

Aus dem
Department für Frauengesundheit Tübingen
Universitäts-Frauenklinik

**Durchführbarkeit der PIK3CA-Mutationstestung in
disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark von
Brustkrebspatientinnen mittels mikrofluider Isolierung**

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

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

vorgelegt von

Grollmann, Hanne

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Y. Brucker
2. Berichterstatter: Professorin Dr. C. Wiechers

Tag der Disputation: 03.08.2026

Widmung

*Ich widme diese Arbeit allen Patient*innen, die von Brustkrebs betroffen sind
und dem Fortschritt im Bereich der Brustkrebstherapie.*

*Außerdem für meine Eltern Marlies und Stefan Grollmann
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.*

Hinweis zur Sprache

Zur besseren Lesbarkeit und im Sinne einer geschlechtergerechten Sprache wird in dieser Arbeit das Gendersternchen (z. B. Patient*innen) verwendet. Diese Schreibweise schließt alle Geschlechtsidentitäten ein. In Fällen, in denen eine genderneutrale Formulierung möglich und sinnvoll ist, wurde diese bevorzugt verwendet. Alle Personenbezeichnungen gelten – sofern nicht anders angegeben – gleichermaßen für alle Geschlechter.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2 Klinik und Diagnostik	3
1.1.3 Einteilung	3
1.1.4 Prognose	4
1.1.5 Therapiemöglichkeiten	5
1.1.6 Metastasierung	7
1.2 Tumorzell dissemination	8
1.2.1 Klinische Bedeutung und biologische Eigenschaften	9
1.3 Detektion von disseminierten Tumorzellen	11
1.3.1 Standardmethode zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen	11
1.3.2 Mikrofluide Methode zur Isolation von disseminierten Tumorzellen	13
1.3.3 Digitale Tröpfchen PCR	14
1.4 PIK3CA-Mutation	15
1.5 Problemstellung und Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Allgemeiner Versuchsplan	19
2.2 Material	20
2.2.1 Ethikvotum	20
2.2.2 Patient*innenkollektiv	20
2.2.3 Klinische Daten	21
2.2.4 Reagenzien	22
2.2.5 Geräte	23
2.2.6 Allgemeines Laborequipment	24

2.2.7	Zelllinien	24
2.3	Methoden	25
2.3.1	Grundlagen und Techniken	25
2.3.2	Standardmethode zur Detektion von disseminierten Tumorzellen	25
2.3.3	Knochenmarkpunktion und Aufbereitung des Knochenmarks	26
2.3.4	Kryokonservierung von Knochenmarkproben	26
2.3.5	Auftauverfahren von Knochenmarkproben	28
2.3.6	Mikrofluide Zellseparation	28
2.3.7	Vorversuche	30
2.3.8	Definieren des Tumorareals für die DNA-Isolation	30
2.3.9	Isolierung von DNA aus FFPE	31
2.3.10	Digital droplet PCR für die Detektion der PIK3CA hotspot mutation	31
2.3.11	Untersuchung der DTCs auf die PIK3CA-Mutation	32
2.3.12	Berechnung prozentualer Nachweisveränderungen bei variierenden PBMC- und MCF7-Zellzahlen	33
2.3.13	Bildverarbeitung	34
2.3.14	Statistik	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Beschreibung des Gesamtkollektivs	35
3.2	DTC Positivität	39
3.3	Nachweis von PIK3CA-Mutationen in Primärtumoren	42
3.4	Mikrofluidische Separation zur DTC-Isolierung	46
3.5	PIK3CA-Hotspot-Mutationsnachweis in MCF7- Spiking- Experimenten	48
3.6	Detektion der PIK3CA-Mutation im Primärtumor	50
3.7	Untersuchung der Knochenmarksproben von Brustkrebspatient*innen	52
3.8	Quantitative Analyse der zellulären Interferenz: Prozentuale Veränderungen der Nachweisraten bei variierenden PBMC- Konzentrationen	55
4	Diskussion	57
4.1	Bezugnahme auf initiale Fragestellungen	58
4.2	Interpretation und Diskussion einzelner Ergebnisse	59
4.3	Methodische Überlegungen	62

4.4	Limitationen der Arbeit	62
4.5	Schlussfolgerungen und Relevanz für die Klinik	63
4.6	Ausblick	63
5	Zusammenfassung	64
	Literaturverzeichnis	77
6	Danksagung	78
7	Erklärung zum Eigenanteil	79
8	Veröffentlichungen	81

Abbildungsverzeichnis

1	Mechanismus der Dissemination	8
2	Schema der Parsortix-Technologie	13
3	Darstellung des PIK3CA Signalweges	15
4	Kryokonservierung einer Knochenmarkprobe	27
5	Aufbau des Parsortix-Gerätes	29
6	Markierung des Tumorareals	31
7	Patientinnenselektion	35
8	Altersverteilung des Gesamtkollektives	37
9	Verteilung der Tumorgrößen nach pT-Klassifikation	38
10	Verteilung der Lymphknotenstatus nach pN-Klassifikation	38
11	DTC-Status nach klinisch-pathologischen Parametern	41
12	Verfahrensablauf von DNA-Isolation aus Primärtumoren und anschließender digitaler Tröpfchen-Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR)	42
13	PIK3CA-Mutationsstatus in Primärtumoren nach klinisch-pathologischen Parametern	45
14	Arbeitsablauf von Spiking-Experimenten mit Parsortix	46
15	Immunfluoreszenzbilder von geernteten Zellen nach Parsortix-Isolierung von DTCs aus Knochenmark	47
16	Verfahrensablauf von Spiking-Experimenten mit MCF7 Zellen, Parsortix Separation und anschließender digitaler Tröpfchen-Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR)	48
17	Verteilung von PIK3CA-Mutationen in primären Brusttumoren	51
18	Versuchsablauf der DNA-Isolation von Knochenmarksproben mittels Parsortix und ddPCR	53
19	Schematische Übersicht der Knochenmarksanalysen mittels Zellseparation und ddPCR	54

