

Aus dem  
Department für Frauengesundheit Tübingen  
Universitäts-Frauenklinik

# **Disseminierte Tumorzellen beim ductalen Carcinoma in situ**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Walter, Vincent Philip**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Hartkopf  
2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend

Tag der Disputation: 14.03.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Brustkrebs allgemein . . . . .	1
1.2	Pathologie . . . . .	1
1.3	Ductales Carcinoma in situ . . . . .	2
1.3.1	CNV beim DCIS und invasiven Mammakarzinom . . . . .	5
1.4	Disseminierte Tumorzellen . . . . .	6
1.5	Zirkulierende Tumorzellen . . . . .	7
1.6	Fragestellungen . . . . .	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1	Ethik . . . . .	9
2.2	Patientendaten . . . . .	9
2.3	Detektion disseminierter Tumorzellen im Knochenmark . . . . .	10
2.4	Generation einer Einzelzellsuspension aus Paraffinblöcken . . . . .	11
2.5	FFPE DNA Reparaturschritt . . . . .	12
2.6	Tumor DNA Isolation aus Paraffinblöcken . . . . .	12
2.7	Immunhistochemische Färbung von zytokeratinpositiven Zellen . . . . .	13
2.8	Einzelzellisolation von Cytospins . . . . .	13
2.9	Mikromanipulation . . . . .	14
2.10	Linker Adapter Whole Genome Amplification . . . . .	14

---

2.11 LowPass Sequenzierung . . . . .	15
2.12 Statistik . . . . .	16
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>18</b>
3.1 Einzelzellgenomamplifizierung von Zellen aus Paraffinblöcken des Primärtumors . . . . .	18
3.2 DCIS Patientenkollektiv . . . . .	21
3.3 Charakterisierung des Einzelzellgenoms disseminierter Tumorzellen und zugehöriger Primärtumore . . . . .	33
3.3.1 DCIS 1 . . . . .	35
3.3.2 DCIS 2 . . . . .	37
3.3.3 DCIS 3 . . . . .	37
3.3.4 DCIS 4 . . . . .	37
3.3.5 DCIS 5 . . . . .	37
3.3.6 DCIS 6 . . . . .	43
3.3.7 DCIS 7 . . . . .	43
3.3.8 DCIS 8 . . . . .	43
<b>4 Diskussion</b>	<b>49</b>
4.1 Longitudinaler Vergleich von CNV-Profilen aus Paraffin-Blöcken . . . . .	49
4.2 Charakterisierung von DCIS DTZ . . . . .	51
4.2.1 Klinische Daten . . . . .	51
4.2.2 Genomische Charakterisierung . . . . .	54
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
<b>7 Erklärung zum Eigenanteil</b>	<b>66</b>
<b>8 Veröffentlichungen</b>	<b>67</b>



# Abbildungsverzeichnis

1.1	DCIS CNV Profile der Progenetix Datenbank. . . . .	6
3.1	Qualitätskontroll PCR mit und ohne Reparaturschritt. . . . .	19
3.2	Gegenüberstellung der Ergebnisse der Qualitätskontroll PCR mit und ohne Reparaturschritt. . . . .	20
3.3	Auswahl der Genomamplifikate für die Lowpass Sequenzierung. . .	22
3.4	Copy Number Profile von Einzelzellen des Primärtumors aus FFPE Gewebe. . . . .	23
3.5	Copy Number Profile von Einzelzellen des ipsilateralen Rezidivs aus FFPE Gewebe. . . . .	24
3.6	Copy Number Profile von Einzelzellen des kontralateralen Rezidivs aus FFPE Gewebe. . . . .	25
3.7	Vergleich von Copy Number Profilen aus Primärtumor, ipsilatera- lem Lokalrezidiv, kontralateralem Rezidiv, disseminierten Tumor- zellen aus dem Knochenmark und zirkulierenden Tumorzellen aus dem peripheren Patientenblut. . . . .	26
3.8	Vergleich der Tumorgröße in mm zwischen Patientinnen mit unter- schiedlicher DTZ Zahl im Knochenmark. . . . .	28
3.9	Kaplan Meier Kurven der rezidivfreien Zeit. . . . .	29
3.10	Kaplan Meier Kurven der lokalrezidivfreien Zeit. . . . .	30

---

3.11 Kaplan Meier Kurven der fernmetastasenfreien Zeit. . . . .	31
3.12 Kaplan Meier Kurven des Gesamtüberlebens. . . . .	32
3.13 Forestplot der Cox-Regressionsmodelle zum Gesamtüberleben, lokalrezidivfreier sowie rezidivfreier Zeit der DCIS Patientinnen. . .	34
3.14 Quantitative Darstellung des GII des mittels WGA amplifizierten Einzelzellgenoms nach Patientin und Zelltyp. . . . .	35
3.15 Copy Number Profile für DCIS Fall 1. . . . .	36
3.16 Copy Number Profile für DCIS Fall 2. . . . .	38
3.17 Copy Number Profile für DCIS Fall 3. . . . .	39
3.18 Copy Number Profile für DCIS Fall 4. . . . .	40
3.19 Copy Number Profile für DCIS Fall 4 (fortges.). . . . .	41
3.20 Copy Number Profile für DCIS Fall 5. . . . .	42
3.21 Copy Number Profile für DCIS Fall 6. . . . .	44
3.22 Copy Number Profile für DCIS Fall 6 (fortges.). . . . .	45
3.23 Copy Number Profile für DCIS Fall 7. Die DTZ wurde ohne Laser Mikrodissektion isoliert. . . . .	46
3.24 Copy Number Profile für DCIS Fall 8. Die DTZ wurde ohne Laser Mikrodissektion isoliert. . . . .	47

# Tabellenverzeichnis

2.1	Thermocyclerprogramm Reamp68. . . . .	15
3.1	Tumorcharakteristika der zur Sequenzierung aufgearbeiteten FF- PE Blöcke. . . . .	18
3.2	Verteilung klinisch-pathologischer Charakteristika in den Gruppen der DTZ- und DTZ+ DCIS Patientinnen. . . . .	27
3.3	Charakteristika der acht DCIS Patientinnen, deren DTZs analysiert wurden. . . . .	33



# Abkürzungsverzeichnis

**ADH** atypische ductale Hyperplasie

**BSA** bovines Serumantigen

**CGH** comparative genomic hybridization

**CK** Zytokeratin

**CNV** copy number variation

**DCIS** ductales Carcinoma in situ

**DNA** Desoxyribonukleinsäure

**DTZ** disseminierte Tumorzellen

**EpCAM** epithelial cell adhesion molecule

**ER** Östrogenrezeptor

**FFPE** formalin fixiert, paraffingebettet

**GII** genomic integrity index

**HER2** human epidermal growth factor receptor 2

**HR** hazard ratio

**IBC** invasiver Brustkrebs

**IDC** invasives ductales Karzinom

**IDC NOS** invasive mammary carcinoma, not otherwise specified

**NST** non special type

**PBS** phosphatgepufferter Salzlösung

**PCR** Polymerasekettenreaktion

**PR** Progesteronrezeptor

**RNA** Ribonukleinsäure

**SEER** Survival, Epidemiology, and End Results Datenbank

**TCGA** Cancer Genome Atlas

**WGA** whole genome amplification [Amplifikation des Gesamtgenoms]

**ZTZ** zirkulierende Tumorzellen

# 1. Einleitung

## 1.1 Brustkrebs allgemein

Das Mammakarzinom ist die mit Abstand häufigste invasive Neoplasie deutscher Frauen (exklusive nicht-melanozytärer Hautkrebs) und auch die häufigste Grunderkrankung krebssassoziierter Sterbefälle (Robert-Koch-Institut, 2016). Insgesamt steht das Mammakarzinom an 5. Stelle der Todesursachen in der weiblichen Bevölkerung (Statistisches Bundesamt, 2019). Jedoch sterben Mammakarzinompatientinnen in der Regel nicht am Primarius der Brust, sondern an dessen Fernmetastasen und ihren Komplikationen (Hagemeister et al., 1980).

## 1.2 Pathologie

Invasives ductales Karzinom (IDC), auch invasive mammary carcinoma, not otherwise specified (IDC NOS) oder non special type (NST) genannt, ist die histologische Bezeichnung für eine heterogene Gruppe von invasiv wachsenden Brusttumoren, die nicht die histologischen Kriterien für eine speziellere Subtypenbezeichnung und damit assoziierte prognostische Implikationen erfüllen und den Großteil (40-75%) aller Mammakarzinome ausmachen (Korourian, 2018; Weigelt & Reis-Filho, 2009).

Auf histologischer Ebene besteht vom gesunden Brustgewebe hin zu invasiven Mammakarzinomen ein Kontinuum, welches begrifflich wie in der Folge beschrieben unterteilt wird.

Wenn sich mehr Zellen als gewöhnlich in den Gängen aufschichten, die Zellen jedoch weiterhin polymorph in Aussehen und Markerexpression sind, spricht man von üblicher ductaler Hyperplasie. Ductale Carcinomata in situ (DCIS) sind wie die IDC eine heterogene Gruppe von klonalen Neoplasien, die allerdings nicht infiltrativ wachsen (Klimberg & Bland, 2018). Anhand der Kernmorphologie werden DCIS in drei Grade eingeteilt, mit denen die Atypie zunimmt (Ellis, 2010). Als atypische ductale Hyperplasie (ADH) werden Veränderungen bezeichnet, welche histologisch einem DCIS mit niedrigem Kernatypiegrad entsprechen, jedoch weniger als zwei vollständige Milchgänge betreffen und deren Gesamtdurchmesser <2mm liegt (Ellis, 2010; Page et al., 1985).

Dieser Kontinuität entsprechend wurde lange Zeit von einer ebenso linearen Progression des Brustkrebs von gesundem Epithel über ADH zu DCIS, invasivem Brustkrebs (IBC) und daraus hervorgehend fernen Metastasen ausgegangen. Während dieser Progression, so die Annahme, werden auch linear Mutationen erworben, welche die Fitness des Tumorklons und seine metastasierenden Fähigkeiten zunehmend stärken (Polyak, 2008). Inzwischen spricht allerdings vieles dafür, dass schon in frühen Präkursoren viele Mutationen vorhanden sind und damit das Schicksal der Erkrankung verankert ist (Allred et al., 2008; Lopez-Garcia et al., 2010; Wiechmann & Kuerer, 2008).

### **1.3 Ductales Carcinoma in situ**

Aus historischen Beobachtungen lässt sich schließen, dass etwa 20-50% der DCIS Fälle in ein invasives Mammakarzinom übergehen (Cowell et al., 2013). Die

Diagnose des DCIS hat aufgrund des Mammographiescreenings in den letzten Jahrzehnten jedoch stark zugenommen (Virnig et al., 2010), wodurch die Übertragbarkeit der historisch beobachteten Verläufe auf aktuelle Patientinnen unklar ist. Hierdurch werden die Therapieentscheidungen zunehmend komplexer, da im Rahmen dieser hohen Detektionsrate sowohl DCIS mit benignem natürlichem Verlauf als auch DCIS mit invasivem und konsekutiv aggressivem Verlauf detektiert werden (Epstein et al., 2018).

Sowohl in der NSABP B-17 Studie (National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-17) als auch in einer Auswertung der DCIS Fälle im SEER Register (einem großen amerikanischen Krebsregister), konnten Fälle von Patientinnen beschrieben werden, bei denen nach einer DCIS Diagnose Metastasen entdeckt wurden, ohne dass vorher eine invasive Brustkrebserkrankung beschrieben wurde (Fisher et al., 1998; Narod et al., 2015). Auch das MD Anderson Cancer Center, das niederländische Krebsregister und regionale schwedische Krebsregister beschreiben solche Fälle (Elshof et al., 2018; Roses et al., 2011; Wadsten et al., 2017). So postulieren Narod und Sopik, dass DCIS teilweise streuende Tumore sind (Narod & Sopik, 2018).

In Anbetracht der steigenden DCIS Inzidenz ist die Prädiktion eines invasiven und metastasierenden Verlaufs ein wichtiges Forschungsgebiet. Bisher konnte allerdings keine Methode etabliert werden, die eine sichere Unterscheidung zulässt (Cowell et al., 2013; Wiechmann & Kuerer, 2008). Ferner scheinen die Unterschiede zwischen DCIS und IBC interindividuell stark zu variieren (Cowell et al., 2013). Andere sind zu dem Schluss gekommen, dass die Invasion durch die Tumormikro Umgebung gesteuert und keine tumorzellintrinsische Eigenschaft ist (Review von Cowell et al. (2013)). Doebar et al. beschreiben eine differenzielle Ribonukleinsäure (RNA) Expression von COL1A1, CXCL14, EGFR, KRT81, KRT18, NOTCH3, PLAU, S100A7 und SCGB1D2 zwischen reinen DCIS und DCIS mit synchronem

IBC (Doebar et al., 2017). GATA3 Mutationen scheinen eine Rolle bei der Progression zum IBC zu spielen, PIK3CA Mutationen hingegen waren in einer japanischen Kohorte mit Monoklonalität assoziiert und isoliert eher protektiv (Nagasawa et al., 2021). Auch Lin et al. beobachteten, dass PIK3CA Mutationen ohne copy number variation (CNV) prognostisch günstig sind (Lin et al., 2019).

Drei phylogenetische Modi der Invasion von DCIS wurden beschrieben (Review zum DCIS von Casasent et al. (2017), zur Tumorevolution generell von McGranahan & Swanton (2017)).

1. Zwei unterschiedliche Klone entwickeln sich unabhängig voneinander als DCIS- und IBC-Klon.
2. Im Verlauf der klonalen Entwicklung wird eine Mutation erworben, welche die Invasion ermöglicht und einen evolutionären Flaschenhals darstellt (Martelotto et al., 2017).
3. Es erfolgt eine multiklonale Invasion (z.B. Martelotto et al. (2017), Casasent et al. (2018)). Diese kann auch nach intraduktaler Ausbreitung auftreten (Yates et al., 2015).

Teilweise werden bei unterschiedlichen Patientinnen, die mit gleicher Methodik aufgearbeitet wurden, Daten generiert, die mit unterschiedlichen phylogenetischen Modellen vereinbar sind (Martelotto et al., 2017).

In BALB-NeuT Mäusen, bei denen Ratten-Her-2/neu zur Entwicklung von Mammarkarzinomen führt, konnten Hüsemann et al. schon disseminierte Tumorzellen (DTZ) im Knochenmark detektieren, als histologisch in der Brustdrüse nur eine ADH nachweisbar war (Hüsemann et al., 2008). Ähnliches wurde in MMTV-polyomavirus-middle T transgenen Mäusen beobachtet, wo DTZ im Knochenmark nachweisbar waren, nachdem sich im Brustgewebe DCIS entwickelt hatten. In ihren DCIS Proben konnten sie eine vermehrte Expression von Matrixmetalloproteinasen and Cathepsinen nachweisen, nicht aber im invasiven Brustkrebs (Hüse-

mann et al., 2008). Dies könnte erklären, warum Matrixmetalloproteinasen Inhibitoren Tumorzell dissemination nach der Diagnose nicht mehr verhindern können (Coussens et al., 2002). Weiterhin beschreiben Hosseini et al., dass im Mausmodell Zellen aus frühen Läsionen effizienter streuen, während Zellen späterer Läsionen in situ bleiben und proliferieren (Hosseini et al., 2016).

1-22% der DCIS Fälle weist Tumoringfiltration im drainierenden Lymphknoten auf (Francis et al., 2015). Osako et al. haben 12 solcher Fälle histologisch aufgearbeitet und 17-344 Schnitte pro Patientin nachbefundet. Dabei konnten bei 7/12 Patientinnen invasive Anteile detektiert werden. 5/12 zeigten jedoch selbst bei dieser aufwändigen Aufarbeitung keine invasiven Anteile (Osako et al., 2013). Zetterlund et al. beschreiben eine nachträgliche Detektion von invasiven Anteilen in 1/11 DCIS Fällen mit positivem Wächterlymphknoten (Zetterlund et al., 2014).

### **1.3.1 CNV beim DCIS und invasiven Mammakarzinom**

Als CNV bezeichnet man genomische Deletionen oder Amplifikationen, die >1 Kilobasen groß sind (Iafrate et al., 2004; Sebat et al., 2004). Die Akkumulation solcher Mutationen ist ein prognostischer Faktor in vielen unterschiedlichen Krebserkrankungen (Hieronymus et al., 2018).

Cirrello et al. beschreiben unterschiedliche Mutationsmuster in verschiedenen Tumorentitäten des Cancer Genome Atlas (TCGA). Brustkrebs hat dabei dominierend CNV (Ciriello et al., 2013).

Low-grade DCIS haben weniger CNV als high-grade DCIS (Casasent et al., 2017). High-grade DCIS haben häufig die folgenden CNV: 1q+, 5p+, 8p-, 8q+, 11q-, 13q-, 14q- und 17q+, sowie fokale Amplifikationen auf 6q22, 8q22, 11q13, 17q12, 17q22-24 und 20q13 (Casasent et al., 2017).

Gorringe et al. beschreiben, dass rezidivierende DCIS insgesamt mehr CNV auf-

weisen und im speziellen häufiger Amplifikationen von Chromosom 20q, Deletionen von 15q, allelisches Ungleichgewicht von Chromosom 10 und weniger ausgeprägt ERBB2 Amplifikationen aufweisen (Gorringe et al., 2015). In einer Meta-Analyse von CNV-Profilen von 50 ADH, 288 reinen DCIS-Fällen, 328 synchronen DCIS mit IBC sowie 145 IBC stellten Rane et al. fest, dass 4q31.3 and 15q22.1–15q22.33 in IDC häufiger deletiert und 5q32 häufiger amplifiziert waren als in DCIS, wohingegen 5p15.33–5p14.1 in DCIS häufiger amplifiziert war (Rane et al., 2015). In der Progenetix Datenbank sind 270 DCIS CNV-Profile hinterlegt (Abbildung 1.1) (Baudis & Cleary, 2001; Huang et al., 2021).

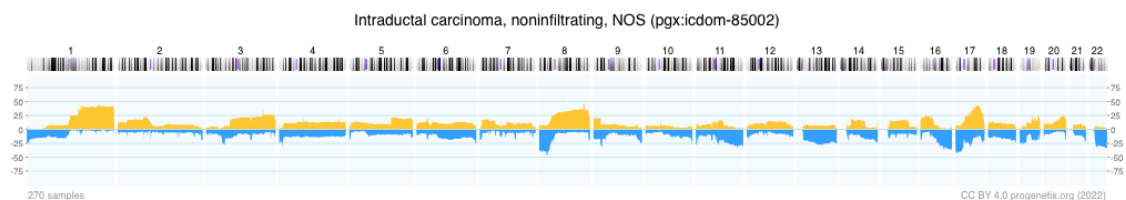


Abbildung 1.1: DCIS CNV Profile der Progenetix Datenbank.

## 1.4 Disseminierte Tumorzellen

Beim Brustkrebs finden sich bei einem Teil der Patientinnen auch in Abwesenheit klinisch apparenter Metastasen Zytokeratin (CK)<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark (Schli-mok et al., 1987). Der maligne Ursprung dieser Zellen konnte über eine whole genome amplification [Amplifikation des Gesamtgenoms] (WGA) solcher Einzelzellen und anschließende comparative genomic hybridization (CGH), eine molekularbiologische Technik, die CNV detektieren kann, nachweisen lassen (Klein et al., 1999; Klein et al., 2002). Dissemination ins Knochenmark scheint dabei ein früher Schritt in der Tumorprogression zu sein (Harper et al., 2016; Hosseini et al., 2016; Hüsemann et al., 2008; Klein, 2009; Schmidt-Kittler et al., 2003). Dabei sind solche Zellen auch bei etwa 16% der DCIS Patientinnen auffindbar (Banys



et al., 2014; Hüsemann et al., 2008; Sängler et al., 2011).

Die Detektion von DTZ im Knochenmark ist ein negativer prognostischer Faktor. Ein solcher Einfluss wurde auf das Gesamtüberleben, brustkrebsspezifisches, erkrankungsfreies, fernmetastasenfreies und lokalrezidivfreies Überleben beschrieben (Braun et al., 2005; Hartkopf et al., 2014, 2021; Hartkopf et al., 2015).

## 1.5 Zirkulierende Tumorzellen

Zirkulierende Tumorzellen (ZTZ) sind Zellen, die vom Mammakarzinom, dessen Metastasen oder der minimalen Resterkrankung ausgehen und mit einer Halbwertszeit von wenigen Stunden im Blut nachweisbar sind (Meng et al., 2004). Die Detektion kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen (Pantel & Alix-Panabières, 2019). Die beim Mammakarzinom dabei klinisch etablierteste ist die CellSearch Plattform von Menarini Silicon Biosystems. Hierbei wird epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) als Marker epithelialer Zellen genutzt. EpCAM<sup>+</sup> Zellen werden immunomagnetisch angereichert und schließlich werden Zytokeratine (als weitere Marker epithelialer Zellen), CD45 (als Marker hämatopoetischer Zellen) und der Zellkern gefärbt (Allard et al., 2004). Beim metastasierten Mammakarzinom ist die ZTZ-Zahl ein etablierter prognostischer Faktor fürs progressionsfreie und Gesamtüberleben (Bidard et al., 2014). Auch bei Mammakarzinomen ohne Fernmetastasen ist der Nachweis von ZTZ ein prognostischer Faktor für Gesamtüberleben, erkrankungsfreies, brustkrebsspezifisches, und fernmetastasenfreies Überleben (Janni et al., 2016). Vor neoadjuvanter Chemotherapie haben ZTZ eine prognostische Bedeutung (Bidard et al., 2018). Mehrere Gruppen konnten bei DCIS Patientinnen ZTZ nachweisen (Franken et al., 2012).

