtumorkohorte, dagegen relativ häufig in BCBM (17 %) nachgewiesen werden. Alle identifizierten Aberrationen wurden nicht in korrespondierendem Normalgewebe detektiert. Dies impliziert ihren somatischen Ursprung. Ferner wurde keine der Mutationen zuvor im Zusammenhang mit Mammakarzinomerkrankungen erwähnt. Zwei der untersuchten Fälle mit heterozygotem Verlust der *PTEN*-Kopienanzahl wiesen zusätzlich *PTEN*-Mutationen auf. In einer Patientin wurde eine Deletion von Exon 4 nachgewiesen. Die andere Patientin trug eine komplexe Mutation, die sich einer Dele-

tion der Exone 4-6 auf dem einen Allel und Konversion der Exone 1-3 mit den Exonen 3-5 sowie einem deletierten Exon 6 auf dem zweiten Allel zusammensetzte. Die Al spiegelte in diesem Fall die unterschiedlichen Sequenzlängen beider unterschiedlich mutierter Allele wider. Ferner wurde in einer Patientin eine heterozygote Deletion der Exone 5-9 detektiert. Leider waren die Al-Analysen dieser Proben nicht informativ. Aufgrund der Größe der Deletion wäre zu erwarten, dass sich dies als einer Al nachweisen ließe. Die vierte Patientin mit einer detektierten Mutation, wies eine heterozygot vorliegende Basenpaarsubstitution (c.389G>T, p.R130L) ohne Vorliegen einer Al auf. Diese Punktmutation wurde ebenfalls in Karzinomen der Gebärmutterschleimhaut nachgewiesen<sup>256–265</sup>. Die Mutation ist zwar nahe dem aktiven Zentrum lokalisiert, jedoch liegt in diesem Fall scheinbar kein Dosiseffekt einer Haploinsuffizienz vor, da das Tumorgewebe der in dieser Arbeit untersuchten Patientin hohe PTEN-Proteinlevels aufwies.

Der eindeutige Nachweis des PTEN-Verlustes kann folglich nur auf Proteinebene erfolgen. Hierfür bieten sich IHC-Analysen an, da im Gegensatz zu Immunoblot-Analysen neben einer (semi-) quantitativen Bewertung die intrazelluläre Lokalisation (Zytosol bzw. Nucleus) von PTEN quantitativ auf Einzelzellniveau ermittelt werden kann. Außerdem werden für Immunoblot-Analysen verhältnismäßig große Proteinmengen benötigt, die aufgrund der meist limitierten Tumormasse in Patientenproben verfügbar ist. Die verlässlichste Aussage über den Verlust funktionellen PTENs kann durch Verwendung von Antikörpern getroffen werden, die gegen phosphoryliertes, also aktiviertes, PTEN-Protein gerichtet sind. Der Basenpaaraustausch c.389G>T könnte für eine funktionelle inaktive, jedoch stabile Form des PTEN-Proteins kodieren, die durch einen nicht-phosphospezifischen Antikörper erkannt werden kann. Durch Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers könnte eine valide Aussage über das Vorliegen einer funktionell inaktiven PTEN-Form getroffen werden<sup>183</sup>.

PTEN-Proteinverlust wurde in 14 Patientinnen ohne Mutationen nachgewiesen und wurde in neun dieser Fälle vermutlich durch die vorliegende AI verursacht. In den restlichen fünf Fällen müssen andere Mechanismen als Mutationen des PTEN-Lokus' oder AI ursächlich für den PTEN-Proteinverlust sein. Messbare PTEN-Proteinspiegel trotz Vorliegen einer AI wurden in fünf BCBM- bzw. drei BCOM-sowie metastasierenden Primärtumorproben festgestellt. Ein möglicher Auslöser einen Funktionsverlust könnte in diesen Fällen die Methylierung der *PTEN*-Promotorregion darstellen, wodurch das Ablesen der Sequenz unterbunden wird<sup>168</sup>. In der Literatur wird in 30 % der Mammakarzinome von methyliertem *PTEN* berichtet <sup>168,169</sup>. Zudem treten PTEN-Splicevarianten in familiärem und sporadischem Mammakarzinom auf. Allerdings wurde belegt, dass diese auch durch längere Lagerung der Proben hervorgerufen werden können<sup>266,267</sup>.

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv wiesen 31 % der BCBM-, 21 % der BCOM- und 19 % der Primärtumorpatientinnen keine messbaren cytoplasmatischen PTEN-Proteinspiegel auf. Wie in den Analysen der Kopienanzahl und des Mutationsstatus' wiesen Primärtumorpatientinnen mit BCBM den höchsten Anteil mit PTEN-Verlust auf. Dies betont die wichtige Rolle der Inhibtion des AKT-Signalwegs in der Gehirnmetastasierung des Mammakarzinoms. Weiterhin ist zu bemerken, dass acht der analysierten Gewebe heterogene Proteinspiegel in verschiedenen Tumorarealen aufwiesen, die sowohl PTEN-positiv als auch –negativ waren. Dieser Befund erlangt im Zusammenhang mit bereits publizierten IHC-Analysen von PTEN Bedeutung, da dort verhältnismäßig häufig TMAs eingesetzt werden. Diese setzen sich aus Stanzen verschiedener Tumorproben zusammen, deren Durchmesser etwa 1 mm beträgt und die auf einen Objektträger aufgebracht werden<sup>268</sup>. Diese Art der Gewebeverarbeitung bringt zwar die Vorteile mit sich, dass aufgrund minimalen Verbrauchs von Antikörpern sowie Gewebe mehr und kosteneffizientere Analysen unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden können als an normalen Gewebeschnitten. Andererseits steht nur ein sehr kleiner Anteil des Gesamttumors den Analysen zur Verfügung. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit deutlich, dass Subklone des Tumors mit PTEN-Verlust übersehen werden. Für die klinische Diagnostik ist dies nicht von Relevanz, da dort keine Gewebe-Microarrays eingesetzt werden<sup>28</sup>. Tatsächlich variieren die Frequenzen von Primärtumorpatientinnen mit PTEN-Verlust auf Proteinebene unter verschiedenen Studien stark (8-48 %)<sup>153,155–157,220,221,269–273</sup>. Panigrahi et al verwendeten für ihre Analysen Tumorgewebe in TMA-Form und wiesen mit 8 % den geringsten Anteil mit PTEN-Verlust auf<sup>221</sup>. Depowski et al dagegen verwendeten Schnitte von Gewebeblöcken und detektierten mit 48 % am häufigsten einen PTEN-Verlust<sup>273</sup>. Die große Differenz zwischen beiden Studien unterstreicht die Wichtigkeit der Verwendung von größeren Tumorarealen für IHC-Analysen, da Areale mit Veränderungen auf TMA-Stanzen möglicherweise nicht enthalten sind.

Es ist bekannt, dass PTEN sowohl zytoplasmatisch als auch im Nukleus lokalisiert sein kann. Chung *et al* belegten, dass die Proteinphosphataseaktivität von PTEN eher im Nukleus relevant ist, wo sie Einfluss auf die Zellzykluskontrolle hat, wohingegen zytoplasmatisches PTEN hauptsächlich in seiner Lipidphosphatasefunktion als PI3K-Antagonist tätig ist<sup>207</sup>. Klinische Studien zu nukleärer PTEN-Expression sind rar. Jedoch wurde eine Assoziation des Verlustes nukleären PTENs im malignen Melanom und Patienten mit Kolonkarzinomen berichtet<sup>274,275</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde der Verlust nukleär lokalisierten PTENs im Vergleich zu zytoplasmatischen PTEN in allen untersuchten Subgruppen häufiger beobachtet. Mit Ausnahme eines Falles wiesen alle Proben gleichzeitig einen Verlust von nukleär als auch von zytoplasmatisch lokalisiertem PTENs am seltensten in BCBM-Proben detektiert. Überraschenderweise wiesen Primärtumorpatientinnen mit BCBM, gefolgt von solchen mit

Knochenmetastasen am häufigsten einen Verlust nukleär lokalisierten PTENs auf. Die Rolle nukleären PTENs in der Zellzykluskontrolle scheint daher in Primärtumoren wichtiger zu sein als in Metastasen. Eine mögliche Funktion von PTEN als Metastasensuppressor in der Gehirnmetastasierung wäre somit nicht mit der Zellzykluskontrolle im Nukleus, sondern mit dem AKT-Signalweg im Zytoplasma gekoppelt.

Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass während der Metastasierung in das Gehirn sowohl eine fehlende Zellzykluskontrolle als auch eine gesteigerte Aktivierung des PI3K-Signalwegs zum Tragen kommt, während die Interaktion anderer solider Metastasen mit der Mikroumgebung vor Ort über PTEN-regulierte Zellzykluskontrolle beeinflusst wird.

#### 5.1.4 Klinische Relevanz von PIK3CA-Mutationen im Mammakarzinom

Krebserkrankungen, u.a. Mammakarzinome, sind mit einer konstitutiven Aktivierung von Mitgliedern der Klasse IA der PI3Ks assoziiert, was besonders für den Vertreter p110α gilt<sup>131–133</sup>. Mutationen im *PIK3CA*-Gen sind zwar für die gesamte CDS beschrieben, der Großteil ist jedoch in *Hotspots* konzentriert, die in Abschnitten auf Exon 9 (E542, E545, Q546) und Exon 20 lokalisiert sind (H1047), welche für die helikale bzw. die katalytische Domäne kodieren<sup>142</sup>. Alle Mutationen führen zu Aminosäuresubstitutionen an oberflächenexponierten an Positionen, die mit der regulatorischen Untereinheit interagieren und imitieren die durch die Bindung eines physiologischen Aktivators ausgelöste Konformationsänderung. Dies führt zu einer konstitutiven Aktivierung von PI3K, was eine verstärkte Signalweiterleitung in dem angeschlossenen AKT-Signalweg zur Folge hat<sup>143</sup>.

Der *PIK3CA*-Mutationsstatus primärer Mammakarzinome wurde in diversen Studien untersucht. Die Frequenzen mutierter Primärtumore variierten zwischen 15-45 %<sup>135–141</sup>. Der Anteil aller in dieser Arbeit nachgewiesenen PIK3CA-Mutationen in den Exonen 9 und 20 fügt sich mit 23 % gut in die bereits berichteten Frequenzen unter primären Mammakarzinomen ein. Analysen des *PIK3CA*-Mutationsstatus metastatischer Mammakarzinome sind dagegen verhältnismäßig rar. Gonzalez-Angulo *et al* und Jensen *et al* wiesen in Metastasen einen Anteil von 42 % bzw. 53 % mutierter Fällen nach<sup>141,220</sup>. Die Studie von Gonzalz-Angulo *et al* enthielt zwar zwei Fälle mit BCBM, jedoch wurde auf deren Mutationsstatus im Einzelnen nicht eingegangen. Im direkten Vergleich mit diesen Studien sind die PIK3CA-Mutanten in dem in dieser Arbeit analysierten BCBM-Kollektiv mit 23 % unterrepräsentiert.

Es konnten insgesamt drei neue Mutationen mit unbekannten Auswirkungen auf die PIK3CA-Expression identifiziert werden. Die Aminosäuren p.D538 und p.P566 befinden sich allerdings in räumlicher Nähe zu Aminosäuresubstitutionen bereits beschriebener *Hotspot*-Mutationen (siehe Abb. 5.1). Daher könnten die detektierten Mutationen p.D538Y (c.1612G>T) und p.P566L (c.1697C>T) vergleichbare Auswirkungen auf die Regulation der PIK3CA-Aktivität haben<sup>276–278</sup>.



**Abb. 5.1: Lokalisation der mutierten Aminosäuren im nativen Protein.** Dargestellt sind die betroffenen Aminosäurereste der bereits bekannten Hotspotmutationen neben den in dieser Arbeit neu identifizierten Punktmutationen in der helikalen Domäne (A) und der Kinasedomäne (B) eingebettet in die PI3K-Proteinstruktur. Die betroffenen Aminosäurereste der Hotspotmutationen sind in lila illustriert und jene der neue Mutationen sind in blau hervorgehoben und durch Pfeile markiert.

Ferner wurde für die Aminosäure p.D538 die Basenpaarsubstitution G>A (an derselben Position wie in der vorgestellten Mutante) bereits in einer Metastase des kutanen Melanoms beschrieben, die ebenso einen Austausch von einer sauren zu einer polaren Aminosäure hervorruft (p.D538N)<sup>277</sup>. Eine definitive Aussage über Auswirkungen der Mutationen, die nicht in den *Hotspot*-Regionen lokalisiert sind, auf die PIK3CA-Expression kann nur durch funktionelle Analysen einer Überexpression im Zellkultursystem getroffen werden.

Mutationen wurden in dieser Arbeit etwa gleichhäufig in BCBM, BCOM und Primärtumorpatientinnen nachgewiesen (23 %, 20 % und 23 %). Diese Resultate werden durch die Studien von Gonzalez-Angulo *et a.* bestätigt<sup>220</sup>, in der ebenfalls keine Unterschiede zwischen Häufigkeiten von *PIK3CA*-Mutationen in primären und metastastischen Mammakarzinomen belegt werden konnten. Dies lässt sich gut mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen Assoziation von PIK3CA-Mutationen mit vorteilhafteren prognostischen Faktoren wie einem HR-positiven Status vereinbaren. Diese Assoziation wurde kürzlich in einer umfangreichen Meta-Analyse bestätigt<sup>279</sup>. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass PIK3CA-Mutationen und die hierdurch ausgelöste konstitutive Aktivierung des Enzyms mit einer vorteilhaften Prognose einhergehen und daher nicht mit einem metastasischen Phänotyp assoziiert sind.

# 5.1.5 Assoziation des Mammakarzinomsubtyps mit Alterationen des EGFR/HER2-Signalwegs und Metastasierungsprofilen

EGFR/PTEN- und HER2-Alterationen schlossen sich in dem hier untersuchten Patientenkollektiv gegenseitig fast vollständig aus. Dies legt eine Untergliederung der untersuchten Fälle in eine Gruppe mit EGFR/PTEN- oder HER2-Alterationen sowie eine mit PIK3CA-Mutationsträgerinnen nahe (Abb. 5.2).



Abb. 5.2: Alterationen von Mitgliedern des EGFR/HER2-Signalwegs in Metastasen des Mammakarzinoms. Dargestellt ist der Anteil der HER2-positiven Fälle sowie der Patientinnen mit PIK3CA-Mutationen und TNBC unter BCBM (roter Rahmen) und Knochenmetastasen des Mammakarzinoms (grauer Rahamen), sowie der Anteil der Patientinnen mit Alteration des EGFR/HER2-Signalwegsstatus' (grau ausgefüllte Umrandung).

Primäre Mammakarzinome lassen sich anhand ihres Genexpressionsmusters in Subtypen untergliedern, die charakteristische immunhistochemischer Marker aufweisen<sup>39</sup>. Aufgrund ihrer spezifischen biologischen Besonderheiten zeigen die molekularen Subtypen des Mammakarzinoms ausgeprägte Unterschiede im Krankheitsverlauf und im Ansprechen auf ihre Behandlung. Die schnell proliferierenden basal-like Karzinome, weisen eine schlechte Prognose auf und haben einen besonderen Stellenwert, da aktuell keine Targeted-Therapien für diese Gruppe zur Verfügung stehen. Daher ist ihre weitere molekulare Charakterisierung von herausragender klinischer Bedeutung<sup>43,44</sup>. Im Laufe der Jahre stellte sich heraus, dass die Einteilung des Mammakarzinoms in molekulare Subtypen deutlich komplexer ist als initial angenommen und vor allem bezüglich auf die Therapieempfehlungen für die klinische Anwendung stetig überarbeitet werden muss<sup>39,45</sup>. Die im Zuge dieser Studie erbrachten Resultate bestätigen die Assoziation EGFR-positiver primärer Mammakarzinome mit dem TNBC-Subtyp und eine damit einhergehende schlechte Prognose<sup>39,44,280–283</sup>. Die Zuordnung EGFR-positiver Tumore zu einem basal-like Subtyp liegt zwar nahe, war aufgrund fehlender Informationen zur Expression der Zytokine 5 und 6 im Zuge der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig möglich. Zusätzlich wurde eine Korrelation PTEN-negativer Primärtumore mit primären TNBC-Tumoren beobachtet. Jüngste Studien an Primärtumorpatientinnen des Mammakarzinoms haben einen Zusammenhang zwischen PTEN- und EGFR-Alterationen mit triple-negativem Brustkrebssubtyp dargelegt<sup>116,218,282</sup>.
Beide Alterationen waren auch in BCBM des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kollektivs mit einem TNBC-Subtyp assoziiert. Unter BCBM-Patientinnen wiesen 100 % der TNBC-Fälle eine EGFR/PTEN-Alteration auf. Eine erhöhte Tendenz von TNBC-Tumoren zur Gehirnmetastasierung wurde in diversen Studien nachgewiesen. Im Speziellen traf dies auf *basal-like* Tumore zu, die u.a. durch EGFR-Expression charakterisiert sind. Somit respräsentieren EGFR/PTEN-alterierte primäre Mammakarzinome eine Subpopulation von TNBCs mit einer Präferenz BCBM auszubilden. Dagegen wurde durch diverse Studien belegt, dass *basal-like* Mammakarzinome selten Knochenmetastasen ausbilden, was auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde <sup>284–287</sup>.

Die wenigen in dieser Arbeit verfügbaren korrespondierenden Primärtumor- und BCBM-Gewebe wiesen interessanterweise in den meisten Fällen einen identischen PTEN- bzw. EGFR-Status auf. Nur in einer BCBM-Probe wurde eine *de novo* auftretende EGFR-Alteration nachgewiesen. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass EGFR/PTEN-alterierte Tumore eine Subpopulation primärer TNBC-Erkrankungen darstellen und der EGFR- bzw. PTEN-Status als Risikofaktoren für die Entwicklung von BCBM betrachtet werden sollte. Ferner implizieren diese Ergebnisse das Vorliegen einer Organotropie bezüglich EGFR/PTEN-alterierter primärer Mammakarzinome, bei welcher das Gehirn als sogenannte *soil* dient. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass primäre Gehirntumore wie das GBM oder das Neuroblastom und das vorzugsweise in das Gehirn metastasierende maligne Melanom ebenfalls häufig Alterationen des EGFR- und PTEN-Lokus aufweisen<sup>188</sup>. Um eine eindeutige Aussage über den EGFR- bzw. PTEN-Status als Prognosemarker für eine Gehirnmetastasierung treffen zu können, ist die Analyse eines größeren Kollektives korrespondierender primärer Mammakarzinom- und BCBM-Gewebe notwendig.