Tabellenverzeichnis

1	TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms	4
2	UICC-Stadieneinteilung des Mammakarzinoms	5
3	Klassifikation der Tumorzellen	12
4	Reagenzien und ihre Hersteller	22
5	Geräte und ihre Hersteller	23
6	Allgemeines Laborequipment und ihre Hersteller	24
7	Klinische Daten der Patient*innen	36
8	Kohortenmerkmale in Bezug auf DTC-Positivität	40
9	Kohortenmerkmale in Bezug auf PIK3CA-Positivität	44
10	Zusammenfassung definierter Kenngrößen im Spiking-Experiment nach Parsortix-basierter DTC-Isolierung	47
11	Nachweis der PIK3CA-Mutation (E545K - Exon 9) in der digitalen Tröpfchen-Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR)	49
12	Verteilung der PIK3CA Hotspot Mutationen	50
13	Geschätzte Anzahl an DTCs nach Parsortix-Anreicherung in Knochenmarkproben von PIK3CA-positiven Patient*innen	52
14	Ergebnisse der Nachweisgrenzen für die PIK3CA-Mutation mit unterschiedlicher Anzahl an PBMCs	55

Abkürzungsverzeichnis

Abb. Abbildung

AK Antikörper

ATCC *American Type Culture Collection*

BEO brusterhaltende Operation

BME *basement membrane extract*

BRCA *breast cancer gene*

bzw. beziehungsweise

BSA *bovine serum albumin*

CH Schweiz

CK Zytokeratin

CTCs zirkulierende Tumorzellen

DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol

DCIS ductales Carcinoma in situ

ddPCR digitale Tröpfchen-Polymerase-Kettenreaktion

DE Deutschland

DMEM *Dulbecco's modified Eagle medium*

DNA Desoxyribonukleinsäure

DTCs disseminierte Tumorzellen

EMT Epithel-Mesenchym-Transition

ER Östrogenrezeptor

FA fraktionelle Häufigkeit

FCS *Fetal calf serum*

FFPE *formaldehyde-fixed paraffin-embedded*

HE Hämatoxylin-Eosin

HER2 humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2

HR Hormonrezeptor

IHC Immunhistochemie

IKP Institut für klinische Pharmakologie

ILC invasiv-lobuläres Karzinom

LCIS lobuläres Carcinoma in situ

NGS Next-Generation-Sequencing

NST invasives Karzinom, nicht-spezifischer Typ

PBMC mononukleäre Blutzellen

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung

PI3K Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-Kinase

PIK3CA *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*

PR Progesteronrezeptor

RCCM *Recovery Cell Culture Freezing Medium*

RNA Ribonukleinsäure

SNB Sentinel-Lymphknotenbiopsie

Tab. Tabelle

UICC *Union for International Cancer Control*

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist ein bösartiger Tumor. Es entsteht durch unkontrolliertes Wachstum von Zellen der Brustdrüse, vorwiegend aus dem Epithel der Drüsengänge oder seltener aus den Milchgängen der terminalen ductulo-lobulären Einheit (Kellner et al., 2019).

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Mammakarzinom stellt die häufigste Krebserkrankung der Frau dar (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024). Die Inzidenz der malignen Tumorerkrankung variiert weltweit, mit höheren Raten in entwickelten Ländern im Vergleich zu Entwicklungsländern (Bray et al., 2024). 2022 wurden in Deutschland 74.500 Neuerkrankungen bei Frauen festgestellt (Robert Koch Institut, 2023). Zudem ist laut Robert Koch Institut das Mammakarzinom die häufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen der Frau (vgl. Erdmann 2021). Die Mortalität ist durch Früherkennungsprogramme und fortschrittlichere Therapien gesunken, hängt jedoch auch stark vom Erkrankungsstadium und individuellen Faktoren ab. In Ländern des globalen Südens ist die Mortalität bei Brustkrebs aufgrund begrenzter Ressourcen, mangelnder Früherkennung und verzögerter Behandlung deutlich höher (Akram et al., 2017).

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist weitgehend unbekannt. Es existieren sowohl exogene Einflüsse, wie Umweltfaktoren oder der Lebensstil, als auch endogene Faktoren, wie genetische oder hormonelle Einflüsse, die das Risiko zur Entstehung von Brustkrebs erhöhen (Weyerstahl and Stauber, 2013). Es wird eine multifaktorielle Pathogenese aus einer Kombination von genetischen Veränderungen und Umweltfaktoren postuliert (Akram et al., 2017).

Hormonelle Faktoren – darunter eine früh einsetzende Menarche und eine verspätete Menopause – sowie reproduktive Merkmale wie Kinderlosigkeit (Nulliparität) oder eine niedrige Parität erhöhen das Brustkrebsrisiko (Tao et al., 2015, Weyerstahl and Stauber, 2013). Auch Alkoholkonsum (Vegunta et al., 2020) und Nikotinkonsum (Catsburg et al., 2015) erhöhen die Wahrscheinlichkeit, an Brustkrebs zu erkranken. Das Krebsrisiko wird durch Adipositas, westliche Ernährung (Verzehr von verarbeiteten Lebensmitteln, hoher Anteil an gesättigten

Fettsäuren, hoher Fleischkonsum) und fettreiche Nahrung gesteigert (Vegunta et al., 2020). Ein fortgeschrittenes Alter stellt einen weiteren hohen Risikofaktor dar (Weyerstahl and Stauber, 2013). Am häufigsten tritt der maligne Tumor in der 6. und 7. Lebensdekade auf (Kellner et al., 2019).