## 1.6 Fragestellungen

In dieser Arbeit wurden folgende Fragestellungen bearbeitet: Lassen sich aus formalinfixierten paraffingebetteten (FFPE) Gewebeblöcken mittels WGA und Sequenzierung mit niedriger Tiefe CNV Profile erstellen? Können auf diese Weise Zellen mit gleichen Profilen über die Zeit hinweg beobachtet werden? Sind CK<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark von DCIS Patientinnen prognostisch relevant? Und lässt sich ihre maligne Herkunft über Copy Number Analysen bestätigen?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Ethik**

Der Durchführung des Projektes wurde von der Ethikkommission unter den Projektnummern 560/2012R sowie 535/2016BO2 zugestimmt.

### **2.2 Patientendaten**

Eingeschlossen wurden Patientinnen mit ductalem Carcinoma in situ der Brust ohne Mikroinvasion, bei denen eine Knochenmarksaspiration während der Primäroperation in der Universitätsfrauenklinik Tübingen zwischen 2001 und 2016 durchgeführt wurde. Frauen, in deren Vorgeschichte ein invasives Mammakarzinom in der ipsilateralen oder kontralateralen Brust oder ein anderes Malignom beschrieben war, sowie Frauen, welche vorangehende antineoplastische Therapie erhalten hatten, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Alle Patientinnen willigten in die Knochenmarksaspiration und Verwendung des Aspirats sowie ihrer Patientendaten zu Forschungszwecken ein. Klinische Parameter der Patientinnen wurden aus deren elektronischer Patientenakte erhoben. Daten zur Nachverfolgung wurden dem Krebsregister des Comprehensive Cancer Center Tübingen-Stuttgart entnommen. Als lokoregionales Rezidiv wurden ipsilateraler Brustkrebs,

ein Rezidiv in ipsilateralen Lymphknoten oder der ipsilateralen Brustwand definiert. Priorisiert nach disseminierter Tumorzellzahl im Knochenmark wurden 8 Patientinnen, bei denen CK+ Zellen im Knochenmark nachgewiesen wurden und von denen kryokonservierte Cytospins verfügbar waren, zur Durchführung molekular-genetischer Analysen eingeschlossen.

### **2.3 Detektion disseminierter Tumorzellen im Knochenmark**

Im Rahmen von Brustoperationen werden in der Universitätsfrauenklinik Tübingen routinemäßig 10-20ml Knochenmark aspiriert. Mononukleäre Zellen wurden durch Dichtezentrifugation (1,077 g/mL; Ficoll, Biochrom, Deutschland) abgetrennt und je  $1,5 \times 10^6$  Zellen auf einen Glasträger gesponnen (Hettich Zytocentrifuge, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Zwei Objektträger pro Patientin wurden für die anschließenden Färbungen in 4% Formalin fixiert. Bei Patientinnen, bei denen aufgrund einer höheren Zellzahl weitere Objektträger verfügbar waren, wurden diese bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der DTZ-Status wurde mit dem DAKO Autostainer (Dako, Glostrup, Dänemark) und dem monoklonalen Maus-Antikörper A45-B/B3, der gegen ein gemeinsames Epitop auf Zytokeratinen einschließlich CK8, CK18 und CK19 gerichtet ist (Micromet, München, Deutschland) und ab 2016 mit dem Cytokeratin 8/18 Ab-1 (MS-743-S, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) sowie DAKO-APAA-Detektionskit (Dako) bestimmt. Für jeden Patienten wurden zwei Objektträger (je  $1,5 \times 10^6$  Zellen) ausgewertet, wobei die Konsensempfehlungen für eine standardisierte Tumorzelldetektion befolgt wurden (Fehm et al., 2006). Ein unspezifischer isotypangepasster Antikörper wurde als Isotyp-Kontrolle auf einem zusätzlichen Objektträger verwendet. Mit jeder Färbung wurden Leukozyten von gesunden Probanden analysiert und dienten als

Negativkontrolle, während die humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 und SKBR-3 als Positivkontrolle dienen. Für die Bewertung wurden 1-3 positive Zellen pro zwei Objektträger als 1+ kategorisiert, 4-7 positive Zellen als 2+, 8-10 positive Zellen als 3+ und mehr als 10 Zellen als 4+. Diese Prozedur wird routinemäßig von den medizinisch technischen Fachangestellten der Universitätsfrauenklinik durchgeführt.

## **2.4 Generation einer Einzelzellsuspension aus Paraffinblöcken**

Hierzu wurde nach Herstellerangaben zum DEPAArray™ FFPE SamplePrep Kit verfahren. Zuerst wurden 40-60µm dicke Schnitte aus Paraffinblöcken in Nylon-säckchen versiegelt. Anschließend erfolgte eine Deparaffinisierung in Xylen dreimalig für 10 Minuten mit darauffolgender Rehydratation in Ethanollösungen absteigender Konzentration (100%, 75%, 50%, 0%; je 3x für 5 Minuten). Hieraufhin wurde eine Inkubation im HIAR Antigen Retrieval Buffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für eine Stunde bei 80 °C durchgeführt. Danach wurde dreimalig bei Raumtemperatur mit RPMI 1640 Medium für je 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurde 45 Minuten in einer Dissoziationslösung bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Transfer in ein Eisbad gestoppt und durch Auf- und Abpipettieren wurde die Resuspension durchgeführt. Die resultierende Suspension wurde durch einen 30µm Nylonfilter gefiltert, bei 1000g 5 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das resultierende Pellet wurde zweimalig erneut mit eiskaltem PBATw Puffer gewaschen und durch erneute Zentrifugation wieder in Pelletform überführt. Das anschließend in PBATw resuspendierte Pellet wurde in ein 1,5ml Eppendorf protein LoBind Behältnis überführt und mit DAPI (0,2µg/ml) gefärbt.

## 2.5 FFPE DNA Reparaturschritt

Zur Verbesserung der Probenqualität aus FFPE Blöcken wurde ein kommerziell erhältliches Kit (NEBNext® FFPE DNA Repair Mix) bestehend aus verschiedenen DNA Reparaturenzymen verwendet. Eine Inkubation mit diesen wurde zwischen Proteinase K Verdau und MseI Verdau bei 37°C für 20 Minuten durchgeführt (s. Abschnitt 2.10).

## 2.6 Tumor DNA Isolation aus Paraffinblöcken

Die Tumorareale des Blocks wurden von Florian Weber, Pathologie Universitätsklinik Regensburg, auf Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitten markiert. Entsprechende Regionen wurden mit einem 1,5mm durchmessenden Rundmesser aus dem Block gestanzt, manuell mit einem Skalpell von überflüssigem Paraffin befreit und durch Druck zwischen zwei UV-sterilisierten Objektträgern planiert. Hiernach wurde das Gewebe mit einem Skalpell in kleinste Teile zerschnitten und in ein 1,5ml Gefäß transferiert und in einer Zentrifuge auf dessen Boden gesponnen. Aus diesem Ausgangsmaterial wurde mithilfe des kommerziellen QIAamp FFPE Tissue Kits nach Herstelleranleitung gDNA isoliert und mittels NanoDrop ND-1000 quantifiziert. Die in diesem Absatz beschriebenen Schritte wurden von Manjusha Ghosh, Lehrstuhl für Experimentelle Medizin Regensburg, durchgeführt.

## 2.7 Immunhistochemische Färbung von zytokeratinpositiven Zellen

Verfügbare Objektträger wurden zunächst für 30 Minuten mit 10% AB Serum in 1x phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) abgeblockt. Anschließend wurden die Objektträger über eine Stunde mit dem Panzytokeratinantikörper A45-B/B3 (Micromet, München) inkubiert und in der Folge dreimal mit 1x PBS gewaschen. Hieraufhin erfolgte die 30-minütige Inkubation mit einem anti-Maus alkalische Phosphatase Polymer Sekundäantikörper gefolgt von drei Waschschritten mit 1x PBS. Bei der Entwicklung wurde nach Herstelleranleitung mit BCIP/NBT (AP Conjugate Substrate Kit; Bio-Rad Laboratories) vorgegangen. Diese Lösung wurde um 0,5% Levamisol zur Blockade endogener alkalischer Phosphatase ergänzt. Mit diesem Gemisch erfolgte eine Inkubation für 12 Minuten und anschließend erfolgten 3 Waschschriffe.

## 2.8 Einzelzellisolation von Cytospins

Hierzu wurde nach dem von Manjusha Ghosh in ihrer Dissertation entworfenen Protokoll verfahren (Ghosh, 2020). Zunächst wurden die in Abschnitt 2.7 beschriebenen Schritte befolgt. Nun wurden CK+ Zellen unter einem PALM MicroBeam Mikroskop aufgesucht und mittels PALM Robo Software kartiert. Zur Gegenfärbung erfolgte die Inkubation mit Mayers Hämatoxylin und 2 Waschschriffe mit 1x PBS. Nach 30 Minuten bei 4°C in 1x PBS wurden die Objektträger dehydriert, indem sie nacheinander jeweils für 5 Sekunden in -20°C kalte Lösungen von 70, 90, und 100% Ethanol und hiernach in Azeton getaucht wurden. Da die Haftobjektträger sehr dicht mit Zellen bedeckt sind, was die Einzelzellisolation mittels Mikromanipulation extrem erschwert oder teilweise unmöglich macht, wurde nun auf dem

PALM MicroBeam Mikroskop eine Mikrodissektion der Zellumgebung durchgeführt, um Einzelzellen ohne Störung durch Nachbarzellen der Mikromanipulation zugänglich zu machen. Für jede Patientin wurden CK+ Zellen und Laserkontrollzellen von umgebenden Zellen mittels Lasermikrodissektion befreit. Außerdem wurde von Randbereichen des Haftobjektträgers, in denen die Zelldichte geringer ist, Zellen ohne Lasermikrodissektion isoliert. Diese Zellen und Kontrollzellen, in deren Umgebung keine Lasermikrodissektion erfolgte, wurden nun mittels Mikromanipulation isoliert. Hierzu wurde der Objektträger in 1x PBS rehydriert und in der Folge in einem Detergenziengemisch aus 10µl OPA Puffer, 2,6µl 10% Tween, 2,6µl Igepal und 69,6µl nukleasefreiem Wasser für mindestens 5 Minuten inkubiert und anschließend in 1X PBS gewaschen.

## 2.9 Mikromanipulation

Einzelzellen wurden mit einer 30µm durchmessenden Glaskapillare in einem Mikromanipulator (PatchMan NP2, Eppendorf) unter dem Olympus IX81 Mikroskop aspiriert und aus einem gesonderten Pickfeld nach Kontrolle, dass es sich um eine einzelne Zelle handelt, mit einer Pipette in 1µl PBS in ein Polymerasekettenreaktion (PCR) Gefäß (Axygen, MAXYMum Recovery) mit 2 µl Lysepuffer transferiert.

## 2.10 Linker Adapter Whole Genome Amplification

Zur Amplifikation des Einzelzellgenoms wurde die von Christoph Klein beschriebene linker adapter PCR genutzt, welche im Vergleich zu Alternativmethoden eine gleichmäßigere Amplifikation bewirkt und so auch Kopienzahlanalysen des Genoms ermöglicht (Klein et al., 1999). Eine detaillierte Beschreibung des Protokolls findet sich in Referenz (Kroneis, 2015). Dem Protokoll folgend wurde die Einzelzelle einem Verdau mit Proteinase K zugeführt und die DNA in der Folge mit der



Tabelle 2.1: Thermocyclerprogramm Reamp68.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Schritt 1	95 °C	1 min	
Schritt 2	60 °C	30 s	10
Schritt 3	68 °C	2 min	
Schritt 4	94 °C	30 s	
Schritt 5	60 °C	30 s	
Schritt 6	68 °C	2 min, Verlängerung um 20s/ Zyklus	
Schritt 7	4 °C	∞	

Restriktionsendonuklease Msel fragmentiert. Hieraufhin wurde ein Alignment mit zur Restriktionsstelle passenden Primern und schließlich eine PCR durchgeführt. Zur Qualitätskontrolle wurden, wie von Polzer et al. beschrieben, KRAS, CK 19, TP53 Exon2/3 und D5S2117 aus dem WGA Produkt amplifiziert (Polzer et al., 2014). Das Resultat wurde in ein Gel aus 1,5% Agarose in 1X TBE Puffer und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid eingebracht. Hierzu wurden 10µl der Qualitätskontrollen PCR mit 3µl Ladepuffer in das Gel eingebracht und 45 Minuten bei einer Spannung von 160V laufen gelassen.

## 2.11 LowPass Sequenzierung

Das kommerzielle Ampli1 LowPass Kit wurde gemäß Herstellerinstruktionen verwendet, um Sequenzierungsbibliotheken herzustellen. Hierzu wurde zunächst eine Reamplifikation durchgeführt, indem 35,5µl PCR Wasser, 5µl Expand Long Template Buffer 1, 5µl Lib1 (10µM), 1,75µl dNTPs (10mM), 1,25µl bovines Serumantigen (BSA) und 0,5µl Desoxyribonukleinsäure (DNA) Polymerase Mix mit 1µl des amplifizierten Einzelzellgenoms gemischt wurden und dann mit dem Thermocyclerprogramm Reamp68 (Tabelle 2.1) behandelt wurden.

In der Folge wurde eine Qualitätskontrolle wie in Abschnitt 2.10 beschrieben

durchgeführt. Je 5µl Wasser und 5µl Reamp68 Produkt wurden mit 1.8X SPRI-select oder AMPure XP beads (Beckman Coulter) aufgereinigt und 3µl dem Low Pass Protokoll zugeführt (Ferrarini et al., 2018). Die barcodemarkierten Bibliotheken wurden dann mittels Bioanalyzer HS DNA kit (Agilent) und Qubit HS DNA kit (ThermoFisher Scientific) gemäß Herstellerangaben quantifiziert und gepoolt (4nM pro Patientin) und auf einem Short Read Sequenziergerät der Firma Illumina mit einer Coverage von etwa 1x sequenziert.

Die bioinformatische Analyse erfolgte mittels HIENA Software des Instituts für Toxikologie und Experimentelle Medizin in Regensburg.

## 2.12 Statistik

Assoziationen zwischen nominal skalierten Variablen wurden mittels  $\chi^2$ -Test oder bei weniger als fünf erwarteten Beobachtungen mittels Fisher Test untersucht. Der Wilcoxon Rangsummentest wurde verwendet, um Assoziationen zwischen nominalen und kontinuierlichen Variablen zu überprüfen. Für die Überlebensmaße wurden folgende Definitionen verwendet:

- Lokalrezidivfreie Zeit ist als Zeit von Operation bis zum lokoregionalen Rezidiv definiert. Als lokoregionales Rezidiv wurden ipsilateraler Brustkrebs, ein Rezidiv in ipsilateralen Lymphknoten oder der ipsilateralen Brustwand definiert.
- Fernmetastasenfreie Zeit ist die Zeit bis zur Detektion von Fernmetastasen.
- Rezidivfreie Zeit ist als Zeit bis zum Auftreten von Lokalrezidiv oder Fernmetastasen definiert.
- Gesamtüberleben ist die Zeit bis zum Eintreten des Todes.

Wenn bei der letzten Tumorregisterabfrage im Juni 2017 keines dieser Ereignisse eingetreten war, wurden die Daten zensiert. Die reverse Kaplan-Meier Me-

thode wurde zur Bestimmung des medianen Nachverfolgungszeitraums genutzt. Überlebenskurven wurden nach der Kaplan-Meier-Methode dargestellt und mittels Log-rank Test verglichen. Kaplan-Meier-Kurven wurden mithilfe des `survminer` Pakets erstellt (Kassambara et al., 2021). Zur multivariaten Analyse wurde ein Cox Regressionsmodell verwendet. Der Effekt der einzelnen Variablen wurde mittels Wald Test untersucht und in seiner Größe als hazard ratio (HR) und korrespondierende 95% Konfidenzintervalle ausgedrückt. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  gewählt. Datenmanipulationen und statistische Analysen erfolgten mithilfe der R Programmiersprache (R Core Team, 2021).

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Einzelzellgenomamplifizierung von Zellen aus Paraffinblöcken des Primärtumors

Bei der hier untersuchten Patientin lagen Gewebe vom Primärtumor sowie dem fünf Jahre später aufgetretenen Rezidivtumor und kontralateralem Brustkrebs vor (s. Tabelle 3.1).

Aus diesen Geweben wurden 118 Einzelzellen isoliert und Einzelzellgenome mittels WGA amplifiziert. Zunächst wurde ein zusätzlicher Reparaturschritt im Rahmen der Einzelzellgenomamplifikation evaluiert (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2).

Es ergab sich kein Vorteil für den Reparaturschritt bei zeitlichem und finanziel-

Tabelle 3.1: Tumorcharakteristika der zur Sequenzierung aufgearbeiteten FFPE Blöcke.

	Primarius	Ipsilaterales Rezidiv	Zweitkarzinom
T	3	1	1
Grading	2	2	2
ER-Status	-	+	+
PR-Status	+	+	+
HER2-Status	+	-	-

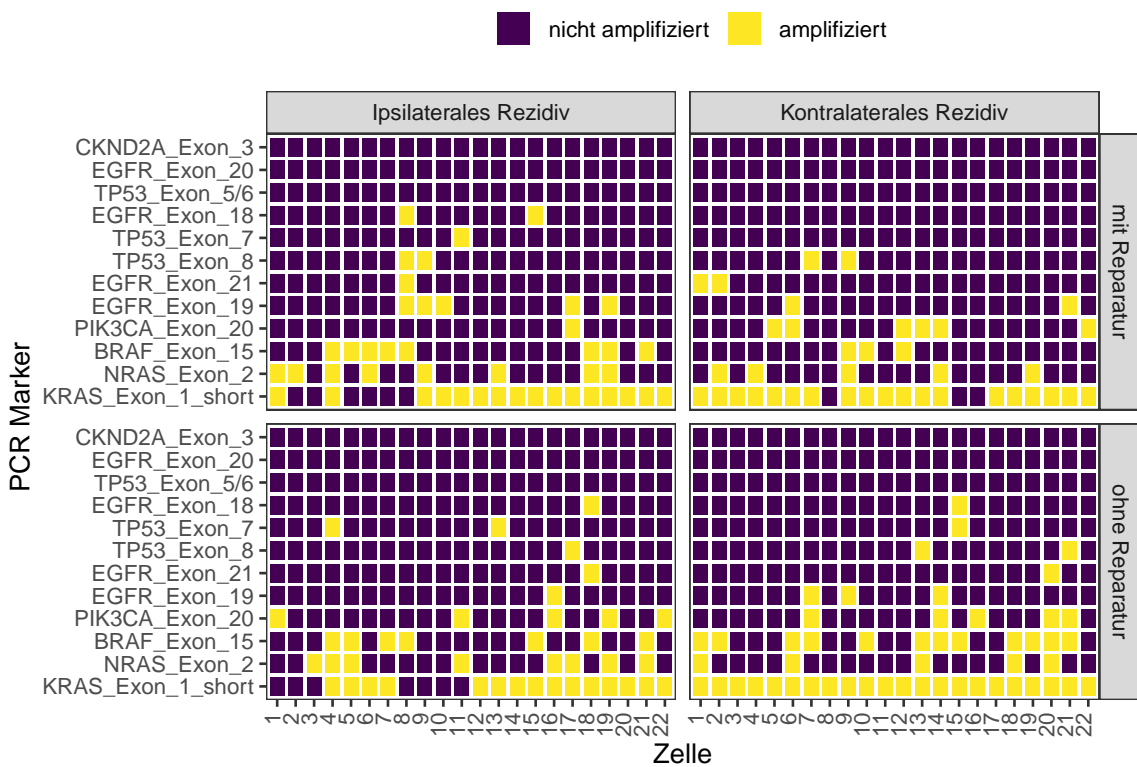


Abbildung 3.1: Qualitätskontrolle PCR mit und ohne Reparaturschritt. Aufgetragen sind die Zellen gegen den Nachweis von nach erwarteter Fragmentgröße sortierten Banden in der Qualitätskontrolle PCR.

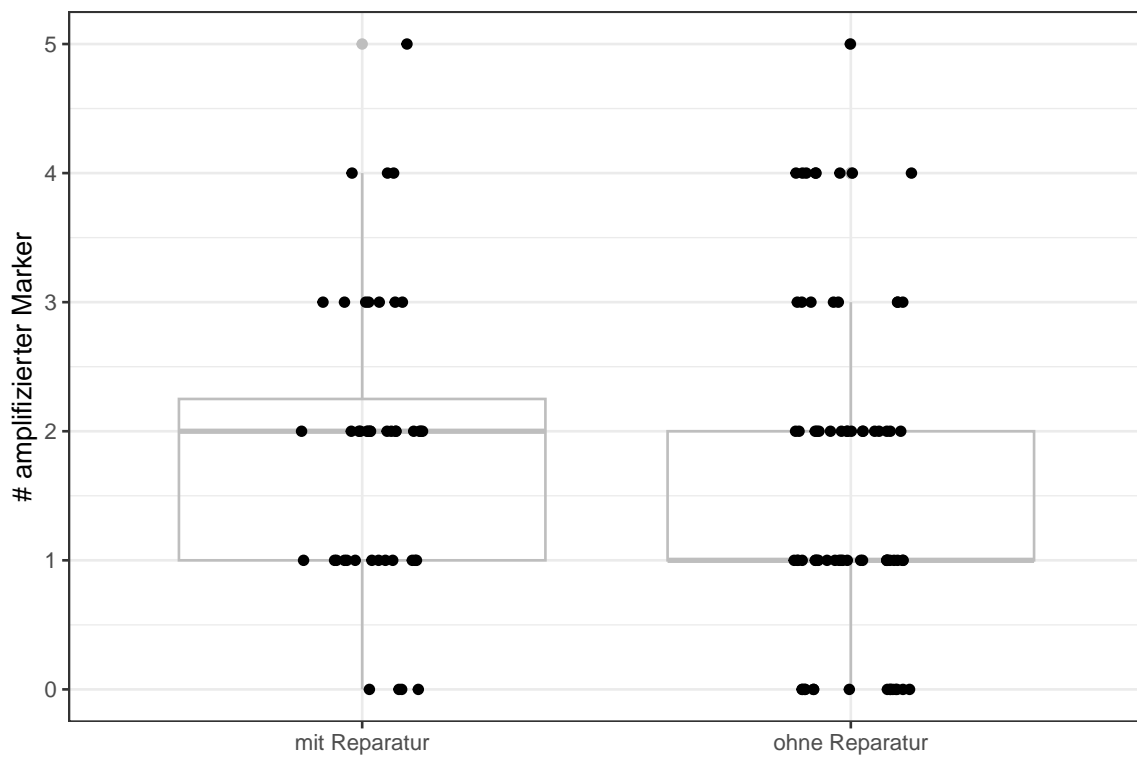


Abbildung 3.2: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Qualitätskontroll PCR mit und ohne Reparaturschritt.

lem Mehraufwand. Daher wurde in der Folge auf die Reparatur verzichtet. Die in Abbildung 3.3 markierten WGA Produkte, sowie weitere von Dr. Ghosh isolierte ZTZ und DTZ wurden zur weiteren Untersuchung mittels LowPass Sequenzierung ausgewählt. Die Auswahl erfolgte dabei aufgrund der Anzahl nachweisbarer PCR Produkte. Insbesondere WGA Produkte, in denen Banden von großen DNA Fragmenten nachweisbar waren, wurden selektiert. Dabei wurden die in Abbildung 3.4 - Abbildung 3.7 dargestellten Copy Number Profile generiert.