HER2-positive Tumore traten am zahlreichsten unter BCBM-Patientinnen auf. Im Vergleich zu BCOM-Patientinnen waren HER2-Alterationen etwa gleichhäufig unter allen Primärtumorsubgruppen vertreten. Dies impliziert zwar eine Assoziation HER2-positiver Tumore mit Fernmetastasierung, jedoch nicht speziell mit Gehirnmetastasen. Tumore mit *PIK3CA*-Mutationen waren hingegen etwa gleichhäufig unter BCBM- und BCOM- sowie unter Primärtumoren ohne Fernmetastasen oder mit solchen in anderen Geweben als dem Gehirn zu finden. Dagegen befanden sich unter Primärtumoren von Patientinnen mit Knochenmetastasen oder BCBM wenig (8 %) oder gar keine PIK3CA-Mutationsträgerinnen. Zusammen mit der bereits zuvor genannten Assoziation *PI3KA*-mutierter Fälle mit einem HR-positivem Mammakarzinomsubtyp und geringer Tumorgröße spricht dies für eine positive Prognose in Einklang mit nicht-metastastischer Erkrankung in den betroffenen Patientinnen.

Die Tatsache, dass EGFR/PTEN- und HER2-Alterationen nicht parallel vorliegen deutet die Existenz zweier unabhängiger Signalwege über EGFR/PTEN in TNBC- oder HER2-positiven Patientinnen an, die mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung von Gehirnmetastasen assoziiert sind. Bei genauerer Betrachtung fiel ferner auf, dass unter den hier analysierten BCBM-Proben alle bis auf eine von Signalwegsalterationen betroffen war. Dieser Fund konnte in einem größeren, bisher unveröffentlichten Probenkollektiv von BCBM-Geweben in der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt werden. Hieraus erwächst die Schlussfolgerung, dass von einer kombinierten Behandlung mit neuartigen, gegen Mitglieder des EGFR/HER2-Signalwegs gerichteten Therapeutika so gut wie alle BCBM profitieren könnten.

# 5.2 Die funktionelle Rolle von PTEN in der Gehirnmetastasierung des Mammakarzinoms

Basierend auf den Ergebnissen des translationalen Teils dieser Arbeit in Kombination mit der Tatsache, dass Aberrationen des *EGFR*- und *PTEN*-Lokus' ebenso in primären Gehirntumoren wie auch dem vorzugsweise in das Gehirn metastasierenden malignen Melanom auftreten, sollte die Rolle von PTEN in der Gehirnmetastasierung des Mammakarzinoms im Zellkulturmodell untersucht werden.

Im Zuge dieser Studie wurde eine differentielle PTEN-Expression in Mammakarzinom- bzw. Brustepithelzelllinien nachgewiesen. Basierend auf dieser Feststellung diente die immortalisierte Brustepithelzelllinie MCF-10A als nicht-invasives Modell um zu analysieren, ob der Verlust der PTEN-Expression einen invasiven Phänotyp induziert. Ferner lag in der Sublinie MDA-MB-231 BR im Vergleich zur parentalen Zelllinie MDA-MB-231 WT eine verringerte PTEN-Expression vor. Aufgrund dieses Fundes diente die BR-Subline als aggressives, gehirnspezifisches Modell, anhand dessen untersucht wurde, ob eine gesteigerte PTEN-Expression einen milderen Phänotyp induziert. Der lentivirale PTEN-*Knockdown* bzw. die -Überexpression konnte erfolgreich in MCF-10A bzw. MDA-MB-231 BR Zellen etabliert werden. Eine PTEN-Überexpression in dem usprünglich verwendeten System führte in MDA-MB-231 BR Zellen nach ca. drei Tagen zu exzessivem Zelltod. Weng *et al* berichteten nach 120 h von einer 3-fach erhöhten Anzahl apoptotischer PTEN-überexprimierenden MCF-7 Zellen im Vergleich zu PTEN endogen exprimierenden Zellen <sup>288</sup>. Um trotz des apoptoseinduzierenden Effektes von PTEN dennoch die Auswirkungen einer gesteigerten PTEN-Expression in MDA-MB-231 BR Zellen analysieren können, wurde die Höhe der PTEN-Überexpression dosisabhängig mittels Doxycyclin reguliert, so dass zwar eine Proliferationsverringerung, jedoch keine Apoptose induziert wurde. Bislang wurden funktionelle Analysen nur mit dem Überexpressionsmodell durchgeführt. Hierbei wurde der Effekt veränderter PTEN-Expression auf den Aktivierungsstatus des AKT-Signalwegs wie auch die Auswirkung des Aktivierungsstatus' auf das Proliferations- sowie Migrationsverhalten untersucht. Zudem sollten die Auswirkungen veränderter PTEN-Expression auf die Interaktion mit der Mikroumgebung des Gehirns analysiert werden, wofür primäre humane Astrozyten und die immortalisierte Mikrogliazelllinie CHME3 als Modelle dienten.

## 5.2.1 Induktion eines weniger aggressiven Phänotyps einer in gehirnmetastatischen Mammakarzinomzelllinie durch PTEN-Überexpression

Die PTEN-Überexpression der in das Gehirn metastasierenden Sublinie MDA-MB-231 BR führte zu einer verminderten EGF-abhängigen AKT-Aktivierung und Migration sowie zu einer EGFunabhängigen Verringerung der Proliferation. EGF ist ein direkter Aktivator des AKT-Signalwegs, welcher wichtige zelluläre Prozesse wie das Überleben und eine der Schlüsselkomponenten in der Vermittlung des Überlebens dormanter Zellen steuert<sup>10</sup>. Dies untermauert die wichtige Rolle PTENs als Tumorsuppressorgen und Regulator des AKT-Signalwegs. Da die Proliferationsrate der PTENüberexprimierenden Sublinie im Vergleich zu jener mit endogener PTEN-Expression vermindert ist und somit jener der parentalen Zelllinie ähnelt, deutet dies eine Veränderung in Richtung des weniger aggressiven Phänotyps der parentalen Zelllinie an.

In allen hier analysierten Zelllinien musste die Migration durch zusätzliche Stimuli induziert werden. EGF-Gabe verursachte in diesem Kontext die höhste Migrationsrate. Die Migrationsfähigkeit von PTEN über- sowie endogen exprimierender MDA-MB-231 BR Zellen wurde ebenfalls durch Astrozyten sowie Mikroglia gesteigert. Zudem war die Migrationsrate PTEN überexprimierender Zellen im Vergleich jenen mit endogener PTEN-Expression unter allen verwendeten Kulturbedingungen deutlich verringert. Da eine PTEN-spezifische Beeinflussung des Migrationsverhaltens sowohl durch direkte Aktivierung des AKT-Signalwegs als auch durch Kokultur mit Gliazellen ausgelöst wird, besteht die Möglichkeit, dass durch Gliazellen ausgeschüttete Botenstoffe ebenfalls in der Lage sind den AKT-Signalweg zu aktivierten.

Kim *et al* wiesen eine Chemoprotektion in MDA-MB-231 Zellen durch Kokultur mit murinen Astrozyten nach, welche über die Aktivierung von AKT sowie MAPK und nachfolgend ausgelöste Expression dreier *Survival*-Gene induziert wird. Die betreffenden Gene codieren für das *BCL2-like* 1-Protein, den *twist family bHLH*-Transkriptionsfaktor 1 und die Glutathion S-Transferase  $\alpha$ 5<sup>289</sup>. Diese Resultate eröffnen eine Möglichkeit, wie sich die Interaktion zwischen Astrozyten und Tumorzellen mit verringerter PTEN-Expression auswirken kann. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen

zeigten, dass in MDA-MB-231 BR Zellen mit endogener PTEN-Expression im Vergleich zu PTENüberexprimierenden Zellen eine ebenfalls erhöhte AKT-Aktivierung vorlag. Dies impliziert eine gesteigerte Chemoprotektion von BCBM-Zellen mit verringerter PTEN-Expression, was der Früherkennung PTEN-negativer primärer Mammakarzinome eine noch größere Bedeutung beimisst. Diese Hypothese muss anhand weiterführender Analysen jedoch erst belegt werden.

# 5.2.2 Auswirkungen der Interaktion einer in gehirnmetastatischen Mammakrzinomzelllinie mit Gliazellen

Das Gehirn stellt aufgrund der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und dem besonderen Mikromilieu ein sehr spezielles Zielorgan für die Fernmetastasierung dar. Die BHS bildet eine effektive, hochspezialisierte, physikalische Barriere zum Schutz des Gehirns vor schädlichen Substanzen und zur Aufrechterhaltung des Mikromilieus<sup>290</sup>. Das Gehirn setzt sich hauptsächlich aus den Endothelzellen der BHS, Neuronen sowie verschiedenen Gliaspezies zusammen. Makroglia werden durch Oligodendrozyten und Astrozyten repräsentiert. Astrozyten sind über sog. *Gap Junctions* eng miteinander verbunden und bilden ein funktionelles Synzytium zur Aufrechterhaltung eines optimalen, extrazellulären Milieus für Neuronen. Die Stärke der interzellulären Astrozytenkopplung kann durch diverse Faktoren beeinflusst werden<sup>211,291,292</sup>. Mikroglia stellen residente Mediatoren der unspezifischen Immunabwehr des zentralen Nervensystems dar, die nach ihrer Aktivierung durch pathologische Veränderungen im Gehirn Entzündungsprozesse auslösen, in dem sie proinflammatorische Zytokine ausschütten. Solche pathologischen Veränderungen können u.a. durch Astrozyten vermittelt werden. Demgegenüber wird auch die Aktivität der Astrozyten durch die mikrogliasezernierten Botenstoffe moduliert <sup>194,211</sup>.

Mikroglia und Astrozyten werden auch durch die Anwesenheit von extra- und intrazerebraler Zellen diverser Tumorentitäten aktiviert, zu welchen u.a. das metastasierende Mammakarzinom zählt<sup>22,212–215</sup>. Andererseits können die durch aktivierte Gliazellen sezernierten Botenstoffe Einfluss auf diverse Funktionen der Tumorzellen nehmen. Xing *et al* bestimmten beispielsweise die JAG1-Spiegel in Zell-kulturüberständen von MDA-MB-231 BR-Zellen und berichteten von einer erhöhten JAG1-Expression im Vergleich zur parentalen Zelllinie. In Astrozyten, die in diesem konditionierten Medium kultiviert wurden, wurde ebenfalls eine gesteigerte JAG1-Expression induziert, die zu einem erhöhten Spiegel des sauren Gliafaserproteins führte. Letzteres wurde als Aktivierung der Gliazellen interpretiert<sup>293</sup>.

Wang *et al* kultivierten parentale MDA-MB-231-Zellen in durch Astrozyten konditioniertem Medium und wiesen eine gesteigerte Invasion im Vergleich zur Kultivierung in hitzeinaktiviertem, konditioniertem Astrozytenmedium bzw. DMEM nach. Ferner belegten sie im Vergleich zur Kultivierung in DMEM verringerte Proliferationsraten, vergleichbar mit einer Kultivierung in DMEM ohne FBS <sup>294</sup>. Die

Ergebnisse von Wang *et al* bestätigen die hier vorliegenden Ergebnisse der Migrations-Assays, in denen erhöhte Migrationsraten unter Kokultivierung mit Gliazellen nachgewiesen wurden. Dies traf sowohl für die MDA-MB-231 BR Sublinie mit endogenen als auch mit erhöhten PTEN-Spiegeln zu. Die Ergebnisse des Proliferations-Assays der vorliegenden Arbeit werden durch die Analysen von Wang *et al* ebenfalls untermauert. Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit eine PTEN-abhängige Proliferationsänderung in MDA-MB-231 BR Zellen durch Astrozyten-sezernierte Substanzen nachgewiesen. Daher liegt folgende Schlussfolgerung nahe. MDA-MB-231 BR Zellen mit endogener PTEN-Expression weisen einen sehr aggressiven Phänotyp auf, welcher durch die Überexpression von PTEN in Richtung des Phänotyps der parentalen Zelllinie verschoben wird. Es ist denkbar, dass ein weniger aggressiver Zelltyp die Aktivierung von Astrozyten geringer stimuliert und daher die Zellen der PTEN-überexprimierenden Sublinie eine verringerte Proliferation aufweisen.

Rietkötter *et al* belegten eine gesteigerte Invasion von luminalen MCF-7-Zellen, die durch Kokultur mit murinen Mikroglia ausgelöst wurde und führen dies auf das Vorliegen von durch die Gliazellen ausgeschüttete Zytokine zurück<sup>295</sup>. Da ein anderes Modellsystem als in der vorliegenden Studien verwendet wurde, können die Resultate nicht direkt miteinander verglichen werden, jedoch implizieren auch die hier vorgestellten Ergebnisse des Migrations-Assays eine Steigerung der Migration triple-negativer MDA-MB-231-BR Zellen durch mikrogliasezernierte Substanzen. Auch in diesem Kontext verursachte eine PTEN-Überexpression verringerte Migrationsraten in den MDA-MB-231 BR Zellen. Dies legt nahe, dass PTEN als wichtiger Regulator der Migration fungiert, welche durch die Interaktion von Tumorzellen mit der Mikroumgebung des Gehirns angeschaltet werden kann.

Die Literatur berichtet zwiespältige Auswirkungen aktivierter Mikroglia auf Tumorzellen<sup>22</sup>. Es sind sowohl tumorprotektive als auch –supprimierende Aktionen bekannt. Diese wurden durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt, welche eine mikrogliainduzierte Migration, jedoch keine Effekte auf die Proliferation nachwiesen. Lorger *et al* injizierten MDA-MB-231 BR-Zellen in die Karotisarterie von CB17/SCID-Mäusen und fanden eine einheitliche Assoziation und Aktivierung von Astrozyten mit in das Gehirn invadierenden Zellen vor, wohingegen Mikroglia variierende Aktivierungsstadien aufwiesen<sup>21</sup>. Für Bronchialkarzinom- und Gliomzellen wurden ähnliche Funde bezüglich der Interaktion von Mikroglia mit Tumorzellen gemacht<sup>22,296</sup>. Auch die vorliegenden Resultate legen heterogene Reaktionen der Gesamtpopulation von Mikroglia und deuten an, dass nur eine Subpopulation eine tumorunterstützende Funktion wahrnimmt. Aktivierte Mikroglia liegen in verschiedenen Stadien vor, die als M1 und M2 bezeichnet werden. Bekannterweise nehmen diese Stadien unterschiedliche Funktionen war <sup>296–298</sup>. Da in den Proliferations- und Migrations-Analysen keine vergleichbaren Kultivierungsbedingungen vorherrschten, ist es durchaus möglich, dass die diskrepanten Resultate durch das Vorliegen Mikroglia unterschiedlicher Aktivierungsstadien hervorgerufen wurden.

Zusammengefasst lösen sowohl durch Astrozyten als auch durch Mikroglia sezernierte Botenstoffe eine Steigerung der Migration aus. Diese Ergebnisse implizieren ein gesteigertes Ansprechen von Zellen mit PTEN-Verlust auf Botenstoffe, die durch beide Gliaspezies sezerniert werden. Die Tumorzellproliferation scheint dagegen nur durch astrozytenserzernierte Botenstoffe PTEN-spezifisch inhibiert zu werden. Dies deutet an, dass Tumorzellen mit verringerter PTEN-Expression selbst Botenstoffe sezernieren, die durch Astrozyten erkannt werden, welche daraufhin die Proliferation der Tumorzellen unterdrücken könnten. Ferner lagen möglicherweise in den Analysen der Proliferation und Migration Mikroglia in unterschiedlichen Aktivierungsstadien vor, wodurch sowohl tumorprotektive (gesteigert Migration) als auch –supprimierende Effekte (verringerte Proliferation) ausgelöst wurden.

### 5.3 Ausblick

Die Ergebnisse des translationellen Teils legen zwar eine gehirnspezifische Metastasierung von Mammakarzinomzellen mit EGFR/PTEN-Alterationen nahe, jedoch konnte diese Schlussfolgerung aufgrund der niedrigen Anzahl von Patientinnen mit korrespondierendem, verfügbarem Primärtumor- und BCBM-Gewebe nicht zweifelsfrei unter Beweis gestellt werden. Aktuell werden in einer deutschlandweiten, multizentrischen Kooperation Proben für einen TMA mit einer deutlich höheren Anzahl zusammengehöriger Primärtumor- und BCBM-Proben zusammengetragen. Ferner wurden Blutproben einiger bereits analysierten BCBM-Patientinnen für geplante CTC-Analysen sog. Flüssigbiopsie gesammelt, deren Untersuchung noch aussteht <sup>299</sup>. In zukünftigen Analysen gepaarter Primärtumor- und BCBM-Gewebe sowie von CTCs derselben Patientin könnte glaubhaft nachgewiesen werden, ob ein Umschlag der Expression der untersuchten Gene während der Gehirnmetastasierung eintritt.

Die Proliferations-Analysen des funktionellen Teils wurden bislang nur einmal durchgeführt und müssen wiederholt werden, um die Resultate zu validieren. Zudem wurde zwar eine klare Assoziation der PTEN-Expression mit der Proliferation und Migration nachgewiesen, welche seine wichtige tumorsupprimierende Rolle untermauert. Eine gehirnspezifische Relevanz auf diese beiden Prozesse konnte durch Kokultur mit Gliazellen nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz ist die Rolle von PTEN in anderen Schritten der Gehirnmetastasierung, wie die Überwindung der BHS, mesenchymaleepitheliale Transition oder Kolonisation, unklar. Daher sind Analysen zur Überwindung der BHS geplant. Hierfür bieten sich einerseits Invasions-Assays durch eine mit Matrigel und/oder Endothelzellen des Gehirns beschichtete poröse Membran an. Andererseits kann die Art der Kommunikation mit der Mikroumgebung des Gehirns und das Migrationsverhalten der Tumorzellen in Kokulturen mit Gehirnschnitten untersucht werden. Zusätzlich sollen Mikroarray-Analysen klären, welche Signalwege in MDA-MB-231 BR- bzw. MCF-10A-Zellen mit endokriner PTEN-Expression und PTEN-Überexpression bzw. herunter regulierter PTEN-Expression zum Tragen kommen und ob PTEN-Proteinspiegel mit einer mesenchymaler-epithelialen Transition assoziiert sind <sup>300</sup>.

Ferner können die Aussagen der durchgeführten Analysen spezifiziert werden, in dem die Auswirkung der PTEN-Expression in Tumorzellen auf den Aktivierungsstatus von Gliazellen untersucht wird. Zudem sollte durch Verwendung verschiedener Stimulanzien ermittelt werden in welchem Aktivierungsstadium Gliazellen Auswirkungen auf das Proliferations- und Migrationsverhalten haben. Fü+r beide Fragestellungen soll die Konzentration verschiedener Zytokine in Zellkulturüberständen bestimmt werden.