Zudem spielen verschiedene hereditäre und molekulare Faktoren eine Rolle. Dazu zählen eine familiäre Häufung (Weyerstahl and Stauber, 2013), das Vorliegen dominanter *breast cancer gene* (BRCA)-1 und BRCA-2 Mutationen sowie epigenetische Mechanismen, wie etwa die Hypermethylierung des BRCA-1-Gens oder die Hochregulierung der Micro-RNA *miR-21* (Tao et al., 2015).

1.1.2 Klinik und Diagnostik

Die pathologische Einteilung des Mammakarzinoms erfolgt in invasive und nicht-invasive Karzinome, letztere als ductales Carcinoma in situ (DCIS) und lobuläres Carcinoma in situ (LCIS) unterteilt (Kellner et al., 2019). Das invasive Karzinom, nicht-spezzieller Typ (NST) ist der häufigste invasive Typ der malignen Tumorerkrankung, das invasiv-lobuläre Karzinom (ILC) folgt als zweithäufigstes. Weitere, seltenere Formen sind histologisch unterscheidbare medulläre, tubuläre, muzinöse, papilläre und neuroendokrine Tumoren.

Als häufigstes Hauptsymptom gilt der derbe, palpierbare Knoten. Durch bildgebenden Verfahren, wie Sonographie, Mammographie und Kernspintomographie können bereits frühe invasive und nicht invasive Karzinome vor Auftreten klinischer Symptome erkannt und diagnostiziert werden. Gleichzeitig mit der Einführung des Mammakarzinom-Screenings wurde ein Rückgang der Mortalität in Europa festgestellt (Broeders et al., 2012). In Deutschland wird Frauen zwischen dem 50. und 75. Lebensjahr die Teilnahme am Mammographie-Screening empfohlen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

Die Diagnose kann auf der Grundlage der bildgebenden Verfahren und der klinischen Symptomatik vermutet werden und wird daraufhin über eine Gewebeentnahme (Biopsie) histopathologisch gesichert.

1.1.3 Einteilung

Basierend auf der Expression verschiedener Marker unterteilt man anhand der Sankt Gallen Klassifikation in molekulare Subtypen von Brustkrebs: Luminal A, Luminal B, humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2)-Typ und Basal-Typ (Triple-negativ) (Perou et al., 2000). Diese Subtypen werden durch die Expression bestimmter Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Tumorzelle, wie Hormonrezeptoren, und durch wachstumsfördernde Gene, charakterisiert. Sie beeinflussen die Lymphknotenbeteiligung und weisen spezifische Rückfallmuster auf, z.B. die höhere Wahrscheinlichkeit von viszerale Metastasen beim Basal- und HER2-Typ (Vasconcelos et al., 2016).

Das Mammakarzinom wird pathologisch nach TNM eingestuft (siehe Tabelle (Tab.) 1),

wobei "T" für die Größe des Primärtumors beziehungsweise Infiltration gewisser Strukturen wie Haut/Mamille/Thorax), "N" für Anzahl der befallenen Lymphknoten in der Axilla und "M" für das Vorhandensein von Fernmetastasen steht (Brierley et al., 2017). Auf Basis dieser Einstufung erfolgt die Einteilung in die *Union for International Cancer Control* (UICC)-Stadien 0-IV (Tab. 2).

Tab. 1: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms.

Kategorie	Beschreibung
T0	Kein Nachweis eines Primärtumors
T1	Tumor ≤ 2 cm
T2	Tumor > 2 cm und ≤ 5 cm
T3	Tumor > 5 cm
T4	Infiltration von Haut, Mamille oder Thoraxwand
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in beweglichen ipsilateralen Lymphknoten
N2	Metastasen in fixierten ipsilateralen Lymphknoten
N3	Metastasen in infra- oder supraklavikulären Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen nachweisbar

1.1.4 Prognose

Die Prognose ist von verschiedenen Faktoren abhängig, einschließlich der histopathologischen Differenzierung (*Grading*), der Ausdehnung und Größe des Tumors und des Lymphknotenbefalls (*Staging*) und dem allgemeinen Gesundheitszustand der Patient*innen (Kellner et al., 2019). Im UICC-Stadium I beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate nahezu 100%, während sie im UICC-Stadium IV deutlich geringer ausfällt (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

Tab. 2: UICC-Stadieneinteilung des Mammakarzinoms.