Im Primärtumor zeigen sich geteilte Deletionen im Chromosom X, sowie teilweise Amplifikationen auf den Chromosomen 1, 4, 5, 7, 8, 11 und 12 (Abbildung 3.4).

Das ipsilaterale Rezidiv weist prominentere und uniformere Veränderungen auf (Abbildung 3.5). Dazu zählen Amplifikationen auf den Chromosomen 1, 5, 7 und 8, sowie Deletionen auf den Chromosomen 3, 4, 11, 16 und teilweise X.

Im kontralateralen Rezidiv imponieren drei fast unveränderte Profile und vier Profile, welche Amplifikationen auf den Chromosomen 1, 5, 7 und 8, sowie Deletionen auf den Chromosomen 3,4 , 11 und 16 teilen (Abbildung 3.6).

In der vergleichenden Abbildung 3.7 erkennt man zwischen den unterschiedlichen Tumoren und über den zeitlichen Verlauf geteilte Aberrationen der Einzelzellgenome, wie Amplifikationen auf den Chromosomen 1, 5, 7, 8 und Deletionen auf den Chromosomen 3, 4, 11 und 16.

## **3.2 DCIS Patientenkollektiv**

In die Analyse wurden 627 Patientinnen eingeschlossen. Bei 72 Patientinnen wurden disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen. Klinisch-pathologische Eigenschaften der beiden Gruppen sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Zwischen der DTZ-positiven und -negativen Gruppe bestehen darin keine Unter-

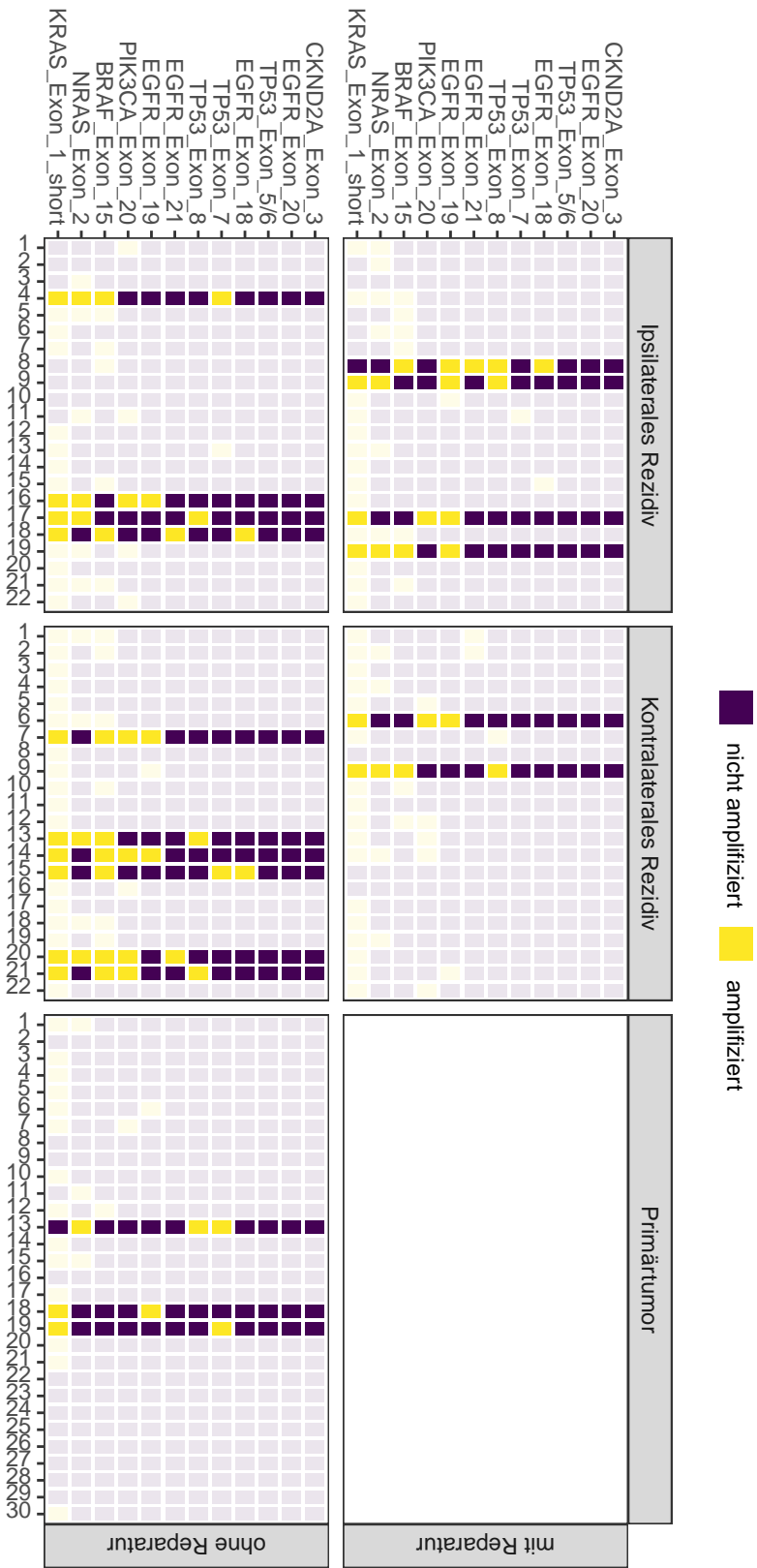


Abbildung 3.3: Auswahl der Genomamplifikate für die Lowpass Sequenzierung. Zur Sequenzierung gewählte Proben sind hervorgehoben.



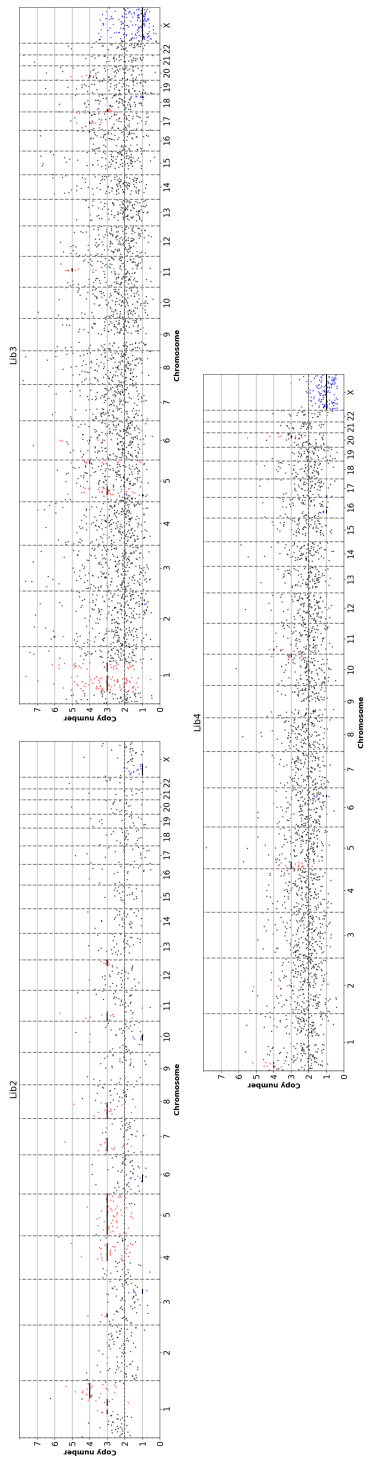


Abbildung 3.4: Copy Number Profile von Einzelzellen des Primärtumors aus FFPE Gewebe.

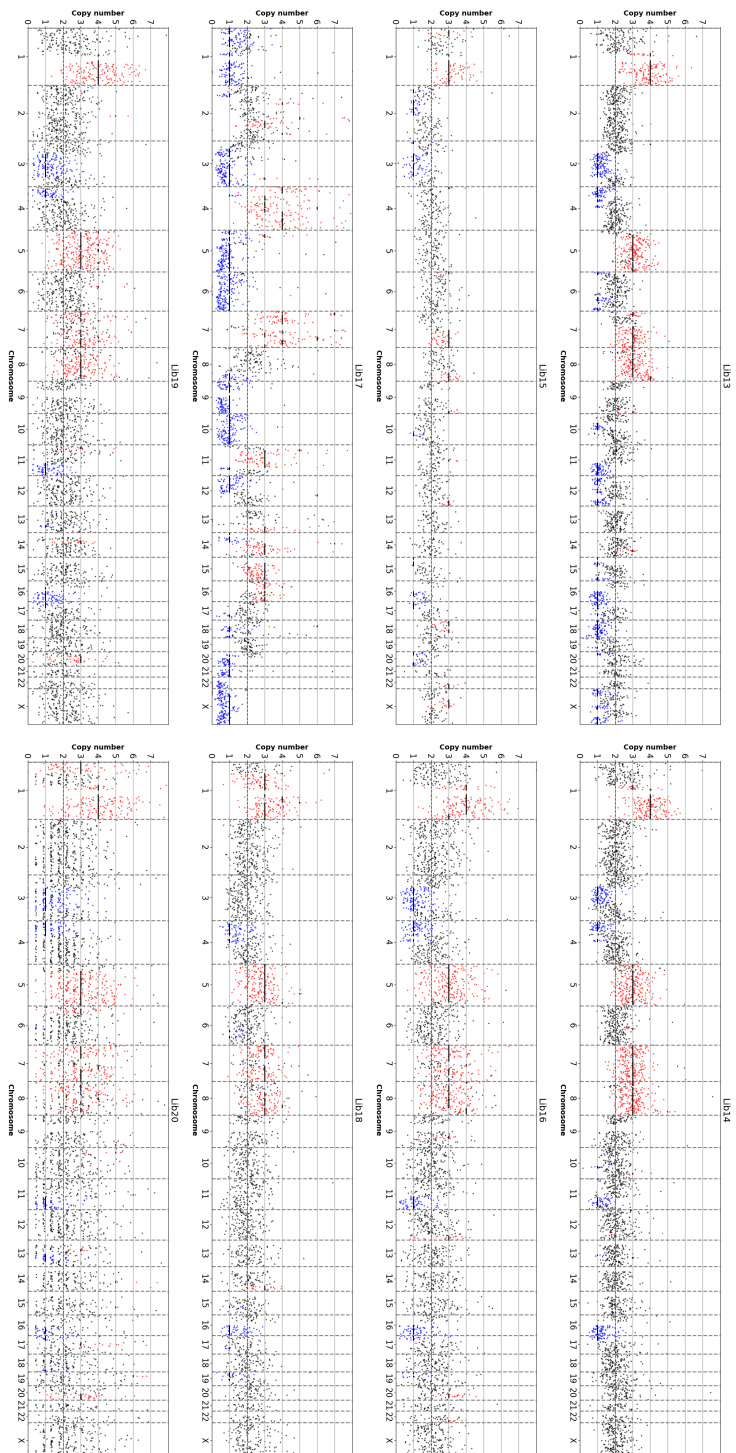


Abbildung 3.5: Copy Number Profile von Einzelzellen des ipsilateralen Rezidivs aus FFPE Gewebe.

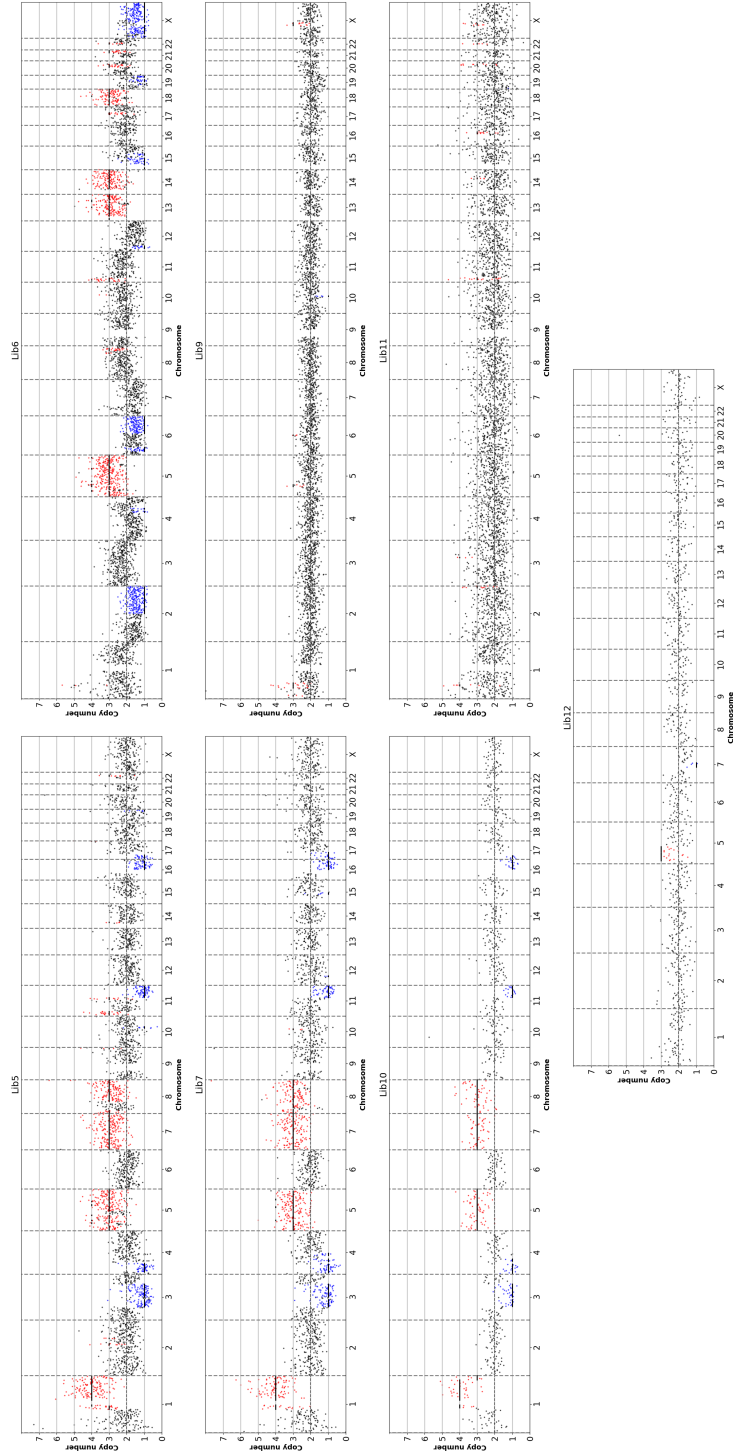


Abbildung 3.6: Copy Number Profile von Einzelzellen des kontralateralen Rezidivs aus FFPE Gewebe.

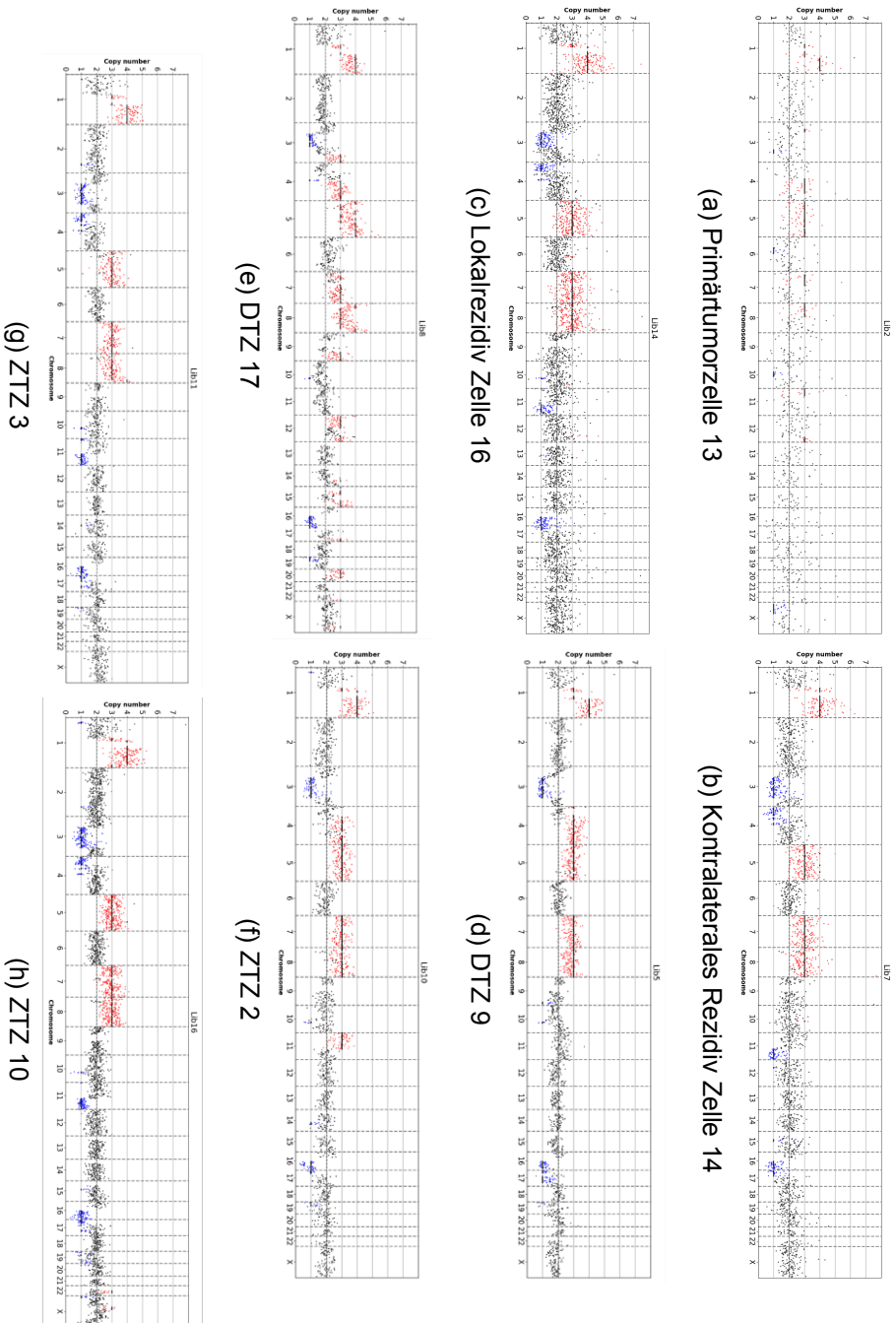


Abbildung 3.7: Vergleich von Copy Number Profilen aus Primärtumor, ipsilateralem Lokalrezidiv, kontralateralem Rezidiv, disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark und zirkulierenden Tumorzellen aus dem peripheren Patientenblut.

Tabelle 3.2: Verteilung klinisch-pathologischer Charakteristika in den Gruppen der DTZ- und DTZ+ DCIS Patientinnen.

	<b>N</b>	<b>DTZ-, N = 555</b>	<b>DTZ+, N = 72</b>	<b>p-value</b>
<b>Menopausenstatus</b>	627			>0.9
postmenopausal		328 (59%)	42 (58%)	
prämenopausal		227 (41%)	30 (42%)	
<b>Alter</b>	627	56 (50, 65)	55 (46, 66)	0.6
<b>Grading</b>	580			0.8
DIN I		75 (15%)	8 (12%)	
DIN II		207 (40%)	28 (44%)	
DIN III		234 (45%)	28 (44%)	
<b>ER</b>	616			0.6
ER-		119 (22%)	14 (19%)	
ER+		425 (78%)	58 (81%)	
<b>PR</b>	611			0.6
PR-		166 (31%)	24 (34%)	
PR+		374 (69%)	47 (66%)	
<b>HER2</b>	235			>0.9
HER2-		128 (62%)	17 (61%)	
HER2+		79 (38%)	11 (39%)	
<b>Tumorgroße</b>	607	30 (14, 54)	30 (16, 55)	>0.9
<b>LK Status</b>	479			0.3
LK-		422 (100%)	54 (98%)	
LK+		2 (0.5%)	1 (1.8%)	

Kategoriale Variablen sind als n (%) verzeichnet,  
kontinuierliche Variablen als Median (1., 3. Quartile).  
P-Werte wurden mittels Wilcoxon, Chi-Quadrat oder Fisher Test berechnet.

schiede. Auch ein Zusammenhang des DTZ Status mit dem Grading des DCIS oder der Tumorgröße wurde nicht beobachtet (Tabelle 3.2 und Abbildung 3.8).