# Zusammenfassung

Gehirnmetastasen repräsentieren als Endstadium von Krebserkrankungen die häufigste Art von Tumoren des zentralen Nervensystems mit extrem schlechter Prognose und gelten derzeit als unheilbar. Neben Lungenkrebs sind Mammakarzinome die zweithäufigste Ursache für Gehirnmetastasen. Die Disseminierung von Tumorzellen stellt ein frühes Ereignis in der Metastasierung dar. Dennoch wachsen im Gehirn zumeist erst Jahre nach der Primärtumordiagnose solide Metastasen aus einzelnen disseminierten Tumorzellen aus, die in einer Art Ruhezustand die Zeit überdauert haben. Bei der Diagnosestellung des Primärtumors liegt häufig bereits eine sogenannte minimale residuelle Krebserkrankung im Zielorgan vor. Diese Zellen werden ggf. durch Therapeutika nicht erreicht und können daher zu Metastasen auswachsen. Um die Entstehung von Metastasen zu verhindert, ist eine frühe Diagnose der Mammakarzinomerkrankung von außerordentlicher Bedeutung.

Die genaue molekulare Basis der Gehirnmetastasierung ist nicht geklärt. Allerdings reguliert der durch die Rezeptortyrosinkinasen EGFR und HER2 angeschaltete PI3K-Signalweg diverse an der Tumorgenese beteiligte Zellfunktionen. Die gezielte Behandlung mit gegen HER2-gerichtete Therapeutika wird aktuell bereits in der Klinik angewendet. Zusätzlich werden andere Mitglieder des Signalwegs als Ziele von *Targeted*-Therapieansätzen intensiv erforscht. Die Effizienz der Therapie könnte durch eine kombinierte Inhibition mehrerer Proteine desselben oder in parallelen Signalwegen deutlich gesteigert werden, daher sind sie von außerordentlicher klinischer Bedeutung. Diverse Studien belegen häufige Alterationen von EGFR, HER2, PTEN und PIK3CA in Gehirnmetastastasen des Mammakarzinoms. Diese Arbeit ist die erste vergleichende Studie, die sich der Untersuchung aller vier Proteine in verschiedenen Subgruppen primärer Mammakarzinome, Gehirnmetastasen sowie Metastasen in andere Organe gemeinsam zum Ziel gesetzt hat. Zur Analyse der Kopienanzahl wurden quantitative *Realtime*-PCR-, Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungs- und Mikrosatelliten-Analysen herangezogen. Der Mutationsstatus wurde anhand von Sanger-Sequenzierungen und die Proteinspiegel über immunhistochemische Analysen bestimmt.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass EGFR- und PTEN-Alterationen signifikant mit einer Gehirnmetastasierung assoziiert sind. Bereits schwache Zugewinne des *EGFR*-Lokus' gingen mit einem verkürzten Überleben einher und besonders in diesen Fällen lagen häufig intratumoral heterogene Proteinspiegel vor. Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne wie auch die Transkriptvariante EGFRvIII wurden in dem untersuchten Kollektiv nicht nachgewiesen und scheinen als Ursache einer EGFR-Überexpression eine untergeordnete Rolle in Gehirnmetastasen des Mammakarzinoms zu spielen. Ein PTEN-Verlust scheint durch allelische Imbalanz, Mutationen und andere Mechanismen hervorgerufen zu werden. Zusätzlich wurde eine organspezifische, differentielle intrazelluläre Lokalisation von PTEN nachgewiesen. Diese impliziert eine Relevanz des völligen PTEN-Verlustes in der Ge-

hirnmetastasierung, sowie eine Rolle nukleär lokalisierten PTENs in der Interaktion mit dem Gehirnmilieu. Dagegen scheint während der Metastasierung in den Knochen die Aktivierung des PI3K-Signalwegs von Bedeutung zu sein. Ferner schließen sich Alterationen von HER2 und EGFR oder PTEN nahezu aus. Die untersuchten Proteine lassen sich daher in drei Gruppen untergliedern. EGFR/PTEN-Alterationen treten in einer Subpopulation von Mammakarzinomen mit fehlender Expression des Östrogen- und des Progesteronrezeptors sowie von HER2 auf (*triple*-negativ), die eine ausgeprägte Organotropie für das Gehirn aufweist. Die HER2-exprimierende Gruppe ist generell mit Fernmetastasierung assoziiert und nicht speziell auf Gehirnmetastasen beschränkt. PIK3CA-mutierte Patientinnen sind mit einem Primärtumorsubtyp assoziiert, der eine gute Prognose aufweist und metastasieren selten in das Gehirn. Interessanterweise wies nur eine der Gehirnmetastasen keine Alterationen in allen analysierten Proteinen auf. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass fast alle Patientinnen mit Gehirnmetastasen von einer kombinierten Anwendung neuartiger, gegen Mitglieder des EGFR/HER2-Signalwegs gerichteter Therapeutika profitieren könnten.

Aberrationen des *EGFR*- und *PTEN*-Lokus'treten auch in primären Gehirntumoren und dem vorzugsweise in das Gehirn metastasierenden malignen Melanom auf. Im Kontext der Ergebnisse des translationalen Teils legt dies nahe, dass das Gehirn aufgrund seines speziellen Mileus als bevorzugtes Zielorgan für Zellen mit EGFR/PTEN-Alterationen fungiert. Daher sollte die Rolle von PTEN in der Gehirnmetastasierung des Mammakarzinoms im Zellkulturmodell untersucht werden. Hierfür wurde PTEN in der *triple*-negativen Zelllinie MDA-MB-231 BR überexprimiert. Im Gegensatz zu ihrer parentalen Zelllinie metastasieren diese Zellen bevorzugt in das Gehirn und weisen eine verringerte PTEN-Expression auf. Die PTEN-Überexpression in den aggressiven MDA-MB-231 BR Zellen führte zu einer verringerten Aktivierung der Serin- Threoninkinase AKT und Proliferation sowie Migration, was einem weniger aggressiven Phänotyps (ähnlich der parentalen Zelllinie MDA-MB-231 WT) entspricht. Die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen wurde PTEN-abhängig durch Mikroglia wie auch Astrozyten induziert. Der PTEN-abhängige Effekt auf die Proliferation wurde durch Botenstoffe aktivierter Astrozyten verringert. Faktoren, die durch aktivierte Mikroglia sezerniert wurden, hatten dagegen keine Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten.

Die translationalen und funktionellen Ergebnisse deuten eine mögliche PTEN-abhängige Veränderung des Tumorzellphänotyps durch Interaktion mit dem Gehirnmilieu an, der die Besiedlung des Zielgewebes unterstützt. Diese Hypothese muss anhand weiterführender Analysen erst belegt werden, bestärkt jedoch die Wichtigkeit der Früherkennung PTEN-negativer Mammakarzinomerkrankungen.

## Summary

Brain metastases represent the final stage of cancerous diseases and are so far incurable. Besides lung cancer, breast cancer is the most common cause for brain metastases. The dissemination of single tumor cells from the primary tumor is as an early step in the metastatic cascade. These disseminated tumor cells are able to rest within distant sites like the brain and can grow out to overt metastases even years after the primary diagnosis. Therefore, such minimal residual disease is thus already present at distant site of relapse at time of primary tumor diagnosis. These cells remain undetected and may be inaccessible for therapeutics due to the non-proliferative state of the cells. An early diagnosis of breast cancers is of tremendous importance in order to prevent the formation of metastases.

The exact molecular mechanism responsible for brain metastasis is still unclear. However, diverse cell functions involved in tumorigenesis are regulated by the PI3K pathway, which can be activated by the receptor tyrosine kinases EGFR and HER2. So far, HER2-targeted therapies are in clinical use and other pathway members are under intensive investigation. For maximal efficiency of treatment, combined targeting of multiple proteins of the same or parallel pathways may be potentially useful and thus be of clinical significance. Several studies have reported frequent alterations of EGFR, HER2, PTEN and PIK3CA in breast cancer brain metastases. However, this thesis is the first comparative study of all four proteins in different subgroups of primary and metastatic breast cancer patients including brain and other metastases. Copy number variations were studied by using qPCR, FISH and microsatellite analyses. Mutation analyses were done by Sanger sequencing and protein levels were determined by immunohistochemistry.

This study revealed a significant association between EGFR and PTEN alterations and the presence of brain metastasis. Even a weak gain of EGFR locus caused shortened survival rates and intratumoral heterogeneous protein levels. Neither mutations in the tyrosin kinase domain nor the EGFRvIII transcript variant were detected within the analyzed patient cohort and thus seem to be irrelevant for EGFR overexpression in breast cancer brain metastases. PTEN loss was shown to be mainly caused by allelic imbalance followed by mutations. Moreover, an organ-specific, differential, intracellular localization of PTEN was detected, implicating a relevance of complete PTEN loss in brain metastasis and an involvement of nuclear PTEN in brain microenvironment interaction. In contrast, activation of PI3K signaling seems to be important in bone metastasis rather than brain metastasis. Furthermore, alterations of HER2 and EGFR were found to be almost mutually exclusive. Therefore, patients can be categorized into three groups based on their alteration status. Both EGFR and PTEN alterations are significantly associated with hormone receptor and HER2 negative (triple-negative) breast cancer possessing a distinct organ-specific homing to the brain. The HER2 overexpressing group is generally

associated with distant metastasis, which is not limited to the brain. PIK3CA mutant tumors correlate with a primary tumor subtype with a good prognosis, which rarely metastasizes to brain. Importantly, only one of the studied brain metastases samples harbored no alterations in any of the analyzed proteins. Therefore, these results suggest that almost all brain metastases patients would benefit from a combined use of novel targeted therapies against EGFR/HER2 pathway members.

Aberrations of EGFR and PTEN loci are also commonly found in primary brain tumors and malignant melanoma, which metastasizes preferentially to the brain. The translational results of this thesis suggest brain as favored distant site for cells harboring EGFR/PTEN alterations due to its specialized microenvironment. Therefore, the functional role of PTEN in breast cancer brain metastasis was analyzed in a cell culture model. Hence, PTEN overexpression was introduced into the highly aggressive, triple-negative MDA-MB-231 BR cell line. In contrast to the parental cell line (MDA-MB-231 WT), these cells metastasize preferentially to the brain and show a decreased PTEN expression. PTEN overexpression in MDA-MB-231 BR cells caused a decreased AKT activation and proliferation as well as diminished migration. Overexpression of PTEN thus caused a less aggressive phenotype resembling more the parental MDA-MB-231 WT cell line. PTEN-dependent tumor cell migration was induced by astrocytes and microglia. PTEN-dependent effect on proliferation decreased in tumor cells grown with secreted factors from activated astrocytes. In contrast, secreted factors from activated microglia had no effect on tumor cell proliferation.

Translational and functional results point to a possible PTEN-dependent switch of the tumor cell phenotype supporting the colonization of target tissue caused by brain microenvironment interaction. This hypothesis has to be proven by further analyzes. However, it encourages the importance of early diagnosis of PTEN-negative breast tumors.

# Literaturverzeichnis

- 1. Wagener, C. & Müller, O. *Molekulare Onkologie*. (Thieme Verlag, 2009).
- 2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70 (2000).
- 3. Mehlen, P. & Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nat. Rev. Cancer* 6, 449–58 (2006).
- 4. Sänger, N. *et al.* Disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with ductal carcinoma in situ. *Int. J. Cancer* **129**, 2522–6 (2011).
- 5. Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 563–72 (2002).
- 6. Talmadge, J. E. & Fidler, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* **70**, 5649–69 (2010).
- 7. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–8 (2003).
- 8. Pantel, K., Brakenhoff, R. H. & Brandt, B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* **8**, 329–340 (2008).
- 9. Marches, R., Scheuermann, R. & Uhr, J. Cancer dormancy: from mice to man. Cell Cycle 5, 1772–8 (2006).
- 10. Wan, L., Pantel, K. & Kang, Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nat. Med.* **19**, 1450–64 (2013).
- 11. Uhr, J. W. & Pantel, K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 12396–400 (2011).
- 12. Ewing, J. Neoplastic Diseases: A Treatise on Tumours. W. B. Saunders, Philadelphia 3. Edition, (1928).
- 13. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* **8**, 98–101 (1989).
- 14. Teicher, B. A. & Fricker, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. Clin. Cancer Res. 16, 2927–31 (2010).
- 15. Alix-Panabières, C., Riethdorf, S. & Pantel, K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin. Cancer Res.* **14**, 5013–21 (2008).
- 16. Müller, A. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature 410, 50–6 (2001).
- 17. Zach, O. & Lutz, D. Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow. Curr. Opin. Oncol. 18, 48–56 (2006).
- 18. Schouten, L. J., Rutten, J., Huveneers, H. A. M. & Twijnstra, A. Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma. *Cancer* **94**, 2698–705 (2002).
- 19. Capper, D. *et al.* Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases. *Acta Neuropathol.* **123**, 223–33 (2012).
- 20. Preusser, M. *et al.* Brain metastases: pathobiology and emerging targeted therapies. *Acta Neuropathol.* **123**, 205–22 (2012).
- 21. Lorger, M. & Felding-Habermann, B. Capturing changes in the brain microenvironment during initial steps of breast cancer brain metastasis. *Am. J. Pathol.* **176**, 2958–71 (2010).
- 22. He, B. P. *et al.* Differential reactions of microglia to brain metastasis of lung cancer. *Mol. Med.* **12**, 161–70 (2006).
- 23. *Krebs in Deutschland 2007/2008.* **8. Ausgabe,** (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg)., 2012).
- 24. Sobin, L., Gospodarowicz, M. & Wittekind, C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. **7th Edition**, (Wiley-Blackwell, 2009).
- 25. Macià, F. *et al.* Factors affecting 5- and 10-year survival of women with breast cancer: an analysis based on a public general hospital in Barcelona. *Cancer Epidemiol.* **36**, 554–9 (2012).
- 26. Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014. (American Cancer Society, Inc., 2013). http://www.cancer.org
- 27. Goldhirsch, A. *et al.* Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol.* **22**, 1736–47 (2011).
- 28. Kreienberg, R. & Albert, U. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. *Senol. Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie* **10**, 164–192 (2013).
- 29. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **365**, 1687–717
- 30. Roessner, A., Pfeifer, U. & Müller-Hermelink, H. K. *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der Speziellen Pathologie*. **11. Auflage**, (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2008).

- 31. DeVita, V. T. J., Lawrence, T. S., DePinho, R. A. & Weinberg, R. A. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. *Lippincott Raven* **9. Edition**, (2011).
- 32. Weigelt, B., Peterse, J. L. & van 't Veer, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* 5, 591–602 (2005).
- Page, D. L. Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am. J. Surg. Pathol.* 15, 334–49 (1991).
- 34. Osborne, C., Wilson, P. & Tripathy, D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* **9**, 361–77 (2004).
- 35. Weinberg, R. A. Oncogenes and tumor suppressor genes. CA. Cancer J. Clin. 44, 160–70
- 36. Sidransky, D. & Hollstein, M. Clinical implications of the p53 gene. Annu. Rev. Med. 47, 285–301 (1996).
- Deng, C.-X. & Wang, R.-H. Roles of BRCA1 in DNA damage repair: a link between development and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 12 Spec No, R113–23 (2003).
- 38. Bishop, J. M. The molecular genetics of cancer. *Science* 235, 305–11 (1987).
- 39. Perou, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 406, 747–52 (2000).
- 40. Choi, J., Jung, W.-H. & Koo, J. S. Clinicopathologic features of molecular subtypes of triple negative breast cancer based on immunohistochemical markers. *Histol. Histopathol.* **27**, 1481–93 (2012).
- 41. Herschkowitz, J. I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* **8**, R76 (2007).
- 42. Farmer, P. *et al.* Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* **24**, 4660–71 (2005).
- 43. Sørlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–74 (2001).
- 44. Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8418–23 (2003).
- 45. Guiu, S. *et al.* Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann. Oncol.* **23**, 2997–3006 (2012).
- 46. Böcker, W., Heitz, P. U. & Moch, H. Pathologie. (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2012).
- 47. Weigel, M. T. & Dowsett, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr. Relat. Cancer* **17**, R245–62 (2010).
- 48. Bartsch, R. *et al.* Impact of anti-HER2 therapy on overall survival in HER2-overexpressing breast cancer patients with brain metastases. *Br. J. Cancer* **106**, 25–31 (2011).
- 49. Pakkiri, P., Lakhani, S. R. & Smart, C. E. Current and future approach to the pathologist's assessment for targeted therapy in breast cancer. *Pathology* **41**, 89–99 (2009).
- 50. Roengvoraphoj, M., Tsongalis, G. J., Dragnev, K. H. & Rigas, J. R. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for non-small cell lung cancer: focus on epidermal growth factor receptor mutation testing and mutation-positive patients. *Cancer Treat. Rev.* **39**, 839–50 (2013).
- 51. D'Arcangelo, M. & Cappuzzo, F. Erlotinib in the first-line treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **13**, 523–33 (2013).
- 52. Den Hollander, P., Savage, M. I. & Brown, P. H. Targeted Therapy for Breast Cancer Prevention. *Front. Oncol.* **3**, 250 (2013).
- 53. Vrbic, S., Pejcic, I., Filipovic, S., Kocic, B. & Vrbic, M. Current and future anti-HER2 therapy in breast cancer. J. BUON. 18, 4–16
- 54. Liao, B.-C., Lin, C.-C. & Yang, J. C.-H. First-line management of EGFR-mutated advanced lung adenocarcinoma: recent developments. *Drugs* **73**, 357–69 (2013).
- 55. Counsell, C. E., Collie, D. A. & Grant, R. Incidence of intracranial tumours in the Lothian region of Scotland, 1989-90. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **61**, 143–50 (1996).
- 56. Walker, A. E., Robins, M. & Weinfeld, F. D. Epidemiology of brain tumors: the national survey of intracranial neoplasms. *Neurology* **35**, 219–26 (1985).
- 57. Gaspar, L. *et al.* Recursive partitioning analysis (RPA) of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) brain metastases trials. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **37**, 745–51 (1997).
- 58. Jemal, A. et al. Global cancer statistics. CA. Cancer J. Clin. 61, 69–90
- 59. Kohler, B. A. *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J. Natl. Cancer Inst.* **103**, 714–36 (2011).
- 60. Chen, Y. & Liu, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 640–65 (2012).