Stadium	TNM-Klassifikation
0	Tis N0 M0
I	T1 N0 M0
IIA	T0/1 N1 M0 oder T2 N0 M0
IIB	T2 N1 M0 oder T3 N0 M0
IIIA	T0/1/2 N2 M0 oder T3 N1/2 M0
IIIB	T4 N beliebig M0
IIIC	Beliebiges T, N3, M0
IV	Beliebiges T, beliebiges N, M1

1.1.5 Therapiemöglichkeiten

Die multimodale, interdisziplinäre Therapie des Mammakarzinoms berücksichtigt die Ausdehnung der Erkrankung, die biologische Charakterisierung des Tumors sowie personenspezifischen Faktoren. Die Therapieoptionen umfassen je nach Stadium die chirurgische Resektion, Strahlentherapie und systemische Behandlungen. Systemische Therapie umfasst z.B. Chemotherapie, endokrine Therapie (Antihormontherapie) und zielgerichtete sowie immunbasierte Ansätze. Die Entscheidung für eine spezifische Therapie erfolgt individuell und wird je nach Tumorcharakteristika und dem individuellen Risikoprofil getroffen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

Die operative Therapie gilt als Basis der Behandlung für alle nicht metastasierten (M0) Mammakarzinome. Chirurgische Optionen reichen von der brusterhaltenden Operation (BEO) bis zur Mastektomie, wobei eine sofortige oder sekundäre Brustrekonstruktion erwogen werden kann. Zur Beurteilung des axillären Befalls wird die Sentinel-Lymphknotenbiopsie (SNB) in den meisten Fällen durchgeführt, die weniger Risiken für Folgeschäden, wie z.B. ein Lymphödem, als eine vollständige Lymphknotenentfernung zeigt (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

Die Strahlentherapie erfolgt postoperativ, insbesondere nach einer brusterhaltenden Operation (BEO), um das Risiko eines Rezidivs zu minimieren (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

Auch nach einer Mastektomie kann sie bei Vorliegen bestimmter Risikofaktoren indiziert sein.

Die systemische Therapie umfasst verschiedene Ansätze, die individuell je nach Tumorbiologie gewählt werden. Eine endokrine Therapie wird bei Expression von Hormonrezeptoren eingesetzt und erfolgt mittels Tamoxifen, Aromatasehemmern und bzw. oder GnRH-Analoga (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024). Der HER2-Status entscheidet über den Einsatz einer zielgerichteten Anti-HER2-Therapie mit Trastuzumab, Pertuzumab oder neueren Substanzen. Chemotherapie wird bei HER2-positiven, triple-negativen oder aggressiven luminalen Tumoren mit hohem Rezidivrisiko (z.B. hohes Ki-67 (Proliferationsmarker), G3 (Grading, schlechte Differenzierung), junges Alter, Lymphknotenbefall) erwogen. (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024). Die St.-Gallen-Konsensuskonferenz empfiehlt einen risikoadaptierten Einsatz systemischer Therapien mit zurückhaltenderer Behandlung bei Niedrigrisiko-Konstellationen und Therapieintensivierung bei Hochrisiko-Tumoren, insbesondere bei triple-negativem oder biologisch ungünstigem lumbalem Karzinom. Für HER2-positive und triple-negative Tumoren im Stadium II–III wird bevorzugt eine neoadjuvante systemische Therapie eingesetzt, um das Ansprechen zu beurteilen und eine mögliche postneoadjuvante Therapieanpassung zu ermöglichen (Burstein et al., 2025).

Neben klassischen Chemotherapeutika kommen zunehmend zielgerichtete Therapien wie CDK4/6-Inhibitoren, PARP-Inhibitoren und Immuncheckpoint-Inhibitoren zum Einsatz. Diese individualisierten Therapieansätze können insbesondere in fortgeschrittenen Stadien das Tumorwachstum hemmen und die Prognose verbessern (Schmid et al., 2020, Geyer et al., 2022, Johnston et al., 2026).

Im metastasierten Stadium UICC-Stadium IV steht die palliative Therapie im Vordergrund, primär durch systemische Ansätze. In einigen Fällen kann auch eine palliative Operation erwogen werden, um Symptome zu lindern oder Komplikationen zu vermeiden (Moo et al., 2018). Eine frühe Diagnose und individuelle Therapieansätze können unter Umständen durch ein geringeres Toxizitätsprofil, als bei klassischen zytostatischen Therapien, die Lebenserwartung und die Lebensqualität betroffener Patient*innen steigern und das Fortschreiten der Erkrankung verzögern (McDonald et al., 2016).

Die Therapie des Mammakarzinoms erfordert eine individuelle, leitliniengerechte Planung unter Berücksichtigung der neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse und personenspezifischer Faktoren (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

1.1.6 Metastasierung

Die Metastasierung des Brustkrebses kann sowohl lymphogen als auch hämatogen erfolgen. Lymphogene Metastasierung in die axillären Lymphknoten stellt einen wichtigen Prognose- und Therapiefaktor dar (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

Bei der hämatogenen Fernmetastasierung gelangen Tumorzellen über die Blutbahn in entfernte Organe wie Skelettsystem, Lunge, Leber, Gehirn oder Pleura. Diese Fernmetastasen sind in der Regel makroskopisch sichtbar und mit Symptomen assoziiert.

Mikrometastasen hingegen verursachen meist keine klinischen Symptome und finden sich häufig im Knochenmark oder in einzelnen Lymphknoten bzw. in der Blutbahn (Diel et al., 1990). Sie können als zirkulierende Tumorzellen (CTCs) oder disseminierte Tumorzellen (DTCs) detektiert werden und gelten als potenzielle Quelle für spätere Makro-Metastasierung (Hartkopf et al., 2014).

