

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2189.

SZÉKELY BORBÁLA

**Sejt-, extracelluláris matrix-, rostrendszer változások szív- és érrendszeri és egyes
daganatos megbetegedésekben. Kísérletes és diagnosztikus pathomorfológiai
vizsgálatok
című program**

Programvezető: Dr. Schaff Zsuzsa, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Kulka Janina, egyetemi tanár

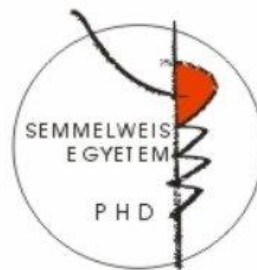
Primer emlőtumorok és távoli áttétek összehasonlítása

Doktori értekezés

Dr. Székely Borbála

Semmelweis Egyetem

Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kulka Janina, Ph.D., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Bittner Nóra, Ph.D., osztályvezető főorvos

Dr. Sági Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Bodoky György, Ph.D., egyetemi magántanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nagy Péter, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Lászik András, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2018

| | |
|--|----|
| TARTALOMJEGYZÉK | 2 |
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE | 5 |
| I. BEVEZETÉS | 6 |
| I.1 Rosszindulatú emlődaganatok | 6 |
| I.1.1 Epidemiológia | 6 |
| I.1.2 Diagnosztika | 6 |
| I.1.3 Patológia, prediktív és prognosztikus tényezők | 8 |
| I.1.4 Terápiás lehetőségek | 11 |
| I.1.5 Metasztatikus emlőrák - klinikai vonatkozások | 14 |
| I.1.6 Autopsziák | 16 |
| I.2 Az áttétképzés sajátosságai | 16 |
| I.2.1 Az áttétképzés mechanizmusa | 16 |
| I.2.2 Tumor heterogenitás | 17 |
| I.2.3 Metasztatikus emlőrák – a progresszió vizsgálata | 19 |
| II. CÉLKITŰZÉSEK | 23 |
| III. MÓDSZEREK | 24 |
| III.1 Betegek és minták | 24 |
| III.2 Immunhisztokémiai vizsgálatok | 25 |
| III.3 FISH | 26 |
| III.4 Makrodisszekció és nukleinsav kinyerés | 26 |
| III.5 Exom és célzott szekvencia analízis | 27 |
| IV. EREDMÉNYEK | 45 |

| | |
|---|-----|
| IV.A Immunhisztokémiai vizsgálatok | 45 |
| IV.A.1 Primer tumorok jellemzése | 47 |
| IV.A.2 Primer tumorok és távoli áttétek összehasonlítása | 49 |
| IV.A.3 Távoli áttétek | 52 |
| IV.A.4 Betegségmentes és teljes túlélés | 57 |
| IV.B Szomatikus mutációk és kópiaszám eltérések elemzése | 58 |
| IV.B.1 Betegek és jellegzetességeik | 58 |
| IV.B.2 Szomatikus mutációk és kópiaszám eltérések | 60 |
| IV.B.3 Filogenetikai rekonstrukció és metasztatikus progresszió | 60 |
| IV.B.4 Disszemináció metasztatikus prekursorokon keresztül | 67 |
| IV.B.5 Több szórási esemény a primer tumorból | 74 |
| IV.B.6 Ellenoldali emlőtumorok – metasztatikus depozitok? | 78 |
| IV.B.7 A genomikai eltérések evolúciója a progresszió során | 80 |
| V. MEGBESZÉLÉS | 84 |
| V.A Immunhisztokémiai vizsgálatok | 84 |
| V.B Nukleotid szintű vizsgálatok | 89 |
| VI. MEGÁLLAPÍTÁSOK | 96 |
| VI.A Immunhisztokémiai vizsgálatok | 96 |
| VI.B Nukleotid szintű vizsgálatok | 97 |
| VII. KÖVETKEZTETÉSEK | 99 |
| VIII. ÖSSZEFOGLALÁS | 101 |
| IX. ABSTRACT | 102 |
| X. IRODALOMJEGYZÉK | 103 |

| | | |
|-------|--|-----|
| XI. | SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A DISSZERTÁCIÓHOZ TARTOZÓ KÖZLEMÉNYEK) | 123 |
| XII. | SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (ADISSZERTÁCIÓTÓL FÜGGETLEN KÖZLEMÉNYEK) | 124 |
| XIII. | KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 128 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

AF (allélfrekvencia)

CNA (kópiaszám eltérés)

CCF (daganatsejt frakció)

DFS (betegségmentes túlélés)

DNS (dezoxiribonukleinsav)

ER (ösztrogén receptor)

HER2 (human epidermális növekedési faktor receptor)

HR (hormonreceptor)

IBC NST (nem specifikus típusú invazív emlőrák)

IHC (immunhisztokémia)

ILC (invazív lobuláris karcinóma)

NGS (következő generációs szekvenálás)

OS (teljes túlélés)

PFS (progressziómentes túlélés)

PR (progeszteron receptor)

SNP (egy pontos nukleotid polimorfizmus)

SNV (egy pontos nukleotid variáns)

TN (tripla negatív emlőrák)

VAF (variáns allél frekvencia)

WGS (teljes genom szekvenálás)

I. BEVEZETÉS

I.1 Rosszindulatú emlődaganatok

I.1.1 Epidemiológia

A fejlett világ női lakosságának körében a legnagyobb prevalenciájú malignus betegség az emlőrák, körülbelül minden nyolcadik nőt érinti. Magyarországon évente 5-6000 új esetet diagnosztizálnak és átlagosan 2000 nőt veszítünk el a betegség miatt. Hazánkban 2001-óta működik röntgen mammográfiás (rtg mmg) szervezett szűrés. Ez a panaszmentes, átlagos rizikójú, 45-65 év közötti hölgyek csoportját célozza, segítségével az emlőrákos mortalitás mintegy 40%-al csökkenthető az 50-69 éves korosztályban, míg a fals-pozitív biopsziák valószínűsége 1% alatti¹. A WHO követelményeknek megfelelő részvételi arány, mely mellett a szűrővizsgálat a legnagyobb hatékonyságú népegészségügyi szempontból, 70% körüli érték, azonban Magyarországon jelenleg az átlagos részvétel csak 50% körül mozog². Az EURO CARE-5 vizsgálat eredményei alapján Európában a korai emlőrákok (ekkor a diagnózis időpontjában nincsen kimutatható metasztázis) esetében az 5 éves teljes túlélés (overall survival, OS) 80% felett van, amennyiben a páciens az összes szükséges terápiás beavatkozáson átesik³. Ebben kiemelt szerepe van a fent már említett szűrővizsgálatoknak, valamint az egyre fejlődő terápiás eljárásoknak (kemoterápia, sebészi ellátás, sugárterápia, endokrin kezelés és egyéb célzott terápiák). Mindezek ellenére azonban a korai emlőrákkal valaha érintett páciensek mintegy 30%-ánál távoli áttétek alakulnak ki⁴.

I.1.2 Diagnosztika

A népegészségügyi elveknek megfelelően a fent leírtak szerint az emlőrák szűrése jellemzően röntgen mammográfiával (rtg mmg) történik, mely implantált emlők esetén is használható. Igazoltan jobb eredmények várhatóak a direkt digitális mammográfiától (szükség esetén tomosztézis vagy kontrasztanyag mmg is alkalmazható), melyet kiegészíthet ultrahangos (UH) vizsgálat. Fokozott rizikó (pl. BRCA génmutáció hordozása) esetén mágneses

rezonanciával (MRI) végzett szoros követés lehet indokolt. MR mammográfia használható okkult primer tumor keresésekor, illetve heg vs. helyi kiújulás elkülönítésére.

Tünetek, panaszok (csomó tapintása az emlőben illetve a hónaljban, váladékozás az emlőből, Paget-kór illetve gyulladásoos emlőrák tünetei) esetén első lépésként fizikális vizsgálat indokolt, melynek során az ellátó orvos áttapintja az emlőket és a lokális nyirokcsomó régiókat. Ezt követően rtg mmg és UH vizsgálat történik. A képalkotóval észlelt elváltozásokból célzott mintavétel történik, amely lehet vékonytűs (fine needle aspiration biopsy, FNAB) vagy vastagtűs (core biopszia). A citológiai vagy szövettani diagnózis határozza meg a további kivizsgálás és/vagy kezelés tervezését. Onkológiai terápiát (műtéti beavatkozás illetve szisztémás kezelés, sugárterápia) kizárólag pozitív biopsziás lelettel lehet elkezdni.

A rosszindulatú emlődaganat diagnózisát követően lényeges kérdés a betegség stádiumának meghatározása. Erre agresszív biológiai tulajdonságokkal rendelkező tumor esetén illetve előrehaladott stádiumban mellkas röntgen, hasi ultrahang illetve komputertomográfia (CT), pozitron emissziós tomográfia (PET) -CT⁵, MR vizsgálat ajánlható, a csontok vizsgálatára szcintigráfia javasolt⁶. A nemzetközi irányelvek alapján I-II stádiumú betegség esetén, tünet- és panaszmentes állapotban nem szükséges a távoli szervek vizsgálata.

A képalkotó eljárásoknak metasztatikus stádiumban is kiemelt szerepük van, a státuszrögzítésen kívül a daganatellenes kezelésre adott terápiás válasz monitorozásában alkalmazzuk őket. Ehhez a RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) kritériumrendszert használjuk. Ebben a válasz mértéke alapján megkülönböztetünk komplett remissziót (complete response, CR), parciális választ (partial response, PR), progresszív- (progressive disease, PD) és stabil betegséget (stable disease, SD)^{7,8}. Mivel immunterápiák alkalmazásakor jellegzetesen más kinetikájú lehet a kezelésre adott válasz (pszeudoprogesszió esetén a lézió nagyobbak látszik a fokozott immunsejtes beszűrődés miatt⁹), ilyen esetekben a RECIST módosított formája alkalmazandó¹⁰.

I.1.3 Patológia, prediktív és prognosztikus tényezők

Az emlőrák heterogén entitás, több különböző viselkedésű, klinikai lefolyású, prognózisú betegséget foglal magában. Az, hogy az adott páciens esetében milyen prognózisú betegséggel állunk szemben, a patológiai vizsgálat (szövettani altípus, immunhisztokémiai és genetikai eredmények) alapján már jó eséllyel körvonalazható.

Szövettani jellemzők

A rosszindulatú elváltozások egy korai formája, ami az invazív daganatokat tekintve daganatmegelőző állapotként is meghatározható, az in situ karcinóma, amikor a daganatsejtek preformált hámstruktúrákon belül terjednek. Az in situ duktális karcinóma gyakorisága a rtg mmmg-val szűrt populációban 20% körüli, ezzel szemben az in situ lobuláris karcinóma ritkán fedezhető fel szűrővizsgálattal – gyakori, hogy véletlen leletként kerül leírásra. Az invazív karcinómák 70-80%-a “nem speciális típusú” emlőrák (IBC NST), kb. 10%-ban fordul elő invazív lobuláris karcinóma, egyéb speciális típusok jóval ritkábbak¹¹. Az IBC NST heterogén típus, nagy változatosság figyelhető meg mind a tumorsejtekre, mind a daganatos stromára vonatkozóan.

A tumor differenciáltsága (grade) alapján 3 különböző csoportot különíthetünk el: grade I (jól differenciált, alacsony mitózisszám és a sejtmagok viszonylagos uniformitása jellemzi, jó prognózisú, általában idősebb korban fordul elő), grade II (közepesen differenciált, jellemzőbb a nukleáris polimorfizmus, közepes mitotikus hallam), grade III (kevésbé differenciált, jellegzetessége a nukleáris atípiá és a magas mitózis szám valamint az agresszívabb és rapidabb klinikai lefolyás)¹². Az ILC-k klasszikus altípusa differenciáltabb, általában idősebb életkorban jelentkező elváltozás, gyakrabban fordul elő bilaterálisan és multicentrikusan, mint az IBC NST-k. A klasszikus típus prognózisa jó, azonban a pleiomorf ILC-k kedvezőtlen prognózisú tumorok¹³. Az IBC NST-k jellemzően a májba, tüdőbe, csontokba, központi idegrendszerbe adnak távoli áttétet, míg az ILC-k esetében jellemző lokalizációk a fentiek mellett a gasztrointesztinalis traktus, hashártya és az agyhártya is¹⁴.

Immunfenotípusok

A nagymértékű heterogenitás miatt szükségesek további faktorok, melyek alapján az emlőtumorok hatékonyan osztályozhatóak. Megkülönböztetünk prognosztikus (a betegség terápia nélküli várható lefolyására, prognózisára utaló) és prediktív (a használt készítménynél várható terápiás válasz mértékére utaló) faktorokat. Ezek alapján megbecsülhető, hogy az adott páciensnél milyen klinikai viselkedésű betegséggel állunk szemben, milyen terápiás lehetőségek jönnek szóba és ezektől körülbelül milyen terápiás eredményt várhatunk. A mindennapi gyakorlatban ez immunhisztokémiai, illetve *in situ* hibridizációs (ISH) vizsgálatokkal meghatározható és viszonylag rövid idő alatt, költséghatékonyan értékes információt szolgáltat. Az ösztrogén receptor (ER) és progeszteron receptor (PR) pozitív tumorokat összességében jobb prognózis jellemzi, az ezen receptorokat célzó készítmények voltak az első célzott terápiák az emlőrák gyógyszeres kezelésének történetében¹⁵. A humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2) pozitívitas önmagában rosszabb prognózisú betegségre utal, azonban a receptort célzó terápiák bevezetése óta ezen betegek prognózisa körülbelül hasonló a HER2 negatív esetekéhez¹⁶.

A Ki67 a mitotikus aktivitást jellemző index, mely az osztódó tumorsejtek arányára utal. Két, nagy betegszámú metaanalízis eredményei alapján is független prognosztikai faktornak bizonyult korai emlőrákban a Ki67 index annak ellenére, hogy a klinikai vizsgálatok mind felépítésükben, mind a Ki67 index meghatározására használt módszerek tekintetében igen heterogének voltak^{17,18}. Mindezek ellenére azonban a Ki67 index prognosztikai markerként való használata a klinikai gyakorlatban ellentmondásos kérdés és az ASCO (American Society of Clinical Oncology) tumor marker szakértői panelje nem javasolja a proliferációs markerek használatát a prognózis meghatározásában¹⁹.

A mindennapi diagnosztikában jelenleg használatos altípusokba történő beosztások alapja a hormonreceptor és HER2 státusz, valamint a proliferációs aktivitást jellemző Ki67 LI. Ezek alapján a tumorok Luminalis-A (ER+, PR+, HER2-, alacsony Ki67 index); HER2 negatív Luminalis-B (ER+, HER2-, és legalább az egyik az alábbiak közül: PR- vagy alacsony, $\geq 20\%$ Ki67 LI); HER2 pozitív Luminalis-B (ER+, HER2+ bármilyen Ki67 LI és bármilyen PR értékkel), HER2 pozitív (ER-, PR-, HER2+ bármilyen Ki67 LI értékkel) és tripla negatív,

azaz TN (ER-, PR- és HER2- bármilyen Ki67 LI értékkel) csoportokra oszthatóak²⁰. Az egyes alcsoportok klinikai viselkedése és agresszivitása, valamint a rendelkezésre álló terápiás lehetőségek is igen különbözőek^{21,22}. A Luminalis-A daganatok jó prognózisúak, mivel azonban jellemzően kevés osztódó sejtet tartalmaznak, a citosztatikus terápiák itt kevésbé hatékonyak, míg az endokrin kezelés szerepe nagy. A Luminalis-B tumorok prognózisa rosszabb, azonban a kemoterápiára érzékenyebbek. A TN daganatoknál szisztémás terápiaként jelenleg egyedül a kemoterápia használható, melyre ezek az elváltozások zömmel jól is reagálnak. Emellett számos, egyéb támadáspontú kezelés (immun-ellenőrzőpont gátlók, androgén receptor útvonalat célzó készítmények) áll tesztelés alatt klinikai vizsgálatokban²³, melyekhez nagy reményeket fűznek. A HER2 molekula azonosítása és a célzott terápiák (trastuzumab, lapatinib, neratinib, pertuzumab) bevezetése forradalmi áttörést hozott az onkológiában^{16,24-27}.

A fenti faktorok vizsgálata kiemelten fontos a terápiás döntések meghozatala előtt, hiszen logikusan merül fel a kérdés, hogy metasztatikus stádiumban, különösen hosszú betegségmentes túlélés (disease free survival, DFS) esetén változik-e a betegség profilja. A gondolat már több évtizeddel ezelőtt felmerült²⁸, azóta különböző esetszámokkal és megválaszolandó kérdésekkel, a vizsgálatokat eltérő módszerekkel végezve születtek ezzel kapcsolatos tanulmányok. A legtöbb vizsgálat egy távoli áttétet hasonlított össze a primer tumorról, csak kevés kutatásban végeztek szélesebb körű összehasonlítást²⁹. A legnagyobb mértékű különbséget a PR esetén találta a vizsgálatok többsége (20-50%), míg a HER2 státusz bizonyult a legstabilabbnak (13% körüli értékekkel). Az ER változása a primer tumorok és a metasztázisok között a kettő közé esik (10-30%)³⁰⁻³².

Egy, a közelmúltban azonosított prediktív és prognosztikai faktor a peritumoralis immunsejtes beszűrődés, mely elsősorban a TN emlőtumorokban jellemző, azoknak mintegy 30-60%-ában található meg³³⁻³⁵. Ezen tumoroknak mind kemoterápia alkalmazása esetén, mind anélkül jobb a prognózisuk, mint az azonos szövettanú, TIL (tumor infiltráló limfocita) negatív elváltozásoknak. Az onkológiában több indikációban is (malignus melanoma, tüdőrák) forradalmi előrelépést hozott az immunterápiák bevezetése. Jelenleg emlőrákban is számos, immun-ellenőrzőpont gátlókat tesztelő neoadjuváns és adjuváns klinikai vizsgálat

van folyamatban²³, melyek leginkább a Programmed cell Death receptor Ligand 1 (PD-L1) expressziót használják prediktív markerként^{36,37}.

Stádium

A betegség stádiuma igen nagy hatással van a páciensek túlélési esélyeire, az 5 éves relatív túlélés 95%, 85%, 70%, 52%, 48%, és 18% az I, IIA, IIB, IIIA, IIIB és IV stádiumban diagnosztizált betegek esetében, egyenként³⁸. A stádium meghatározásának alapja a primer tumor mérete, a régióális nyirokcsomók érintettsége illetve a távoli áttétek jelenléte.³⁹

I.1.4 Terápiás lehetőségek

Az emlőrák kezelése multidiszciplináris megközelítést igényel, melynek három fő alappilére a szisztémás (gyógyszeres) kezelés, sebészi beavatkozás és a sugárterápia.

Szisztémás kezelés

A gyógyszeres kezelésnek több típusa van; a citosztatikumok vagy más néven kemoterápiás szerek a gyorsan osztódó sejteket célozzák és eliminálják. Hatásmechanizmusuk alapján több csoportjuk van; antimetabolitok, DNS-t támadó hatóanyagok, topoizomeráz-gátlók, mitotikus orsóra ható szerek. Elsőként a CMF (ciklofoszfamid, methotrexat és 5-fluorouracil) kezelést alkalmazták⁴⁰, majd a paletta folyamatosan bővült a különböző hatóanyagokkal. Az antraciklinek (A) és a taxánok (T) a 80-as, 90-es évek fordulóján kerültek a figyelem középpontjába⁴¹, jelenleg ezeket kombinációban alkalmazva adható a leghatékonyabbnak tartott kemoterápia emlőrákban. Elsősorban a neoadjuváns és az adjuváns fázisban kerül alkalmazásra a dózisdenz AC-T (adriamycin+ciklofoszfamid – paclitaxel) formában, ekkor az AC-t kétheti, a T-t heti adagolásban alkalmazzuk a legjobb terápiás válasz elérése érdekében. Hatékonyak a tumorsejtekkel szemben, azonban mivel a szervezet összes gyorsan

osztódó sejtjére azonos hatással vannak, jellegzetes mellékhatás profillal (hányinger, hányás, hasmenés, alopecia, szájnyalvákhartya afták) rendelkeznek. Lényeges szerepük van a célzott terápiáknak, melyek közül a legrégebb óta alkalmazott az endokrin kezelés emlőrákban. Ezt adjuvánsan, legalább 5 éven keresztül alkalmazva a tamoxifen és az aromatáz inhibitorok is jelentősen megnövelték az ER+ betegek túlélését, valamint igazolódott, hogy a kezelés további 5 évvel való meghosszabbítása még tovább javítja a prognózist⁴²⁻⁴⁴. Az emlőrákok 15-20%-ában detektálható a HER2 fehérje overexpressziója illetve a gén amplifikációja²⁴, az elsőként alkalmazott hatékony célzott kezelés a HER2 fehérje extracelluláris doménjét gátló monoklonális antitest, a trastuzumab volt. Ez hatékonynak bizonyult metasztatikus stádiumban²⁵, adjuvánsan¹⁶ majd neoadjuvánsan²⁶ is, eredményességét a pertuzumabbal való kiegészítés még tovább javította²⁷. A BRCA-mutációt csírvonalban hordozó páciensek esetében használhatóak a poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP)-inhibitorok^{45,46} valamint különösen hatékonyak a platina alapú terápiák⁴⁷. A TN betegségben az immunterápiák bevezetése hozhat érdemi előrelépést a közeljövőben. Az eddigi vizsgálatok eredményei bizakodásra adnak okot⁴⁸⁻⁵⁰, és számtalan vizsgálat van jelenleg is folyamatban.

Attól függően, hogy a szisztémás kezelés a betegség mely szakaszában kerül alkalmazásra beszélhetünk neoadjuváns (korai stádiumú betegségben a műtéti beavatkozást megelőzően), adjuváns (korai stádiumban a primer tumor eltávolítását követően) majd első illetve többedvonalbeli kezelésről (előrehaladott stádiumban, távoli áttétek mellett). A korai stádiumú TN és HER2 pozitív elváltozások esetében igen nagy jelentőséggel bír a **neoadjuváns** kemoterápia, mivel komplett patológiai remisszió (pathological complete response, pCR) esetén ezeknél a betegeknél jó túlélési eredmények várhatóak DFS és teljes túlélés (overall survival, OS) tekintetében egyaránt⁵¹.

Emiatt minden olyan korai emlőrákban szenvedő beteget, akinél kemoterápiát tervezünk, érdemes a műtét előtt kezelni, mivel nagyon értékes prognosztikai információhoz juthatunk⁵¹. Kemoterápiát követően a műtéti anyagban jelenlévő reziduális betegség esetén a páciens prognózisa rosszabb, azonban bizonyos vizsgálatok eredményei alapján ezen némiképp tudunk javítani: az eddigi eredmények alapján az adjuvánsan alkalmazott capecitabin kezelés eredményes lehet, különösen a TN csoportban⁵². Az **adjuváns** kezelés

celja a mikrometasztázisok eliminálása és ilyen módon az áttétes stádium kialakulásának megelőzése. A metasztatikus stádiumban adott kezelés célja a **palliáció**, a betegség tüneteinek csökkentése, a beteg életének meghosszabbítása kielégítő életminőség mellett. Az onkológiai kezelésnek minden esetben személyre szabottnak kell lennie, a betegség prediktív és prognosztikai faktorait, a páciens komorbid státuszát mind figyelembe kell venni a kezelések kiválasztásakor⁵³.

Sebészi ellátás

A korai emlőrákoknál a sebészi beavatkozás kuratív célú. Az onkológiai alapelvek betartása mellett igen lényeges az onkoplasztikai ajánlások követése. Minden esetben törekszünk az emlő megtartására, amennyiben ez nem veszélyezteti a páciens túlélési esélyeit és kozmetikailag elfogadható eredményt ad. Korai, klinikailag negatív axilláris státuszú betegek esetében rutinná vált az őrszem nyirokcsomó eltávolítás, csökken az axilláris blokkdisszekciók száma, mivel sugárterápiás beavatkozásokkal általában megoldható az axilláris nyirokrégió kontrollja⁵⁴. A lokális recidívák és szoliter távoli áttétek esetében is szerepet kaphat a rezekció.

Sugárterápia

A sugárterápia célja korai emlőrákban a betegség lokorégióális kontrollja, a műtétet követően esetlegesen még jelenlévő tumorsejt csoportok eradikálása. Ezzel mind a lokális recidívák aránya, mind a DFS és OS is megnövelhető⁵⁵. Lokálisan előrehaladott emlőrákban, mellkasfali érintettség esetén a szisztémás kezelés mellett a radioterápia is a neoadjuváns kezelés része lehet. Fontos szerepe van a távoli áttétek terápiájában is, gyakran alkalmazzuk csontérintettség esetén fájdalomcsillapítás céljából⁵⁶, valamint központi idegrendszeri terjedés esetén. Multiplex agyi áttétek jelentkezésekor részleges vagy teljes agyi besugárzás (WBRT – whole brain radiation treatment), kisebb számú áttét esetén műtét illetve gamma kés, sztereotaxiás sugársebészet alkalmazható^{57,58}.

I.1.5 Metasztatikus emlőrák – klinikai vonatkozások

A korai emlőrakkal kezelt páciensek mintegy harmadában jelentkeznek később távoli áttétek⁴. TN tumorok esetén ennek a diagnózist követő első két évben a legnagyobb az esélye, míg luminalis daganatoknál sok évvel a primer tumor detektálását követően is előfordulhat. Bár a szűrővizsgálatok megjelenése miatt az emlődaganatok többségét korai stádiumban fedezik fel, a páciensek egy részében már metastatikus stádiumban kerül sor a diagnózisra. Az, hogy ilyen esetekben mennyire van létjogosultsága a **primer tumor eltávolításának**, ez milyen módon változtatja a betegek progressziómentes túlélését (progression free survival, PFS) valamint az OS-t, fontos kérdés. A hipotézis, mely szerint a sebészi beavatkozás esetén a relapszus esélye megnő, két fő elemre támaszkodik; angiogén hullám kialakulása az antiangiogén faktorok eltávolítása miatt, illetve a növekedési faktorok felszabadulása a sebgyógyulási folyamat következtében⁵⁹. Erre utalt egy állatmodellel dolgozó vizsgálat, melyben a primer tumor eltávolítását követően a kísérleti állat tüdőáttétei rapidan nőni kezdtek⁶⁰. Ezzel szemben állnak a humán vizsgálatok eredményei. Neuman és mtsai retrospektív vizsgálatukban trendszerű összefüggést tapasztaltak, mely szerint a lokális kezelés javította a túlélést, a korreláció az ER+, HER2- páciensek esetében volt a legerősebb⁶¹. Babiera és mtsai ugyancsak retrospektív anyagot feldolgozva találtak szignifikánsan jobb PFS-t, és trendszerű OS javulást az operált betegek esetén azokhoz viszonyítva, akiknél nem történt meg a primer tumor eltávolítása⁶².

A **távoli áttétek műtéti ellátásának** kérdése hasonlóan összetett probléma. Többszörös szervi érintettség esetén az egyetlen eszköz, mellyel érdemi javulást érhetünk el a beteg állapotában, a szisztémás terápia. Ekkora műtéti beavatkozással járó fizikai terhelés illetve a műtét előtt és után szükséges szisztémás kezelés felfüggesztése együttesen a progresszió felé sodorhatja a beteget. Szoliter illetve kis számú áttétek esetén, azaz **oligometasztatikus stádiumban** (oligometastatic breast cancer, OMBC) azonban lehet helye a daganat eltávolításának, ennek eldöntése minden esetben egyéni mérlegelést igényel. Rendelkezésre álló adatok alapján a páciensek egy része, akik OMBC-ben agresszív kezelésben részesülnek, hosszú időre tünetmentessé tehetőek⁶³⁻⁶⁵.

Az egyre több hatékony **szisztémás terápiának** köszönhetően az emlőrák áttétes stádiumban is kezelhető és az esetek többségében kielégítő életminőség mellett hosszabb ideig kordában tartható. Az, hogy a páciens milyen hosszú ideig tudjuk kezelni a metasztatikus stádiumban, függ a betegség kiterjedtségétől, a páciens teljesítmény státuszától illetve a rendelkezésre álló hatékony terápiás beavatkozási lehetőségek számától. Jellemzően a “drug-holiday” időszakoktól (amikor a páciens kérésére vagy a régóta fennálló SD miatt egy időre felfüggesztjük az aktív kezelést) eltekintve a betegeknek folyamatosan szükségük van kezelésre, mellyel remisszió illetve stabil betegség érhető el. Az esetek döntő többségében azonban egy idő után (minél későbbi vonalban kap a beteg egy bizonyos új hatóanyagot, annál rövidebb progressziómentes időszakra számíthatunk) a használt hatóanyagokkal szemben rezisztencia alakul ki. Ennek háttérében a daganatos klónok szelekciója áll - ez rávilágít arra, hogy egy daganatos betegség mindig egy dinamikusan változó közeg. Ennek ellenére biopszia vétele, melynek vizsgálata hozzájárul a leghatékonyabb terápia kiválasztásához, a legtöbb esetben csak a metasztatikus betegség diagnózisakor történik. Érthetően a “primum non nocere” (mindenekelőtt, ne árts) Hippokráteszi alapelv betartása miatt nem végzünk mintavételt minden egyes terápia váltásnál illetve minden áttétes lokalizációból, holott ebből addicionális információt nyerhetnénk. A jövőben erre a problémára a liquid biopsziák alkalmazása jelenthet megoldást, amikor is a vérből történik tumor DNS izolálás, mellyel jól közelíthető a betegség progressziója, az egyes kezelésekre adott válasz⁶⁶. Ez jelenleg rutinszerűen még nem alkalmazott, ma szinte kizárólag a szöveti biopsziás minták állnak rendelkezésre a daganatos betegségek progressziójának tanulmányozására, melyek azonban jellemzően csak diagnosztikai célra elegendő mennyiségű szövetet tartalmaznak.

I.1.6 Autopsziák

Az autopsziák szerepe korábban igen nagy volt, amennyiben nélkülözhetetlen módon és óriási mértékben járultak hozzá az orvostudomány fejlődéséhez. Azonban a megszerzett tudás (pontos anatómiai ismeretek) és az egyre fejlettebb diagnosztikus technikák megjelenése miatt szerepük egyre csökken, jelenleg viszonylag kis számban történik kórboncolás. Holott autopsziák biztosítanak lehetőséget arra, hogy több érintett szervből, nagyobb mennyiségű minta álljon rendelkezésünkre. Nem kísérleti körülmények között (tudományos kutatás miatt végzett rapid autopsziák) az igazságügyi kórboncoláson kívül számos országban csak kevés körülmény indokolja az autopszia elvégzését; a halál pontos okának tisztázása, a betegség különleges, szokatlanul agresszív, váratlan lefolyása. Emiatt a jelen tanulmányban elemzett szövettani minták egyedülállóak, kevés hasonló szövetgyűjtemény ismert a világon^{32,67}.

I.2 Az áttétképzés sajátosságai

I.2.1 Az áttétképzés mechanizmusa

Sokat vizsgált kérdés az onkológiában az áttétképzés mechanizmusa, annak megértése, hogy milyen módon válnak képessé a primer daganatot alkotó sejtek távoli áttétek létrehozására, miért és milyen faktorok hatására illetve közvetítésével alakul ki bizonyos esetekben az áttétes stádium minden lehetséges terápiás beavatkozás ellenére. Hasonlóan fontos kérdések, hogy hogyan változnak az egyes daganatok a betegség progressziója során, miben és mennyire különböznek az áttétek a primer tumortól illetve egymástól, mennyire kapunk reális képet az egész szervezetet érintő betegségről egy távoli áttétből vett minta vizsgálatával.

A daganatsejtek folyamatosan versengenek az oxigénért, tápanyagért és a helyért. Azon sejtek, melyek olyan mutációkat halmoznak fel, amelyek segítségével jobban tudnak alkalmazkodni a körülményekhez és sikeresebben élnek túl, többségbe kerülnek, ezt nevezzük klonális szelekciónak. Ismert, hogy a daganatos progresszió és az áttétképzés tulajdonképpen egy evolúciós folyamat⁶⁸, melybe a legjobb betekintést akkor kapjuk, amikor

nukleinsav szinten vizsgáljuk a kérdést. Ennek megfelelően a primer tumorok és távoli áttétek vizsgálata is nagyot léphetett előre, mivel ezen új módszerek használatával elérhetővé vált a gyakorlat számára az elváltozások genetikai hátterének pontosabb ismerete, melynek segítségével közelebb kerülhetünk az áttétképzés folyamatának megértéséhez.

A metasztázis képzés egyik régebbi elmélete a **monoklonális szóródás**, mely szerint egy elszabadult tumorsejt klónból alakul ki a távoli áttét. Felmerül a kérdés, hogy vajon a daganatsejtek a primer tumorból elindulva, lineáris módon haladva hozzák-e létre egymás után a távoli áttéteket, vagy több, elágazó metasztatizálási folyamat indul a primer tumorból valamint a már meglévő távoli áttétekből is⁶⁹. Egyre több olyan kutatási eredmény jelenik meg, mely poliklonális áttétképzést detektált, az egyik elmélet szerint ekkor tumorsejt klaszterek jutnak el a távoli szervekbe⁷⁰⁻⁷². Monoklonális szóródást detektáltak ovarium, vesesejtes daganat és prosztaták esetekben^{68,71-73}. Valószínűsíthetően mindkét forma előfordul, azonban egyes betegekben és betegségekben eltérő hangsúllyal.

I.2.2 Tumor heterogenitás

Több munkacsoport vizsgálta a daganaton belüli *heterogenitás* kérdéskörét és ennek hatását a metasztázis képzésre genomikai analízis keretein belül^{74,75}. Shah és mtsai egy ILC-s beteg primer tumorát és egy metasztázisát elemezték, a DFS 9 év volt. A 32 non-szinoním mutáció közül, melyek az áttétben jelen voltak, 5 domináns volt, 6 kisebb frekvenciában, de jelen volt a korábban eltávolított primer tumorban. Ez az egyike volt az első olyan tanulmányoknak, mely megmutatta, hogy a mutációs heterogenitás az alacsony vagy közepes rizikójú emlőrákoknál is előfordul, és a beteg szignifikáns evolúción megy keresztül progressziója során⁷⁶.

Yachida és mtsai a daganatos progresszió első kvantitatív modelljét alkották meg hasnyálmirigy tumorok tanulmányozásával, definiálták az *alapító (founder) mutáció* fogalmát, mely a metasztatikus disszemináció alappilére⁷⁷. Hét, metasztatikus hasnyálmirigyrákban elhunyt betegnél végeztek rapid autopsziát; primer tumorokat, távoli áttéteket és az utóbbiakból létrehozott sejtvonalat illetve xenograft modellt (index minták)

elemeztek. Két típusú szomatikus mutációt detektáltak; (i) founder mutációk: az adott páciens minden egyes mintájában jelen voltak, ezek alkották a mutációk többségét (átlagosan az összes mutáció 64%-át), (ii) progresszor mutációk, melyek egy vagy több metasztázis mintában voltak jelen (átlagosan az összes mutáció 36%-át alkották). Ezek alapján osztották be az elváltozásokat 1. szülői clone – melyek csak founder mutációkat tartalmaztak, és 2. szubklónok, melyek mind szülői klónokat, mind progresszor klónokat tartalmazták. A szülői klónokban halmozódtak azok a mutációk, melyek a korábban primer daganatokban driverként azonosított géneket érintették pl. KRAS, TP53 és SMAD4. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a szomatikus szerzett mutációk egy nagyobb része az áttétek megjelenése előtt, a primer tumorban alakul ki. Emellett minden beteg esetében megalkották a daganat evolúciós térképét a szomatikus mutációk mintázata és az áttétek lokalizációja alapján. Ennek alapján, annak ellenére, hogy a szülői klón nagy számú mutációt hordozott, az áttétet képző klónban több progresszor mutáció is előfordult, emellett az áttétekben minden mutáció klonális (azaz az áttét közel minden egyes sejtjében azonosítható) volt. 2 beteg primer tumorának további vizsgálata során ezeknek fizikailag külön régióit elemezték. Ennek alapján azonosították az egyes szubklónokat, melyek a primer tumor különböző területein nonrandom módon helyezkedtek el, egyenként mintegy 100 millió sejtből álltak és hierarchikus sorrendbe voltak helyezhetőek a daganat evolúciójában a tumor progressziójának megfelelően. Kimutatták tehát, hogy a hasnyálmirigy tumor egymástól fizikailag távol levő, nagy sejtszámú szubklónokból áll, melyek jelen vannak a primer elváltozásban a távoli áttétek klinikai detektálhatósága előtt.

Brastianos és mtsai agyi áttéteket vizsgáltak, tüdő (n=38) emlő (n=21) és vesesejtes karcinomás (n=10) betegekben. Néhány esetükben több agyi áttét, több primer tumor illetve egyéb távoli áttétekből származó minta is rendelkezésre állt⁷⁸. Eredményeik szerint a betegek 53%-ában az agyi áttétben előfordultak olyan, potenciónalisán célozható eltérések, melyek a primer tumorban nem voltak detektálhatóak. Emellett az agyi áttétek relatíve homogén csoportot alkottak, jobban hasonlítottak egymásra, mint a primer tumorra. 4 betegnél állt rendelkezésre egyéb lokalizációjú távoli áttét, ezeket vizsgálva igen változatos képet kaptak; 2 esetben a nem agyi áttétekben hasonló mennyiségű vagy több privát mutáció fordult elő,

mint az agyi áttét trunkális vagy privát mutációi. A harmadik esetben a primer tumornál és a tüdőáttétnél leírtak common ancestor-t, azaz közös őst, mely magában foglalt olyan mutációkat, melyek az agyi áttétben nem voltak jelen. A negyedik esetben az agyi és a tüdőáttétben előfordult olyan közös ős, mely a primer tumorban nem volt detektálható. Emellett a keringő tumor DNS szubklonális privát mutációi szintjében bekövetkező változások korreláltak a különböző távoli áttétekben kialakuló terápiás válasszal. Ebben az egy betegben a távoli áttétekből vett biopsziák és a plazma minták elemzése alapján a keringő tumor DNS vizsgálatával lehetővé vált a multifokális klonális evolúció valós idejű tanulmányozása.

Campbell és mtsai tanulmányukban hasnyálmirigy daganatokat és azok távoli áttéteit vizsgálták, és leírták a *szervspecifikus távoli áttét képzést*; 13 betegnél rapid autopszia keretein belül történt a mintavétel, majd DNS szekvenálást végeztek⁷⁹. Eredményeik alapján a tüdő és a máj áttétek lényegesen különböztek egymástól, melynek hátterében az állhat, hogy más klón dominált a két lokalizációban; a filogenetikai fákön ábrázolva a tüdő és a hasi áttétek különböző ágakon helyezkedtek el. Erre kétféle magyarázattal szolgáltak a szerzők; 1. különböző genotípusok irányíthatják az áttétképzést a különböző szervekbe, azaz pl. a tüdőáttétek létrehozásához egy bizonyos addicionális driver mutáció szükséges, mely képessé teszi a sejteket a tüdőben való túlélésre. 2. A metasztatikus kaszkád egy lépésről lépésre történő folyamat, mely könnyebben zajlik egy szerv határain belül mint szervek között.

I.2.3 Metasztatikus emlőrák – a progresszió vizsgálata

Murtaza és mtsai is arra keresték a választ, hogy milyen mértékben monitorozható a betegség progressziója és a terápiás válasz a *keringő tumor DNS* vizsgálatával⁶⁶. Egy ER+, HER2+ metasztatikus emlőrákban szenvedő beteget követtek 3 éven keresztül többvonalbeli kezelés mellett. Ezidő alatt 8 tumor biopszia és 9 plazma mintavétel történt, majd teljes exom és célzott ampikon szekvenálást végeztek. A biopsziás mintákban azonosították a founder mutációkat, melyek minden elváltozásban jelen voltak (1 csoport), a progresszor mutációkat,

melyek csak az áttétekből vett biopsziákban voltak jelen (2 csoport) és privát mutációkat, melyek $\geq 2\%$ -os allélfrekvenciában (AF) voltak jelen egy vagy több tumor mintában (3-8 csoport). A plazma mintákban a founder mutációk voltak detektálhatóak legnagyobb számban, a metasztatikus mutációkat alacsonyabb számban azonosították. A lapatinib kezelés alatt nagyobb számban detektáltak olyan mutációkat, melyek specifikusak voltak a beteg mellkasfali áttétére, mely ezen célzott terápia mellett szignifikáns progressziót mutatott. Ilyen volt pl az ERBB4 tirozin kináz doménjén megjelenő (p.H809G) mutáció, mely lapatinib rezisztenciára jellemző és ez utóbbi áttét privát mutációja volt.

Ding és mtsai egy bazális típusú metasztatikus emlőrákban szenvedő beteget vizsgáltak, a primer tumorból, az abból készített xenograftból, az agyi áttétekből és perifériás vérből vett mintán végeztek teljes genom szekvenálást⁸⁰. A xenograft megőrizte a primer tumorban található mutációkat és emellett a távoli áttétben lévő eltérésekhez hasonlókat halmozott fel, mely arra utal, hogy a xenograftban és a betegben végbement genomika progresszió hasonló volt egymáshoz. A primer tumor kifejezetten heterogénnek bizonyult, ezzel szemben az agyi áttétekből és a xenograftból vett mintákban szűkült mutációs frekvenciát találtak. Ez arra utal, hogy a metasztázis képzéshez és transzplantációhoz olyan sejtek *kiszelektálódása* szükséges, melyek a primer tumor mutációs repertoárjának egy meghatározott altípus csoportját hordozzák. Emellett fontos megjegyezni, hogy ezek a genetikai változások igen valószínűsíthetően nem a terápiák következményeként alakultak ki, mivel a xenograft létrehozása a kezelések megkezdése előtt történt. Láthatóan további szomatikus mutációk, kópiaszám eltérések és egyéb strukturális variációk történnek a betegség előrehaladtával amellett, hogy a legtöbb mutáció, mely már a primer tumorban jelen van, az áttétekben is megtalálható, csak utóbbiakban nagyobb számban.

Cummings és mtsai az autopsziás minták immunhisztokémiai vizsgálata mellett 6 betegnél a primer tumoroknál és a távoli áttéteknél array-alapú komparatív genomikai hibridizációt végeztek³². A genetikai vizsgálatok alapján a DNS kópiaszámok tekintetében az azonos betegből származó távoli áttétek hasonlóak voltak egymáshoz és nagyobb mértékben különböztek a primer tumortól. A genomikai kópiaszám vizsgálat eredményei szerint a *klonális sokféleség* már a primer tumorra jellemző volt és nem a betegség disszeminációja

során alakult ki, ennek megfelelően független volt a kezelési eljárásoktól. Feltételezésük szerint ezen kópiaszám eltérések felruházhatják a tumort agresszívabb vonásokkal, valószínűleg azon keresztül, hogy felerősítik az egyes sejtek metasztatikus potenciálját, míg a progresszió és a távoli áttétekben történő kolonizáció során a tumor genomja viszonylag stabil maradt.

Juric és mtsai arra keresték a választ vizsgálatukban, hogy a tumor evolúciójára hatással van-e *szelekciós nyomással* a terápia hasonló módon, mint az a fertőző betegségeknél ismert⁸¹. Egy metasztatikus emlőrákban szenvedő beteg mintáit elemezték, akinél ismert volt aktiváló foszfatidilinozitol-4,5-bifoszfát 3-kináz (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, PIK3CA) mutáció. A beteg PI3K3CA-gátló (BYL719) kezelésben részesült, melyre tartós válasz alakult ki, majd rezisztencia jelentkezett, ezt követően a beteg rövid időn belül elhunyt. Rapid autopszia keretein belül mintát vettek a páciens 14 távoli áttétéből, majd teljes genom szekvenálás (whole genome sequencing, WGS) történt. A távoli áttéteknel foszfatáz és tenzin homológ (phosphatase and tensin homolog, PTEN) kópiaszám veszteséget találtak a terápia-naiv primer tumorhoz viszonyítva, és azon elváltozások, melyek rezisztenssé váltak a kezelésre egyéb PTEN eltéréseket, pl. deléciókat is felhalmoztak. Ezután célzott mély szekvenálást végeztek a primer tumoron és az összes rendelkezésre álló áttéten. Számos mutációt azonosítottak mindegyik elváltozásban, azonban voltak olyan eltérések, amik csak az áttétekben (az összesben vagy csak néhányban) fordultak elő. Az utóbbiak egyike volt pl. az ösztrogén receptor 1 (estrogen receptor 1, ESR1) Y537N mutáció, mely összefüggésbe hozható az endokrin kezeléssel szemben kialakult rezisztenciával, a vizsgált betegben valószínűsíthetően az első vonalban kapott endokrin kezelés következményeként alakult ki. Eredményeik arra utalnak, hogy minden áttét a PTEN vad típusú (wild type, WT) primer tumorból származott, emellett jelentkezett egy progresszív parallel PTEN veszteség a célzott terápia adása mellett.

Látható, hogy egyéb tumorokban több kutatás foglalkozott részletesen az áttétképzés mechanizmusával, azonban emlőrákok esetében továbbra is sok még a nyitott kérdés. A kérdés népegészségügyi és klinikai gyakorlati szempontból is igen lényeges, tekintve az

emlőrákos betegek nagy számát és a metasztatikus páciensek terápia váltásakor felmerülő döntési helyzeteket.

Munkacsoportunk egy korábbi munkában kimutatta, hogy gyakori az immunfenotípus változás az emlőtumorok távoli áttéteiben a primer tumorokhoz viszonyítva, melyet befolyásol többek között az is, hogy milyen típusú antitestet használunk.⁸²

II. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen vizsgálat célja az emlő primer tumorainak és azok távoli szervekbe adott áttéteinek összehasonlító elemzése. Vizsgálatunkban az áttétképződés folyamatának tanulmányozását, a metasztatizáló tumorok és áttétek részletes patológiai és genomikai vizsgálatát tűztük ki célul.

1. A távoli áttétet adó primer emlőtumorok jellemzése szöveti szinten: szövettani és immunfenotípus, differenciáltság. Megfigyelhetőek-e mintázatok az áttétek lokalizációja és a primer tumor altípusok között?
2. Megtartották-e a primer tumorok szövettani és immunhisztokémiai jellemzőiket az áttétekben? Miben különböztek a távoli áttétek a primer tumoroktól?
3. Az ugyanazon primer tumorból származó távoli áttétek között volt-e hasonlóság immunfenotípus szempontjából illetve genetikai szinten?
4. Megfigyelhető-e összefüggés a távoli áttétek megjelenése és a primer tumor diagnózisa között eltelt idő hossza (DFS) és az immunfenotípus változás között?
5. Van-e összefüggés a metasztázis lokalizációja és az immunfenotípus változás között?
6. Monoklonális vagy poliklonális típusú áttétképzés a jellemző a vizsgált emlődaganatokra?
7. Megfigyelhető-e összefüggés a túlélés hossza és a genetikai eltérések jellegzetességei között?
8. Előfordul-e metasztázisból metasztázisba történő szórás a vizsgált beteganyagban?
9. Kimutatható-e klonális kapcsolat a primer tumorok és a metakron ellenoldali emlőrákok között?

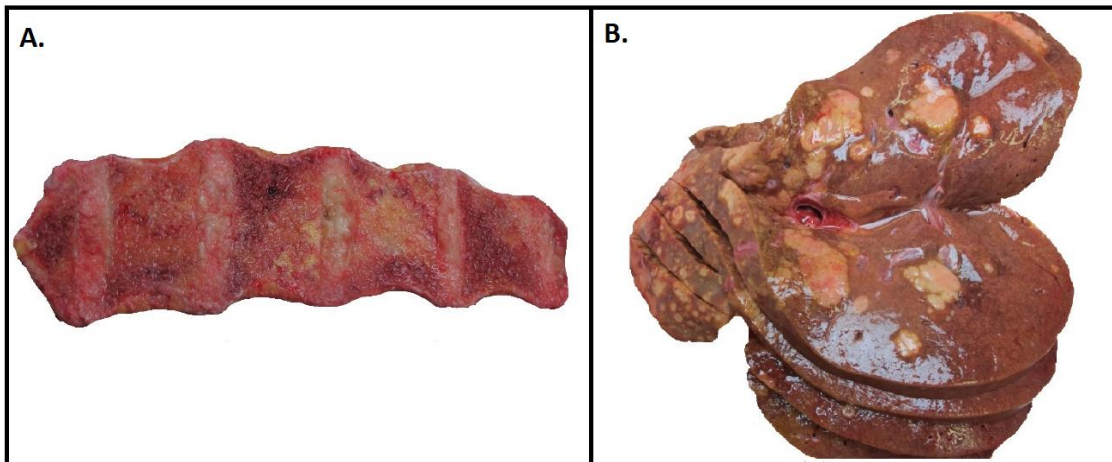
III. MÓDSZEREK

III.1 Betegek és minták:

Retrospektív vizsgálatunkban a Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézetének autopsziás adatbázisát tekintettük át az Intézeti Etikai Bizottság engedélyét követően (IKEB #185-1/2007). A vizsgálatban a rutin autopsziák, sebészeti beavatkozások és biopsziás mintavételek során nyert szövetmintákat használtuk fel. A 2001-2014 közötti időszakban összesen 97, metasztatikus emlőrákban elhunyt beteg autopsziája történt Intézetünkben, közülük 25 páciens felelt meg a beválasztási kritériumoknak: női nem, 18 év feletti életkor, primer invazív emlődaganat az anamnézisben, IV. stádiumú betegség, legalább egy távoli áttét jelenléte, melyből az autopszia során mintavétel történt, pontos klinikai információk a betegség lefolyásáról és kezeléséről, valamint elérhető minta a primer tumorból (amennyiben ez korábban műtéti úton került eltávolításra, illetve lehetőség szerint a betegség diagnózisakor illetve a terápia során progressziókor vett biopsziák, esetleges metasztazektomiás minták, valamint normál, azaz daganatmentes szövetminta). Az olyan pácienseket, akiknél egyéb malignus betegség is előfordult az anamnézisben, kizártuk a vizsgálatból. A primer tumorok diagnosztizálása 1991-2012 között történt. Azon betegeknél, akik neoadjuváns kemoterápiában részesültek, a diagnosztikus biopsziás mintát és a kezelést követően eltávolításra került sebészi rezekciós mintát is vizsgáltuk. Olyan pácienseknél, akik nem kaptak neoadjuváns kezelést, csak a sebészi rezekátumon végeztünk vizsgálatokat. Amennyiben a primer tumor nem került eltávolításra, a diagnosztikus biopsziát és az autopszia során vett mintát elemeztük.

18 beteg esetében találtunk utalást csontáttétre a klinikai dokumentációban, azonban csak 7 betegnél történt mintavétel a csontelváltozásból (1 páciensnél a terápia eredményeként komplett klinikai válasz alakult ki, 10 betegnél pedig a csont metasztázisokat nem detektálták az autopszia során). A klinikai információt (diagnózis ideje, életkor a diagnózis idején, terápias beavatkozások és szisztémás kezelés jellemzői, DFS és OS hossza) a Semmelweis Egyetem elektronikus adatbázisaiból nyertük.

A betegek halálának időpontja és az autopszia megkezdése között medián 70 óra telt el, mely idő alatt a kadávereket +4 °C-on tartották. Az autopsziák során komplett külső és belső vizsgálat történt. A egyes szervek méreteinek pontos meghatározását követően szövettani mintavétel történt a detektálható áttétes gócból, valamint a primer tumorból és regionális nyirokcsomókból, amennyiben ezek jelen voltak az autopszia idején (1. ábra). A szövetszövetminták fixálása 10%-os pufferolt formalinban történt, majd a minták paraffin blokkokba kerültek beágyazásra. A csontból nyert szövetek dekalifikációja a szöveti fehérjék antigenitásának megőrzése érdekében EDTA oldatban történt (0.5 mol/L, pH 6.9). A hematoxylin-eozin (HE) metszetek alapján határoztuk meg az invazív daganatsejtek százalékos arányát, a jelentős posztvitális károsodást szenvedett mintákat kizártuk a vizsgálatból. A primer tumorok stádiumát a TNM atlasz 7-ik kiadása alapján újra osztályoztuk³⁹.



1. ábra: Áttétek a csigolyákban (A) és a májban (B). (Saját felvétel, autopsziás minták).

III.2 Immunhisztokémiai vizsgálatok

A vizsgálatokat 4 µm vastagságú natívmetszeteken végeztük. Az immunhisztokémiai reakciókat automatizált Ventana Benchmark XT készülékekben végeztük (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) a gyártó utasításai alapján, a következő antitestek használatával: ER (SP1) (nyúl monoklonális antitest, Ventana #790-4324), PR (1E2) (nyúl monoklonális antitest, Ventana #790-2223), HER-2/neu (4B5) (Ventana #800-2996). A hormonreceptor (HR) státusz meghatározását az Allred/Quick pontozó rendszer alapján

végeztük, mely a pozitív daganatsejtek arányát és a reakció intenzitását is figyelembe vevszi⁸³. A proliferáció mértékére utaló Ki67 index meghatározásához a MIB1 (DAKO #M7240, Carpinteria, CA, USA) antitestet használtuk, az indexet a pozitív daganatsejtek/összes daganatsejt arányával adtuk meg. A HER2 státusz meghatározása a 2013-as ASCO/CAP irányelvek⁸⁴ alapján történt, azaz pozitívnak tekintettük a reakciót, amennyiben a sejtek több, mint 10%-ánál erős, komplett membránreakciót detektáltunk.