- 61. Berman, A. T., Thukral, A. D., Hwang, W.-T., Solin, L. J. & Vapiwala, N. Incidence and patterns of distant metastases for patients with early-stage breast cancer after breast conservation treatment. *Clin. Breast Cancer* **13**, 88–94 (2013).
- 62. Disibio, G. & French, S. W. Metastatic patterns of cancers: results from a large autopsy study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **132**, 931–9 (2008).
- 63. Tsukada, Y., Fouad, A., Pickren, J. W. & Lane, W. W. Central nervous system metastasis from breast carcinoma. Autopsy study. *Cancer* **52**, 2349–54 (1983).
- 64. Patanaphan, V., Salazar, O. M. & Risco, R. Breast cancer: metastatic patterns and their prognosis. *South. Med. J.* **81**, 1109–12 (1988).
- 65. Lee, Y. T. Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. J. Surg. Oncol. 23, 175–80 (1983).
- 66. Hagemeister, F. B., Buzdar, A. U., Luna, M. A. & Blumenschein, G. R. Causes of death in breast cancer: a clinicopathologic study. *Cancer* **46**, 162–7 (1980).
- 67. Han, W. *et al.* DNA copy number alterations and expression of relevant genes in triple-negative breast cancer. *Genes, Chromosom. Cancer* **47**, 490–499 (2008).
- 68. Cho, S. Y. & Choi, H. Y. Causes of death and metastatic patterns in patients with mammary cancer. Ten-year autopsy study. *Am. J. Clin. Pathol.* **73**, 232–4 (1980).
- 69. Chang, E. L. & Lo, S. Diagnosis and management of central nervous system metastases from breast cancer. Oncologist **8**, 398–410 (2003).
- 70. Kleihues, P. & Cavenee, W. K. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. *IARC Press* **2. Edition**, (2000).
- 71. Issa, C. M., Semrau, R., Kath, R. & Höffken, K. Isolated brain metastases as the sole manifestation of a late relapse in breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **128**, 61–3 (2002).
- 72. Weil, R. J., Palmieri, D. C., Bronder, J. L., Stark, A. M. & Steeg, P. S. Breast cancer metastasis to the central nervous system. *Am. J. Pathol.* **167**, 913–20 (2005).
- 73. DiStefano, A., Yong Yap, Y., Hortobagyi, G. N. & Blumenschein, G. R. The natural history of breast cancer patients with brain metastases. *Cancer* **44**, 1913–8 (1979).
- 74. Lentzsch, S., Reichardt, P., Weber, F., Budach, V. & Dörken, B. Brain metastases in breast cancer: prognostic factors and management. *Eur. J. Cancer* **35**, 580–5 (1999).
- Mahmoud-Ahmed, A. S., Suh, J. H., Lee, S.-Y., Crownover, R. L. & Barnett, G. H. Results of whole brain radiotherapy in patients with brain metastases from breast cancer: a retrospective study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 54, 810–7 (2002).
- 76. Boogerd, W., Vos, V. W., Hart, A. A. & Baris, G. Brain metastases in breast cancer; natural history, prognostic factors and outcome. *J. Neurooncol.* **15**, 165–74 (1993).
- 77. Lin, N. U., Bellon, J. R. & Winer, E. P. CNS metastases in breast cancer. J Clin Oncol 22, 3608–3617 (2004).
- 78. Albiges, L. *et al.* Spectrum of breast cancer metastasis in BRCA1 mutation carriers: highly increased incidence of brain metastases. *Ann. Oncol.* **16**, 1846–7 (2005).
- 79. Cobleigh, M. A. *et al.* Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2639–48 (1999).
- 80. Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* **235**, 177–82 (1987).
- 81. Slamon, D. J. *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **344**, 783–92 (2001).
- 82. Burstein, H. J. *et al.* Clinical activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **19**, 2722–30 (2001).
- 83. Park, B.-B. *et al.* Prognostic factor analysis in patients with brain metastases from breast cancer: how can we improve the treatment outcomes? *Cancer Chemother. Pharmacol.* **63**, 627–33 (2009).
- 84. Robinson, D. R., Wu, Y. M. & Lin, S. F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**, 5548–57 (2000).
- 85. Prenzel, N. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr. Relat. Cancer* **8**, 11–31 (2001).
- 86. Vlahovic, G. Activation of Tyrosine Kinases in Cancer. Oncologist 8, 531–538 (2003).
- 87. Gschwind, A., Fischer, O. M. & Ullrich, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 361–70 (2004).
- Marmor, M. D., Skaria, K. B. & Yarden, Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 58, 903–13 (2004).

- 89. Van der Geer, P., Hunter, T. & Lindberg, R. A. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 251–337 (1994).
- 90. Heldin, C. H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213–23 (1995).
- 91. Engelman, J. A., Luo, J. & Cantley, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 606–19 (2006).
- 92. Zahnow, C. A. ErbB receptors and their ligands in the breast. *Expert Rev. Mol. Med.* 8, 1–21 (2006).
- 93. Stern, D. F. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Res.* **2**, 176–83 (2000).
- 94. Luo, J., Manning, B. D. & Cantley, L. C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* **4**, 257–62 (2003).
- 95. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell 129, 1261–74 (2007).
- 96. Song, M. S., Salmena, L. & Pandolfi, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 283–96 (2012).
- 97. Roskoski, R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.* (2013). doi:10.1016/j.phrs.2013.11.002
- 98. Pérez-Soler, R. HER1/EGFR targeting: refining the strategy. *Oncologist* 9, 58–67 (2004).
- 99. Alroy, I. & Yarden, Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett.* **410**, 83–6 (1997).
- 100. Mendelsohn, J. & Baselga, J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. Oncogene 19, 6550–65 (2000).
- 101. Slamon, D. J. *et al.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707–12 (1989).
- 102. Pedersen, M. W., Meltorn, M., Damstrup, L. & Poulsen, H. S. The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann. Oncol.* **12**, 745–60 (2001).
- 103. Lee-Hoeflich, S. T. *et al.* A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res.* **68**, 5878–87 (2008).
- 104. Chakrabarty, A., Sánchez, V., Kuba, M. G., Rinehart, C. & Arteaga, C. L. Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2718–23 (2012).
- 105. Cohen, S., Carpenter, G. & King, L. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J. Biol. Chem.* **255**, 4834–42 (1980).
- 106. Downward, J. *et al.* Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* **307**, 521–7
- 107. Hunter, T. The epidermal growth factor receptor gene and its product. *Nature* **311**, 414–6
- 108. Buerger, H. *et al*. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J. Pathol.* **189**, 521–6 (1999).
- 109. Bauknecht, T., Kohler, M., Janz, I. & Pfleiderer, A. The occurrence of epidermal growth factor receptors and the characterization of EGF-like factors in human ovarian, endometrial, cervical and breast cancer. EGF receptors and factors in gynecological carcinomas. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 115, 193–9 (1989).
- 110. Spano, J.-P. *et al.* Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann. Oncol.* **16**, 102–8 (2005).
- 111. Sobol, R. E. *et al.* Epidermal growth factor receptor expression in human lung carcinomas defined by a monoclonal antibody. *J. Natl. Cancer Inst.* **79**, 403–7 (1987).
- 112. Ladanyi, M. & Pao, W. Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Mod. Pathol.* **21 Suppl 2**, S16–22 (2008).
- 113. Overman, M. J. & Hoff, P. M. EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. Dis. Colon Rectum 50, 1259–70 (2007).
- 114. Bhargava, R. *et al.* EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod. Pathol.* **18**, 1027–33 (2005).
- 115. Kersting, C. *et al.* Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of egfr amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma. *Lab Invest* **84**, 582–587 (2004).
- 116. Gumuskaya, B. *et al.* EGFR expression and gene copy number in triple-negative breast carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* **203**, 222–9 (2010).
- 117. Richards, R. I. Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends Genet.* **17**, 339–45 (2001).

- 118. Bhargava, R. *et al.* EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod. Pathol.* **18**, 1027–33 (2005).
- 119. Gan, H. K., Kaye, A. H. & Luwor, R. B. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J. Clin. Neurosci.* **16**, 748–54 (2009).
- 120. Yu, H. *et al.* Co-expression of EGFRvIII with ErbB-2 enhances tumorigenesis: EGFRvIII mediated constitutively activated and sustained signaling pathways, whereas EGF-induced a transient effect on EGFR-mediated signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 1818–28 (2008).
- 121. Nieto, Y., Nawaz, F., Jones, R. B., Shpall, E. J. & Nawaz, S. Prognostic significance of overexpression and phosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and the presence of truncated EGFRvIII in locoregionally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* **25**, 4405–13 (2007).
- 122. Linardou, H., Dahabreh, I. J., Bafaloukos, D., Kosmidis, P. & Murray, S. Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 352–66 (2009).
- 123. Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A. & Kuriyan, J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **125**, 1137–49 (2006).
- 124. Jacot, W. *et al.* Lack of EGFR-activating mutations in European patients with triple-negative breast cancer could emphasise geographic and ethnic variations in breast cancer mutation profiles. *Breast Cancer Res.* **13**, R133 (2011).
- 125. Teng, Y. H.-F. *et al.* Mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in triple negative breast cancer: possible implications for targeted therapy. *Breast Cancer Res.* **13**, R35 (2011).
- 126. Carlsson, J. *et al*. HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. *Br. J. Cancer* **90**, 2344–8 (2004).
- 127. McCLINTOCK, B. Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **16**, 13–47 (1951).
- 128. Rosenberg, C. L. Polysomy 17 and HER-2 amplification: true, true, and unrelated. J. Clin. Oncol. 26, 4856–8 (2008).
- 129. Lower, E. E. *et al.* Increased rate of brain metastasis with trastuzumab therapy not associated with impaired survival. *Clin. Breast Cancer* **4**, 114–9 (2003).
- 130. Cantley, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655–7 (2002).
- 131. Lee, J. W. *et al.* PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* **24**, 1477–80 (2005).
- 132. Broderick, D. K. *et al.* Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas. *Cancer Res.* **64**, 5048–50 (2004).
- Bachman, K. E. *et al.* The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* 3, 772–5 (2004).
- 134. Gabelli, S. B. *et al.* Structural effects of oncogenic PI3Kα mutations. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **347**, 43–53 (2010).
- 135. Liedtke, C. *et al.* PIK3CA-activating mutations and chemotherapy sensitivity in stage II-III breast cancer. *Breast Cancer Res.* **10**, R27 (2008).
- 136. Boyault, S. *et al.* Mutational characterization of individual breast tumors: TP53 and PI3K pathway genes are frequently and distinctively mutated in different subtypes. *Breast cancer Res Treat* **132**, 29–39 (2012).
- 137. Barbareschi, M. *et al.* Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **13**, 6064–9 (2007).
- 138. Campbell, I. G. et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. Cancer Res. 64, 7678–81 (2004).
- 139. Saal, L. H. *et al.* PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res.* **65**, 2554–9 (2005).
- 140. Stemke-Hale, K. *et al.* An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* **68**, 6084–91 (2008).
- 141. Jensen, J. D. *et al.* PIK3CA mutations, PTEN, and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive earlystage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann. Oncol.* **23**, 2034–42 (2012).
- 142. Samuels, Y. et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. Science 304, 554 (2004).
- 143. Baselga, J. Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *Oncologist* **16 Suppl 1**, 12–9 (2011).
- 144. Lee, J. O. *et al.* Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* **99**, 323–34 (1999).
- 145. Myers, M. P. *et al.* P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9052–7 (1997).

- 146. Rizo, J. & Südhof, T. C. C2-domains, structure and function of a universal Ca2+-binding domain. J. Biol. Chem. 273, 15879–82 (1998).
- 147. Davidson, L. *et al.* Suppression of cellular proliferation and invasion by the concerted lipid and protein phosphatase activities of PTEN. *Oncogene* **29**, 687–97 (2010).
- 148. Leslie, N. R., Yang, X., Downes, C. P. & Weijer, C. J. PtdIns(3,4,5)P(3)-dependent and -independent roles for PTEN in the control of cell migration. *Curr. Biol.* **17**, 115–25 (2007).
- 149. Weng, L. P., Brown, J. L. & Eng, C. PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 599–604 (2001).
- 150. Verhaak, R. G. W. *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98–110 (2010).
- 151. Phillips, H. S. *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**, 157–73 (2006).
- 152. Pourmand, G. et al. Role of PTEN gene in progression of prostate cancer. Urol. J. 4, 95–100 (2007).
- 153. Perren, a *et al.* Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am. J. Pathol.* **155**, 1253–60 (1999).
- 154. Di Cristofano, A. et al. Impaired Fas response and autoimmunity in Pten+/- mice. Science 285, 2122–5 (1999).
- 155. Lee, J. S. *et al.* Reduced PTEN expression is associated with poor outcome and angiogenesis in invasive ductal carcinoma of the breast. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **12**, 205–10 (2004).
- 156. López-Knowles, E. *et al.* PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *Int J Cancer* **126**, 1121–31 (2010).
- 157. Chung, M. J., Jung, S. H., Lee, B. J., Kang, M. J. & Lee, D. G. Inactivation of the PTEN gene protein product is associated with the invasiveness and metastasis, but not angiogenesis, of breast cancer. *Pathol. Int.* **54**, 10–5 (2004).
- 158. Yang, X., Xin, Y. & Mao, L. Clinicopathological significance of PTEN and Caspase-3 expressions in breast cancer. *Chin. Med. Sci. J.* **23**, 95–102 (2008).
- 159. Knippers, R. Molekulare Genetik. 9. Auflage, (Thieme Verlag, 2006).
- 160. Furnari, F. B. *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* **21**, 2683–710 (2007).
- 161. Tokunaga, E. *et al.* Coexistence of the loss of heterozygosity at the PTEN locus and HER2 overexpression enhances the Akt activity thus leading to a negative progesterone receptor expression in breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* **101**, 249–57 (2007).
- 162. Garcia, J. M. *et al.* Allelic loss of the PTEN region (10q23) in breast carcinomas of poor pathophenotype. *Breast Cancer Res. Treat.* **57**, 237–243 (1999).
- 163. Bose, S., Wang, S. I., Terry, M. B., Hibshoosh, H. & Parsons, R. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. *Oncogene* **17**, 123–7 (1998).
- 164. Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/
- 165. Rhei, E. *et al.* Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas. *Cancer Res.* **57**, 3657–9 (1997).
- 166. Saal, L. H. *et al.* Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7564–9 (2007).
- 167. Zhang, H.-Y., Liang, F., Jia, Z.-L., Song, S.-T. & Jiang, Z.-F. PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients. *Oncol. Lett.* **6**, 161–168 (2013).
- 168. Mueller, S. *et al.* PTEN promoter methylation and activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in pediatric gliomas and influence on clinical outcome. *Neuro. Oncol.* **14**, 1146–52 (2012).
- 169. Khan, S. *et al.* PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int. J. Cancer* **112**, 407–10 (2004).
- 170. LASFARGUES, E. Y. & OZZELLO, L. Cultivation of human breast carcinomas. J Natl Cancer Inst. 21, 1131–47 (1958).
- 171. Lindman, H., Taube, A. & Bergh, J. C. Suramin inhibits the growth of human breast cancer cell lines. Studies on parental lines and corresponding sublines with acquired doxorubicin resistance with and without expression of P-glycoprotein. *Anticancer Res* **14**, 363–6
- 172. Hurst, J. et al. A novel model of a metastatic human breast tumour xenograft line. Br J Cancer 68, 274–6 (1993).
- 173. DuBridge, R. B. *et al.* Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 379–87 (1987).
- 174. Soule, H. D., Vazguez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* **51**, 1409–16 (1973).

- 175. Soule, H. D. & McGrath, C. M. A simplified method for passage and long-term growth of human mammary epithelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **22**, 6–12 (1986).
- Cailleau, R., Young, R., Olivé, M. & Reeves, W. J. Breast tumor cell lines from pleural effusions. J. Natl. Cancer Inst. 53, 661–74 (1974).
- 177. Pollari, S. *et al.* Enhanced serine production by bone metastatic breast cancer cells stimulates osteoclastogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* **125,** 421–30 (2011).
- 178. Yoneda, T., Williams, P. J., Hiraga, T., Niewolna, M. & Nishimura, R. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 1486–95 (2001).
- 179. Cailleau, R., Olivé, M. & Cruciger, Q. V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* **14**, 911–5 (1978).
- Janabi, N., Peudenier, S., Héron, B., Ng, K. H. & Tardieu, M. Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. *Neurosci. Lett.* 195, 105–8 (1995).
- 181. Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–23 (1979).
- 182. Wikman, H. *et al.* CDK4 is a probable target gene in a novel amplicon at 12q13.3-q14.1 in lung cancer. *Genes Chromosom. Cancer* **42**, 193–199 (2005).
- 183. Lottspeich, F. & Engels, J. W. Bioanalytik. (Spektrum Akademischer Verlag, 2012).
- 184. Morrison, T. B., Weis, J. J. & Wittwer, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**, 954–8, 960, 962 (1998).
- 185. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
- 186. Thellin, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J. Biotechnol. 75, 291–5 (1999).
- 187. Rudnicki, M. *et al.* Reliability of t7-based mRNA linear amplification validated by gene expression analysis of human kidney cells using cDNA microarrays. *Nephron. Exp. Nephrol.* **97**, e86–95 (2004).
- 188. Wikman, H. *et al.* Relevance of PTEN loss in brain metastasis formation of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 14, R49 (2012).
- 189. Uslar, L. Clinical Relevance of Allelic Imbalances on Chromosome 10q in Brain Metastases Formation in Breast Cancer Patients. *Dissertation* (2012). http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2012/5941/
- 190. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–7 (1977).
- 191. Mellinghoff, I. K. *et al.* Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* **353**, 2012–2024 (2005).
- 192. Riethdorf, S. *et al.* Prospective multi-centre study to validate chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 gene amplification in specimens from adjuvant and metastatic breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* **137**, 261–9 (2011).
- 193. Wolff, A. C. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* **25**, 118–45 (2007).
- 194. Banati, R. B., Gehrmann, J., Schubert, P. & Kreutzberg, G. W. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7, 111–8 (1993).
- 195. Köller, H. TNF alpha in cerebrospinal fluid of meningitis patients reduces astrocytes membrane potential. *J. Neuroimmunol.* **76**, 185–8 (1997).
- 196. Hinkerohe, D. *et al.* Effects of cytokines on microglial phenotypes and astroglial coupling in an inflammatory coculture model. *Glia* **52**, 85–97 (2005).
- 197. Albini, A. *et al.* A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* **47**, 3239–45 (1987).
- 198. Hohensee, I. et al. Frequent genetic alterations in EGFR- and HER2-driven pathways in breast cancer brain metastases. *Am. J. Pathol.* **183**, 83–95 (2013).
- Arteaga, C. L. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? Oncologist 7 Suppl 4, 31–9 (2002).
- 200. Nicholson, R. I., Gee, J. M. & Harper, M. E. EGFR and cancer prognosis. Eur. J. Cancer 37 Suppl 4, S9–15 (2001).
- 201. Quintela, I. *et al.* Expression and prognostic value of EGFR in invasive breast cancer. *Oncol. Rep.* **14,** 1655–63 (2005).
- 202. Hiesiger, E. M., Hayes, R. L., Pierz, D. M. & Budzilovich, G. N. Prognostic relevance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-neu/erbB2 expression in glioblastomas (GBMs). *J. Neurooncol.* **16**, 93–104 (1993).