1.2 Tumorzelldissemination

Schon Schlimok et al. (1987) sprachen von frühen Mikrometastasen und disseminierte Tumorzellen (DTCs). Unter hämatogener Tumorzelldissemination wird das Vorhandensein isolierter Tumorzellen in tumorfernen Körperkompartimenten oder in der Blutbahn verstanden. Tumorzelldissemination ist am Prozess der Metastasierung in Form der Invasion-Metastasierung-Kaskade beteiligt und geht in Form von DTCs und zirkulierende Tumorzellen (CTCs) mit erhöhtem Risiko zur Fernmetastasierung einher (Diel et al., 1990, Valastyan and Weinberg, 2011). Die mangelhafte Eradikation von verbleibenden Tumorzellen in Form von DTCs oder CTCs durch systemische Therapien ist eine Herausforderung im klinischen Management (Chemi et al., 2021). Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass bei Detektion des Primärtumors bereits bei der Mehrheit aller malignen Tumore eine Tumorzelldissemination stattgefunden hat (Friberg and Nystrom, 2015). Diese zunächst solitär vorliegenden Zellen können sich trotz makroskopischer Tumorfreiheit und abgeschlossener Therapie nach langer asymptomatischer Phase zu Metastasen entwickeln (Fehm et al., 2012). In Abbildung (Abb.) 1 ist der Prozess der Dissemination schematisch aufgezeigt.

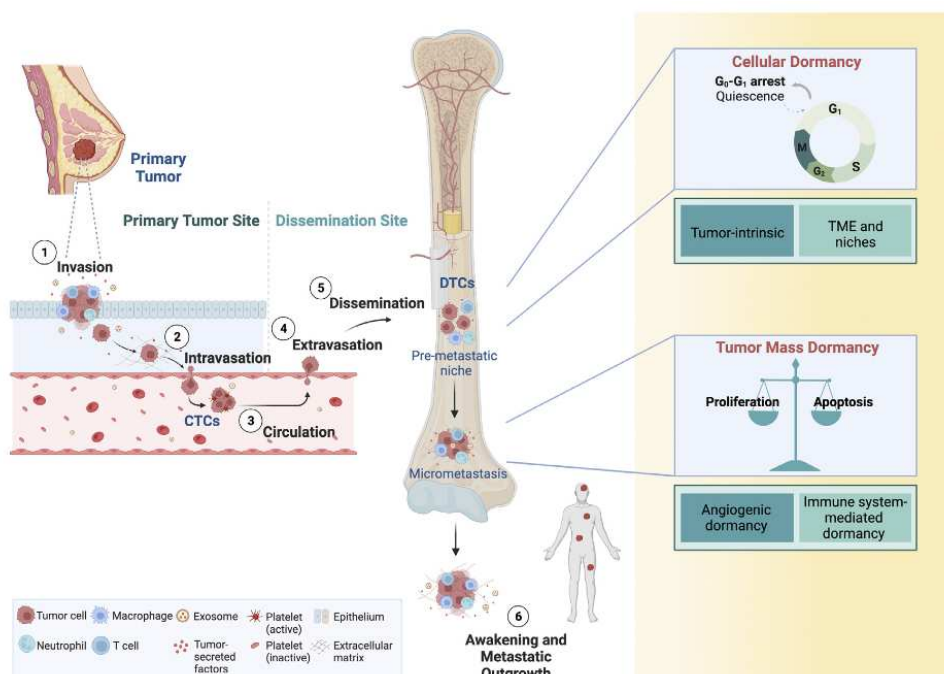


Abb. 1: Mechanismus der Dissemination (Ring et al., 2022).

1.2.1 Klinische Bedeutung und biologische Eigenschaften

DTCs beeinflussen die Prognose von Patient*innen mit Mammakarzinom. Das Vorhandensein von Tumorzellen im Knochenmark gilt als prognostischer Marker und ist mit einer geringeren Überlebensrate assoziiert (Wiedswang et al., 2003, Hartkopf et al., 2021a). Bei circa 30% aller Brustkrebspatient*innen liegen DTCs vor und sie können in allen UICC-Stadien vorliegen (Riethdorf and Pantel, 2008, Fehm et al., 2012). Sie sind mit höherem Tumorstadium, schlechterer Differenzierung, und Lymphknoten-Metastasierung assoziiert (Riethdorf and Pantel, 2008, Braun et al., 2005). Außerdem sind DTCs prädiktiv für das Auftreten von Fernmetastasen (Ring et al., 2022).

DTCs können als Einzelzellen oder als oligoklonale Zellkluster, also in kleinen Gruppen von wenigen, häufig genetisch verwandten Zellen, vorliegen (Ring et al., 2022). DTCs sind rar, es finden sich meist nur 10-20 Zellen auf Millionen Knochenmarkszellen ($1/10^6$). Zudem besitzen DTCs Stammzeleigenschaften ($CD44+/CD24-/low$) (Riethdorf and Pantel, 2008). Sie gehen aus CTCs hervor, die über die Blutbahn in verschiedene Organe und Gewebe gelangen und sich dort nach Ansiedlung zu DTCs entwickeln.

DTCs breiten sich hauptsächlich ins Knochenmark, teilweise aber auch in Leber, Lunge und ins Gehirn aus (Phan and Croucher, 2020). CTCs und DTCs verfügen durch ihre Stammzeleigenschaften über eine phänotypische Plastizität und Anpassungsfähigkeit, was bedeutet, dass sie ihre Eigenschaften nach Umgebungsbedingungen verändern können (Ring et al., 2022). CTCs und DTCs unterscheiden sich jedoch in der Lokalisation, sowie hinsichtlich der Zugänglichkeit, der Frequenz der Detektion, der Halbwertszeit und der zellulären Komposition (Ring et al., 2022). DTCs werden meist durch eine invasive Knochenmarkpunktion gewonnen, während CTCs im peripheren Blut bestimmt werden (Ring et al., 2022).