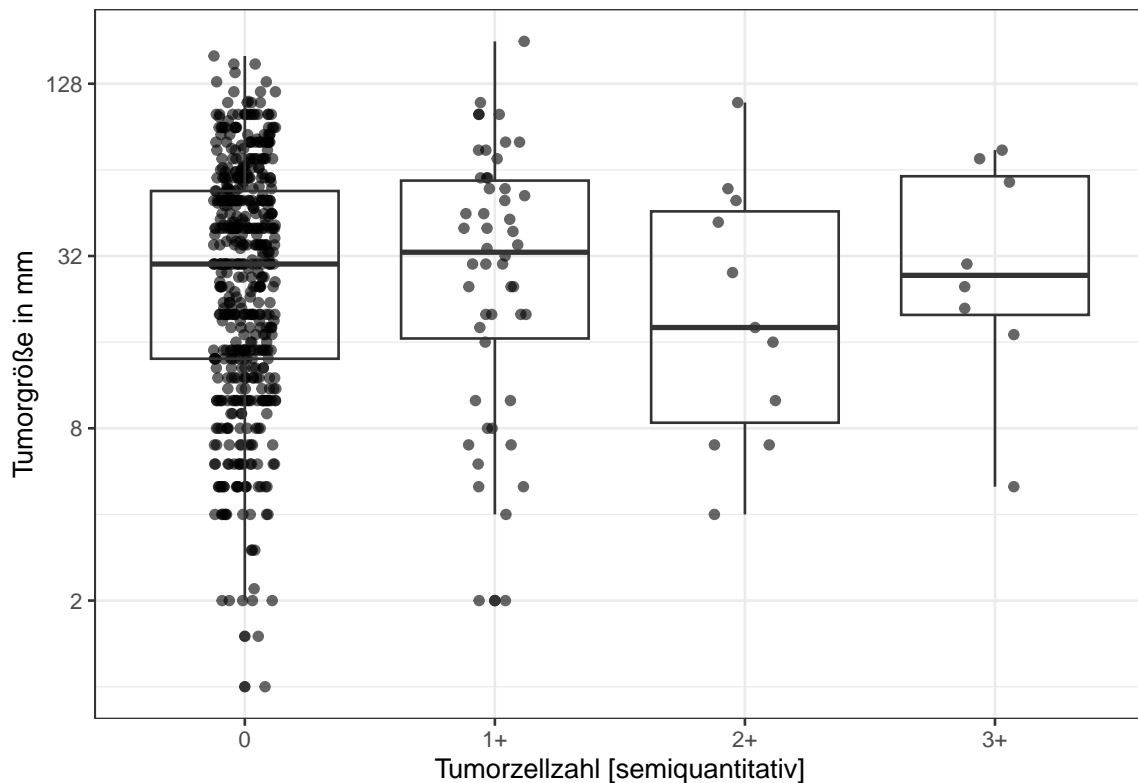


Abbildung 3.8: Vergleich der Tumorgröße in mm zwischen Patientinnen mit unterschiedlicher DTZ Zahl im Knochenmark.

Die Nachverfolgung betrug im Median 49 Monate. Ein Brustkrebsrezidiv trat bei 33 Patientinnen auf. Zu 30 der 31 Lokalrezidive lag eine weitere Dokumentation vor. 19 (61%) der Lokalrezidive waren invasive Lokalrezidive. 7 der 33 Patientinnen mit Rezidiv (21%) entwickelten Fernmetastasen, darunter 2 ohne vorangegangenes invasives Rezidiv. 14 Patientinnen starben während der Nachverfolgung. Gruppiert man nach DTZ Status, erhält man die in Abbildungen 3.9 - 3.12 dargestellten nichtsignifikanten Unterschiede für lokalrezidivfreie, fernmetastasenfreie und rezidivfreie Zeit sowie für das Gesamtüberleben. Im Log-rank Test ergeben sich  $p$ -Werte von 0.12, 0.055, 0.063 und 0.37.

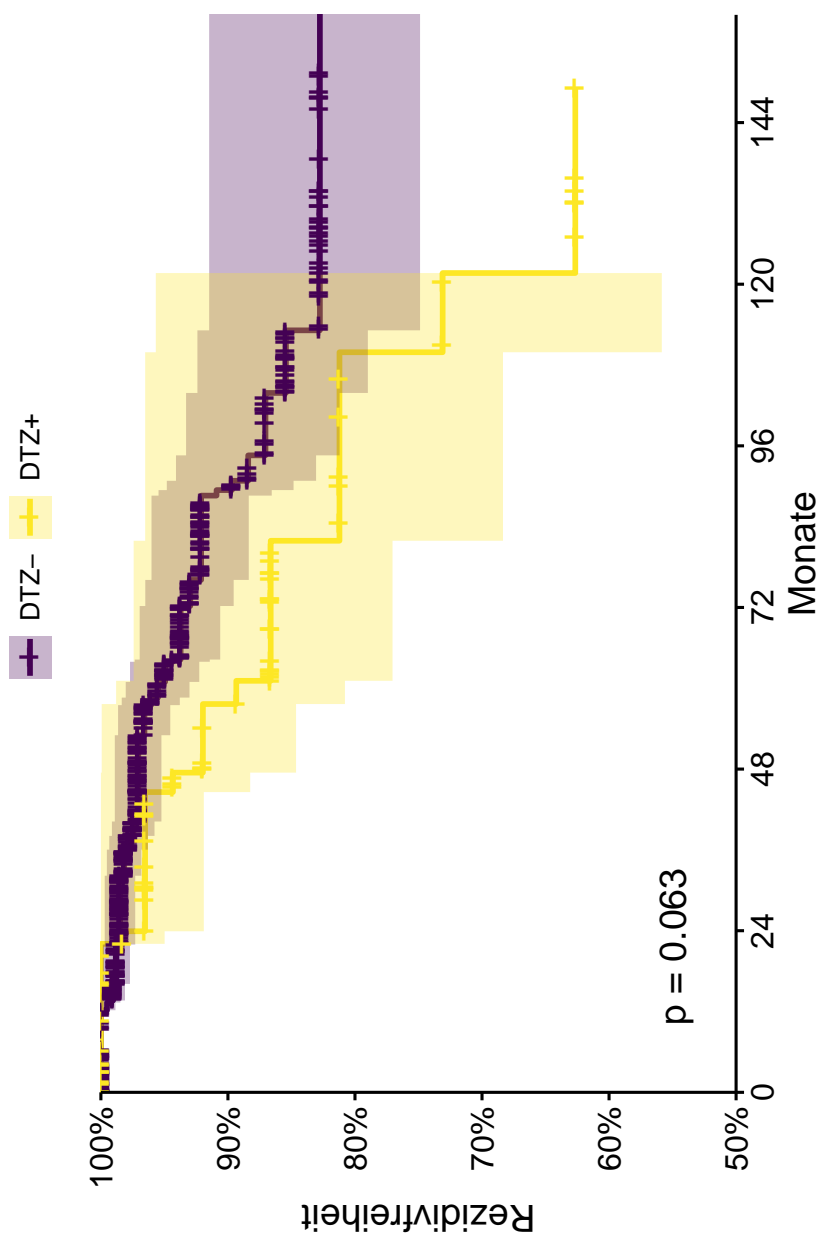


Abbildung 3.9: Kaplan Meier Kurven der rezidivfreien Zeit. Verglichen sind DTZ- und DTZ+ Patientinnen. Der P-Wert wurde mithilfe des Log-Rank Tests ermittelt. Die schattierten Flächen entsprechen den Konfidenzintervallen.

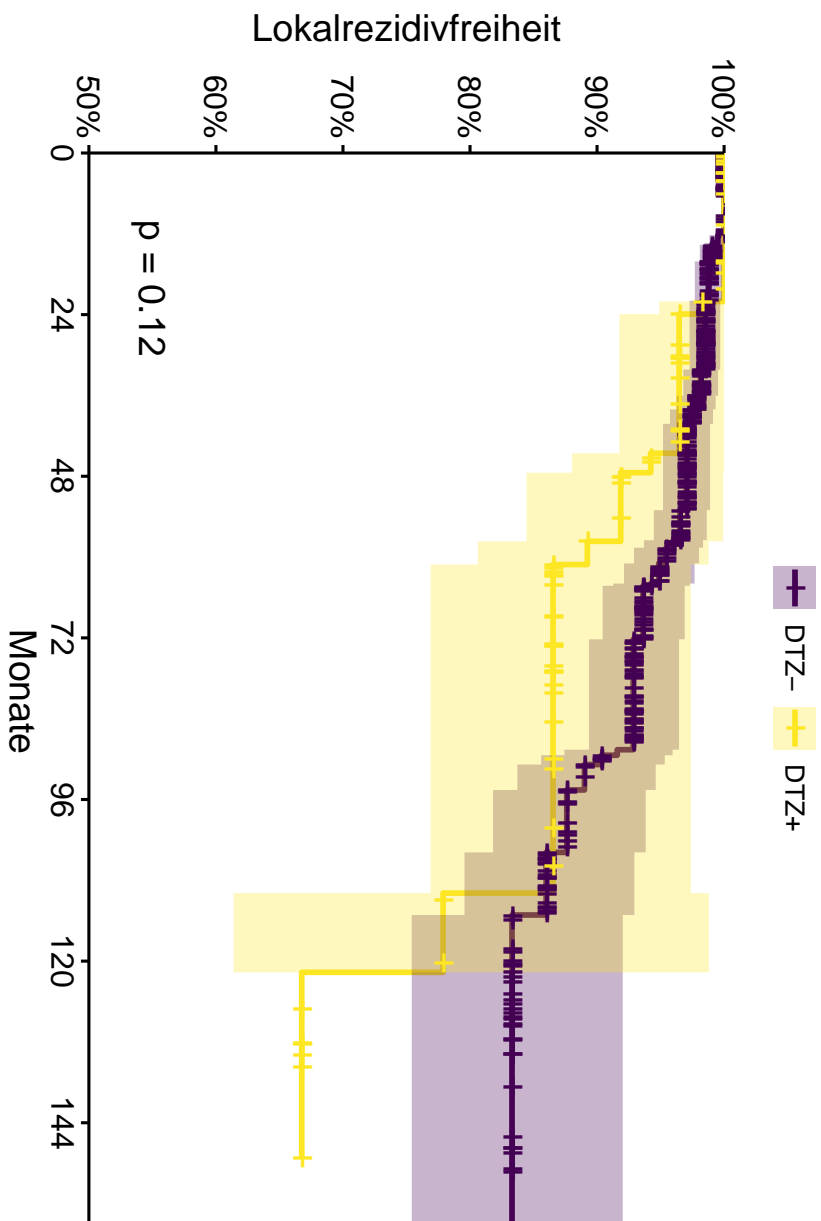


Abbildung 3.10: Kaplan Meier Kurven der lokalrezidivfreien Zeit. Verglichen sind DTZ- und DTZ+ Patientinnen. Der P-Wert wurde mithilfe des Log-Rank Tests ermittelt. Die schattierten Flächen entsprechen den Konfidenzintervallen.



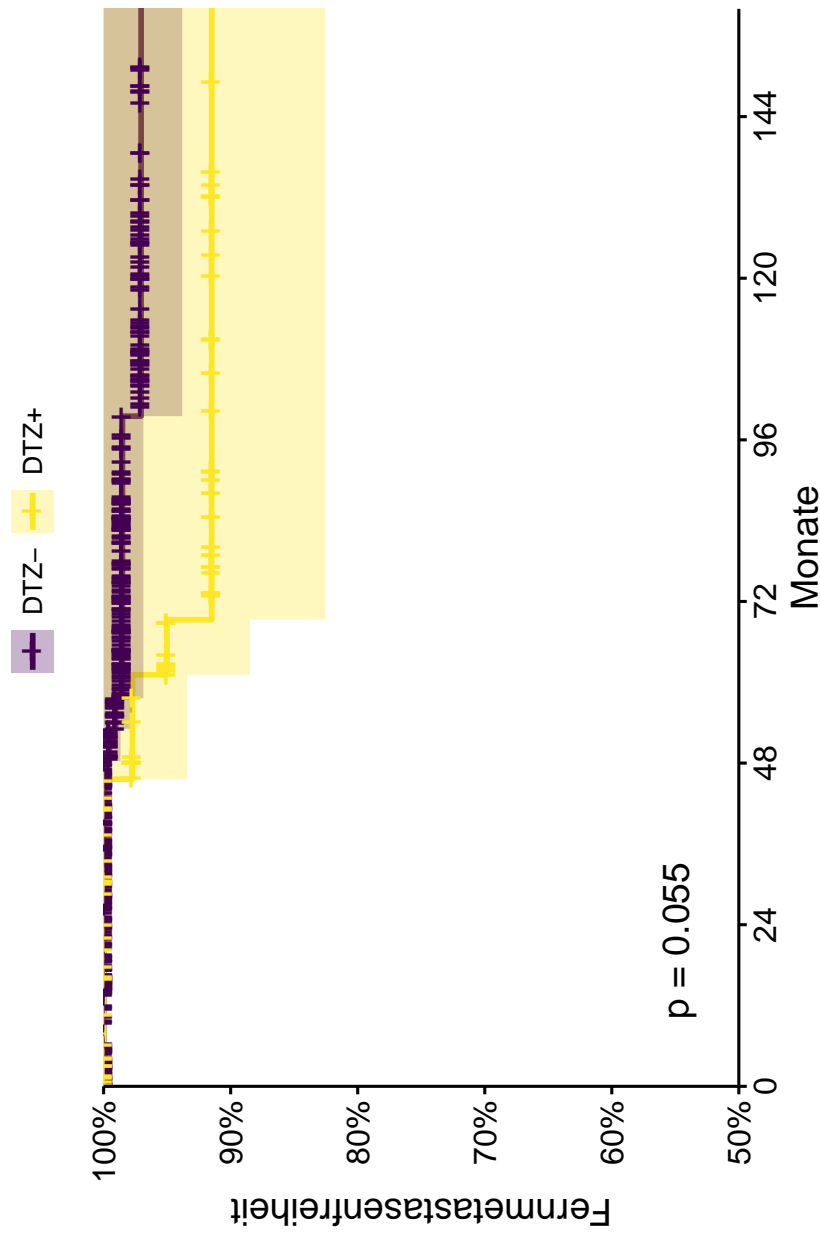


Abbildung 3.11: Kaplan Meier Kurven der fernmetastasenfreien Zeit. Verglichen sind DTZ- und DTZ+ Patientinnen. Der P-Wert wurde mithilfe des Log-Rank Tests ermittelt. Die schattierten Flächen entsprechen den Konfidenzintervallen.

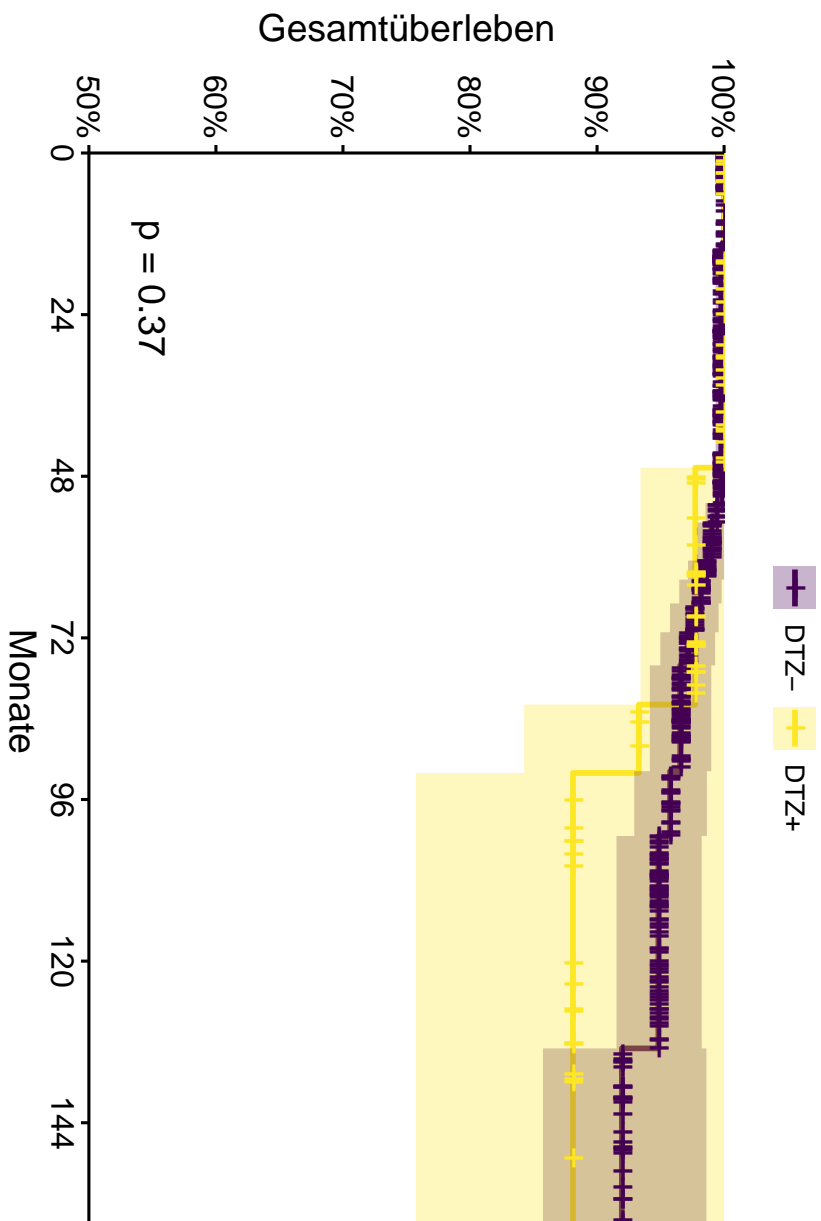


Abbildung 3.12: Kaplan Meier Kurven des Gesamtüberlebens. Verglichen sind DTZ- und DTZ+ Patientinnen. Der P-Wert wurde mithilfe des Log-Rank Tests ermittelt. Die schattierten Flächen entsprechen den Konfidenzintervallen.

Tabelle 3.3: Charakteristika der acht DCIS Patientinnen, deren DTZs analysiert wurden.

Patientin	Alter bei ED	Menopausenstatus	Tumordurchmesser	Grading	ER	PR	HER2
DCIS1	72	postmenopausal	55	3	+	+	
DCIS2	60	postmenopausal	16	2	+	+	
DCIS3	62	postmenopausal	21	1			
DCIS4	68	postmenopausal	25	1	+	+	-
DCIS5	44	prämenopausal	7	2	+	+	
DCIS6	81	postmenopausal	70	2	+	+	
DCIS7	57	postmenopausal	60	2	+	+	
DCIS8	71	postmenopausal	60	2	+	+	-

In Cox Regressionsmodellen für Rezidive, Lokalrezidive und Gesamtüberleben hat einzig das Alter einen signifikanten Einfluss auf das Überleben. So scheint höheres Alter bezüglich rezidivfreier und lokalrezidivfreier Zeit das Risiko zu mindern (HR 0,95), bezüglich des Gesamtüberlebens das Risiko zu steigern (HR 1,05; Abbildung 3.13). Koeffizienten für ein Cox Modell für die fernmetastasenfreie Zeit ließen sich aufgrund der geringen Anzahl beobachteter Fernmetastasen nicht schätzen.

### 3.3 Charakterisierung des Einzelzellgenoms disseminierter Tumorzellen und zugehöriger Primärtumore

Zur Bestätigung der malignen Natur der nachgewiesenen DTZ bei DCIS Patientinnen wurden acht Patientinnen identifiziert, bei denen ungefärbte Objektträger mit DTZ zur Analyse zur Verfügung standen. Die Charakteristika der Patientinnen finden sich in Tabelle 3.3. Von den verfügbaren Zytospins wurden CK<sup>+</sup> Zellen, CK<sup>-</sup> Kontrollzellen ohne Lasermikrodissektion, lasermikrodissezierte CK<sup>-</sup> Kontrollzellen und Zellpools isoliert.

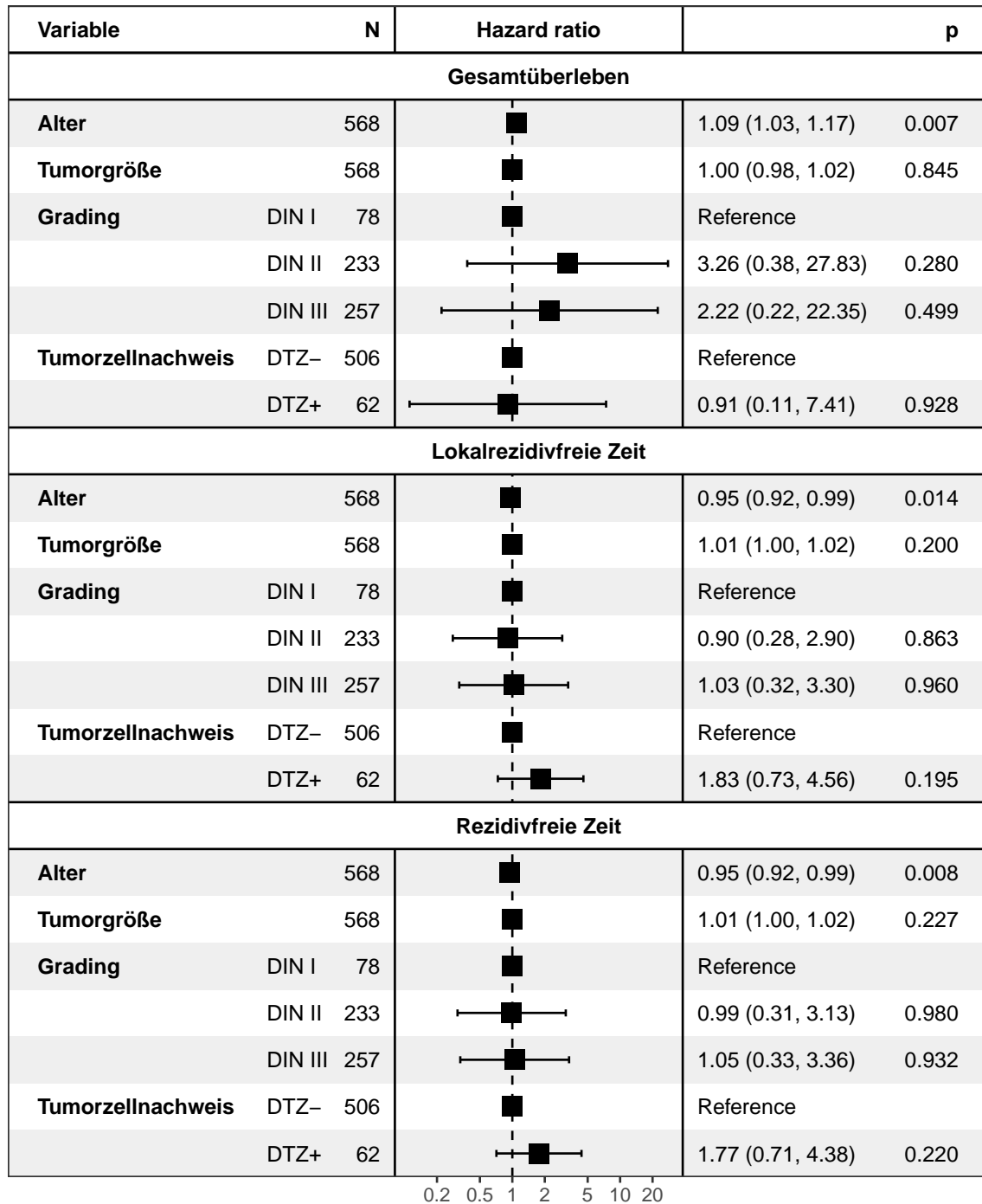


Abbildung 3.13: Forestplot der Cox-Regressionsmodelle zum Gesamtüberleben, lokalrezidivfreier sowie rezidivfreier Zeit der DCIS Patientinnen.