III.3 FISH

Az immunhisztokémiai reakcióval 2+-nek bizonyuló esetekben a HER2 génamplifikációs státusz meghatározására FISH vizsgálatot végeztünk (Poseidon Repeat-Free probes, Kreatech Diagnostics, #KBI-10735, Amsterdam, Hollandia). A mintákat először deparaffináltuk, majd feltárást végeztünk (10 perc, mikrohullámú sütő, VECTOR antigén feltáró), ezután pepszines emésztés történt (37°C, 15 perc, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Németország), majd dehidratáltuk és szárítottuk a mintát. Ezután overnight hibridizációt végeztünk, a minta lefedéséhez DAPI-t használtuk. A FISH reakciókat ugyancsak a 2013-as ASCO/CAP irányelvek alapján értékeltük; nem-aplifikáltak tekintettük, amennyiben a HER2/CE17 arány kisebb volt mint 1.8, ekvivokálisnak, ha a HER2/CE17 arány 1.8 és 2.2 között volt, és amplifikáltak, ha a HER2/CE17 arány nagyobb volt, mint 2.2.⁸⁴

Az emlőrák szubtípus kategóriákba a vizsgálat idején érvényes St. Gallen-i irányelveknek megfelelően osztottuk be az eseteket²².

III.4 Makrodisszekció és nukleinsav kinyerés

A HE festett metszetek vizsgálatakor meghatároztuk és rögzítettük minden egyes vizsgált minta esetében az invazív és in situ tumorsejtek, a stroma, a zsírsejtek, normál epitélium, normál alapszövet és TIL-ek arányát. Kijelöltük azokat a régiókat, melyek alkalmasak nukleinsav izolálásra, majd makrodisszekciót végeztünk (2. ábra) összesen 5 darab, egyenként 10µm vastagságú metszeten.



2. ábra: A DNS izoláláshoz használni kívánt, tumorszövetet tartalmazó régiók kijelölése a HE festett metszeteken a makrodisszekció elvégzése előtt. (Saját felvétel).

A kijelölt szövetdarabokat Eppendorf csövekbe helyeztük. A DNS izoláláshoz QIAamp DNA FFPE Tissue Kitet (Qiagen, #56404, Hilden, Németország) használtunk. A duplaszálú DNS (dsDNS) mennyiségét QUBIT 2.0 Fluorométerrel (Invitrogen) és PicoGreen® vizsgálattal határoztuk meg; azon mintákat használtuk további molekuláris elemzésre, melyek mindkét teszt alapján $>1\mu\text{g}$ dsDNS-t tartalmaztak.

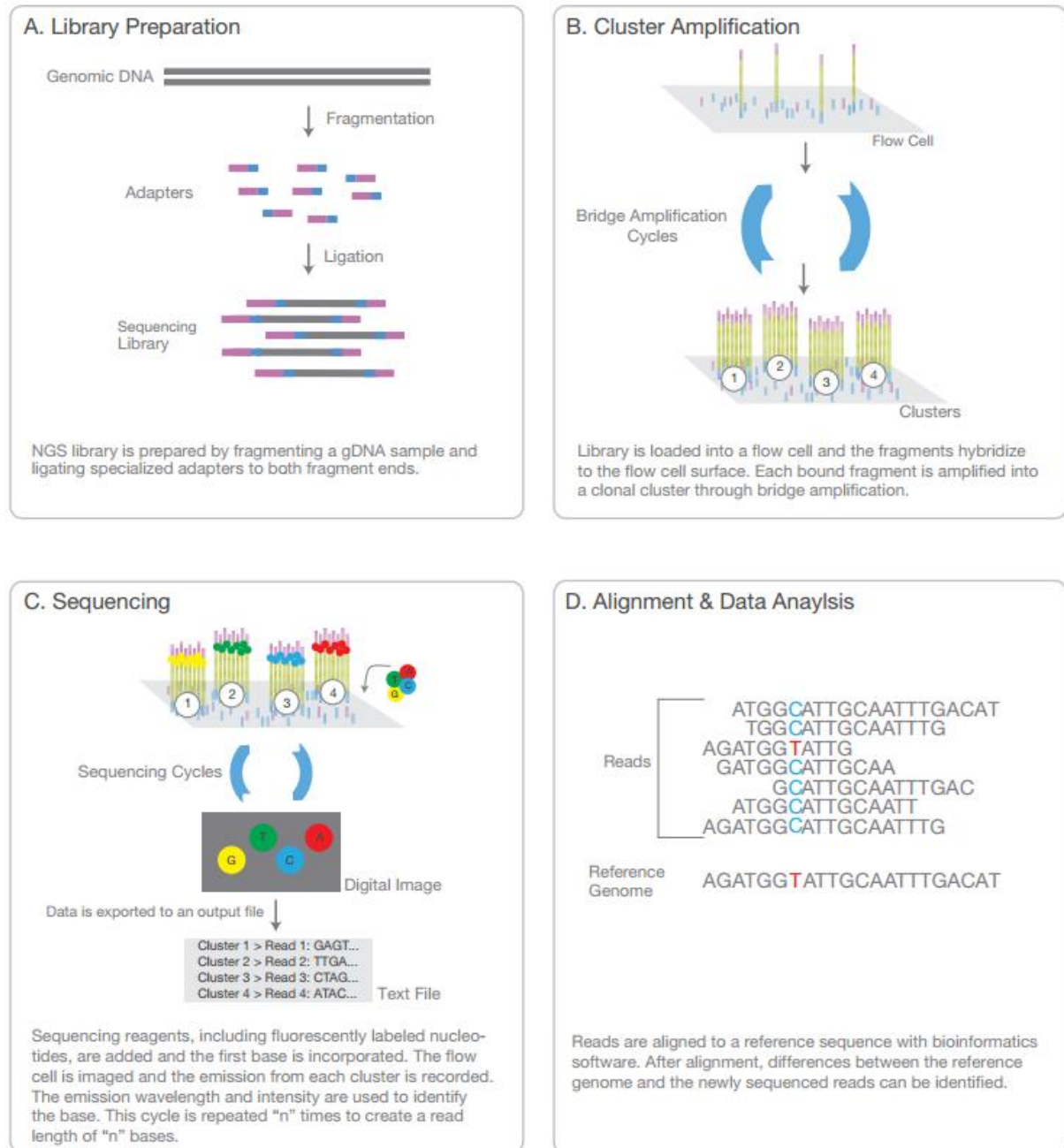
III.5 Exom és célzott szekvencia analízis

Teljes exom szekvenálás

Az exom a genomnak mindössze 1%-át teszi ki, azonban annak igen fontos része, a kódoló szakasz. A betegségeket okozó mutációk döntő többsége erre a régióra lokalizálódik.

Az elmúlt évtizedek egyik legnagyobb jelentőségű lépése az orvostudományban a genetikai információ egyre részletesebb feltérképezésének lehetősége, mely tulajdonképpen a DNS-szekvencia (a felépítő bázisok; adenin (A), citozin (C), guanin (G) és timidin (T) sorrendjének megismerése. Az 1970-es években fejlesztették ki a Sanger-féle láncterminációs (didezoxi-) szekvenálást⁸⁵, majd az ezredfordulón jelentek meg az új-generációs (next-generation sequencing, NGS) módszerek, melyekkel párhuzamosan több millió szekvencia képezhető le és nagy áteresztőképességűek (high throughput, HTP) emiatt mély szekvenálásnak (deep sequencing) is nevezik⁸⁶.

A kétdimenziós kromatográfia megjelenését követően (1970-es évek) a Sanger láncterminációs technika hozott áttörést 1977-ben⁸⁵, majd egy évtizeddel később jelentek meg az automatizált, kapilláris elektroforézissel (CE) működő technikák, melyek fontos szerepet kaptak a Human Genom Project megvalósításában⁸⁷. A rövidebb read-ekkel dolgozó, masszív paralell szekvenálási technika megreformálta a módszer lehetőségeit, ezt az új eljárást következő generációs szekvenálásnak (next-generation sequencing, NGS) nevezzük. Az első humán genom szekvenálása 15 évig tartott és költsége 3 milliárd dollár volt, ezzel szemben a ma használható technikákkal 45 humán genom szekvenálható egy nap alatt körülbelül 1000 dolláros darabonkénti költséggel. Alapvetően az NGS technikák hasonlóak a CE szekvenáláshoz; a DNS polimeráz katalizálja a fluoreszcens-jelölt dezoxiribonukleotid bázisok beépülését a templát szálba, minden ciklusban a beépülés pillanatában a nukleotidok azonosításra kerülnek a fluoreszcens “kisülés” detektálásával. A módszerrel kb 100 bázispár (bp) hosszúságú szakaszok kerülnek leírásra, egyszerre akár több milliós nagyságrendben (masszív paralell szekvenálás). Vizsgálatunkban az Illumina platformot használtuk, a folyamat 4 alaplépésre osztható. (3. ábra)



3. ábra: Az NGS kémiai alapjai.(forrás: [://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf](http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf))

A. Könyvtár készítés: A folyamat a DNS random fragmentációjával kezdődik, ezután 5' és 3' végek adapter ligációja történik. Ennek alternatívái azok az eljárások, melyek a

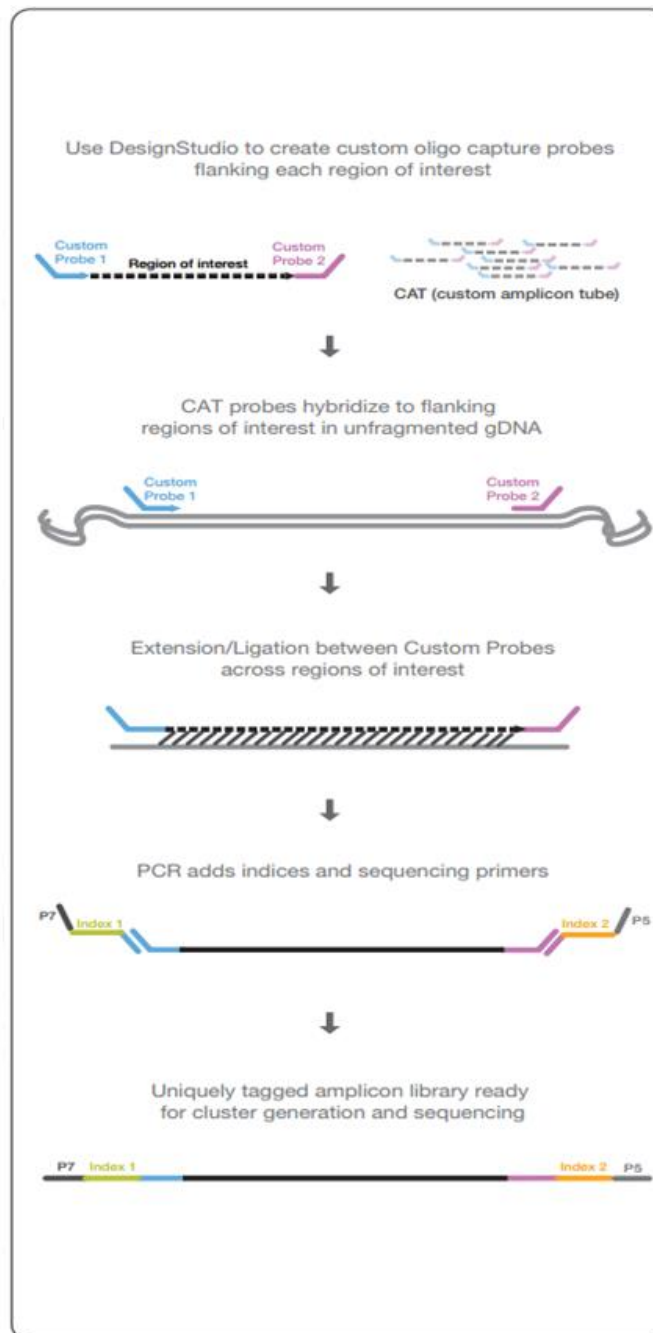
fragmentációs és a ligációs lépést ötvözik. Ezután a fragmentumok PCR amplifikációja és géltisztítása zajlik.

B. Híd-amplifikáció: A könyvtárat szekvenáló lemezre viszik fel, ahol a fragmentumok az adapterek segítségével a lemezhez kihorgonyozott, hozzájuk kompatibilis oligonukleotid primerekhez kötődnek. Ezután híd-amplifikáció történik, így minden fragmentum amplifikálódik miközben klaszterek alakulnak ki.

C. Szekvenálás: A templáthoz primert ligálnak, majd a reakcióhoz hozzáadják a négy, fluoreszcens molekulával jelölt nukleotidot (reverzibilis terminátorok). Az ezek beépülésekor keletkező fluoreszcens jelet detektálják, ezután a fluorofort lehasítják és a be nem épült bázisokat lemossák, majd a lépést egymás után többször elvégzik.

D. Adatok elemzése: az újonnan detektált bázis sorrendet a referencia genoméhoz hasonlítják, számos analízis végezhető (SNP és indel meghatározás stb).

Célzott amplicon reszekvenálás során, mellyel lényegesen nagyobb lefedettség biztosítható, a gének egy csoportja illetve a genom egy régiója kerül szekvenálásra. Általában teljes exom szekvenálást (WGS) követi a célzott amplicon reszekvenálás, mellyel ritka szomatikus mutációk is azonosíthatóak összetett minták esetén (a tanulmányunkban vizsgált minták is ez utóbbi csoportba tartoztak, mivel csíravonal DNS-el keveredő daganatos szöveteket elemeztünk). Az amplicon reszekvenálás során a vizsgálni kívánt régiók amplifikációja és tisztítása történik multiplex PCR oligoszettek segítségével. (4. ábra)



4. ábra: Az amplicon létrehozás folyamata.

Minden páciensnél a minták egy részét arra használtuk, hogy jelöljük az SNV-k (single nucleotid variant, egyponos nukleotid variáns) jelenlétét a teljes exom szekvenálással. Összesen 51 mintát szekvenáltunk (minden páciens esetében legalább egy normál mintát beleértve) 40x cél-lefedettséggel. A detektált szomatikus SNV-nek vélt elváltozásokat Sequenom MassARRAY-vel validáltuk mind a csírasejt referenciák, mind a daganatos minták esetében. További validációként minden egyes daganatos mintán célzott amplicon mély szekvenálást (a medián lefedettség 9000x volt) végeztünk, ennek célja a kezdeti szekvenálási eredmények igazolása és a variáns allél frekvenciák (VAF) pontosságának növelése volt. A teljes exom DNS könyvtárak létrehozása minimális változtatásoktól eltekintve a gyártói protokollnak megfelelően történt (Illumina TruSeq DNA library preparation kit v2). Az end-repair lépés előtt a mintákat 65°C-on inkubáltuk a reverzibilis keresztkötések eltávolítása érdekében, ezt követően a felesleges egyszálú DNS-t eltávolítottuk a rendszerből. A kétszálú DNS mennyiségét a PicoGreen eljárással határoztuk meg és ennek megfelelően szabályoztuk az adapterek koncentrációját. A könyvtár dúsítást 5-7 ciklus PCR-rel értük el, a teljes exom leolvasást az Illumina Human Exome capture kit használatával végeztük. A könyvtárakat HiSeq 2000 géppel szekvenáltuk, V3 lemez használatával 2x100 bp paired-end readeket hoztunk létre. A nyers adatokat a humán referencia genomhoz hasonlítottuk (NCBI37/hg19) a Burrows-Wheeler Aligner (BWA)⁸⁸ módszerrel, a sorba állított readeket a SAMtools⁸⁹ segítségével dolgoztuk fel és elemeztük tovább. A duplikátumként előforduló readeket a Picard módszer segítségével távolítottuk el. Bázis rekálibrációt, az indelek körüli újrendeződést és az SNV-k meghatározását a GenomeAnalysisToolKit (GATK)⁹⁰ használatával végeztük, az indelek meghatározásához a Dindel⁹¹ használtuk. A mutációkat a mapping minősége és a szekvenálási lefedettség alapján szűrtük, a szomatikus mutációk további szűrése az adott beteghez tartozó csíravonal referencia és további két adatbázis (1000 genom project⁹² és a dbSNP version 132⁹³) segítségével történt.

A célzott reszekvenáláshoz a primereket a Sequenom MassARRAY design szoftverével készítettük, az univerzális szekvencia jelöléseket manuálisan adtuk hozzá a rendszerhez. Azon ampliconokat, melyek a vizsgálni kívánt mutációkat tartalmazták PCR-rel hoztuk létre

(Roche FastStart High Fidelity PCR kit), majd a második PCR reakcióhoz az univerzális szekvenálási adaptereket is hozzáadtuk (Access Array Barcode) melyek tartalmaztak egy 10bp hosszúságú indexet. A létrejövő PCR végtermékeket összegyűjtöttük, denaturáltuk majd szekvenáltuk Illumina MiSeq eszközzel, 2x75 bázispár (bp) szekvenálási folyamatban V3 lemez használatával. A Fastq fileokat CASAVA segítségével hoztuk létre, a nyers adatokat a humán referencia genomhoz hasonlítottuk (NCBI37/hg19) BWA használatával, a variáns és referencia allélok leolvasása a GATK segítségével történt, ezeket aztán manuálisan ellenőriztük az Integrative Genomics Viewer (IGV) -ben⁹⁴.

Az egyponyos nukleotid variánsok (single nucleotid variant, SNV) szűrése

Az SNV-eket további analízishez 5-lépcsős eljárással szűrtük. (i.) Nulladik szintűnek tekintettük azokat az SNV-eket, melyek valamely mintán megjelentek, beleértve a csírvonal referenciákat is. (ii.) 1. szintűnek neveztük azokat az SNV-eket, melyeket a csírvonallal történő összehasonlítást követően szomatikusként azonosítottunk, (iii.) 2. szintű SNV-k az 1. szint alcsoportja, azok a mutációk, melyeket később a Sequenom MassARRAY-val validáltunk és confirmáltunk. (iv.) 3. szintű SNV-k: mutációk, melyeket a célzott ampikon reszekvenálás confirmált. Az FFPE minták fixálási sajátosságai miatt néhány lókuszon mind a négy bázist alacsony frekvenciában detektáltuk. Ahhoz, hogy a célzott szekvenálási kísérletek háttérzaj szintjét megállapítsuk, kiválasztottunk 25 bázispárt upstream és downstream a 2. szintű SNV-khez képest. Minden olyan adatpontot, mely több mint 10% non-referencia read-et tartalmazott, eltávolítottunk. Ezután összegyűjtöttük az adatokat minden mutáció típushoz (AT>CG, AR>GC, AT>TA, CG>AT, CG>GC és CG>TA), majd kiszámoltuk az átlagos háttérzajt és a standard deviációt (SD). Ezen becslésekből a legmagasabb megfigyelt érték 1.59% volt, így a konzervatív 3%-os értéket adtuk meg végleges határértéknek, mely felett egy mutációt valószínűsíthetünk.

Mivel vizsgálatunkban több minta tartozott ugyanazon beteghez, fontos volt a magas lefedettség, hogy jelenlevőnek deklarálhassunk egy mutációt egy mintában, illetve hiányzóknak egy másik mintában. Emiatt a 3. szintű SNV-kenél először szűrtük az összes SNV-

t az összes összetartozó (azaz egy betegből származó) mintában, hogy >1500x lefedettséget érjünk el és azokat a mintákat elemeztük tovább, melyeknél minimum 75%-ban detektációs arányunk volt. Ezután kizártuk az összes olyan SNV-t, mely >1 hiányzó értékkel bírt bármely összetartozó mintában. Ezután megfordítottuk a VAF-ok szűresi rendjét azzal, hogy először elimináltuk az SNV-eket, melyeket <3%-ban találtunk hiányzónak az összes összetartozó mintában azok közül, melyeket előzőleg megtartottunk. Néhány mintánál valószínűleg azért azonosítottunk jelenlévőnek kevesebb SNV-t, mert alacsonyabb CCF-el bírtak, azonban az alacsonyabb számú detektált mutáció is állhat a jelenség hátterében. Emiatt egy megengedőbb filtert alkalmaztunk, hogy kizárjuk a potenciálisan alacsony CCF-fel bíró mintákat azzal, hogy a >20% SNV-eket tekintettük valósnak. Néhány minta nagy számú SNV-vel rendelkezett vagy korlátozott mennyiségű DNS állt rendelkezésünkre már az induláskor. Ezen mintáknál végeztük el a Sequenom MassARRAY-vel való validációt és így az eltérések nem kerülhettek a 2. szintű SNV-k közé. Végül minden mintánál ahol az SNP array és célzott szekvenálás is elérhető volt, valamint a minta >30% CCF értéket mutatott az SNP array alapján, az SNV-eket 4. szintűnek neveztük.

Egypontos nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism, SNP) array analízis

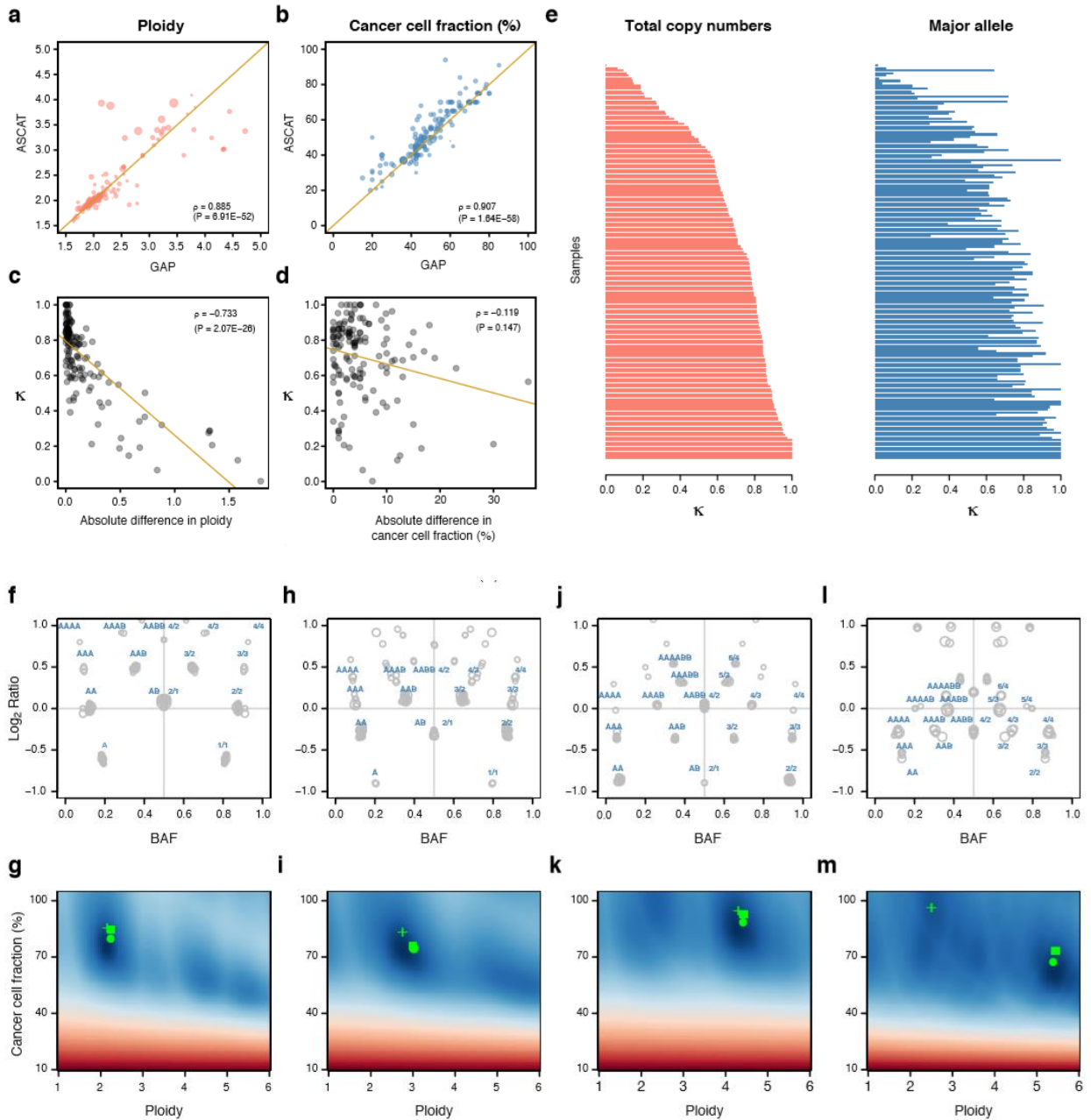
A kópiaszám eltérések (copy number aberrations, CNA) meghatározásához 64 mintát küldtünk el az Affymetrix Research Services Laboratóriumába. Az FFPE blokkokból származó normál és daganatos DNS minták genotipizálása az Affymetrix Oncoscan FFPE Express 2.0 teszttel történt. A rutin formalinos fixálás és paraffinba ágyazás gyakran károsítja a DNS-t és olyan módosulásokat hoz létre, melyeket hibásan CNA-ként értékelünk. Emiatt az SNP array-k minőségellenőrzési kontrolljához a Medián Abszolút Páros Deviáció (MAPD) és a Medián Auto Korreláció (MAC) log₂ arány intenzitásokat használtuk. A MAPD>0.7 és MAC>0.3 értékekkel rendelkező mintákat kihagytuk az elemzésből. Azon mintákat, melyeknél a B allél frekvencia (BAF) vizuális inspekcója alapján alacsony CCF-et valószínűsítettünk, megjelöltük és amennyiben a feldolgozást követően igazolódott, hogy <30% CCF-fel bírnak, kizártuk a további elemzésből. A megmaradó minták közül csak a

heterozigóta fenotípusú (AB) és neutrális kópiaszámú (2) normál mintákkal rendelkező mintákat elemeztük tovább. Az, hogy egy betegnek több mintája állt rendelkezésünkre, a töréspontok kikövetkeztetésében nyújtott segítséget, mely információt elveszthettünk volna a CCF-beli nagy variáció miatt. A közös töréspontok meghatározása a log₂ arány intenzitás és a BAF vizsgálatával, betegenként csoportosítva történt a multitrack PCF algoritmus használatával, az R package használatával⁹⁵. A γ penalty parametert (mely meghatározza a diszkontinuitásokat a log₂ arányban és a BEF trackban) minden páciensnél egyénileg lett meghatározva a szegmentációs profil vizuális inspekcója alapján. Végül minden szegmentet, melyek kevesebb, mint 3 SD távolságra voltak egymástól “egybeolvasztottunk” a szomszédaiikkal és együtt vizsgáltuk őket. A teljes kópiaszám és a major/fő allélok becslése a GAP⁹⁶ használatával történt. A GAP-pel kapott becsléseket két másik program, az ASCAT⁹⁷ és az ABSOLUTE⁹⁸ által megadottal is összehasonlítottuk.

A paramétereket minden programhoz alapértelmezett szinten tartottuk, amennyiben az ettől való eltérést külön nem jeleztük. Az ASCAT-nál a γ paraméter, mely a platform specifikus sűrítési arányt határozza meg, 0.8-as értékre volt beállítva. A program megállapít egy alapértelmezett becslést a ploiditásról és a CCF-ről, melyet a GAP-pel való összehasonlításban alkalmaztunk. Az ABSOLUTE-ot “total copy” módban használtuk. A genom non-klonális frakciójának a maximum értékét a végtelenben határoztuk meg, mivel így tudtuk elemezni a maximális számú megoldást. Az ABSOLUTE-tól kaptunk egy csoportot a lehetséges ploiditás és CCF eredményekkel, az ehhez legközelebb álló másik megoldást a GAP adta.

Mindhárom esetben magas volt a Spearman féle korrelációs együttható (ρ) a becsült CCF értékek között. A ploiditási értékeknél azonban a GAP és az ASCAT által adott becsült értékek közötti korreláció relatíve alacsony volt két ok miatt: 1. két betegről származó több minta esetében az ASCAT tartományon kívüli értékeket mért; 2. több olyan lókusznál, ahol magas kópiaszámokat találtunk, a GAP lekerekítette az eredményt 8-ra, míg az ASCAT nem, így megváltozott a becsült érték. Meghatároztuk a Cohen együtthatót (κ) az ASCAT és a GAP által adott értékek között, hogy a két módszer közötti egyezést elemezni tudjuk teljes

kópiaszám és major allélek szempontjából. Az eredmények alapján a két program közötti különbségek az allélok sorrendjének meghatározásában és a kópiaszámok megadásában a ploiditásban tapasztalt diszkordanciával függenek össze ($\rho=-0.898$, $P<0.01$). Mivel a használt adatbázis összetartozó mintákat tartalmaz és emiatt félrevezető eredményeket adhat, egy független csoporton (125 minta, még nem publikált eredmények) is elvégeztük az Affymetrix OncoScan SNP vizsgálatot hogy reprodukáljuk az analízist. Az 5. ábra nagyon jó korrelációt mutat a becsült ploiditásban ($\rho=0.885$, $P<0.01$) és CCF-ben is ($\rho =0.907$, $P<0.01$), azonban a κ együttható a teljes kópiaszámra és az abszolút különbség a ploiditásban ($\rho=-0.733$, $P<0.01$) és ($\rho=-0.119$, $P=0.147$) azt mutatja hogy a globális genomikai tömeg hibás becslése volt az, ami a két algoritmus által adott eredmények közötti különbséget okozta. Az 5. ábra f-m részében a GAP és az ASCAT által adott eredmények összehasonlítása látható, nagy genomikai tömeggel bíró minta esetében. Itt érzékelhető a probléma komplexitása, és egyben az is, hogy milyen nehéz a jó megoldás kiválasztása CCF és ploiditás vizsgálatokor. Mivel összetartozó mintákat vizsgáltunk és a GAP használatakor lehetőség van a ploiditási megoldások manuális ellenőrzésére, ezt választottuk a további analízis elvégzésére (annak a figyelembe vételével hogy maximum 8 kópiát engedélyez a szoftver) a következőképpen: (i). az SNV-eket, melyek olyan lókuszon fordultak elő, ahol a teljes kópiaszám 8 volt vagy a major allélek száma nagyobb volt mint 4, nem vettünk figyelembe a CCF és a klonális frekvencia becslésekor (ii). hasonlóan jártunk el a kópiaszám eltérések (copy number aberration, CNA) használatával végzett filogenetikus rekonstrukciónál, kivéve a magas ploiditással rendelkező eseteket (8, 6., 15 és 14 számú): bármely lókuszt 8-as totál kópiaszámmal vagy 4-es major allélszámmal rendelkező bármelyik mintában, azt eltávolítottuk az ugyanazon beteghez tartozó összes mintából.



5. ábra: Az ASCAT és GAP programok használatával kapott CCF és ploiditási eredmények összehasonlítása.

CCF és klonális frekvenciák becslése 4.szintű SNV-knél

A CCF-et meghatároztuk egyenként minden egyes 4. szintű SNV-nél, és csoportként az összes 4. szintű SNV együttes vizsgálatával azon mintákban, ahol rendelkezésre állt az SNP array adat is. q_t -vel jelöltük a teljes kópiaszámot a mutált lókuszon, q_1 jelölte a minor kópiaszámot és q_2 jelölte a major kópiaszámot úgy mint $q_2 \geq q_1$, $q_t = q_1 + q_2$ és q_1, q_2 és $q_t \in \mathbb{N}$. Jelölje s_q denote the number of mutated copies such that $s_q \in \{1, \dots, q_2\}$. Jelölje f_{sq} az SNV vék VAF-t ahol $f_{sq} \in [0, 1]$. Majd f_{sq} összefügg s_q -val és α -val a CCF, a következőképpen:

$$f_{sq} = s_q \left(\frac{\alpha}{\alpha q_t + 2(1-\alpha)} \right) \quad (1)$$

α a változó, melyet próbálunk megbecsülni, míg \hat{f} -t használjuk a VAF jellemzésére. A CCF jellemzésére a szekvenálásból kapott adatot $\hat{\alpha}$ -ként jelöltük. A fenti egyenlet átrendezhető a következőképpen:

$$\hat{\alpha} = \frac{2\hat{f}}{s_q - \hat{f}(q_t - 2)} \quad (2)$$

Legyen n a szekvenálási readek száma, melyek mutált lókuszt lefedik, majd

$$Pr(X = n\hat{f}) = w_{s_q} Beta(f_{s_q} | n\hat{f} + 1, n(1 - \hat{f}) + 1) \quad (3)$$

ahol X az adott SNV-re vonatkozó mutált readek száma, w_{s_q} jelöli a mixture weights minden lehetséges s_q értéknél. Az s_q kiszámításához az α ismerete szükséges. Ahhoz, hogy megbecsüljük az s_q értékét és hogy individuális SNV-k értékét egyéb mutációktól függetlenül, feltételezzük, hogy α ismert. Így, q_t , q_1 , q_2 és α plugin mennyiségek melyeket az SNP array-ből nyerünk. Ezután

$$s_q^* = \underset{s_q \in \{1, \dots, q_2\}}{\operatorname{argmax}} \left\{ Pr(X = n\hat{f}) \right\} \quad (4)$$

és a szekvenálási hibát $e \in [0,1)$ Purdom⁹⁹ et al. munkája alapján modelleztük, úgy mint

$$f_e = \frac{1}{3-2e} ((3-4e)f_{sq} + e) \quad (5)$$

cseréli fel (helyettesíti) f_{sq} -t a Beta eloszlásban. uniform priors over the range of possible values of s_q and $e = 0.01$. Ezek adják az alapját a CCF-ek pontszerű meghatározásának (Supplementary Fig. 10b). Hogy lazítsuk a követelményt az α korábbi v megelőző ismeretével kapcsolatban, definiáljuk a likelihood function over all tier-4 SNVs az adott mintában mint

$$\mathcal{L}(f|n, s_q, w_{sq}) = \sum_{s_q \in \{1, \dots, q_2\}} Pr(X = n\hat{f}) \quad (6)$$

Meglévő v adott α érték mellett, kiszámítjuk a log L -t és ismételten hozzáigazítjuk a weights w_{sq} -t, míg L konvergál illetve amíg a maximum 100 ismétlést el nem érjük. A globális CCF, α^* , amely maximalizálja L -t, mint

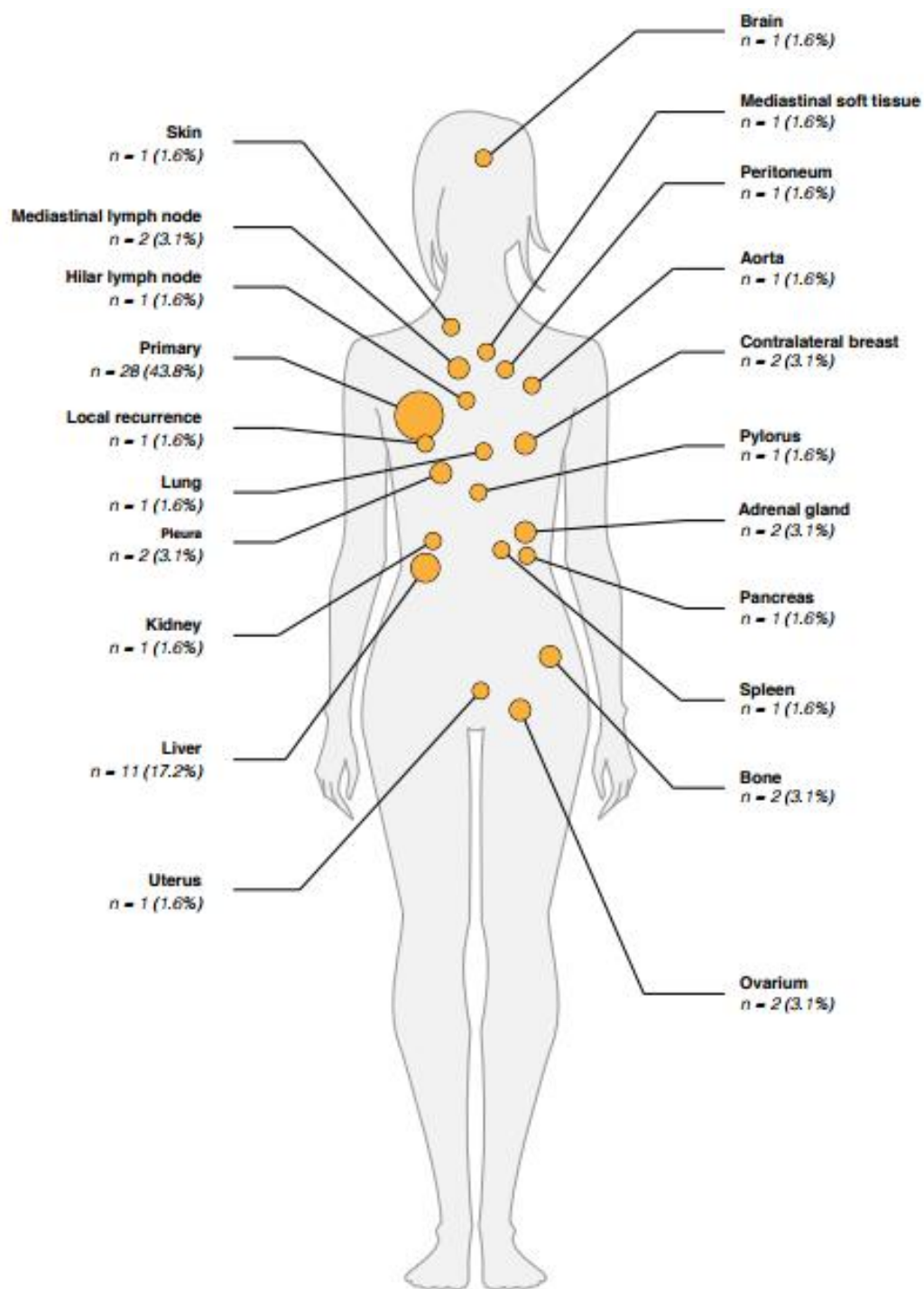
$$\alpha^* = \operatorname{argmax}_{\alpha \in \{0.1, \dots, 0.9\}} \{\mathcal{L}(\hat{f}|\alpha)\} \quad (7)$$

Egy példa a Supplementary Fig. 10e-f-ben, és α^* -thasonlítjuk a GAP által adott becsléshez a Supplementary Fig. 10g-ben. A CCF és az SNV-k klónális frekvenciája az utóbbival függ össze, ezeket együtt számoltuk az összetartozó mintáknál a PyClone használatával, a GAP által megadott major és minor kópiaszámokat használva. A Beta Binomial megoszlást használtunk a parentális kópiaszám opcióval és alapértelmezett beállítással kivéve a szekvenálási hibát, melyet 0.01-re állítottunk be és a tumor tartalmat, melyet a globális CCF-hez, α^* -höz állítottunk be.

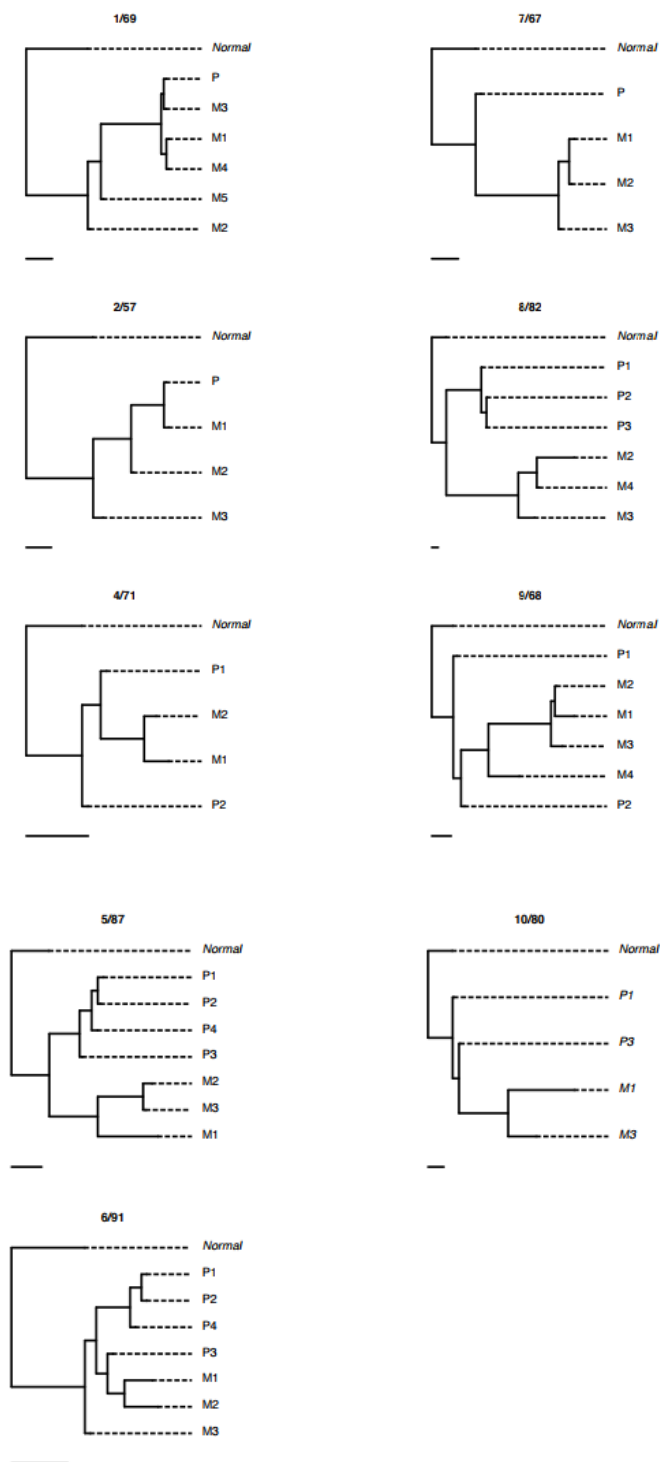
Az SNV-k filogenetikai analízise

Az SNV-k nyers VAF értékeit, melyek a célzott reszekvenálásból származtak bináris értékekké alakítottuk konzervatív 3%-os határérték mellett. Kezdetben csak a teljesen klonális 3.szintű SNV-eket terveztük szűrni ennek a konzervatív határértéknek a használatával. Az

egyedeknél a filogenitásra a Dollo parszimónia kritériumok használatával következtettünk, a filogenetikai rekonstrukcióhoz a PHYLIP programot használtuk Felsenstein¹⁰⁰ alapján. A Dollo parszimónia kritérium minimalizálja a homopláziákat annak az árán, hogy a későbbi ágakon visszafordulások alakulhatnak ki, azonban a legjobb filogenetikai fa megtalálásához használt kritériumok csökkentik ezek számát. Mindezek ellenére több filogenetikai fa egyformán parszimónusz lehet, emiatt a megegyező CNA alapú fákat használtunk hogy kikövetkeztethessük a korrekt filogenitást. A 3. szintű SNV-eket ábrázoló heatmapok a megfelelő filogenetikai fák topológiája és az ágak hossza alapján készültek egy, az R program¹⁰¹ által nyújtott ősi állapotot rekonstruáló gyorsított tranzíciós modell^{102,103} segítségével. Az egyes betegek filogenetikai fái a 6. ábrán láthatóak. Minden egyes azonosított SNV-t, melyhez a CNA profilt használtuk, manuálisan igazoltunk. A 3.szintbe való beosztásnál nem vettük figyelembe a minták CCF-ét. Lehetséges, hogy a korábbi szűrések ellenére nagyon alacsony CCF-el rendelkező minták, összességében kevesebb mutációval is benne maradhattak a rendszerben, ezek a minták a korai ágak létrejöttéhez vezettek a filogenetikus fa törzsén. Ugyanezt az analízist ismételtük meg a 4. szintű SNV-ekkel, az eredmények a 7. ábrán láthatóak.

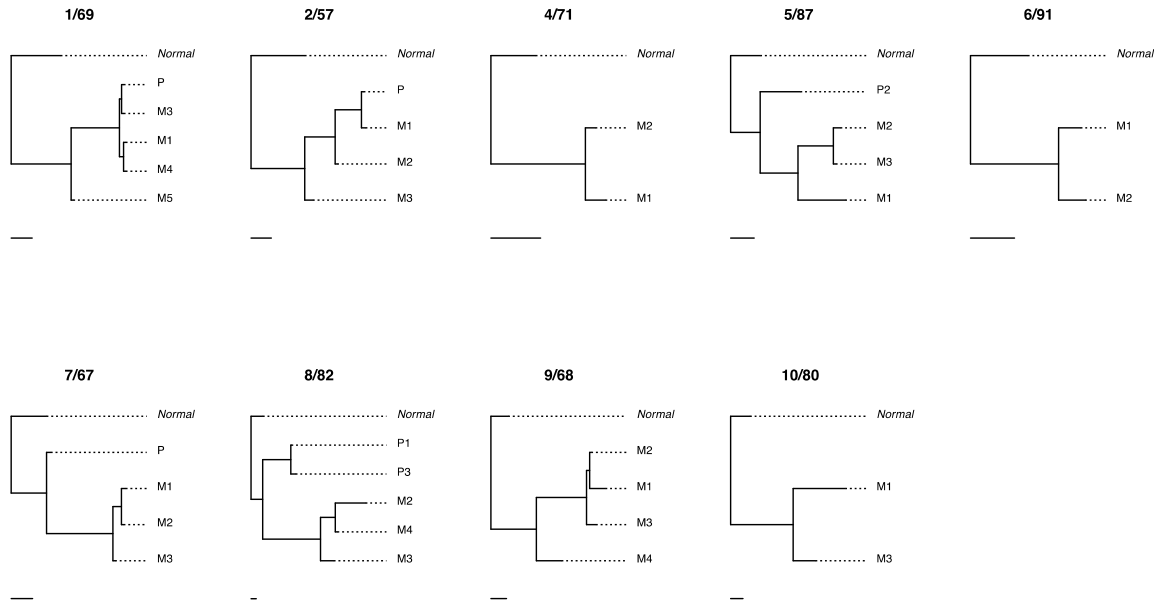


6.a ábra: A 3. szintű SNV-k elemzésével, a Dollo parszimónia kritérium használatával vizsgált minták. Az ábrán az elváltozások anatómiai lokalizációja látható.



6.b ábra: Filogenetikai fák 3. szintű SNV-k elemzésével, a Dollo parszimónia kritérium használatával. A 9.a ábrán látható elváltozások vizsgálatával kapott

filogenetikai fák. A legalább 1500x-es lefedettséggel és >3% VAF-al bíró minták filogenetikai fái a jobb oldalon, a fák alatt található mérővonal 10 SNV hosszát jelöli, mely segít az ágak és a fák teljes hosszának értelmezésében.



7. ábra: 4. szintű SNV-k elemzésével, Dollo parszimónia kritériumok használatával készült filogenetikai fák. A minták legalább 30%-os CCF, >1500x lefedettség és >3% VAF értékkel rendelkeztek. Két páciens esetében (no 9. és no 20.) a primer tumorokból származó minták nem feleltek meg a minőségi kritériumoknak, így ezeket tovább nem vizsgáltuk. A filogenetikai fák alatt található mérővonal 10 SNV hosszát jelöli, mely segít az ágak és a fák teljes hosszának értelmezésében.

A CNA-k filogenetikai analízise

A GAP által meghatározott minor és major kópiaszámokat a transducer alapú páronkénti összehasonlítási funkcióban modelleztük a MEDICC program használatával¹⁰⁴. A közel diploid mintáknál tisztán diploid outgroupot (azaz 2/1 totál kópiaszám/major allél arányt)

feltételeztünk kópiaszám eltérések nélkül, a filogenezis eredetének megállapításához. Tetraploid minták esetében egy további lépést alkalmaztunk annak érdekében, hogy jól helyezzük el a CNA-kat a teljes genom duplikációs eseményhez képest az adott beteg filogenitását figyelembe véve. Először a klasszikus megközelítést alkalmaztuk, hogy egy részterméket kapjunk korrekt topológiával, azonban az ágak hosszának figyelmen kívül hagyásával. Az egyes lókuszok major és minor kópiáinak meghatározásához parszimónia pontszámot alkalmaztunk, mely a résztermék fa ághosszainak összege. A fát a négy tetraploid ősi stádiumok valamelyikének a használatával 6/4, 4/2, 4/4 és 2/2 (teljes kópiaszám/major allél) arányban kaptuk meg. Ezek jelenítik meg a kópiaszám stádiumokat 3/2, 2/1, 2/2 és 1/1 a teljes genom duplikációs eseményt követően. A 0→1 tranzíciók kivételével minden lehetséges permutációt használtunk az internal node-oknál a megfigyelt kópiaszámok esetében. Az átmeneti fát és a hozzá tartozó tetraploid ősi stádiumot választottuk a minimum pontszám meghatározásához. Végül, a teljes filogenetikai fa megalkotásához a klasszikus megközelítést használtuk: minden lókuszon a tetraploid ősi stádiumot használtuk outgroup-nak. A filogenetikai fákhoz a felhasznált értékek a páronkénti távolság mátrixból való újbóli mintavétel 100x megismétlésével születtek, Gauss zaj hozzáadása mellett hasonló felosztásokat számolva a kialakuló (származó) fánál és az eredeti filogenitásnál.

IV. EREDMÉNYEK

IV.A Immunhisztokémiai vizsgálatok

A vizsgálat során 25, metasztatikus emlőrákban elhunyt beteg mintáit elemeztük. A pácienseknek összesen 90 távoli áttéte került szövettani vizsgálatra, melyek 23 különböző lokalizációban fordultak elő. A betegek klinikopatológiai jellemzői az 1. táblázatban láthatóak.

1. táblázat: Klinikopatológiai jellemzők és a primer tumor jellegzetességei.