Eine Eigenschaft, die DTCs aufweisen können, ist der sogenannte Dormancy-Status: Einzelne Zellen treten in einen reversiblen, temporären Zellzyklusarrest (Phan and Croucher, 2020). Dieser wird von Phan and Croucher (2020) auch als *Quiescence* bezeichnet. In diesem Zustand sind die Zellen inaktiv und schwer zu detektieren, und somit auch für das Immunsystem oder für Therapien, wie beispielsweise adjuvanter Chemotherapie nicht zugänglich (Walter et al., 2018). DTCs können also auch nach neoadjuvanter Chemotherapie

nachgewiesen werden (Volmer et al., 2023). Es gibt Hinweise darauf, dass Makrophagen im Primärtumor bereits bei DTCs die Fähigkeit zur Dissemination sowie den Übergang in den Dormancy-Status induzieren können (Borriello et al., 2022).

Mehrere Studien zeigen, dass DTCs genomisch instabil und heterogen sind. Zudem können genetische Diskrepanzen zwischen Primärtumor und DTCs auftreten (Ring et al., 2022, Schmidt-Kittler et al., 2003, Aguirre-Ghiso, 2007). Es wurde festgestellt, dass sowohl CTCs als auch DTCs im Vergleich zum Primärtumor unterschiedliche biologische Profile aufweisen (Magbanua et al., 2018) und sogar die Expression einiger Epitope verlieren können. Dies ist insbesondere im Zusammenhang mit der Epithel-Mesenchym-Transition (EMT) relevant, einem Prozess, der signifikante Veränderungen in den Zelloberflächenmarkern bewirkt. Im Rahmen der EMT kann es zu einer Herunterregulierung oder zum Verlust epithelialer Epitope und gleichzeitig zu einer verstärkten Expression mesenchymaler Marker kommen (Alix-Panabières et al., 2017).

1.3 Detektion von disseminierten Tumorzellen

1.3.1 Standardmethode zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden zum Nachweis von DTCs im Knochenmark (Fehm et al., 2006). Derzeit wird bei der primären Brustkrebsoperation Knochenmark entnommen, und DTCs werden mit immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen, die auf epitheliale Marker wie EpCAM oder Zytokeratin (CK) abzielen.

Die Knochenmark-Aufbereitung hierfür beruht auf einer Dichtegradient-Zentrifugation z.B. durch Ficoll zur Isolierung von mononukleären Zellen. Nach der Isolierung dieser mononukleärer Zellen werden Zytospins hergestellt. Die Probe, die untersucht werden soll, wird zunächst auf einem Objektträger fixiert und dann mit einem Primärantikörper behandelt. Der primäre Antikörper (AK) bindet an die Zielproteine auf den Oberflächen der Tumorzellen. Anschließend wird ein sekundärer AK verwendet, der an den Primärantikörper gebunden ist und einen Farbstoff trägt. Durch die Verwendung eines sekundären AK wird die spezifische Bindung des primären AK an die Zielproteine visualisiert. Dieses Detektionssystem beinhaltet die Bindung eines bestimmten Antigens durch die Affinität des AK zum passenden Epitop (spezifisches Zell-Oberflächenantigen). Als einer der am häufigsten verwendeten Marker gilt CK. Andere Anreicherungsmethoden basieren ebenfalls auf AK, z. B. EpCAM und HER2 (Schindlbeck et al., 2016, Cackowski et al., 2019).

Die Positivität einer Knochenmark-Probe wird definiert durch mindestens eine CK-positiven Zelle mit abnormer Morphologie auf $3,0 \times 10^6$ Zellen. Die CK-Klassifikation bezieht sich auf die Anzahl der Tumorzellen, die in einer Probe nachgewiesen werden (siehe Tab. 3). Die Knochenmark-Proben werden nach Anzahl der CK-positiven Zellen klassifiziert: Knochenmark-Proben, die nur wenige CK-positiven Zellen aufweisen, werden als CK1+, Proben, die eine moderate Anzahl von CK-positiven Zellen aufweisen, als CK2+, und Proben, die eine hohe Anzahl von CK-positiven Zellen aufweisen, als CK3+ beschrieben (Fehm et al., 2006).

Tab. 3: Klassifikation der Tumorzellen.

Klassifikation	Tumorzellen pro $3,0 \times 10^6$ Zellen
CK 1+	1–3
CK 2+	4–7
CK 3+	8–10

Trotz der weiten Verbreitung der Standardmethode gibt es mehrere Herausforderungen und Einschränkungen. DTCs können eine erhebliche phänotypische Variabilität aufweisen, nicht alle Tumorzellen exprimieren beispielsweise die gleichen Marker in gleicher Intensität. Außerdem kann ein Markerverlust durch EMT stattfinden. Niedrige oder gar keine Expression der Zielantigene können zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Die Genauigkeit der IHC hängt weiterhin von der Qualität und Spezifität der AK ab. Beispielsweise kann eine geringe Affinität des AK zu einer unzureichenden Detektion und zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Zudem ist eine weitere potentielle Fehlerquelle die subjektive Interpretation durch die mikroskopische Beurteilung, welche eine Variabilität in den Ergebnissen zur Folge hat.

Die Herausforderungen bei der Isolierung, Identifizierung und Analyse von DTCs, bedingt durch deren Heterogenität und die geringe Zellzahl, werden durch Geräte wie Parsortix® gezielt angegangen. Diese nutzen mikrofluidische Filtration, um eine epitopunabhängige Anreicherung und Isolierung von CTCs sowie lebensfähigen DTCs zu ermöglichen.