Es ergaben sich die in Abbildung 3.14 dargestellten GII. Bei den Patientinnen wurden die Zellen mit einem GII > 3 sowie die DTZs ohne Laserbehandlung mittels LowPass Sequenzierung analysiert und die in Abbildung 3.15 - 3.24 dargestellten CNV Profile generiert. Zusätzlich wurden von Dr. Ghosh erstellte Sequenzierungsbibliotheken aus FFPE Blöcken der Patientinnen analysiert.

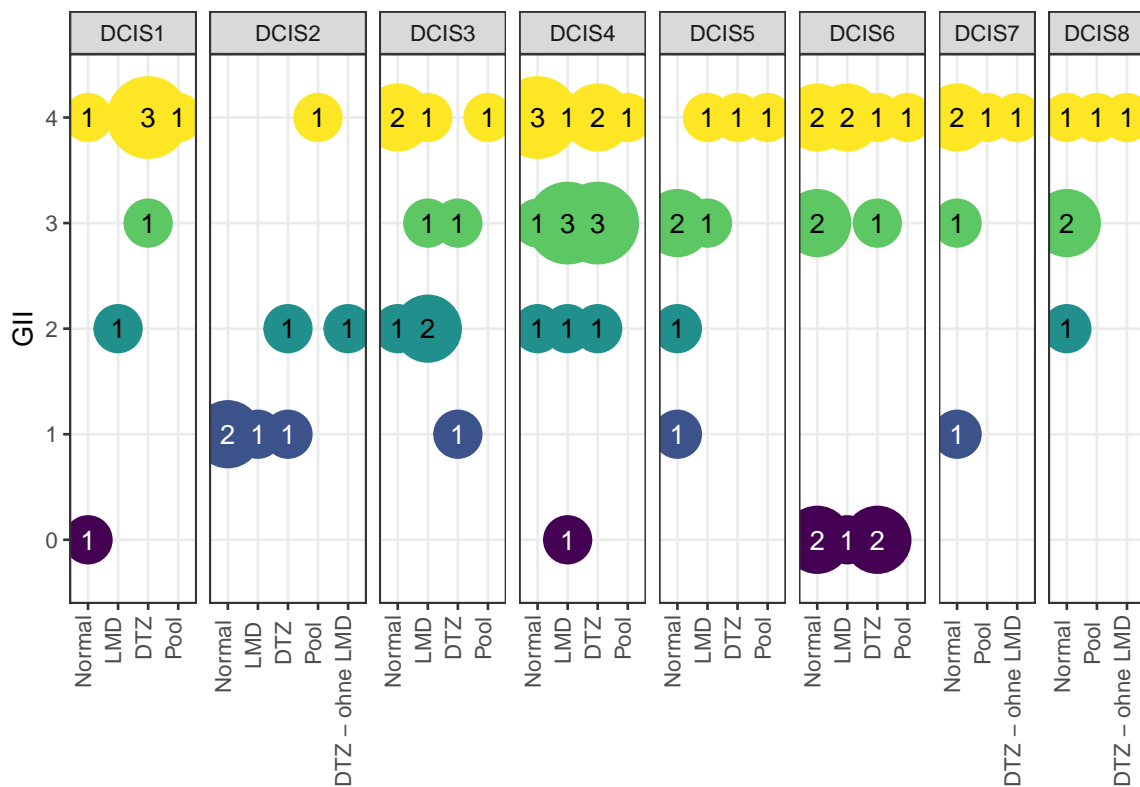


Abbildung 3.14: Quantitative Darstellung des GII des mittels WGA amplifizierten Einzelzellgenoms nach Patientin und Zelltyp. Zahlen und Größe der Kreise zeigen die Anzahl der Zellen mit einem bestimmten GII in einer Gruppe an. LMD = Lasermikrodissektion.

### 3.3.1 DCIS 1

Während die Kontrollzelle S1N2 und der Zellpool balancierte CNV Profile zeigen, sieht man in den DTZs und dem DCIS Primärtumor variable Amplifikationen und Deletionen (Abbildung 3.15). Dabei teilen der Tumorblock und Zelle S2D1 eine

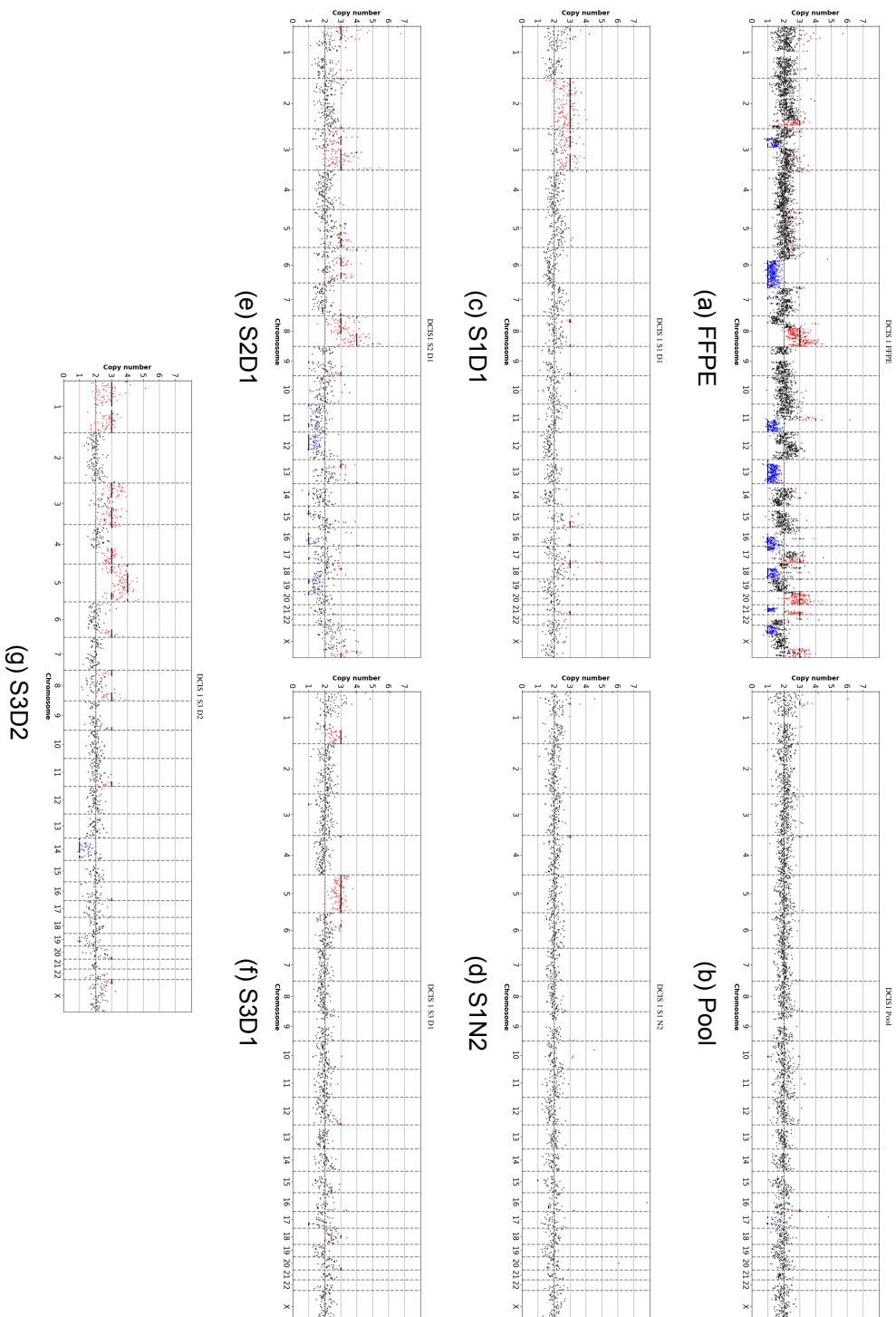


Abbildung 3.15: Copy Number Profile für DCIS Fall 1.

Amplifikation auf Chromosom 8 und eine Deletion auf Chromosom 16. S1D1 und S3D2 teilen Amplifikationen auf Chromosom 3.

### **3.3.2 DCIS 2**

Bei DCIS 2 sieht man balancierte Profile im Zellpool, der ohne Lasermikrodissektion isolierten DTZ S2D1 und im FFPE Block. Zellen S1D1 und S3D1 zeigen nicht geteilte Aberrationen (Abbildung 3.16).

### **3.3.3 DCIS 3**

Bei DCIS Patientin 3 zeigen Pool und Normalzellen balancierte Profile. Die Laserkontrollzelle S4L1 zeigt kleine Amplifikationen und Deletionen. Laserkontrollzelle S4L3 und DTZ S4D1 teilen Amplifikationen im Chromosom 3,5,7, 11 und X. S4L3 trägt darüber hinaus Amplifikationen im Chromosom 10, 16, 20 sowie Deletionen in 4,9,13, 17, 18, 19 (Abbildung 3.17).

### **3.3.4 DCIS 4**

Im DCIS 4 sieht man balancierte Profile der Normalzellen und des Pools. In den Lasermikrodissektionskontrollen S1L1 und S4L1 können Amplifikationen und Deletionen erkannt werden. Die CK+ Zellen S1D1, S4D1 und S4D2 zeigen deutlicher Aberrante Profile (Abbildungen 3.18 & 3.19). Eine FFPE Probe war hier leider nicht verfügbar.

### **3.3.5 DCIS 5**

Der FFPE Block des DCIS 5 zeigt Amplifikationen auf Chromosomen 1, 8, 12, 17 und 20 und Deletionen auf Chromosomen 17 und 19. Zelle S1D1 teilt die Amplifikationen auf Chromosom 1, 8 und 20, und die Deletion auf Chromosom 17,

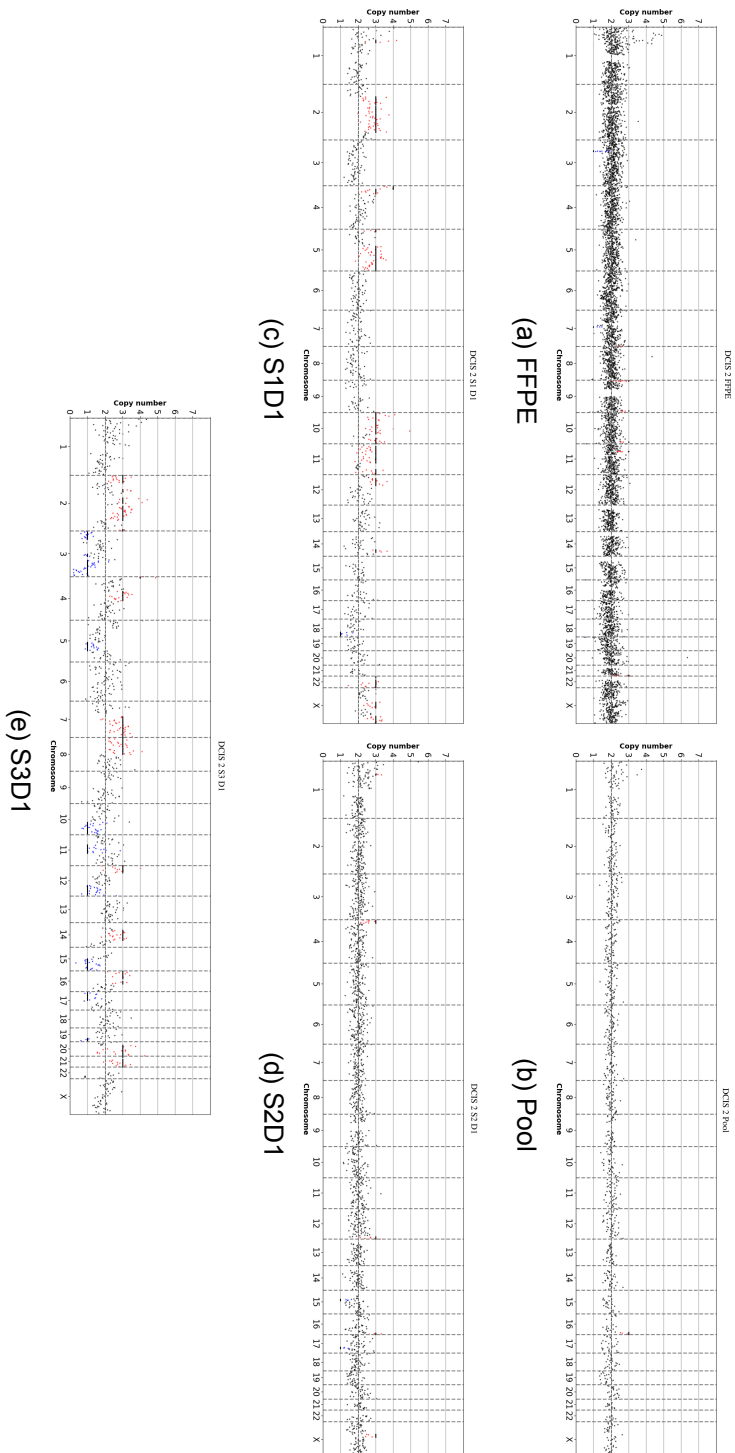


Abbildung 3.16: Copy Number Profile für DCIS Fall 2.



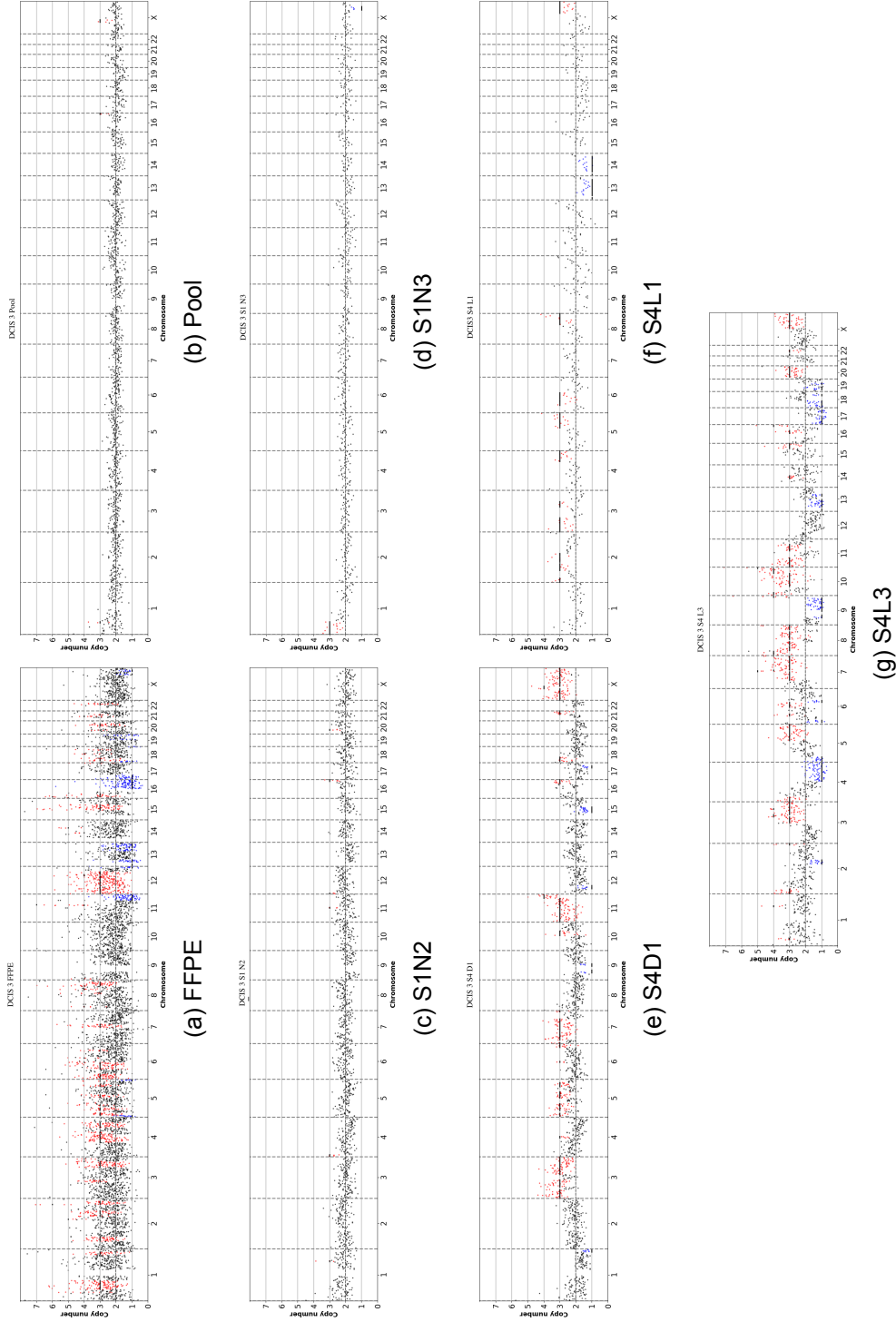


Abbildung 3.17: Copy Number Profile für DCIS Fall 3.

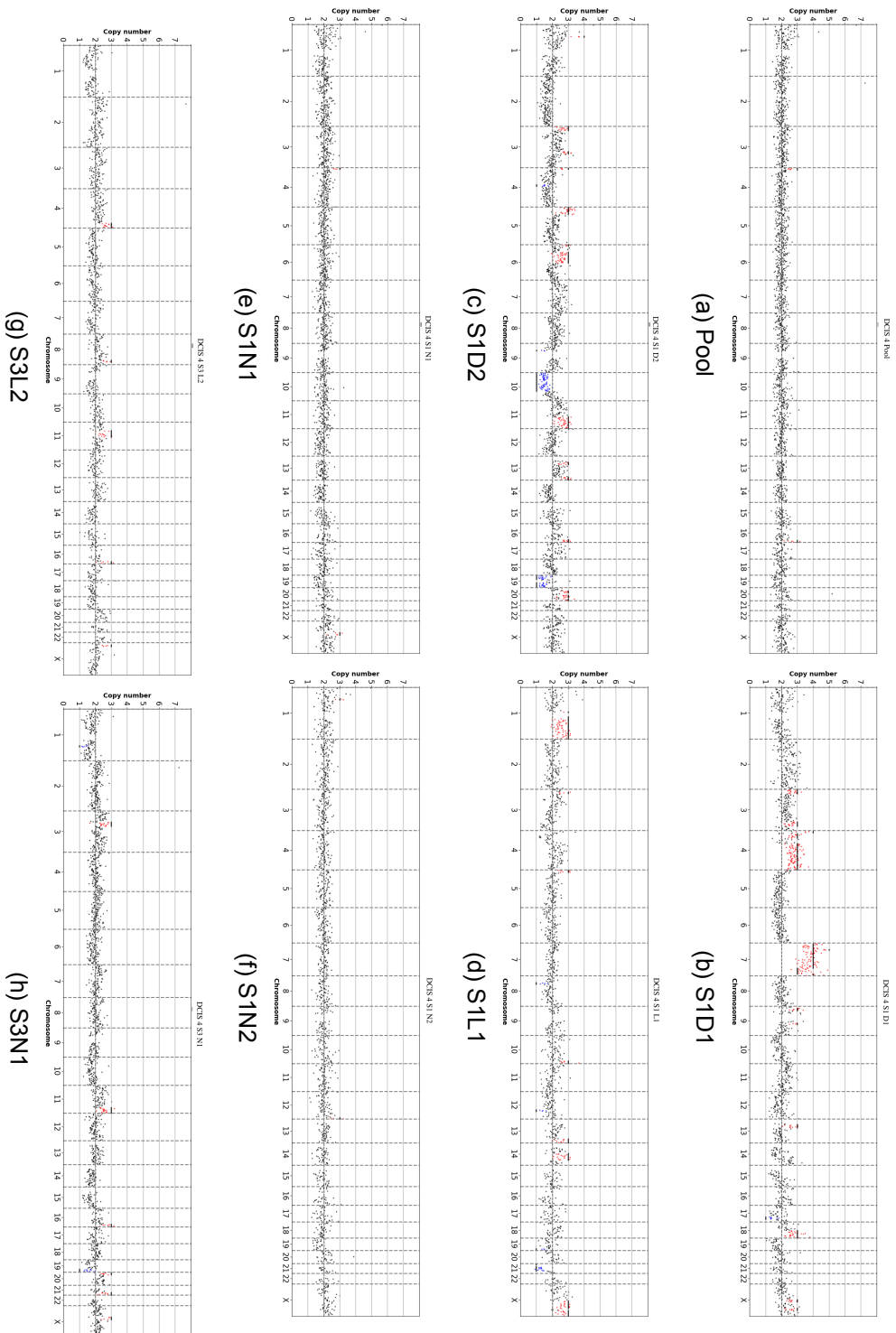


Abbildung 3.18: Copy Number Profile für DCIS Fall 4.