KT=kemoterápia, ET=endokrin terápia, TT=célzott terápia

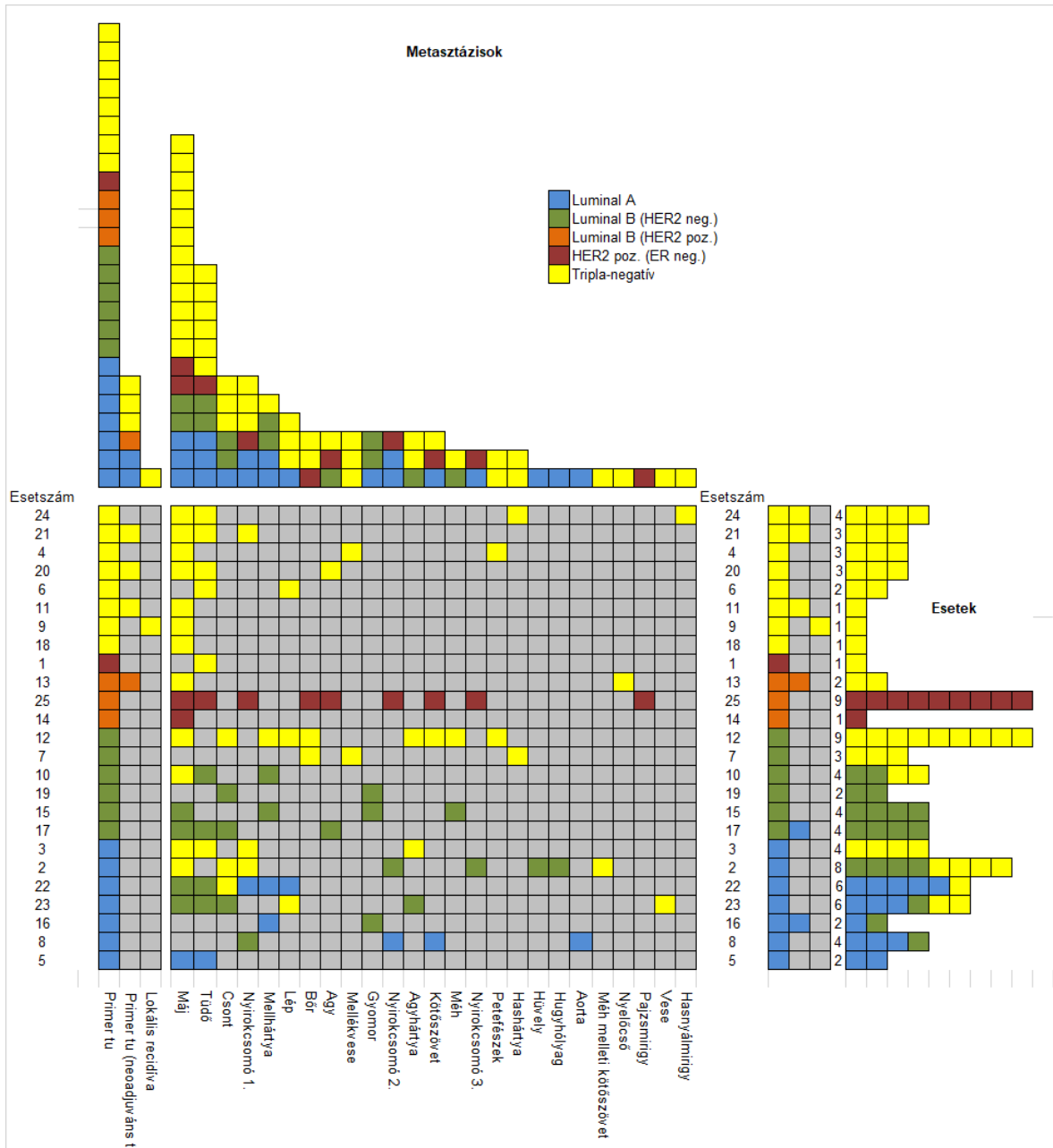
| | n | (%) | Átlag | Medián |
|---|----|----------|-------|--------|
| Életkor a diagnózis idején (év) | 25 | | | 41 |
| Családi onkológiai anamnézis | | | | |
| pozitív | 7 | 0.28 | | |
| negatív | 1 | 0.04 | | |
| NA | 17 | 0.68 | | |
| Diagnózis éve | | | | |
| 1991-1995 | 4 | 0.16 | | |
| 1996-2000 | 3 | 0.12 | | |
| 2001-2005 | 6 | 0.24 | | |
| 2006-2010 | 8 | 0.32 | | |
| 2011-2013 | 4 | 0.16 | | |
| Primer tumor szövettani altípusa | | | | |
| IDC | 20 | 0.8 | | |
| ILC | 2 | 0.08 | | |
| Pleiomorf ILC | 2 | 0.08 | | |
| Invazív karcinóma | 1 | 0.04 | | |
| Tumor grade | | | | |
| 1 | 4 | 0.16 | | |
| 2 | 3 | 0.12 | | |
| 3 | 17 | 0.68 | | |
| NA | 1 | 0.04 | | |
| Prediktív faktorok | | | | |
| ER pozitív | 16 | 0.64 | | |
| ER Q score | | | 6.26 | 7 |
| PR pozitív | 12 | 0.48 | | |
| PR Q score | | | 5.82 | 6 |
| HER2 pozitív | 4 | 0.16 | | |
| Ki67 (%) | | | 17.37 | 6 |
| Szubtípus | | | | |
| LumA | 7 | 0.28 | | |
| LumB HP | 6 | 0.24 | | |
| LumB HER2 | 3 | 0.12 | | |
| HER2 | 1 | 0.04 | | |
| TN | 8 | 0.32 | | |
| T stádium diagnóziskor | | | | |
| 1 | 4 | 0.16 | | |
| 2 | 9 | 0.36 | | |
| 3 | 2 | 0.08 | | |
| 4 | 9 | 0.36 | | |
| NA | 1 | 0.04 | | |
| N stádium diagnóziskor | | | | |
| 0 | 5 | 0.2 | | |
| 1 | 5 | 0.2 | | |
| 2 | 6 | 0.24 | | |
| 3 | 1 | 0.04 | | |
| NA | 8 | 0.32 | | |
| M stádium diagnóziskor | | | | |
| 0 | 17 | 0.68 | | |
| 1 | 8 | 0.32 | | |
| Kezelés | | | | |
| Daganatellenes kezelésben nem részesült | 6 | 0.24 | | |
| Csak KT | 9 | 0.36 | | |
| Csak ET | 2 | 0.08 | | |
| KT+ET | 4 | 0.16 | | |
| KT+ET+TT | 3 | 0.12 | | |
| KT+TT | 1 | 0.04 | | |
| KT vonalak száma | | | | |
| Neoadjuváns | 5 | 0.104167 | | |
| Adjuváns | 10 | 0.208333 | | |
| Első vonal | 18 | 0.375 | | |
| Másodvonal | 9 | 0.1875 | | |
| Harmadvonal | 5 | 0.104167 | | |
| ≥ Negyedvonal | 2 | 0.041667 | | |
| DFS (hónap) | | | | 13 |
| OS (hónap) | | | | 26 |
| Autopszia éve | | | | |
| 2001-2005 | 4 | 0.16 | | |
| 2006-2010 | 11 | 0.44 | | |
| 2011-2014 | 10 | 0.4 | | |

IV.A.1 Primer tumorok jellemzése

A primer tumorok többsége IBC NST volt (80%), lobuláris karcinóma 4 betegnél fordult elő, közülük kettőnél pleiomorf ILC-t diagnosztizáltunk (16 és 8%). Az immunhisztokémiai altípusok közül a Luminalis B fordult elő leggyakrabban (n=9), ezek közül 6 Luminalis B HER2 negatív és 3 Luminalis B HER2 pozitív. TNBC-t 8, Luminalis A tumort 7 és HER2 alcsoportba tartozó elváltozást 1 esetben detektáltunk. A proliferációs rátát tekintve 6 páciensnél találtunk magas ($\geq 20\%$) Ki67 értéket, míg az átlagos Ki67 érték 17.67% volt az összes primer tumort figyelembe véve. Az elváltozások többsége alacsonyan differenciált volt, grade 2 és 1 elváltozásokat lényegesen kisebb arányban találtunk (68 vs. 12 vs 16%).

A vizsgálatban szereplő tumorok leggyakrabban a májba, tüdőbe, távoli nyirokcsomókba és a csontba adtak áttéteket (8. ábra). Vizsgáltuk azt, hogy az egyes immunhisztokémiai altípusba tartozó tumorok mely távoli szervekbe adnak áttétet. A TNBC-k leggyakrabban a tüdőbe és a májba (88 és 50%) metasztatizáltak, míg csontáttétet ebben a csoportban nem detektáltunk. A Luminalis A tumorok is jellemzően a májba és a tüdőbe adtak áttétet (71 és 57%), emellett ebben a csoportban a csont metasztázisok is gyakoriak voltak (43%). Az összes, csontokba áttétet adó primer tumor HR pozitív volt.

Máj áttétek a Luminalis B csoportban is gyakran előfordultak (78%). A HR+ csoport jellemzően több távoli szervet érintett (a 16 HR+ tumor 69 különböző lokalizációba adott áttétet, míg a 8 TNBC 18 távoli szervet érintett). Ezzel szemben a TNBC-k általában csak 2-3 távoli szervbe metasztatizáltak, jellemzően a májba és a tüdőbe. Négy beteg esetében csak egy távoli szervre lokalizálódott a betegség, ez 3 esetben a májat, 1 esetben a tüdőt érintette. A vizsgálatban szereplő 25 beteg közül egynél fordult elő helyi kiújulás, ez a primer tumorhoz hasonlóan TNBC volt. A TNBC-k minden esetben TNBC áttétet adtak, a leggyakoribb altípus váltás a Luminalis A-ról B-re történt. A Luminalis B tumorok nagyobb arányban őrizték meg a fenotípust, mint a Luminalis-A daganatok, azonban még így is az általuk adott áttétek fele TN volt.



8. ábra: A primer tumorok és távoli áttétek altípusa. Az egyes eseteket a vizsgálatba való beválasztáskor kapott sorszámval jelöltük (1-25). Egy sor egy beteget jelképez, az oszlopokban pedig az egyes áttétek lokalizációi láthatóak. A páciensek a primer tumor altípusa alapján (melyet színekkel jelöltünk) vannak sorba rendezve, a színes kockák az általunk vizsgált

mintákat jelölik, a szürke kockák azt jelentik, hogy adott páciensnek adott lokalizációban nem volt áttéte, melyet vizsgálni tudtunk. Az ábra összefoglaló (jobb oldali) részén összegezve láthatóak az eredmények betegenként és a minták lokalizációja alapján felbontva.

IV.A.2 Primer tumorok és távoli áttétek összehasonlítása

Az esetek közel felében (12/25) a távoli áttétek megtartották a primer tumor altípusát, itt sem receptor vesztés sem receptor nyeres nem fordult elő. A 16 ER pozitív primer tumorral rendelkező beteg közül 10 (62.5%) vesztette el ER pozitívítását egy vagy több távoli áttétben. A 16 ER pozitív beteg közül 11-ben PR pozitívítást is detektáltunk a primer tumorban, közülük 10 betegnél (90.9%) fordult elő PR vesztés egy vagy több áttétben. Azon primer tumorok esetében, melyeknél az áttétben HR vesztés történt, a primer tumor Allred/Quick score-ja alacsonyabb volt, mint azon tumoroknál, ahol nem történt receptor vesztés, azonban a különbség nem volt szignifikáns (ER score medián 6 vs 7, $p=0.298$; PR score medián 5 vs 8, $p=0.117$). 4 betegnél detektáltunk HER2 pozitív primer tumort, melyek közül kettő vesztett HER2 receptort egy vagy több távoli áttétben. Receptor nyeres nem fordult elő az általunk vizsgálat TNBC primer tumorok áttéteiben.

Behatóbban vizsgáltuk a receptor vesztés kérdését, hogy kizárhassuk az autopsziás minták használatából adódó esetleges szuboptimális technikai körülményeket: ennek során részletesen elemeztük azon eseteket, melyeknél a beteg életében biopszia illetve sebészi rezekció történt a távoli áttétek valamelyikéből. 4 ilyen HR pozitív betegünk volt, közülük 3 esetben már a biopszia kimutatta a receptor vesztést az adott szervi lokalizációban, melyet megerősítettünk az autopsziás minták vizsgálatával. Egy páciens esetében a primer tumor Luminalis B HER2 pozitív volt, a 4 éves DFS után detektált helyi kiújulás HR- HER2+ volt, míg a 10 év után kialakult máj metasztázis biopszia alapján Luminalis B HER2+ volt (ER Q-score 3). A páciens a diagnózist követő 11-ik évben hunyt el, az autopszia során vizsgált minden áttét HR-/HER2+ -nak bizonyult. Egy másik páciens IV.stádiumban került diagnózisra HR+ emlődaganattal, többvonalbeli kezelést kapott, majd az autopszia során vett minták közül a primer tumor megőrizte HR pozitívítását, akár csak az áttétek többsége, azonban 1 áttétnél PR vesztést detektáltunk. A 16, HR pozitív primer tumorral diagnosztizált

beteg közül 9 részesült endokrin kezelésben, 7/9 esetben történt ER vesztés, 7/7 esetben pedig PR vesztést találtunk a távoli áttétekben. A 7 beteg közül, aki nem kapott endokrin kezelést (elutasították, illetve viscerális krízis miatt kemoterápiára volt szükség) 3 esetben nem történt HR vesztés, 3/4 esetben ER és PR is negatív lett az áttétekben, valamint 1/4 esetben csak PR vesztést detektáltunk. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést az endokrin kezelés és az ER illetve PR vesztés között ($p=0.225$ és $p=0.57$).

A távoli áttétek szélesebb körű elemzéséhez 3 lépcsős, az áttétek lokalizációján alapuló csoportosítási rendszert hoztunk létre (ebből a beosztásból a helyi kiújulást, a lágyrész és pajzsmirigy áttéteket kihagytuk, a távoli nyirokcsomókat pedig elhelyezkedésük alapján osztottuk be). Az első lépcsőben 5 nagyobb régiót vizsgáltunk; központi idegrendszer (KIR), mellkas, has+kismedence, csont és bőr. A második lépés szervrendszerek alapján osztotta be az elváltozásokat, majd a harmadik lépésben az egyes szerveket külön vizsgáltuk (2. táblázat).

- i. A primer tumorokat és a régiókat összehasonlítva azt találtuk, hogy az ER vesztés a has+kismedence régió áttéteiben volt a legjellemzőbb, míg a PR vesztés a has+kismedence mellett a mellkasi metasztázisokban is szignifikánsan magasabb arányban fordult elő.
- ii. A szervrendszereket vizsgálva a gasztrointesztinális traktus áttéteiben jellemző volt az ER és PR vesztés is, míg a légzőrendszeri áttétekben csak PR vesztést detektáltunk.
- iii. A szerveket külön vizsgálva megfigyeltük, hogy a HR vesztés a máj- és a tüdőáttétekben volt jellemző.

Statisztikailag szignifikáns változás a Ki67 státuszban kizárólag a csontáttétekben fordult elő, ahol is a Ki67 index alacsonyabb volt a primer tumorokban detektálthoz viszonyítva. A HER2 státusz változását a kis esetszám miatt nem elemeztük.

2. táblázat: ER, PR és Ki67 státusz változása a primer tumorok vs régiók, szervrendszerek és szervek áttétei között. A színes kockák jelölik azokat a lokalizációkat, melyben szignifikáns különbséget találtunk a HR illetve proliferációs státuszban a primer tumor és az adott régió/szervrendszer/szerv metasztázisa között. A táblázat megmutatja, hogyan kerültek beosztásra az egyes szervek/szervrendszerek a különböző régiókba.

| | ER | | | PR | | | Ki67 | | |
|--|---------------|-------------------------|--------------------|---------------|-------------------------|--------------------|---------------|-------------------------|--------------------|
| | Régió | Szervrendszer | Szerv | Régió | Szervrendszer | Szerv | Régió | Szervrendszer | Szerv |
| | KIR p=0,268 | Agyhártya | | KIR p=0,075 | Agyhártya | | KIR p=0,631 | Agyhártya | |
| | | Agy | | | Agy | | | Agy | |
| | | Legzőrendszer p=0,304 | Tüdő p=0,227 | | Legzőrendszer p=0,05 | Tüdő p=0,049 | | Legzőrendszer p=0,372 | Tüdő p=0,251 |
| | | | Mellhártya p=0,829 | | | Mellhártya p=0,829 | | | Mellhártya p=0,933 |
| | | | Aortafal | | | Aortafal | | | Aortafal |
| | | | Nyelőcső | | | Nyelőcső | | | Nyelőcső |
| | | | Pajzsmirigy | | | Pajzsmirigy | | | Pajzsmirigy |
| | | | Lágyrész | | | Lágyrész | | | Lágyrész |
| | | Távoli nyirokcsomó | | | Távoli nyirokcsomó | | | Távoli nyirokcsomó | |
| | | Emésztőrendszer p=0,026 | Máj p=0,026 | | Emésztőrendszer p=0,001 | Máj p=0,004 | | Emésztőrendszer p=0,213 | Máj p=0,212 |
| | | | Hasnyálmirigy | | | Hasnyálmirigy | | | Hasnyálmirigy |
| | | | Gyomor | | | Gyomor | | | Gyomor |
| | | | Petefészek | | | Petefészek | | | Petefészek |
| | | | Méh | | | Méh | | | Méh |
| | | | Hüvely | | | Hüvely | | | Hüvely |
| | | Nemiszervek p=0,123 | | | Nemiszervek p=0,054 | | | Nemiszervek p=0,295 | |
| | | | Parametrium | | | Parametrium | | | Parametrium |
| | | | Mellékvese | | | Mellékvese | | | Mellékvese |
| | | | Vese | | | Vese | | | Vese |
| | | Húgyzervek p=0,095 | | | Húgyzervek p=0,142 | | | Húgyzervek p=0,322 | |
| | | | Hüghólyag | | | Hüghólyag | | | Hüghólyag |
| | | | Hashártya | | | Hashártya | | | Hashártya |
| | | | Távoli nyirokcsomó | | | Távoli nyirokcsomó | | | Távoli nyirokcsomó |
| | | | Lép | | | Lép | | | Lép |
| | Csont p=0,281 | | | Csont p=0,054 | | | Csont p=0,048 | | |
| | Bőr | | | Bőr | | | Bőr | | |

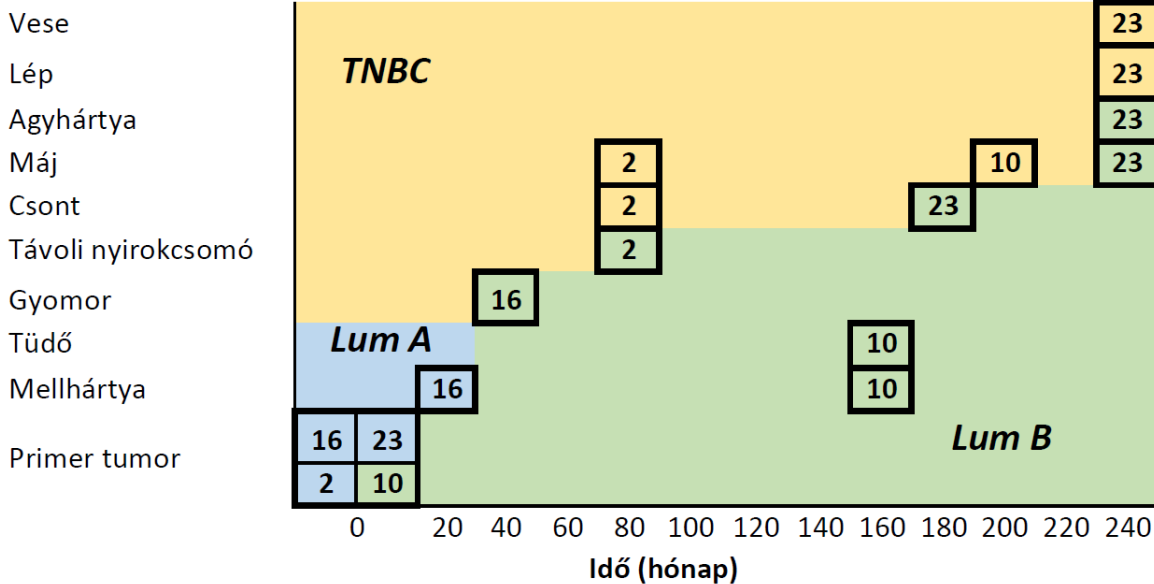
IV.A.3 Távoli áttétek

Az ER, PR és Ki67 státusz szempontjából összehasonlítottuk egymással a távoli áttéteket: a különböző lokalizációban lévő metasztázisok (régiók, szervrendszerek és egyes szervek) között nem találtunk különbséget. (3. táblázat)

3. táblázat: A különböző lokalizációjú távoli áttétek összehasonlítása egymással a háromlépcsős beosztás alapján. A táblázatokban látható számok az egyes p értékeket jelölik.

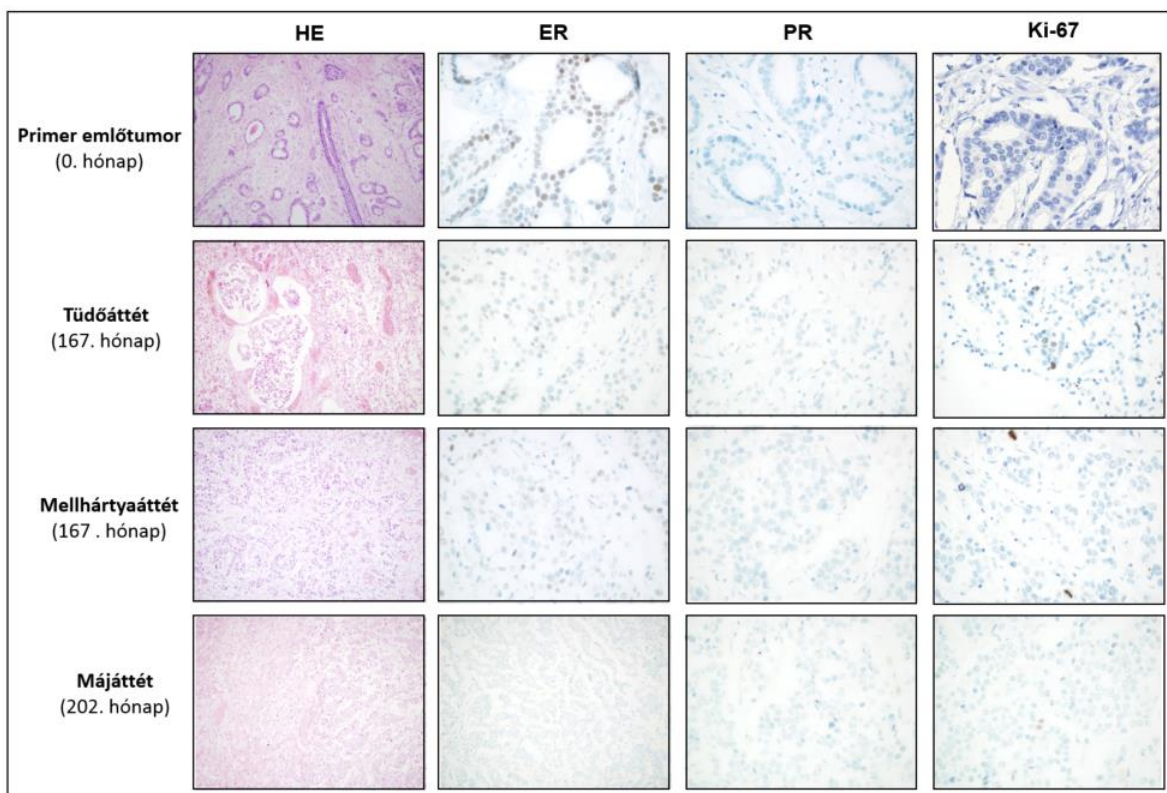
| RÉGIÓK | | | | SZERVRENDSZEREK | | | | SZERVEK | | | | | | |
|---------|-------|---------------|---------|-----------------|-------|-------|-----|---------|------|-----|------|------|------|---|
| KIR | 0.896 | Mellkas | 0.886 | Csont | 0.896 | 0.234 | KIR | KIR | 0.78 | máj | 0.82 | tüdő | 0.82 | x |
| x | | | | | | | | | | | | | | |
| Mellkas | 0.655 | x | | | | | | | | | | | | |
| Has | 0.836 | 0.11 | x | | | | | | | | | | | |
| Csont | 0.358 | 0.886 | 0.288 | x | | | | | | | | | | |
| ER | KIR | Mellkas | Has | Csont | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| PR | Csont | Has | Mellkas | KIR | | | | | | | | | | |
| KIR | 1 | 0.787 | 0.445 | x | | | | | | | | | | |
| Mellkas | 0.445 | 0.08 | x | | | | | | | | | | | |
| Has | 0.787 | x | | | | | | | | | | | | |
| Csont | x | | | | | | | | | | | | | |
| ER | Csont | 0.902 | 0.389 | x | | | | | | | | | | |
| tüdő | | | | | | | | | | | | | | |
| máj | | | | | | | | | | | | | | |
| bone | | | | | | | | | | | | | | |
| KIR | 0.692 | 0.773 | x | | | | | | | | | | | |
| Csont | | | | | | | | | | | | | | |
| KIR | 0.562 | Légzőrendszer | | | | | | | | | | | | |
| KIR | 0.82 | tüdő | | | | | | | | | | | | |
| máj | | | | | | | | | | | | | | |
| Csont | | | | | | | | | | | | | | |
| KIR | 0.687 | 0.682 | x | | | | | | | | | | | |
| tüdő | | | | | | | | | | | | | | |
| máj | | | | | | | | | | | | | | |
| Csont | | | | | | | | | | | | | | |

Betegenként elemezve is vizsgáltuk a távoli áttéteket egymáshoz képest. A páciensek többségénél az ugyanazon primer tumorból származó metasztázisok homogének voltak a HR státusz tekintetében, azaz, az egy betegben azonosított áttétek HR státusza megegyezett. 7 esetben azonban az áttétek heterogének bizonyultak, azaz némelyiküknel történt HR veszteség míg egyéb lokalizációban detektált metasztázisok megőrizték HR pozitívitasukat. Ez utóbbi 7 primer tumor mindegyike a Luminalis szubtypusba tartozott, összesen 31 távoli áttétet azonosítottunk, melyekből mintavétel történt az autopszia során. PR veszteség 20/31, ER veszteség 9/31 lokalizációban fordult elő. A 7 betegből 3 esetben az áttétes emlőrák diagnózisa az autopsziás minták vizsgálata alapján született meg, így a betegség lefolyásáról nem áll információ rendelkezésre, annyi azonban biztos, hogy a páciensek onkológiai kezelést nem kaptak. A többi 4 páciensnél pontos információkkal rendelkezünk a betegség progressziójáról, melyet retrospektíven tudunk elemezni. Ennek alapján egy igen érdekes mintázatot találtunk; minél hosszabb idő telt el a primer betegség diagnózisa és az adott áttét detektálása között, annál valószínűbb volt, hogy az áttét a primer tumortól eltérő IHC profillal rendelkezett. A klinikai detektálás időpontját minden esetben az elvégzett képalkotó vizsgálat időpontja alapján adtuk meg (9. ábra).

Áttét lokalizációja

9. ábra: Heterogén áttéttel rendelkező esetek. Az esetszámmal jelölt kockák az egyes betegek primer tumorait illetve távoli áttéteit jelölik, a színekkel az altípusokat jelöltük, az időtengelyen a klinikai detektálás időpontját adjuk meg. Pl. a 10. számú beteg primer Luminalis B altípusba tartozott, a diagnózis után 160 hónappal tüdő és mellhártya áttétek alakultak ki, melyek ugyancsak Luminalis B típusúak voltak, majd a 200-ik hónapban TN máj áttétet detektáltak.

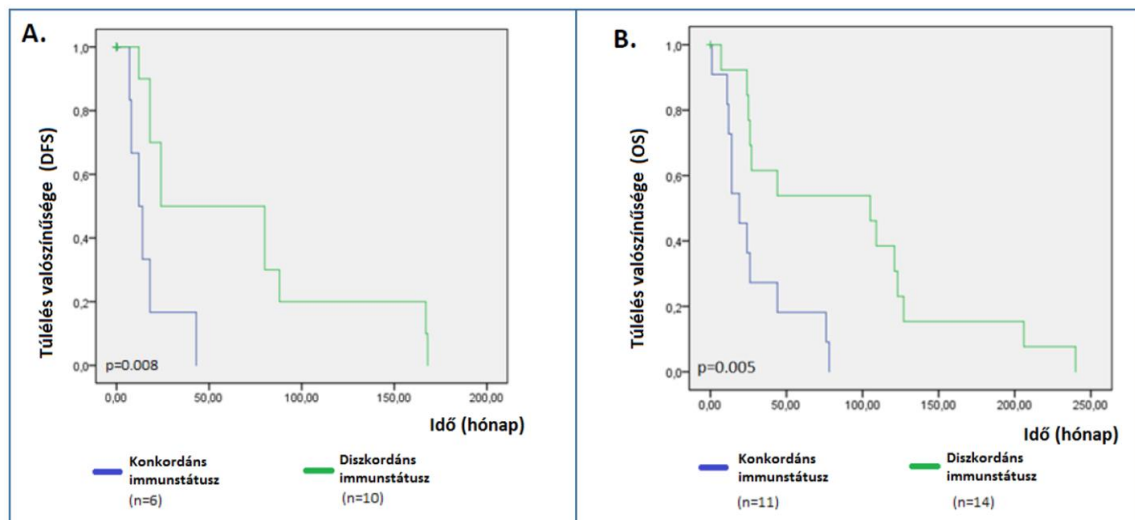
A szövettani metszetekről készült fotókon az egyik páciens (10.) primer tumorának és távoli áttéteinek HE metszete, valamint ER, PR és Ki67 immunhisztokémiai festései láthatóak (10. ábra).



10. ábra: A 10-es beteg primer tumorának és távoli áttéteinek mikroszkópos képei (20x). A páciens primer tumora Luminalis B típusú (ER+, PR-, alacsony Ki67 index érték, HER2-) IBC NST volt. A sebészi rezekciót követően adjuváns sugárterápia történt, azonban a szisztémás kezelést a beteg elutasította. 14 évvel később távoli áttéket detektáltak a tüdőben és a mellhártyán, ekkor több vonalbeli kemoterápia és endokrin kezelés történt. A 17-ik évben májáttétek jelentkeztek, ekkor ismét kemoterápiás kezelés indult, azonban a páciens 4 hónappal később a betegség progressziója következtében elhunyt. Az áttétekből származó szövetek autopsziás minták. A tüdő és a mellhártya áttét Luminalis B típusba tartozott (bár gyengébb ER pozitívítás jellemezte ezeket, mint a primer tumort), míg a májáttét TN-nak bizonyult.

IV.A.4 Betegségmentes és teljes túlélés

A túlélés vizsgálatokor a diszkordáns (az áttétek HR-t és/vagy HER2-t vesztek) és a konkordáns (nem történt HR illetve HER2 veszteség) eseteket hasonlítottuk össze. A medián OS hosszabbnak bizonyult a diszkordáns csoportban ($p=0.005$). A DFS-t 16 betegnél tudtuk vizsgálni (9 olyan beteg nem vontunk be az összehasonlításba, akik IV. stádiumban kerültek diagnózisra). Így 6 konkordáns vs 10 diszkordáns fenotípusú beteg összehasonlítását végeztük, itt is azt találtuk, hogy a diszkordáns csoport túlélése szignifikánsan hosszabb volt ($p=0.008$). (11. ábra)

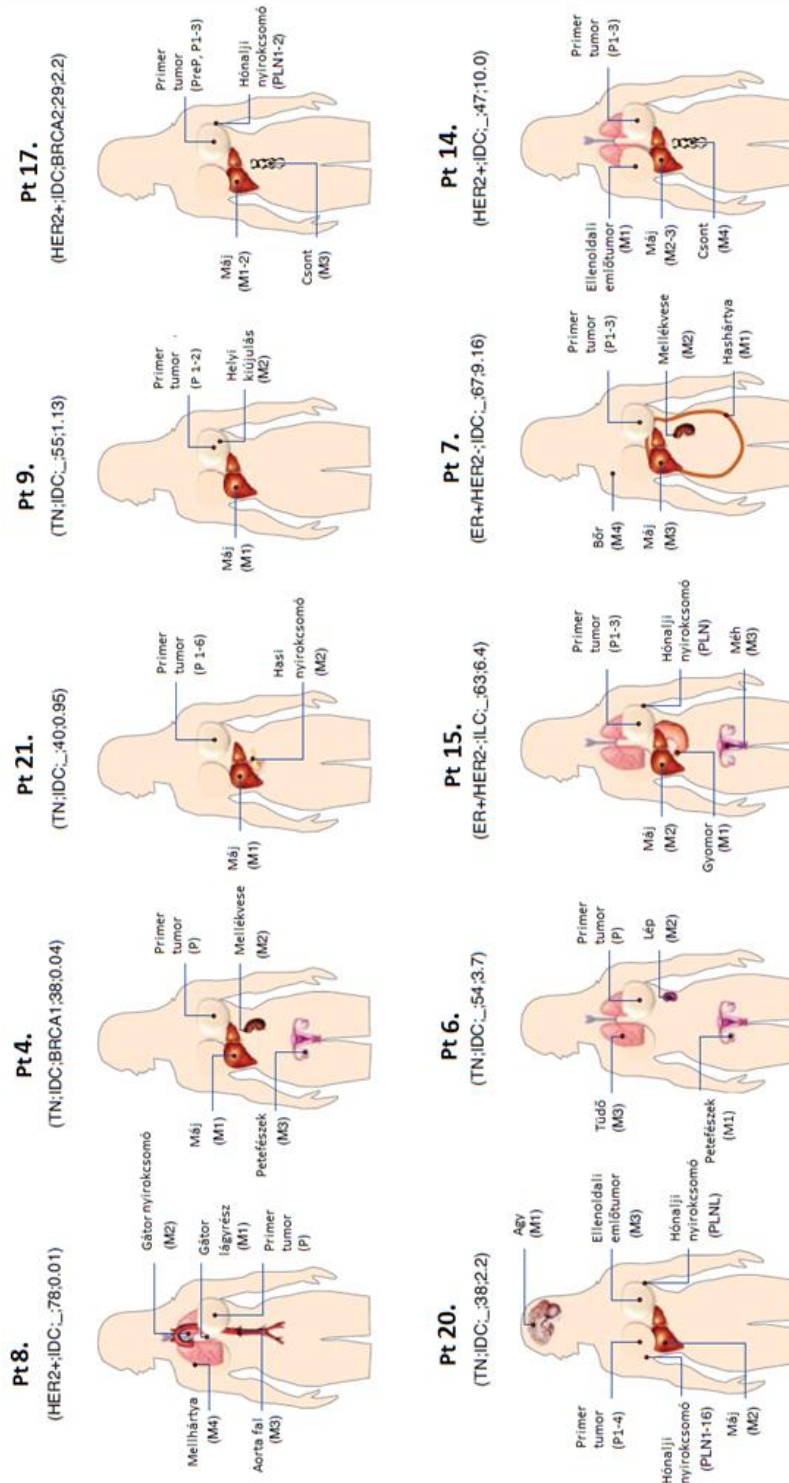


11. ábra: Túlélési adatok diszkordáns és konkordáns szubtípusú csoportok esetében. A DFS és az OS is szignifikánsan hosszabb volt azon betegek csoportjában, akik HR-t vesztek a távoli áttétekben azokhoz viszonyítva, akiknek a receptor státusza nem változott.

IV.B Szomatikus mutációk és kópiaszám eltérések elemzése

IV.B.1 Betegek és jellegzetességeik

A vizsgálat második lépcsőjébe a fent elemzett 25-ből 10 beteget tudtunk bevonni, akik megfeleltek a további szigorú beválasztási kritériumoknak: $>1\mu\text{g}$ duplaszálú DNS a primer tumorból, a normál (nem-daganatos) szövetből - a csírvonal mutációk vizsgálatához referenciaként, valamint legalább egy távoli áttétből. 8 betegnél korai emlőrák jelentkezett, azonban a terápia korai szakaszában egynél közülük (17. számú) szoliter majáttétet detektáltak. Három beteg (21, 17 és 20. számú) neoadjuváns kezelést kapott, míg a másik 5 páciens (9, 6, 15, 7 és 14. számú) a primer tumor eltávolítását követően adjuváns kezelésben részesült az adott időszakban érvényes irányvonalaknak megfelelően. Két páciens már a diagnózis pillanatában IV.stádiumú volt, esetükben a primer tumor műtéti eltávolítása nem történt meg, ezekből az autopszia során vettünk mintát, a többi betegnél a primer tumor sebészi eltávolítása során nyert anyagot dolgoztuk fel. Egy esetben fordult elő helyi kiújulás, ebből az autopszia során vettünk mintát. Betegenként átlagosan 3 távoli áttétet dolgoztunk fel (12. ábra).



12. ábra: A vizsgálat genetikai részében résztvevő betegek jellemzése. Az ábrán látható a betegek sorszáma, immunhisztokémiai fenotípusa és szövettani altípusa,

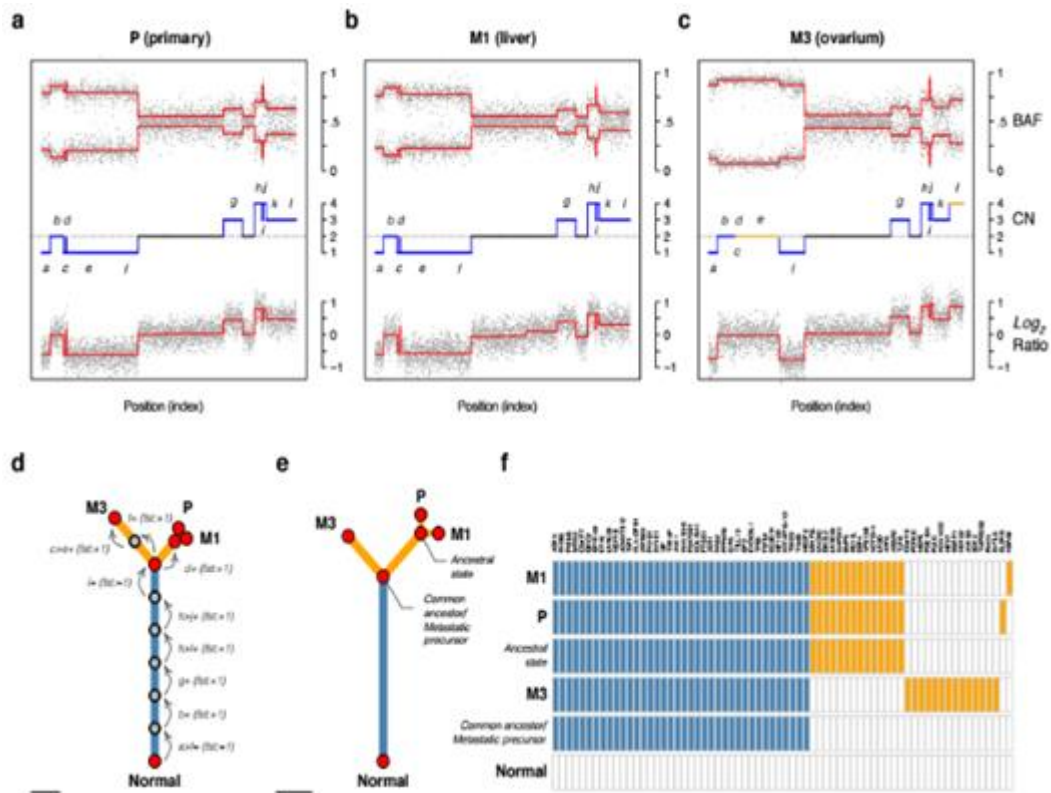
esetleges BRCA pozitívitás, a beteg életkora a diagnózis idején, a teljes túlélés ideje években, valamint az elemzett szövetminták lokalizációja.

IV.B.2 Szomatikus mutációk és kópiaszám eltérések (CNA)

Teljes exom szekvenálással azonosítottuk a szomatikus mutációkat 51 mintában (medián lefedettség $40 \pm 18x$). Ezt Sequenom MassARRAY-vel végzett ortogonális validáció követte a fals pozitív jelek azonosítására, majd célzott amplikon reszekvenálást végeztünk (medián lefedettség $11390 \pm 5646x$) a pontos VAF meghatározásához. Ezt kiegészítettük nagy intenzitású SNP array-vel, hogy meghatározzuk az ennek alapjául szolgáló CNA 64 párosított mintában. Ezután létrehoztunk egy többlépcsős rendszert, mellyel minden egyes mutáció validitási szintjét meg tudjuk adni. Betegenként 27-305 non-szinoním SNV-t tudtunk azonosítani, a 3. szintig majd minőségbiztosítási kritériumokat alkalmaztunk. Végül összesen 56 mintánál állt rendelkezésre CNA vagy szekvenálási eredmény a további analízisekhez.

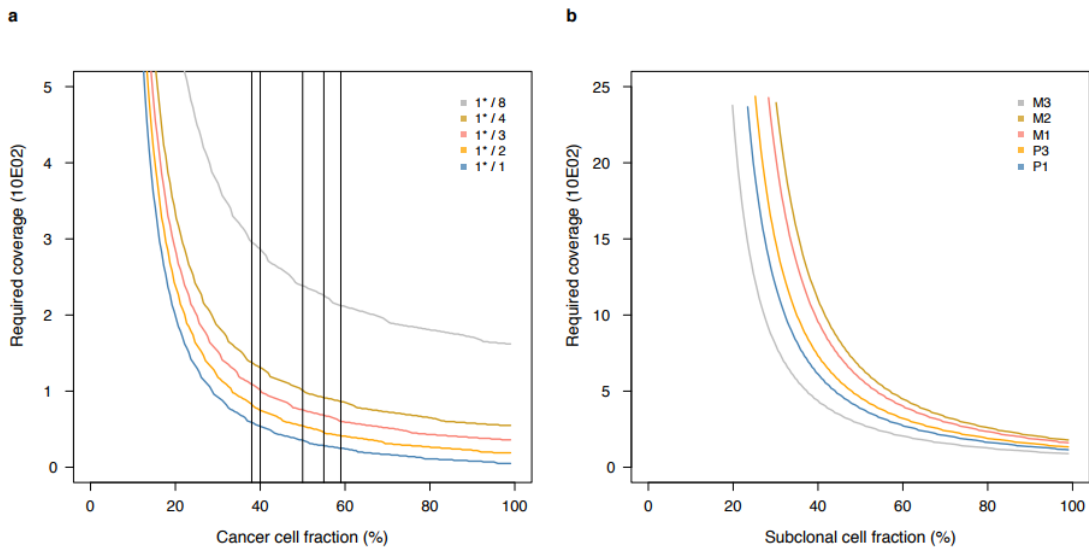
IV.B.3 Filogenetikai rekonstrukció és metasztatikus progresszió

A metasztázisok klonális kapcsolatban voltak egymással és olyan sejtekből eredtek, melyek a betegség különböző fázisaiban disszeminálódtak. Ennek megfelelően bizonyos arányban hordozták a parentális sejtek genetikai jellemzőit, majd ezek mellé felhalmozták a saját privát eltéréseiket. A genomikai alterációk sorrendjének a meghatározásakor a maximum parszimónia kritériumot használtuk. A 13. ábra a-f a 4. számú beteg vizsgálatával kapott eredményeket mutatja. Azon esetekben, amikor az SNV-k és a CNA-k vizsgálatával kapott filogenetikai eredmények konzisztensek voltak, ezeket közös fán ábráztuk. Amikor az SNV-alapú elemzéssel fel nem oldott csomókat kaptunk, a CNA-k vizsgálatával megkapott fát tekintettük helyesnek, mivel az SNP array-vel nagyobb mennyiségű aberrációt találtunk, azonban a CNA-k egyedi lehetőséget biztosítottak a fa rekonstrukcióhoz.



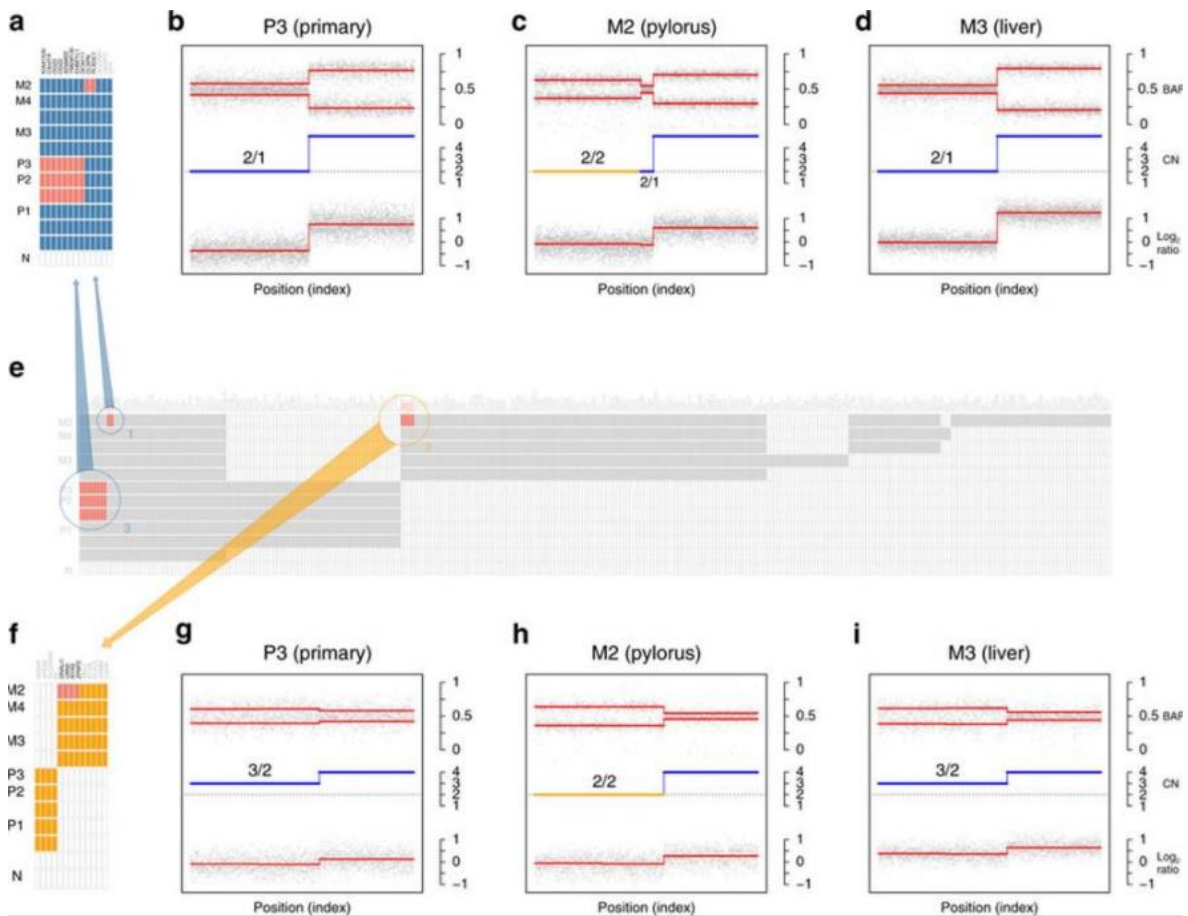
13. ábra: Filogenetikai információ a SNV-k és CNA-k felhasználásával. Klonális szomatikus CNA-k a 3-as kromoszómán a primer tumorban (**a panel**), a májjáttétben (**b panel**) és a petefészkek áttétben (**c panel**) a 4-es betegben. Az ábrán a vonalak (fentről lefelé) a B allél frekvencia (BAF), kópiaszám (CN) és log₂ arányokat jelölik. A filogenetikus rekonstrukció a **d** panelen látható, ahol nyilak jelzik az eltéréseket rövidítésekkel, melyek a koordinátákat és a történések típusát tartalmazzák. Konvergens evolúciót szemléltet a “d” régió fokális amplifikációja **a panelben** és **b panelben**, míg a c-e nagymértékű növekedése látható a **c panelben**, mind a három esetben az eredmény heterozigótaság elvesztése (LOH) a d régióban. A CNA-k színekódolása: a “korai” eseményeket kék, a “késői” eseményeket sárga színnel, a diploid régiókat, melyek nem adnak hozzá a filogenetikai fához, feketével jelöltük. (**e panel**) konkordáns filogenitász a 3. szintű SNV-k elemzésével és (**f panel**) az ősi állapot rekonstrukciója ugyanezen mintáknál. A mérővonalak a **d panelben** egy CNA-t, **e panelben** 10 SNV-t jelentenek.

Az SNV-k és a CNA-k együttes használatával azonosíthatóak a reverziók, azaz hogy az SNV-knek az előrejelzéseknek megfelelően, várhatóan ott kellene lenniük az adott mintában az ősi állapot rekonstrukciója alapján, azonban mégsem találjuk meg őket. Az előre jelzett reverziók esetében a vizsgálat erejének a kalkulációja alapján (melyet Carter és mtsai munkája alapján végeztünk¹⁰⁵) kizártuk annak lehetőségét, hogy ezek a reverziók fals negatív jelek lennének, melyek az elégtelen szekvenálási mélységnek tulajdoníthatóak vagy annak, hogy a mutációk szubklonális frekvenciákban fordultak elő (14. ábra).



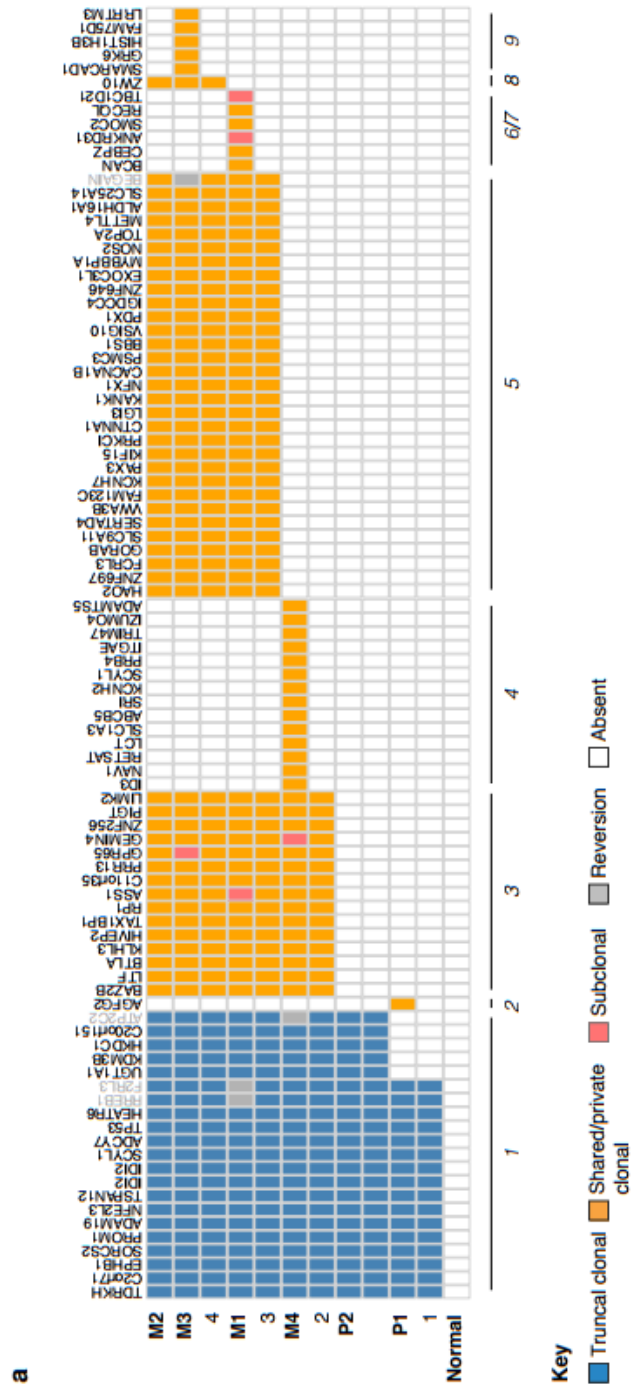
14. ábra: Az elemzés statisztikai erejének meghatározása a 15. számú beteg mintáinak tanulmányozásakor. (a) a szekvenálás lefedettségének szükséges mélysége a CCF (%) és CNA használatával, a legrosszabb esetben egy mutált kópia (1*) jelenlétekor a 95%-os statisztikai erő eléréséhez a szekvenálási hiba $e = 1.59E-02$ és $FPR = 5E-07$ érték mellett, klonális SNV-k meghatározásához. A függőleges fekete vonalak a minták CCF-ját jelölik, mely információ a kapcsolódó SNP analízisből származik. **(b)** hasonló, mint **(a)** csak a szubklonális sejtfraekció (%) elemzésekör kapott adatok.

A 15. ábrán a reverziók két csoportja látható a no 15.-es beteg gyomor metasztázisából, mely a heterozigótaság elvesztése (loss of heterozigoty, LOH) miatt alakulhatott ki az 1p és 17p kromoszómákon ebben a lézióban.

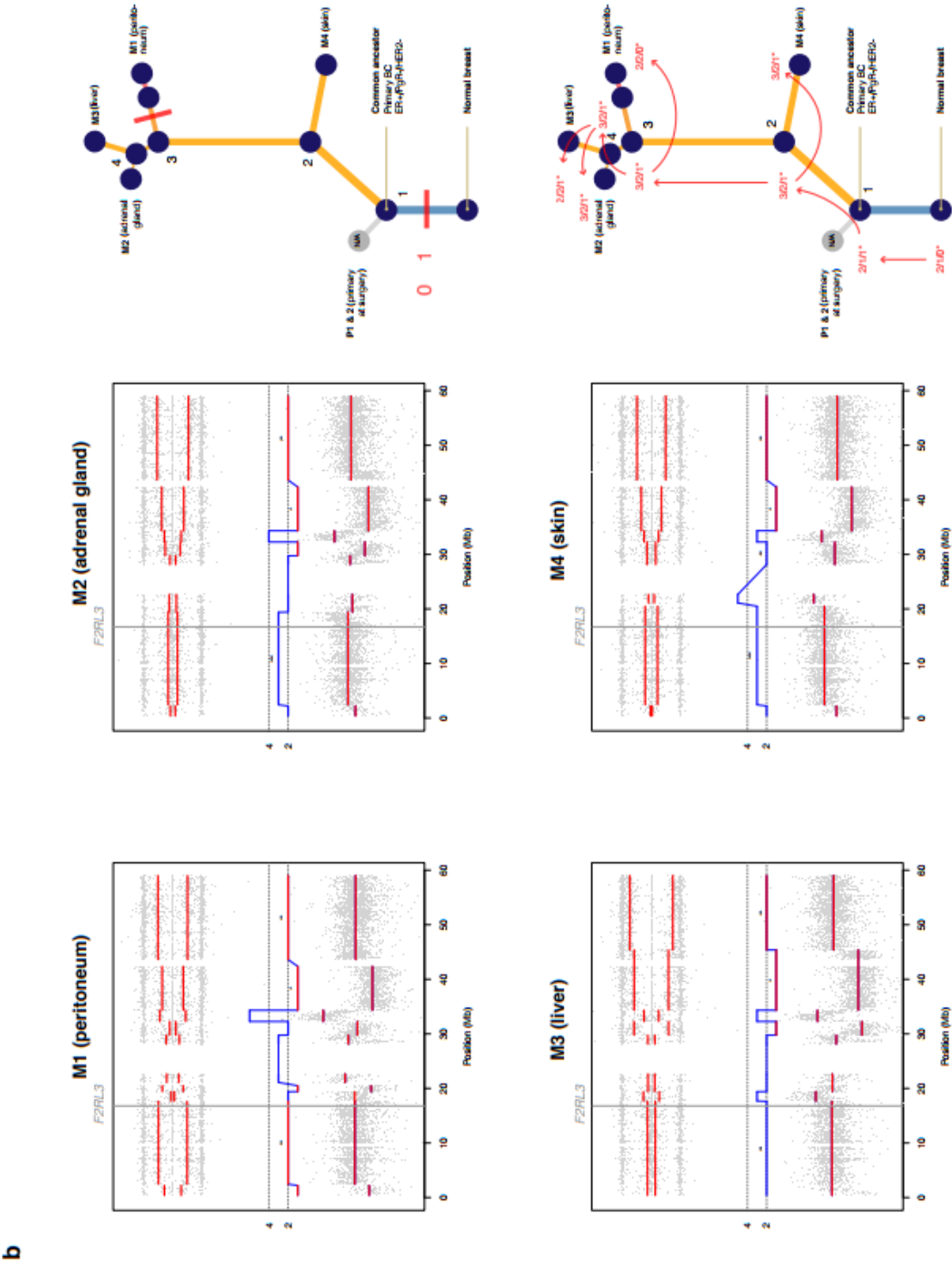


15. ábra: A SNV-kben található reverziókat megmagyarázzák a CNA-k. (a, f) A korai és késői 3. szintű SNV-k, melyek reverzióként voltak előre jelezve a no 15.-ös beteg pylorus áttétében. Ezek az 1p és 17p kromoszómákon voltak detektálhatóak. **(b-d, g-i)** Az 1-es és 17-es kromoszóma teljesen klonális szomatikus CNA-ai primer tumor, pylorus-, és hepaticus áttétekben, a genomikai koordináták szerinti sorrendben. Az egyes panelekben a BAF, a becsült CN értékek és a log₂ arányok láthatóak. **(e)** Heat map, mely az ősi stádium rekonstruált verzióját mutatja. Az 1p és 17p kromoszóma karokon detektált LOH az M2-ben megmagyarázza ezen mutációk hiányát.