1.3.2 Mikrofluide Methode zur Isolation von disseminierten Tumorzellen

Parsortix[®] bezeichnet eine mikrofluide Technologie, mit der Tumorzellen aus Flüssigkeiten (meist Blutproben) isoliert werden können. Sie wurde ursprünglich für den Abfang von CTCs basierend auf Zellgröße, Verformbarkeit und Kompressionsfähigkeit entwickelt und verwendet (Miller et al., 2018, Chemi et al., 2021). Mittels des Parsortix[®]-Systems werden hochangereicherte, lebensfähige Zellen isoliert, die für sekundäre Analysen zugänglich sind (Miller et al., 2018). Das System funktioniert semiautomatisch und computerkontrolliert. Es kommen keine AK zum Einsatz, stattdessen nutzt das Gerät physikalische Zelleigenschaften und arbeitet somit epitopenabhängig. Das Probenmaterial wird durch innere Flusskanäle geschleust. Zur Zellseparation wird eine spezielle Kassette verwendet, in der durch eine schlingenförmige Struktur eine finale kritische Lücke von $6,5\ \mu\text{m}$ entsteht, in der die Zellen aufgefangen werden. Die Schlingenform sorgt für mehr Streckenlänge, die Flussrichtung verläuft uni-direktional (siehe Abb. 2).

In einer Studie unserer Arbeitsgruppe wurde die Isolierung von DTCs mit Parsortix[®] validiert, wobei deutlich mehr Zellen gewonnen wurden, als bei der immunhistochemischen Standardmethode (Volmer et al., 2023). Dies erhöht die analytische Kapazität, da eine größere Anzahl von Zellen für weiterführende Untersuchungen verfügbar ist.

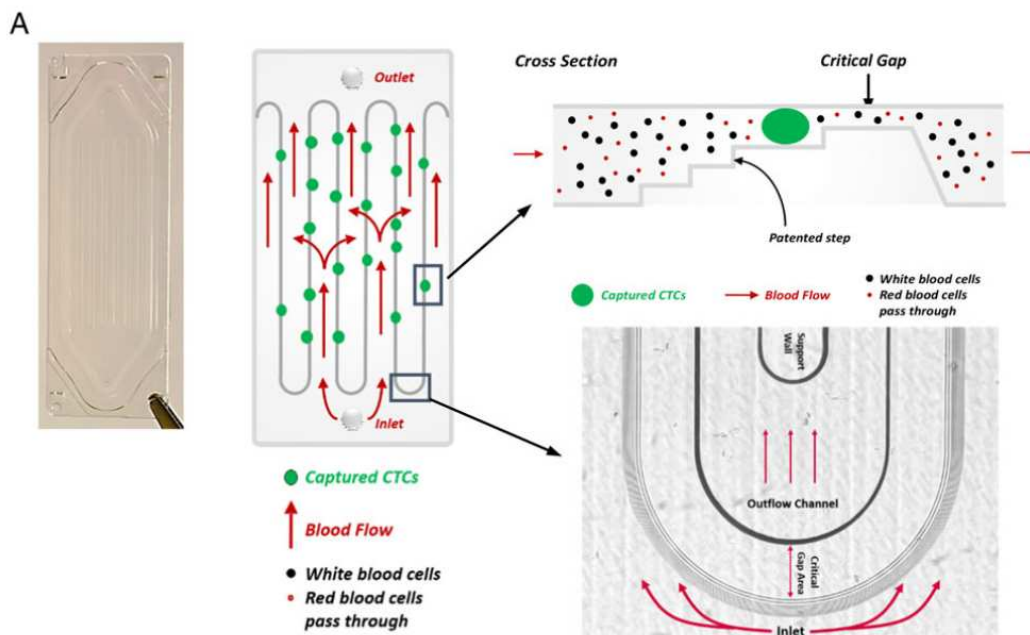


Abb. 2: Schema der Parsortix-Technologie (Miller et al., 2018).

1.3.3 Digitale Tröpfchen PCR

Die digitale Tröpfchen-Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR) stellt eine Wasser-Öl-Tröpfchen-Technologie dar. Die Probe wird dabei in 20.000 Tröpfchen geteilt und in jedem Tröpfchen wird die Desoxyribonukleinsäure (DNA) einzeln amplifiziert. Dies sorgt dafür, dass eine absolute DNA-Quantifizierung stattfindet und ein Amplifikationsbias verringert wird. Außerdem eignet sich die Methode besonders zur Analyse geringer Zellzahlen oder begrenzter Probenmengen, wie sie beispielsweise bei DTCs vorliegen, da sie eine hochsensitive und quantitative Detektion einzelner Zielsequenzen ermöglicht (Postel et al., 2018, Luthra et al., 2016).

1.4 PIK3CA-Mutation

Die *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha* (PIK3CA)-Mutation tritt bei verschiedenen Krebsarten auf, z.B. bei Brustkrebs, Endometriumkarzinom oder Lungenkrebs (Madsen et al., 2018). Beim Mammakarzinom kommt es bei ca. 30 % der Erkrankten mit hormonrezeptorpositiven, HER2-negativen Tumoren zur PIK3CA-Mutation (Mosele et al., 2020). Die genetische Veränderung tritt im PIK3CA-Gen auf und führt zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-Kinase (PI3K) (Gonzalez-Angulo et al., 2011). Es kommt zur unkontrollierten Signalweiterleitung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges, wodurch zentrale zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Zellwachstum und Überlebenssignale verstärkt werden (Reinhardt et al., 2022). Dies kann zu einer gesteigerten Tumorzellproliferation, Apoptoseresistenz, sowie erhöhter Angiogenese führen, wodurch das Tumorwachstum begünstigt und die Tumorprogression gefördert wird (Madsen et al., 2018). Zudem kann die Aktivierung des Signalwegs eine Resistenz gegenüber bestimmten Krebstherapien, insbesondere endokrinen Therapien, begünstigen (Nunnery and Mayer, 2020).