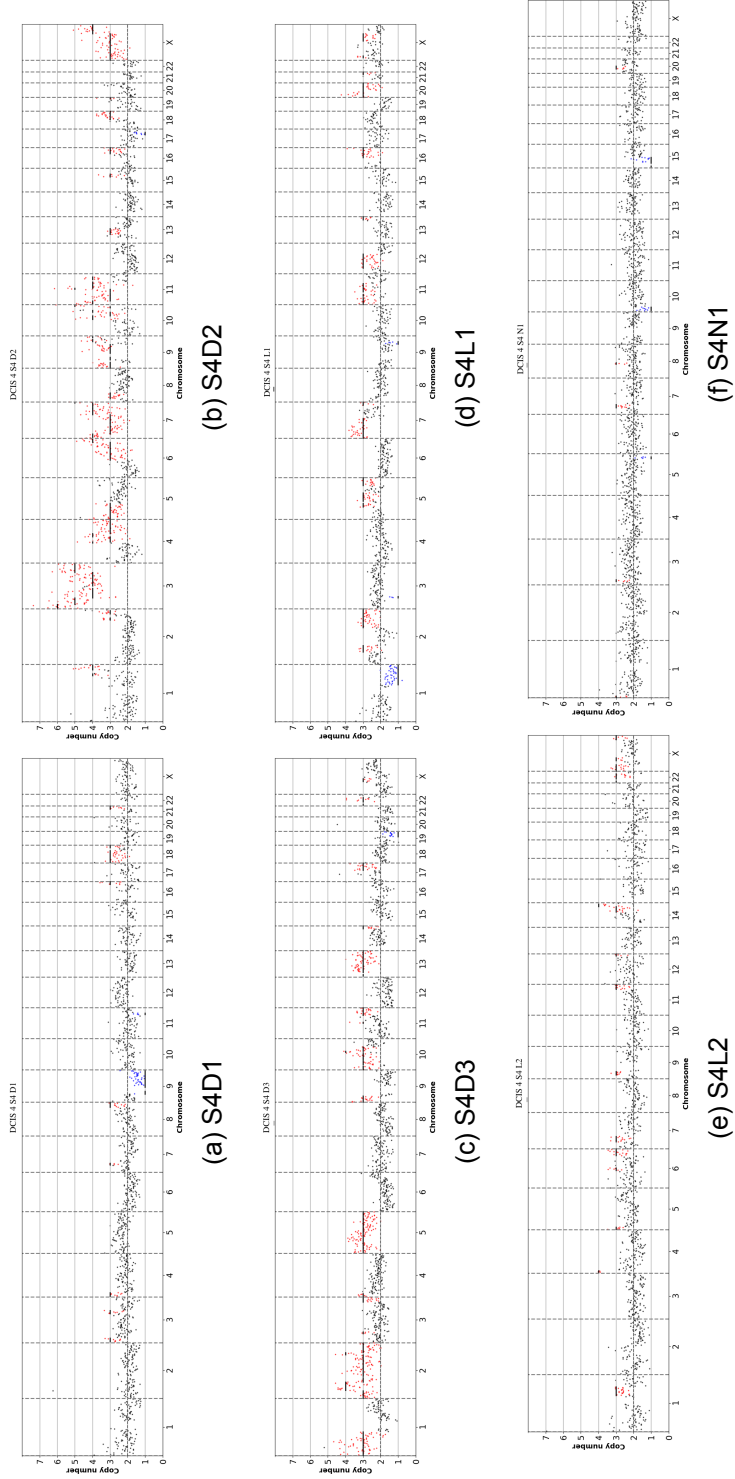


Abbildung 3.19: Copy Number Profile für DCIS Fall 4 (fortges.).

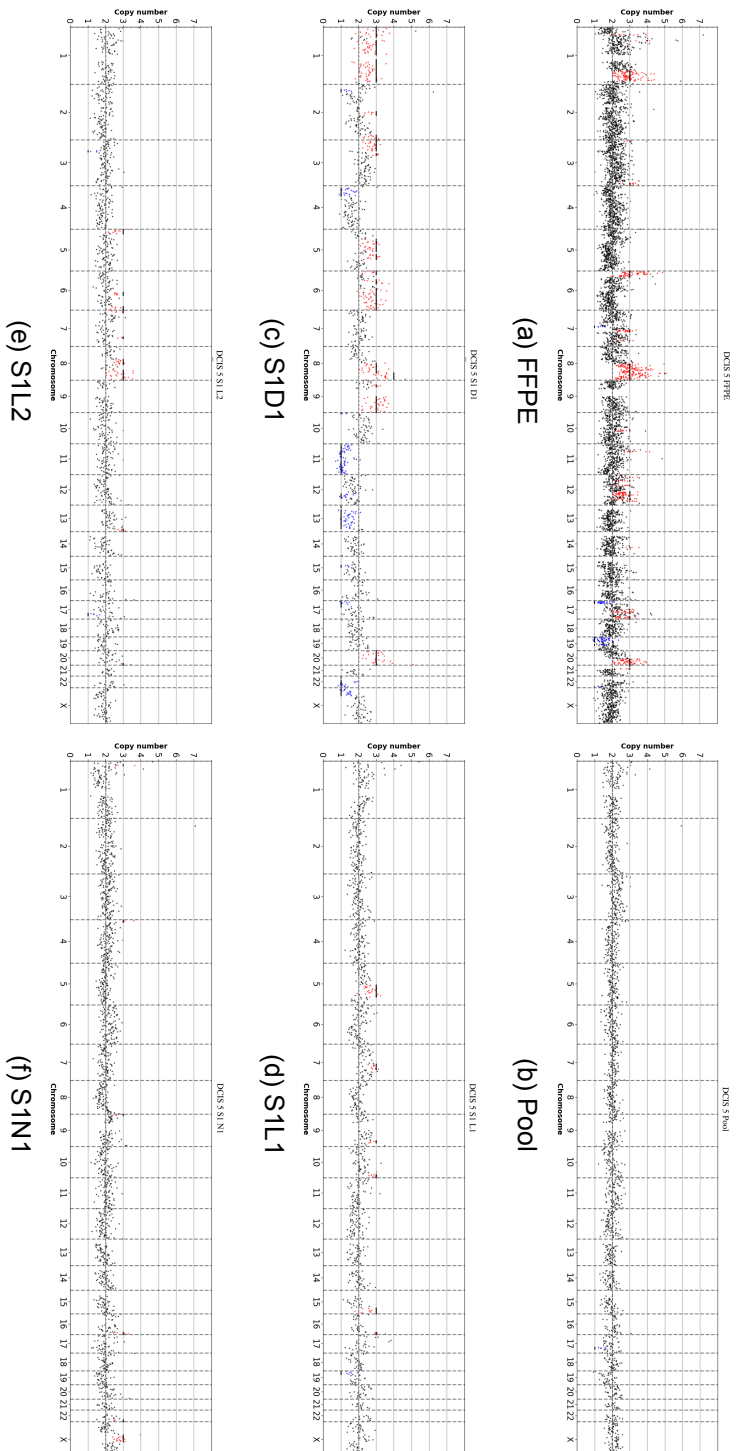


Abbildung 3.20: Copy Number Profile für DCIS Fall 5.

zeigt darüber hinaus jedoch noch weitere Amplifikationen und Deletionen. Die Lasermikrodissektionskontrollen S1L1 und S1L2 haben kleine Amplifikationen. Der Zellpool und die Normalzellen weisen balancierte Profile auf (Abbildung 3.20).

### **3.3.6 DCIS 6**

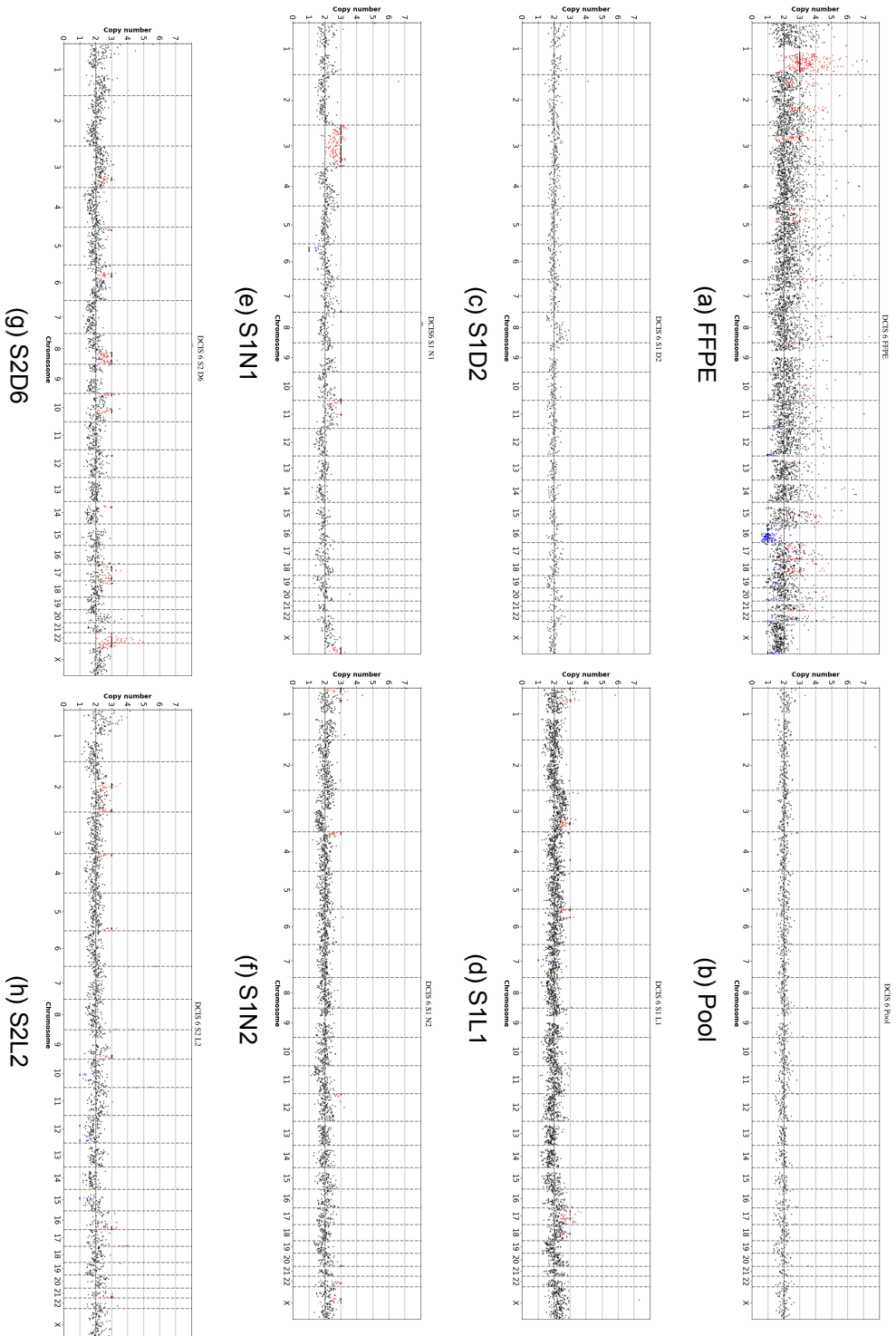
Das Profil des FFPE Blocks von DCIS 6 zeigt eine Amplifikation auf Chromosom 1 und eine Deletion auf Chromosom 16. Der Zellpool, die CK<sup>+</sup> Zelle, die Lasermikrodissektionskontrolle und die Normalzelle S1N2 haben balancierte Profile. Auf Chromosom 3 der Normalzelle S1N3 sieht man eine Amplifikation. Zelle S2D6 weist Amplifikationen unter anderem auf Chromosom 8 und 22 auf (Abb. 3.21). Die Lasermikrodissektionskontrolle und Normalzelle 1 haben balancierte Profile, wohingegen Normalzelle 2 Amplifikationen auf Chromosom 7 und 9 aufweist (Abb. 3.22).

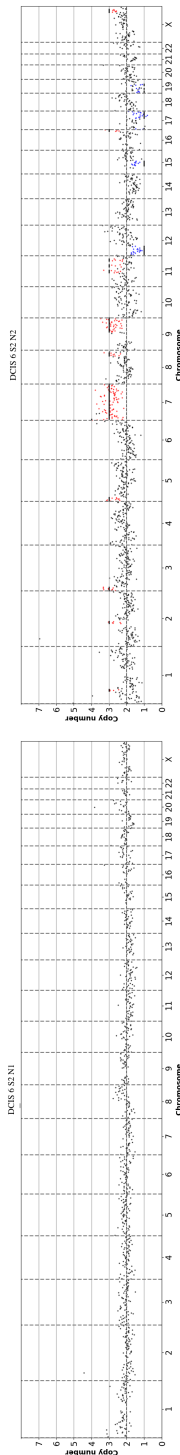
### **3.3.7 DCIS 7**

Beim DCIS 7 haben der Zellpool, Zelle S1N1 und S1N4 balancierte Profile. Zelle S1D1, die ohne Lasermikrodissektion gepickt wurde, weist Amplifikationen auf Chromosom 2 und 8, sowie Deletionen auf Chromosom 7, 13 und 14 auf. Zelle S1N2 hat Amplifikationen auf Chromosomen 5 und 8 und Deletionen auf Chromosom 19 (Abb. 3.23). Zu dieser Patientin war leider kein FFPE Block verfügbar.

### **3.3.8 DCIS 8**

Hier zeigt der FFPE Block Amplifikationen auf Chromosomen 6, 8, 20 und X, sowie Deletionen auf 6 und 18. Der Zellpool und die Zellen S1D1, S1N2 haben balancierte Profile. Zelle S1N1 weist Amplifikationen auf Chromosom 6 und 7 auf. Zelle S1N2 zeigt Deletionen auf Chromosom 11 und 19, sowie Amplifikationen





(a) S2N1

(b) S2N2

Abbildung 3.22: Copy Number Profile für DCIS Fall 6 (fortges.).

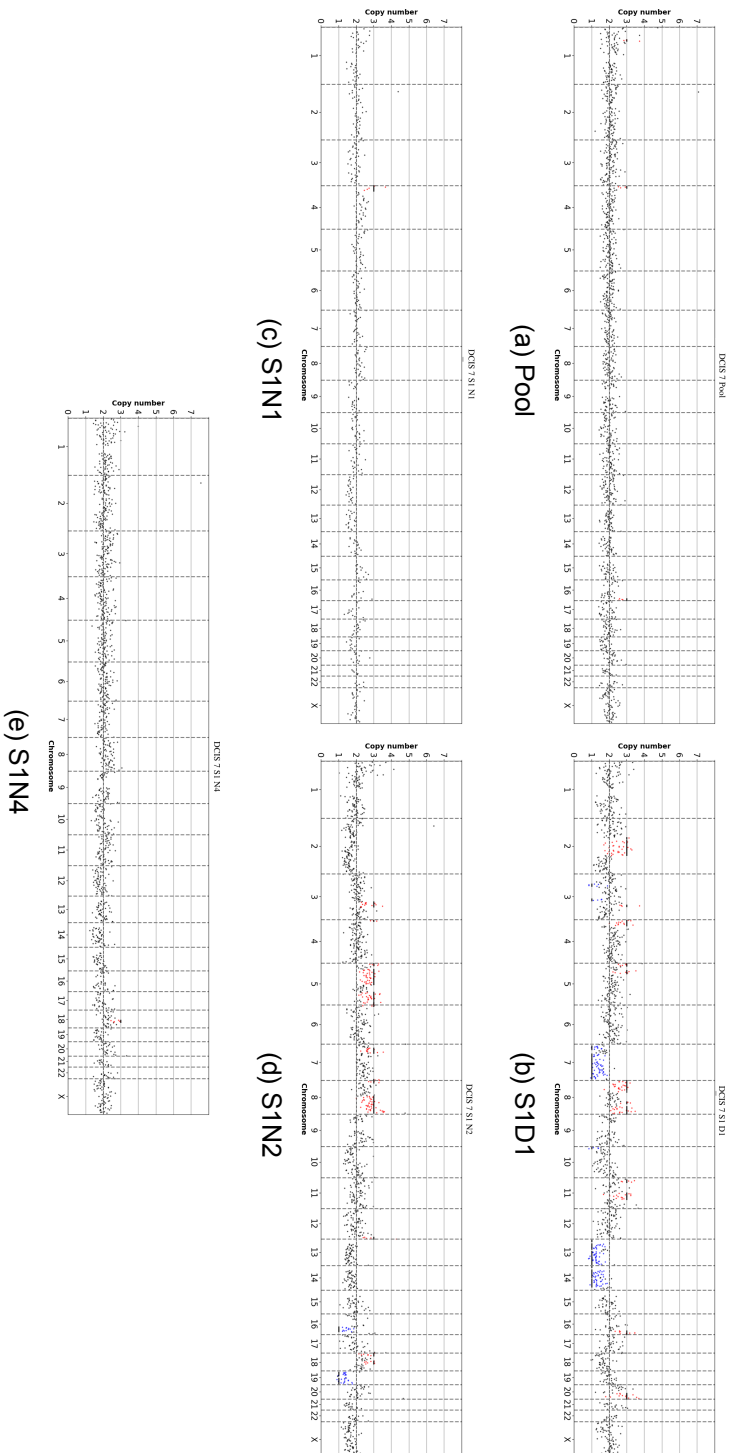


Abbildung 3.23: Copy Number Profile für DCIS Fall 7. Die DTZ wurde ohne Laser Mikrodissektion isoliert.



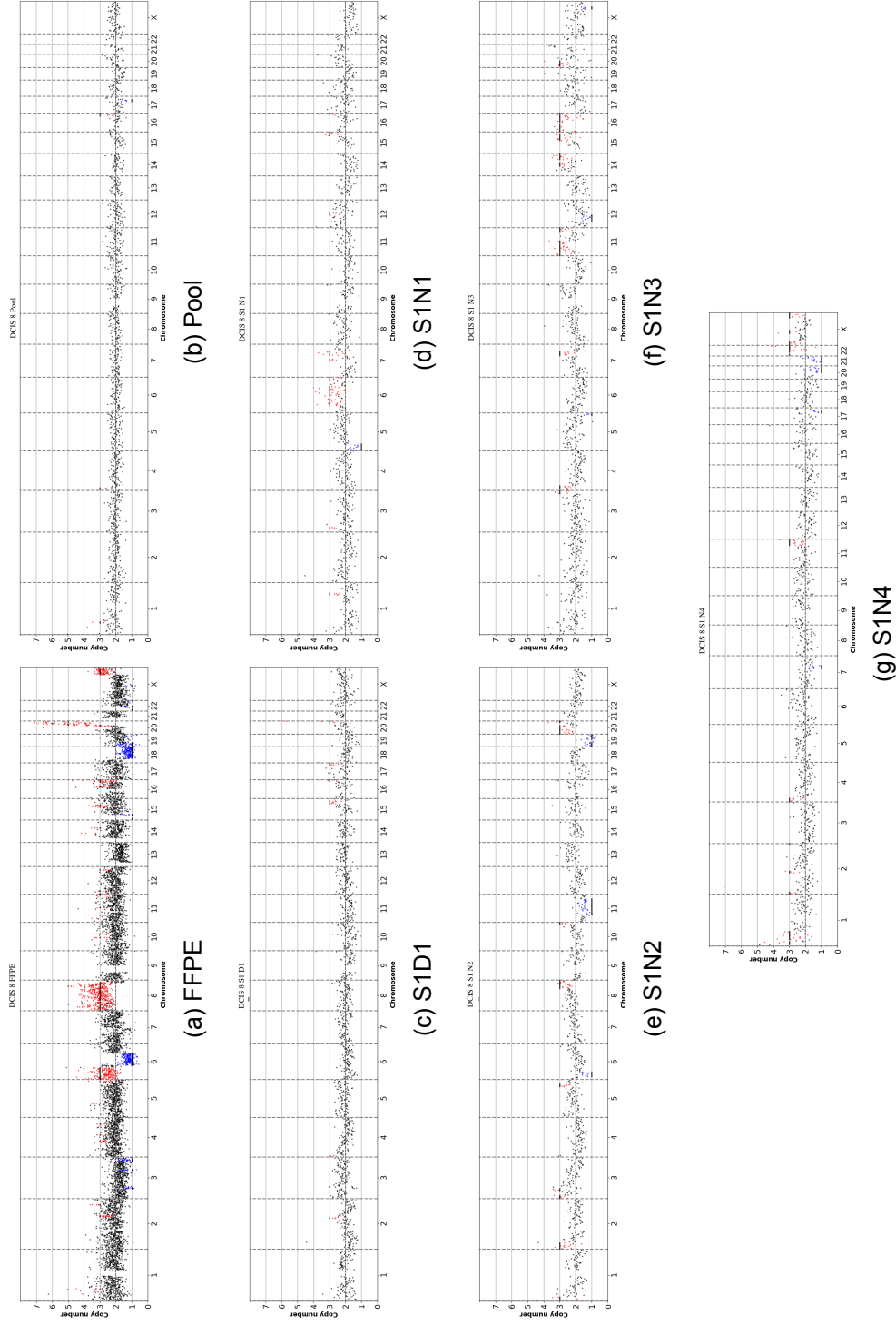


Abbildung 3.24: Copy Number Profile für DCIS Fall 8. Die DTZ wurde ohne Laser Mikrodisektion isoliert.