Ezután hasonló jelenséget azonosítottunk a 7. számú esetről (16. ábra). Itt a kópiaszám státuszban tapasztalt változás a 19p kromoszómán végigkövethető a filogenetikai fán és megmagyarázza az F2RL3-ban detektált mutáció reverzióját. A reverziók előfordulása kevésbé elfogadott tény az irodalomban és a növekvő érdeklődés ellenére, mely a kérdést övezi, számos megközelítés hibásan támaszkodott a “no back mutation” hipotézisre.



16.a ábra: Az SNV-kben található reverziókat megmagyarázzák a CNA-k. A 7-es számú beteg 3. szintű SNV-inek ősi stádiumú rekonstrukciója, ahol a korai mutációkat késsel, a későieket narancssárgával jelöltük. A back mutációkat szürke kocka jelképezi.

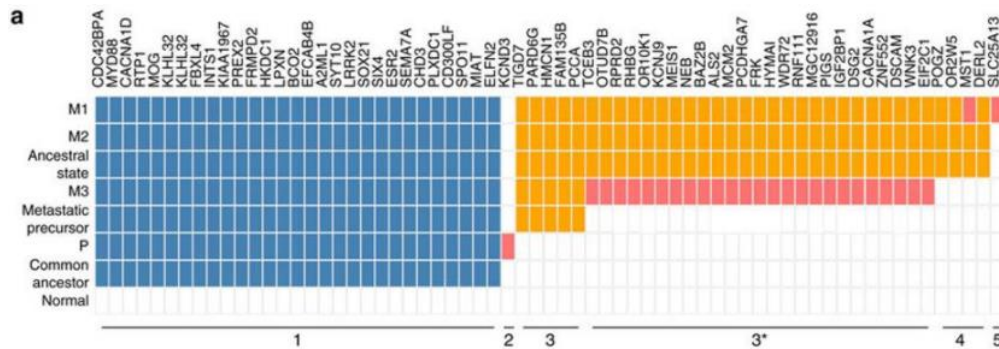


16.b ábra: Az SNV-kben található reverziókat megmagyarázzák a CNA-k. A metastázisok a 19-es kromoszóma CNA profilja, a BAF, a becsült a CN értékek és a

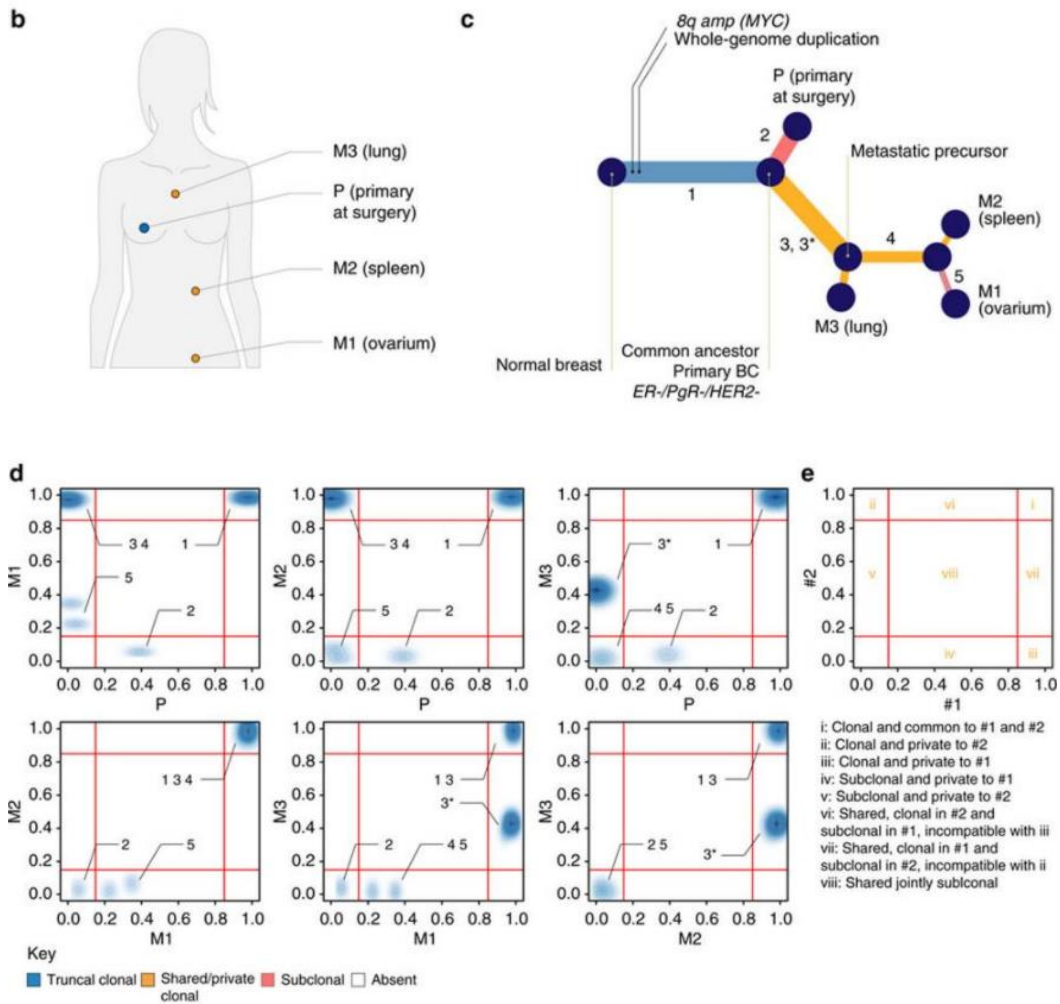
log₂ arányok. Az F2RL3 genomikai koordinátáját a függőleges szürke vonal jelzi. Az SNV-k és CN-ek evolúcióját a jobb oldalon található filogenetikai fán követhetjük.

IV.B.4 Disszemináció metasztatikus prekursorokon keresztül

Hasonló módszerrel tártuk fel a többi esetet az összes olyan betegnél, akiknél mind az SNV, mind a CNA adat a rendelkezésünkre állt. A genetikai eltéréseket két csoportba osztottuk annak alapján, hogy a betegség evolúciója szempontjából mikor történtek. Korainak neveztünk egy eltérést, amennyiben a filogenetikai fa törzsén, és későinek, ha a fa egy ágán detektáltuk őket. A kombinált filogenitásra egy jó példa a no 6. eset. Ennél a páciensnél 54 éves korában TN emlődaganatot diagnosztizáltak, a tumor eltávolítását követően több vonalbeli kezelést kapott, a betegség progressziójának következtében 3 évvel később elhunyt. Esetében az összes távoli áttét egy klaszterben helyezkedett el, ezek egy közös ősből származtak, melyet metasztatikus prekuzornak neveztünk el. A klonális frekvenciákat a variáns allél frekvenciákból (VAF-okból), a teljes daganatsejt frakcióból (CCF-ból) és a kópiaszámokból számoltuk ki az egyes SNV-k esetében. Ezeket páronkénti összehasonlításban láthatjuk (17. ábra).



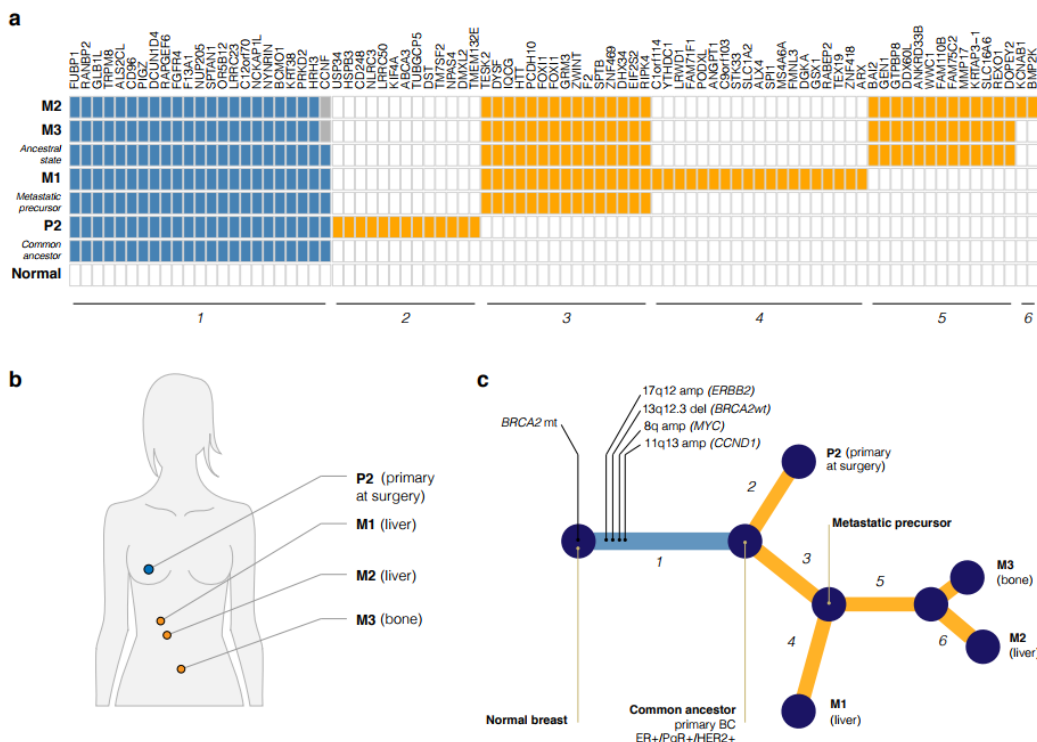
17.a ábra: Az emlőrák progressziójának filogenetikai rekonstrukciója a 6. számú betegnél. A 3-as szintű SNV-k ősi állapotának rekonstrukciója a vizsgált léziók anatómiai lokalizációjával.



17.b-e ábra: Az emlőrák progressziójának filogenetikai rekonstrukciója a 6. számú betegnél. (b) CNA-k és SNV-k felhasználásával megalkotott filogenetikai fák (c) és a 4. szintű SNV-k klonális frekvenciáinak párszerinti összehasonlítása (d). A filogenetikai fa ágait 1-5 számokkal jelöltük, a mutációk lokalizációja a páronkénti összehasonlításban a (d) panelen látható. Két fiktív minta páronkénti összehasonlításának sematikus ábrája (e). Az i., ii., és iii. mutációk teljesen klonálisak és vagy közösek a két mintában, azaz az egyik szülői vonalból származtak, vagy az egyik lézió privát eltérései voltak. A iv. és v. mutációk privátak és szubklonálisak, az egyik mintához tartoznak. A vi. és vii-ben található mutációk két mintában is megtalálhatóak, klonálisak az egyik, míg szubklonálisak a másik mintában. Ha a két mintának van közös szülői eredete, akkor ezek a mutációk teljesen inkompatibilisek a ii-ben és iii-ban található klonális

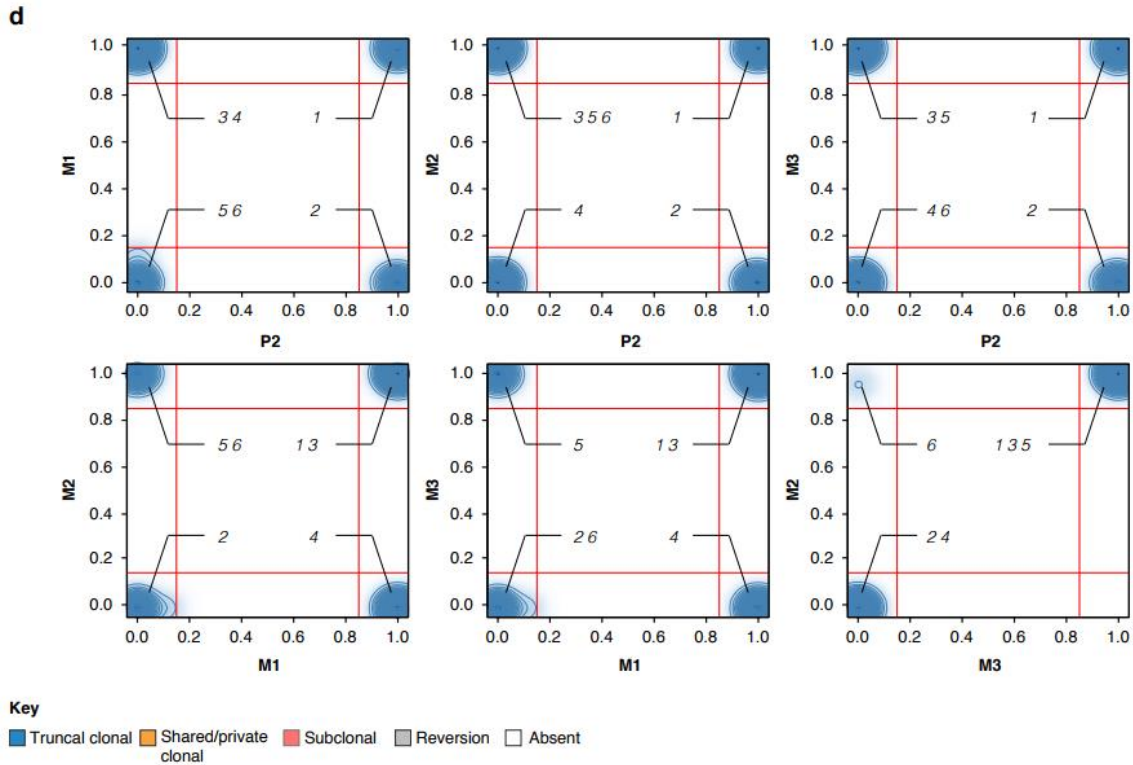
mutációkkal. A szubklonális frekvenciákat az intratumorális heterogenitás magyarázhatja. Ennek alternatívájaként a vi-ben és vii-ben lévő mutációk horizontális szóráson keresztül származhatnak egy harmadik mintából is.

Ehhez hasonlóan, a többi páciensnél, akiket korai emlőrákkal diagnosztizáltak (9, 15, 7 és 14. számú) valamint a 17. betegnél, akinél diagnóziskor egyetlen májattét került leírásra, hasonló helyzetet találtunk (18. és 19. ábra). Valószínűsíthetően a progresszió első lépése a primer tumorból a “metasztatikus prekursor” klón szóródása, és mivel a primer tumor eltávolításra került, a további disszemináció útja metasztázisból metasztázisba vezethetett. Eredményeink arra utalnak, hogy a korai stádiumban diagnosztizált emlőtumoros betegek esetében, akik kuratív célú tumoreltávolításon estek át (jelenleg a szűresi és edukációs eljárásoknak köszönhetően ők adják a páciensek túlnyomó többségét) valószínűsíthetően a kaszkádszerű disszemináció az áttétképzés fő útja.

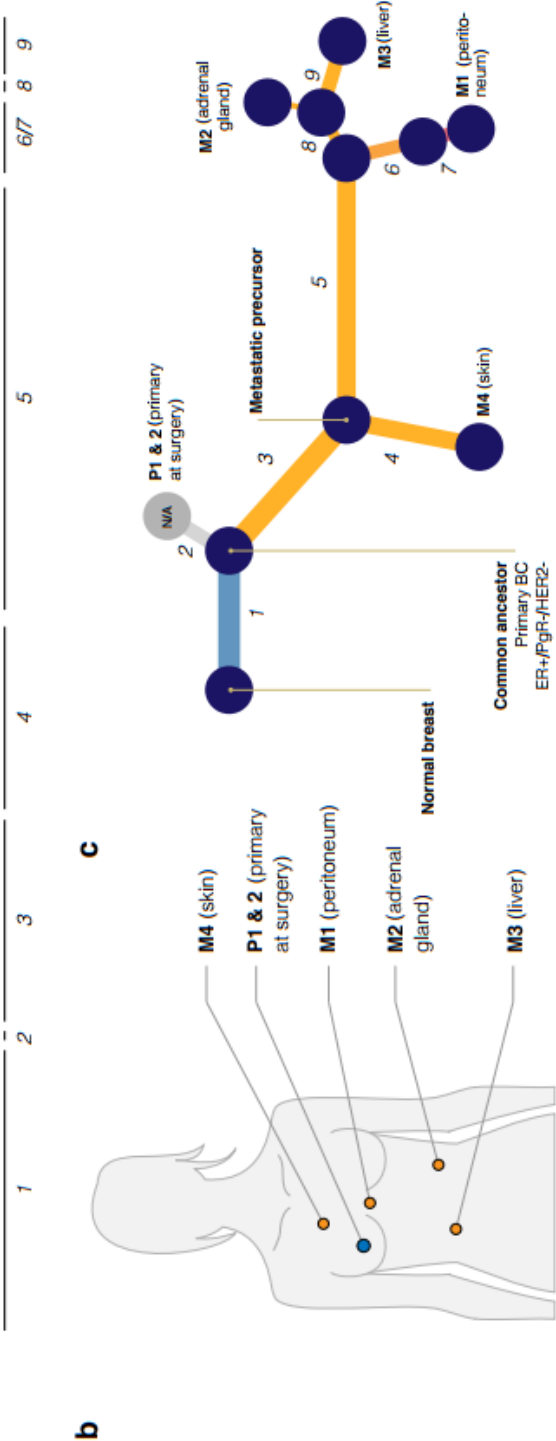
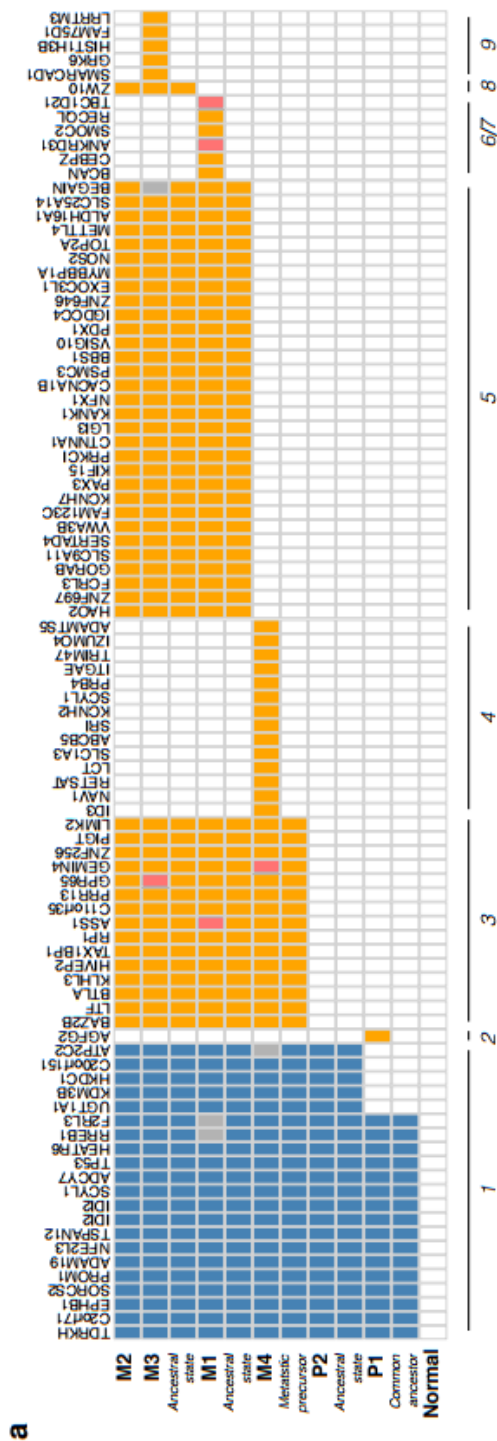


18.a-c ábra: A 17. számú beteg emlőrákos progressziójának filogenetikai rekonstrukciója. (a) A 3. szintű SNV-k ősi stádiumú rekonstrukciója a primer tumorban és

három különböző lokalizációjú távoli áttétben, melyek anatómiai lokalizációját **(b)** mutatja. **(c)** a kombinált filogenetikai fa a CNA és SNV eredmények alapján

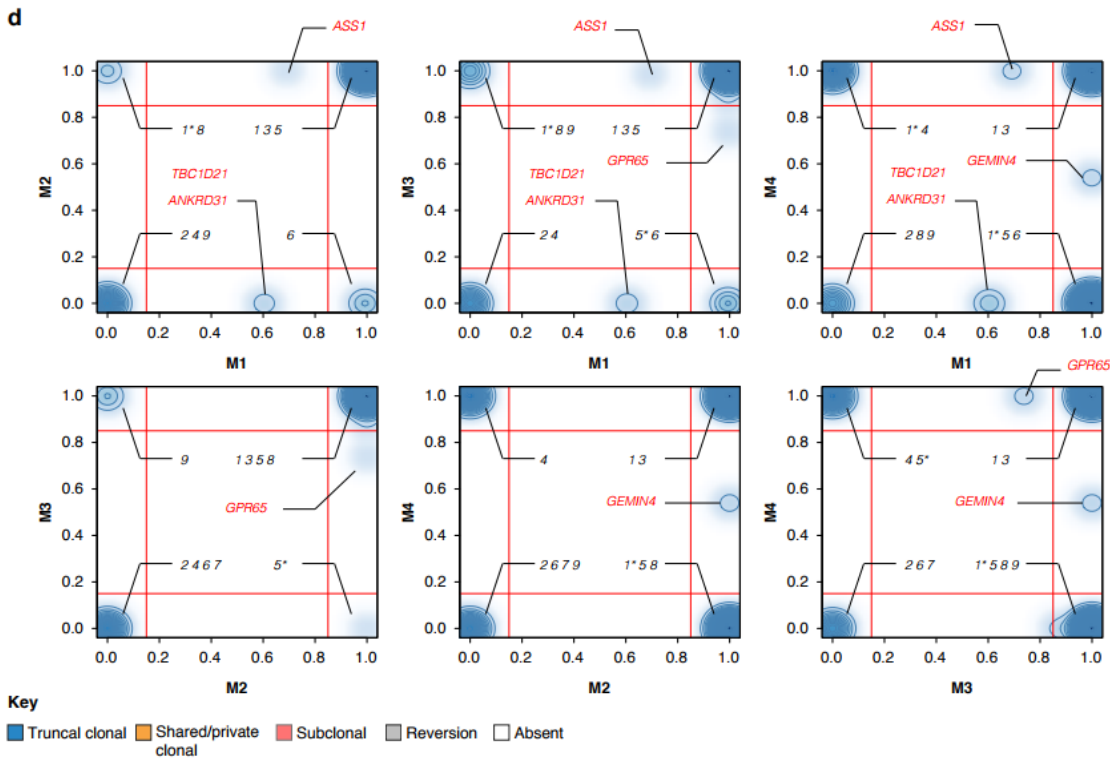


18.d ábra: A 17. számú beteg emlőrákos progressziójának filogenetikai rekonstrukciója. (d) a klonális frekvenciák páronkénti összehasonlítása. A filogenetikai fa ágait 1-től 6-ig számoztuk a (c) pontban és ezen mutációk lokalizációja páronkénti összehasonlításban a (d) pontban látható.



19.a-c ábra: A 7. számú beteg emlőrákos progressziójának filogenetikai rekonstrukciója. (a) A 3. szintű SNV-k ősi stádiumú rekonstrukciója a primer tumorban és

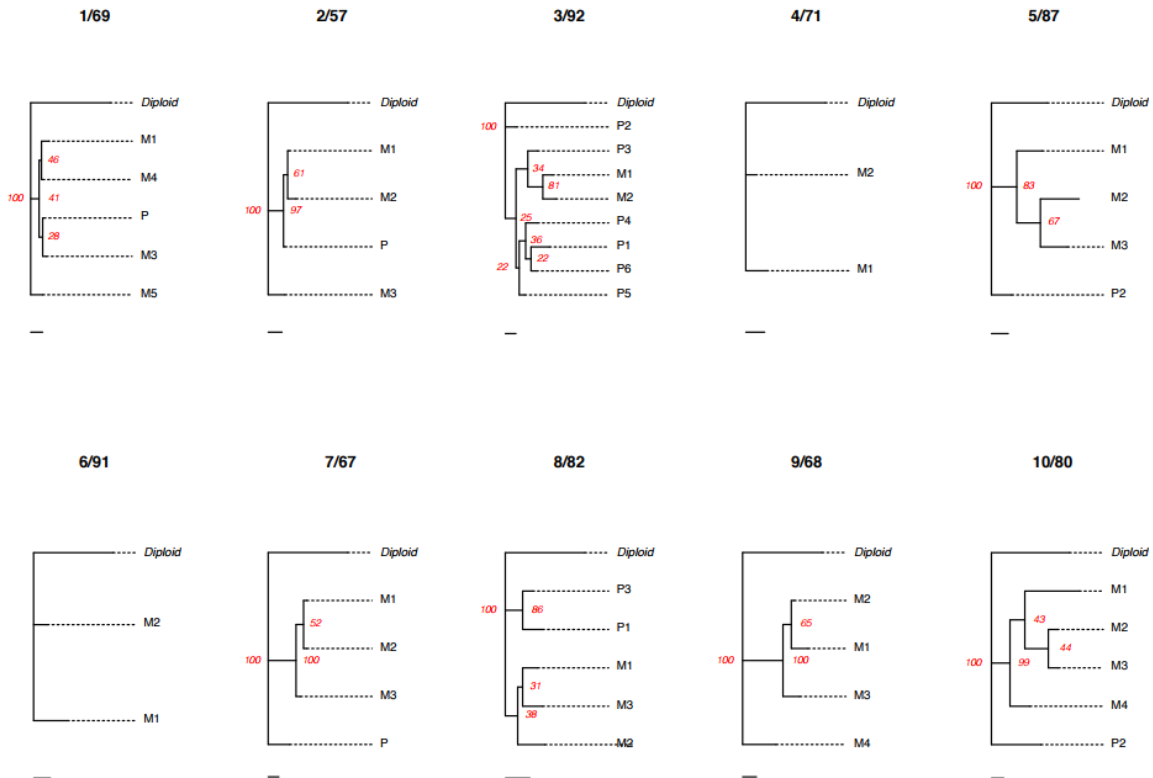
négy különböző lokalizációjú távoli áttétben, melyek anatómiai lokalizációját (b) mutatja. (c) kombinált filogenetikai fa a CNA és SNV eredmények alapján á



19.d ábra: A no 7-es beteg emlőrákos progressziójának filogenetikai rekonstrukciója. (d) a klonális frekvenciák páronkénti összehasonlítása. A filogenetikai fa ágait 1-től 9-ig számoztuk a (c) panelen és ezen mutációk lokalizációja páronkénti összehasonlításban a (d) panelen látható. A (d) panelen 1* és 5* jelölik a reverziók helyét M1, M3 és M4-ben, melyet a CNA-k magyaráznak. Három SNV *ASS1p.M147L*, *GPR65p.N213fs*, és *GEMIN4p.C683W* klonális struktúrája inkonzisztens volt a filogenetikai rekonstrukcióval, ezek szubklonálisak voltak M1, M3 és M4-ben, egyenként. Az, hogy *ASS1p.M147L* és *GPR65p.N213fs* teljesen klonálisak voltak M4 egy korábbi ágán, arra utal, hogy ezek a mutációk az 1 vagy 3 ág mentén jöttek létre. Mivel az eltérések a P1 és P2-ben nem voltak jelen, a 3-as ág érintettsége a valószínűbb az 1-essel szemben. Mindazonáltal ezek a 4.szintű SNV-knek csak az 3.2%-át tették ki, és kihagyásuk nem befolyásolta a filogenetikai fa globális topológiáját.

TBC1D21p.Q14K és *ANKRD31p.Y1796C* egyedülállóan szubklonális M1-ben, ez beleillik a kikövetkeztetett filogenetikai képbe.

Hét páciensunk (21, 9, 17, 20, 15, 7 és 14. számú) esetében a primer tumorból több blokk is rendelkezésre állt. Közülük két esetben a primer tumor egy bizonyos régiója genetikailag közelebb állt az áttétekhez, mint az egyéb területek. A 21. beteg esetén a CNA információ alapuló filogenetikai fa alapján a primer tumor minta (P3) együtt, klaszterben helyezkedett el a májjáttéttel (M2) és a hasi nyirokcsomó áttéttel (M3) (20. ábra).



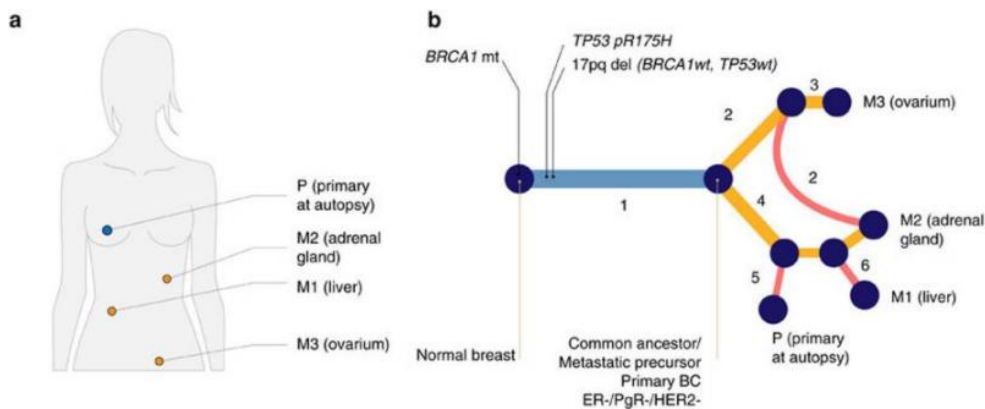
20. ábra: A MEDICC használatával kapott, CNA alapú filogenetikai fák. A filogenetikai fákat olyan mintáknál ábrázoljuk, melyeknél >30% CCF értékek álltak rendelkezésre. Két betegnél (9 és 20. számú) a primer tumorokból származó minták nem teljesítették a minőségre vonatkozó kritériumokat, így ezeket nem elemeztük tovább. Az egyes fák alatt található mérővonalak 10 CNA-t jelölnek és információt adnak a fák teljes hosszáról. Az elágazások mellett található számok mutatják azon fák százalékos

arányát, melyek ugyancsak alátámasztják az elágazást a távolság matrix 100 megismételt elemzés esetén hozzáadott Gaussi zaj mellett.

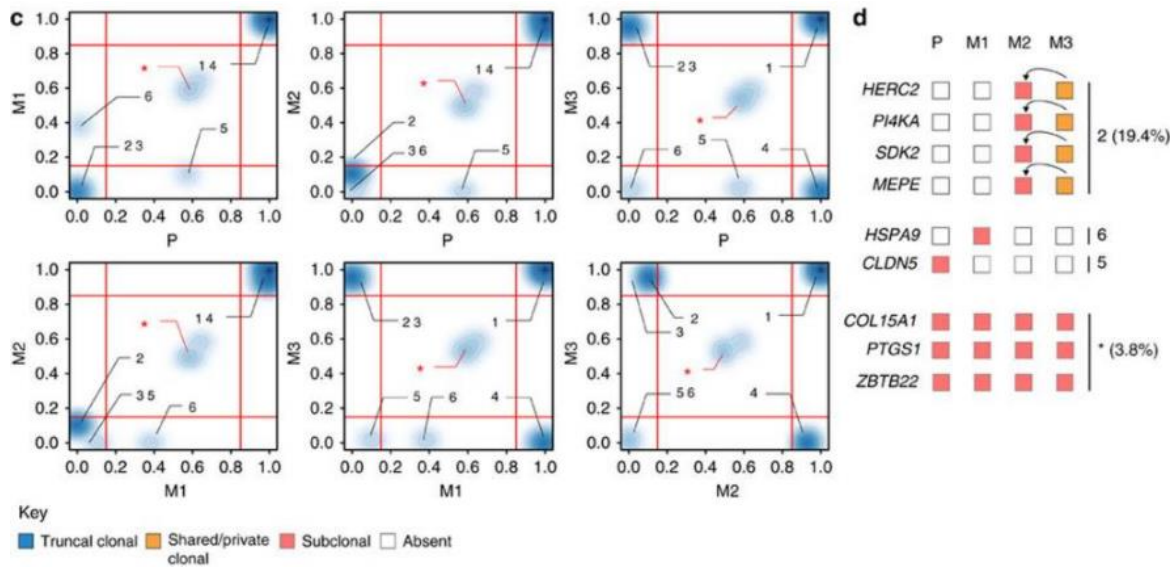
A 20. számú páciens esetében az SNV-ken alapuló fa szerint a primer tumor (P3) az agyi (M1) és máj áttétek (M2) egy klaszterben helyezkedtek el. Ettől a két kivételtől eltekintve a primer tumorból származó minták egy külön klaszterre lokalizálódva, a távoli áttétektől különállóan helyezkedtek el.

IV.B.5 Több szórás esemény a primer tumorból

A “metasztatikus prekursor” ellentéte biológiai és klinikai szempontból is a 4. számú páciens esete. A betegnél 38 éves korában diagnosztizáltak lokálisan előrehaladott emlődaganatot, mely TN IBC NST-nek bizonyult. Státuszrögzítő képalkotó vizsgálatokkal multiplex tüdő, máj és csontáttétek kerültek leírásra. A beteg igen gyenge általános állapotára való tekintettel onkológiai kezelés nem volt kivitelezhető, a páciens a diagnózis után egy hónappal elhunyt. Tanulmányunk keretein belül végzett részletes genetikai vizsgálat eredményeként került sor a BRCA1-csíravonalbeli mutáció igazolására. A primer tumor (P) és a távoli áttétek vizsgálatakor két, egymástól teljesen független szórás eseményt találtunk a petefészekbe (M3) és a májba (M1) (21. ábra).



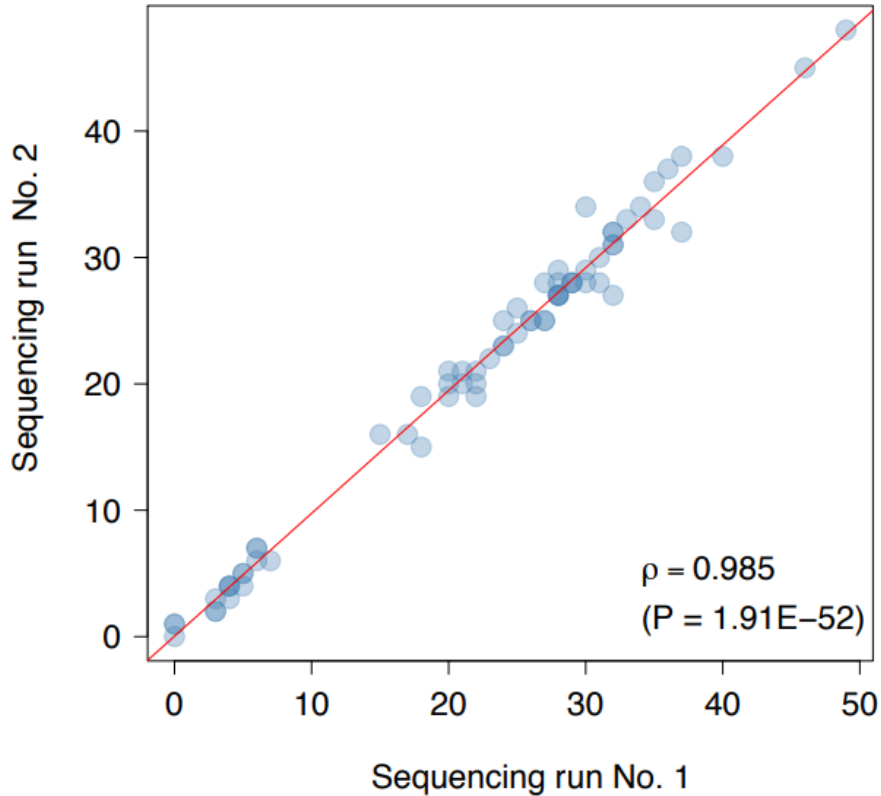
21.a-b. ábra: A 4. számú beteg emlőrákos progressziójának filogenetikai rekonstrukciója. (a) a vizsgált daganatos léziók anatómiai elhelyekedése, (b) a CNA-k és SNV-k elemzésével kapott kombinált filogenetikai fa.



21. c-d ábra: A 4. számú beteg emlőrákos progressziójának filogenetikai rekonstrukciója. (c) a 4. szintű SNV-k klonális frekvenciáinak párszerinti összehasonlítása. A filogenetikai fa ágait 1-6-ig számoztuk **b** panelen, a mutációk helye a párszerinti összehasonlításban a **c** panelen jelölt alapján. A 2.szegmensben lévő mutációk klonális frekvenciában voltak jelen az M3-ban, szubklonális frekvenciában az M2-ben: ez horizontális szórásra utal, melyet piros vonallal emeltünk ki (2) a **b** panelen. A (**d**) panelen láthatóak a lehetséges megoldásokat tartalmazó esetek. Összesen mindössze 3 mutáció volt a megmagyarázhatatlan * konfigurációban, egy az 5, egy a 6 és tizenkettő a 2-es konfigurációban. A * konfigurációban lévő mutációk kizárása nem befolyásolja a filogenitász topológiáját. A **d** panelen zárójelben látható számok mutatják az összes 4. szintű SNV arányát.

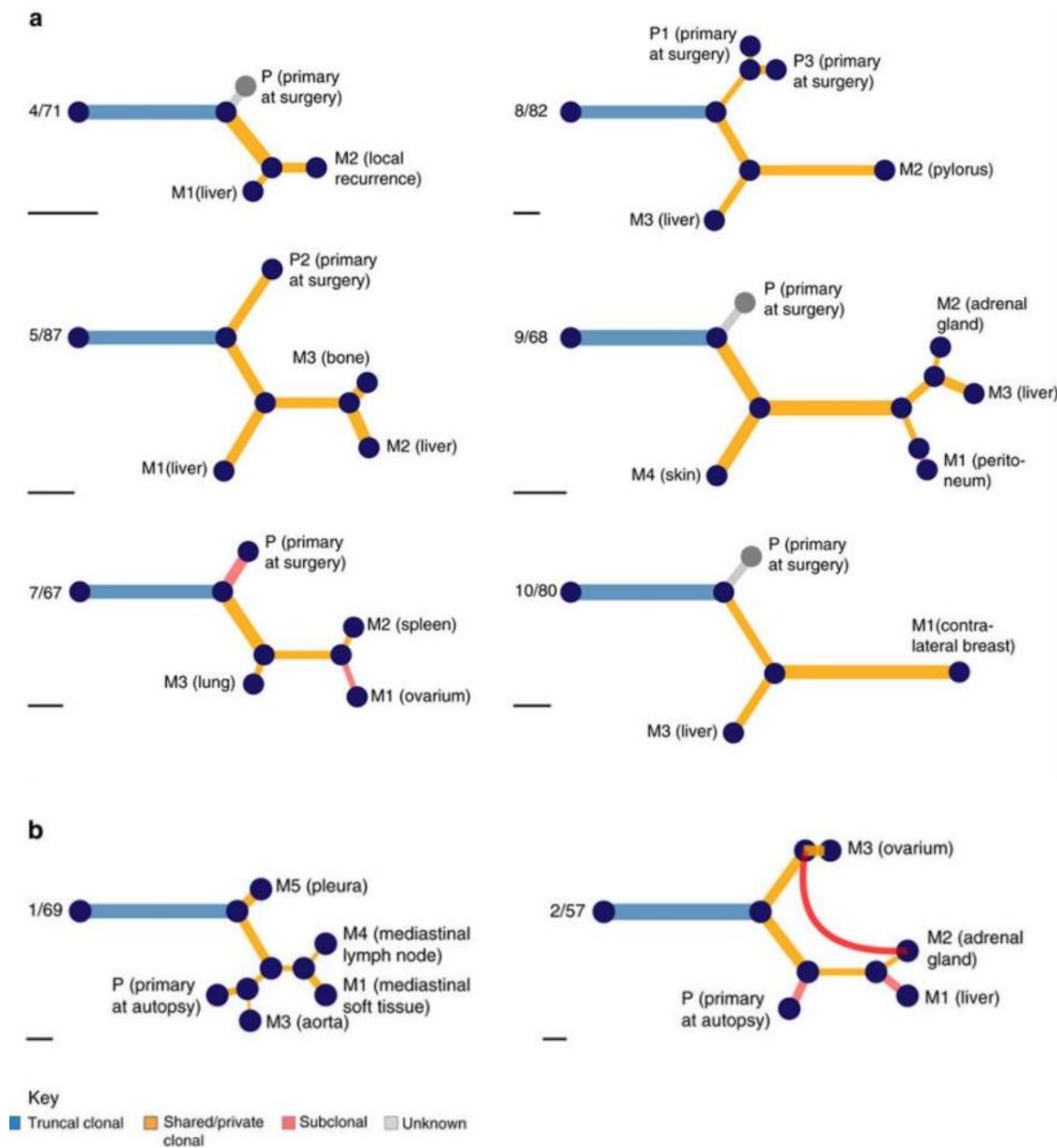
A CNA-n alapuló filogenetikai rekonstrukcióval megállapítottuk, hogy a mellékvese áttét (M2) a májattéttel közös prekuzorból származott (21.b ábra). Azonban a mellékvese áttétben megtalálhatóak voltak olyan SNV-k, melyek a primer tumor – májattét ág késői eltérései voltak, valamint olyan SNV-eket is detektáltunk, melyek kizárólag a petefészek áttétre voltak jellemzőek. A 4. szintű SNV-k klonális frekvenciáinak párszerinti összehasonlítása alapján a 4. szegment (azaz a primer tumorhoz és májattétéhez tartozó)

szintén megtalálható volt a mellékvese áttétben (21.c ábra), amit a CNA profilok vizsgálata során kapott eredmények is alátámasztottak. A “késői” SNV-k, melyek a petefészek áttétbe tartoztak (2. szegment) szubklonális frekvenciában megtalálhatóak voltak a mellékvese áttétben. Az M2 mintát újra szekvenáltuk és ismét a korábbival megegyező eredményt kaptuk (22. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy a keringő metasztatikus sejtek, melyek a petefészekáttétből indultak el, horizontálisan újra szórták a már áttétes mellékvese szövetet. Ezzel igazoltuk, hogy emlőrákban is előfordul tumor-önszórás (tumor self-seeding)¹⁰⁶. A jelenség korábban petefészek¹⁰⁷- és prosztatarákban⁷² került leírásra.



22. ábra: Az SNV-k variáns allél frekvenciáinak pontos meghatározása. A 4. számú beteg mellékvese metasztázisának két különböző szekvenálási folyamatban nyert SNV VAF (%)-nak összehasonlítása. Ennek alapján megfelelő szintű konkordanciát találtunk.

A másik, előrehaladott stádiumban diagnosztizált emlődaganatban szenvedő páciens (8-as számú) ugyancsak elhunyt a diagnózist követő hetekben, így nem kerülhetett sor onkológiai kezelésre. A primer tumort az áttétek melletti clusterben találtuk meg (23. ábra).



23. ábra: A kombinált filogenezis metasztatikus progresszióra utal 8 betegben. (a)

A korai stádiumban diagnosztizált betegek tumorainak filogenezise, akik sebészi

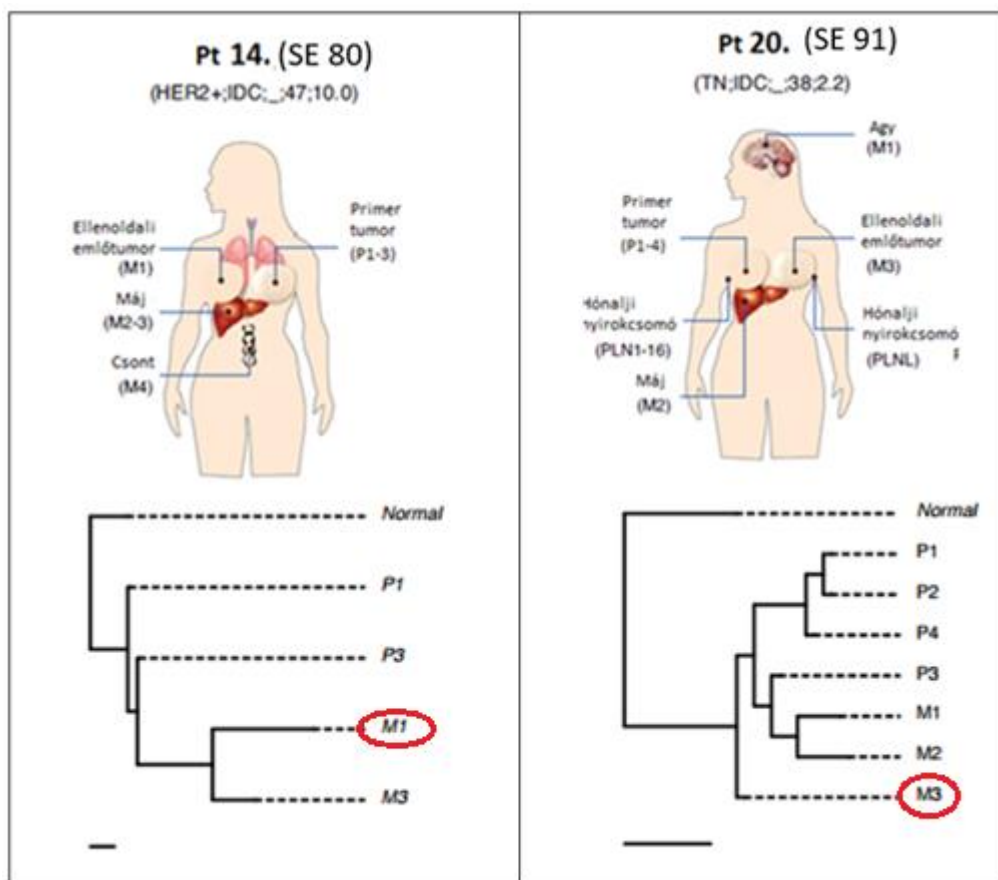
beavatkozáson majd ezt követően kemoterápiás kezelésem át, valamint (b) előrehaladott stádiumú, terápia naív illetve metasztatikusan diagnosztizált betegek tumorainak filogenetikai fáit. A korábbi ábrákkal megegyező színkódot használtunk a „korai” és „késői” események jelölésére. Vizuális okok miatt a fák sávbeosztásait úgy változtattuk meg, hogy a különböző fák törzsei egyforma hosszúak legyenek. A fák alatt található mérővonalak 10 SNV-t jelenítenek meg, segítségükkel a fa hozzára következtethetünk. A 9. és 7. számú betegeknél a primer műtét során eltávolított primer tumormintákon exom szekvenálás történt, az 1. szintűnek vélt mutációkat Sequenom MassARRAY-val validáltuk, majd ultra-mély amplitikon szekvenálást végeztünk. A vonatkozó SNP array-k eredményei alapján ezen két minta CCF értéke alacsonyabb volt, mint a határértéknek beállított 30%-os érték. Így ezen két mintában a 3. szintű SNV-eket felhasználtuk az SNV filogenetikai fa képzéséhez, mivel ezek a léziók a metasztatikus betegség diagnózisa és az autopszia előtt évekkal kerültek detektálásra. Ehhez hasonlóan, a no. 14-es beteg primer tumorából származó minták nem feleltek meg a 3. szintű SNV-eknél megállapított minőségi kritériumoknak. Mindezek miatt az ezen pontokhoz vezető ágak vastagsága irreleváns, ezeket szürke színnel jelöltük.

Hasonló korai szórás találtunk (primer tumorból a pleurára a no 8. esetben, valamint a primer tumorból a petefészekbe a no 4. esetben), melyet késői szórás esemény követett a primer tumorból mindkét esetben (a no 8. esetben az aortafalba, a no 4. esetben a májba) illetve egy másik távoli áttétből (gátori lágyszövet metasztatizációból gátori nyirokcsomóba és fordítva a no 8. esetben illetve a májból a mellékvesébe és fordítva a no 4. esetben).

IV.B.6. Ellenoldali emlőtumorok – metasztatikus depozitok?

Két páciensünk esetében fordult elő metakron ellenoldali emlőtumor; a 20-as számú beteg esetében egy évvel, a 14-es beteg esetében 10 évvel a primer diagnózist követően (24. ábra). A 20. esetben a 3. szintű SNV-ken alapuló filogenetikus rekonstrukció alapján a kontralateralis tumor (M3) volt a legkorábbi leágazódás, de jelentős arányban tartalmazott a

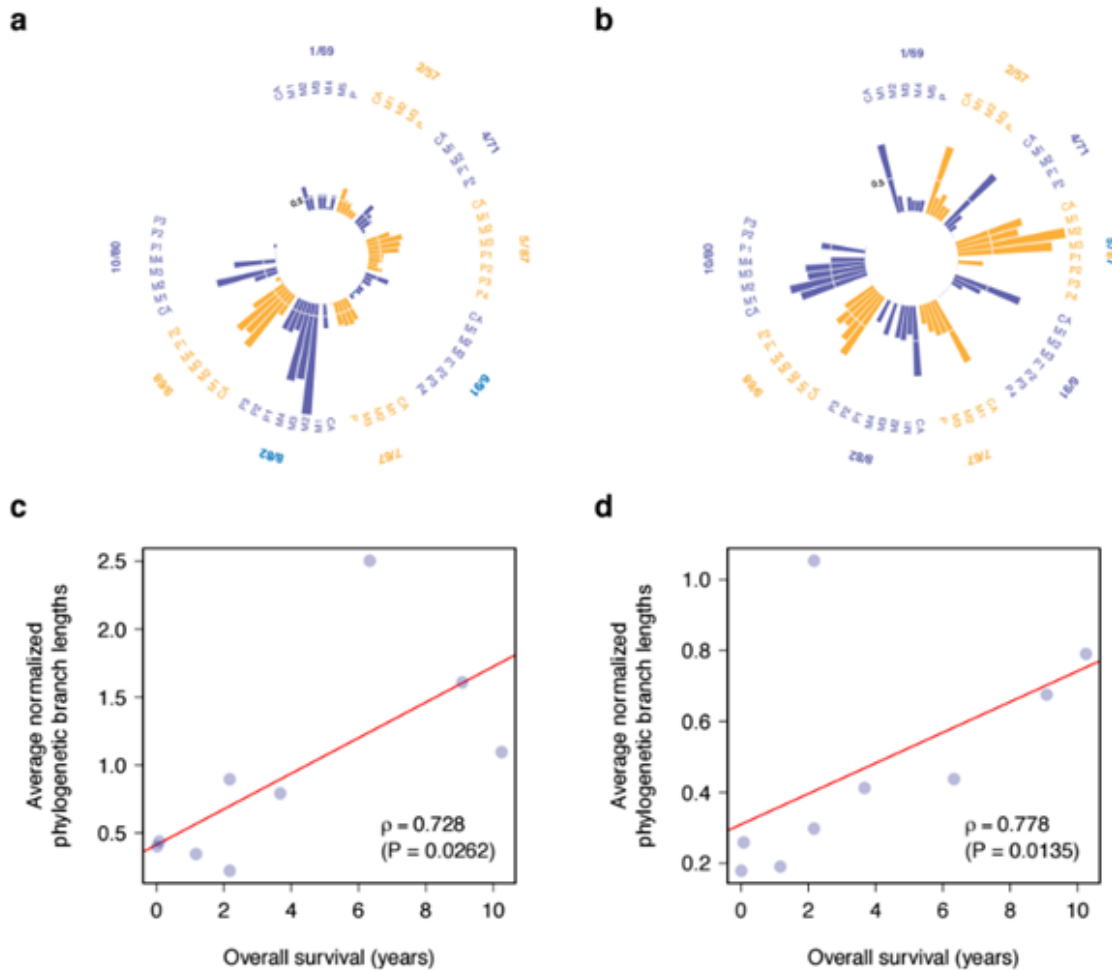
törzsből származó SNV-eket. Ezzel szemben a 14.esetben a CNA profil alapján a kontralaterális emlőtumor (M1) abból a leány lézióból (daughter lesion) származik, mint a májban detektált áttétek (M2 és M3). Mindazonáltal mind a két esetben kimutattuk, hogy klonális kapcsolat állt fenn az eredeti emlőrák és a kontralaterális emlőtumor között. Ez megkérdőjelezi annak a gyakorlatnak a létjogosultságát, mely a metakron kontralaterális tumorokat második primer tumorként kezeli. Mivel a kezelési algoritmusok élesen különböznek, amennyiben egy második primer tumorra illetve egy távoli áttéttel állunk szemben, fontosak azok a vizsgálatok, melyek a kontralaterális emlőtumorok “eredetét” vizsgálják, azt hogy jellemzően az eredeti daganat metasztatikus depozitjai vagy második primer tumorok.