- 203. Tokunaga, E. *et al.* Coexistence of the loss of heterozygosity at the PTEN locus and HER2 overexpression enhances the Akt activity thus leading to a negative progesterone receptor expression in breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* **101**, 249–57 (2007).
- 204. Carracedo, A., Alimonti, A. & Pandolfi, P. P. PTEN level in tumor suppression: how much is too little? *Cancer Res.* 71, 629–33 (2011).
- 205. Tohma, Y. *et al.* PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **57**, 684–9 (1998).
- 206. Boström, J. *et al.* Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res* **58**, 29–33 (1998).
- 207. Chung, J.-H. *et al.* The ERK1/2 pathway modulates nuclear PTEN-mediated cell cycle arrest by cyclin D1 transcriptional regulation. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2553–9 (2006).
- 208. Hou, P. *et al.* Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 1161–70 (2007).
- 209. Abubaker, J. *et al.* Clinicopathological analysis of colorectal cancers with PIK3CA mutations in Middle Eastern population. *Oncogene* **27**, 3539–45 (2008).
- 210. Oda, K., Stokoe, D., Taketani, Y. & McCormick, F. High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res* **65**, 10669–73 (2005).
- 211. Rohen, J. W. Funktionelle Neuroanatomie: Lehrbuch und Atlas. (Schattauer Verlag, 2001).
- 212. Roggendorf, W., Strupp, S. & Paulus, W. Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. *Acta Neuropathol.* **92**, 288–93 (1996).
- 213. Hoelzinger, D. B., Demuth, T. & Berens, M. E. Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 1583–93 (2007).
- 214. Daginakatte, G. C. & Gutmann, D. H. Neurofibromatosis-1 (Nf1) heterozygous brain microglia elaborate paracrine factors that promote Nf1-deficient astrocyte and glioma growth. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1098–112 (2007).
- 215. Fitzgerald, D. P. *et al.* Reactive glia are recruited by highly proliferative brain metastases of breast cancer and promote tumor cell colonization. *Clin. Exp. Metastasis* **25**, 799–810 (2008).
- 216. Ramakrishna, R. & Rostomily, R. Seed, soil, and beyond: The basic biology of brain metastasis. *Surg. Neurol. Int.* **4**, S256–64 (2013).
- 217. Scaltriti, M. & Baselga, J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin. Cancer Res.* **12**, 5268–72 (2006).
- 218. Adamo, B. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in breast cancer brain metastases. *Breast Cancer Res* **13**, R125 (2011).
- 219. Lin, N. U. & Winer, E. P. Brain metastases: the HER2 paradigm. Clin. Cancer Res. 13, 1648–55 (2007).
- 220. Gonzalez-Angulo, A. M. *et al.* PI3K pathway mutations and PTEN levels in primary and metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther* **10**, 1093–101 (2011).
- 221. Panigrahi, a R. *et al.* The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. *J. Pathol.* **204**, 93–100 (2004).
- 222. Dacic, S. EGFR assays in lung cancer. Adv. Anat. Pathol. 15, 241–7 (2008).
- 223. Munk, K. & Jahn, D. *Genetik*. (Georg Thieme Verlag, 2010).
- 224. Van Beers, E. H. & Nederlof, P. M. Array-CGH and breast cancer. Breast cancer Res. 8, 210 (2006).
- Pinkel, D. & Albertson, D. G. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat. Genet.* 37 Suppl, S11–7 (2005).
- Wood, H. M. *et al.* Using next-generation sequencing for high resolution multiplex analysis of copy number variation from nanogram quantities of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Nucleic Acids Res.* 38, e151 (2010).
- 227. Jin, L. & Lloyd, R. V. In situ hybridization: methods and applications. J. Clin. Lab. Anal. 11, 2–9 (1997).
- 228. Flynn, J. F., Wong, C. & Wu, J. M. Anti-EGFR Therapy: Mechanism and Advances in Clinical Efficacy in Breast Cancer. J. Oncol. 2009, 526963 (2009).
- 229. Generali, D. et al. EGFR mutations in exons 18-21 in sporadic breast cancer. Ann. Oncol. 18, 203–5 (2007).
- 230. Ise, N. *et al.* Novel monoclonal antibodies recognizing the active conformation of epidermal growth factor receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 685–90 (2010).
- 231. Yoshida, S. & Takahashi, H. Expression of extracellular matrix molecules in brain metastasis. J. Surg. Oncol. **100**, 65– 8 (2009).
- 232. Collins, L. C. *et al.* Basal cytokeratin and epidermal growth factor receptor expression are not predictive of BRCA1 mutation status in women with triple-negative breast cancers. *Am. J. Surg. Pathol.* **33**, 1093–7 (2009).

- 233. Nielsen, T. O. *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. cancer Res.* **10**, 5367–74 (2004).
- 234. Tham, Y.-L., Sexton, K., Kramer, R., Hilsenbeck, S. & Elledge, R. Primary breast cancer phenotypes associated with propensity for central nervous system metastases. *Cancer* **107**, 696–704 (2006).
- 235. Grupka, N. L., Lear-Kaul, K. C., Kleinschmidt-DeMasters, B. K. & Singh, M. Epidermal growth factor receptor status in breast cancer metastases to the central nervous system. Comparison with HER-2/neu status. *Arch Pathol Lab Med* **128**, 974–9 (2004).
- 236. Gaedcke, J. *et al.* Predominance of the basal type and HER-2/neu type in brain metastasis from breast cancer. *Mod Pathol* **20**, 864–70 (2007).
- 237. Gojis, O. *et al.* Expression of selected proteins in breast cancer brain metastases. *Folia Histochem. Cytobiol.* **51**, 213–8 (2013).
- 238. Brand, T. M., Iida, M. & Wheeler, D. L. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther* **11**, 777–92 (2011).
- 239. Sosińska-Mielcarek, K. *et al.* Immunohistochemical prediction of brain metastases in patients with advanced breast cancer: The role of Rad51. *Breast* **22**, 1178–83 (2013).
- 240. Bachmann, C., Grischke, E. M., Staebler, A., Schittenhelm, J. & Wallwiener, D. Receptor change-clinicopathologic analysis of matched pairs of primary and cerebral metastatic breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **139**, 1909–16 (2013).
- 241. Gancberg, D. *et al.* Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann. Oncol.* **13**, 1036–43 (2002).
- 242. Zidan, J. *et al.* Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease. *Br. J. Cancer* **93**, 552–6 (2005).
- 243. Nishimura, R. *et al.* Changes in the ER, PgR, HER2, p53 and Ki-67 biological markers between primary and recurrent breast cancer: discordance rates and prognosis. *World J Surg Oncol* **9**, 131 (2011).
- 244. Lower, E. E., Glass, E., Blau, R. & Harman, S. HER-2/neu expression in primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **113**, 301–6 (2009).
- 245. Regitnig, P., Schippinger, W., Lindbauer, M., Samonigg, H. & Lax, S. F. Change of HER-2/neu status in a subset of distant metastases from breast carcinomas. *J. Pathol.* **203**, 918–26 (2004).
- 246. Fuchs, I., Loebbecke, M. & Buhler, H. HER2 in brain metastases: issues of concordance, survival, and treatment. *J Clin Oncol* **20**, 4130–3 (2002).
- 247. Flores, L. M. *et al.* Improving the yield of circulating tumour cells facilitates molecular characterisation and recognition of discordant HER2 amplification in breast cancer. *Br. J. Cancer* **102**, 1495–502 (2010).
- 248. Yu, M. *et al.* Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* **339**, 580–4 (2013).
- 249. Fehm, T. *et al.* HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. *Breast Cancer Res. Treat.* **124**, 403–12 (2010).
- 250. Krishnamurthy, S. *et al.* Discordance in HER2 gene amplification in circulating and disseminated tumor cells in patients with operable breast cancer. *Cancer Med.* **2**, 226–33 (2013).
- 251. DETECT III. http://www.detect-studien.de/
- 252. SUCCESS B. http://www.success-studie.de/b/
- 253. Jäger, B. *et al.* Her2-Expression zirkulierender Tumorzellen bei Patientinnen mit Her2 positivem Mammakarzinom im Frühstadium vor adjuvanter Chemotherapie Ergebnisse der SUCCESS B Studie. *Senologie* **9**, (2012).
- 254. Trotman, L. C. et al. Pten dose dictates cancer progression in the prostate. PLoS Biol. 1, E59 (2003).
- 255. Alimonti, A. et al. Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. Nat. Genet. 42, 454–8 (2010).
- 256. Peterson, L. M. *et al.* Molecular characterization of endometrial cancer: a correlative study assessing microsatellite instability, MLH1 hypermethylation, DNA mismatch repair protein expression, and PTEN, PIK3CA, KRAS, and BRAF mutation analysis. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **31**, 195–205 (2012).
- 257. Liang, H. *et al*. Whole-exome sequencing combined with functional genomics reveals novel candidate driver cancer genes in endometrial cancer. *Genome Res.* **22**, 2120–9 (2012).
- 258. Trédan, O. *et al.* Predicting everolimus treatment efficacy in patients with advanced endometrial carcinoma: a GINECO group study. *Target. Oncol.* **8**, 243–51 (2013).
- 259. Byron, S. A. *et al.* Inhibition of activated fibroblast growth factor receptor 2 in endometrial cancer cells induces cell death despite PTEN abrogation. *Cancer Res.* **68**, 6902–7 (2008).
- 260. Kanaya, T. *et al.* Association of mismatch repair deficiency with PTEN frameshift mutations in endometrial cancers and the precursors in a Japanese population. *Am. J. Clin. Pathol.* **124**, 89–96 (2005).

- 261. Moreno-Bueno, G. *et al.* Molecular alterations associated with cyclin D1 overexpression in endometrial cancer. *Int. J. Cancer* **110**, 194–200 (2004).
- 262. Cohn, D. E. *et al.* Absence of PTEN repeat tract mutation in endometrial cancers with microsatellite instability. *Gynecol. Oncol.* **79**, 101–6 (2000).
- 263. Levine, R. L. *et al.* PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *Cancer Res.* **58**, 3254–8 (1998).
- 264. Maxwell, G. L. *et al.* Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer Res.* **58**, 2500–3 (1998).
- 265. Risinger, J. I. *et al.* PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clin. Cancer Res.* **4**, 3005–10 (1998).
- 266. Agrawal, S. & Eng, C. Differential expression of novel naturally occurring splice variants of PTEN and their functional consequences in Cowden syndrome and sporadic breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 777–87 (2006).
- 267. Liu, Y., Malaviarachchi, P., Beggs, M. & Emanuel, P. D. PTEN transcript variants caused by illegitimate splicing in "aged" blood samples and EBV-transformed cell lines. *Hum. Genet.* **128**, 609–14 (2010).
- 268. Sauter, G. & Mirlacher, M. Tissue microarrays for predictive molecular pathology. J. Clin. Pathol. 55, 575–6 (2002).
- 269. Capodanno, A. *et al.* Dysregulated PI3K/Akt/PTEN pathway is a marker of a short disease-free survival in nodenegative breast carcinoma. *Hum. Pathol.* **40**, 1408–17 (2009).
- 270. Tsutsui, S. *et al.* Reduced expression of PTEN protein and its prognostic implications in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncology* **68**, 398–404 (2005).
- 271. Tsutsui, S. *et al.* Inactivation of PTEN is associated with a low p27Kip1 protein expression in breast carcinoma. *Cancer* **104**, 2048–53 (2005).
- 272. Pérez-Tenorio, G. *et al.* PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 3577–84 (2007).
- 273. Depowski, P. L., Rosenthal, S. I. & Ross, J. S. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod. Pathol.* **14**, 672–6 (2001).
- 274. Whiteman, D. C. *et al.* Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer* **99**, 63–7 (2002).
- 275. Zhou, X.-P. *et al.* PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers. *Am. J. Pathol.* **161**, 439–47 (2002).
- 276. Zhou, L.-F. *et al.* A unique life-threatening mediastinal liposarcoma mimicking pleural effusion. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 106 (2012).
- 277. Omholt, K., Kröckel, D., Ringborg, U. & Hansson, J. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma res* **16**, 197–200 (2006).
- 278. Huang, C.-H. *et al.* The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science* **318**, 1744–8 (2007).
- 279. Dumont, A. G., Dumont, S. N. & Trent, J. C. The favorable impact of PIK3CA mutations on survival: an analysis of 2587 patients with breast cancer. *Chin. J. Cancer* **31**, 327–34 (2012).
- 280. Rydén, L., Jirström, K., Haglund, M., Stål, O. & Fernö, M. Epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2 are specific biomarkers in triple-negative breast cancer. Results from a controlled randomized trial with long-term follow-up. *Breast Cancer Res. Treat.* **120**, 491–8 (2010).
- 281. Pintens, S. *et al.* Triple negative breast cancer: a study from the point of view of basal CK5/6 and HER-1. *J. Clin. Pathol.* **62**, 624–8 (2009).
- 282. Martin, V. *et al.* Molecular characterization of EGFR and EGFR-downstream pathways in triple negative breast carcinomas with basal like features. *Histol. Histopathol.* **27**, 785–92 (2012).
- 283. Toyama, T. *et al.* Frequently increased epidermal growth factor receptor (EGFR) copy numbers and decreased BRCA1 mRNA expression in Japanese triple-negative breast cancers. *BMC Cancer* **8**, 309 (2008).
- 284. Smid, M. et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. Cancer Res. 68, 3108–14 (2008).
- 285. Heitz, F. *et al.* Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *Eur. J. Cancer* **45**, 2792–8 (2009).
- 286. Kennecke, H. et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. J. Clin. Oncol. 28, 3271–7 (2010).
- 287. Niwińska, A., Olszewski, W., Murawska, M. & Pogoda, K. Triple-negative breast cancer with brain metastases: a comparison between basal-like and non-basal-like biological subtypes. *J. Neurooncol.* **105**, 547–53 (2011).
- 288. Weng, L. *et al.* PTEN Suppresses Breast Cancer Cell Growth by Phosphatase Activity-dependent G1 Arrest followed by Cell Death PTEN Suppresses Breast Cancer Cell Growth by Phosphatase Activity-dependent G 1 Arrest followed by Cell Death 1. 5808–5814 (1999).

- 289. Kim, S.-J. *et al.* Astrocytes upregulate survival genes in tumor cells and induce protection from chemotherapy. *Neoplasia* **13**, 286–98 (2011).
- 290. Palmieri, D., Chambers, A. F., Felding-Habermann, B., Huang, S. & Steeg, P. S. The biology of metastasis to a sanctuary site. *Clin. Cancer Res.* **13**, 1656–62 (2007).
- 291. Aschner, M. & Costa, L. G. The Role of Glia in Neurotoxicity, 2nd Edition. (Taylor & Francis, 2010).
- 292. Faustmann, P. M. *et al.* Microglia activation influences dye coupling and Cx43 expression of the astrocytic network. *Glia* **42**, 101–8 (2003).
- 293. Xing, F. *et al.* Reactive astrocytes promote the metastatic growth of breast cancer stem-like cells by activating Notch signalling in brain. *EMBO Mol. Med.* **5**, 384–96 (2013).
- 294. Wang, L. et al. Astrocytes directly influence tumor cell invasion and metastasis in vivo. PLoS One 8, e80933 (2013).
- 295. Rietkötter, E. *et al.* Zoledronic acid inhibits macrophage/microglia-assisted breast cancer cell invasion. *Oncotarget* **4**, 1449–60 (2013).
- 296. Wei, J., Gabrusiewicz, K. & Heimberger, A. The controversial role of microglia in malignant gliomas. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, 285246 (2013).
- 297. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* **11**, 889–96 (2010).
- 298. Galli, S. J., Borregaard, N. & Wynn, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* **12**, 1035–44 (2011).
- 299. Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. Clin. Chem. 59, 110-8 (2013).
- 300. Kang, Y. & Pantel, K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell* **23**, 573–81 (2013).
- 301. Gasch, C. *et al.* Heterogeneity of Epidermal Growth Factor Receptor Status and Mutations of KRAS/PIK3CA in Circulating Tumor Cells of Patients with Colorectal Cancer. *Clin. Chem.* **59**, 252–60 (2013).
- 302. Danielsen, S. A. *et al.* Novel mutations of the suppressor gene PTEN in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability- and TP53 mutation- status. *Hum. mutat* **29**, E252–62 (2008).
- 303. Hannemann, J. *et al.* Quantitative high-resolution genomic analysis of single cancer cells. *PLoS One* **6**, e26362 (2011).