---

auf Chromosom 8 und 20, S1N3 Amplifikationen auf Chromosomen 11, 14, 15 und 16. Bei Zelle S1N4 sieht man Amplifikationen auf den Chromosomen 1 und X, sowie Deletionen auf 20 und 21 (Abb. 3.24).

## 4. Diskussion

### 4.1 Longitudinaler Vergleich von CNV-Profilen aus Paraffin-Blöcken

Mithilfe von WGA und Sequenzierung mit niedriger Sequenziertiefe konnten bei einer Patientin aus FFPE Blöcken aus dem Primärtumor der Brust, einem fünf Jahre später aufgetretenen Lokalrezidiv, sowie kontralateralen Zweitkarzinom, aus ZTZ aus dem Blut, sowie aus DTZ aus dem Knochenmark CNV-Profile erstellt werden. Im Rahmen der Aufarbeitung wurde ein Reparaturschritt mittels kommerziell erhältlichem NEBNext® FFPE DNA Repair Mix evaluiert, wobei dies keine Verbesserung der resultierenden DNA zur Folge hatte, weshalb in der Folge darauf verzichtet wurde (Abbildung 3.2). Es ergaben sich die in Abbildungen 3.4 - 3.7 dargestellten Profile. Bei Betrachtung des in Abbildung 3.7 ersichtlichen direkten Vergleichs imponieren dabei geteilte Amplifikationen auf den Chromosomen 1, 5, 7, und 8 sowie Deletionen auf Chromosomen 3, 4, und 16. Insbesondere das Lokalrezidiv, das kontralaterale Rezidiv, DTZ 9 und die ZTZs weisen große Übereinstimmungen der CNV auf, sodass hier über einen geteilten klonalen Ursprung spekuliert werden kann.

Auch Demeulemeester et al. konnten in invasiven Brusttumoren, Lymphknoten und DTZ die selben CNV nachweisen. Allerdings waren in dieser Studie nur in

53% der DTZ die Verbindung zum Primarius herstellbar und die CNV auch mit aberranten hämatopoetischen Zellen vereinbar (Demeulemeester et al., 2016). Übereinstimmend sind in vielen Studien die CNV-Profile zwischen unterschiedlichen Lokalisationen konserviert, wobei über Punktmutationen eine feinere Klondefinition ermöglicht wird (Gao et al., 2016; Savas et al., 2016; Wang et al., 2014).

Eine solche Gegenüberstellung von Mutationen ist aufgrund der Paraffinfixierung allerdings schwer möglich. Die in dieser Arbeit verwendete WGA-Methode der linker adapter-WGA basiert auf dem Prinzip, dass die DNA der Zelle durch die Restriktionsendonuklease MseI verdaut wird und für die Schnittstellen spezifische Primer für eine PCR zur Amplifikation genutzt werden (Klein et al., 1999). Formalin führt im Genom allerdings zu Doppelstrangbrüchen. Daher ist es möglich, dass einzelne Fragmente nicht von MseI geschnitten werden und damit keine Primer binden. Weiterhin hat die verwendete AmpliTaq Gold eine Fehlerrate von  $1 \times 10^{-4}$ - $2 \times 10^{-5}$ , sodass im Rahmen der Amplifikation regelmäßig Fehler generiert werden. Eine Möglichkeit, diese Fehler zu korrigieren, ist das unabhängige Sequenzieren der komplementären Stränge über orientierungsspezifische Primer (Schmitt et al., 2012; Xing et al., 2021) oder das Separieren der Stränge mittels einem mikrofluidischen Gerät (Chu et al., 2017). Eine etablierte Kombination mit dem Ampli1 Kit zur Linker Adapter WGA existiert nicht. Da Ampli1 im Vergleich mit anderen kommerziell erhältlichen Kits qualitativ überlegen ist, wurde es jedoch in diesem Projekt verwendet (Biezuner et al., 2021).

Neben den zwischen mehreren Lokalisationen geteilten Abweichungen konnten auch andere nicht geteilte Aberrationen nachgewiesen werden. Dies kann auf mehrere Arten erklärt werden: Balancierte Profile sind entweder auf gesundes Brustepithel oder aber Tumorklone mit balancierten CNV-Profilen zurückzuführen. Einerseits sind aberrante CNV-Profile in gesundem Brustgewebe von Gao et al. in 5,9% gesunder einzelner Brustzellen beschrieben (Gao et al., 2016). Eine

weitere Erklärung ist die bei Neoplasien weit verbreitete Intratumorheterogenität (Black & McGranahan, 2021; McGranahan & Swanton, 2017). Ähnlich zu uns haben auch Baslan et al. bei Einzelzellgenomen aus Brustkrebszellen eine deutliche Heterogenität auf CNV-Ebene beobachtet (Baslan et al., 2020).

Einige Studien beschreiben CNV beim Brustkrebs als frühe Mutationen und auch ein frühes Auftreten des letzten gemeinsamen Vorfahrens der Tumorzellen (Gao et al., 2016; Nik-Zainal et al., 2012). Große Sequenzieranstrengungen der letzten Zeit kommen allerdings zu dem Schluss, dass es chromosomale Instabilität beim Brustkrebs auch über längere Zeiträume gibt (Gerstung et al., 2020). In der MSK-MET Kohorte war TP53 Deletion und chromosomale Instabilität beim HR+/HER2-Brustkrebs mit Metastasierung assoziiert (Nguyen et al., 2022).

Dass sich bei der Patientin geteilte CNV zwischen Primärtumor, DTZ und Lokalrezidiv finden, kann beispielsweise durch eine erneute Kolonisierung des Brustgewebes durch schon disseminierte Tumorzellen erklärt werden. So konnten Kim et al. zeigen, dass unterschiedliche Tumorentitäten, darunter auch Mammakarzinome, im Mausmodell aus ZTZs zurück in das Organ des Primärtumors streuen und dabei besonders aggressive Klone selektioniert werden (Kim et al., 2009).

## **4.2 Charakterisierung von DCIS DTZ**

### **4.2.1 Klinische Daten**

Bei 627 Patientinnen mit DCIS wurden in 11% DTZs nachgewiesen. Die Detektion war weder mit dem Tumordurchmesser, noch mit einem anderen klinikopathologischen Parameter assoziiert. Die Lokalrezidivrate von 5% in dieser DCIS-Kohorte entspricht der Lokalrezidivrate, die auch für frühen invasiven Brustkrebs festgestellt wurde (Hartkopf et al., 2015). Auch hier waren Fernmetastasen häufiger

nach Lokalrezidiv zu beobachten und zwar unabhängig von der Invasivität des Rezidivs. Gemeinsam mit der Feststellung, dass 2 Patientinnen Fernmetastasen ohne Lokalrezidiv entwickelten, untermauert dies die Möglichkeit, dass histopathologische Invasivität nicht maßgeblich für die Fähigkeit zu metastasieren ist. Vielmehr könnte die Fähigkeit der früh gestreuten Zellen, einen Ruhezustand zu verlassen, ausschlaggebend für die Entwicklung eines Rezidivs sein (Aguirre-Ghiso, 2007). Ähnlich argumentieren auch Narod und Sopik, die DCIS als disseminierende Tumore einordnen (Narod & Sopik, 2018).

Die DTZ-Positivität lag mit 11% unter der Rate von 24%, die wir bei frühen invasiven Mammakarzinomen beobachten (Hartkopf et al., 2015), entspricht aber der von Sänger et al. beobachteten Rate bei DCIS nach Färbung von CK 7, 8 und 18 mit dem A45-B/B3 Antikörper (Sänger et al., 2011). Dort konnte jedoch die Detektionsrate durch zusätzliches Färben mit dem AE1/AE4 Antikörper gegen CK5, 7, 8 und 19 verdoppelt werden (Sänger et al., 2011).

In der Literatur wird das Konzept des disseminierenden DCIS häufig kritisiert. So wurde als Antwort auf die SEER Studie von Narod et al., die beschreibt, dass Patientinnen nach DCIS-Diagnose ohne invasives Rezidiv an Fernmetastasen sterben können, vielfach das Argument angeführt, dass es sich um eine übersehene Invasion und damit einen Fehler der pathologischen Befundung handeln müsse (Boyages et al., 2016; Narod et al., 2015). Allerdings gibt es Studien, die in Fällen mit Tumornachweis im DCIS Wächterlymphknoten trotz extensiver histologischer Aufarbeitung keine Invasion finden (Osako et al., 2013; Zetterlund et al., 2014). Eine histopathologische Aufarbeitung war bei uns nicht umfassend möglich, da nur repräsentative Schnitte für längere Zeiträume aufbewahrt werden. Während bei uns 30% der Patientinnen mit frühem invasiven Mammakarzinomen eine Beteiligung des Wachterlymphknotens aufweisen, war dies allerdings bei keiner der 26 DCIS Patientinnen der Fall, der die Wächterlymphknoten entfernt wurden, genau-

so wie bei den 7 Patientinnen, die Fernmetastasen entwickelten. Weiterhin liegt die Positivitätsrate von Wächterlymphknoten mit 1% am unteren Ende des in der Literatur beschriebenen Spektrums von 1-22% (Francis et al., 2015).

Eine andere Erklärung für Lymphknotenmetastasen und DTZ bei Patientinnen mit DCIS ist eine iatrogene Dissemination im Rahmen von Biopsien, wobei die prognostische Signifikanz dieser Beobachtung unklar ist und der Nachweis mit zunehmendem Abstand zwischen Biopsie und Exzision abnimmt (Liebens et al., 2009). So beschreiben auch Uematsu und Kasami DCIS Fälle, bei denen durch eine Biopsie Tumorzellen verschleppt werden (Uematsu & Kasami, 2008).

In der aktuellen Analyse zeigt sich in allen betrachteten Überlebensmaßen ein nichtsignifikant häufigeres Auftreten von Rezidiven bei DTZ Nachweis. Dieser Unterschied ist biologisch nachvollziehbar, wenn man CK<sup>+</sup> Zellen als Tumorzellen betrachtet, die vom DCIS in die Ferne disseminiert sind. Da die dokumentierten Rezidive über einen Zeitraum von > 10 Jahren auftraten, die mediane Nachverfolgung allerdings bei 4,1 Jahren lag, sind die errechneten Konfidenzintervalle breit und der Unterschied somit statistisch nicht signifikant. Dies zeigt sich auch bei den beobachteten Hazard ratios der Cox Überlebensmodelle. Um eine genauere Schätzung zu ermöglichen, bedarf es einer größeren Patientenzahl mit langer Nachverfolgung. In der *European Organisation for Research and Treatment of Cancer Randomized Phase III Trial 10853* Studie, in der der Effekt adjuvanter Bestrahlung auf den Krankheitsverlauf von 1.010 DCIS Patientinnen untersucht wurde, zeigten sich in der multivariaten Überlebensanalyse für Lokalrezidive Patientenalter, Detektionsmethode, histologischer Subtyp, Architektur, Resektionsstatus und Bestrahlung als signifikante Prädiktoren (Bijker et al., 2006). Die Hazard ratios lagen hierbei im Bereich von 1,5 - 2,4 (Bijker et al., 2006). Ein Einfluss in dieser Größenordnung ist bei dem in dieser Arbeit beobachteten Konfidenzintervall von 0,73 - 4,56 für den Nachweis von DTZ durchaus möglich. Neben der poten-

tiellen prognostischen Relevanz sind DTZ bei DCIS jedoch vor allem biologisch interessant, da sie Zellen darstellen, an denen Tumorphylogenie und Dormanz untersucht werden können.

#### 4.2.2 Genomische Charakterisierung

Im folgenden Teil dieser Arbeit wurden DTZ von acht DCIS Patientinnen mit dem Ziel isoliert, die maligne Natur dieser Zellen zu bestätigen und die Ähnlichkeit zu den CNV der DCIS zu beschreiben. Aus den Zellen wurden Einzelzellgenome amplifiziert und mit niedriger Auflösung sequenziert, um Copy Number Profile zu erstellen. Aufgrund der hohen Zelldichte auf den Haftobjektträgern kam hierbei bei 6/8 Patientinnen eine Lasermikrodissektion der umgebenden Zellen zum Einsatz, um die Isolation der einzelnen CK<sup>+</sup>-Zelle mittels Mikromanipulation zu ermöglichen. Bei den Patientinnen 1-7 konnten auf diese Weise DTZs mit aberranten CNV-Profilen dokumentiert werden. Diese waren jedoch nicht eindeutig übereinstimmend mit den Veränderungen der FFPE Blöcke.

Darüber hinaus fanden sich bei den Patientinnen 3, 4, 5 und 6, auch CNV in den Profilen der Laserkontrollzellen und bei den Patientinnen 3, 4, 6, 7 und 8 auch veränderte CK<sup>-</sup> Zellen mit CNVs. Bei Patientin 7 wurde eine DTZ ohne Lasermikrodissektion isoliert und wies CNV auf. Leider stand bei dieser Patientin kein FFPE-Block zur Auswertung zur Verfügung, sodass unklar bleibt, ob die Veränderungen zwischen DCIS und DTZ geteilt sind.

Eine fehlende Übereinstimmung der Profile zwischen DTZs und Tumorblöcken wurde auch von Demeulemeester et al. im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen beschrieben. In jeder der sechs Patientinnen beschreiben sie CK<sup>+</sup> aberrante Zellen unklarer Herkunft, deren CNV eher mit den Abweichungen übereinstimmen, die sie bei hämatopoetischen Neoplasien erwarten und deren Frequenz mit dem Alter der Patientinnen zunimmt (Demeulemeester et al., 2016). Allerdings



sind auch Fälle beschrieben, in denen die Metastasenklone nicht im Primarius auffindbar waren (Savas et al., 2016).

Möglicherweise hat die Lasermikrodissektion dazu beigetragen, dass aus CK<sup>-</sup> Zellen aberrante Profile generiert wurden, indem beispielsweise durch Ungenauigkeit des Lasers benachbarte Zellen unvollständig entfernt wurden und deren Genom teilweise mit amplifiziert wurde. Eine alternative Erklärung, die auch die abweichenden Profile bei CK<sup>-</sup> Zellen berücksichtigt, die ohne Lasermikrodissektion isoliert wurden ist, dass es sich hier um echte Abweichungen von hämatopoetischen Zellen handelt.

Aufgrund der abweichenden Profile vieler Kontrollzellen ist die eindeutige Attribution der CK<sup>+</sup> Zellen als vom DCIS disseminierte Zellen in dieser Arbeit nicht möglich. An einer technischen Optimierung des Protokolls zur besseren Einordnung der Zellen wird in der Arbeitsgruppe von Christoph Klein in Regensburg schon gearbeitet. Zunächst wird hierzu ein moderneres Mikroskop zur Lasermikrodissektion verwendet, um bei dem in dieser Arbeit genutzten Gerät beobachtete Ungenauigkeiten als Fehlerquelle auszuschließen. Weitere Möglichkeiten, die CK<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark von DCIS Patientinnen störungsfreier zu charakterisieren, wären eine Lagerung auf Haftobjektträgern mit geringerer Zelldichte oder im optimalen Fall eine direkte Zellisolation und WGA am Tag der Operation. In der Umsetzung sind diese Möglichkeiten aufgrund der Rarität der Patientinnen und Zellen, der begrenzten Lagermöglichkeiten und des hohen Arbeitsaufwands jedoch unrealistisch.

Sollte sich durch eine optimierte Methodik der maligne Ursprung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von DCIS Patientinnen bestätigen, käme dies einem Paradigmenwechsel in der Einordnung von Brusttumoren gleich, da dies bedeutete, dass Dissemination keiner histologischen Invasion bedarf. Ein Einfluss auf Überlebensmaße wäre in diesem Fall nur logisch und sollte sich in größeren

Patientenkollektiven feststellen lassen.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Einzelzellgenome aus verschiedenen Gewebeatypen isoliert und amplifiziert. Auf diese Weise konnten bei einer Patientin mit Primärtumor, Lokalrezidiv, kontralateralem Rezidiv, DTZs und ZTZs Copy Number Profile erstellt werden, welche die Persistenz von Veränderungen über die Zeit darstellen. In einer neuerlichen Auswertung des Patientenkollektivs von DCIS-Patientinnen, bei denen in Tübingen im Rahmen der Brustoperation Knochenmark aspiriert wurde, konnte auch mit erhöhter Patientenzahl und längerem Follow-up kein statistisch signifikanter Einfluss des DTZ-Status auf Überlebensmaße beschrieben werden. Die Aussagekraft der Modelle bleibt jedoch aufgrund der breiten Konfidenzintervalle weiterhin eingeschränkt und ein relevanter Einfluss ist im Rahmen dieser durchaus möglich. Es kann daher gemutmaßt werden, dass ein solcher mit größeren Patientenkollektiven und längerer Nachverfolgung nachgewiesen werden könnte. Zur Bestätigung der malignen Herkunft CK<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark der DCIS Patientinnen wurden solche Zellen bei acht Patientinnen isoliert und sequenziert. Hierbei zeigten jedoch auch CK<sup>-</sup> Zellen aberrante Copy Number Profile. Daher besteht entweder ein methodisches Problem, oder sind unterschiedliche Zellen im Knochenmark aberrant. Da kein DTZ-Profil mit dem Profil des dazugehörigen DCIS übereinstimmt, konnte kein einwandfreier Nachweis der malignen Herkunft dieser Zellen erbracht werden. Mit einer optimierten Methodik könnte dieser Nachweis in Zukunft gelingen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). Models, Mechanisms and Clinical Evidence for Cancer Dormancy. *Nature Reviews Cancer*, 7 (11, 11), 834–846. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrc2256
- Allard, W. J., Matera, J., Miller, M. C., Repollet, M., Connelly, M. C., Rao, C. et al. (2004). Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but Not in Healthy Subjects or Patients with Nonmalignant Diseases. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10 (20), 6897–6904. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0378
- Allred, D. C., Wu, Y., Mao, S., Nagtegaal, I. D., Lee, S., Perou, C. M. et al. (2008). Ductal Carcinoma In Situ and the Emergence of Diversity during Breast Cancer Evolution. *Clinical Cancer Research*, 14 (2), 370–378. American Association for Cancer Research. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1127
- Banys, M., Hahn, M., Gruber, I., Krawczyk, N., Wallwiener, M., Hartkopf, A. et al. (2014). Detection and Clinical Relevance of Hematogenous Tumor Cell Dissemination in Patients with Ductal Carcinoma in Situ. *Breast Cancer Research and Treatment*, 144 (3), 531–538. doi:10.1007/s10549-014-2898-6
- Baslan, T., Kendall, J., Volyanskyy, K., McNamara, K., Cox, H., D’Italia, S. et al. (2020). Novel Insights into Breast Cancer Copy Number Genetic Heterogeneity Revealed by Single-Cell Genome Sequencing. *eLife*, 9, e51480. doi:10.7554/eLife.51480
- Baudis, M. & Cleary, M. L. (2001). Progenetix.Net: An Online Repository for Molecular Cytogenetic Aberration Data. *Bioinformatics*, 17 (12), 1228–1229. doi:10.1093/bioinformatics/17.12.1228
- Bidard, F.-C., Michiels, S., Riethdorf, S., Mueller, V., Esserman, L. J., Lucci, A. et al. (2018). Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 110 (6), 560–567. doi:10.1093/jnci/djy018
- Bidard, F.-C., Peeters, D. J., Fehm, T., Nolé, F., Gisbert-Criado, R., Mavroudis, D. et al. (2014). Clinical Validity of Circulating Tumour Cells in Patients with Metastatic Breast Cancer: A Pooled Analysis of Individual Patient Data. *The*

- Lancet Oncology*, 15 (4), 406–414. doi:10.1016/S1470-2045(14)70069-5
- Biezuner, T., Raz, O., Amir, S., Milo, L., Adar, R., Fried, Y. et al. (2021). Comparison of Seven Single Cell Whole Genome Amplification Commercial Kits Using Targeted Sequencing. *Scientific Reports*, 11 (1, 1), 17171. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41598-021-96045-9
- Bijker, N., Meijnen, P., Peterse, J. L., Bogaerts, J., Van Hoorebeeck, I., Julien, J.-P. et al. (2006). Breast-Conserving Treatment With or Without Radiotherapy in Ductal Carcinoma-In-Situ: Ten-Year Results of European Organisation for Research and Treatment of Cancer Randomized Phase III Trial 10853—A Study by the EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group. *Journal of Clinical Oncology*, 24 (21), 3381–3387. Wolters Kluwer. doi:10.1200/JCO.2006.06.1366
- Black, J. R. M. & McGranahan, N. (2021). Genetic and Non-Genetic Clonal Diversity in Cancer Evolution. *Nature Reviews Cancer*, 21 (6, 6), 379–392. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41568-021-00336-2
- Boyages, J., Stuart, K. & Shah, C. (2016). Treatment and Long-Term Risks for Patients With a Diagnosis of Ductal Carcinoma In Situ. *JAMA Oncology*, 2 (3), 399. doi:10.1001/jamaoncol.2015.4875
- Braun, S., Vogl, F. D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M. P., Coombes, R. C. et al. (2005). A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 353 (8), 793–802. doi:10.1056/NEJMoa050434
- Casasent, A. K., Edgerton, M. & Navin, N. E. (2017). Genome Evolution in Ductal Carcinoma in Situ: Invasion of the Clones. *The Journal of Pathology*, 241 (2), 208–218. doi:10.1002/path.4840
- Casasent, A. K., Schalck, A., Gao, R., Sei, E., Long, A., Pangburn, W. et al. (2018). Multiclonal Invasion in Breast Tumors Identified by Topographic Single Cell Sequencing. *Cell*, 172 (1-2), 205–217.e12. doi:10.1016/j.cell.2017.12.007
- Chu, W. K., Edge, P., Lee, H. S., Bansal, V., Bafna, V., Huang, X. et al. (2017). Ultraaccurate Genome Sequencing and Haplotyping of Single Human Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (47), 12512–12517. National Academy of Sciences. doi:10.1073/pnas.1707609114
- Ciriello, G., Miller, M. L., Aksoy, B. A., Senbabaoglu, Y., Schultz, N. & Sander, C. (2013). Emerging Landscape of Oncogenic Signatures across Human Cancers. *Nature Genetics*, 45 (10, 10), 1127–1133. Nature Publishing Group. doi:10.1038/ng.2762
- Coussens, L. M., Fingleton, B. & Matrisian, L. M. (2002). Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer—Trials and Tribulations. *Science*, 295 (5564), 2387–2392. doi:10.1126/science.1067100
- Cowell, C. F., Weigelt, B., Sakr, R. A., Ng, C. K. Y., Hicks, J., King, T. A. et al. (2013). Progression from Ductal Carcinoma *in Situ* to Invasive Breast Cancer: Revisited. *Molecular Oncology*, 7 (5), 859–869.