24. ábra: Ellenoldali emlőtumorok, mint metasztatikus depozitok. Az ábra két oldalán a két beteg és a minták filogenetikai fái láthatóak

IV.B.7 A genomikai eltérések evolúciója a progresszió során

Minden minta esetében kiszámoltuk a normalizált filogenetikai ágak hosszát, mely a közös őstől az adott lézióig terjedő távolság és a közös törzs aránya (25a-b. ábra). Ez mutatja meg a genomikai eltérések mértékét, melyek az első metasztatikus eseményt követően alakultak ki, a progresszió módjától függetlenül. Kevés kivételtől eltekintve a 3. szintű SNV-k esetén tapasztalt minta tükrözte a CNA-k vizsgálatokor kapott eredményt. A 8, 4, és 9-es számú esetekben, akik a diagnózist követően egy éven belül elhunytak a betegség következtében, az evolúciós változások döntő többsége a filogenetikai fa törzsén, korán alakultak ki. Ezzel ellentétben, a hosszabb betegségstörténettel rendelkező páciensek (15., 7. és 10-es számú) esetben az SNV profil alapján az evolúciós változások többsége “későn” alakult ki, nem illeszthető egy rendszerbe a CNA-val (uncoordinated). A 25. ábra c-d panelek mutatják az átlagos normalizált filogenetikai ághossz és az OS összefüggését. Bár az esetszámunk alacsony, pozitív korrelációt találtunk mind a CNA-k, mind az SNV-k vizsgálatokor, azaz minél nagyobb átlagos normalizált filogenetikai ághosszt találtunk, annál hosszabb OS adódott.

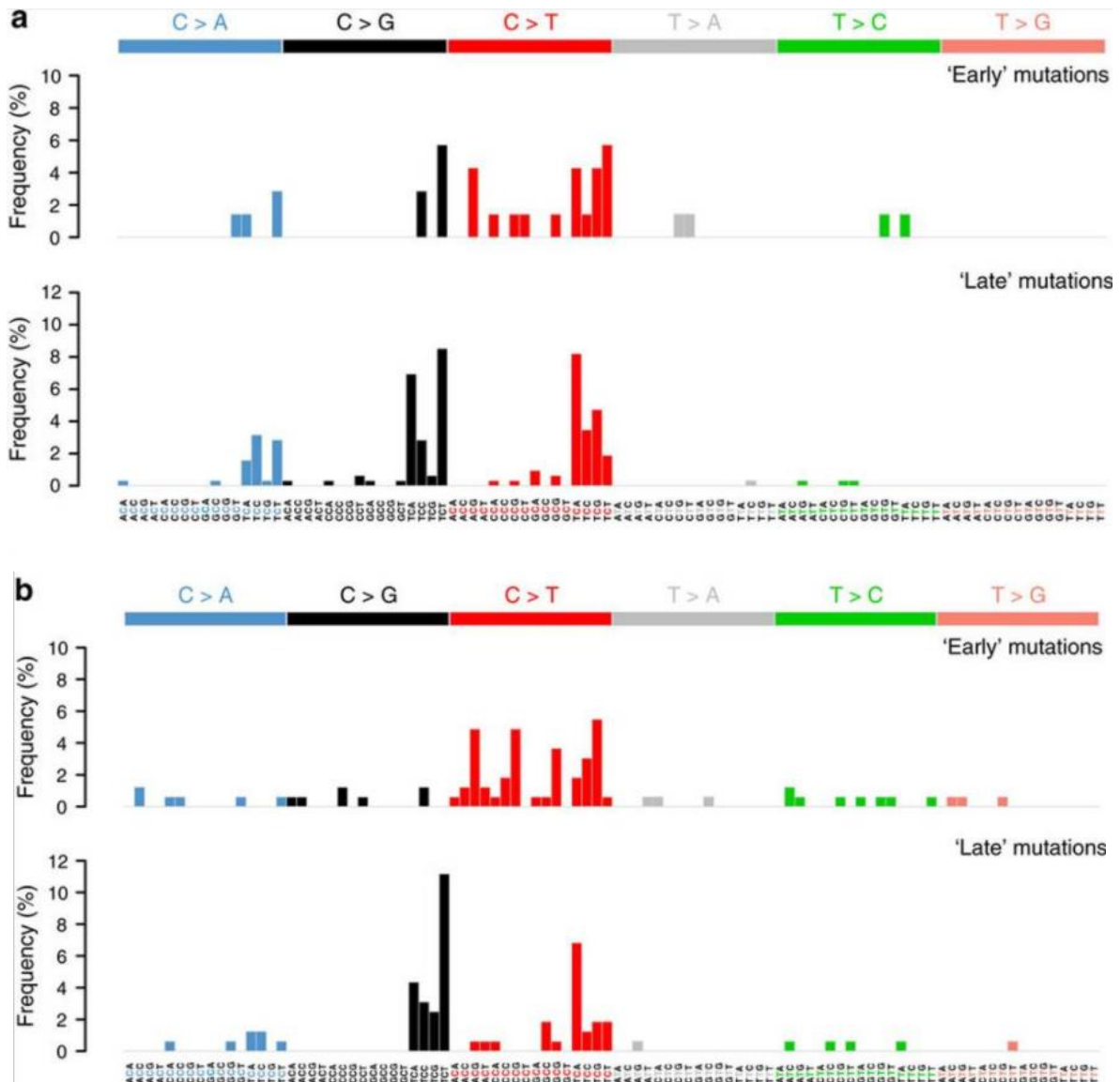


25. ábra: Genomikai változások dinamikája a metasztatikus progresszió során.

Normalizált filogenetikai távolság minden egyes vizsgált mintánál. Ezeket úgy kaptuk, hogy a közös őstől az adott mintáig terjedő vonal hossza a fa törzséhez viszonyítva (a) SNV-kenél és (b) CNA-kenél. (c,d) az átlagos filogenetikai távolság és a teljes túlélés összefüggése SNV-k és CNA-k esetén, egyenként.

A 15. és 14. számú esetekben magas mutációs terhet (burden) találtunk, melyben emelkedett C<T szubsztitúciós számot detektáltunk az NpCpG trinukleotidok esetén. Ez a szubsztitúciós minta emlékeztet az Alexandrov és mtsai munkájában leírt 13-as mutációs lenyomatra¹⁰⁸. A

26.a-b ábra mutatja a törzsön jelentkező, azaz “korai” és az ágakon lévő, azaz “késői” szubsztitúciókat a fenti két beteg esetében az evolúciós kaszkád során. Így előfordulhat, hogy legalább ennél a két betegnél a citidin deaminázok, az APOBEC család aktivációja okozta a mutációk felhalmozódását, mely az SNV és a CNA profil közötti nagy eltérés kialakulásához vezetett. A 14. számú esetben egy “korai” mutációt találtunk a 22-es kromoszóma APOBEC clusterében, míg a 15. számú betegnél egy “korai” *APOBEC3B* D316N mutációt találtunk.



26. ábra: A szubsztitúciók eloszlása metasztatikus progresszióban. A különböző típusú szubsztitúciók frekvenciái 3. szintű SNV-kben (a) a 15-ös és (b) 14-es páciensnél. Ezeket “korai” illetve “késői” csoportokba osztottuk annak megfelelően, hogy a vonatkozó filogenetikai fákon hol helyezkedtek el.

V. MEGBESZÉLÉS

Általános megfigyelés, hogy az áttétes stádiumban adott citosztatikus illetve célzott kezelésekre egy adott idő után a betegség rezisztenssé válik, a korábban zsugorodó vagy stabil elváltozások növekedésnek indulnak, illetve új elváltozások jönnek létre. Emiatt a primer tumorok és távoli áttétek összehasonlító elemzése klinikai szempontból is igen fontos kérdés, néhány betegségben, mint pl. a pancreas, a prostata daganatai esetén már genetikai / genomikai szinten is vizsgált kérdés. A témában megjelent vizsgálatok többsége általában kis esetszámú, illetve egy primer tumorhoz csak kevés, rendszerint egy távoli áttét mintát rendel hozzá.

Vizsgálatunk célja az volt, hogy mélyebb betekintést nyerjünk az emlőrák progressziójának folyamatába a primer emlőtumorok és azok távoli áttéteinek vizsgálatával. Mivel tanulmányunkban autopszia során vett mintákkal dolgoztunk, elegendő mennyiségű szövet állt rendelkezésünkre, valamint a legtöbb, emlőrákban jellemző távoli áttét által érintett szervet vizsgálni tudtuk. Így azt mondhatjuk, hogy mintánk reprezentatív az emlőrákban elhunyt populáció vizsgálatára. Mivel teljes blokkokat vizsgáltunk, illetve amennyiben lehetőségünk volt rá, teljes műtéti anyagot, elég nagy valószínűséggel kizártuk a tumor heterogenitásból eredő hibalehetőségeket. Az IHC vizsgálatokat minden esetben a műtéti anyag reprezentatív blokkján végeztük. Amennyiben egy távoli szervből több különböző lokalizációból volt mintánk, ezek közül az egyiknél végeztük el az IHC és FISH vizsgálatokat.

V.A Immunhisztokémiai vizsgálatok

Primer tumorok jellemzése

Az általunk elemzett beteganyagban túlréprezentáltak voltak az ismertén agresszív emlőrákok, mint pl a TNBC, fiatalkori emlőtumorok, valamint igen magas arányban fordultak elő a diagnózisukkor már áttétes stádiumban lévő tumorok. Mivel vizsgálatunk retrospektív, Intézetünkben a klinikai gyakorlat szerint autopsziára kerülő esetek álltak rendelkezésünkre – ezek a különösen agresszív, rapid lefolyású illetve lezáratlan kérdéseket

hagyó esetek voltak. Ismert, hogy az emlőrák jellemzően a középkorú nőket érinti, a 35 év alatti betegek aránya 4% körüli értéken mozog¹⁰⁹. Ezzel szemben vizsgálatunkban ez az arány 16% volt, míg 40 év alatti volt a betegeink 28%-a. Ehhez hasonlóan a TNBC aránya az irodalmi 15-20% körüli értékkel²³ szemben esetünkben 32% volt. Természetesen ez a két változó egymástól nem független, hiszen ismert, hogy fiatal korban gyakrabban fordulnak elő TN emlőtumorok. A pleiomorf ILC-k igen ritkák, előfordulási arányuk a teljes emlőrákos populációban 1% alatt van. Ez a jellemzően agresszív es rossz prognózisú forma¹¹⁰ 2 betegünkénél is előfordult, mely 8%-os gyakoriságot jelent.

Primer emlőtumorok és távoli áttétek összehasonlítása

A távoli áttétek lokalizációja szempontjából is reprezentatívnak tekinthető a mintánk, mivel az emlőrák által gyakran érintett szervekből származott az általunk feldolgozott áttétek többsége, ennek megfelelően hasonló arányokat találtunk, mint a nagyobb esetszámot feldolgozó vizsgálatok^{32,111}. A klinikai dokumentáció alapján a mi beteganyagunkban is a csontáttétek fordultak elő leggyakrabban, azonban azokból nem minden esetben történt mintavétel. Ritkán tapasztalt eset, amikor csak egy távoli szervben alakul ki áttét, ez leggyakrabban csontmetasztázisok esetén fordul elő¹¹². Tanulmányunkban 4 ilyen esetet detektáltunk, azonban nem a csontérintettség dominált ezen csoportban, hanem 3 betegnél máj, 1 betegnél tüdő áttétek voltak. DiSibio és mtsai nagy autopsziás beteganyagot feldolgozó tanulmányukban 41 különböző daganatos betegségben elhunyt páciens adatait elemezték, eredményeik alapján az emlőrák a sok távoli áttétet (több szervet érintő) adó malignitások közé tartozik; 432 betegünkénél összesen 2205 távoli áttét került leírásra 39 lokalizációban¹¹³. A mi beteganyagunkban is számos lokalizációban fordultak elő áttétek egy-egy betegben.

Ugyancsak többek által vizsgált jelenség, hogy a különböző emlőrák altípusok áttétképzési mintázata eltérő a metastázisok lokalizációjára szempontjából¹¹⁴, a jelenséget (természetesen egyszerűsített, tehát kizárólag immunhisztokémiai módszerek alapján meghatározott altípus beosztás alapján) mi is detektáltuk. Soni és mtsai vizsgálatában a lúminális fenotípus esetén

fordult elő ritkábban több szervet érintő távoli áttét¹¹⁵, a mi eredményeink alapján azonban ez a TN alcsoportban volt jellemző. A mi beteganyagunkban a HR+ tumorok esetében több szervben fordult elő áttét. Ennek oka lehet az, hogy ebben a csoportban több terápiás lehetőség áll rendelkezésre, a betegség kevésbé agresszív és így hosszabb a DFS és OS, emiatt több szervet érintő betegség kialakulására van lehetőség.

Az utóbbi évek egyik legnagyobb, autopsziás beteganyagot feldolgozó vizsgálata Cummings és mtsai nevéhez kötődik, akik egy mintegy 50 évet felölelő időszak autopsziás adatbázisát tekintették át³². 197 emlőrákban elhunyt beteget azonosítottak akiknél összesen 945 távoli áttétet találtak, 55 páciensnél immunhisztokémiai vizsgálatokat is végeztek. A leggyakrabban előforduló távoli áttétek a tüdő és pleura (80.7%), csont (74.1%), máj (71.6%) és távoli nyirokcsomók (54.8%) voltak. Tőkés és mtsai 490 beteg mintáit és adatait elemezték, az áttétek hasonló lokalizációkban fordultak elő, mint az általánosan vizsgált anyagban. Eredményeik alapján a Luminalis A csoportban volt a leghosszabb, míg HER2 pozitív betegségben a legrövidebb a DFS (39 vs 21 hónap, $p=0,012$)¹¹⁶.

Cummings és mtsai illetve DiSibio és mtsai eredményeihez hasonlóan mi is nagy arányban detektáltunk HR vesztést a betegség progressziója során, melynek hátterében több dolog is állhat.

- i. Vizsgálatunkban a metasztázisokból származó mintavétel a betegség lefolyásának, történetének a végén történt, emiatt a legtöbb esetben elegendő idő telt el ahhoz, hogy az áttétek szignifikánsan különbözzenek a jellemzően több évvel korábban operált primer tumortól mind génexpressziós mintázat, mind immunfenotípus szempontjából.
- ii. Vizsgálatunkban a legtöbb esetben egy beteghez tartozó több távoli áttétet is vizsgáltunk, mely ugyancsak nagyobb esélyt ad arra, hogy a HR vesztést detektáljuk; amennyiben a páciens bármely áttétében – legyen az akár csak egy elváltozás – HR vesztést azonosítottunk, az esetet már diszkordánsnak neveztük.

- iii. A háttérben állhat az endokrin terápiára kisselektálódó rezisztens klónok térnyerése is, mely azután távoli áttétet képezve HR negatív metasztázisokat is létrehozhat. Ogba és mtsai állatmodellje alapján a HR vesztés a betegség progressziójának eredménye, melyben fontos szerepe lehet a tumor dormancia kialakulásának is. Az, hogy nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést az endokrin terápia és a HR vesztés között, valószínűleg az alacsony betegszám következménye.
- iv. Technikai problémák (nem rapid autopsziák, fixációs problémák) ugyancsak állhatnak a háttérben, azonban ezt nem tartjuk valószínűnek, mivel azon esetekben, melyekben rendelkezésünkre állt biopsziás illetve metasztazektómiás minta, minden esetben ezzel megegyező eredményt kaptunk az autopszia során vett mintákon történt vizsgálatokkal is.

Vizsgálatunk egyik kérdése az volt, hogy le tudunk-e írni egy, az immunstátusz változás és az áttétek anatómiai lokalizációja közötti összefüggést.

- i. Eredményeink és korábban megjelenő kutatások alapján is az azonos primer tumorhoz tartozó metasztázisok jobban hasonlítottak egymásra, mint a primer tumorra¹¹⁷. A különböző lokalizációjú áttétek között szignifikáns különbséget nem találtunk sem régió, sem szervrendszer, sem szerv lokalizációban (azaz pl. a mellkasi vs hasi, KIR vs emésztőrendszer, tüdő vs agyi áttétek között nem találtunk különbséget immunfenotípus szempontjából.)
- ii. A hasüregben az ER és PR vesztés is gyakori volt, a mellkasban a PR vesztés volt szignifikánsan kimutatható a primer tumorhoz képest. A hasüregi szervek közül a máj, a mellkasban a tüdő volt a leggyakrabban metasztázis által érintett lokalizáció (19 illetve 12 esetben), csak ezen szervek esetében detektáltunk szignifikáns változást az immunfenotípusban a primer daganathoz viszonyítva. Ennek magyarázata lehet az is, hogy itt rendelkezünk kellően nagy esetszámmal, és valószínűsíthető az, hogy amennyiben elegendő esetünk lenne a többi

lokalizációban is, több szervnél is hasonló eredményt kapnánk. Erre utal az is, hogy Ogba és mtsai eredményei alapján a fenotípus változás nem szerv-specifikus¹¹⁸.

- iii. Nishimura és mtsai Ki67 emelkedést detektáltak a távoli áttétekben a primer tumorokhoz viszonyítva¹¹⁹. Ezzel szemben mi szignifikáns különbséget csak a csontáttétek csoportjában tudtunk kimutatni, ahol is a Ki67 csökkent a primer tumorhoz képest. A csontáttétek esetében EDTA oldatban történő fixálást végeztünk, melynek eredménye a szöveti antigenitás és szöveti fehérjék megőrzése. Tőkés és mtsai primer emlőtumor és távoli áttét minták (47 primer, 59 áttét, melyből 37 pár) ki67 expresszióját vizsgálták; a központi idegrendszeri áttétekben szignifikáns Ki67 emelkedést detektáltak a primer tumorhoz viszonyítva, míg tüdő és csontáttétek esetében nem találtak különbséget¹²⁰.

Távoli áttétek

Vizsgálatunk ezen részének legérdekesebb eredménye a HR-ok szempontjából heterogén áttétekkel bíró páciensek köre. Annak ellenére, hogy ez csak a betegek kis hányadában fordult elő, fontos megállapítás, mivel a jelenlegi ajánlások szerint egyetlen távoli áttétből vett minta alapján határozzuk meg a páciensek kezelését, választjuk ki a következő vonalbeli terápiát. Eredményeink alapján minél hosszabb idő telt el a primer diagnózis és az adott távoli áttét kialakulása között, annál nagyobb a valószínűsége annak, hogy az áttét különbözik a primer tumortól. Ennek alapján indokolt lehet a betegség folyamán, különösen hosszú progresszió esetén a többszöri mintavétel az áttétekből.

DFS és OS

A legtöbb vizsgálat, mely a HR státusz változása és a túlélés összefüggését vizsgálta, azt találta, hogy a HR státusz változás esetén a páciensek prognózisa rosszabb, melyre két valószínű magyarázat áll rendelkezésre.

i., Azok, akiknél HR pozitív betegséget diagnosztizáltak majd a progresszió során HR vesztés történt, a betegség egy agresszívabb, kevesebb terápiás lehetőséggel kordában tartható formába alakult át.

ii, A kezdetben félrediaosztizált, álnegatív primer tumorok prognózisa (melyek ennek eredményeként nem részesültek endokrin terápiában) ugyancsak rosszabb, mint a kezelt HR pozitív eseteké¹²¹.

A mi eredményeink látszólag ennek ellentmondanak; jobb prognózist detektáltunk a HR vesztő csoportban. Ennek oka az lehet, hogy vizsgálatunkban a kis esetszám miatt az összes beteg túlélését vizsgáltuk együtt, az eredetileg HR pozitív alcsoport külön vizsgálata statisztikailag nem volt értékelhető (4 vs 13 eset volt az immunfenotípust nem váltó vs váltó csoportokban). A konkordáns csoportunkban igen nagy arányban fordultak elő TN daganatok, melyeknek ismertén rosszabb a prognózisa, mint a HR pozitív csoportnak.

V.B Nukleotid szintű vizsgálatok

A vizsgálat második részében filogenetikai módszereket alkalmaztunk az emlőrák progresszió evolúciós történetének a meghatározására. Ehhez Intézetünk Autopsziás Adatbázisában szereplő, fenti 25-ből 10 beteg mintáit vizsgáltuk. A korábbi vizsgálatokkal ellentétben, melyek “egyetlen távoli áttét-primer tumor” párokat illetve több távoli áttétet de maximum két beteget vizsgáltak, a mi vizsgálatunk sikeréhez illetve új eredmények megtalálásához elkerülhetetlen volt a nagyobb számú minta, hogy tanulmányozni tudjuk a metasztatikus progresszió alapját képező disszeminációs utakat. Feltéve, hogy a vizsgált genomikai eltérések teljes mértékben klonálisak, a minták filogenetikai elemzése segíthet abban, hogy az egyes metasztázisok származását követni tudjuk egy betegen belül.

A disszemináció formái

Vizsgálatunkban két lehetséges forgatókönyvet tapasztaltunk. A gyakoribb az volt, amikor egy sikeres szórás esemény történt a primer tumorból, majd metasztázisból metasztázisba kaskád-szerű disszemináció történt. A második, általunk ritkábban tapasztalt áttét képzési mód az volt, amikor több szórás esemény történt a primer tumorból amellet, hogy a metasztázisból metasztázisba szórás is megtörtént. Ez a kettősség megjelent a betegségek klinikai lefolyásában is (a 17. számú beteg kivételével), amennyiben a közös metasztatikus eredet (common metastatic origin) a korai emlőrákokra volt jellemző, míg az áttétes stádiumban diagnosztizált elváltozásokra a többszörös szórás volt jellemző. Hasonlóak Gundem és mtsai eredményei, akik 10, metasztatikus prosztatákban szenvedő beteget vizsgáltak, céljuk a primer léziók és azok áttéteinek szubklonális architektúrájának megalkotása volt teljes genom szekvenálással⁷². Bizonyos esetekben csak lineáris szórás tudtak kimutatni, más betegeknél a lineáris mellett polikonális terjedés is előfordult, és olyan esetet is leírtak, ahol szubklónok jelenléte metasztázis-metasztázis szórásra utalt. Több betegnél azonosítottak olyan klónokat, melyek a primer tumorban szubklónként voltak jelen, de a távoli áttétekben dominánsá váltak. Emellett kimutatták, hogy a távoli áttétek közelebb álltak genetikailag egymáshoz, mint a primer tumorhoz.

Hong és munkatársai is prosztatárakos betegek mintáit vizsgálták, és leírták, hogy egy primer tumorból több különböző időpontban is elindulhatnak metasztatikus klónok, mely felveti a primer tumor rezekciójának szükségességét akár előrehaladott esetekben is. Emellett még egy fontos megfigyelésük volt egy esetük kapcsán; a betegnél az egyik távoli áttétből származó klón szórta meg a prosztatektómia helyét és hozott létre lokális recidívát⁷¹.

Primer tumor eltávolítása metasztatikus stádiumban

A primer tumor eltávolításának kérdése áttétes emlőrákkal diagnosztizált betegek esetében nem tisztázott, jelenleg nem áll olyan evidencia szintű adat rendelkezésre, mely szerint ez

javítana a betegek túlélésén. Korábbi vizsgálatok eredményei alapján a primer tumor sebészi eltávolítása elősegítheti a mikrometasztázisok növekedését^{59,61,62}. A közelmúltban két prospektív vizsgálat eredményeit is közölték, melyek a IV. stádiumú betegenél vizsgálták a primer tumor eltávolításának hatásait. Badwe és mtsai 350 olyan beteget randomizáltak nyílt, kontrollált vizsgálatukba, akiknél elsővonalbeli kezelésre klinikai válasz alakult ki, ezután 173 beteg részesült lokoregionális kezelésben (locoregional treatment, LRT), 177 betegnél nem végeztek primer tumor eltávolítást (no locoregional treatment, NLRT)¹²². A pácienseknél nem találtak különbséget a túlélés tekintetében: 23 hónapos medián követési időnél a medián OS 19.2 vs 20.5 hónap ($p=0.79$) volt az LRT vs NLRT csoportokban, egyenként; a 2 éves OS 41.9% vs 43% volt az LRT vs NLRT csoportokban. A másik egy III. fázisú vizsgálat volt, melyben a terápia naív pácienseket szisztémás terápia (ST) vs lokoregionális kezelés + szisztémás terápia (LST) karokra randomizálták ($n= 136$ vs 138)¹²³. A 36 hónapos OS hasonló volt a két csoportban (51 vs 60%, $p=0.5$), azonban alsocsoport analízis során azonosítottak egy olyan betegcsoportot (ER+ HER2- immunfenotípus, szoliter csontáttéttel), akiknél túlélési előnyt hozott a primer tumor eltávolítása, azonban az eredmény nem volt szignifikáns. Ezzel szemben viszcerális (máj és tüdő) áttétek esetén a sebészi beavatkozás mellett rosszabb túlélést tapasztaltak. Ezek alapján a kérdés még nem kellően tisztázott, az viszont körvonalazódik, hogy bizonyos betegeknél (ER+, HER2- immunfenotípus és szoliter csontérintettség) a primer tumor eltávolítása túlélési előnyt hozhat, míg kiterjedt, viszcerális betegségben a szisztémás kezelés preferálandó. A mi vizsgálatunk eredményei alapján logikusnak látszik, hogy a primer tumor eltávolítása csökkentheti a metasztatikus disszemináció lehetőségét.

Áttétek sebészi rezekciója

Hasonlóképpen, nincsen olyan erős evidencia, amely alátámasztaná, hogy oligometasztatikus stádiumban (OMBC) a metasztázisok rezekciója hosszabb betegség specifikus túléléssel járna. Eredményeink alapján azonban a távoli áttétek a szóródás folyamatos forrásául szolgálnak és ilyen módon a betegségre jellemző még nagyobb heterogenitáshoz is

hozzájárulnak. A vizsgálatunkban szereplő betegcsoport túl kicsi ahhoz, hogy a jelenlegi gyakorlatot megváltoztató következtetéseket vonjunk le belőle, eredményeink mégis alátámasztják azt az elképzelést, mely szerint egy-egy izolált metasztázis eltávolítása a beteg javára szolgálhat bizonyos esetekben. Az eddig megjelent tanulmányok alapján OMBC-ben a tumor(ok) sebészi eltávolítása majd utókezelés együttes eredményeként a betegek akár hosszú évekre is tünetmentessé tehetőek. Kobayashi és mtsai retrospektív elemzésükben az OMBC-t a következőképpen definiálták: maximum 2 szervben jelenlévő metasztázis, kevesebb, mint 5 lézió/szerv, a léziók átmérője <5cm. Kemoterápiával elért klinikai válasz (CR illetve PR) esetén sebészi beavatkozás illetve sugárkezelés történt. Multivariáns analízissel azon betegeknél találtak hosszabb PFS-t, akiknél egy szervet érintett a betegség, történt lokális kezelés és rövidebb volt a betegségmentes intervallum (disease free interval, DFI)⁶⁴. Greenberg és mtsai retrospektív vizsgálatukban 1581, metasztatikus emlőrákkal kezelt beteg adatait dolgozták fel, közülük 263 (16.6%) esetben alakult ki komplett remisszió (CR) a terápiára adott válaszként, 49 páciensnél (3.1%) ez legalább 5 éven keresztül fennált (hosszútávú CR csoport). Ez utóbbi csoportra jellemző volt a premenopauzális státusz, fiatalabb életkor, kisebb tumortömeg és jobb teljesítmény-státusz⁶³. A rizikóbecslés alapján a progresszió esélye lényegesen csökkent 3 év elteltével, azonban 10 beteg esetében (20.4%) második primer tumor alakult ki. Ahogy a célzott terápiák és citosztatikumok kombinációjával egyre jobb terápiás választ tudunk elérni, indokolt lenne tesztelni azokat oligometasztatikus stádiumban is, illetve pontosabban azonosítani azt a populációt, akiknél hosszan tartó CR elérésére van esély¹²⁴⁻¹²⁶. Mind a primer tumor, mind az áttétek rezekciója IV. stádiumban kérdéseinek megválaszolásához nagy esetszámú, prospektív klinikai vizsgálatok szükségesek.

Metakron ellenoldali emlőtumorok

Eredményeink alapján az ellenoldali emlőben kialakult “második” tumorok genetikai kapcsolatban álltak az elsődleges emlődaganattal, azaz annak távoli áttétei voltak. Ez egybeesik más munkacsoportok eredményeivel, akik ugyancsak leírták a jelenséget¹²⁷.

Ezek alapján is lényeges, hogy metakron ellenoldali emlődaganat esetén alapos, egész testre kiterjedő képalkotó vizsgálatok szükségesek, valamint indokolt olyan magasabb szintű genetikai vizsgálat, mely a két lézió között kapcsolat kérdésére választ tud adni. Mivel a második primer tumor és az áttétes betegség – akár oligometasztatikus stádiumban - kezelése eltérhet egymástól, fontos annak tisztázása, hogy adott esetben melyik helyzettel állunk is szemben.

Tumor önszórás

A tumor önszórás jelenségét emlőrákban eddig csak egér kísérletekben igazolták, ott viszont Kim és mtsai munkája során feltárára kerültek azok a gének; IL-6, IL-8, FSCN1 és MMP1, melyek az önszórás funkciójának beteljesítéséhez (hogy a dagantos szövet vonzza a keringő tumorsejteket, illetve, hogy azok is felismerjék és célként tekintsenek a daganatszövetre) fontosak.¹⁰⁶ Eredményeik szerint az önszórásnak emlőrákban is kiemelt szerepe van a daganatos progresszióban, melynek mélyebb megismerése a folyamatbe való beavatkozás, esetleges újabb célzott terápiák lehetőségét hordozza.

Genomikai eltérések evolúciója

Arra számítottunk, hogy a “késői” SNV-k és CNA-k számának növekednie kell, ahogy a távoli áttétek fejlődnek, és tovább módosulnak Ennek alapján adható egy körülbelüli becslés annak az időtartamnak a hosszáról, mely eltelt azóta, hogy az egyes elváltozások elváltak a közös őstől. Valóban, pozitív korrelációt figyeltünk meg a teljes túlélés és az átlagos normalizált filogenetikus ághosszak között. Ezt magyarázhatja az a tény, hogy a no. 8 és no 4.páciensek a diagnóziskor már metasztatikusak voltak és hozzájuk hasonlóan a no 9. betegnél is igen rövid DFS és OS értékeket találtunk. Ezzel szemben no 15., no 7. és no. 14. pácienseknél, akiknél a távoli áttétek több, mint 4 évvel a primer diagnózis után jelentkeztek, a késői “genomikai” eltérések mértéke összemérhető volt a betegek túlélésevel. Ezek az eredmények, melyek a várakozásoknak megfelelnek, arra utalnak, hogy a hosszabb betegségstörténettel rendelkező páciensek esetében az áttétek genetikailag távolabb állnak a

közös őstől vagy a primer származási tumorszövetből, mint a rövidebb betegségtörténettel rendelkező esetek. Elmondható tehát, hogy mind immunhisztokémiai, mind genetikai szinten kimutattuk, hogy minél hosszab idő telik el a primer tumor és a távoli áttétek kialakulása között, azok annál nagyobb mértékben különböznek a primer tumortól.

Egyre több bizonyítékot találunk az irodalomban a kezelés indukálta genomikai átalakulással kapcsolatban^{81,128-134} főleg az ESR1 és a PTEN eltérések esetén, melyek az endokrin terápiára és a PI3K-inhibitorokra kialakuló rezisztenciában játszhatnak szerepet. Vizsgálatunkban az 5 ER pozitív beteg közül 4 részesült aromatáz inhibitor kezelésben, azonban áttétekben nem tudtunk ESR1 mutációt kimutatni. PI3K kezelést egy beteg sem kapott, így az ezzel kapcsolatos rezisztencia mechanizmusokat nem tudtunk vizsgálni.

A metasztatikus genomot alakító genomikai alterációk vizsgálatával nyert, eddig kevésbé vagy egyáltalán nem ismert adatok révén új betekintést nyerhettünk az emlőrák disszeminációs mintázatába, melynek lényeges, a klinikai gyakorlatot érintő következményei lehetnek:

1. Eredményeink alapján a korai, radikálisan eltávolított emlőrákokban a kaszkádszerű áttétképzés a disszemináció fő útja.
2. Előrehaladott stádiumú primer tumorok a diagnóziskor nem tekinthetőek reprezentatívnak a betegség egészét tekintve (azaz az áttétes betegség vizsgálatára), mely a lehetőség szerint több áttétes deponitból való mintavétel fontosságát húzza alá.

A közelmúlt technikai vívmányai, mint pl. a keringő tumor DNS vizsgálata¹³⁵ esetleg lehetőséget biztosíthatnak a mikrometasztatikus betegség korai diagnózisára a klinikailag detektálható rekurrenciák megjelenése előtt, és talán jobban detektálható általuk a betegség heterogenitása is, mely segíthet a legmegfelelőbb terápiás opciók kiválasztásában. A genomikai eltérések egyedileg azonosítják az emlőrák metasztatizisait etiológiai nézőpontból, már “csak” a terápiás lehetőségeket kell azonosítanunk, melyekkel hatékonyan felléphetünk velük szemben.

Eredményeink és a daganatos progressziót vizsgáló egyéb munkacsoportok közelmúltbeli eredményei alapján egyértelmű, hogy a távoli áttétek jelentős mértékben különböznek a primer tumoroktól, melyekből származnak. Genetikai vizsgálatok is alátámasztják, hogy a primer tumorok a disszemináció során a mutációk és a genetikai eltérések egy jelentős részét megőrzik az áttétekben, azonban a metasztázisokban már egyéni progresszió folytatódik, nagy részben halmozódnak fel új eltérések⁶⁷. Eredményeink alapján megfontolandó lenne több távoli áttétből való mintavétel, amennyiben ez kivitelezhető, ennek különösen nagy jelentősége lenne az új, célzott terápiákat használó klinikai vizsgálatokban. Valószínűleg a közeljövőben összetettebb markerek, gén- és fehérjeexpresszió alapuló landscape-ek vizsgálata fogja elősegíteni a progredialó metasztatikus emlőrákban szenvedő betegek kezelését. A távoli áttétekből való gyakoribb mintavétellel illetve rapid autopsziás biobank segítségével jobban megérthetjük az emlőrák progresszióját és hatékonyabb beavatkozási módszereket is azonosíthatunk.

VI. MEGÁLLAPÍTÁSOK

VI.A Immunhisztokémiai vizsgálatok

1. A Luminalis csoportba tartozó primer tumorok jellemzően több távoli szervbe adtak áttétet, míg a TN daganatok kevesebb szervet érintettek.
2. A távoli áttétek szignifikánsan különböztek a primer tumoroktól az immunfenotípus tekintetében. A progresszió során a primer léziók leggyakorabban a PR-, majd az ER expressziót veszítették el egy vagy több áttétben.
3. A Luminalis típusú, heterogén áttétekkel rendelkező primer tumorok esetén jellemző volt, hogy azon áttétekben történt HR veszteség, melyek a betegség progressziója során későbbi időpontban alakultak ki.
4. Az ER veszteség a has+kismedence, míg a PR veszteség a has+kismedence mellett a mellkasi metasztázisokban is szignifikánsan magasabb arányban fordult elő. A szervrendszereket vizsgálva a gasztrointesztinális traktus áttéteiben jellemző volt az ER és PR veszteség is, míg a légzőrendszeri áttétekben csak PR veszteséget detektáltunk. A szerveket külön vizsgálva megfigyeltük, hogy a HR veszteség a máj- és a tüdőáttétekben volt jellemző.
5. Statisztikailag szignifikáns változás a Ki67 státuszban kizárólag a csontáttétekben fordult elő, melyekben alacsonyabb Ki67 index értékeket detektáltunk a primer tumorokhoz viszonyítva.
6. A betegek távoli áttétei nem különböztek szignifikánsan egymástól az immunfenotípus szempontjából. Néhány páciensnél azonban előfordult egy eseten belüli immunfenotípus heterogenitás az áttétekben: eredményeink alapján minél hosszabb idő telt el az alapbetegség diagnózisának időpontja és az adott áttét kialakulása között, annál inkább előfordult, hogy az áttét már nem expresszálta a primer tumorban illetve a korábban megjelent áttétben detektált hormonreceptort.

7. A túlélés vizsgálatokor hosszabb DFS és OS értékeket találtunk a diszkordáns esetek csoportjában (azaz akinél a immunfenotípus változott a betegség progressziója során).

VI.B Szomatikus mutációk és kópiaszám eltérések elemzése

8. A metasztázisok klonális kapcsolatban voltak egymással, és olyan sejtekből eredtek, melyek a betegség különböző fázisaiban disszeminálódtak a primer tumorokból. Ennek megfelelően bizonyos arányban hordozták a parentális sejtek genetikai jellemzőit, majd ezek mellé felhalmozták a saját privát eltéréseiket.
9. Leírtuk SNV-kben a mutációk reverzióját, melyek háttérben LOH jelensége állt, ezzel bizonyítottuk, hogy “back mutation”-ok előfordulhatnak.
10. Megalkottuk a metasztatikus prekursor fogalmát. Eredményeink arra utalnak, hogy a korai stádiumban diagnosztizált emlőtumoros betegek esetében, akik kuratív célú tumoreltávolításon estek át, valószínűsíthetően a metasztatikus prekursoron keresztül történő, kaszkádszerű disszemináció az áttétképzés fő útja.
11. Néhány esetben a primer tumorból több blokk is rendelkezésre állt, ezek egy részében a primer tumor egy bizonyos régiója genetikailag közelebb állt az áttétekhez, mint az egyéb területek.
12. Vizsgálatunkban azon esetekben, melyek IV. stádiumban kerültek diagnosztizálásra és a primer tumor eltávolítása nem történt meg, a primer tumorból több, különböző szórási eseményt azonosítottunk.
13. Igazoltuk, hogy emlőrákban is előfordul a tumor önszórás jelensége, azaz, az egyik áttétből elinduló metasztatikus sejtek horizontálisan újra szórhatnak egy már áttétes szövetet.
14. Két betegünk esetében fordult elő metakron ellenoldali emlőtumor, mindkettőnél klonális kapcsolatot tudtunk kimutatni az eredeti primer tumor és az ellenoldali tumor

között, amely arra utal, hogy a később kialakult, ellenoldali emlőrák az első tumor áttétének feleltek meg.

15. A normalizált filogenetikai ágak hossza korrelált az OS értékekkel, azaz azon betegeknél, akiknél az evolúciós változások többsége a filogenetikai fa törzsén, korán alakult ki, rövidebb teljes túlélést tapasztaltunk. Azon pácienseknél, ahol hosszabb DFS után alakultak ki távoli áttétek, a metasztázisok genetikailag távolabb álltak a “közös őstől” illetve a normál szövettől, melyből kialakultak.

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

A primer tumorok és távoli áttétek vizsgálata kiemeleten fontos kérdés, különösen olyan daganatoknál, melyeknél a betegség lefolyása általában időben hosszú folyamat, így emlőrákok esetén is. Vizsgálatainkban egyedülálló módon egy betegből több távoli áttétből származó minta állt rendelkezésünkre, így betekintést nyerhettünk az emlőrák progressziójának mélyebb összefüggéseibe.

Eredményeink alapján a távoli áttétek jellemzően különböznek a primer emlőtumoroktól. Fehérje expresszió (immunhisztokémiai fenotípus) szintjén elsősorban a PR, ennél ritkábban az ER vesztes fordul elő. A közelmúlt eredményei alapján az ER+PR- státusz kedvezőtlenebb prognózisa utal, mint az ER és PR egyidejű pozitivitása, mivel előbbi esetekben rosszabb a terápia fontos részét képező ER antagonisták hatása¹³⁶. A TN tumorok agresszívabb viselkedése is jól ismert, ennek megfelelően a Luminalis A – Luminalis B - TN fenotípus váltás a progresszió logikus útja, mely akár egy adott betegségen belül is megjelenhet, mint ahogy ezt a heterogén áttétekkel bíró esetekben láttuk.

A HR vesztes a máj- és tüdő áttétekben detektáltunk szignifikáns mértékben. , melyben fontos szerepet játszhat, hogy ezen lokalizációkban rendelkezünk a legnagyobb számú távoli áttéttel.

Annak a jelenségnek, hogy a HR+ elváltozások jellemzően több távoli szervbe adtak áttétet egyik lehetséges magyarázata, hogy a betegség lassabb lefolyású, terápiával jobban kordában tartható, így a daganatsejtek több távoli szervbe eljutnak. Ezzel szemben a TN betegségre agresszív klinikai lefolyás és rövidebb DFS és OS jellemző, ezeknél a pácienseknél kevesebb távoli áttéttel érintett szervet találtunk.

A minták genetikai vizsgálata során az áttétképzés két fő útját azonosítottuk. Korai emlőrákok esetén, melyeknél a primer tumor eltávolításra került a távoli áttétek egy ún. “metasztatikus prekurzorból” származtak és kaszkádszerűen jöttek létre egymás után a további léziók. Ezzel szemben azon pácienseknél, akiknél IV. stádiumban diagnosztizálták a betegséget és a primer daganat nem került eltávolításra, a daganatsejtek több különböző szórás folyamat során távoztak az emlőből és hoztak létre távoli áttéteket. Ennek alapján

definiálható egy olyan betegcsoport (jellemzően LuminalisA altípusú, kis tumortömeggel, leginkább szoliter csontáttéttel bírók), akiknél előrehaladott stádiumban diagnosztizált betegség esetén is előnyt adhat a primer tumor eltávolítása. A primer tumor heterogenitásának fontosságára hívja fel a figyelmet, hogy néhány betegünk esetében az egyes áttétekben a primer tumor különböző régióira jellemző daganatos klónok domináltak. Humán mintában először igazoltuk azt, hogy emlőrákban is előfordul az önszórás jelensége, melynek kiemelt szerepe van a betegség progressziójában, heterogenitásának fokozásában, emellett új terápiás célpontok megtalálásához is hozzájárulhat.

A filogenetikai fák vizsgálata alapján azon betegek esetében, akiknél hosszabb DFS után alakult ki metasztatikus betegség, a vizsgált áttétek genetikailag jobban különböztek a kiindulási szövettől, az eltelt hosszabb idő alatt több mutációt halmoztak fel.

Eredményeink alapján a távoli áttétek genetikai és fenotípus szinten is különböznek a primer emlőtumoroktól, melyekből származnak, és a betegség progressziója során további, egyéni eltéréseket halmoznak fel. Leírtuk, hogy a korai és a késői emlőrákokban eltérő a metasztatizációs folyamat, megalkottuk a metasztatikus prekursor fogalmát és elsőként bizonyítottuk humán emlőrákban a tumor önszórás jelenségét. A fentiek közvetlen hatással vannak a napi klinikai gyakorlatra, amennyiben:

- i. ajánlott a távoli áttétekből szövetminta vétele (a metasztatikus betegség diagnózisakor, illetve hosszabb PFS időszakokat követően),
- ii. lényeges a metakron kontralaterális emlőtumorok mélyebb vizsgálata,
- iii. jól definiált betegcsoportban kedvező lehet az előrehaladott stádiumban diagnosztizált betegek esetében is a primer tumor sebészi eltávolítása.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

Bevezetés: A primer emlőtumorok és távoli áttéteik közötti különbségek jelenléte ma már elfogadott biológiai tény. Célunk több távoli áttéttel rendelkező eset elemzése volt az immunhisztokémiai (IHC) fenotípus és a genetikai jellemzők szintjén. **Módszerek:** 25 beteg 23 különféle szervbe adott, összesen 90 távoli áttétét és primer tumorait elemeztük retrospektíven, autopsziás mintákon. A prediktív és prognosztikai faktorokat IHC festett metszeteken vizsgáltuk, 10 esetben teljes exom szekvenálást és kópiaszám analízist végeztünk. **Eredmények:** Az IHC fenotípus tekintetében a távoli áttétek hasonlítottak egymásra és jellemzően különböztek a primer tumortól. 3-lépcsős csoportosítási módszert alkalmazva a primer tumorok hasi régióba adott áttéteiben ER és PR, míg a mellkasban PR vesztés volt jellemző. A gasztrointesztinális traktusban ER és PR, míg a légzőrendszerben PR vesztést detektáltunk. Az egyes szerveket külön vizsgálva a májban ER és PR, míg a tüdőben a PR vesztést tapasztaltunk. A Ki67 expresszió a csontáttétekben szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a primer tumorokhoz képest. Heterogén IHC profilú távoli áttétekkel rendelkező betegek esetében minél hosszabb DFS után jelent meg egy áttét, annál nagyobb valószínűséggel volt a primer tumortól eltérő IHC profilja, a hosszabb OS-sel bíró betegeknél nagyobb eséllyel alakultak ki diszkordáns áttétek. A genetikai szintű vizsgálatok során a betegség progressziójának két módját találtuk; korai stádiumban diagnosztizált esetekben a távoli áttétekből származó minták monoklonális eredetűek voltak, közös metasztatikus prekursorból származtak. Ezzel szemben az előrehaladott stádiumban diagnosztizált esetekben több metasztatikus klónt is azonosítottunk. Igazoltuk, hogy emlőrákban is előfordul az önszórás jelensége, illetve klonális kapcsolatot találtunk a metakron kontralaterális és a primer tumorok között. **Következtetések:** A távoli áttétek immunprofilja különbözhet a primer tumorokétól, mely a kezelésre adott válaszban is megnyilvánulhat. A korai és előrehaladott stádiumban diagnosztizált emlőrákok esetében különböző áttétképzési mechanizmusok fordulnak elő. Indokolt a metakron kontralaterális emlőtumorok genetikai szintű vizsgálata, valamint az előrehaladott stádiumban diagnosztizált betegek bizonyos csoportjaiban a primer tumor eltávolítása meggondolandó, mivel ezzel feltehetően a metasztatikus disszemináció csökkenthető.

IX. ABSTRACT

Introduction: Differences between primary breast cancers (PBC) and corresponding distant metastases (M) has been accepted as an inherent biological feature rather than technical fault. Our aim was to study autopsy cases with multiple distant metastases on phenotypical, histopathological and genetic level. **Methods:** We retrospectively analyzed the immunohistochemical phenotype and histopathological features of 25 PBC and 90 M in 23 organs. In 10 of the 25 cases we used phylogenetic techniques on data generated using whole-exome sequencing and copy number profiling to infer the evolutionary history of breast cancer progression. **Results:** Phenotypically, M were more similar to each other and often differed from the PBC. We created a 3-step grouping system based on the localization of M. Tumors metastasizing to the abdominal region were likely to lose ER; we detected loss of PR in M to the thorax and abdomen. Loss of ER and PR was observed in M to the gastrointestinal system, in the respiratory system only the loss of PR was significant. The PBCs were likely to lose ER and PR in liver M. In lung M only loss of PR was apparent. Significant Ki67 labeling index change occurred only in bone M compared to the PBC. In patients with heterogeneous immunoprofiles in M the later the M was discovered the more likely it had a differing IHC profile compared to the PBC: patients who had longer OS had a higher chance to develop a discordant M. We observed two modes of disease progression. In patients diagnosed with early breast cancer, all M clustered on a branch separate from their primary cancer, clonal frequency analyses of somatic mutations showed that the M have a monoclonal origin and descend from a common ‘metastatic precursor’. In cases diagnosed with advanced stage disease multiple M were seeded from different clones present within the PBC. We showed that a M can be horizontally cross-seeded and metachronous contralateral breast tumors can represent a metastatic deposit of the PBC. **Conclusions:** Immunoprofile of M may differ from PBC and from each other, probably resulting in different response to therapy. Metachronous contralateral breast cancers can be metastatic deposits, therefore genetic testing of the tumors is advisable. Early and late stage breast cancers have different modes of disease progression. In patients diagnosed with stage IV. disease the surgical excision of the PBC might reduce metastatic dissemination in selected cases.

X. IRODALOMJEGYZÉK

1. Sardanelli F, Aase HS, Alvarez M, Azavedo E, Baarslag HJ, Balleyguier C, Baltzer PA, Beslagic V, Bick U, Bogdanovic-Stojanovic D, Briedine R, Brkljacic B, Camps Herrero J, Colin C, Cornford E, Danes J, de Geer G, Esen G, Evans A, Fuchsjaeger MH, Gilbert FJ, Graf O, Hargaden G, Helbich TH, Heywang-Köbrunner SH, Ivanov V, Jónsson Á, Kuhl CK, Lisencu EC, Luczynska E, Mann RM, Marques JC, Martincich L, Mortier M, Müller-Schimpfle M, Ormandi K, Panizza P, Pediconi F, Pijnappel RM, Pinker K, Rissanen T, Rotaru N, Saguatti G, Sella T, , Talk M, Taourel P, Trimboli RM, Vejborg I, Vourtsis A, Forrai G (2017). Position paper on screening for breast cancer by the European Society of Breast Imaging (EUSOBI) and 30 national breast radiology bodies from Austria, Belgium, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Croatia, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Israel, Lithuania, Moldova, The Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Serbia, Slovakia, Spain, Sweden, Switzerland and Turkey. *Eur radiol*, 27:2737–43.
2. Boncz I, Dobrossy L, Pentek Z, Kovacs A, Budai A, Vajda R, Sebestyen A (2013). Participation rates in the third round (2006-2007) of the breast cancer screening program in Hungary. *Magy onkol*, 57:140-146.
3. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, Trama A, Visser O, Brenner H, Ardanaz E, Bielska-Lasota M, Engholm G, Nennecke A, Siesling S, Berrino F, Capocaccia R; EUROCORE-5 Working Group (2014). Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCORE--5-a population-based study. *Lancet Oncol*, 15:23-34.
4. Berman AT, Thukral AD, Hwang WT, Solin LJ, Vapiwala N (2013). Incidence and patterns of distant metastases for patients with early-stage breast cancer after breast conservation treatment. *Clin Breast Cancer*, 13:88-94.
5. Forrai G, Ambrozay E, Bidlek M, Borbely K, Kovacs E, Lengyel Z, Ormandi K, Pentek Z, Riedl E, Sebo E, Szabo E (2016). Use of imaging methods in the current screening, diagnostics and treatment of breast cancer - Professional guidelines. 3rd Breast Cancer Consensus Meeting. *Magy onkol*, 60:181-193.

6. NCCN Clinical practice guidelines in oncology. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.
7. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG (2000). New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors. *J Natl Cancer Inst*, 92:205-216.
8. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 45:228-247.
9. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbe C, Maio M, Binder M, Bohnsack O, Nichol G, Humphrey R, Hodi FS (2009). Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res*, 15:7412-7420.
10. Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, Weber JS, Daud A, Hamid O, Patnaik A, Ribas A, Robert C, Gangadhar TC, Joshua AM, Hersey P, Dronca R, Joseph R, Hille D, Xue D, Li XN, Kang SP, Ebbinghaus S, Perrone A, Wolchok JD (2016). Evaluation of Immune-Related Response Criteria and RECIST v1.1 in Patients With Advanced Melanoma Treated With Pembrolizumab. *J Clin Oncol*, 34:1510-1517.
11. Li CI, Uribe DJ, Daling JR (2005). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*, 93:1046-1052.
12. Elston CW, Ellis IO (2002). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 41:154-161.
13. Orvieto E, Maiorano E, Bottiglieri L, Maisonneuve P, Rotmensz N, Galimberti V, Luini A, Brenelli F, Gatti G, Viale G (2008). Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases from a single institution. *Cancer*, 113:1511-1520.