# Anhang

## 9.1 Zusätzliche Tabellen

**Tabelle 9.1: Resultate alle Analysen an korrespondierendem Gehirnmetastasen- und Primärtumorgewebe.** Dargestellt sind Fälle mit unverändertem (keine Füllung) oder verändertem Status (•). Fälle mit einem Zugewinn der Kopienanzahl wurden als o illustriert. Verändert nach Hohensee *et al.*<sup>198</sup>

Patientin	Paar	Rezidiv	Subtyp	E	GFR			PTE	N		PIK3CA	HER2	EGFR+	HER2+
			Kopien Protein Status		Kopien	Mutation	Protein	Status			КЗСА	PIK3CA		
BCBM-05	1	Gehirn	HER2	0			•					•		•
PT-030	1	Gehirn + Knochen	HER2				•	-				•		•
BCBM-20	2	Gehirn	HR+				•							
PT-039	2	Gehirn	nd				•	-	•	•			•	•
BCBM-01	3	Gehirn	HER2	•	•	•	•					•	•	•
PT-029	3	Gehirn	TNBC	•	•	•	•						٠	
BCBM-14	4	Gehirn	HR+				•		•	•			٠	•
PT-040	4	Gehirn	nd		-		-	-	-	-		-		-

**Tabelle 9.2: Resultate alle Analysen an korrespondierenden Primärtumor- und DCIS-Arealen.** Dargestellt sind Fälle mit unverändertem (keine Füllung) oder verändertem Status (•). Verändert nach Hohensee *et al.*<sup>198</sup>

Patientin	Paar	Rezidiv	Subtyp	EGFR		PTEN			РІКЗСА	HER2	EGFR+	HER2+		
				Kopien	Protein	Status	Kopien	Mutation	Protein	Status			PIEN+ PIK3CA	PIK3CA
PT-005	5	Knochen	nd		-		•		-	•		-	•	-
DCIS-01	5	Knochen	nd		-		-	-	-	-	-	-	-	-
PT-011	6	Keine	HR+		-				-					
DCIS-02	6	Keine	nd		-		-	-	-	-	-	-	-	-
PT-015	7	Keine	HR+		-				-					
DCIS-03	7	Keine	nd		-		-	-	-	-	-	-	-	-
PT-017	8	Andere	HER2									•		•
DCIS-04	8	Andere	nd		-		-	-	-	-	-	-	-	-
PT-022	9	Keine	HR+				•							
DCIS-05	9	Keine	nd		-		-	-	-	-	-	-	-	-
PT-103	10	Andere	HER2				-		•	•	•	•	•	•
DCIS-06	10	Andere	nd		-		-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabelle 9.3: Resultate alle Analysen nicht korrespondierender BCBM-, BCOM- und Primärtumorgewebe.** Dargestellt sind Fälle mit unverändertem (keine Füllung) oder verändertem Status (•). Fälle mit einem Zugewinn der Kopienanzahl wurden als o illustriert. Verändert nach Hohensee *et al.*<sup>198</sup>

Patientin	Rezidiv	Subtyp	E	GFR			PT	EN		PIK3CA	HER2	EGFR+	HER2+
												PTEN+PT	
												KSCA	PIKSCA
			_	c	6	_	u	c	6				
			pieı	itei	atus	pieı	atic	itei	atus				
			Ko	Pro	Sta	Ko	٩ut	Pro	Sta				
							2						
				Geh	irnm	netast	asen						
BCBM-02	Gehirn	HER2	ο								•		•
BCBM-03	Gehirn	TNBC	•	•	•	•		•	•			•	•
BCBM-04	Gehirn	HER2				•					•		•
BCBM-06	Gehirn	TNBC	0	•	•	•	٠	•	•			•	•
BCBM-07	Gehirn	TNBC	0	•	•	•	٠	•	•			•	•
BCBM-08	Gehirn	HER2					•				•		•
BCBM-09	Gehirn	HR+				•		•	•			•	•
BCBM-10	Gehirn	HER2									•		•
BCBM-11	Gehirn	HER2	0			•				•	•	•	•
BCBM-12	Gehirn	HER2		-				•	•		•	•	•
BCBM-13	Gehirn	HR+								•		•	•
BCBM-15	Gehirn	HER2									•		•
BCBM-16	Gehirn	HR+								•		•	•
BCBM-17	Gehirn	HER2	0			-					•		•
BCBM-18	Gehirn	HER2	0			•	-				•		•
BCBM-19	Gehirn	TNBC						•	•			•	•
BCBM-21	Gehirn	TNBC	0	•	•	•		•	•			•	•
BCBM-22	Gehirn	HER2	•	•	•	-				•	•	•	•
BCBM-23	Gehirn	nd	0			-							
BCBM-24	Gehirn	HR+				-	•			•		•	•
BCBM-26	Gehirn	HR+					•	•	•	•		•	•
BCBM-27	Gehirn	TNBC	•	•	•	-	-			-		•	
BCBM-28	Gehirn	HR+		•	•	-	-			-		•	
BCBM-29	Gehirn	HR+	0	•	•	-	-			-		•	
BCBM-31	Gehirn	TNBC	0	•	•	-	-					•	
		Metasta	isen ir	1 and	eren	Orga	nen a	als de	m Ge	ehirn			
BCOM-01	Andere	nd		-		-	-	-	-		-		-
BCOM-02	Andere	nd					-	٠	•			•	-
BCOM-03	Andere	nd				•							-
BCOM-04	Andere	nd	0			٠					-		-
BCOM-05	Andere	nd	0	•	٠	•		•	•	•		•	-
BCOM-06	Andere	nd	0			•	-			-	•		-
BCOM-07	Knochen	nd	-	-	-	-	-	•	•	-	-	•	-
BCOM-08	Knochen	nd	-			-	-			-	-		-
BCOM-09	Knochen	nd	-			-	-			-			-
BCOM-10	Knochen	nd	-			-	-			-			-
BCOM-11	Knochen	nd	-			-	-			-			-
BCOM-12	Knochen	nd	-			-	-			-			-
BCOM-13	Knochen	nd	-			-	-			-	•		-
BCOM-14	Knochen	nd	-			-	-			-			-
BCOM-15	Knochen	nd	-			-	-			-			-
						I					l		

	Primärtumore												
PT-004	Keine	HR+		-				-	T				
PT-007	Keine	HER2					-				•		•
PT-010	Andere	HER2		-				-		•	•	•	•
PT-013	Andere	HER2				•					•		•
PT-014	Keine	HR+								•		•	•
PT-016	Keine	HR+		-				-		•		•	•
PT-018	Andere	HR+				•							
PT-019	Keine	HR+		-				-		•		•	•
PT-020	Keine	HR+		-			-						
PT-021	Keine	HR+											
PT-023	Keine	HER2	0							•	•	•	•
PT-024	Keine	HR+											
PT-025	Keine	HR+	0										
PT-028	Gehirn	nd	-				-			-			
PT-033	Keine	HFR2					-	-			•		•
PT-036	Andere	HR+								•	•	•	
PT-038	Gehirn	HR+					-	•		•		•	
PT-041	Knochen	HR+				•	-	•	•	-		•	•
PT-041	Gehirn + Knochen	TNBC					-						
PT-042	Keine	TNBC						•				•	•
PT-045	Keine	HR+		_								•	
PT-047	Keine	TNRC		_		•	_	_	•			•	•
PT-048	Andoro						-						
PT-049	Andere		0	-				-					
PT-053	Knochon		0				-	-					
PT-059	Knochon		0	-				-		•		•	
PT-000	Knochon			-			-	-		•		•	•
PT-065	Knochon			-				-					
PT-003	Knochon			-				-					
PT-071	Knochen						-						
PT-072	Cohirp			•	•		-					•	
PT-075	Knochon		•	•	•		-					•	
PT-074	Andoro		0	-			-				•		•
PT-075	Knochon		~				-			•		•	•
PT-077	Knochen	HK+	0				-						
PT-093	Andere	HK+								•		•	•
PT-097	Andere	INBC	•	•	•	-	-			-		•	
PT-098	Genirn	HK+				•	-						
PT-099	Knochen	HK+					-						
PT-100	Knocnen	HK+	0	-		-	-			-		_	_
PT-101	Keine	HK+								•		•	•
PT-102	Andere	HK+	_										
PI-104	Keine	INBC	0	-									
PT-105	Keine	TNBC	0	-		-							
PT-106	Keine	TNBC				-							
PI-107	Andere	INBC	Ι.	-		-				•		•	•
PT-108	Keine	TNBC	0			-	-	•	•			•	•
PT-109	Andere	TNBC					-	-		•		•	•
PT-110	Andere	TNBC		•	•	-		•	•			•	•
PT-111	Keine	TNBC		-		•	-	•	•			•	•
PT-112	Andere	TNBC	I			-	-	•	•		1 I	•	•

**Tabelle 9.4: EGFR-Kopienanzahl und -Proteinspiegel der BCBM-Patientinnen.** Dargestellt sind die EGFR-Kopienanzahl und die –Proteinlevels der jeweiligen Patientinnen. Diploid vorliegendes EGFR, EGFR-Zugewinn und –Amplifikation sind als WT, GAIN bzw. AMP illustriert. Nicht messbare, schwache, moderate und hohe EGFR-Proteinlevels wurden als 0, 1+, 2+ bzw. 3+ dargestellt. Heterogene EGFR-Proteinlevels in verschiedenen Bereichen derselben Tumorprobe wurden als het markiert.

Patientin*	EGFR						
	Kopien-						
	anzahl†	Protein					
BCBM-01	AMP	3+					
BCBM-02	GAIN	0					
BCBM-03	AMP	3+					
BCBM-04	WT	0					
BCBM-05	GAIN	0					
BCBM-06	GAIN	1-3+ (het)					
BCBM-07	GAIN	0-2+ (het)					
BCBM-08	WT	0					
BCBM-09	WT	0					
BCBM-10	WT	0					
BCBM-11	GAIN	0					
BCBM-13	WT	0					
BCBM-14	WT	0					
BCBM-15	WT	0					
BCBM-16	WT	0					
BCBM-17	GAIN	0					
BCBM-18	GAIN	0					
BCBM-19	WT	0					
BCBM-20	WT	0					
BCBM-21	GAIN	2+					
BCBM-22	AMP	3+					
BCBM-23	GAIN	0					
BCBM-24	WT	0					
BCBM-26	WT	0					
BCBM-27	AMP	3+					
BCBM-28	WT	3+					
BCBM-29	GAIN	0-3+ (het)					
BCBM-31	GAIN	3+					

**Tabelle 9.5: EGFR-Kopienanzahl und -Proteinspiegel der BCOM-Patientinnen.** Dargestellt sind die EGFR-Kopienanzahl und die –Proteinlevels der jeweiligen Patientinnen. Diploid vorliegendes EGFR und EGFR-Zugewinn sind als WT bzw. GAIN illustriert. Nicht messbare und hohe EGFR-Proteinlevels wurden als 0 bzw. 3+ dargestellt.

Patientin*	EGFR					
	Kopien-					
	anzahl†	Protein				
BCOM-02	WT	0				
BCOM-03	WT	0				
BCOM-04	GAIN	0				
BCOM-05	GAIN	3+				
BCOM-06	GAIN	0				

**Tabelle 9.6: EGFR-Kopienanzahl und -Proteinspiegel der Primärtumorpatientinnen.** Dargestellt sind die EGFR-Kopienanzahl und die -Proteinlevels der jeweiligen Patientinnen mit zugehöriger Lokalisation des Rezidivs. Auf geführt sind Patientinnen, die im weiteren Krankenheitsverlauf keine Rezidive (Keine), Rezidive im Gehirn (Gehirn), im Knochen (Knochen), in Gehirn und Knochen (Gehirn+Knochen) oder in anderen Geweben als dem Gehirn (Andere) entwickelten. Diploid vorliegendes EGFR, EGFR-Zugewinn und –Amplifikation sind als WT, GAIN bzw. AMP illustriert. Nicht messbare, schwache und hohe EGFR-Proteinlevels wurden als 0, 1+ bzw. 3+ dargestellt.

Patientin*	Rezidiv <sup>+</sup>	EGFR			
		Kopien-			
		anzahl <sup>+</sup>	Protein		
PT-007	keines	WТ	0		
PT-013	andere	WT	0 0		
PT-014	keines	WT	0 0		
PT-017	andere	WT	0 0		
PT-018	andere	WT	Õ		
PT-021	keines	WT	0		
PT-022	keines	WT	0		
PT-023	keines	GAIN	0		
PT-024	keines	WT	0		
PT-025	keines	GAIN	0		
PT-028	Gehirn	WT	0		
PT-029	Gehirn	AMP	3+		
PT-030	Gehirn + Knochen	WT	0		
PT-033	keines	WT	0		
PT-036	andere	WT	0		
PT-038	Gehirn	WT	0		
PT-039	Gehirn	WT	0		
PT-028	Gehirn	WT	0		
PT-042	Gehirn + Knochen	WT	0		
PT-045	keines	WT	0		
PT-048	keines	WT	0		
PT-053	andere	GAIN	0		
PT-071	Knochen	WT	0		
PT-072	Knochen	WT	0		
PT-073	Gehirn	AMP	3+		
PT-075	andere	WT	0		
PT-077	Knochen	GAIN	0		
PT-093	andere	WT	0		
PT-097	andere	AMP	1+		
PT-098	Gehirn	WT	0		
PT-099	Knochen	WT	0		
PT-101	keines	WT	0		
PT-102	andere	WT	0		
PT-103	andere	WT	0		
PT-106	keines	WT	0		
PT-108	keines	GAIN	0		
PT-109	andere	WT	0		
PT-110	andere	WT	3+		
PT-112	andere	WT	0		

**Tabelle 9.7: Patientendaten über Nachsorge, Rezidiventwicklung und Versterben der Primärtumorpatietinnen.** Dargestellt sind Daten der Nachsorge (*Follow-up*) sowie die Zeitspanne von der Resektion des Primärtumors bis zu jener der Fernmetastase bzw. bis zum Tod der jeweiligen Patientin in Monaten mit zugehöriger Lokalisation des Rezidivs. Auf geführt sind Patientinnen, die im weiteren Krankenheitsverlauf keine Rezidive (Keine), Rezidive im Gehirn (Gehirn), im Knochen (Knochen), in Gehirn und Knochen (Gehirn+Knochen) oder in anderen Geweben als dem Gehirn (Andere) entwickelten. Kein Rezidiv: bis zum Datum der letzten Nachsorge wurde kein Rezidiv diagnostiziert, M1: Diagnose des Rezidivs zum Zeitpunkt der Primärtumorresektion, Nicht bekannt: es konnte keine Zeitspanne der Nachsorge ermittelt werden, Nicht verstorben: bis zum Datum der letzten Nachsorge war die Patientin noch am leben.

Patientin	Rezidiv	<b>Follow-up</b> [Monate]	Zeitspanne bis Rezidivierung [Monate]	Zeitspanne bis Versterben [Monate]
PT-004	keines	90,9	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-005	Knochen	20,8	16,4	21,6
PT-007	keines	91,0	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-010	andere	27,9	nicht bekannt	27,9
PT-011	keines	83,0	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-013	andere	80,1	63,6	nicht verstorben
PT-014	keines	97,6	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-015	keines	71,9	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-016	keines	138,8	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-017	andere	76,1	51,0	nicht verstorben
PT-018	andere	74,8	39,9	nicht verstorben
PT-019	keines	73,4	kein Rezidiv	73,4
PT-020	keines	73,0	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-021	keines	73,7	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-022	keines	61,1	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-023	keines	62,6	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-024	keines	63,8	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-025	keines	54,5	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-028	Gehirn	nicht bekannt	M1	nd
PT-029	Gehirn	14,5	11,4	nicht verstorben
PT-030	Gehirn + Knochen	140,0	69,0	140
PT-033	keines	97,9	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-036	andere	92,6	68,5	nicht verstorben
PT-038	Gehirn	52,0	36,6	52,0
PT-039	Gehirn	nicht bekannt	122	nicht verstorben
PT-040	Gehirn	13,0	13,0	nicht verstorben
PT-041	Knochen	68,4	66,5	68,4
PT-042	Gehirn + Knochen	18,9	12,0	18,9
PT-045	keines	48,2	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-047	keines	39,0	kein Rezidiv	39,0
PT-048	keines	56,9	kein Rezidiv	nicht bekannt
PT-049	andere	14,4	M1	14,4
PT-053	andere	48,0	M1	nicht verstorben
PT-059	Knochen	13,1	13,1	13,1
PT-060	Knochen	45,6	23,5	45,6
PT-061	Knochen	45,5	M1	45,5
PT-065	Knochen	42,5	M1	42,5
PT-071	Knochen	18,5	5,8	18,5
PT-072	Knochen	71,4	10,7	nicht verstorben
PT-073	Gehirn	15,6	10,6	15,5
PT-074	Knochen	22,5	22,6	nicht bekannt
PT-075	andere	62,3	13,7	nicht verstorben
PT-077	Knochen	39,0	5,5	39
PT-093	andere	12,8	12,3	12,8
PT-097	andere	0,5	0,3	nicht verstorben
PT-098	Gehirn	118,6	nicht bekannt	nicht verstorben
PT-099	Knochen	82,0	56,0	82
PT-100	Knochen	39,3	28,6	nicht verstorben
PT-101	keines	93,5	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-102	andere	47,6	29,1	nicht verstorben
PT-103	andere	84,0	6,6	nicht verstorben
PT-104	keines	57,2	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-105	keines	70,7	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-106	keines	66,5	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-107	andere	31,2	28,2	31,2
PT-108	keines	67,5	kein Rezidiv	nicht verstorben
PT-109	andere	20,9	8,2	20,8
PT-110	andere	11,3	10,7	11,3
PT-111	keines	56,6	kein Rezidiv	nicht verstorben

		9	Anhang			
PT-112	andere	6	6,0	66	nicht verstorben	_

**Tabelle 9.8: Patientendaten über Rezidiventwicklung der BCBM-Patientinnen.** Dargestellt ist die Zeitspanne von der Resektion des Primärtumors bis zu jener der Fernmetastase der jeweiligen Patientin in Monaten. Nicht bekannt: es konnte keine Zeitspanne der Nachsorge ermittelt werden.

Patientin	Zeitspanne bis Rezidivierung
	[Monate]
BCBM-01	11,4
BCBM-02	32,2
BCBM-03	0,7
BCBM-04	63,1
BCBM-05	36,4
BCBM-06	Nicht bekannt
BCBM-07	58,3
BCBM-08	37,6
BCBM-09	43,6
BCBM-10	222,0
BCBM-11	Nicht bekannt
BCBM-12	84,0
BCBM-13	12,4
BCBM-14	69,6
BCBM-15	25,0
BCBM-16	86,6
BCBM-17	168,2
BCBM-18	97,4
BCBM-19	17,7
BCBM-20	120,0
BCBM-21	7,0
BCBM-22	4,0
BCBM-23	9,0
BCBM-24	84,0
BCBM-26	132,0
BCBM-27	Nicht bekannt
BCBM-28	Nicht bekannt
BCBM-29	Nicht bekannt
BCBM-31	Nicht bekannt

**Tabelle 9.9: PTEN-Kopienanzahl, -Mutationsstatus und -Proteinlevels der Primärtumorpatientinnen.** Dargestellt sind PTEN-Kopienanzahl, -Mutationsstatus und die -Proteinspiegel der jeweiligen Patientinnen mit zugehöriger Lokalisation des Rezidivs. Auf geführt sind Patientinnen, die im weiteren Krankenheitsverlauf keine Rezidive (Keine), Rezidive im Gehirn (Gehirn), im Knochen (Knochen), in Gehirn und Knochen (Gehirn+Knochen) oder in anderen Geweben als dem Gehirn (Andere) entwickelten. Diploid bzw. nicht-mutiert vorliegendes *PTEN* sind als WT illustriert. Ein Verlust der *PTEN*-Kopienanzahl ist als LOSS und einen Mutation als MUT dargestellt. Nicht messbare, schwache, moderate und hohe PTEN-Proteinspiegel wurden als 0, 1+, 2+ bzw. 3+ eingepflegt.