- doi:10.1016/j.molonc.2013.07.005
- Demeulemeester, J., Kumar, P., Møller, E. K., Nord, S., Wedge, D. C., Peterson, A. et al. (2016). Tracing the Origin of Disseminated Tumor Cells in Breast Cancer Using Single-Cell Sequencing. *Genome Biology*, 17 (1), 250. doi:10.1186/s13059-016-1109-7
- Doebar, S. C., Sieuwerts, A. M., Weerd, V. de, Stoop, H., Martens, J. W. M. & Deurzen, C. H. M. van. (2017). Gene Expression Differences between Ductal Carcinoma in Situ with and without Progression to Invasive Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*, 187 (7), 1648–1655. Elsevier. doi:10.1016/j.ajpath.2017.03.012
- Ellis, I. O. (2010). Intraductal Proliferative Lesions of the Breast: Morphology, Associated Risk and Molecular Biology. *Modern Pathology*, 23 (2, 2), S1–S7. Nature Publishing Group. doi:10.1038/modpathol.2010.56
- Elshof, L. E., Schmidt, M. K., Rutgers, E. J. T., van Leeuwen, F. E., Wesseling, J. & Schaapveld, M. (2018). Cause-Specific Mortality in a Population-based Cohort of 9799 Women Treated for Ductal Carcinoma In Situ. *Annals of Surgery*, 267 (5), 952–958. doi:10.1097/SLA.0000000000002239
- Epstein, M. S., Lagios, M. D. & Silverstein, M. J. (2018). Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *The Breast* (S. 562–575.e4). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-323-35955-9.00039-8
- Fehm, T., Braun, S., Muller, V., Janni, W., Gebauer, G., Marth, C. et al. (2006). A Concept for the Standardized Detection of Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow from Patients with Primary Breast Cancer and Its Clinical Implementation. *Cancer*, 107 (5), 885–892. doi:10.1002/cncr.22076
- Ferrarini, A., Forcato, C., Buson, G., Tononi, P., Monaco, V. del, Terracciano, M. et al. (2018). A Streamlined Workflow for Single-Cells Genome-Wide Copy-Number Profiling by Low-Pass Sequencing of LM-PCR Whole-Genome Amplification Products. *PLOS ONE*, 13 (3), e0193689. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.pone.0193689
- Fisher, B., Dignam, J., Wolmark, N., Mamounas, E., Costantino, J., Poller, W. et al. (1998). Lumpectomy and Radiation Therapy for the Treatment of Intraductal Breast Cancer: Findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-17. *Journal of Clinical Oncology*, 16 (2), 441–452. doi:10.1200/JCO.1998.16.2.441
- Francis, A. M., Haugen, C. E., Grimes, L. M., Crow, J. R., Yi, M., Mittendorf, E. A. et al. (2015). Is Sentinel Lymph Node Dissection Warranted for Patients with a Diagnosis of Ductal Carcinoma In Situ? *Annals of Surgical Oncology*, 22 (13), 4270–4279. doi:10.1245/s10434-015-4547-7
- Franken, B., de Groot, M. R., Mastboom, W. J., Vermes, I., van der Palen, J., Tibbe, A. G. et al. (2012). Circulating Tumor Cells, Disease Recurrence and Survival in Newly Diagnosed Breast Cancer. *Breast Cancer Research*, 14 (5), R133. doi:10.1186/bcr3333

- Gao, R., Davis, A., McDonald, T. O., Sei, E., Shi, X., Wang, Y. et al. (2016). Punctuated Copy Number Evolution and Clonal Stasis in Triple-Negative Breast Cancer. *Nature Genetics*, 48 (10, 10), 1119–1130. Nature Publishing Group. doi:10.1038/ng.3641
- Gerstung, M., Jolly, C., Leshchiner, I., D'Entropio, S. C., Gonzalez, S., Rosebrock, D. et al. (2020). The Evolutionary History of 2,658 Cancers. *Nature*, 578 (7793, 7793), 122–128. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41586-019-1907-7
- Ghosh, M. S. (2020, Juli 10). *Identification of Metastasis Founder Cells in Breast Cancer by Cell Lineage Tracing*. Universität Regensburg.
- Gorringe, K. L., Hunter, S. M., Pang, J.-M., Opeskin, K., Hill, P., Rowley, S. M. et al. (2015). Copy Number Analysis of Ductal Carcinoma in Situ with and without Recurrence. *Modern Pathology*, 28 (9, 9), 1174–1184. Nature Publishing Group. doi:10.1038/modpathol.2015.75
- Hagemeyer, F. B., Buzdar, A. U., Luna, M. A. & Blumenschein, G. R. (1980). Causes of Death in Breast Cancer: A Clinicopathologic Study. *Cancer*, 46 (1), 162–167. doi:10.1002/1097-0142(19800701)46:1<162::aid-cncr2820460127>3.0.co;2-b
- Harper, K. L., Sosa, M. S., Entenberg, D., Hosseini, H., Cheung, J. F., Nobre, R. et al. (2016). Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer. *Nature*, 540 (7634, 7634), 588–592. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nature20609
- Hartkopf, A. D., Brucker, S. Y., Taran, F.-A., Harbeck, N., von Au, A., Naume, B. et al. (2021). Disseminated Tumour Cells from the Bone Marrow of Early Breast Cancer Patients: Results from an International Pooled Analysis. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 154, 128–137. doi:10.1016/j.ejca.2021.06.028
- Hartkopf, A. D., Taran, F.-A., Wallwiener, M., Hahn, M., Becker, S., Solomayer, E.-F. et al. (2014). Prognostic Relevance of Disseminated Tumour Cells from the Bone Marrow of Early Stage Breast Cancer Patients - Results from a Large Single-Centre Analysis. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 50 (15), 2550–2559. doi:10.1016/j.ejca.2014.06.025
- Hartkopf, A. D., Wallwiener, M., Fehm, T. N., Hahn, M., Walter, C. B., Gruber, I. et al. (2015). Disseminated Tumor Cells from the Bone Marrow of Patients with Nonmetastatic Primary Breast Cancer Are Predictive of Locoregional Relapse. *Annals of Oncology*, 26 (6), 1155–1160. doi:10.1093/annonc/mdv148
- Hieronimus, H., Murali, R., Tin, A., Yadav, K., Abida, W., Moller, H. et al. (2018). Tumor Copy Number Alteration Burden Is a Pan-Cancer Prognostic Factor Associated with Recurrence and Death. (M.R. Green, J. Settleman, C. Abate-Shen & M.A. Rubin, Hrsg.) *eLife*, 7, e37294. eLife Sciences Publications, Ltd. doi:10.7554/eLife.37294
- Hosseini, H., Obradović, M. M. S., Hoffmann, M., Harper, K. L., Sosa, M. S., Werner-Klein, M. et al. (2016). Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast

- Cancer. *Nature*, 540 (7634), 552–558. doi:10.1038/nature20785
- Huang, Q., Carrio-Cordo, P., Gao, B., Paloots, R. & Baudis, M. (2021). The Progenetix Oncogenomic Resource in 2021. *Database*, 2021, baab043. doi:10.1093/database/baab043
- Hüsemann, Y., Geigl, J. B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E. et al. (2008). Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer. *Cancer Cell*, 13 (1), 58–68. Elsevier. doi:10.1016/j.ccr.2007.12.003
- lafrate, A. J., Feuk, L., Rivera, M. N., Listewnik, M. L., Donahoe, P. K., Qi, Y. et al. (2004). Detection of Large-Scale Variation in the Human Genome. *Nature Genetics*, 36 (9, 9), 949–951. Nature Publishing Group. doi:10.1038/ng1416
- Janni, W. J., Rack, B., Terstappen, L. W. M. M., Pierga, J.-Y., Taran, F.-A., Fehm, T. et al. (2016). Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 22 (10), 2583–2593. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1603
- Kassambara, A., Kosinski, M. & Biecek, P. (2021). *Survminer: Drawing Survival Curves Using Ggplot2*. manual,. Verfügbar unter: <https://rpkgs.datanovia.com/survminer/index.html>
- Kim, M.-Y., Oskarsson, T., Acharyya, S., Nguyen, D. X., Zhang, X. H.-F., Norton, L. et al. (2009). Tumor Self-Seeding by Circulating Cancer Cells. *Cell*, 139 (7), 1315–1326. Elsevier. doi:10.1016/j.cell.2009.11.025
- Klein, C. A. (2009). Parallel Progression of Primary Tumours and Metastases. *Nature Reviews Cancer*, 9 (4, 4), 302–312. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrc2627
- Klein, C. A., Blankenstein, T. J., Schmidt-Kittler, O., Petronio, M., Polzer, B., Stoecklein, N. H. et al. (2002). Genetic Heterogeneity of Single Disseminated Tumour Cells in Minimal Residual Cancer. *The Lancet*, 360 (9334), 683–689. doi:10.1016/S0140-6736(02)09838-0
- Klein, C. A., Schmidt-Kittler, O., Schardt, J. A., Pantel, K., Speicher, M. R. & Riethmüller, G. (1999). Comparative Genomic Hybridization, Loss of Heterozygosity, and DNA Sequence Analysis of Single Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (8), 4494–4499. National Academy of Sciences. doi:10.1073/pnas.96.8.4494
- Klimberg, V. S. & Bland, K. I. (2018). In Situ Carcinomas of the Breast. *The Breast* (S. 130–144.e4). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-323-35955-9.00009-X
- Korourian, S. (2018). Infiltrating Carcinomas of the Breast. *The Breast* (S. 145–155.e4). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-323-35955-9.00010-6
- Kroneis, T. (Hrsg.). (2015). *Whole Genome Amplification: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology) (Band 1347). New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-1-4939-2990-0
- Liebens, F., Carly, B., Cusumano, P., Van Beveren, M., Beier, B., Fastrez, M. et al. (2009). Breast Cancer Seeding Associated with Core



- Needle Biopsies: A Systematic Review. *Maturitas*, 62 (2), 113–123. doi:10.1016/j.maturitas.2008.12.002
- Lin, C.-Y., Vennam, S., Purington, N., Lin, E., Varma, S., Han, S. et al. (2019). Genomic Landscape of Ductal Carcinoma in Situ and Association with Progression. *Breast Cancer Research and Treatment*, 178 (2), 307–316. doi:10.1007/s10549-019-05401-x
- Lopez-Garcia, M. A., Geyer, F. C., Lacroix-Triki, M., Marchió, C. & Reis-Filho, J. S. (2010). Breast Cancer Precursors Revisited: Molecular Features and Progression Pathways: Molecular Evolution of Breast Cancer. *Histopathology*, 57 (2), 171–192. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03568.x
- Martelotto, L. G., Baslan, T., Kendall, J., Geyer, F. C., Burke, K. A., Spraggon, L. et al. (2017). Whole-Genome Single-Cell Copy Number Profiling from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples. *Nature Medicine*, 23 (3), 376–385. doi:10.1038/nm.4279
- McGranahan, N. & Swanton, C. (2017). Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*, 168 (4), 613–628. doi:10.1016/j.cell.2017.01.018
- Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E. P., Shete, S., Naftalis, E. Z., Huth, J. F. et al. (2004). Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10 (24), 8152–8162. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1110
- Nagasawa, S., Kuze, Y., Maeda, I., Kojima, Y., Motoyoshi, A., Onishi, T. et al. (2021). Genomic Profiling Reveals Heterogeneous Populations of Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *Communications Biology*, 4 (1, 1), 1–13. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s42003-021-01959-9
- Narod, S. A., Iqbal, J., Giannakeas, V., Sopik, V. & Sun, P. (2015). Breast Cancer Mortality After a Diagnosis of Ductal Carcinoma In Situ. *JAMA Oncology*, 1 (7), 888. doi:10.1001/jamaoncol.2015.2510
- Narod, S. A. & Sopik, V. (2018). Is Invasion a Necessary Step for Metastases in Breast Cancer? *Breast Cancer Research and Treatment*, 169 (1), 9–23. doi:10.1007/s10549-017-4644-3
- Nguyen, B., Fong, C., Luthra, A., Smith, S. A., DiNatale, R. G., Nandakumar, S. et al. (2022). Genomic Characterization of Metastatic Patterns from Prospective Clinical Sequencing of 25,000 Patients. *Cell*, 185 (3), 563–575.e11. doi:10.1016/j.cell.2022.01.003
- Nik-Zainal, S., Van Loo, P., Wedge, D. C., Alexandrov, L. B., Greenman, C. D., Lau, K. W. et al. (2012). The Life History of 21 Breast Cancers. *Cell*, 149 (5), 994–1007. Elsevier. doi:10.1016/j.cell.2012.04.023
- Osako, T., Iwase, T., Kimura, K., Horii, R. & Akiyama, F. (2013). Detection of Occult Invasion in Ductal Carcinoma in Situ of the Breast with Sentinel Node Metastasis. *Cancer Science*, 104 (4), 453–457. doi:10.1111/cas.12095
- Page, D. L., Dupont, W. D., Rogers, L. W. & Rados, M. S. (1985). Atypical Hy-

- perplastic Lesions of the Female Breast. A Long-Term Follow-up Study. *Cancer*, 55 (11), 2698–2708. doi:10.1002/1097-0142(19850601)55:11<2698::AID-CNCR2820551127>3.0.CO;2-A
- Pantel, K. & Alix-Panabières, C. (2019). Liquid Biopsy and Minimal Residual Disease — Latest Advances and Implications for Cure. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16 (7), 409–424. doi:10.1038/s41571-019-0187-3
- Polyak, K. (2008). Is Breast Tumor Progression Really Linear? *Clinical Cancer Research*, 14 (2), 339–341. American Association for Cancer Research. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-2188
- Polzer, B., Medoro, G., Pasch, S., Fontana, F., Zorzino, L., Pestka, A. et al. (2014). Molecular Profiling of Single Circulating Tumor Cells with Diagnostic Intention. *EMBO Molecular Medicine*, 6 (11), 1371–1386. doi:10.15252/emmm.201404033
- R Core Team. (2021). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. manual, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Verfügbar unter: <https://www.R-project.org/>
- Rane, S. U., Mirza, H., Grigoriadis, A. & Pinder, S. E. (2015). Selection and Evolution in the Genomic Landscape of Copy Number Alterations in Ductal Carcinoma in Situ (DCIS) and Its Progression to Invasive Carcinoma of Ductal/No Special Type: A Meta-Analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 153 (1), 101–121. doi:10.1007/s10549-015-3509-x
- Robert-Koch-Institut. (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, 274.
- Roses, R. E., Arun, B. K., Lari, S. A., Mittendorf, E. A., Lucci, A., Hunt, K. K. et al. (2011). Ductal Carcinoma-In-Situ of the Breast with Subsequent Distant Metastasis and Death. *Annals of Surgical Oncology*, 18 (10), 2873–2878. doi:10.1245/s10434-011-1707-2
- Sänger, N., Effenberger, K. E., Riethdorf, S., Van Haasteren, V., Gauwerky, J., Wiegratz, I. et al. (2011). Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Patients with Ductal Carcinoma in Situ. *International Journal of Cancer*, 129 (10), 2522–2526. doi:10.1002/ijc.25895
- Savas, P., Teo, Z. L., Lefevre, C., Flensburg, C., Caramia, F., Alsop, K. et al. (2016). The Subclonal Architecture of Metastatic Breast Cancer: Results from a Prospective Community-Based Rapid Autopsy Program „CASCADE“. *PLOS Medicine*, 13 (12), e1002204. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.pmed.1002204
- Schlimok, G., Funke, I., Holzmann, B., Göttlinger, G., Schmidt, G., Häuser, H. et al. (1987). Micrometastatic Cancer Cells in Bone Marrow: In Vitro Detection with Anti-Cytokeratin and in Vivo Labeling with Anti-17-1A Monoclonal Antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84 (23), 8672–8676. National Academy of Sciences. doi:10.1073/pnas.84.23.8672
- Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M., Ahr, A., Blankenstein, T.

- J. F. et al. (2003). From Latent Disseminated Cells to Overt Metastasis: Genetic Analysis of Systemic Breast Cancer Progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (13), 7737–7742. doi:10.1073/pnas.1331931100
- Schmitt, M. W., Kennedy, S. R., Salk, J. J., Fox, E. J., Hiatt, J. B. & Loeb, L. A. (2012). Detection of Ultra-Rare Mutations by next-Generation Sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (36), 14508–14513. National Academy of Sciences. doi:10.1073/pnas.1208715109
- Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexander, J., Young, J., Lundin, P. et al. (2004). Large-Scale Copy Number Polymorphism in the Human Genome. *Science*, 305 (5683), 525–528. doi:10.1126/science.1098918
- Statistisches Bundesamt. (2019). Statistisches Jahrbuch 2019, 36.
- Uematsu, T. & Kasami, M. (2008). Risk of Needle Tract Seeding of Breast Cancer: Cytological Results Derived from Core Wash Material. *Breast Cancer Research and Treatment*, 110 (1), 51–55. doi:10.1007/s10549-007-9685-6
- Virnig, B. A., Tuttle, T. M., Shamliyan, T. & Kane, R. L. (2010). Ductal Carcinoma In Situ of the Breast: A Systematic Review of Incidence, Treatment, and Outcomes. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 102 (3), 170–178. doi:10.1093/jnci/djp482
- Wadsten, C., Garmo, H., Fredriksson, I., Sund, M. & Wärnberg, F. (2017). Risk of Death from Breast Cancer after Treatment for Ductal Carcinoma in Situ. *British Journal of Surgery*, 104 (11), 1506–1513. doi:10.1002/bjs.10589
- Wang, Y., Waters, J., Leung, M. L., Unruh, A., Roh, W., Shi, X. et al. (2014). Clonal Evolution in Breast Cancer Revealed by Single Nucleus Genome Sequencing. *Nature*, 512 (7513), 155–160. doi:10.1038/nature13600
- Weigelt, B. & Reis-Filho, J. S. (2009). Histological and Molecular Types of Breast Cancer: Is There a Unifying Taxonomy? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6 (12, 12), 718–730. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrclinonc.2009.166
- Wiechmann, L. & Kuerer, H. M. (2008). The Molecular Journey from Ductal Carcinoma in Situ to Invasive Breast Cancer. *Cancer*, 112 (10), 2130–2142. doi:10.1002/cncr.23430
- Xing, D., Tan, L., Chang, C.-H., Li, H. & Xie, X. S. (2021). Accurate SNV Detection in Single Cells by Transposon-Based Whole-Genome Amplification of Complementary Strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118 (8). National Academy of Sciences. doi:10.1073/pnas.2013106118
- Yates, L. R., Gerstung, M., Knappskog, S., Desmedt, C., Gundem, G., Van Loo, P. et al. (2015). Subclonal Diversification of Primary Breast Cancer Revealed by Multiregion Sequencing. *Nature Medicine*, 21 (7), 751–759. doi:10.1038/nm.3886
- Zetterlund, L., Stemme, S., Arrrup, H. & de Boniface, J. (2014). Incidence of and Risk Factors for Sentinel Lymph Node Metastasis in Patients with a Postoperative Diagnosis of Ductal Carcinoma in Situ. *British Journal of Surgery*, 101 (5), 488–494. doi:10.1002/bjs.9404

## 7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsfrauenklinik Tübingen und dem Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin in Regensburg unter Betreuung von Andreas Hartkopf und Christoph Klein durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte gemeinsam mit den oben genannten Betreuern. Sowohl die Erhebung als auch die Auswertung der klinischen Daten erfolgte eigenständig. Die Einzelzellgenomamplifizierung von Zellen aus FFPE Tumorblöcken, sowie aus DCIS DTZs und Normalzellen erfolgte durch mich. Aus diesen WGA Produkten erfolgte die eigenständige Generation von Sequenzierbibliotheken. Bibliotheken aus FFPE DCIS Blöcken, sowie aus DTZs und ZTZs der longitudinal charakterisierten Patientin erfolgten durch Manjusha Ghosh. Die Sequenzierung erfolgte durch Manjusha Ghosh. Die bioinformatische Auswertung wurde am Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin in Regensburg durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 30.06.2022

## **8. Veröffentlichungen**

Die Einzelzell CNV Profile aus FFPE-Blöcken wurden schon im Rahmen der Promotion von Manjusha Ghosh publiziert (Ghosh, 2020). Klinische Daten zu DTZ bei DCIS wurden mit anderer Dichotomisierung des DTZ-Status auf dem San Antonio Breast Cancer Symposium 2017 präsentiert.

## 9. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Andreas Hartkopf für die langjährige hervorragende Betreuung. Weiterhin danke ich Christoph Klein für die Ermöglichung des experimentellen Teils dieser Arbeit, Manjusha Ghosh für das Beibringen der experimentellen Grundlagen, die viele Geduld und das Hinwegsehen über die Anfängerfehler. Vielen Dank auch an Ute Hilcher und Sabine Hofmeister, ohne die das Projekt schon an der Logistik gescheitert wäre.

Zuletzt möchte ich meiner Frau und meinen Eltern danken, die mich in allen spannenden Phasen des Lebens unterstützen.