14. Ferlicot S, Vincent-Salomon A, Medioni J, Genin P, Rosty C, Sigal-Zafrani B, Fréneaux P, Jouve M, Thiery JP, Sastre-Garau X (2004). Wide metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Eur J Cancer*, 40:336-341.
15. Bartlett JM, Brookes CL, Robson T, van de Velde CJ, Billingham LJ, Campbell FM, Grant M, Hasenburg A, Hille ET, Kay C, Kieback DG, Putter H, Markopoulos C, Kranenbarg EM, Mallon EA, Dirix L, Seynaeve C, Rea D (2011). Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational trial. *J Clin Onc*, 29:1531-1538.
16. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 353:1659-1672.
17. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M (2007). Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*, 96:1504-1513.
18. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P (2008). Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*, 17:323-334.
19. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr; American Society of Clinical Oncology (2007). American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Onc*, 25:5287-5312.
20. Maisonneuve P, Disalvatore D, Rotmensz N, Curigliano G, Colleoni M, Dellapasqua S, Pruneri G, Mastropasqua MG, Luini A, Bassi F, Pagani G, Viale G, Goldhirsch A (2014). Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and

- luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res.* 16:R65.
21. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:10869-10874.
 22. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*, 24 :2206-2223.
 23. Szekely B, Silber AL, Pusztai L (2017). New Therapeutic Strategies for Triple-Negative Breast Cancer. *Oncology (Williston Park)*, 31:130-7.
 24. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235:177-182.
 25. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 344:783-792.
 26. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, Pusztai L, Green MC, Arun BK, Giordano SH, Cristofanilli M, Frye DK, Smith TL, Hunt KK, Singletary SE, Sahin AA, Ewer MS, Buchholz TA, Berry D, Hortobagyi GN (2005). Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Onc*, 23:3676-3685.
 27. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, Lluch A, Staroslawska E, de la Haba-Rodriguez J, Im SA, Pedrini JL, Poirier B, Morandi P, Semiglazov V, Srimuninnimit V, Bianchi G, Szado T, Ratnayake J, Ross G,

- Valagussa P (2012). Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 13:25-32.
28. Holdaway IM, Bowditch JV (1983). Variation in receptor status between primary and metastatic breast cancer. *Cancer*, 52:479-485.
 29. Gomez-Fernandez C, Daneshbod Y, Nassiri M, Milikowski C, Alvarez C, Nadji M (2008). Immunohistochemically determined estrogen receptor phenotype remains stable in recurrent and metastatic breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 130:879-882.
 30. Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F, Rouas G, Leroy JY, Piccart M, Larsimont D (2002). Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol*, 13:1036-1043.
 31. Liedtke C, Broglio K, Moulder S, Hsu L, Kau SW, Symmans WF, Albarracin C, Meric-Bernstam F, Woodward W, Theriault RL, Kiesel L, Hortobagyi GN, Pusztai L, Gonzalez-Angulo AM (2009). Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer. *Ann Oncol*, 20:1953-1958.
 32. Cummings MC, Simpson PT, Reid LE, Jayanthan J, Skerman J, Song S, McCart Reed AE, Kutasovic JR, Morey AL, Marquart L, O'Rourke P, Lakhani SR (2014). Metastatic progression of breast cancer: insights from 50 years of autopsies. *J Pathol*, 232: 23-31.
 33. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, Rouas G, Francis P, Crown JP, Hitre E, de Azambuja E, Quinaux E, Di Leo A, Michiels S, Piccart MJ, Sotiriou C (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Onc*, 31:860-867.
 34. Stanton SE, Disis ML (2016). Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer*, 4:59.

35. Puzstai L, Ladanyi A, Szekely B, Dank M (2016). Immunotherapy opportunities in breast cancer. *Magy Onkol*, 60:34-40.
36. Wimberly H, Brown JR, Schalper K, Haack H, Silver MR, Nixon C, Bossuyt V, Puzstai L, Lannin DR, Rimm DL (2015). PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol Research*, 3:326-332.
37. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, Su X, Wang Y, Gonzalez-Angulo AM, Akcakanat A, Chawla A, Curran M, Hwu P, Sharma P, Litton JK, Molldrem JJ, Alatrash G (2014). PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Research*, 2:361-370.
38. Newman LA (2009). Epidemiology of locally advanced breast cancer. *Semin Radiat Oncol*, 19:195-203.
39. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours 7th Edition*. Wiley-Blackwell. 2009
40. Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, Rossi A, Brugnatelli L, Brambilla C, De Lena M, Tancini G, Bajetta E, Musumeci R, Veronesi U (1976). Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *N Engl J Med*, 294:405-410.
41. Holmes FA, Walters RS, Theriault RL, Forman AD, Newton LK, Raber MN, Buzdar AU, Frye DK, Hortobagyi GN (1991). Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 83:1797-1805.
42. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, Abraham M, Medeiros Alencar VH, Badran A, Bonfill X, Bradbury J, Clarke M, Collins R, Davis SR, Delmestri A, Forbes JF, Haddad P, Hou MF, Inbar M, Khaled H, Kielanowska J, Kwan WH, Mathew BS, Mitra I, Müller B, Nicolucci A, Peralta O, Pernas F, Petruzella L, Pienkowski T, Radhika R, Rajan B, Rubach MT, Tort S, Urrútia G, Valentini M, Wang Y, Peto R; Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter (ATLAS) Collaborative Group (2013). Long-term effects of continuing adjuvant

- tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*, 381:805-816.
43. Jin H, Tu D, Zhao N, Shepherd LE, Goss PE (2012). Longer-term outcomes of letrozole versus placebo after 5 years of tamoxifen in the NCIC CTG MA.17 trial: analyses adjusting for treatment crossover. *J Clin Onc*, 30:718-721.
 44. Goss PE, Ingle JN, Pritchard KI, Robert NJ, Muss H, Galow J, Gelmon K, Whelan T, Strasser-Weippl K, Rubin S, Sturtz K, Wolff AC, Winer E, Hudis C, Stopeck A, Beck JT, Kaur JS, Whelan K, Tu D, Parulekar WR (2016). Extending Aromatase-Inhibitor Adjuvant Therapy to 10 Years. *N Engl J Med*, 375:209-219.
 45. Byrski T, Huzarski T, Dent R, Marczyk E, Jasiowka M, Gronwald J, Jakubowicz J, Cybulski C, Wisniowski R, Godlewski D, Lubinski J, Narod SA (2014). Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 147:401-405.
 46. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor MJ, Ashworth A, Carmichael J, Kaye SB, Schellens JH, de Bono JS (2009). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*, 361:123-134.
 47. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, Juul N, Leong CO, Calogrias D, Buraimoh A, Fatima A, Gelman RS, Ryan PD, Tung NM, De Nicolo A, Ganesan S, Miron A, Colin C, Sgroi DC, Ellisen LW, Winer EP, Garber JE (2010). Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 28:1145-1153.
 48. Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, Pusztai L, Pathiraja K, Aktan G, Cheng JD, Karantza V, Buisseret L (2016). Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol* 34:2460-2467.
 49. Adams S SP RH, Winer E, Loirat D, Awada A, Loirat D, Awada A, Cescon DW, Iwata H, Campone M, Nanda R, Hui R, Curigliano G, Toppmeyer G, O'Shaughnessy J, Loi S, Paluch-Shimon S, Card D, Zhao J, Karantza V, Cortes J (2017). Phase 2 study of pembrolizumab (pembro) monotherapy for previously treated metastatic

- triple-negative breast cancer (mTNBC): KEYNOTE-086 cohort A. *J Clin Oncol*, 35 suppl; abstr 1008.
50. Adams S LS TD, Cescon DW, De Laurentiis M, Nanda R, Winer EP, Mukai H, Tamura K, Armstrong A, Liu MC, Iwata H, Ryvo L, Wimberger P, Card D, Ding Y, Karantza V, Schmid P (2017). Phase 2 study of pembrolizumab as first-line therapy for PD-L1–positive metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): Preliminary data from KEYNOTE-086 cohort B. *J Clin Oncol*, 35 suppl; abstr 1088.
 51. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, Bonnefoi H, Cameron D, Gianni L, Valagussa P, Swain SM, Prowell T, Loibl S, Wickerham DL, Bogaerts J, Baselga J, Perou C, Blumenthal G, Blohmer J, Mamounas EP, Bergh J, Semiglazov V, Justice R, Eidtmann H, Paik S, Piccart M, Sridhara R, Fasching PA, Slaets L, Tang S, Gerber B, Geyer CE Jr, Pazdur R, Ditsch N, Rastogi P, Eiermann W, von Minckwitz G (2014). Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*, 384:164-172.
 52. Toi M LS-J LE, Ohtani S, Im Y-H, Im S-A, Park B-W, Kim S-B, Yanagita Y, Takao S, Ohno S, Aogi K, Iwata H, Kim A, Sasano H, Yokota I, Ohashi Y, Masuda N (2016). A phase III trial of adjuvant capecitabine in breast cancer patients with HER2-negative pathologic residual invasive disease after neoadjuvant chemotherapy (CREATE-X, JBCRG-04). *Cancer Res*, DOI: 10.1158/1538-7445.SABCS15-S1-07.
 53. Horvath Z, Boer K, Dank M, Kahán Z, Kocsis J, Kover E, Pajkos G, Piko B, Rubovszky G, Eckhardt S (2016). Systemic therapy of breast cancer: practice guideline. *Magy Onkol*, 60:241-257.
 54. Lazar G, Bursics A, Farsang Z, Harsanyi L, Kosa C, Maraz R, Matrai Z, Paszt A, Pavlovics G, Tamás R (2016). 3rd Hungarian Breast Cancer Consensus Conference - Surgery Guidelines. *Magy Onkol*, 60:194-207.
 55. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R (2011). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of

- individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*, 378:1707-1716.
56. Lutz S, Balboni T, Jones J, Lo S, Petit J, Rich SE, Wong R, Hahn C (2017). Palliative radiation therapy for bone metastases: Update of an ASTRO Evidence-Based Guideline. *Pract Radiat Oncol*, 7:4-12.
 57. Phillips C, Jeffree R, Khasraw M (2017). Management of breast cancer brain metastases: A practical review. *Breast*, 31:90-98.
 58. Polgar C, Kahan Z, Csejtei A, Gabor G, Landherr L, Mangel L, A, Fodor J (2016). 3rd Hungarian Breast Cancer Consensus Conference - Radiotherapy Guidelines. *Magy Onkol*, 60:229-239.
 59. Fisher B, Gunduz, N, Coyle J, Rudock C, Saffer E (1989). Presence of a growth-stimulating factor in serum following primary tumor removal in mice. *Cancer Res* 49, 1996-2001.
 60. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79:315-328.
 61. Neuman HB, Morrogh M, Gonen M, Van Zee KJ, Morrow M, King TA (2010). Stage IV breast cancer in the era of targeted therapy: does surgery of the primary tumor matter? *Cancer*, 116:1226-1233.
 62. Babiera GV, Rao R, Feng L, Meric-Bernstam F, Kuerer HM, Singletary SE, Hunt KK, Ross MI, Gwyn KM, Feig BW, Ames FC, Hortobagyi GN (2006). Effect of primary tumor extirpation in breast cancer patients who present with stage IV disease and an intact primary tumor. *Ann Surg Onc*, 13:776-782.
 63. Greenberg PA, Hortobagyi GN, Smith TL, Ziegler LD, Frye DK, Buzdar AU (1996). Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *J Clin Onc*, 14:2197-2205.
 64. Kobayashi T, Ichiba T, Sakuyama T, Arakawa Y, Nagasaki E, Aiba K, Nogi H, Kawase K, Takeyama H, Toriumi Y, Uchida K, Kobayashi M, Kanehira C, Suzuki M, Ando N, Natori K, Kuraishi Y (2012). Possible clinical cure of metastatic breast

- cancer: lessons from our 30-year experience with oligometastatic breast cancer patients and literature review. *Breast Cancer*, 19:218-237.
65. Cheng YC, Ueno NT (2012). Improvement of survival and prospect of cure in patients with metastatic breast cancer. *Breast cancer*, 19:191-199.
 66. Murtaza M, Dawson SJ, Pogrebniak K, Rueda OM, Provenzano E, Grant J, Chin SF, Tsui DW, Marass F, Gale D, Ali HR, Shah P, Contente-Cuomo T, Farahani H, Shumansky K, Kingsbury Z, Humphray S, Bentley D, Shah SP, Wallis M, Rosenfeld N, Caldas C (2015). Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nat comm*, 6:8760.
 67. Budczies J, von Winterfeld M, Klauschen F, Bockmayr M, Lennerz JK, Denkert C, Wolf T, Warth A, Dietel M, Anagnostopoulos I, Weichert W, Wittschieber D, Stenzinger A (2015). The landscape of metastatic progression patterns across major human cancers. *Oncotarget*, 6:570-583.
 68. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*, 366:883-892.
 69. Alderton GK (2015). Metastasis: Spreading the seed. *Nat Rev Cancer*, 15:255.
 70. Cheung KJ, Padmanaban V, Silvestri V, Schipper K, Cohen JD, Fairchild AN, Gorin MA, Verdone JE, Pienta KJ, Bader JS, Ewald AJ (2016). Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113:E854-863.
 71. Hong MK, Macintyre G, Wedge DC, Van Loo P, Patel K, Lunke S, Alexandrov LB, Sloggett C, Cmero M, Marass F, Tsui D, Mangiola S, Lonie A, Naeem H, Sapre N, Phal PM, Kurganovs N, Chin X, Kerger M, Warren AY, Neal D, Gnanapragasam V, Rosenfeld N, Pedersen JS, Ryan A, Haviv I, Costello AJ, Corcoran NM, Hovens CM (2015). Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer. *Nat Comm*, 6:6605.

72. Gundem G, Van Loo P, Kremeyer B, Alexandrov LB, Tubio JMC, Papaemmanuil E, Brewer DS, Kallio HML, Hognas G, Annala M, Kivinummi K, Goody V, Latimer C, O'Meara S, Dawson KJ, Isaacs W, Emmert-Buck MR, Nykter M, Foster C, Kote-Jarai Z, Easton D, Whitaker HC; ICGC Prostate Group, Neal DE, Cooper CS, Eeles RA, Visakorpi T, Campbell PJ, McDermott U, Wedge DC, Bova GS (2015). The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature*, 520:353-357.
73. Bashashati A, Ha G, Tone A, Ding J, Prentice LM, Roth A, Rosner J, Shumansky K, Kalloger S, Senz J, Yang W, McConechy M, Melnyk N, Anglesio M, Luk MT, Tse K, Zeng T, Moore R, Zhao Y, Marra MA, Gilks B, Yip S, Huntsman DG, McAlpine JN, Shah SP (2013). Distinct evolutionary trajectories of primary high-grade serous ovarian cancers revealed through spatial mutational profiling. *J Pathol*, 231:21-34.
74. de Bruin EC, McGranahan N, Mitter R, Salm M, Wedge DC, Yates L, Jamal-Hanjani M, Shafi S, Murugaesu N, Rowan AJ, Gronroos E, Muhammad MA, Horswell S, Gerlinger M, Varela I, Jones D, Marshall J, Voet T, Van Loo P, Rasmussen DM, Rintoul RC, Janes SM, Lee SM, Forster M, Ahmad T, Lawrence D, Falzon M, Capitanio A, Harkins TT, Lee CC, Tom W, Teeffe E, Chen SC, Begum S, Rabinowitz A, Phillimore B, Spencer-Dene B, Stamp G, Szallasi Z, Matthews N, Stewart A, Campbell P, Swanton C (2014). Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science*, 346:251-256.
75. Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, Fisher R, McGranahan N, Matthews N, Santos CR, Martinez P, Phillimore B, Begum S, Rabinowitz A, Spencer-Dene B, Gulati S, Bates PA, Stamp G, Pickering L, Gore M, Nicol DL, Hazell S, Futreal PA, Stewart A, Swanton C (2014). Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat gen*, 46:225-233.
76. Shah SP, Morin RD, Khattra J, Prentice L, Pugh T, Burleigh A, Delaney A, Gelmon K, Guliany R, Senz J, Steidl C, Holt RA, Jones S, Sun M, Leung G, Moore R, Severson T, Taylor GA, Teschendorff AE, Tse K, Turashvili G, Varhol R, Warren RL, Watson P, Zhao Y, Caldas C, Huntsman D, Hirst M, Marra MA, Aparicio S

- (2009). Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature*, 461:809-813.
77. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Iacobuzio-Donahue CA (2010). Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 467:1114-1117.
78. Brastianos PK, Carter SL, Santagata S, Cahill DP, Taylor-Weiner A, Jones RT, Van Allen EM, Lawrence MS, Horowitz PM, Cibulskis K, Ligon KL, Taberner J, Seoane J, Martinez-Saez E, Curry WT, Dunn IF, Paek SH, Park SH, McKenna A, Chevalier A, Rosenberg M, Barker FG 2nd, Gill CM, Van Hummelen P, Thorner AR, Johnson BE, Hoang MP, Choueiri TK, Signoretti S, Sougnez C, Rabin MS, Lin NU, Winer EP, Stemmer-Rachamimov A, Meyerson M, Garraway L, Gabriel S, Lander ES, Beroukhi R, Batchelor TT, Baselga J, Louis DN, Getz G, Hahn WC (2015). Genomic Characterization of Brain Metastases Reveals Branched Evolution and Potential Therapeutic Targets. *Cancer Discov*, 5:1164-1177.
79. Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA, Morsberger LA, Latimer C, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal SA, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Griffin CA, Burton J, Swerdlow H, Quail MA, Stratton MR, Iacobuzio-Donahue C, Futreal PA (2010). The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature*, 467:1109-1113.
80. Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, Harris CC, McLellan MD, Fulton RS, Fulton LL, Abbott RM, Hoog J, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Kalicki J, Zhang Q, Chen L, Lin L, Wendl MC, McMichael JF, Magrini VJ, Cook L, McGrath SD, Vickery TL, Appelbaum E, Deschryver K, Davies S, Guintoli T, Lin L, Crowder R, Tao Y, Snider JE, Smith SM, Dukes AF, Sanderson GE, Pohl CS, Delehaunty KD, Fronick CC, Pape KA, Reed JS, Robinson JS, Hodges JS, Schierding W, Dees ND, Shen D, Locke DP, Wiechert ME, Eldred JM, Peck JB, Oberkfell BJ, Lolojie JT, Du F, Hawkins AE, O'Laughlin MD, Bernard KE, Cunningham M, Elliott G, Mason MD, Thompson DM Jr, Ivanovich JL, Goodfellow PJ, Perou CM,

- Weinstock GM, Aft R, Watson M, Ley TJ, Wilson RK, Mardis ER (2010). Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature*, 464:999-1005.
81. Juric D, Castel P, Griffith M, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA, Morsberger LA, Latimer C, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal SA, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Griffin CA, Burton J, Swerdlow H, Quail MA, Stratton MR, Iacobuzio-Donahue C, Futreal PA (2015). Convergent loss of PTEN leads to clinical resistance to a PI(3)Kalpha inhibitor. *Nature*, 518:240-244.
 82. Kulka J, Szekely B, Lukacs LV, Kiss O, Tökés AM, Vincze E, Turányi E, Fillinger J, Hanzély Z, Arató G, Szendrői M, Györffy B, Szász AM (2016). Comparison of Predictive Immunohistochemical Marker Expression of Primary Breast Cancer and Paired Distant Metastasis using Surgical Material: A Practice-Based Study. *J Histochem Cytochem*, 64:256-267.
 83. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, 11:155-168.
 84. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, 31:3997-4013.
 85. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74:5463-5467.
 86. Kamps R, Brandao RD, Bosch BJ, Paulussen AD, Xanthoulea S, Blok MJ, Romano A (2017). Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci*, 18.
 87. Collins FS, Morgan M, Patrinos A (2003). The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*, 300:286-290.

88. Li H, Durbin R (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25:1754-1760.
89. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25:2078-2079.
90. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*, 20:1297-1303.
91. Albers CA, Lunter G, MacArthur DG, McVean G, Ouwehand WH, Durbin R (2011). Dindel: accurate indel calls from short-read data. *Genome Res*, 21:961-973.
92. Genomes Project C, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491:56-65.
93. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 29:308-311.
94. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*, 14:178-192.
95. Nilsen G, Liestol K, Van Loo P, Moen Vollan HK, Eide MB, Rueda OM, Chin SF, Russell R, Baumbusch LO, Caldas C, Børresen-Dale AL, Lingjaerde OC (2012). Copynumber: Efficient algorithms for single- and multi-track copy number segmentation. *BMC Genomics*, 13:591.
96. Popova T, Manie E, Stoppa-Lyonnet D, Rigail G, Barillot E, Stern MH (2009). Genome Alteration Print (GAP): a tool to visualize and mine complex cancer genomic profiles obtained by SNP arrays. *Genome Biol*, 10:R128.
97. Van Loo P, Nordgard SH, Lingjaerde OC, Russnes HG, Rye IH, Sun W, Weigman VJ, Marynen P, Zetterberg A, Naume B, Perou CM, Børresen-Dale AL, Kristensen

- VN (2010). Allele-specific copy number analysis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107:16910-16915.
98. Purdom E, Ho C, Grasso CS, Quist MJ, Cho RJ, Spellman P (2013). Methods and challenges in timing chromosomal abnormalities within cancer samples. *Bioinformatics*, 29:3113-3120.
99. Roth A, Khattra J, Yap D, Wan A, Laks E, Biele J, Ha G, Aparicio S, Bouchard-Côté A, Shah SP (2014). PyClone: statistical inference of clonal population structure in cancer. *Nat Methods*, 11:396-398.
100. Joseph Felsenstein. *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 2004.
101. Maddison W, Maddison, DR. *MacClade. Analysis of Phylogeny and Character Evolution*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA), 1992.
102. Swofford DLM, Maddison WP (1987). Reconstructing ancestral character states under Wagner parsimony. *Math Biosci*, 87:199-229.
103. Schliep KP (2011). phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27:592-593.
104. Schwarz RF, Trinh A, Sipos B, Brenton JD, Goldman N, Markowitz F (2014). Phylogenetic quantification of intra-tumour heterogeneity. *PLoS Comput Biol*, 10:e1003535.
105. Carter SL, Cibulskis K, Helman E, McKenna A, Shen H, Zack T, Laird PW, Onofrio RC, Winckler W, Weir BA, Beroukhim R, Pellman D, Levine DA, Lander ES, Meyerson M, Getz G (2012). Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nat Biotechnol*, 30:413-421.
106. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massagué J (2009). Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*, 139:1315-1326.
107. McPherson A, Roth A, Laks E, Masud T, Bashashati A, Zhang AW, Ha G, Biele J, Yap D, Wan A, Prentice LM, Khattra J, Smith MA, Nielsen CB, Mullaly SC, Kalloger S, Karnezis A, Shumansky K, Siu C, Rosner J, Chan HL, Ho J, Melnyk N, Senz J, Yang W, Moore R, Mungall AJ, Marra MA, Bouchard-Côté A, Gilks CB, Huntsman DG, McAlpine JN, Aparicio S, Shah SP (2016). Divergent modes of clonal spread

- and intraperitoneal mixing in high-grade serous ovarian cancer. *Nat Genet*, 48:758-767.
108. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Børresen-Dale AL, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjörd JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Ilicic T, Imbeaud S, Imielinski M, Jäger N, Jones DT, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, López-Otín C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlesner M, Schumacher TN, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt AN, Valdés-Mas R, van Buuren MM, van 't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative; ICGC Breast Cancer Consortium; ICGC MMML-Seq Consortium; ICGC PedBrain, Zucman-Rossi J, Futreal PA, McDermott U, Lichter P, Meyerson M, Grimmond SM, Siebert R, Campo E, Shibata T, Pfister SM, Campbell PJ, Stratton MR (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*,500:415-421.
 109. Paluch-Shimon S, Wolf I, Sadetzki S, Gluck I, Oberman B, Papa MZ, Catane R, Kaufman B (2011). Association between very young age and adverse characteristics of breast cancer at presentation amongst Israeli women. *Am J Clin Oncol*, 34:219-222.
 110. Jung SP, Lee SK, Kim S, Choi MY, Bae SY, Kim J, Kim M, Kil WH, Cho EY, Choe JH, Kim JH, Kim JS, Nam SJ, Lee JE (2012). Invasive pleomorphic lobular carcinoma of the breast: clinicopathologic characteristics and prognosis compared with invasive ductal carcinoma. *J Breast Cancer*,15:313-319.
 111. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, Foekens JA, Martens JW (2008). Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*, 68:3108-3114.
 112. Wei S, Li Y, Siegal GP, Hameed O (2011). Breast carcinomas with isolated bone metastases have different hormone receptor expression profiles than those with metastases to other sites or multiple organs. *Ann Diagn Pathol*, 15:79-83.

113. Disibio G, French SW (2008). Metastatic patterns of cancers: results from a large autopsy study. *Arch Pathol Lab Med*, 132:931-939.
114. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K (2010). Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*, 28:3271-3277.
115. Soni A, Ren Z, Hameed O, Chanda D, Morgan CJ, Siegal GP, Wei S (2015). Breast cancer subtypes predispose the site of distant metastases. *Am J Clin Pathol*, 143:471-478.
116. Molnar IA, Molnar BA, Vizkeleti L, Fekete K, Tamas J, Deak P, Szundi C, Szekely B, Moldvay J, Vari-Kakas S, Szasz MA, Acs B, Kulka J, Tokes AM (2017). Breast carcinoma subtypes show different patterns of metastatic behavior. *Virchows Arch*, 470:275-283.
117. Wu JM, Fackler MJ, Halushka MK, Molavi DW, Taylor ME, Teo WW, Griffin C, Fetting J, Davidson NE, De Marzo AM, Hicks JL, Chitale D, Ladanyi M, Sukumar S, Argani P (2008). Heterogeneity of breast cancer metastases: comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between primary tumors and their multifocal metastases. *Clin Cancer Res*, 14:1938-1946.
118. Ogba N, Manning NG, Bliesner BS, Ambler SK, Haughian JM, Pinto MP, Jedlicka P, Joensuu K, Heikkila P, Horwitz KB (2014). Luminal breast cancer metastases and tumor arousal from dormancy are promoted by direct actions of estradiol and progesterone on the malignant cells. *Breast Cancer Res*, 16:489.
119. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Tashima R, Toyozumi Y, Arima N (2011). 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.
120. Tokes AM, Szasz AM, Geszti F, Lukács LV, Kenessey I, Turányi E, Meggyesházi N, Molnár IA, Fillinger J, Soltész I, Bálint K, Hanzély Z, Arató G, Szendrői M, Kulka J (2015). Expression of proliferation markers Ki67, cyclin A, geminin and aurora-kinase A in primary breast carcinomas and corresponding distant metastases. *J Clin Pathol*, 68(4):274-282.

121. Szekely B, Pusztai L: Indications and caveats for re-biopsying metastatic breast cancer to determine Estrogen and HER2 receptor status. *Metastatic Breast Cancer Forum. On-line CME forum Issue 59 - November 2011.*
122. Badwe R, Hawaldar R, Nair N, Kaushik R, Parmar V, Siddique S, Budrukkar A, Mitra I, Gupta S (2015). Locoregional treatment versus no treatment of the primary tumour in metastatic breast cancer: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 16:1380-1388.
123. Soran A, Ozmen V, Ozbas S, Karanlik H, Muslumanoglu M, Igci A, Canturk Z, Utkan Z, Ozaslan C, Evrensel T, Uras C, Aksaz E, Soyder A, Ugurlu UM, Col C, Cabioglu N, Bozkurt B, Sezgin E, Johnson R, Lembersky BC (2016). A randomized controlled trial evaluating resection of the primary breast tumor in women presenting with de novo stage IV breast cancer: Turkish Study (Protocol MF07-01). *ASCO Annual Meeting*; 2016.
124. Sledge GW (2016). Curing Metastatic Breast Cancer. *J Oncol Pract*, 12:6-10.
125. Davidson NE (2016). Conquering Metastatic Breast Cancer. *J Oncol Pract*, 12:11-12.
126. Hayes DF (2016). Is Breast Cancer a Curable Disease? *J Oncol Pract*, 12:13-16.
127. Klevebring D, Lindberg J, Rockberg J, Hilliges C, Hall P, Sandberg M, Czene K (2015). Exome sequencing of contralateral breast cancer identifies metastatic disease. *Breast Cancer Res Treat*, 151:319-324.
128. Robinson DR, Wu YM, Vats P, Su F, Lonigro RJ, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Wang R, Ning Y, Hodges L, Gursky A, Siddiqui J, Tomlins SA, Roychowdhury S, Pienta KJ, Kim SY, Roberts JS, Rae JM, Van Poznak CH, Hayes DF, Chugh R, Kunju LP, Talpaz M, Schott AF, Chinnaiyan AM (2013). Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet*, 45:1446-1451.
129. Ellis MJ, Ding L, Shen D, Luo J, Suman VJ, Wallis JW, Van Tine BA, Hoog J, Goiffon RJ, Goldstein TC, Ng S, Lin L, Crowder R, Snider J, Ballman K, Weber J, Chen K, Koboldt DC, Kandoth C, Schierding WS, McMichael JF, Miller CA, Lu C, Harris CC, McLellan MD, Wendl MC, DeSchryver K, Allred DC, Esserman L, Unzeitig G, Margenthaler J, Babiera GV, Marcom PK, Guenther JM, Leitch M, Hunt K, Olson J, Tao Y, Maher CA, Fulton LL, Fulton RS, Harrison M, Oberkfell B, Du

- F, Demeter R, Vickery TL, Elhammali A, Piwnica-Worms H, McDonald S, Watson M, Dooling DJ, Ota D, Chang LW, Bose R, Ley TJ, Piwnica-Worms D, Stuart JM, Wilson RK, Mardis ER (2012). Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature*, 486:353-360.
130. Li S, Shen D, Shao J, Crowder R, Liu W, Prat A, He X, Liu S, Hoog J, Lu C, Ding L, Griffith OL, Miller C, Larson D, Fulton RS, Harrison M, Mooney T, McMichael JF, Luo J, Tao Y, Goncalves R, Schlosberg C, Hiken JF, Saied L, Sanchez C, Giuntoli T, Bumb C, Cooper C, Kitchens RT, Lin A, Phommaly C, Davies SR, Zhang J, Kavuri MS, McEachern D, Dong YY, Ma C, Pluard T, Naughton M, Bose R, Suresh R, McDowell R, Michel L, Aft R, Gillanders W, DeSchryver K, Wilson RK, Wang S, Mills GB, Gonzalez-Angulo A, Edwards JR, Maher C, Perou CM, Mardis ER, Ellis MJ (2013). Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. *Cell Rep*, 4:1116-1130.
131. Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Beaney M, Cristofanilli M, Andre F, Loi S, Loibl S, Jiang J, Bartlett CH, Koehler M, Dowsett M, Bliss JM, Johnston SR, Turner NC (2016). Plasma ESR1 Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 34:2961-2968.
132. Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, Dvir A, Soussan-Gutman L, Jeselsohn R, Yelensky R, Brown M, Miller VA, Sarid D, Rizel S, Klein B, Rubinek T, Wolf I (2013). D538G mutation in estrogen receptor-alpha: A novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Res*, 73:6856-6864.
133. Spoerke JM, Gendreau S, Walter K, Qiu J, Wilson TR, Savage H, Aimi J, Derynck MK, Chen M, Chan IT, Amler LC, Hampton GM, Johnston S, Krop I, Schmid P, Lackner MR (2016). Heterogeneity and clinical significance of ESR1 mutations in ER-positive metastatic breast cancer patients receiving fulvestrant. *Nature Comm*, 7:11579.
134. Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M, Li Z, Gala K, Fanning S, King TA, Hudis C, Chen D, Taran T, Hortobagyi G, Greene G, Berger M, Baselga J,

- Chandarlapaty S (2013). ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Gen*, 45:1439-1445.
135. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, Cheang M, Osin P, Nerurkar A, Kozarewa I, Garrido JA, Dowsett M, Reis-Filho JS, Smith IE, Turner NC (2015). Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Translat Med*, 7:302ra133.
136. Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA, Serandour AA, Birrell SN, Bruna A, Saadi A, Menon S, Hadfield J, Pugh M, Raj GV, Brown GD, D'Santos C, Robinson JL, Silva G, Launchbury R, Perou CM, Stingl J, Caldas C, Tilley WD, Carroll JS (2015). Progesterone receptor modulates ERalpha action in breast cancer. *Nature*, 523:313-317.

XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK)

1. **Szekely B**, Nagy Z I, Farago Z, Kiss O, Lotz G, Kovacs A, Udvarhelyi N, Dank M, Szentmartoni Gy, Baranyai Z, Tokes AM, Szasz AM, Kulka J (2017). Comparison of immunophenotypes of primary breast carcinomas and corresponding multiple distant metastases – an autopsy study of 25 patients.
Clin Exp Metastasis, 34:103-113
(IF:3.144)
2. Brown D*, Smeets D*, **Szekely B***, Larsimont D, Szász AM, Adnet PY, Rothe F, Rouas G, Nagy ZI, Farago Z, Tokes AM, Dank M, Szentmartoni G, Udvarhelyi N, Zoppoli G, Pusztai L, Piccart M, Kulka J, Lambrechts D, Sotiriou C, Desmedt C (2017). Phylogenetic analysis of metastatic progression in breast cancer using somatic mutations and copy number aberrations.
Nat Commun, 8:14944
(IF:12.124)

XII. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A DISSZERTÁCIÓHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK)

1. Kulka J, Tokes AM, Toth AI, Szasz AM, Farkas A, Borka K, Jaray B, Szekely E, Harsanyi L, Rusz Z, Laszlo Zs, Istok R, Lotz G, Madaras L, Korompay A, Harsanyi L, Laszlo Z, Rusz Z, Molnar BA, Molnar IA, Kenessey I, Szentmartoni G, **Szekely B**, Dank M (2009). Immunohistochemical phenotype of breast carcinomas predicts the effectiveness of primary systemic therapy. *Magy Onkol*, 53:335–343.
2. **Szekely B**, Madaras L, Szentmartoni G, Szasz AM, Baranyak Z, Szittyá L, Torgyik L, Zergenyi E, Borbenyi E, Kenessey I, Korompay A, Langmar Z, Banhidy F, Kulka J, Dank M (2010). Comparison of breast cancer in young and old women based on clinicopathological features. *Magy Onkol*, 54:19-26.
3. Dank M, Szentmartoni Gy, **Szekely B**, Langmar Z (2010). Pain management in cancer patients. Hippocrates, RGD:73088/HU/2010.07.12.
4. **Szekely B**, Langmar Z, Somlai K, Szentmartoni Gy, Szalay K, Korompay A, Szasz AM, Kulka J, Banhidy F, Dank M (2010). Treatment of pregnancy associated breast cancer. *Orv Hetil*, 151:1299-303.
5. Szasz AM, Szendroi A, Szucs M, Idan R, Tokes AM, Kardos M, **Szekely B**, Szabo Gy, Kulka J, Szendroi M, Romics I, Timar J (2010). Role of hypoxia on gene expression and their prognostic power in renal cell carcinoma. *Uroonkológia*, 7:74-81.
6. **Szekely B**, Pusztai L (2011). The value of genomic analysis of breast cancer in drug development. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 43:1–3.
7. **Szekely B**, Szentmartoni G, Kulka J, Szasz AM, Langmar Z, Dank M (2011). Primary systemic therapy in breast cancer--an update for gynecologic oncologists. *Eur J Gynaecol Oncol*, 32:636-41. (IF: 0.474)
8. Stoddard FR II, Szasz AM, **Szekely B**, Tokes AM, Kulka J (2011). Molecular genetic tests in the prediction of the prognosis of breast cancer. *MEMO*, 4:158-162.
9. Madaras L, Szasz AM, Baranyak Zs, Tokes AM, Szittyá L, Lotz G, **Szekely B**, Szentmartoni Gy, Dank M, Baranyai Zs, Kulka J (2012). Morphological and

- immunophenotypical heterogeneity in breast cancers of young and elderly women. *Magy Onkol*, 56:75-8.
10. Tokes T, Somlai K, **Szekely B**, Kulka J, Szentmartoni G, Torgyik L, Galgoczy H, Lengyel Z, Gyorke T, Dank M (2012). The role of FDG-PET-CT in the evaluation of primary systemic therapy in breast cancer: links between metabolic and pathological remission. *Orv Hetil*, 153:1958-64.
 11. Szasz AM, Li Q, Eklund AC, Sztupinszki Z, Rowan A, Tokes AM, **Szekely B**, Kiss A, Szendroi M, Gyorffy B, Szallasi Z, Swanton C, Kulka J (2013). The CIN4 chromosomal instability qPCR classifier defines tumor aneuploidy and stratifies outcome in grade 2 breast cancer. *PLoS ONE*, 8:e56707. **(IF=3.534)**
 12. Szasz AM, Acs B, Agoston E, Sztupinszki Z, Tokes AM, Szittyá L, **Szekely B**, Szendroi M, Li Q, Harsanyi L, Timar J, Szallasi Z, Swanton C, Gyorffy B, Kulka J (2013). Simplified, low-cost gene expression profiling for the prediction of outcome in breast cancer based on routine histologic specimens. *Orv Hetil*, 154:627-32.
 13. **Szekely B**, Iwamoto T, Szasz AM, Qi Y, Szallasi Z, Matsuoka J, Symmans WF, Tokes AM, Kulka J, Swanton C, Pusztai L (2013). A 3-gene proliferation score (TOP-FOX-67) can re-classify histological grade 2, ER-positive breast cancers into low and high risk prognostic categories. *Breast Cancer Res Treat*, 138:691-8. **(IF=4.198)**
 14. Madaras L, Baranyák Z, Kulka J, Szasz AM, Kovacs KA, Phan Huong Van, **Szekely B**, Dank M, Nagy T, Kiss O, Harsanyi L, Barbay T, Kenessey I, Tokes AM (2013). Retrospective analysis of clinicopathological characteristics and family history data of early-onset breast cancer: a single-institutional study of Hungarian patients. *Pathol Oncol Res*, 19:723-9. **(IF=1.806)**
 15. Madaras L, Kovacs KA, Szasz AM, Kenessey I, Tokes AM, **Szekely B**, Baranyak Z, Kiss O, Dank M, Kulka J (2013). Clinicopathological features and prognosis of pregnancy associated breast cancer - a matched case control study. *Pathol Oncol Res*, 20:581-90. **(IF=1.855)**

16. Selmecei T, Tokes AM, Rona A, Molnar BA, Kenessey I, **Szekely B**, Madaras L, Szasz AM, Kulka J (2015). Prognostic impact of progesterone receptor expression in HER2-negative luminal-B breast cancer. *J Surg Mol Path*, 1:41-49.
17. Kiss O, Tokes AM, Spisak S, Szilagyi A, Lippai N, **Szekely B**, Szasz AM, Kulka J (2015). Breast- and salivary gland-derived adenoid cystic carcinomas: potential post-transcriptional divergencies. A pilot study based on miRNA expression profiling of four cases and review of the potential relevance of the findings. *Pathol Oncol Res*, 21:29-44. **(IF: 1.94)**
18. Selmecei T, Tokes AM, Rona A, Molnár BA, Kenessey I, **Szekely B**, Szasz AM, Kulka J (2014). A progeszteronreceptor kifejeződésének kórjóslati értéke a HER2-negatív Luminalis -B altípusú emlődaganatokban. *Nőgyógy Onk*, 19:45-49.
19. Kulka J, Tokes AM, Madaras L, Kovacs A, Acs B, Illyes I, Kiss O, **Szekely B**, Lotz G, Szasz MA (2015). Clinico-pathologically focused breast cancer research. *Magy Onkol*, 59:286-91.
20. Pusztai L, Ladanyi A, **Szekely B**, Dank M (2016). Immunotherapy opportunities in breast cancer. *Magy Onkol*, 60:34-40.
21. Kulka J, **Szekely B**, Lukacs L, Madaras L, Tokes AM, Lotz G, Kas J, Harsanyi L, Baranyai Z, Fillinger J, Soltesz I, Hanzely Z, Balint K, Arato G, Szendroi M, Szasz AM (2016). Comparison of predictive immunohistochemical marker expression of primary breast cancer and paired distant metastasis using surgical material: a practice-based study. *J Histochem Cytochem*, 64:256-67. **(IF:2.511)**
22. Santarpia L, Bottai G, Kelly CM, Gyorffy B, **Szekely B**, Pusztai L (2016). Deciphering and targeting oncogenic mutations and pathways in breast cancer. *Oncologist*, 21:1063-78.
23. Bottai G, Raschioni C, **Szekely B**, Di Tommaso L, Szasz A, Losurdo A, Gyorffy B, Acs B, Torrisi R, Karachaliou N, Tokes T, Caruso M, Kulka J, Roncalli M, Santoro A, Mantovani A, Rosell R, Reis-Filho JS, Santarpia L (2016). AXL associated tumor inflammation as a poor prognostic signature in chemotherapy-treated triple-negative breast cancer patients. *NPJ Breast Cancer*, 2:16033.1


24. Molnar IA, Molnar BA, Vizkeleti L, Fekete K, Tamas J, Deak P, Szundi C, **Szekely B**, Moldvay J, Vari-Kakas S, Szasz MA, Acs B, Kulka J, Tokas AM (2017). Breast carcinoma subtypes show different patterns of metastatic behavior. *Virchows Arch*, 470:275-83. (IF:2.848)
25. **Szekely B**, Silber AL, Pusztai L (2017). New therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park NY)*, 31:221108.
26. Wei W, Kurita T, Hess KR, Sanft T, **Szekely B**, Hatzis C, Pusztai L (2018). Comparison of residual risk-based eligibility vs tumor size and nodal status for power estimates in adjuvant trials of breast cancer therapies. *JAMA Oncol*, 25:175092. (IF:16.559)
- Pelekanou V, Barlow WE, Nahleh Z, Wasserman B, Lo YC, von Wahlde MK, Hayes DF, Hortobagyi GN, Gralow JR, Tripathy D, Porter P, **Szekely B**, Hatzis C, Rimm DL, Pusztai L (2018). Tumor infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in pre- and post-treatment breast cancers in the SWOG S0800 Phase II neoadjuvant chemotherapy trial. *Mol Cancer Ther*, 17:1324-1331. (IF:5.764)

XIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom a vizsgálatban résztvevő betegeknek és családtagjaiknak, illetve minden páciensnek, akikkel a mindennapi gyógyító munkám során találkozom.

Köszönöm a folyamatos támogatást Családomnak, témavezetőmnek, Kulka Janinának. A sok segítséget és együtt gondolkodást Pusztai Lajosnak, Szász A. Marcellnek, Tőkés Anna-Márianak, David Brown-nak, Christine Desmedt-nek, Schaff Zsuzsának, Tímár Józsefnek, Christos Sotiriou-nak, Christos Hatzis-nak, Weiwei Si-nek, Tingting Jiang-nak, SE II. sz Patológiai Intézet minden dolgozójának. Külön köszönet a sok technikai segítségért Kovács Erzsébetnek, Pekár Magdolnának és Sklánitzné Samodai Erikának.

Comparison of immunophenotypes of primary breast carcinomas and multiple corresponding distant metastases: an autopsy study of 25 patients

B. Szekely¹  · Zs I. Nagy¹ · Zs Farago¹ · O. Kiss¹ · G. Lotz¹ · K. A. Kovacs¹ · L. Madaras¹ · N. Udvarhelyi³ · M. Dank² · Gy Szentmartoni² · Zs Baranyai⁴ · L. Harsanyi⁴ · A. M. Tóké^{1,5} · Jozsef Timar¹ · A. M. Szasz¹ · J. Kulka¹

Received: 19 April 2016 / Accepted: 7 November 2016 / Published online: 24 November 2016
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract Phenotypical change in metastatic breast carcinoma has widely been accepted as an inherent biological feature rather than technical fault. We analyzed the immunohistochemical phenotype and histopathological features of 25 primary breast carcinomas and 90 corresponding distant metastases in 23 organs retrospectively. Histological slides were reviewed for prognostic and predictive factors. Overall, metastases were more similar to each other and often differed from the primary tumor. We created a 3-step grouping system based on the localization of metastases. Regions: tumors metastasizing to the abdominal region were likely to lose ER ($p = 0.002$); we detected loss of PR in metastases to the thorax ($p = 0.039$) and abdomen ($p < 0.001$). Organ systems: loss of ER and PR was observed in metastases to the gastrointestinal

system ($p = 0.026$ and $p = 0.001$, respectively), in the respiratory system only the loss of PR was significant ($p = 0.05$). Individual organs: the primaries were likely to lose the hormone receptors in liver metastases (ER $p = 0.026$; PR $p = 0.004$). In lung metastases only loss of PR was apparent ($p = 0.049$). We did not observe significant change in HER2 status, regarding Ki67 change occurred only in bone metastases compared to the primary ($p = 0.048$). 7/25 patients' distant metastases had heterogeneous immunoprofiles. The later the metastasis was discovered the more likely it had a differing IHC profile compared to the primary tumor, patients who had longer OS had a higher chance to develop a discordant metastasis. Immunoprofile of metastases may differ from primary breast cancer and from each other, probably resulting in different response to therapy.

Keywords Breast cancer · Metastasis · Immunophenotype · Subtype · Autopsy · Survival

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10585-016-9830-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ B. Szekely
szekelybora@gmail.com

¹ 2nd Department of Pathology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

² Division of Oncology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

³ Surgical and Molecular Tumour Pathology Centre, National Institute of Oncology, Budapest, Hungary

⁴ 1st Department of Surgery, Semmelweis University, Budapest, Hungary

⁵ MTA-SE Tumor Progression Research Group, 2nd Department of Pathology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Abbreviations

| | |
|------|--|
| BC | Breast cancer |
| CNS | Central nervous system |
| ER | Estrogen receptor |
| PR | Progesterone receptor |
| FISH | Fluorescence in situ hybridisation |
| HER2 | Human epidermal growth factor receptor 2 |
| IHC | Immunohistochemistry |
| LumA | Luminal A |
| LumB | Luminal B |
| TN | Triple negative |
| TNBC | Triple negative breast cancer |
| CT | Chemotherapy |
| RT | Radiotherapy |
| LN | Lymph node |

Introduction

Breast cancer (BC) is a major health problem, as it occurs in 1 out of 8 women and it is the leading cause of cancer death in women. According to European epidemiological data, the mean 5 year survival for BC is 81.8%, which is higher if BC is diagnosed at early stage [1, 2]. BC related mortality is nearly always due to metastatic disease. The risk of developing a stage IV disease is around 30% during the lifetime of a patient initially diagnosed with early BC [3]. Autopsy is the gold standard to definitively determine total metastatic disease burden [2] and enables to gain tissue samples from all distant metastatic sites.

The expression of hormone receptors (ER and PR) and HER2 status together with the Ki67 labeling index are the cornerstones of subtyping breast carcinoma cases into the so called surrogate (biological) subtypes in the routine setting. This immunohistochemical classification has significant prognostic and predictive role in the everyday medical oncological practice [4]. Based on immunophenotype, breast cancers can be classified into *Luminal A-like*, *Luminal B-like—HER2 negative*, *Luminal B-like—HER2 positive*, *HER2 positive and triple negative* subgroups [5, 6]. The change in hormone receptor (HR) status of primary breast cancers in corresponding distant metastases has been a frequently addressed question in recent years but the suggestion emerged as early as 30 years ago [7, 8]. Regarding HR expression, most studies detected differences between the primaries and the metastases, with a few exceptions [9, 10]. The reported discordance rate is the highest concerning PR (20–50%) and the lowest is regarding HER2 (13.6–13.9%) status, while for ER it remains around 10–30% [11–15].

Some studies addressed the question whether the different metastases from the same primary tumor vary as compared to each other regarding their gene expression profile [16] or immunophenotype, which has a great influence on treatment decisions that can prevent or delay further progression of the disease. In a recent autopsy study, authors found expression of ER concordant of all metastases only in 56.4% of the cases that is a higher rate of receptor loss compared to non-autopsy studies. They detected a significant loss of ER in lung or pleura, bone, liver and non-axillary lymph nodes (LNs) [17].

As it is commonly seen in clinical practice, the effect of systemic treatment may differ between metastases in the same patient. This effect can be caused by differences in drug absorption or individual barrier mechanisms of the organs, but also might be interpreted as a difference between each metastasis resulting from the clonal evolution phenomenon during the progression of the disease [18]. In the recent publication of Murtaza et al. circulating tumor DNA (ctDNA) was analyzed in a metastatic breast

cancer patient multiple times during the course of the disease. They found different treatment responses across metastases that were reflected by ctDNA [19]. Brastianos et al. studied 86 primary tumors (21/86 breast, 38/86 lung and 10/86 renal cancer) and corresponding brain and extracranial metastases with whole-exome sequencing. By genomic analysis they found that brain metastases of a corresponding primary were homogenous, but differed from the primary tumor and other distant metastases [20].

Ogba et al. in preclinical models demonstrated that injected homogenous ER positive luminal BC cells can generate heterogeneous metastases with a significant proportion of non-proliferating ER negative (thus chemo- and hormone therapy resistant) cells and that those subpopulations can exhibit divergent proliferation rates later [21].

A few rapid autopsy studies [22, 23] and only one large retrospective study were published (the work of Cummings et al. mentioned above) recently, as autopsies are not performed as frequently as they used to be before [24–26].

Therefore, our present work is one of the few studies aiming at providing a closer insight into the metastatic process of breast cancer through examination of immunophenotypes of multiple metastases originating from breast cancers.

Patients and methods

Clinical information

We reviewed the autopsy database of the 2nd Department of Pathology, Semmelweis University following the permission of the Institutional Review Board (IKEB #185-1/2007).

Of the 97 deceased metastatic breast cancer patients who underwent autopsy in our institution between 2001 and 2014, 25 met all our inclusion criteria: female, primary invasive breast cancer, distant metastatic disease, available representative samples of all detectable tumor locations, accurate clinical information. The time span of initial diagnosis of primary breast cancer was from 1991 to 2012. Eighteen patients had clinically diagnosed bone metastases; however we had samples from this localization in 7 patients (1/11 had a complete response to therapy in the bone metastasis and in 10/11 cases bone metastases were not investigated during autopsy). Clinical information (age at diagnosis, year of diagnosis, treatment history) were extracted from the patient's medical records.

Pathological, immunohistochemical (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis

Our study is retrospective, using the samples of routine surgical and autopsy practice. In patients who received

neoadjuvant therapy, the assessment of the primary tumors was performed on pretreatment biopsies and on the post treatment surgical specimen as well. If the patient did not receive neoadjuvant treatment, we assessed the surgical specimen only and did not analyze the diagnostic biopsies. In the case of patients who did not go through surgical removal of the primary tumor, the breast cancer was sampled during autopsy, if it was present.

The period between the time of death and acquisition of autopsy samples was median 70 h (range 41–127 h), 50.8 h on average. Between the time of death and the autopsy the cadavers were stored at +4 °C. During the autopsies, complete external and detailed internal examination was performed. The organs were thoroughly examined and weighed and tissue samples were taken from all detectable metastatic deposits and from the primary tumors and axillary LNs if present at the time of autopsy. All tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. All bone metastasis samples were decalcified using EDTA solution to preserve the antigenicity of tissue proteins. The hematoxylin and eosin (HE) stained sections were reviewed by BSz, AMSz and JK to confirm the presence and percentage of invasive carcinoma in the samples and other tissue content, we excluded samples with serious post-vital impairment. The FFPE blocks of previously removed corresponding primary tumors and axillary LNs were collected from various centers in the country (see acknowledgement).

The stage of primary tumors was reclassified according to the 7th Edition of the TNM classification system [27]. IHC reactions and fluorescence in situ hybridization (FISH) were performed on 4 µm thick tissue sections. HR and HER2 expression were detected by IHC on all samples using an automated immunostainer system (Ventana Benchmark XT, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions with the following antibodies: ER (SP1) (rabbit monoclonal, Ventana #790-4324), PR (1E2) (rabbit monoclonal, Ventana #790-2223), HER-2/neu (4B5) (Ventana #800-2996). HR status was assessed using the Allred/Quick scoring system [28] by two investigators independently (AMSz and BSz). The Ki67 labeling index [Ki67 (MIB1) (DAKO #M7240, Carpinteria, CA, USA) was given as the ratio of the positive tumor cell nuclei within the tumor area. HER2 positivity was primarily defined at protein level using IHC and supplemented by FISH utilizing Poseidon Repeat-Free probes (Kreatech Diagnostics, #KBI-10735, Amsterdam, The Netherlands). The HER2 IHC was evaluated according to the 2013 ASCO/CAP guidelines (i.e. positive by IHC only if more than 30% of tumor cells show strong, complete membrane reaction) [29]. HER2 FISH was performed on samples with IHC 2+ and 3+ for the evaluation of HER2 gene amplification status. FISH reactions were

evaluated according to the 2013 ASCO–CAP HER2 Test Guideline Recommendations: non-amplified if the HER2/CE17 ratio is less than 1.8, equivocal if the HER2/CE17 ratio is between 1.8 and 2.2, and amplified if the HER2/CE17 ratio is above 2.2 [30]. Breast cancers were categorized into subtypes based on the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 [6]; Luminal A-like [ER+, PR+, HER2– and low Ki67 score], Luminal B like—HER2 negative [ER+, HER2–, and at least one of: PR– or low, high Ki67 score ($\geq 20\%$)] Luminal B like—HER2 positive (ER+, HER2+ with any Ki67 and any PR), HER2 positive (ER–, PR–, HER2+) and triple negative (ER–, PR– and HER2–) subgroups.

Statistical analysis

Data on patients' past medical and treatment history were collected in Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics Version 21 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Non-parametric data (ER, PR, HER2, tumor subtype) of the tumors of the same patient were compared with Wilcoxon Signed Ranks Test, and the Mann–Whitney U test was used to compare similar data of metastatic locations to each other. For parametric values (Ki67) paired-samples *t* test and independent-samples *t* test were utilized. All statistical tests were two-sided; *p* values of less than 0.05 were considered significant.

Results

Altogether 25 patients with primary tumors and 90 corresponding distant metastases (from 23 individual organs) were evaluated. Distant metastases were detected between 0 and 168 months after primary breast cancer diagnosis. Patients' demographics and clinical characteristics are presented in extended data Table 1.