Patientin	Rezidiv		PTE	N
		Kopienanzahl	Mutation	Proteinlevel
		•		
PT-005	Knochen	LOSS	WT	-
PT-041	Knochen	WT	-	2+
PT-059	Knochen	WT	WT	-
PT-060	Knochen	WT	-	-
PT-061	Knochen	WT	WT	-
PT-065	Knochen	WT	WT	-
PT-071	Knochen	WT	-	2+
PT-072	Knochen	WT	-	2+
PT-074	Knochen	WT	-	3+
PT-077	Knochen	WT	-	2+
PT-099	Knochen	WI	-	2+
PT-100	Knochen	-	-	1+
PT-028	Gehirn	WI	-	1+
PT-029	Gehirn	LOSS	WT	1+
PT-038	Gehirn	LOSS	-	0
PT-039	Gehirn	LOSS	-	0
PT-040	Gehirn	-	-	-
PT-073	Gehirn	WT	-	2+
PT-098	Gehirn	LOSS	-	2+
PT-030	Gehirn + Knochen	LOSS	-	2+
PT-042	Gehirn + Knochen	WT	-	2+
PT-004	Keine	WT	WT	-
PT-007	Keine	WT	-	2+
PT-011	Keine	WT	WT	-
PT-014	Keine	WT	WT	2+
PT-015	Keine	WT	WT	-
PT-016	Keine	WT	WT	-
PT-019	Keine	WT	WT	-
PT-020	Keine	WT	-	3+
PT-021	Keine	WT	WT	3+
PT-022	Keine	LOSS	WT	1+
PT-023	Keine	WT	WT	2+
PT-024	Keine	WT	WT	2+
PT-025	Keine	WT	WT	3+
PT-033	Keine	WT	-	-
PT-045	Keine	WT	WT	0
PT-047	Keine	LOSS	WT	-
PT-048	Keine	WT	-	2+
PT-101	Keine	WT	WT	2+
PT-104	Keine	WT	WT	1+
PT-105	Keine	-	WT	1+
PT-106	Keine	-	WT	2+
PT-108	Keine	-	-	0
PT-111	Keine	LOSS	-	0
PT-010	Andere	WT	WT	-
PT-013	Andere	LOSS	WT	1+
PT-017	Andere	WT	WT	2+
PT-018	Andere	LOSS	WT	2+
PT-036	Andere	WT	WT	2+
PT-049	Andere	WT	WT	-
PT-053	Andere	WT	-	-
PT-075	Andere	WT	-	2+
PT-093	Andere	WT	WT	1+
РТ-097	Andere	-	-	2+
PT-102	Andere	WT	WT	2+
PT-103	Andere	-	WT	0
PT-107	Andere	-	WT	2+
PT-109	Andere	WT	-	-
PT-110	Andere	-	WT	0
PT-112	other	-	-	0

**Tabelle 9.10: PTEN-Kopienanzahl, -Mutationsstatus und -Proteinlevels der Metastasenpatientinnen.** Dargestellt sind PTEN-Kopienanzahl, -Mutationsstatus und die -Proteinspiegel der jeweiligen Patientinnen mit zugehöriger Lokalisation des Rezidivs. Auf geführt sind Patientinnen mit Gehirn-, Knochenmetastasen oder Metastasen in andere Organe als dem Gehirn (Andere). Diploid bzw. nicht-mutiert vorliegendes *PTEN* sind als WT illustriert. Ein Verlust der *PTEN*-Kopienanzahl ist als LOSS und einen Mutation als MUT dargestellt. Nicht messbare, schwache, moderate und hohe PTEN-Proteinspiegel wurden als 0, 1+, 2+ bzw. 3+ eingepflegt.

Patientin	Rezidiv		PTEN	1
		Kopienanzahl	Mutation	Proteinlevel
BCBM-01	Gehirn	LOSS	WТ	1+
BCBM-02	Gehirn	WT	WT	2+
BCBM-03	Gehirn	LOSS	WT	0
BCBM-04	Gehirn	LOSS	WT	2+
BCBM-05	Gehirn	LOSS	WT	2+
BCBM-06	Gehirn	LOSS	MUT	0
BCBM-07	Gehirn	LOSS	MUT	0
BCBM-08	Gehirn	WT	MUT	3+
BCBM-09	Gehirn	LOSS	WT	0
BCBM-10	Gehirn	WT	WT	2+
BCBM-11	Gehirn	LOSS	WT	3+
BCBM-12	Gehirn	WT	WT	0
BCBM-13	Gehirn	WT	WT	2+
BCBM-14	Gehirn	LOSS	WT	0
BCBM-15	Gehirn	WT	WT	3+
BCBM-16	Gehirn	WT	WT	2+
BCBM-17	Gehirn	-	WT	3+
BCBM-18	Gehirn	LOSS	-	2+
BCBM-19	Gehirn	WT	WT	0
BCBM-20	Gehirn	LOSS	WT	2+
BCBM-21	Gehirn	LOSS	WT	0
BCBM-22	Gehirn	-	WT	2+
BCBM-23	Gehirn	-	WT	2+
BCBM-24	Gehirn	-	MUT	3+
BCBM-26	Gehirn	WT	MUT	0
BCBM-27	Gehirn	-	-	2+
BCBM-28	Gehirn	-	-	2+
BCBM-29	Gehirn	-	-	2+
BCBM-31	Gehirn	-	-	1+
BCOM-01	Andere	-	-	-
BCOM-02	Andere	WT	-	0
BCOM-03	Andere	LOSS	WT	3+
BCOM-04	Andere	LOSS	WT	3+
BCOM-05	Andere	LOSS	WT	0
BCOM-06	Andere	LOSS	-	2+
BCOM-07	Knochen	-	-	0
BCOM-08	Knochen	-	-	3+
BCOM-09	Knochen	-	-	1+
BCOM-10	Knochen	-	-	3+
BCOM-11	Knochen	-	-	1+
BCOM-12	Knochen	-	-	3+
BCOM-13	Knochen	-	-	3+
BCOM-14	Knochen	-	-	2+
BCOM-15	Knochen	-	-	2+

# Abkürzungsverzeichnis

Δ	delta
°C	Temperatur (Grad Celsius)
AI	allelische Imbalanz (Allelic Imbalance)
AKT	Proteinkinase B
Amp	Ampicillin
AMP	Amplifikation
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BCBM	Gehirnmetastasen des Mammakarzinoms (breast cancer brain metastases)
BCOM	Mammakarzinommetastasen in andere Organe als dem Gehirn (breast cancer other metastases)
bp	Basenpaar ( <i>base pair</i> )
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
с.	Lokalisation in der CDS
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CDS	codierende Sequenz
CEP	Zentromersonde (centromere probe)
CGH	komparative genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization)
Chr	Chromosom
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Con	Konversion (conversion)
Cot-1	
Ct	Schwellenwert-Zyklus (threshold cycle)
СТС	zirkulierende Tumorzelle (circulating tumor cell)
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
del	Deletion
de novo	"zum ersten Mal"
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DFS	rezidivfreies Überleben ( <i>disease-free survival</i> )
dH2O	deionisiertes Nuklease-freies Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNase	Deoxyribonuklease
ddNTP	Didesoxynukleotid-Analoga
dNTP	Desoxynukleotid
DTC	disseminierte Tumorzellen (disseminated tumor cells)
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Extinktion
ECL	Enhanced Chemiluminescence Substrate
E. coli	Eschericia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylen diamin tetraacetic acid)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGFR	EGF Rezeptor
EGFRvIII	EGFR-Transkriptvariante
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
et al.	"und andere" ( <i>et alii</i> )
EtOH	Ethanol
evtl.	Eventuell
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBS	fötales Rinderserum (fetal bovine serum)
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet (formalin-fixed paraffin-embedded)
FI	Fluoreszenzintensität
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung
G	Differenzierungsstufen (Grading)
g	Gramm
g.	Lokalisation in der genomischen Sequenz
GRM	Gilopiastoma multiforme
GFP	grun fluoreszierendes Protein
n	Stunde
HE	Hamatoxyiin / EOSIN
	numaner epidermaler wachstumstaktor kezeptor 2
	nexacinioriertes FAIVI Nochleistungsflüssigkeitesbromstossankis /kisk naufaussanka /ka /d. ta sus ta sus k. )
HPLC	nochieistungsnussigkeitschromatographie (nign perjormance liquia chromatography)

HR	Hormonrezeptor
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IFNγ	Interferon gamma
IHC	Immunhistochemie
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
in situ	"am Ort"
in vitro	im Glas"
in vivo	"im Lebendigen"
IAG-1	innand 1
	Kaliumchlorid / Kalziumchlorid
	Lilei Luria Portani
LB	
LOgZ	Logarithmus zur Basis z
IVI	Molar
m	Steigung
mA	Milliampère
МАРК	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MET	mesenchymale-epitheliale Transition
min	Minute
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger</i> RNA)
MTT	Tetrazoliumbromid
MUT	Mutante
Ν	Normal
n	Anzahl
NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
NTC	Negativkontrolle (non-target control)
OD	ontische Dichte
05	Gesamtüberleben (overall survival)
n	nhosnhorvliert
p n	Lokalisation in der Proteinsequenz
p. DAGE	Polyacrulamidgololoktrophoroso
PAGE	roiyaci ylannugelelekti ophorese
pan	gesdiil
PBS	Phosphatgeputterte Salziosung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
РІЗК	Phosphoinositol-3-Kinase
PIK3CA	katalytische Untereinheit von PI3K
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
рН	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
рМ	Status der Fernmetastasen
pN	Status der Lymphknoten-Metastasen (Node)
p-Wert	Wahrscheinlichkeit (probability)
qPCR	quantitative Realtime-PCR
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RPLPO	große Untereinheit der ribosomalen RNA (ribosomal protein, large, PO)
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezentortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkrintase-PCR
SDS	Natriumdodecvlsulfat
505	Sakunda
chPNA	short hairpin PNA
	Short huli pin KNA
SINP	entite sedium citrate
SSC	some sourin citrate
STAT	signal transauter and activator of transcription
рі таг	rumorausaennung
TB	I errific Broth
TBS	I ris-buffered saline
TBS-T	TBS mit Tween-20
Template	zu untersuchene DNA-Vorlage
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TMA	Gewebe-Mikroarray (tissue microarray)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNBC	
INDC	triple-negatives Mammakarzinom (triple negative breast cancer)
TNFα	triple-negatives Mammakarzinom (triple negative breast cancer) Tumornekrosefaktor alpha

TNM	Stadieneinteilung Tris/hydroxymethyl)aminemethan
U	Finheit (Unit)
UHR	universale humane Referenz mRNA
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
USA	United States of America
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumenanteil
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen (weight per volume)
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
хg	mehrfaches der Gravitation
z.B.	zum Beispiel

### Größentabelle

Faktor	Name	Symbol
10 <sup>-12</sup>	pico	р
10 <sup>-9</sup>	nano	n
10-6	micro	μ
10-3	milli	m
10 <sup>-2</sup>	centi	С
10 <sup>3</sup>	kilo	k
10 <sup>6</sup>	mega	М

## Aminosäurecodes

Name	Code	Symbol
Alanin	Ala	А
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	Ν
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	С
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	н
Isoleucin	lle	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	К
Metionin	Met	Μ
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	Р
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	т
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Bezeichnung <sup>1)</sup>	Sequenz (5' → 3')	Gen/ Region	T <sup>2)</sup> [ °C]	Amplikon [Bp]	Literatur	PCR <sup>4)</sup>
Sequenzierung der CD	S von PTEN, der Exone 17-22 von EGFR sowie d	er Exone 8-10	) und 19	-21 von PIK3C	A auf cDNA-E	bene
SeqEGFR TK_F1	CTCCTCTTGCTGCTGGTGGT	ECER	64	605	198	D/C
SeqEGFR TK_R1	GATTCCAATGCCATCCACTT	EGEK	04	095		P/3
SeqPIK3CA_F1	ACATTCCTGATCTTCCTCGTG	DIV2CA	FO	<b>F7F</b>	198	
SeqPIK3CA_R1	CATCTGGGCTACTTCATCTCTA	PIKSCA	20	575		101/17/5
SeqPIK3CA_F2	CGTGTGCCATTTGTTTTGAC	DIV2CA	FO	401	198	
SeqPIK3CA_R2	GGTCTTTGCCTGCTGAGAGT	PIK3CA	58	431	150	IVI/P/S
PTEN CDS_F1	TCCATCCTGCAGAAGAAGC	DTEN	62	1750	198	D
PTEN CDS_R2	TCGGAAACCTCTCTTAGCC	PTEN	62	1/50	150	P
SeqPTEN_F1	TCAAGAGGATGGATTCGACTT	DTEN	-		198	C
SeqPTEN_R1	AGCATCTTGTTCTGTTTGTGG	PTEN	-	-	150	2
SeqPTEN_F2	AGTTCCCTCAGCCGTTACC	DTEN	-		198	S
SeqPTEN_R2	TGGCTTTGTCTTTATTTGCTTTG	PIEN	-	-	150	P/S
Sequenzierung der ger Ebene	nomischen Sequenz der Exone 9 und 20 des PIK	3CA-Gens so	wie der	Exone 3-6 des	PTEN-Gens a	uf DNA-
SeqPIK3CA Ex9_F	GTGAATCCAGAGGGGAAAAA				198	/ . / .
SeqPIK3CA Ex9_R	TGAGATCAGCCAAATTCAG	PI3K	54	261	301	M/P/S
SeqPIK3CA Ex20_F	CAGGAGATGTGTTACAAGGC	51014			201	
SeqPIK3CA Ex20_R	GTGCAATTCCTATGCAATCG	PI3K	54	361	301	M/P/S
PTEN Ex3_F	ATGTTTGTGAGGGTCGAATG		60	700	302	M/P
PTEN Ex3_R	GGACTTCTTGACTTAATCGGTTTAG	PTEN	60	/26	302	M/P/S
PTEN Ex3_F2	CCATAGAAGGGGTATTTGTTGG		-	-	198	S
PTEN Ex4_F	TTGAAAAAGGTGATCGTTGG	DTEN	60		202	Р
PTEN Ex4_R	ATTGTTATGACAGTAAGATACAGTCTATCG	PTEN	60	698	302	P/S
PTEN SeqEx4_F	GGGGTGATAACAGTATCTACTTAATAG	PTEN	-	-	302	S
PTEN Ex5_F	GACCTATGCTACCAGTCCGTA	DTEN	60	1025	302	M/P
PTEN Ex5 P1_R	ATGATATGAAAATGGTAGCGTG	PTEN	60	1036	302	M/P
PTEN SeqEx5_F	ATGCAACATTTCTAAAGTTACCTAC	DTEN	60		302	S
PTEN Ex5 P2_R	CACCTCAATAAAACTGAAGGAAAAA	PTEN	PTEN 60		302	S
PTEN Ex6_F	AATGTATATATGTTCTTAAATGGCTACGA	PTEN	60	40.4	302	P/S
PTEN Exon6 P1_R	TCATAAATATAATTTGGCTTCGACTAC	DTEN	60	484	302	Р
PTEN Exon6 P2_R	TGTTCCAATACATGGAAGGATG	PIEN	-	-	302	S
Mutationsanalyse der	EGFR CDS auf die vIII-Deletionsvariante					
SeqEGFR vIII_F2	CTTCGGGGAGCAGCGATGCGAC	FGFR		8 1044 (WT), 243 (vIII)	198	D
SeqEGFR vIII_R2	ACCAATACCTATTCCGTTACAC	LOIN	50			5

#### 9.2 Oligonukleotide

1) F: Forward-Primer (sense); R: Reverse-Primer (antisense); F2/R2 zweites Primer Set

2) T: Annealingtemperatur
3) D: Deletion, M: Multiplex, P: Präsequenzierung, Q: qPCR, S: Sequenzierung

Bezeichnung <sup>1)</sup>	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3') <sup>2)</sup>	Gen/ Region	T <sup>3)</sup> [ °C]	Amplikon [Bp]	Literatur	PCR <sup>4)</sup>
SYBR green-Assay	basierte quantitative Analyse der Genkopienanzahlen i	m EGFR-Gen				
QEGFR_F	TCTGCATTCCTGCCGAGTTC	FOED	50	04	303	0
QEGFR_R	GCAGTCTCCACTCCATGCTCA	EGFK	58	94	505	Q
Umklonierung der	PTEN CDS bzw. von shRNA-Sequenzen in LeGO-Vektore	n				
PTEN_EcoRI_F	ctga <u>GAATTCCCACC</u> atgacagccatcatcaaag				Eigene	S
PTEN_Notl_R	$gcgcatcg\underline{CTCGAG}tcagacttttgtaatttgtgtatgc$	Lego-Ig2	56	1121	Eigene	S
TRC005_F	gcgcctag <u>TCTAGA</u> cattatcgtttcagacccacc		57	280	Eigene	S
TRC005_R	gcgcctag <u>GTCGAC</u> gccatttgtctcaagatcaa <u>GAATTC</u>	Ledo-d/Fulo	57	560	Eigene	S
Kontrolle der Ligat	ion der PTEN CDS- bzw. der shRNA-Sequenzen mittels S	equenzierung				
LeGO-iG2_F	AAAGAGCTCACAACCCCTCA					S
LeGO-iG2_R	CCAAAAGACGGCAATATGGT	LeGO-iG2	-	1437	Eigene	S
LeGO-G/Puro_F	GGTACAGTGCAGGGGAAAGA			650	<b>-</b>	S
LeGO-G/Puro_R	GCCGCTTAAGCTTGGAACC	Lego-G/Puro	-	650-	Eigene	S
SYBR green-Assay basierte quantitative Analyse der PTEN-Genexpression						
PTEN prom_F	TGCTGCAGGAAGCTTGAACAC	DTEN	<b>C A</b>	110	<b>5</b> '	
PTEN prom_R	CACCATCCAGGATCTGTCTGC	PIEN	<del>0</del> 4	119	Eigene	
RT-RPLP0-F	ACCCAGCTCTGGAGAAACTGC		EO	72	Figono	
RT-RPLPO-R	TGAGGTCCTCCTTGGTGAACA	NFLPU	50	12	EIRGUE	

F: Forward-Primer (sense); R: Reverse-Primer (antisense)
 unterstrichene Abschnitte: eingefügte zusätzliche Sequenzen (add-on)

3) T: Annealingtemperatur
4) D: Deletion, M: Multiplex, P: Präsequenzierung, Q: qPCR, S: Sequenzierung