Characterization of primary tumors

The great majority of the cases (80%) were infiltrating ductal carcinomas (IDC), we detected 2 cases of infiltrating lobular carcinoma (ILC) and pleomorphic ILC (8% both). According to the 25 primary tumor subtypes 8 were TNBC, 1 was HER2 positive subtype, 7 were LumA and 9 were categorized as LumB: 6 LumB-like HER2 negative and 3 LumB-like HER2 positive. Six of 25 tumors were highly proliferating, with a Ki67 score higher than 20%, whereas the mean of Ki67 score was 17.67%. Most of the primary tumors were poorly differentiated, we detected fewer grade 2 and 1 cases (68 vs. 12 vs. 16%). The most frequent

Table 1 Difference of ER, PR and Ki67 status in the regions, organ systems and organs compared to the primary tumor

| Region | Organ system | Organ |
|--------------------------|--|---|
| Primary | | |
| ER | | |
| CNS p = 0.268 | Dura Brain | |
| Thorax p = 0.190 | Respiratory system p = 0.304 Others | Lung p = 0.227 Pleura p = 0.829 Aorta wall Oesophagus Thyroid gland Soft tissue |
| Abdomen p = 0.002 | Distal LN Gastrointestinal p = 0.026 Gynecological p = 0.123 Urological p = 0.095 Peritoneum Distal LN Spleen | Liver p = 0.026 Ovarium Uterus Vagina Parametrium Adrenal gland Kidney Bladder |
| Bone p = 0.281 Skin | | |
| PR | | |
| CNS p = 0.075 | Dura Brain | |
| Thorax p = 0.039 | Respiratory system p = 0.05 Others | Lung p = 0.049 Pleura p = 0.829 Aorta wall Oesophagus Thyroid gland Soft tissue |
| Abdomen p = 0.000 | Distal LN Gastrointestinal p = 0.001 Gynecological p = 0.054 Urological p = 0.142 Peritoneum Distal LN Spleen | Liver p = 0.004 Pancreas Stomach Ovarium Uterus Vagina Parametrium Adrenal gland Kidney Bladder |
| Bone p = 0.054 Skin | | |

Table 1 continued

| Region | Organ system | Organ |
|-----------------------|---|--|
| Ki67 | | |
| CNS p = 0.631 | Dura Brain | |
| Thorax p = 0.345 | Respiratory system p = 0.372 | Lung p = 0.251 Pleura p = 0.933 |
| | Others | Aorta wall Oesophagus Thyroid gland Soft tissue |
| Abdomen p = 0.216 | Distal LN Gastrointestinal p = 0.213 | Liver p = 0.212 Pancreas Stomach |
| | Gynecological p = 0.295 | Ovarium Uterus Vagina Parametrium |
| | Urological p = 0.322 | Adrenal gland Kidney Bladder |
| | Peritoneum Distal LN Spleen | |
| Bone p = 0.048 | | |
| Skin | | |

Bold highlighted represent the locations where the difference in receptor or proliferation status between the primary tumor and the metastasis showed significant correlation. The method how the organs were grouped to organ systems and those to body regions is also shown

metastatic sites in general were liver, lung, non-axillary LNs and bone (Fig. 1).

By analyzing the metastatic sites based on the primaries' subtypes, the TNBCs were most likely to metastasize to the liver and lung (88 and 50%, respectively) but did not disseminate to the bones. The LumA subtype tumors progressed mostly to the liver and lung (71 and 57%, respectively), but bone metastases were also frequent (43%). Liver metastases were frequent in the LumB group as well (78%). All primaries that metastasized to the skeletal system were HR positive. HR positive tumors metastasized to multiple organs in the body, whereas TNBCs characteristically invaded 2–3 different organs only (mostly liver and lung). The most frequently seen change of subtype from LumA primary to LumB or TN metastases as the result of HR loss. LumB primary breast tumors were more likely to preserve the immunophenotype in the corresponding metastases, although in half of the cases one or more metastases were TN. The 16 HR positive tumors had distant metastases in 69, the 8 TNBC cancers

had metastases in 18 different locations (Fig. 1). Four of the 25 patients had metastatic disease localized to one organ only, 3 of them had liver-, 1 had lung involvement. Only one of our patient had a local recurrence that was TN subtype just like the corresponding primary.

Immunophenotype of primary tumors vs. metastases

In 12/25 cases the distant recurrences retained the immunophenotype of the primary tumor, there was no loss or gain of receptor expression. In 13/25 change in immunophenotype in the metastases was detected.

From the 16 patients who had an ER positive primary, 10 (62.5%) lost ER expression in one or all metastases. Out of these 16 patients, 11 expressed PR in primary tumors as well. Compared to the primaries, a significant change of PR status was detected; in 10/11 cases (90.9%) loss of PR was noted in one or all corresponding metastases. The median of the Allred/Quick scores of the primary lesions that lost HR in the metastases were lower compared to those that

did not lose HR (ER med 6 vs. 7, PR 5 vs. 8), although, the difference did not reach significance ($p = 0.298$ and $p = 0.117$, respectively).

We had 4 patients with HER2 positive primary disease, 2 of which lost HER2 expression in distant recurrences in this group. Gain of receptor (HR or HER2) was not seen in distant recurrences of TNBCs.

To further study the question of receptor loss, we reviewed biopsies/surgical specimens from the distant metastases (we found 4 cases with HR positive primaries where this information was available) and compared their immunophenotype to the autopsy samples'. In 3 of the 4 patients the change of immunophenotype was already detected on the biopsy sample, we validated this finding on the metastases. In 1 case the primary tumor was LumB HER2+, 4 years later local recurrence was HR-, HER2+, 10 years later biopsy of the liver metastasis revealed a LumB HER2+ (ER Q-score 3), the patient passed away after 11 years of follow up, we detected all the metastases HER2+, HR-. One of the patients diagnosed as metastatic had a HR+ primary tumor, received multiple lines of treatment, based on the autopsy samples the primary tumor remained the same, while one metastasis lost PR, others kept the immunophenotype of the primary tumor.

From the 16 patients, who had an ER positive primary tumor 9 received endocrine treatment during the history of the disease; 7/9 patients lost ER and 7/7 who had a PR positive primary lost PR in at least one of the metastases. From the 7 patients who did not receive endocrine treatment (declined it, or was treated with chemotherapy) 3/7 patients did not lose HR, 3/7 patients lost ER and PR, 1/7 patient lost PR only in at least one of the metastases. We did not detect statistically significant correlation between endocrine treatment and loss of ER and PR ($p = 0.225$ and $p = 0.57$ respectively).

To analyze the distant metastases in more detail we formed a 3-step grouping system based on the localization of the metastases (local recurrences, soft tissue and thyroid gland metastases were excluded from this analysis; non-axillary LNs were ranked based on their anatomical localization). First we grouped the metastases in five major *regional* groups: central nervous system (CNS), thorax, abdomen, bone and skin. Second, we divided the metastases to various *organ systems*, and third, we analyzed the metastases in each organ *individually* (Table 1).

Based on immunophenotype there were no differences between the groups of metastases compared to each other at any of the steps mentioned above, meaning that the distant recurrences based on localization are very similar to each other (Extended data Table 2).

- i. When we studied the diversities between primaries and *regions* of metastases, we found that tumors

were most likely to lose ER expression while metastasizing to the abdomen. Loss of PR expression was detected in thoracic and abdominal metastases also.

- ii. Regarding *organ systems*, loss of ER and PR expression was detected in metastases of the gastrointestinal system. In the respiratory system only the loss of PR expression was significant.
- iii. While comparing the primary tumors with their corresponding distant metastases by each *organ* individually, we observed that the primary tumors were likely to lose HR expression in the liver and lung (Table 1).

Statistically significant change in Ki67 expression was seen only in bone metastases; HER2 status remained unchanged in the above mentioned locations.

Immunophenotypical discrepancies among metastases

While analyzing the various metastases we have observed that the metastases of 18/25 primary cases were homogeneous what concerns their immunophenotype. In 7/25 cases (in all of them the primary tumor was of luminal subtype) the metastases were heterogeneous; some were discordant while others were concordant with the corresponding primary tumor. In these 7 patients 31 distant recurrences were collected during autopsy. From those, in 20/31 locations the PR, in 9/31 locations ER expression was lost. Three of 7 patients had the first diagnosis of breast cancer at autopsy rendering the clinical history and progression of the disease obscure.

In 4/7 patients we were able to follow the course of the disease by retrospectively analyzing the clinical data. In these cases we found a subgroup/time pattern of metastases: the later the metastasis was discovered the more likely it was to have a differing IHC profile compared to the primary tumor (Fig. 2). The time of detection is a clinical diagnosis of each metastasis by imaging studies.

The photomicrographs of HE and the ER, PR and Ki67 stained slides of a patient (no. 10) with discordant metastases are shown on Fig. 3.

Survival

Analyzing the DFS and OS in the discordant (where IHC status changed at least in one metastasis) and in the concordant group, significant differences were observed (Fig. 4). The median OS was longer in the discordant group ($p = 0.005$). Analyzing DFS of 16 patients (6 in the concordant and 10 in the discordant group), similar significant differences ($p = 0.008$) were noted. From this analysis we

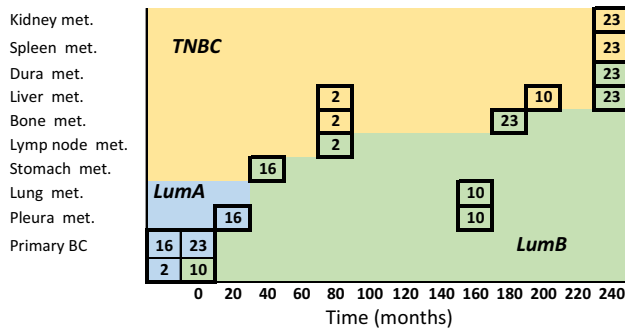


Fig. 2 Cases with metastases of heterogeneous subtype. The color coded boxes with case numbers represent the primary tumor and distant metastases (at the time it was clinically detected and the location of the distant recurrence) of four patients with metastases of heterogeneous subtype. As it can be seen at the figure, the later the metastasis was discovered, it was more likely to have a differing immunoprofile compared to the primary tumor. (Color figure online)

excluded 9 patients who were stage IV at the diagnosis of BC.

Discussion

The aim of our study was to gain a better understanding of breast cancer progression by examining primary tumors and multiple corresponding distant metastases. Samples from the most frequently involved organs by metastatic breast cancer were investigated, without the limiting effect of technical difficulties concerning biopsies. Also, by using relatively large amounts of tissue, we had the chance to eliminate sampling bias that could influence IHC results due to tumor heterogeneity. However, in the cases of patients with multiple metastases in the same organ we performed IHC and FISH studies on one metastatic sample

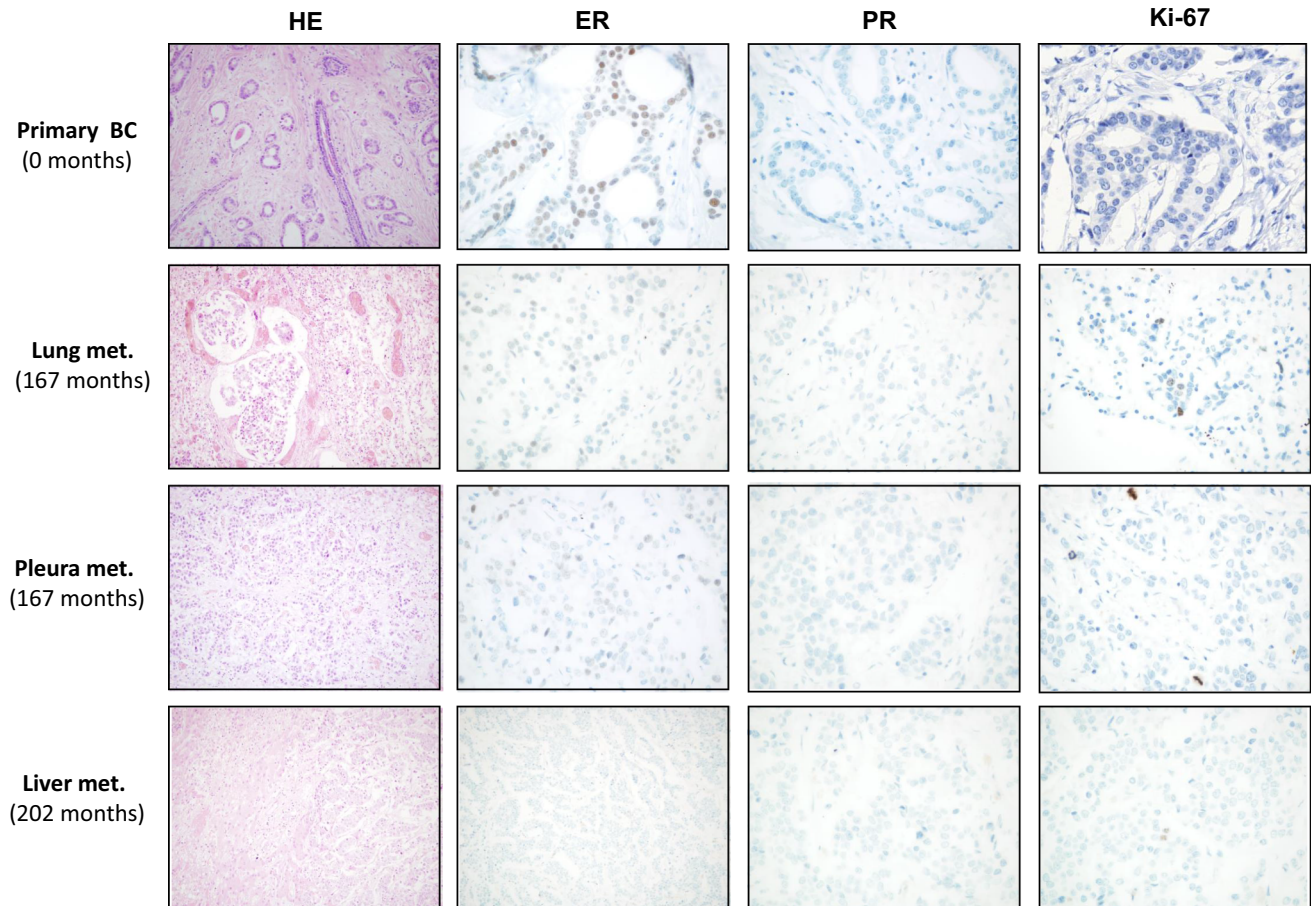


Fig. 3 Photomicrographs of the primary tumor and distant metastases of patient 10. The primary tumor was a LumB (ER+, PR– and Ki67 low, HER2 neg) IDC. After lumpectomy and sentinel lymph node biopsy (SLNB) the patient received radiation therapy, but declined any other adjuvant treatment. 14 years later metastases were discovered in the lung and pleura; the patient received multiple lines of

chemotherapy and endocrine treatment. At 17 years liver metastases occurred, treatment was switched back to chemotherapy, the patient passed away 4 months later due to progression of the disease. The lung and pleura metastases were ER weakly positive, but the liver metastasis was detected as TN

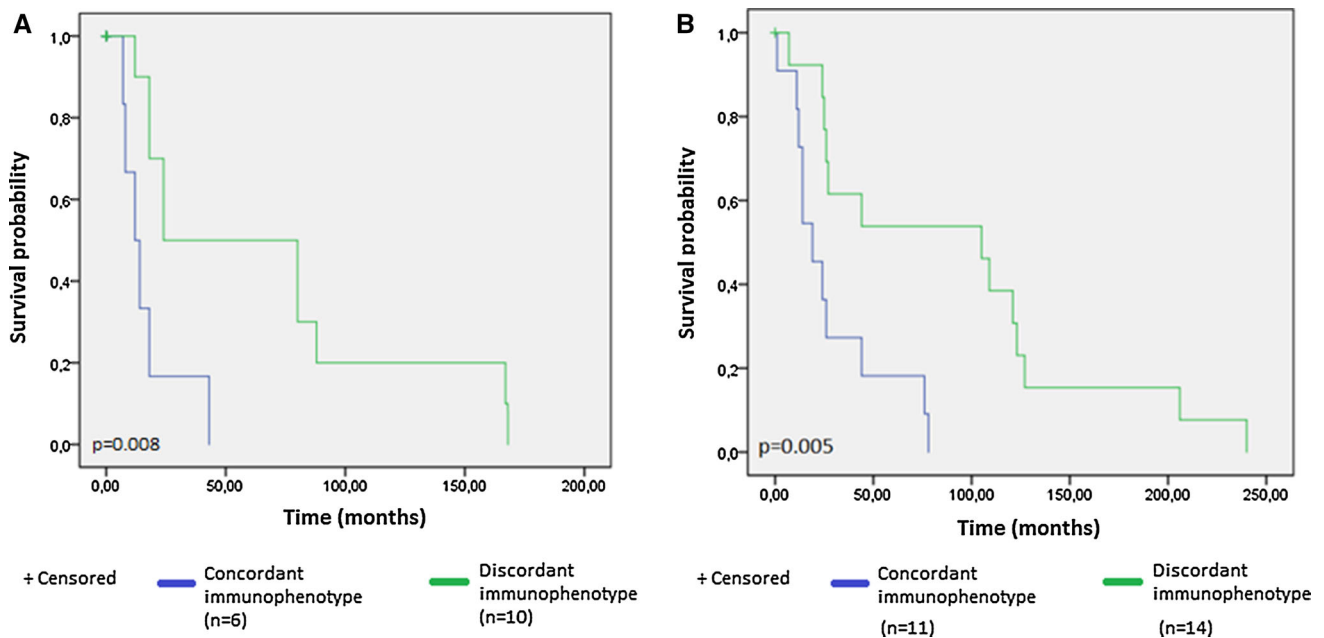


Fig. 4 Survival in patients with concordant versus discordant tumor subtypes. The DFS (a) and OS (b) was significantly better in the group of patients who lost hormone receptor in the distant recurrence

compared to the group of those who had a stable immunoprofile. (Color figure online)

only, which did not allow us to address the problem of inter-metastasis heterogeneity in a single organ.

In our study BCs with well known poor prognostic indicators were overrepresented (relatively high number of TNBC subtype, young age of the patients and a high ratio of stage IV disease at diagnosis). We observed similar trends in the distribution of metastatic localizations to other group’s results [17, 31], based on clinical data, the most metastases occurred in the skeletal system, although we could not sample all lesions.

Metastatic disease localized to only one organ, a rarely studied entity, was detected in 4 (16%) of our patients although all were TNBCs and none of them had the most frequent form bone-only disease [32]. We also detected the immunohistochemically defined (obviously simplified) surrogate subtypes of primary tumors to be associated with different patterns of metastatic spread [33]. In the study of Soni et al. the luminal phenotype was less likely to be associated with multiorgan relapse [34]. We observed the opposite: HR positive tumors metastasized to more organs than TNBCs. The broader metastatic spectrum with more unusual locations is a well-known feature of HR positive breast cancers.

Similar to the findings by Cummings et al. and DiSibio et al., we also detected a high percentage of HR expression loss that can be the result of a multifactorial background:

- i. In this study all metastases were sampled at the end of the disease history; most probably as the disease progresses, there is a higher chance to detect a

- metastasis that is different from the primary tumor in terms of both gene expression and immunoprofile.
- ii. In our study multiple metastases were examined allowing us a higher chance to detect HR loss.
- iii. Another explanation is the selection of hormone independent subclones during the progression of the disease. Based on the animal model of Ogba et al. [21] loss of HRs in metastases is acceptable as a result of disease progression, and might also have an important role in tumor dormancy.
- iv. Technical failure (not rapid autopsies, fixation bias) is also a possible explanation of the high ratio of HR and HER2 loss, although it is not likely as in most of the cases we did not see differences between the biopsy and autopsy specimens’ immunophenotype.

The reason why we did not find statistically significant correlation between the endocrine treatment and loss of HR is likely to be the low number of patients.

Our aim was to find a pattern of the hormone receptor loss phenomenon in various anatomical regions of the body and in distinct organ systems. Based on our results:

- i. The metastases of the same primary tumor are more similar to each other compared to their corresponding primary breast cancer.
- ii. In the abdomen loss of ER and PR expression was common, loss of PR occurred in the thorax. In the abdomen the liver, in the thorax the lungs were the

most common metastatic localizations (19 and 12, respectively) we detected significant change in HR status only in those organs. Probably with increased sample size we could see the same pattern in other organs as well. Ogba et al. also found that the phenotype conversion was not organ-specific [21].

We did not detect statistically significant differences between the groups of metastases compared to each other based on the immunophenotype. Consistent with the results of Wu et al., the HR status of one metastasis generally reflected that of the others [10].

We detected difference in the Ki67 status only while comparing primary breast tumors and corresponding bone metastases. In the study of Nishimura et al. Ki67 tended to decrease during relapse. In our patients we could not detect significant changes in proliferation status in metastatic sites. The only exception was bone, where Ki67 was consistently lower compared to the primary, as mentioned above. All bone metastatic samples were decalcified with EDTA solution thus theoretically the antigenicity of tissue proteins was correctly preserved [35].

We had patients with heterogeneous metastases at HR level. Although this only occurred in a minority of the patients, this may be important, since the result of a biopsy from a metastatic site has a crucial role in making decisions about the next line of therapy. Based on our results the longer period of time elapsed between the diagnosis of the primary disease and the appearance of the metastasis, the more likely it was that the metastasis differed from the corresponding primary tumor.

Most studies examining the correlation between change in HR status and patient survival found more favorable outcome for patients with metastases with concordant HR status to the corresponding primary as compared to the group of discordant cases. Two possible explanations emerge: first, those who were ER positive and lost the HR in the recurrence had an aggressively progressing disease; and second, those with misdiagnosed false negative primary who were not treated with antiestrogens, thus were undertreated.

In our cohort, considering DFS and OS, the prognosis of patients displaying loss of HR expression in the metastases was better (Fig. 4.). This finding may be simply the result of overrepresentation of TN tumors in the concordant group. On the other hand, the discordant group contained only luminal tumors that by nature have a better prognosis compared to TNs. Unfortunately, due to small sample size we could not analyze the survival rates excluding TN samples.

Based on our analysis and also on results of recent studies of cancer progression it cannot be questioned that primary tumors and corresponding distant metastases may

considerably differ. Nevertheless, from genomic studies we also know that metastases preserve a significant amount of mutations and genetic alterations of the primary tumor and then progress individually [2]. Based on our results, in BC patients with multiple metastases, we propose that future studies aim to sample more than just one metastatic lesion, if possible. If we consider not just endocrine- and anti-HER2 therapy but other targeted treatments still in experimental phase that will be soon introduced in the metastatic setting, the picture becomes even more complicated. It seems probable that in the near future more complex markers, protein- or gene expression patterns will be necessary to investigate in progressing BC cases. Metastases responding differently to therapy might possess different mutational landscapes, reflected by IHC. By sampling distant metastases, a better understanding and more effective therapy of progressive breast cancer could be achieved.

Limitations of the study

The autopsies were not rapid autopsies, samples with serious post vital impairment were excluded. As the study covered a long period of time, with the change of the therapeutic guidelines the treatment modalities are heterogeneous. The over-representation of TN primaries and patients diagnosed with stage IV breast cancer.

Acknowledgements We thank Prof. Jozsef Timar and Prof. Zsuzsa Schaff for their continuous support. We acknowledge the technical help of Gyula Lukacs Toth, Laszlo Vass, Tamas Herbert, Katalin Nador, Tamas Magyar, Tibor Barna, Ferenc Salamon, Csaba Diczhazi and Gabriella Arato. We are thankful for the help of all the pathologists (Katalin Borka, Julia Cristofari, Csaba Dekany, Attila Fintha, Tibor Glasz, Judit Halasz, Dora Hargitai, Ildiko Illyes, Roland Istok, Balazs Jaray, Magdolna Kardos, Istvan Kenessey, Andras Kiss, Gabor Lotz, Zsuzsanna Racz, Krisztina Slachter, Aron Somoracz, Kato Szenas, Eszter Szekely, Tamas Szekely and Adrienn Toth) who contributed to the autopsies reported here and assistants for their technical help (Janos Bagi, Laszlo Lukacs, Erzsébet Azumah, Magdolna Pekár, Csilla Horváth, Erika Samodai). AMSz was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences.

Author contributions Study design: BSz, AMSz, JK, AMT, JT; study material collection: BSz, ZsIN, ZsF, OK; clinical data collection: BSz, GySz, MD, ZsB, LH; pathological analysis: BSz, AMSz, JK, NU, GL, AK; statistical analysis: BSz, AMSz. All authors were involved in writing the manuscript and approved the submitted and published versions.

Funding MKOT-Roche-2012, TÁMOP 4.2.1.B-09/1/KMR-2010-0001, TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-0013, TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001, OTKA K 116151, KTIA_NAP_13-2-2014-0021.

References

1. De Angelis R et al (2014) Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE-5-a population-based study. *Lancet Oncol* 15(1):23–34

2. Budczies J et al (2015) The landscape of metastatic progression patterns across major human cancers. *Oncotarget* 6(1):570–583
3. Berman AT et al (2013) Incidence and patterns of distant metastases for patients with early-stage breast cancer after breast conservation treatment. *Clin Breast Cancer* 13(2):88–94
4. Sørlie T et al (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(19):10869–10874
5. Maisonneuve P et al (2014) Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res* 16(3):1
6. Goldhirsch A et al (2013) Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 24(9):2206–2223
7. Allegria JC et al (1980) Changes in multiple or sequential estrogen receptor determinations in breast cancer. *Cancer* 45(4):792–794
8. Holdaway IM, Bowditch JV (1983) Variation in receptor status between primary and metastatic breast cancer. *Cancer* 52(3):479–485
9. Gomez-Fernandez C et al (2008) Immunohistochemically determined estrogen receptor phenotype remains stable in recurrent and metastatic breast cancer. *Am J Clin Pathol* 130(6):879–882
10. Wu JM et al (2008) Heterogeneity of breast cancer metastases: comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between primary tumors and their multifocal metastases. *Clin Cancer Res* 14(7):1938–1946
11. Curigliano G et al (2011) Should liver metastases of breast cancer be biopsied to improve treatment choice? *Ann Oncol* 22(10):2227–2233
12. Gancberg D et al (2002) Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol* 13(7):1036–1043
13. Li BD et al (1994) Estrogen and progesterone receptor concordance between primary and recurrent breast cancer. *J Surg Oncol* 57(2):71–77
14. Liedtke C et al (2009) Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer. *Ann Oncol* 20(12):1953–1958
15. Rossi S et al (2015) Hormone receptor status and HER2 expression in primary breast cancer compared with synchronous axillary metastases or recurrent metastatic disease. *Clin Breast Cancer* 15:307–312
16. Steeg PS (2008) Heterogeneity of drug target expression among metastatic lesions: lessons from a breast cancer autopsy program. *Clin Cancer Res* 14(12):3643–3645
17. Cummings MC et al (2014) Metastatic progression of breast cancer: insights from 50 years of autopsies. *J Pathol* 232(1):23–31
18. Greaves M, Maley CC (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature* 481(7381):306–313
19. Murtaza M et al (2015) Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nat Commun* 6:8760
20. Brastianos PK et al (2015) Genomic characterization of brain metastases reveals branched evolution and potential therapeutic targets. *Cancer Discov* 5(11):1164–1177
21. Ogba N et al (2014) Luminal breast cancer metastases and tumor arousal from dormancy are promoted by direct actions of estradiol and progesterone on the malignant cells. *Breast Cancer Res* 16(6):489
22. Almendro V et al (2014) Genetic and phenotypic diversity in breast tumor metastases. *Cancer Res* 74(5):1338–1348
23. Steeg PS, Theodorescu D (2008) Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 5(4):206–219
24. Nielsen M et al (1987) Breast cancer and atypia among young and middle-aged women: a study of 110 medicolegal autopsies. *Br J Cancer* 56(6):814–819
25. Tsukada Y et al (1983) Central nervous system metastasis from breast carcinoma. Autopsy study. *Cancer* 52(12):2349–2354
26. Viadana E et al (1973) An autopsy study of metastatic sites of breast cancer. *Cancer Res* 33(1):179–181
27. American Joint Committee on Cancer (2010) AJCC cancer staging manual. Springer, New York
28. Allred DC et al (1998) Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 11(2):155–168
29. Pennacchia I et al (2015) HER2 immunohistochemical assessment with A0485 polyclonal antibody: is it time to refine the scoring criteria for the “2+” category? *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 23(1):31–35
30. Wolff AC et al (2014) Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med* 138(2):241–256
31. Smid M et al (2008) Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res* 68(9):3108–3114
32. Wei S et al (2011) Breast carcinomas with isolated bone metastases have different hormone receptor expression profiles than those with metastases to other sites or multiple organs. *Ann Diagn Pathol* 15(2):79–83
33. Kennecke H et al (2010) Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 28(20):3271–3277
34. Soni A et al (2015) Breast cancer subtypes predispose the site of distant metastases. *Am J Clin Pathol* 143(4):471–478
35. Nishimura R et al (2011) 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

ARTICLE

Received 3 May 2016 | Accepted 15 Feb 2017 | Published 21 Apr 2017

DOI: 10.1038/ncomms14944

OPEN

Phylogenetic analysis of metastatic progression in breast cancer using somatic mutations and copy number aberrations

David Brown^{1,*}, Dominiek Smeets^{2,3,*}, Borbála Székely^{4,*}, Denis Larsimont⁵, A Marcell Szász⁴, Pierre-Yves Adnet¹, Françoise Rothé¹, Ghizlane Rouas¹, Zsófia I. Nagy⁴, Zsófia Faragó⁴, Anna-Mária Tökés^{4,6}, Magdolna Dank⁷, Gyöngyvér Szentmártoni⁷, Nóra Udvarhelyi⁸, Gabriele Zoppoli⁹, Lajos Pusztai¹⁰, Martine Piccart¹¹, Janina Kulka⁴, Diether Lambrechts^{2,3}, Christos Sotiriou^{1,**} & Christine Desmedt^{1,**}

Several studies using genome-wide molecular techniques have reported various degrees of genetic heterogeneity between primary tumours and their distant metastases. However, it has been difficult to discern patterns of dissemination owing to the limited number of patients and available metastases. Here, we use phylogenetic techniques on data generated using whole-exome sequencing and copy number profiling of primary and multiple-matched metastatic tumours from ten autopsied patients to infer the evolutionary history of breast cancer progression. We observed two modes of disease progression. In some patients, all distant metastases cluster on a branch separate from their primary lesion. Clonal frequency analyses of somatic mutations show that the metastases have a monoclonal origin and descend from a common ‘metastatic precursor’. Alternatively, multiple metastatic lesions are seeded from different clones present within the primary tumour. We further show that a metastasis can be horizontally cross-seeded. These findings provide insights into breast cancer dissemination.

¹Breast Cancer Translational Research Laboratory, Institut Jules Bordet, Université Libre de Bruxelles, Bld de Waterloo 121, 1000 Brussels, Belgium.

²Laboratory of Translational Genetics, Vesalius Research Center, VIB, Campus Gasthuisberg, O&N IV Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium. ³Laboratory of Translational Genetics, Department of Oncology, Katholieke Universiteit Leuven, O&N IV Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium. ⁴Second Department of Pathology, Semmelweis University, Üllői út 93, 1091 Budapest, Hungary. ⁵Department of Pathology, Institut Jules Bordet, Bld de Waterloo 121, 1000 Brussels, Belgium. ⁶2nd Department of Pathology, MTA-SE Tumor Progression Research Group, Semmelweis University, Üllői út 93, 1091 Budapest, Hungary.

⁷Semmelweis University Cancer Center, Semmelweis University, Tömő u. 25-29, 1083 Budapest, Hungary. ⁸Surgical and Molecular Tumor Pathology Centre, National Institute of Oncology, Ráth György u. 7-9, 1122 Budapest, Hungary. ⁹University of Genova and Istituto di Cura a Carattere Clinico e Scientifico Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino—Istituto Nazionale Tumori, Largo Rosanna Benzi 10, 16132 Genoa, Italy. ¹⁰Yale University, Cedar Street 333, New Haven, Connecticut 05620, USA. ¹¹Department of Medical Oncology, Institut Jules Bordet, Université Libre de Bruxelles, Bld de Waterloo 121, 1000 Brussels, Belgium. * These authors contributed equally to this work. ** These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.S. (email: christos.sotiriou@bordet.be) or to C.D. (email: christine.desmedt@bordet.be).

DOI:10.14753/SE.2019.2189

Cancer-related mortality is almost always due to metastatic dissemination of the primary disease. While research continues to unravel the molecular underpinnings of the metastatic cascade, it is increasingly recognized that profiling of advanced disease could help elucidate such biological phenomena as distant recurrence and the emergence of *de novo* resistance to therapy.

A handful of studies using genome-wide molecular techniques have begun to explore the clonal relationships between primary and matched metastatic tumours in diverse types of neoplasia including pancreatic^{1,2}, clear-cell renal cell³, high-grade serous ovarian^{4–6} and prostate cancer^{7,8}. Despite the small cohort sizes and, too often, a limited number of matched metastases for each patient, these pioneering efforts brought forth thought-provoking findings such as the first quantitative model of cancer progression from onset of the founder mutation to metastatic dissemination², the occurrence of organ specific lineages¹, monoclonal^{3–8}, as well as its counterpart, polyclonal seeding^{7,8}, horizontal cross-seeding between distant metastases^{6,8}, and finally homing of metastatic cells to the primary tumour bed⁷.

While yet other studies continue to highlight the potential of genomic analyses from small cohort sizes to decipher the origins of intra-tumour heterogeneity and its contribution to metastatic dissemination^{9,10}, in-depth knowledge is currently lacking for breast cancer. Several studies have tackled this issue^{11–19}. However, while early attempts were constrained by the development of high throughput genomic techniques, more recent endeavours were, on the other hand, limited in scope by the availability of multiple-matched metastases. Noteworthy exceptions are the work of Juric *et al.*¹⁵ and Murtaza *et al.*¹⁶, both *n*-of-1 fast autopsy studies, where the authors uncovered the mechanisms of resistance to a PI3K-inhibitor and lapatinib, respectively. Despite this, it remains difficult to discern any pattern of metastatic progression due to the small number of patients.

To further investigate breast cancer progression, we applied phylogenetic techniques on data generated using whole-exome sequencing, custom ultra-deep resequencing and copy number profiling. The primary tumours and their associated metastases were obtained from ten autopsied patients. We observed two modes of metastatic progression. In the majority of cases, all distant metastases cluster on a branch separate from their primary lesion. Clonal frequency analyses of somatic mutations show that the metastases have a monoclonal origin and descend from a common ‘metastatic precursor’. Alternatively, the primary tumour is clustered alongside metastases with early branches leading to distant organs. Finally, we show that a distant metastasis can be horizontally cross-seeded confirming previous results observed in other types of neoplastic disorders^{6,8} and lending further support to the self-seeding hypothesis²⁰.

Results

Characteristics of patients and samples. We reviewed the database of the institutional autopsy programme of the second Department of Pathology at Semmelweis University. From 50 deceased metastatic breast cancer patients, whose corpses underwent autopsy between 2001 and 2012, ten patients for whom >1 µg double-stranded DNA from the primary breast tumour, a non-cancerous tissue as germline reference, and at least one metastatic sample was available, were selected. Eight patients were diagnosed with early stage disease among whom, one was diagnosed with a single liver metastasis (5/87). Three patients (3/92, 5/87 and 6/91) received neoadjuvant chemotherapy before surgery while the remaining five patients

(4/71, 7/67, 8/82, 9/68 and 10/80) were treated with breast surgery followed by adjuvant systemic therapy according to standard of care. The remaining two patients (1/69 and 2/57) were diagnosed with *de novo* metastatic disease and deceased before receiving any systemic or surgical treatment. The patient clinico-pathological characteristics are provided in Supplementary Data 1 while the clinical history and autopsy findings are detailed in Supplementary Notes 1–10 corresponding to patient 1/69 to 10/80. The lesions profiled are described in Supplementary Data 2. All samples from the *de novo* metastatic patients were collected post-mortem while, for the remaining patients, the primary tumours were collected at surgery and the distant metastases, in addition to one case of local recurrence, were collected at autopsy. On average, three distant metastatic lesions were profiled per patient.

Indexing of somatic mutations and copy number aberrations.

We used whole-exome sequencing to index somatic mutations from 51 samples (median coverage $40 \pm 18 \times$) followed by orthogonal validation using Sequenom MassARRAY to exclude false positive calls and targeted amplicon ultra-deep sequencing (median coverage $11,390 \pm 5,646 \times$) to obtain accurate variant allele frequencies (VAFs). The list of single nucleotide variants (SNVs) from each patient is provided in Supplementary Data 3. We supplemented this with high density single nucleotide polymorphism (SNP) arrays to characterize the underlying copy number aberrations (CNAs) in 64 matched samples (Supplementary Data 4). We further devised a multiple tier system to ascribe a confidence level to each indexed mutation. Between 27 and 305 non-synonymous SNVs per patient were successfully validated up to tier-3 level and after applying defined quality criteria, a total of 56 samples with either CNA or sequencing data remained for downstream analysis.

Phylogenetic reconstruction of metastatic progression.

Metastases are clonally related and originate from cells disseminated at various stages of the disease. Thus, they inherit varying fractions of genomic alterations from their parental lineage, followed by acquisition of private alterations. Provided the genomic alterations under investigation are fully clonal, phylogenetic inference can be used to investigate lineage tracing of metastases within a patient. Therefore, we used a maximum parsimony criterion to infer the sequence of genomic alterations occurring during metastatic progression. Figure 1a–f illustrates the results obtained in patient 2/57. Whenever the two phylogenies obtained from SNVs and CNAs were consistent, these were graphically represented as a combined tree. In the case of SNV-based phylogenies containing unresolved nodes, so called soft polytomies, we used the corresponding tree generated from CNAs as the correct phylogeny on account of the greater number of aberrations from SNP arrays, allowing for a unique solution to tree reconstruction.

The combined use of SNVs and CNAs demonstrated the presence of reversions, that is, SNVs predicted as present in a sample from the ancestral state reconstruction but were not detected in the particular sample. For the predicted reversions, we excluded the possibility that these were due to false negative calls attributable to inadequate sequencing coverage depth or the occurrence of the mutations at subclonal cell frequencies based on power calculations described in Carter *et al.*²¹ (Supplementary Fig. 1). Instead, Fig. 2a–i shows two clusters of reversions in the metastasis to the pylorus from patient 8/82, which can be attributed to loss of heterozygosity at chromosome 1p and 17p in that lesion. We further encountered a similar phenomenon in patient 9/68 (Supplementary Fig. 2) where the

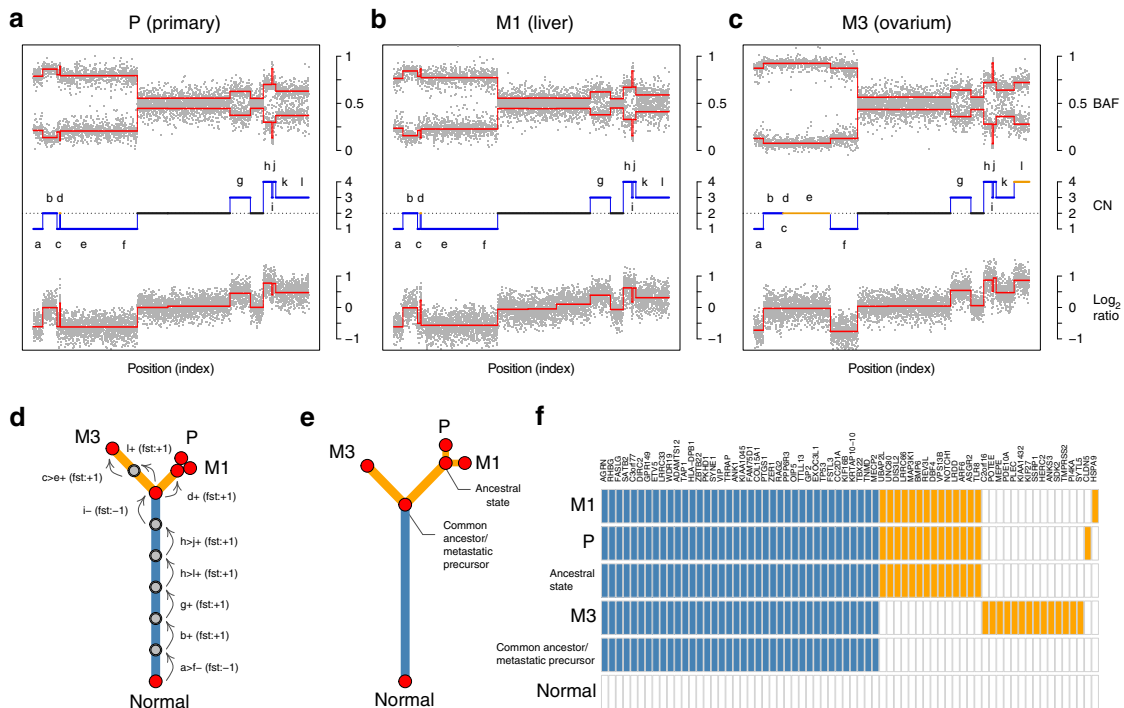


Figure 1 | Phylogenetic inference from SNVs and CNAs. Fully clonal somatic CNAs of chromosome 3 for (a) the primary tumour, (b) the liver and (c) the ovarian metastases of patient 2/57. The tracks are in descending order, the B Allele Frequency (BAF), integer copy number (CN) state and log₂ ratios. The phylogenetic reconstruction is displayed in d, where arrows indicate aberrations with annotations besides detailing coordinates and event type. Convergent evolution is exemplified by the focal amplification of region d in a,b but a broad gain of c–e in c, in all three cases leading to copy-neutral loss of heterozygosity of region d. The CNAs are colour coded with ‘early’ events in blue, ‘late’ events in orange, and diploid regions not contributing to the phylogenetic tree in black. (e) Concordant phylogeny obtained from tier-3 SNVs and (f) ancestral state reconstruction for the same samples. The scale bars in (d,e) represent one CNA and 10 SNVs, respectively.

change in copy number status of chromosome 19p can be tracked across the phylogenetic tree and explains the reversion of the mutation in *F2RL3*. The occurrence of reversions has seldom been acknowledged in the literature and despite growing interest in the inference of phylogenies from single or multiple samples, several approaches have falsely relied on the hypothesis of ‘no back mutation’. Therefore, these examples serve as cautionary tale when performing such analysis without properly matched sequencing and CNA data.

Disease dissemination via a metastatic precursor. We applied the same workflow to all patients for whom both SNV and CNA data were available. We refer to ‘early’ and ‘late’ alterations when occurring in the trunk or the branches of the phylogenetic trees, respectively. A representative combined phylogeny for patient 7/67 is illustrated in Fig. 3. This patient was diagnosed at the age of 54 with an ER-/PgR-/HER2-primary breast cancer. She deceased 3 years later despite surgery and several lines of systemic treatments. All the distant metastases clustered together and descended from what we refer to as the ‘metastatic precursor’. We computed the clonal frequencies from the VAFs, the global cancer cell fraction (CCF) and the copy number states for each SNV. These are represented as pairwise comparisons of samples (Fig. 3d). Similarly, the phylogenies of patients with early breast cancer disease (4/71, 8/82, 9/68 and 10/80), and the one from patient 5/87 with a single liver metastasis at initial diagnosis, further confirmed the case of patient 7/67 (Fig. 5a; Supplementary Figs 4 and 5). Distant metastases probably arose via a seeding event to an initial ‘metastatic precursor’ from the primary tumour and in absence of the latter,

removed at surgery, the source of further dissemination to additional organs occurred by metastasis-to-metastasis disseminations. Our observation suggests that for breast cancer patients diagnosed at an early stage and undergoing curative intent surgery, who represent the majority of patients, cascading disseminations from metastases appears to be a major route of tumour progression.

For seven patients from our cohort, multiple samples from the primary tumour were available (3/92, 4/71, 5/87, 6/91, 8/82, 9/68 and 10/80). In two cases, a particular region of the primary tumour was more genetically related to the distant metastases. For patient 3/92, the phylogenetic tree based on CNAs (Supplementary Fig. 9) show that the primary tumour sample (P3) was clustered alongside the metastases to the liver (M2) and pancreatic lymph node (M3) while for patient 6/91, the tree inferred from tier-3 SNVs (Supplementary Fig. 7) shows that the primary tumour sample (P3) is clustered alongside the metastases to the brain (M1) and liver (M2). Apart from these two exceptions, in all the other patients, the different samples from the primary tumour were clustered together separate from their associated distant metastases (Fig. 2; Supplementary Figs 7 and 9).

Multiple seeding events from the primary tumour. A contrasting clinical and biological condition to the dissemination via a ‘metastatic precursor’ is illustrated by the case of patient 2/57 (Fig. 4). This patient was a *BRCA1* germline mutation carrier diagnosed at the age of 38 with an ER-/PgR-/HER2-metastatic breast cancer. She did not receive any systemic treatment and deceased 1 month after initial diagnosis. Analysis

DOI:10.14753/SE.2019.2189

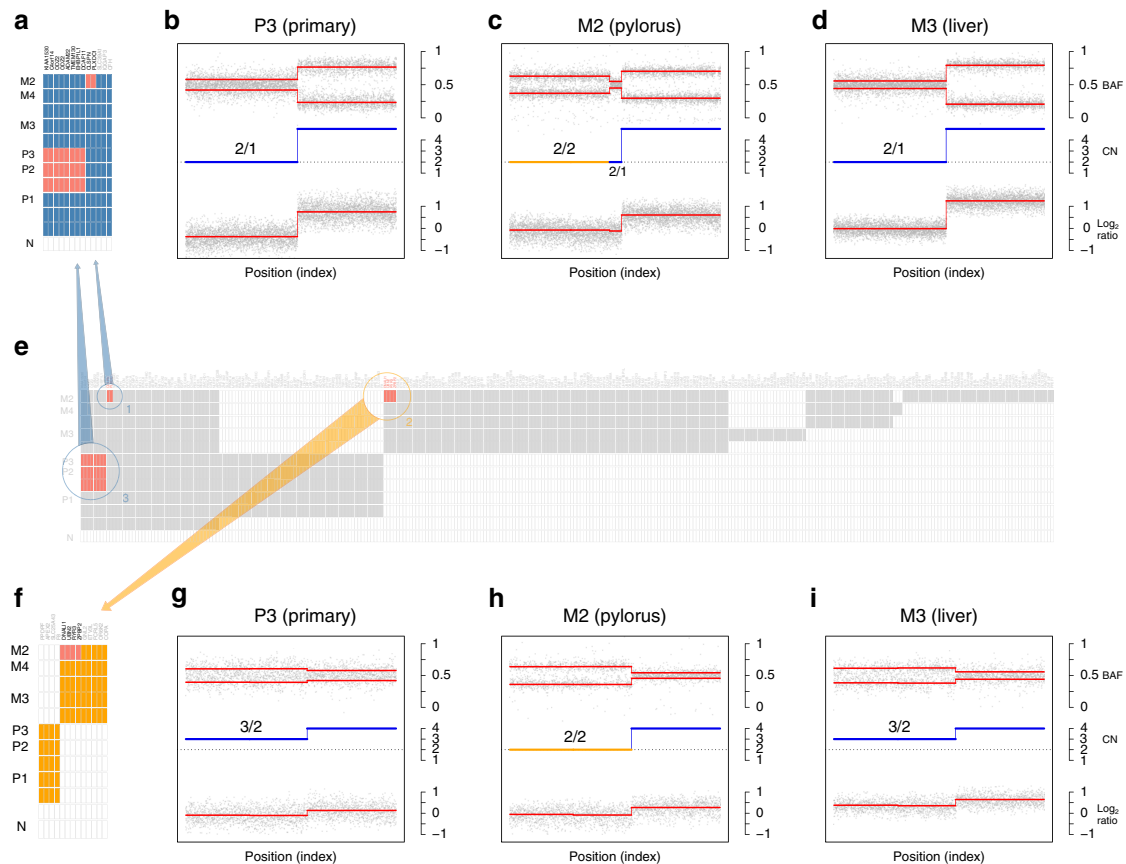


Figure 2 | Reversions in SNVs are explained by underlying CNAs. (a, f) 'Early' and 'late' tier-3 SNVs, respectively, which were predicted to be reversions in the metastasis to the pylorus of patient 8/82. These were clustered on chromosome 1p and 17p. (b-d, g-i) Fully clonal somatic CNAs of chromosome 1 and 17, respectively, for the primary tumour, the pylorus and the liver metastases ordered according to their genomic coordinates. In each panel, the tracks displayed are in descending order, the BAF, the integer based estimation of CN and the log₂ ratios. (e) Heat map representing the ancestral state reconstruction. The loss of heterozygosity at chromosome arm 1p and 17p in M2 explains the absence of these mutations.

of her primary tumour (P) and two distant metastases revealed two independent seeding events from the primary leading to the ovarian (M3) and to the liver (M1) secondary lesions, respectively (Fig. 1d,e). The phylogenetic reconstruction from the CNA profile of the metastasis to the adrenal gland (M2) revealed that this lesion originated from a precursor shared with the liver metastasis (Fig. 4b). However, the adrenal gland lesion displayed both SNVs acquired 'late' in the evolutionary history of the clade composed of the primary tumour and liver metastasis as well as SNVs private to the ovarian metastasis. Pairwise comparisons of the clonal frequencies of tier-4 SNVs showed that those private to the primary tumour and liver metastasis clade (segment 4) were also present at full clonal frequencies in the adrenal gland metastasis (Fig. 4c) in agreement with the phylogeny inferred from the CNA profiles. The 'late' SNVs private to the ovarian metastasis (segment 2) were observed at subclonal frequencies in the adrenal gland metastasis. We resequenced M2 and obtained similar results (Supplementary Fig. 3). Our results imply that circulating metastatic cells, disseminated by the ovarian metastasis, horizontally cross-seeded the already metastatic adrenal gland and confirm previous observations in ovarian⁶ and prostate⁸ cancers further lending support to the hypothesis of tumour self-seeding²⁰.

In the additional advanced stage breast cancer patient (1/69) who was *de novo* metastatic and died in the weeks following her diagnosis without receiving any systemic treatment,

the primary sample was also found clustered alongside distant metastases (Fig. 5b; Supplementary Fig. 6). We observed a similar early seeding to distant organs (primary to pleura in 1/69 and primary to ovarium in 2/57) followed by subsequent late seeding events to additional organs from either the primary lesion (primary to aorta in 1/69 and primary to liver in 2/57) or from already established metastases (mediastinal soft tissue to mediastinal lymph node or vice versa in 1/69 and liver to adrenal gland or vice versa in 2/57).

Contralateral breast tumours originate from primary tumours.