#### 9.3 Verwendete shRNA-Sequenzen

Bezeichnung	ID	Sequenz (5' → 3')*	Spezies	Target	Region
shPTEN1	TRCN0000219043	CTCCTCTTGCTGCTGGTGGT	Homo sapiens	PTEN	c.5217 (3'UTR)
shPTEN2	TRCN0000230371	GATTCCAATGCCATCCACTT	Homo sapiens	PTEN	c.4405 (3'UTR)
shNTC	SHC002	ACATTCCTGATCTTCCTCGTG	Homo sapiens	keines	-
Name	Spezies	Marker	Expression	Verwendung	
----------------------------	--------------	---------------------------------------	--	--	
pCDNA3.1/PTEN	Eukaryotisch	-	PTEN CDS	Ursprungsvektor zur Überexpres- sion von PTEN	
LeGO-iG2	Lentiviral	eGFP	-	Leervektor zur cDNA-Expression, Negativkontrolle im Über- expressionsversuch	
LeGO-iG2/PTEN	Lentiviral	eGFP	PTEN CDS	Etablierung von Modelsystemen mit stabiler PTEN-Überexpression	
piZs2puro++tTKRAB	Lentiviral	ZsGreen, Tetracyclin, Puromycin	-	Leervektor zur induzierbaren cDNA-Expression, Negativkontrol- le im Überexpressionsversuch	
piZs2puro++tTKRAB_ PTEN	Lentiviral	ZsGreen, Tetracyclin, Puromycin	PTEN CDS	Etablierung von Modelsystemen mit induzierbarer PTEN- Überexpression	
pLKO_TRC005/shPTEN1	Lentiviral	Puromycin	shRNA-PTEN1 (gegen die PTEN- mRNA gerichtet )	Ursprungsvektor zum stabilen Knockdown von PTEN	
pLKO_TRC005/shPTEN2	Lentiviral	Puromycin	shRNA-PTEN1 (gegen die PTEN- mRNA gerichtet)	Ursprungsvektor zum stabilen Knockdown von PTEN	
pLKO_TRC005/shNTC	Lentiviral	Puromycin	shRNA gegen keine humane oder murine	Ursprungsvektor für die Negativ- kontrolle im Knockdownversuch	
LeGO-G/Puro+	Lentiviral	eGFP, Puro- mycin	-	Leervektor zur shRNA-Expression	
LeGO-G/Puro+/shPTEN1	Lentiviral	eGFP, Puro- mycin	shRNA-PTEN1	Etablierung von Modelsystemen mit PTEN-Knockdown	
LeGO-G/Puro+/shPTEN2	Lentiviral	eGFP, Puro- mycin	shRNA-PTEN2	Etablierung von Modelsystemen mit PTEN-Knockdown	
LeGO-G/Puro+/shNTC	Lentiviral	eGFP, Puro- mycin	shRNA-NTC	Negativkontrolle im Knockdown- versuch	
psPAX2	Lentiviral	-	lentivirale Verpackungsproteine	Herstellung von Viren	
pMD2.G	Lentiviral	-	lentivirale Hüllproteine	Herstellung von Viren	

## 9.4 Verwendete Plasmide



## Überexpressionsvektoren





#### 9.5 Chemikalien

### Chemikalien und Bioreagenzien

Chemikalien und Bioreagenzien	Hersteller/Vertreiber
AB-Serum	Biotest AG, Dreieich
Aceton	J.T. Baker, Deventer Niederlande
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bactoagar	BD Medical, Le Pont de Claix, Frankreich
Bacto <sup>™</sup> Yeast Extract	BD Medical. Le Pont de Claix. Frankreich
Bactotrypton	BD Medical, Le Pont de Claix, Frankreich
B-Mercaptoethanol	Merck. Darmstadt
Borsäure (H3BO3)	Sigma-Aldrich. Deisenhofen
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck. Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Citratpuffer (pH 6) (10x)	Dako, Glostrup Dänemark
Dako REAL™ Antibody Diluent	Dako, Glostrup Dänemark
Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution	Dako, Glostrup Dänemark
DAKO Blocking Solution	Dako, Glostrup Dänemark
Desaxynukleosidtrinhosnhat-Set	Roche Mannheim
Destransulfat	Sigma-Aldrich Deisenhofen
Diethylprocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Deisenhofen
di-Kaliumbydrogennboshat (K-HPO-)	Merck Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva Heidelberg
di-Natriumbydrogennboshat-Dibydrat (Na-PO, v 2 H-O)	Merck Darmstadt
DMEM/E12 Medium (ohne Phenolrot)	Gibco BRI Life Technologies Eggenstein
DMEM/112 Medium	DAA Laboratorios CmbH, Dasching Östorroich
Desayunucleoside Trinhoshate Set	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Desucynucleoside mphosinate set	Clontech Moutainview CA LISA
d ITEs (Spoktrum orango)	Abbett Laboratorios Abbett Bark II, LISA
EDTA (Diothylon diamin totraossigsäuro)	Sigma Aldrich Doisonhofon
ECE	Miltonyi Piotoc, Pargisch Gladhach
LOF Eosin G Lösung (0.5%, wässrig)	Carl Both CmbH. Karlsruho
Eosin G-Losung (0,5%, wassing)	Marck Darmstadt
Essigsaule (90%) Ethanol (Molekularhiologia abs.)	Sigma Aldrich St. Louis USA
	Malter CMD CmbH Kiel
Ethidiumhromid	Sigma Aldrich St. Louis USA
Ethilandiamintetrascotat (EDTA)	Sigma Aldrich, St. Louis USA
	O Kindler Cmbl. Freiburg
Eukill Eatal Bouing Sorum Mucanlay	D. A. Laboratorios CmbH. Dassbing Österreich
Field Bovine Serum Nycopiex	PAA Laboratories Gribh, Pasching Osterreich
FISH Elizyille Reugelit	Marabuwarka CmbH&Co. Tamm
Fixoguili Farmaldahud (27%)	Marabuwerke Gilbhaco., Tallill
Formanid	Merck, Darmstaut
Formatinu	Signid-Alunch, St. Louis USA
diyterini Hämatovulin	Merck, Darnislau
Heredimethring bromide (NOE)	BD BIOSCIETICES, HEIDEIDETg
Hexaalmetinne bromiae (295%)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
	Cierce Aldrich Deisenhofen
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Insuin Interference	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Interferon y	R&D Systems, Minneapolis, Min, USA
Isopropanoi (2-Propanoi)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LUMINOI	Sigma-Aldrich, Deisenhöfen
Kanumeniorid (KCI)	ivierok Eurolab, Darmstadt
kallumdinydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Nerck, Darmstadt
Kallumnydrogenphosphat (K2HPO4)	Merck Eurolab, Darmstadt
	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
L-Glutamine (200mM) (100x)	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
MEM, High Glucose, High Sodium Bicarbonate Medium	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Mayer's-Hämatoxylinlösung	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol	J.T. Baker, Deventer Niederlande

Methylenblau Milchpulver Natriumacetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) Natriumchlorid (NaCl) Natriumdihydrogenphosphatdihydrat (Na(HPO4)<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O) Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) Natronlauge (NaOH) Nonidet P-40 Nuklease-freies Wasser Opti-MEM<sup>®</sup> Medium Paraformaldehyd (PFA) PBS, Dulbecco's p-Cumarsäure Penicillin Streptomycin (10.000 U/ml) Pepsin Pferdeserum Proteinase K-Lösung **Protogel**® Puromycin **RPMI 1640-Medium** Salzsäure (HCI) Seakem LE Agarose Sodiumdodecylsulfat (SDS) Sodium-Pyruvat Spot-Light Tissue Heat Pretreatment Tetramethylethylendiamin Tumornekrosefaktor α Toluidinblau Triton X100 Trizma Base Trypanblaulösung (0,4%) Trypsin-EDTA-Lösung (25%) Tween-20 Vectashield® Mounting Medium with DAPI Xylene (Xylol) <u>Xylen</u>cyanol FF

### Sigma-Aldrich, Deisenhofen Carl Roth GmbH, Karlsruhe Merck, Darmstadt Carl Roth GmbH, Karlsruhe Merck Eurolab, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Qiagen, Hilden Life Technologies GmbH, Darmstadt Merck, Darmstadt Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein Sigma-Aldrich, Deisenhofen Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein Zymed, Berlin Sigma-Aldrich, Deisenhofen Serva, Heidelberg National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich Merck, Darmstadt Lonza, Rockland USA Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein Zymed, Berlin Carl Roth GmbH, Karlsruhe R&D Systems, Minneapolis, MN, USA Sigma-Aldrich, Deisenhofen Sigma-Aldrich, St. Louis USA Sigma-Aldrich, St. Louis USA Sigma-Aldrich, St. Louis USA Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein Merck, Darmstadt Vector Laboratories, Burlingame USA J.T. Baker, Deventer Niederlande

## 9.6 Kit-Systeme

#### Verwendete käufliche Systeme (Kits)

Agarose GelExtract Mini Kit AmpliTaq Gold Kit BigDye® Terminator v.1.1. Cycle Sequencing Ready Reaction Kit BioPrime DNA Labeling System Bio-Spin 30 Tris Columns DAKO REAL<sup>™</sup> Detection System DAKO REAL<sup>™</sup> EnVision<sup>™</sup> Detection System First Strand cDNA Synthesis Kit INNUPREP DNA Mikrokit Maxima® SYBR Green/Rox qPCR Master Mix NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up NucleoSpin® RNA II PathVysion HER-2 DNA Probe Kit II QIAGEN<sup>®</sup> Large-Construct Kit QIAmp<sup>®</sup> DNA Micro / Mini Kit Qiaprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit QIAshredder PCRExtract Mini Kit RNeasy<sup>®</sup> Micro / Mini Kit Whole Blood Erythrocyte Lysing Kit

### Hersteller/Vertreiber

Sigma-Aldrich, St. Louis USA

5Prime, Hamburg Applied Biosystems, Darmstadt Applied Biosystems, Darmstadt Invitrogen, Karlsruhe Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA Dako, Glostrup Dänemark Dako, Glostrup Dänemark Fermentas, St. Leon-Rot Analystik Jena, Jena Fermentas, St. Leon-Rot Macherey-Nagel, Düren Macherey-Nagel, Düren Macherey-Nagel, Düren Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden 5Prime, Hamburg Qiagen, Hilden R&D Systems, Minneapolis, USA

### 9.7 Geräte

#### Bezeichnung

Hersteller/Vertreiber

Allgemeine Laborgeräte Analysenwaage CPA224S-OCE Bio Imaging System, GeneGenius CO2-Zellkulturinkubator HERAcell® 150 Cryotom JUNG CM1800 Dampfkochtopf Decloaking Chamber™ Eisbereiter FM-120 DE Elektrophorese power supply consort e 143 Elektrophoresekammer ComPhor L Mini/Midi Filmentwickler Curix 60 FISH-Thermoblock, MJ Research PTC-200 Gefrierschrank -20 °C Gelkammer ComPor L Mini GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 Genetic Analyzer 3130 Gefriertruhe -80 °C, KLT 4785 **Gießstand Hoefer** Heizblock HBT 130 Hyperprocessor Laborautoklav Varioklav 75 S Magnetrührer MR 3000 Mastercycler gradient Mikrobiologische Sicherheitswerkbank HERAsafe® Mikrobiologischer Brutschrank, Function Line Mikrowelle 800 Minigelkammern Hoefer SE 250 PeaSTAR pH-Meter inoLab pH level 1 Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 200 µl, 1000 µl) **Pipetus** Präzisionswaage BP 610 Reinstwasser-System Ultra Clear

Rollmischer, Stuart SRT1 Scanner Epson 1680 Schlittenmikrotom SM2000 R Schüttler Semidry-Blotapparatur Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 Stickstoff-Gefrierbehälter LS 4800 Thermomixer comfort Vortex-Genie 2 Wärmeschrank, Tissue Drying Oven TDO 66 Wasserbad 1002 und 1003 Wasserbad HI 1210 Zählkammer, Neubauer improved

#### Zentrifugen und Zubehör

Zentrifuge 5417R Zentrifuge Biofuge fresco Zentrifuge Multifuge 3 S-R Zentrifuge Sorvall RC-5C Plus Zentrifuge Rotofix 32 Sartorius AG, Göttingen Syngene, Cambridge UK Thermo Fisher Scientific, Waltham USA Leica, Nussloch Biocare Medical, Concord USA Hoshizaki, Amsterdam, Niederlande Sigma-Aldrich, St. Louis USA Bioplastics, Landgraaf Niederlande AGFA HealthCare, Bonn Biozym, Hessisch Oldendorf Liebherr, Kirchdorf Bioplastics RV, Landgraaf, NL Applied Biosystem, Kalifornien USA Applied Biosystem, Kalifornien USA Kryotec-Kryosafe GmbH, Hamburg Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK HLC Biotech, Bovenden Amersham, Pharmacia Biotech, Freiburg H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim Heidolph, Schwabach Eppendorf AG, Hamburg Thermo Fisher Scientific, Waltham Heraeus Holding GmbH, Hanau Severin, Sundern Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen WTW, Weilheim Eppendorf AG, Hamburg Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt Sartorius AG, Göttingen SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel Bibby Sterilin, Staffordshire, UK EPSON Deutschland GmbH, Meerbusch Leica, Nussloch Heidolph Instruments GmbH, Schwabach Biorad, München Peqlab, Erlangen Taylor-Wharton, Theodore, USA Eppendorf AG, Hamburg Scientific Industries, Bohemia USA Medite, Burgdorf GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel Leica, Nussloch Optik Labor, Fried

Eppendorf AG, Hamburg Heraeus Holding GmbH, Hanau Heraeus Holding GmbH, Hanau Thermo Fisher Scientific, Waltham USA Hettich, Tuttlingen

Mikroskope und Zubehör		
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging, MetaSystem	Zeiss, Göttingen	
Filterblock DAPI: Set 01	Zeiss, Göttingen	
Filterblock Alexa Fluor 488: MC-2B	AHF Analysentechnik AG, Tübingen	
Filterblock Spektrum orange: MC-4	AHF Analysentechnik AG, Tübingen	
Filterblock Spektrum aqua: Aqua	AHF Analysentechnik AG, Tübingen	
10 x Objektiv: Fluar	Zeiss, Göttingen	
40 x Objektiv: Plan-Neofluar	Zeiss, Göttingen	
63 x Öl Objektiv: Plan-Neofluar	Zeiss, Göttingen	
100 x Öl Objektiv: Plan-Neofluar	Zeiss, Göttingen	
Software isis: in situ imaging system	Zeiss, Göttingen	
Fluoreszenzmikroskop DM LB	Leica, Nussloch	
10 x Objektiv: HC PL Fluotar 506505	Leica, Nussloch	
20 x Objektiv: HC PL Fluotar 506003	Leica, Nussloch	
40 x Objektiv: Pl Fluotar 506004	Leica, Nussloch	
100 x Öl Objektiv: PL Fluotar 506009	Leica, Nussloch	
Kamera: KAPPA DX 30 colour camera System	Kappa, Gleichen	
Kappa ImageBase Software	Kappa, Gleichen	
Lichtmikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss, Oberkochen	
Lichtmikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar	

## Eigene Veröffentlichungen

Kunz M, Driller KM, Hein M, Libnow S, <u>Hohensee I</u>, *et al*. Synthesis of thia-analogous indirubin N-Glycosides and their influence on melanoma cell growth and apoptosis. Chem Med Chem. 2010; 5(4):534-9.

## Aus dieser Dissertation hervorgegangene Veröffentlichungen:

Wikman H, Lamszus K, Detels N, Uslar L, Wrage M, Benner C, <u>Hohensee I</u>, Ylstra B, Eylmann K, Zapatka M, Sauter G, Kemming D, Glatzel M, Müller V, Westphal M, Pantel K. Relevance of PTEN loss in brain metastasis formation of breast cancer patients. Breast Cancer Res. 2012; 14(2):R49.

Hohensee I. et al. Frequent Genetic Alterations in EGFR and HER2 Driven Pathways in Breast Cancer Brain Metastases. Am J Pathol. 183, 83-95 (2013).

## Im Zusammenhang mit dieser Dissertation stehende Posterbeiträge:

Hohensee I. et al. Functional gene analysis by gene trap. Symposium des Exzellenzclusters Entzündungsforschung 2009, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schultz J, Bhattacharya A, <u>Hohensee I</u>. *et al.* Role of microRNA in melanoma metastasis. XXXVII. ADF-Jahrestagung 2010, Heidelberg

Hohensee I. et al. Involvement of EGFR and HER2 Pathway alterations in breast cancer brain metastases formation. Symposium des SFB850 - Control of Cell Motility in Development and Cancer 2013, Freiburg

**Hohensee I.** *et al.* Lamszus K, Riethdorf S, Glatzel M, Brandt B, Westphal M, Müller V, Pantel K, Wikman H. Involvement of EGFR and HER2 Pathway alterations in breast cancer brain metastases formation. ZEM Wissenschaftsklausur 2013, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

## Stipendien

Post-Doc Stelle aus dem Forschungsförderungsfonds der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg (November 2013-Oktober 2014)

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Haiju Wikman, die mir das interessante und aktuelle Thema in der Krebsforschung zur Verfügung gestellt hat. Ich möchte mich bei ihr auch für die intensive, gute und vertrauensvolle Betreuung der Arbeit bedanken. Ihr Wissen und die Bereitschaft dieses zu teilen sowie ihr Enthusiasmus haben mich auf sehr vielen Ebenen vorangebracht und ihre eigene Begeisterung für die Forschung hat mich stets motiviert.

Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können. Darüber hinaus bedanke ich mich bei ihm für die umfangreichen Erfahrungen, die ich im Rahmen meiner Arbeit sammeln durfte. Herrn Prof. Dr. Burmester und Prof. Dr. Schmidt-Rhaesa danke ich für ihre Bereitschaft in der Funktion als Dissertations- bzw. Disputationsgutachters aufzutreten sowie für die Übernahme des Vorsitzes der Disputation als Vertreter des Fachbereiches Zoologie.

Prof. Dr. Markus Glatzel, Prof. Dr. Kathrin Lamszus, Dr. Volkmar Müller und Prof. Dr. Guido Sauter danke ich für die Bereitstellung des Patientenmaterials und der Patientendaten. Prof. Dr. Markus Glatzel, Prof. Dr. Kathrin Lamszus sowie Dr. Alexander Schulte danke ich darüber hinaus für die gute Kooperation. Des Weiteren gebührt mein Dank Stefan Horn, Stefan Werner, Sönke Meyer-Staeckling und Natalia Bednarz-Knoll für die Hilfe und fachlichen Unterstützung bei der Durchführung der genmanipulatorischen Arbeiten, der qPCR- und des FISH-Analyse.

Ich danke meiner Familie für den Rückhalt während all dieser Jahre und besonders meinen Fischbrötchen Mädels Carina und Kristin für mentale Unterstützung, dir leider viel zu oft nur aus der Ferne kam. Noch ein extra Danke geht an meine Labormädels Annkathrin und die beiden Julias für kleine Aufmunterungen zwischendurch. Danke auch allen, die meine Arbeit Korrektur gelesen haben und mir viele Anregungen gaben. An euch alle ein herzliches Dankeschön! Dies richtet sich an alle alten Hasen, Neuzugänge und jene, die es woanders hin verschlagen hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Markus: ohne Deine grenzenlose Geduld und den wissenschaftlichen Austausch – vor allem während der Schreib- und Lernphase – und die mentale Unterstützung hätte ich das alles nicht geschafft! DU BIST DER FELS IN MEINER BRANDUNG.

Mein letzter und wohl auch wichtigster Dank geht an die Menschen, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben – den Patientinnen, die durch ihre Gewebeproben einen großen Beitrag zur Forschung tragen.

184

# **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 03.01.2014

Ina Hohensee