Two patients from our series were diagnosed with a metachronous contralateral breast tumour. Patient 6/91, 1 year and 10/80, 10 years after initial diagnosis. In patient 6/91, the phylogenetic reconstruction based on tier-3 SNVs showed that the contralateral left tumour (M3) was the earliest branching but shared a substantial fraction of the truncal SNVs (Supplementary Fig. 7). This contrasts with the case of patient 10/80 where the CNA profiles show that the contralateral left tumour (M1) originated from a daughter lesion shared with the liver metastases (M2 and M3) (Supplementary Fig. 9). Nonetheless, both cases confirm the clonal relatedness of the contralateral tumour with the initially diagnosed breast cancer. Together with recent reports^{22,23}, this calls into question the current practice of considering metachronous contralateral tumours as second primary cancers. Since treatment strategies offered to patients

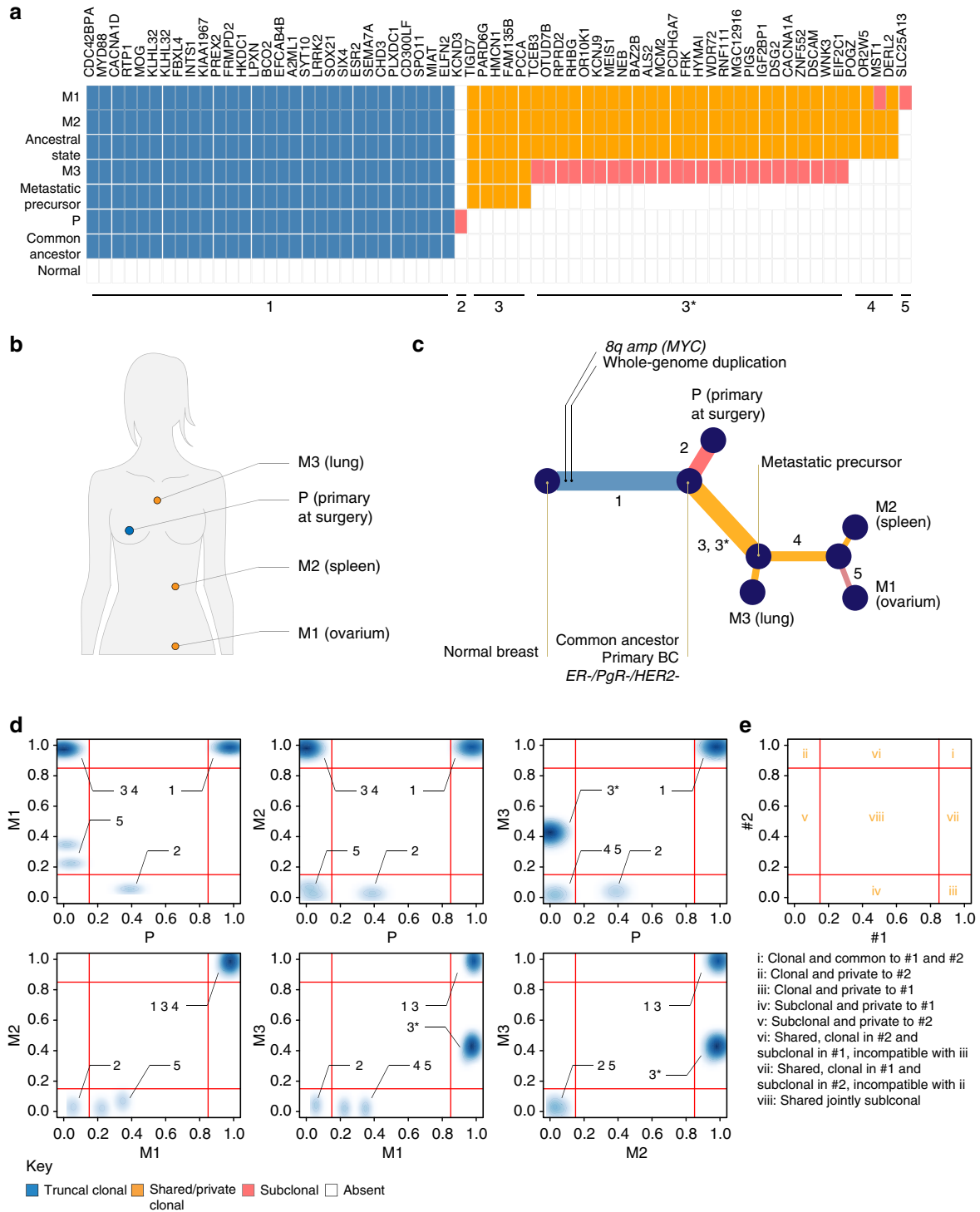


Figure 3 | Phylogenetic reconstruction of breast cancer progression in patient 7/67. (a) Ancestral state reconstruction of tier-3 SNVs with the anatomic location of the profiled lesions is depicted in **b**. **(c)** Combined phylogenetic tree obtained from CNAs and SNVs and **(d)** pairwise comparisons of clonal frequencies of tier-4 SNVs. The branches of the phylogenetic tree are labelled 1-5 and the location of these mutations in pairwise comparisons is indicated in **d**. **(e)** Schematic representation of the pairwise comparison of two fictitious samples. Mutations in i, ii and iii are fully clonal being either common to the two samples and thus inherited from their parental lineage or private to either one. Mutations in iv and v are private and subclonal to either samples. They are expected to have occurred after the divergence of the two lineages and after mutations located in ii and iii, respectively. Mutations in vi and vii are shared between the two samples but are fully clonal in one and subclonal in the other. If the two samples share a common parental origin, these mutations are incompatible with fully clonal mutations occurring in ii and iii, respectively. A possible scenario explaining their occurrence is that vi and vii are mutually exclusive and that sample #1 seeded #2 giving rise to vi or vice versa for vii. The subclonal frequencies could then be explained by intra-tumour heterogeneity in the tumour mass. Alternatively, mutations in vi and vii could find their origin in horizontal reseeded from a third sample.

DOI:10.14753/SE.2019.2189

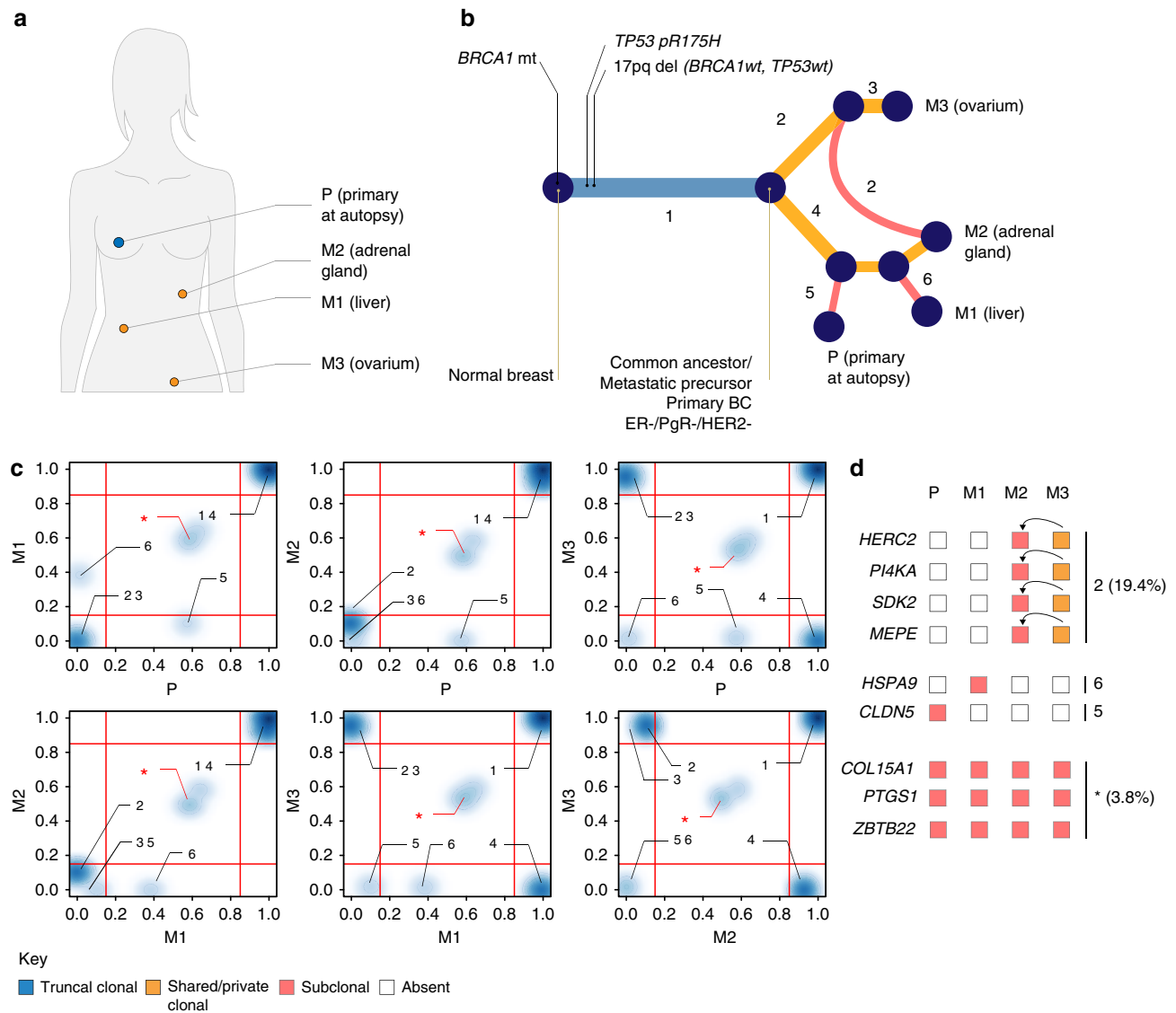


Figure 4 | Phylogenetic reconstruction of breast cancer progression in patient 2/57. (a) Anatomical representation of tumour lesions profiled, (b) combined phylogenetic tree obtained from CNAs and SNVs, and (c) pairwise comparisons of clonal frequencies from tier-4 SNVs. The branches of the phylogenetic tree are labelled 1–6 in b and the location of these mutations in pairwise comparisons is indicated by the corresponding label in c. Mutations in segment 2 at full clonal frequencies in M3 and subclonal frequencies in M2 indicate horizontal seeding, highlighted by the red segment 2 in b. A heuristic interpretation of the different possible scenarios is given in d. Only three mutations in total were in the unexplained configuration *, one in 5, one in 6 and 12 in configuration 2. Excluding mutations in the configuration * does not influence the topology of the phylogeny. The numbers in parentheses in d give the percentage of all tier-4 SNVs.

differ widely between early and advanced stage breast cancers, it is imperative to determine in practice whether contralateral tumours represent a metastatic deposit of the primary tumour.

Evolution of genomic alterations during cancer progression.

We computed for each lesion, a normalized phylogenetic branch length, which is the ratio of the path from the common ancestor to the given lesion relative to the common trunk (Fig. 6a,b). This represents the extent of genomic alterations that accumulated since the first metastasizing event took place irrespective of the mode of progression. With few exceptions, the pattern observed from tier-3 SNVs mirrors the one from CNAs. In patients 1/69, 2/57 and 4/71, who all died from their disease at most 1 year after initial diagnosis, the bulk of evolutionary changes occurred ‘early’ in the trunk of the phylogenetic tree. At the other extreme, in patients 8/82, 9/68 and

10/80, who had a longer disease history, the SNV profile is uncoordinated with the CNA whereby the former shows that most of the evolutionary changes occurred ‘late’. Figure 6c,d shows the correlation of the average normalized phylogenetic branch lengths with overall survival. Although the number of patients is small, we observed a positive correlation for both CNAs and SNVs.

In patients 8/82 and 10/80, we observed a high mutational burden which showed evidence of increased C>T substitutions at NpCpG trinucleotides. This pattern of substitution is reminiscent of mutational signature 13 in Alexandrov *et al.*²⁴ Figure 7a,b shows the pattern of substitutions observed in the trunk, that is, ‘early’, and in branches, that is, ‘late’, during the evolutionary cascade of these two patients. Thus, it is possible that, in at least these two patients, the activation of the APOBEC family of cytidine deaminases caused an accumulation of mutations which uncoupled the SNV and CNA profiles.

DOI:10.14753/SE.2019.2189

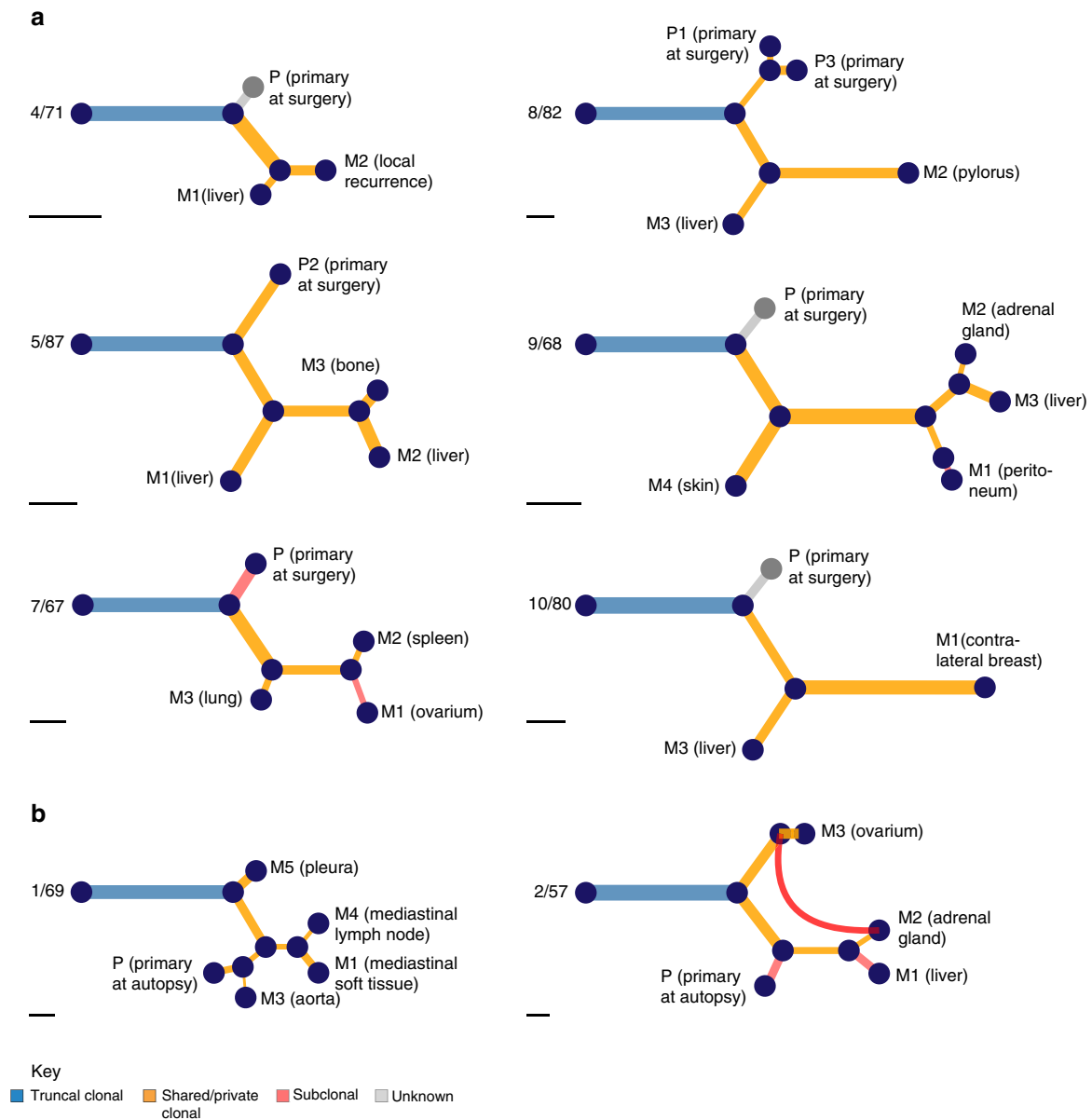


Figure 5 | Combined phylogenies representing metastatic progression across eight patients. (a) Phylogenies of early stage patients who underwent primary surgery followed by systemic treatment and **(b)** phylogenetic trees obtained from advanced stage treatment naïve and *de novo* metastatic patients. The same colour code as in previous figures is used to depict ‘early’ and ‘late’ events. For visual purposes, all the trees were globally rescaled such that the trunks of the trees have the same length. The scale bars at the bottom represent 10 SNVs and provide an indication of the original length of the trees. For patients 4/71 and 9/68, the primary tumour samples removed at surgery were exome sequenced and putative tier-1 somatic mutations were further validated by Sequenom MassARRAY and ultra-deep amplicon sequencing. However, the corresponding SNP arrays showed that these samples had CCFs below the set threshold of 30% for phylogenetic reconstruction. Nonetheless, for these two particular samples, tier-3 SNVs were included in the construction of the phylogenetic trees for SNVs on account that the lesions had been removed several years prior to the diagnosis of distant relapses and autopsy. Similarly, for patient 10/80, the primary tissue samples did not pass the filtering criteria of tier-3 level. The thickness of the branches leading to these nodes is therefore irrelevant. These are displayed in grey.

Patient 10/80 harboured an ‘early’ amplification of the APOBEC cluster on chromosome 22 (Supplementary Data 4) while patient 8/82 harboured an ‘early’ *APOBEC3B* D316N mutation (Supplementary Data 3).

Discussion

Herein, we applied phylogenetic techniques to infer the evolutionary history of breast cancer progression from an autopsy cohort of ten patients. In contrast to previous reports, which

compared single metastasis and primary tumour pairs only or multiple-matched metastases and primary tumours for no more than two patients, the availability of a larger number of patients with matched primary and multiple metastatic samples was critical to our study for deciphering the routes of dissemination underlying metastatic progression.

We observed two possible scenarios. The most frequent implied a single successful seeding event from the primary tumour followed by metastasis-to-metastasis cascading disseminations, whereas the second involved multiple seeding events

DOI:10.14753/SE.2019.2189

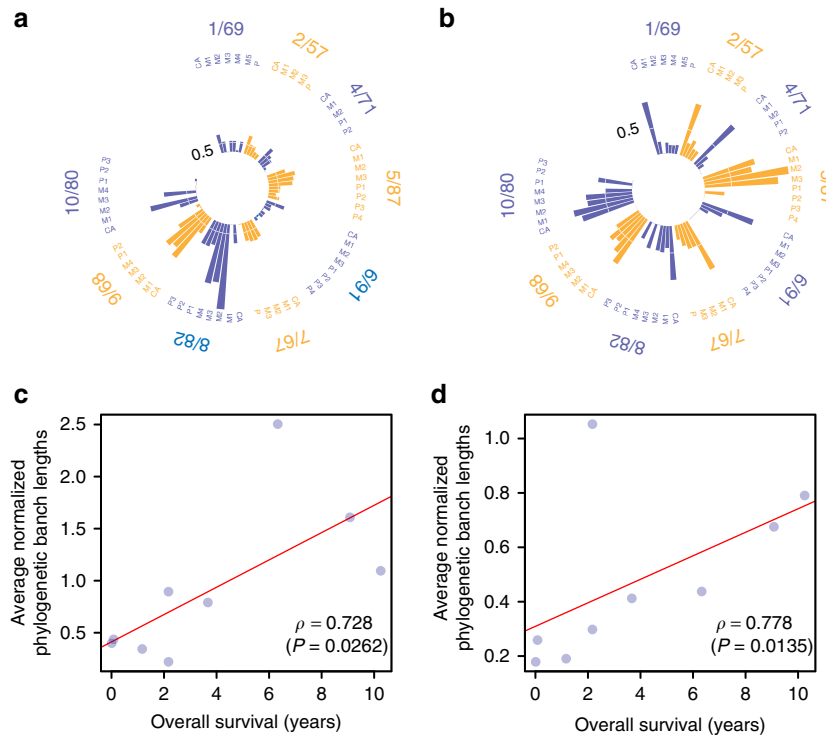


Figure 6 | Dynamics of genomic alterations during metastatic progression. Normalized phylogenetic distance for each sample profiled. These are obtained as the ratio of the path from the common ancestor node to the given sample relative to the trunk of the tree for (a) SNVs and (b) CNAs. (c,d) Correlation of the average phylogenetic distances with overall survival for SNVs and CNAs, respectively.

from the primary tumour alongside daughter metastasis-to-metastasis disseminations. This dichotomy coincides with the clinical history where, except for patient 5/87, descent from a common metastatic origin was observed in patients diagnosed with early stage breast cancer, whereas multiple seeding events from the primary tumour occurred in patients diagnosed with advanced stage disease.

The role of primary tumour resection in *de novo* metastatic breast cancer patients is unclear, and there is currently no consensus whether this procedure confers a survival benefit. A recent open label trial did not support primary surgery in *de novo* metastatic patients progressing to front-line chemotherapy²⁵ and in a subgroup analysis of a Turkish study²⁶, patients with multiple liver and lung metastases did worse in the primary surgery group consistent with earlier reports that surgical excision of the primary tumour might enhance the growth of micrometastases^{27–29}. However, in the same trial by Soran *et al.*²⁶, the authors observed an increased progression free survival for primary tumour resection in ER+/HER2-*de novo* metastatic patients with solitary bone metastases. Thus, our observations suggest that surgical excision of the primary tumour might reduce metastatic dissemination in selected cases hence providing a potential biological rationale for this practice. Similarly, there is no strong recommendation showing overall survival benefit from surgical resection of oligo-metastases in breast cancer. From our analyses, metastatic lesions constitute an additional source of seeding and heterogeneity in advanced breast cancer. Our cohort is too small to derive practice-changing evidence, but supports the concept that resecting isolated metastases may be of clinical benefit in oligo-metastatic breast cancer patients. In both cases, results from larger, prospective studies are warranted.

We reckoned that the number of ‘late’ SNVs and CNAs, should increase as distant metastases evolve and should give an

indication, albeit approximate, of the time elapsed since they last diverged from their common ancestor. Indeed, we observed a positive correlation between overall survival and the average normalized phylogenetic branch lengths. This can be explained by the fact that patients 1/69 and 2/57 were *de novo* metastatic and consistent with those two patients, 4/71 also had a very short distant metastasis free and overall survival. At the other extreme, in patients 8/82, 9/68 and 10/80 who relapsed more than 4 years after initial diagnosis, the extent of ‘late’ genomic alterations were commensurate with the survival of the patients. These results suggest, not unexpectedly, that metastases from patients with longer cancer histories are genetically more distant from their ‘common ancestor’ or their primary tissue of origin than those of patients with a shorter cancer history.

Evidence has been accumulating in the literature regarding treatment-induced genomic remodelling^{15,16,30–37}, especially implicating *ESR1* and *PTEN* alterations in endocrine and PI3K-inhibitor resistance, respectively. In our series, four out of the five ER-positive patients received aromatase inhibitors. However, no *ESR1* mutations have been detected in their distant metastases. None of the patients received any PI3K-inhibitor making it impossible to evaluate resistance mechanisms associated to this treatment.

Overall, by characterizing the genomic alterations that shape metastatic genomes, we have gleaned new insights into the dissemination patterns of breast cancer with potential clinical implications: (1) cascading dissemination from metastases appears to be a major route of metastatic progression in early, radically resected breast cancer and (2) primary tumours at diagnosis may not adequately represent advanced metastatic disease advocating the need for genetic characterization of multiple metastatic lesions. The very recent technical advances in the assessment of circulating tumour DNA³⁸ may both allow

DOI:10.14753/SE.2019.2189

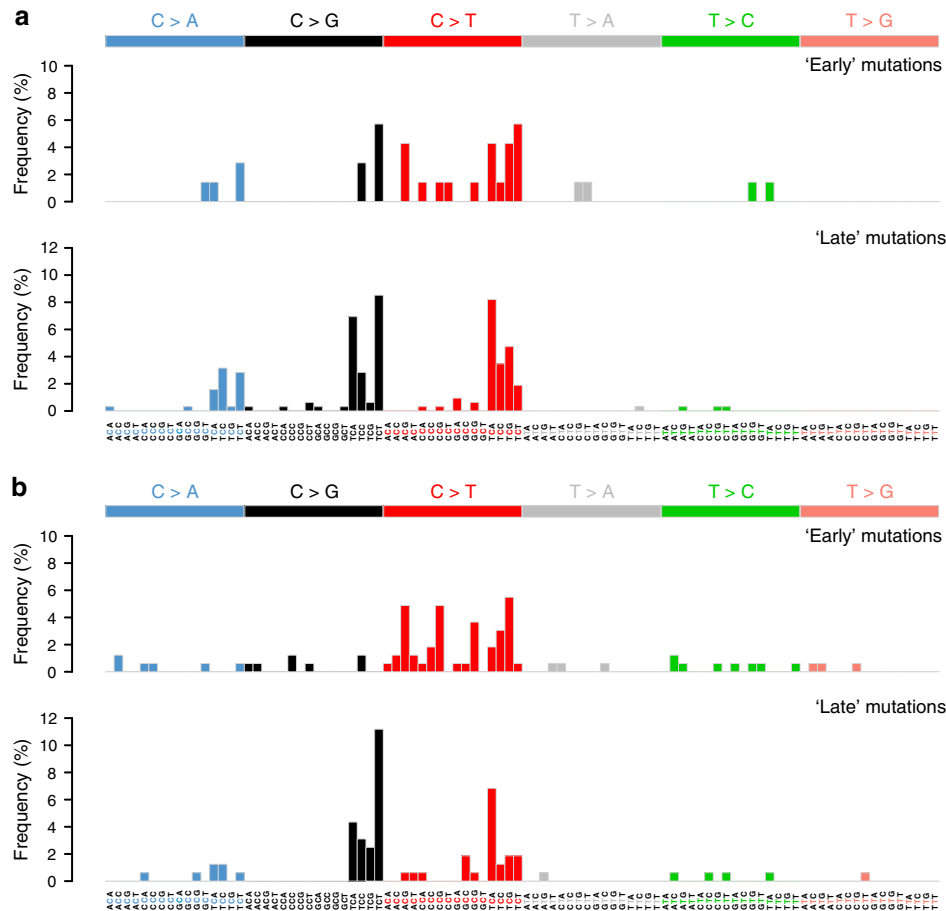


Figure 7 | Distribution of substitutions during metastatic progression. Frequency of the different types of substitutions for tier-3 SNVs in patients (a) 8/82 and (b) 10/80. These are grouped as 'early' and 'late' according to their occurrence in the respective phylogenetic trees.

the early detection of micrometastatic disease before recurrence and may better capture tumour heterogeneity of metastatic disease guiding the best therapeutic options for early and advanced breast cancer patients in the future. Genomic alterations uniquely defining breast cancer metastases from an aetiological standpoint, and therapeutic agents tackling them are yet to be found.

Methods

Patients and samples. The average period between the time of death and acquisition of autopsy samples was 2.8 days (1.5–4.2). Between the time of death and dissection, the cadavers were kept at 4 °C. At autopsy, complete external and detailed internal examinations were performed. The organs were thoroughly examined, weighed and tissue samples were taken. All tissue samples were fixed in formalin and embedded in paraffin as part of routine workup. All bone samples were decalcified using EDTA solution to preserve the antigenicity of the tissue proteins. Hematoxylin-eosin (HE) stained sections were reviewed by J.K., A.M.S. and B.S. to confirm the presence and percentage of invasive carcinoma as well as other tissue composition. A detailed description of the clinico-pathological characteristics of each patient is provided in Supplementary Data 1. This project was approved by the Institutional Review Board (IKEB 185-1/2007). This study is retrospective in nature and part of a larger institutional-based autopsy programme carried out at the Semmelweis University. It did not impact treatment decision for the patients involved and received approval from the ethical committee of the Semmelweis University.

Pathological characterization of samples. The stage of primary tumours was reclassified based on the 7th version of TNM classification system. Immunohistochemistry (IHC) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) were performed on 4 µm tissue sections. All the samples underwent centralized IHC for the oestrogen (ER) and progesterone (PgR) receptor status and IHC/FISH characterization for HER2 receptor status. Hormone receptor and HER2 status

were assessed by IHC on all samples with an automated immunostainer system (Ventana Benchmark, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions with the following antibodies: ER-SP1 rabbit monoclonal (Ventana #790-4324) ready to use kit, PgR-1E2 rabbit monoclonal (Ventana #790-2223) ready to use kit, Ki-67-MIB1 (DAKO #M7240, Carpinteria, CA, USA) at dilution 1:100 and HER2/neu-4B5 (Ventana #800-2996) ready to use kit. Hormone receptor status was evaluated using Allred-Quick scoring system by two investigators independently (A.M.S. and B.S.). Ki-67 index was measured as the ratio of the positive tumour cell nuclei in the sample. IHC assessment of Ki-67 was evaluated only on the primary tumours. HER2 positivity was primarily defined at protein level using IHC and supplemented by FISH using Poseidon probes (Kreatech Diagnostics, #KBI-10735, Amsterdam, Netherlands). HER2 IHC was evaluated according to the modified standard protocol that is, positive by IHC only if more than 30% of tumour cells show strong, complete membrane reaction. FISH was performed on samples with IHC 2+ and 3+ for the evaluation of HER2 gene amplification status. FISH results were evaluated according to the 2013 ASCO/CAP guidelines³⁹. A detailed review of all samples is provided in Supplementary Data 2.

DNA isolation. DNA was extracted from the primary tumours, metastases and matched normal tissue from FFPE tissue blocks after macrodissection using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, #56404, Hilden, Germany). Double-stranded DNA (dsDNA) was quantified using the QUBIT 2.0 Fluorometer (Invitrogen) and the PicoGreen assay for double-stranded DNA. Only samples from which > 1 µg of double-stranded DNA, as quantified by the two assays could be extracted, were selected for downstream molecular profiling.

Exome and targeted sequencing analysis. For each patient, part of the available samples was used to index the presence of SNVs using whole-exome sequencing. A total of 51 samples including at least one normal sample per patient were sequenced at a target coverage of 40 ×. The putative somatic SNVs were validated by Sequenom MassARRAY in both the germline reference and cancer samples. As further validation, all available cancer samples were subjected to targeted

amplicon deep sequencing at a median coverage of $9,000 \times$ to confirm initial sequencing results and increase the accuracy of VAFs.

Whole-exome DNA libraries were generated following the manufacturer's protocol with minor modifications (Illumina TruSeq DNA library preparation kit v2). Before end-repair, a 65 °C incubation step was added to remove reversible crosslinks, after which excessive single-stranded DNA was removed enzymatically. The concentration of double-stranded DNA was assessed using the PicoGreen assay and the concentration of adapters used for ligation was adjusted accordingly. For the library enrichment, 5–7 cycles of PCR were used. Whole-exome capture was then performed using the Illumina Human Exome capture kit and libraries were sequenced on a HiSeq2000 using V3 flowcells generating 2×100 bp paired-end reads. Raw sequencing reads were mapped to the human reference genome (NCBI37/hg19) using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA)⁴⁰ and aligned reads were processed with SAMtools⁴¹. Duplicate reads were removed using Picard tools. Base recalibration, local realignment around indels and SNV calling were performed using the GenomeAnalysisToolKit (GATK)⁴². Indels were called using Dindel⁴³. Mutations were filtered based on mapping quality, and sequencing coverage. Somatic mutations were further filtered by comparison with the matched germline reference and using common variant databases such as the 1000 genomes project⁴⁴ and dbSNP version 132 (ref. 45).

For the targeted resequencing experiments, primers were designed using the Sequenom's MassARRAY assay design software and universal sequence tags were added manually. Amplicons encompassing the mutation of interest were generated using a first PCR (Roche FastStart High Fidelity PCR kit) with universal sequencing adapters (Access Array Barcode) containing a 10 bp index added in a second PCR. The resulting PCR products were pooled, denatured and sequenced on an Illumina MiSeq in a 2×75 bp paired-end sequencing run using a V3 flowcell. Fastq files were generated and demultiplexed using CASAVA. The raw sequencing reads were mapped to the human reference genome (NCBI37/hg19) using BWA. Read counts of both variant and reference alleles were called using GATK and manually checked in IGV⁴⁶.

Tiering system for filtering SNVs. A five-tier system was devised to filter SNVs for downstream analysis (Supplementary Data 3). We considered tier-0 SNVs as any SNV indexed in any sample including the matched germline reference by exome sequencing. Tier-1 SNVs are those that were further called somatic after comparison with the germline reference while tier-2 SNVs are the subset of tier-1 which have been further validated and confirmed somatic by Sequenom MassARRAY. Tier-3 SNVs are the further subset that was confirmed present by targeted deep amplicon sequencing. Due to formalin fixation and paraffin embedding, at some loci, all four bases were often observed at low frequencies. Thus, to determine the background noise of the targeted deep sequencing experiments, we selected 25 bp upstream and downstream of tier-2 SNVs. For each position, the number of reads for the reference nucleotide and the other 3 non-reference nucleotides was determined using GATK. To exclude possible SNPs or SNVs other than the one of interest, we removed all data points that showed more than 10% non-reference reads. We then pooled all the data for each mutation type (AT > CG, AT > GC, AT > TA, CG > AT, CG > GC and CG > TA) and calculated the average background signal and s.d. From these estimates, the highest value observed was 1.59%. Thus, we chose a conservative value of 3% as the final cut-off for calling a mutation present.

In the present context, several samples were matched to a given patient and we found it equally important to have a high coverage to call a mutation present in one sample, as it is to call absence in another paired sample. Thus, at the tier-3 level, we first filtered all SNVs in all matched samples to have a coverage of $> 1,500 \times$ and kept samples with a minimum of 75% non-missing values. We then excluded all SNVs with > 1 missing value across any of the matched samples previously retained. We reversed the filtering order for VAFs by first eliminating SNVs that were called absent $< 3\%$ across all matched samples previously retained. Because of low CCF, it is likely that some samples have a lower total number of SNVs called present. However, a lower number of detected mutations could also be biologically grounded. Therefore, we use a lenient filtering to exclude samples with potentially low CCFs by requiring that $> 20\%$ of SNVs be called present. Some samples showed a large number of SNVs or had limited starting DNA available. For those samples, we were compelled to skip validation by Sequenom MassARRAY and thus the tier-2 level. Finally, we required that for all samples where a matched-SNP array and targeted sequencing were available, that the sample displays a CCF $> 30\%$ as determined by SNP array. All SNVs from that sample were then referred to as tier-4 SNVs

SNP array analysis. For the estimation of CNAs, a total of 64 samples were shipped for processing to the Affymetrix Research Services Laboratory. Normal and tumour DNA from FFPE samples were genotyped using the Affymetrix OncoScan FFPE Express 2.0 arrays. Routine formalin fixation and paraffin embedding frequently damages DNA causing wavy profiles, which may be wrongly interpreted as copy number aberrations. Thus, the median absolute pairwise deviation (MAPD) and the median auto-correlation (MAC) across the \log_2 ratio intensities were used as quality control for the SNP arrays (Supplementary Data 2). Samples with an MAPD > 0.7 or an MAC > 0.3 were discarded. Samples suspected to have a low CCF on visual inspection of the BAF tracks were flagged and after

processing, those confirmed to have less than 30% CCF were discarded from downstream applications. From the remaining samples, only informative probes displaying heterozygous genotype (AB) and copy-neutral state (2) in the matched normal sample were kept for analysis. We used the added value of multiple-matched samples per patient to infer breakpoints, which may otherwise have been missed due to differences in CCF across the various samples. The \log_2 ratio intensities and BAF, grouped per patient, were segmented jointly using the multitrack PCF algorithm in the R package copynumber⁴⁷ to determine common breakpoints. The penalty parameter γ determining discontinuities in the \log_2 ratio and BAF tracks was set individually for each patient after visual inspection of the segmentation profiles. Finally, all segments that were less than three s.d. away were merged with their immediate neighbours.

Integer level estimates of total copy number and major allele were obtained using GAP⁴⁸. We compared the estimates returned by GAP with two other mainstream programs: (1) ASCAT⁴⁹ and (2) ABSOLUTE²¹. Unless otherwise stated, the parameter sets for each programme were kept at default values. For ASCAT, the parameter γ , which determines the platform-specific compression ratio, was set to 0.8. The programme returns one default estimate of ploidy and CCF, which was used in the comparison against GAP. ABSOLUTE was run in 'total copy' mode and model based evaluation against the SNP6 platform. The fraction of the genome allowed to be non-clonal was set to infinity so that the maximum number of solutions could be evaluated. ABSOLUTE returns a set of possible values for ploidy and CCF. The closest solution to that returned by GAP in Euclidean space, after rescaling ploidy values to unit distance, was chosen. The results obtained by GAP, ASCAT and ABSOLUTE are contrasted in Supplementary Fig. 10a,b. In all three cases, the Spearman's ρ between the estimated CCF was high. In the case of ploidy estimates, the correlation between GAP and ASCAT was relatively low due to two reasons: (1) several matched samples from two patients displayed ploidy values outside the range considered by ASCAT and (2) at several loci displaying high copy numbers, GAP truncates the estimate to 8 while ASCAT does not thereby affecting the true estimate. We computed the Cohen's κ coefficient between ASCAT and GAP to measure the agreement in total copy numbers and major alleles. These are displayed in Supplementary Fig. 10c while the correlation of the κ coefficients for total copy numbers and the absolute difference in ploidy between the two algorithms is shown in panel d. The results showed that the disagreement between the two programs in the phasing of alleles and estimation of total copy numbers is in fact linked to the discordances in ploidy ($\rho = -0.898$, $P < 0.01$). Because the present dataset contained matched samples and may represent a biased result, we used an additional dataset of 125 unrelated samples profiled using similar Affymetrix OncoScan SNP arrays (unpublished data) to reproduce the analysis. Supplementary Figure 11a,b shows a very good correlation between the two estimates of ploidy ($\rho = 0.885$, $P < 0.01$) and CCF ($\rho = 0.907$, $P < 0.01$). However, the correlation of the κ coefficients for total copy numbers and the absolute difference in ploidy ($\rho = -0.733$, $P < 0.01$) or CCF ($\rho = -0.119$, $P = 0.147$) shows that it is, in fact, the incorrect estimation of global genomic mass that leads to disagreement between the two algorithms. Supplementary Figure 11f–m contrasts the results from GAP and ASCAT for four samples with increasing genomic mass and illustrates the complexity of choosing the correct solution of CCF and ploidy. Given the present context of matched samples and because GAP allowed for manual review of ploidy solutions, we opted for this package for downstream analyses taking into consideration the maximal limit of eight copies imposed by the software as follows: (1) SNVs that occurred at loci where the total copy number was 8 or a major allele count > 4 was observed were not considered for the estimation of CCF or clonal frequency and (2) similarly for the phylogenetic reconstructions using CNAs, except in the case of high ploidy tumours (that is, 1/69, 7/67, 8/82 and 10/80) any locus displaying a total copy number of 8 or a major allele count > 4 in any sample was removed from all matching samples of that particular patient.

Estimation of CCF and clonal frequencies from tier-4 SNVs. The CCF was estimated both individually from each tier-4 SNV and globally from the whole set of tier-4 SNVs in samples where a matched-SNP array was available. Let q_t denote the total copy number at the mutated locus, q_1 denote the minor copy number and q_2 denote the major copy number such that $q_2 \geq q_1$, $q_t = q_1 + q_2$ and q_1, q_2 and $q_t \in \alpha$. Let s_q denote the number of mutated copies such that $s_q \in \{1, \dots, q_2\}$. Let f_{sq} denotes the expected VAF of the SNV where $f_{sq} \in [0, 1]$. Then, f_{sq} is related to s_q and α , the CCF, as follows:

$$f_{sq} = s_q \left(\frac{\alpha}{\alpha q_t + 2(1 - \alpha)} \right) \quad (1)$$

where α is the variable that we are trying to estimate while \hat{f} is taken to be the observed VAF. We denote the estimate of CCF from sequencing as $\hat{\alpha}$. The above equation can be rearranged such that

$$\hat{\alpha} = \frac{2\hat{f}}{s_q - \hat{f}(q_t - 2)} \quad (2)$$

Let n be the total number of sequencing reads that cover the mutated locus. Then

$$\Pr(X = n\hat{f}) = \omega_{sq} \text{Beta}(f_{sq} | n\hat{f} + 1, n(1 - \hat{f}) + 1) \quad (3)$$

where X is the number of mutated reads for a given SNV, w_{sq} specify the mixture weights for each possible value of s_q . Computation of f_{sq} requires prior knowledge of α . To estimate s_q and for individual SNVs irrespective of other mutations, we make the assumption that α is known. Thus, q_1 , q_2 and α are plugin quantities obtained from the corresponding SNP array. Then

$$s_q^* = \operatorname{argmax}_{s_q \in \{1, \dots, q_2\}} \left\{ \Pr(X = n\hat{f}) \right\} \quad (4)$$

and the sequencing error $e \in [0,1)$ is modelled after Purdom *et al.*⁵⁰ such that

$$f_e = \frac{1}{3-2e} ((3-4e)f_{sq} + e) \quad (5)$$

replaces f_{sq} in the Beta distribution. We use uniform priors over the range of possible values of s_q and $e = 0.01$. These form the basis of the pointwise estimates of CCFs (Supplementary Fig. 10b). To relax the requirement on prior knowledge of α , we define the likelihood function over all tier-4 SNVs present in a given sample as

$$\mathcal{L}(f|n, s_q, \omega_{sq}) = \sum_{s_q \in \{1, \dots, q_2\}} \Pr(X = n\hat{f}) \quad (6)$$

At a given value of α , we compute the log of L and iteratively adjust the weights w_{sq} until L converges or a maximum of 100 iterations is reached. The global CCF, α^* , is the value that maximizes L such that

$$\alpha^* = \operatorname{argmax}_{\alpha \in \{0.1, \dots, 0.9\}} \left\{ \mathcal{L}(\hat{f}|\alpha) \right\} \quad (7)$$

An example is shown in Supplementary Fig. 10e–f and α^* is compared to the estimate of GAP in Supplementary Fig. 10g. The CCF and the clonal frequency of SNVs are related and the latter was computed jointly for all samples belonging to a given patient using PyClone⁵¹ from the estimates of major and minor copy numbers returned by GAP. We used a Beta Binomial distribution with parental copy number option and default parameter settings except for the sequencing error which was set to 0.01 and the tumour content which was set to the global CCF, α^* , estimated above.

Phylogenetic analysis of SNVs. The raw VAFs of tier-3 SNVs from targeted resequencing were converted into binary calls based on a threshold of 3%. We initially intended to filter in only fully clonal tier-3 SNVs using this conservative cut-off and infer the phylogeny for individual patients using the Dollo parsimony method and a branch and bound exhaustive search for the best phylogenetic reconstruction as described in Felsenstein⁵² using the programme PHYLIP. The outgroup used for rooting the phylogenies was one where all the characters were set to the ancestral state 0. The Dollo parsimony criterion minimizes homoplasies at the expense of reversions in later branches and the criteria for determining the best phylogenetic tree is minimizing the number of such reversions. Despite this, several phylogenetic trees can be equally parsimonious. Instead of collapsing the trees using consensus methods, we used the corresponding CNA based tree to break ties and infer the correct phylogeny. The trees in Newick format were rendered using the R package ape⁵³. The heat maps representing the tier-3 SNVs were ordered according to the topology and branch lengths of their corresponding phylogenetic trees via an ancestral state reconstruction using the accelerated transition model^{54,55} as provided in the R package phangorn⁵⁶. The phylogenetic trees for each patient are shown in Supplementary Fig. 7. Each predicted reversion of SNV was manually verified against the underlying CNA profile. The tier-3 level does not take into account the CCF of the samples. It is possible that, despite the previous filters, very low CCF samples with overall fewer positive mutation calls are included. These samples would lead to early branches in the trunk of the phylogenies. Thus, we reproduced the same analysis with samples having tier-4 SNVs. The results are shown in Supplementary Fig. 8.

Phylogenetic analysis of CNAs. The major and minor copy numbers returned by GAP were modelled using a transducer-based pairwise comparison function using the programme MEDICC⁵⁷. For near-diploid samples, we assume a pure diploid outgroup with no copy number aberrations that is, 2/1 (total copy number/major allele) to root the phylogenies. In the case of tetraploid samples, we included an additional step to phase CNAs relative to the whole-genome duplication event within the phylogeny of the given patient. We first used the classic approach to infer an intermediate tree with correct topology irrespective of branch lengths. For the major or minor copy and at each locus, we compute a parsimony score, which is the sum of branch lengths of the intermediate tree rooted using any of the four tetraploid ancestral states 6/4, 4/2, 4/4 and 2/2 (total copy number/major allele). These represent the copy number states 3/2, 2/1, 2/2 and 1/1 following a whole-genome duplication event. We used all possible permutations of observed copy numbers at the internal nodes except for 0 → 1 transitions. We chose the intermediate tree and thus the related tetraploid ancestral state obtaining the minimum score. Ties, if present, are broken by summing the intermediate tree length with the CNAs occurring prior to the whole-genome duplication that is, 1, 0, 2 and 1, respectively. Finally, the global phylogenetic tree is inferred using the classic approach jointly at all loci and rooted using the tetraploid ancestor as

outgroup. The phylogenetic trees are shown in Figs 3–5 of the main text and Supplementary Fig. 9. Support values for the phylogenetic trees were obtained by resampling the pairwise distance matrix 100 times with added Gaussian noise and counting similar bipartitions between the resulting trees and the original phylogeny.

Data availability. The sequencing and SNP array data have been deposited at the European Genome-Phenome Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ega/>), which is hosted by the European Bioinformatics Institute, under accession number EGAS00001000760.

References

- Campbell, P. J. *et al.* The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* **467**, 1109–1113 (2010).
- Yachida, S. *et al.* Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **467**, 1114–1117 (2010).
- Gerlinger, M. *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**, 883–892 (2012).
- Bashashati, A. *et al.* Distinct evolutionary trajectories of primary high-grade serous ovarian cancers revealed through spatial mutational profiling. *J. Pathol.* **231**, 21–34 (2013).
- Schwarz, R. F. *et al.* Spatial and temporal heterogeneity in high-grade serous ovarian cancer: a phylogenetic analysis. *PLoS Med.* **12**, e1001789 (2015).
- McPherson, A. *et al.* Divergent modes of clonal spread and intraperitoneal mixing in high-grade serous ovarian cancer. *Nat. Genet.* **48**, 758–767 (2016).
- Hong, M. K. *et al.* Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer. *Nat. Commun.* **6**, 6605 (2015).
- Gundem, G. *et al.* The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* **520**, 353–357 (2015).
- de Bruin, E. C. *et al.* Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science* **346**, 251–256 (2014).
- Gerlinger, M. *et al.* Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat. Genet.* **46**, 225–233 (2014).
- Shah, S. P. *et al.* Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature* **461**, 809–813 (2009).
- Ding, L. *et al.* Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* **464**, 999–1005 (2010).
- Navin, N. *et al.* Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* **472**, 90–94 (2011).
- Cummings, M. C. *et al.* Metastatic progression of breast cancer: insights from 50 years of autopsies. *J. Pathol.* **232**, 23–31 (2014).
- Juric, D. *et al.* Convergent loss of PTEN leads to clinical resistance to a PI(3)K α inhibitor. *Nature* **518**, 240–244 (2015).
- Murtaza, M. *et al.* Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nat. Commun.* **6**, 8760 (2015).
- Brastianos, P. K. *et al.* Genomic characterization of brain metastases reveals branched evolution and potential therapeutic targets. *Cancer Discov.* **5**, 1164–1177 (2015).
- Zhao, Z. M. *et al.* Early and multiple origins of metastatic lineages within primary tumors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, 2140–2145 (2016).
- Yates, L. R. *et al.* Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nat. Med.* **21**, 751–759 (2015).
- Kim, M. *et al.* Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* **139**, 1315–1326 (2009).
- Carter, S. L. *et al.* Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nat. Biotechnol.* **30**, 413–421 (2012).
- Alkner, S. *et al.* Contralateral breast cancer can represent a metastatic spread of the first primary tumor: determination of clonal relationship between contralateral breast cancers using next-generation whole genome sequencing. *Breast Cancer Res.* **17**, 102 (2015).
- Klevebring, D. *et al.* Exome sequencing of contralateral breast cancer identifies metastatic disease. *Breast Cancer Res. Treat.* **151**, 319–324 (2015).
- Alexandrov, L. B. *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–421 (2013).
- Badwe, R. *et al.* Locoregional treatment versus no treatment of the primary tumour in metastatic breast cancer: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* **16**, 1380–1388 (2015).
- Soran, A. *et al.* A randomized controlled trial evaluating resection of the primary breast tumor in women presenting with de novo stage IV breast cancer: turkish study (Protocol MF07-01). *J. Clin. Oncol.* **34**, abstr 1005 (2016).
- Babiera, G. V. *et al.* Effect of primary tumor extirpation in breast cancer patients who present with stage IV disease and an intact primary tumor. *Ann. Surg. Oncol.* **13**, 776–782 (2006).
- Fisher, B., Gunduz, N., Coyle, J., Rudock, C. & Saffer, E. Presence of a growth-stimulating factor in serum following primary tumor removal in mice. *Cancer Res.* **49**, 1996–2001 (1989).

29. Neuman, H. B. *et al.* Stage IV breast cancer in the era of targeted therapy: does surgery of the primary tumor matter? *Cancer* **116**, 1226–1233 (2010).
30. Robinson, D. R. *et al.* Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat. Genet.* **45**, 1446–1451 (2013).
31. Ellis, M. J. *et al.* Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* **486**, 353–360 (2012).
32. Schiavon, G. *et al.* Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Sci. Transl. Med.* **7**, 313ra182 (2015).
33. Li, S. *et al.* Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. *Cell Rep.* **4**, 1116–1130 (2013).
34. Friibens, C. *et al.* Plasma ESR1 mutations and the treatment of estrogen receptor-positive advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **34**, 2961–2968 (2016).
35. Merenbakh-Lamin, K. *et al.* D538G mutation in estrogen receptor- α : a novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Res.* **73**, 6856–6864 (2013).
36. Spoerke, J. M. *et al.* Heterogeneity and clinical significance of ESR1 mutations in ER-positive metastatic breast cancer patients receiving fulvestrant. *Nat. Commun.* **7**, 11579 (2016).
37. Toy, W. *et al.* ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat. Genet.* **45**, 1439–1445 (2013).
38. Garcia-Murillas, I. *et al.* Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci. Transl. Med.* **7**, 302ra133 (2015).
39. Wolff, A. C. *et al.* Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3997–4013 (2007).
40. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
41. Li, H. *et al.* The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
42. McKenna, A. *et al.* The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).
43. Albers, C. A. *et al.* Dindel: accurate indel calls from short-read data. *Genome Res.* **21**, 961–973 (2011).
44. Abecasis, G. R. *et al.* An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* **491**, 56–65 (2012).
45. Sherry, S. T. *et al.* dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* **29**, 308–311 (2001).
46. Thorvaldsdottir, H., Robinson, J. T. & Mesirov, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* **14**, 178–192 (2013).
47. Nilsen, G. *et al.* Copynumber: efficient algorithms for single- and multi-track copy number segmentation. *BMC Genomics* **13**, 591 (2012).
48. Popova, T. *et al.* Genome Alteration Print (GAP): a tool to visualize and mine complex cancer genomic profiles obtained by SNP arrays. *Genome Biol.* **10**, R128 (2009).
49. Van Loo, P. *et al.* Allele-specific copy number analysis of tumors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 16910–16915 (2010).
50. Purdom, E. *et al.* Methods and challenges in timing chromosomal abnormalities within cancer samples. *Bioinformatics* **29**, 3113–3120 (2013).
51. Roth, A. *et al.* PyClone: statistical inference of clonal population structure in cancer. *Nat. Methods* **11**, 396–398 (2014).
52. Felsenstein. *Inferring Phylogenies* (Sinauer Associates Inc., 2004).
53. Paradis, E., Claude, J. & Strimmer, K. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* **20**, 289–290 (2004).
54. Swofford, D. L. & Maddison, W. P. Reconstructing ancestral character states under Wagner parsimony. *Math. Biosci.* **87**, 199–229 (1987).
55. Maddison, W. P. & Maddison, D. R. *MacClade: Analysis of Phylogeny and Character Evolution* (Sinauer, 1992).
56. Schliep, K. P. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* **27**, 592–593 (2011).
57. Schwarz, R. F. *et al.* Phylogenetic quantification of intra-tumour heterogeneity. *PLoS Comput. Biol.* **10**, e1003535 (2014).

Acknowledgements

We would like to extend our gratitude to the families of the deceased patients who participated in this study. The authors would further like to thank N. Kheddoumi, E. Azumah, M. Pekár and E. Samodai for technical assistance, O. Kiss, I. Illyés, L. Madaras, A. Kovács, G. Lotz, Z. Baranyai, B. Járnyai, T. Glasz, T. Herbert, K. Simon, C. Diczházi, I. Kaszás, G. Lukács Tóth, T. Barna, F. Salamon and G. Bodoky for collection of study material, Z. Schaff, J. Timár and their colleagues at the 2nd Department of Pathology, Semmelweis University for supporting this research programme. D.B. and C.S. are supported by the Belgian Fonds National de la Recherche Scientifique (F.R.S-FNRS). C.D. is supported by a grant from the Brussels Region—Impulse Programme Life Sciences and by Les Amis de l’Institut Bordet. B.S. is supported by the Susan G. Komen and American Joint (JDC) and A.M.S. by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 National Excellence Program. This study was supported by grants from the MEDIC Foundation, Les Amis de l’Institut Bordet, MKOT-Roche-2012, TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-0013 and TÁMOP 4.2.1.B-09/1/KMR-2010-0001.

Author contributions

C.D. and C.S. conceived the study. B.S., A.M.S., Z.I.N., Z.F., A.-M.T., M.D., G.S. and J.K. provided the clinical specimens. B.S., A.M.S., Z.I.N., Z.F., A.-M.T., D.L. and J.K. performed the histopathological assessment of the samples. P.-Y.A. and G.R. processed the samples. D.S. aligned the sequencing reads and called the mutations. D.B. analysed the SNP arrays, reconstructed the phylogenies and rendered the artwork. D.B., D.S. and B.S. reviewed and assembled all the results. D.B., D.S., B.S., G.Z., L.P., C.S., M.P., D.L., J.K., D.L. and C.D. interpreted the results. D.B., D.L., C.S. and C.D. wrote the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Brown, D. *et al.* Phylogenetic analysis of metastatic progression in breast cancer using somatic mutations and copy number aberrations. *Nat. Commun.* **8**, 14944 doi: 10.1038/ncomms14944 (2017).

Publisher’s note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

Erratum: Phylogenetic analysis of metastatic progression in breast cancer using somatic mutations and copy number aberrations

David Brown, Dominiek Smeets, Borbála Székely, Denis Larsimont, A. Marcell Szász, Pierre-Yves Adnet, Françoise Rothé, Ghizlane Rouas, Zsófia I. Nagy, Zsófia Faragó, Anna-Mária Tőkés, Magdolna Dank, Gyöngyvér Szentmártoni, Nóra Udvarhelyi, Gabriele Zoppoli, Lajos Pusztai, Martine Piccart, Janina Kulka, Diether Lambrechts, Christos Sotiriou & Christine Desmedt

Nature Communications 8:14944 doi: 10.1038/ncomms14944 (2017); Published 21 Apr 2017; Updated 6 Jun 2017

The HTML version of this Article previously published had an incorrect publication date of 20 April 2017; it should have been 21 April 2017. This has now been corrected in the HTML; the PDF version of the paper was correct from the time of publication.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017