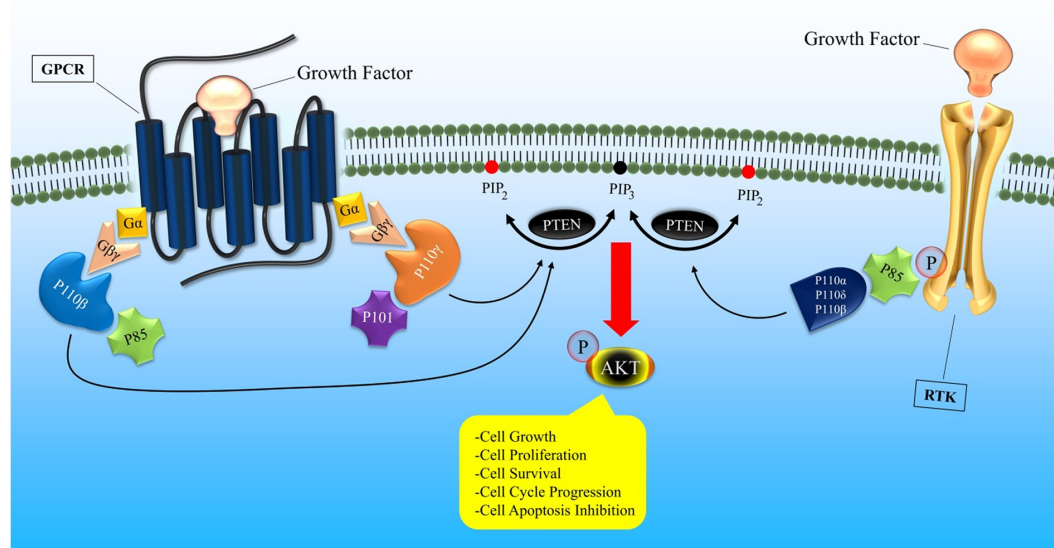


Abb. 3: Darstellung des PIK3CA Signalweges (Miricescu et al., 2020).

Es gibt verschiedene Arten der PIK3CA-Mutation. Am häufigsten treten die Hotspotmutationen in Exon 9 und Exon 20 auf (Martínez-Sáez et al., 2020). Die Mutationsanalyse der PIK3CA-Mutation kann unter anderem mittels DNA-Sequenzierung aus frischem oder konserviertem Tumorgewebe direkt bestimmt werden, beispielsweise aus Paraffinmaterial.

Hierbei lassen sich relevante Bereiche der onkogenen Mutation amplifizieren und analysieren (Lambert et al., 2019).

Bei metastasierten Mammakarzinomen mit positiven Hormonrezeptor (HR) und HER2-negativem bzw. -low Status können als zielgerichtete Therapien bei PIK3CA-Mutation Alpelisib, Capivasertib und Inavolisib eingesetzt werden (Fusco et al., 2021, Turner et al., 2023). Die Veränderung des PIK3CA-Status zwischen Primärtumor und Metastasen könnte von therapeutischer Bedeutung sein, da sie Auswirkungen auf die Behandlungsstrategie haben kann (Dupont Jensen et al., 2011, Thulin et al., 2021).

Studien haben genetische Diskrepanzen zwischen CTCs, DTCs und Metastasen identifiziert, was auf eine ausgeprägte Heterogenität von Tumorzellen hinweist (Ring et al., 2022, Schmidt-Kittler et al., 2003, Aguirre-Ghiso, 2007).

Es gibt zudem Hinweise dafür, dass sich die genotypische Heterogenität im Laufe der Zeit ändern kann. In einer Langzeituntersuchung wurde eine Mutationsdiskordanz festgestellt, die sich über verschiedene Zeitpunkte hinweg veränderte. Besonders bemerkenswert war jedoch die Stabilität einer PIK3CA-Mutation in DTCs, die trotz phänotypischer Veränderungen über 21 Tage in der Zellkultur erhalten blieb. Diese Ergebnisse unterstreichen die komplexe Anpassungsfähigkeit von Tumorzellen und verdeutlichen die Herausforderungen für eine zielgerichtete Therapie (Deng et al., 2014).

1.5 Problemstellung und Zielsetzung

Die Metastasierung einzelner Tumorzellen stellt einen entscheidenden Schritt in der Krebsprogression dar und gilt als ein wesentlicher prognostischer Faktor beim Mammakarzinom. DTCs im Knochenmark werden derzeit überwiegend mithilfe immunhistochemischer Methoden nachgewiesen, wobei spezifische Epitope zur Identifikation der Zellen genutzt werden. Da diese Verfahren jedoch auf der Expression definierter Antikörper basieren, können Zellen mit geringer oder fehlender Antigenexpression nur unzureichend detektiert werden. Dies kann zu einer Unterdiagnose führen und limitiert darüber hinaus die Möglichkeit einer molekularen Charakterisierung von DTCs, insbesondere im Hinblick auf relevante genetische Alterationen wie PIK3CA-Mutationen.

Zur Verbesserung der Detektionsrate und zur Erweiterung der analytischen Möglichkeiten bedarf es daher sensitiver, epitopunabhängiger Methoden zur Anreicherung und Isolierung von DTCs. Hier setzt die Parsortix®-Technologie an: durch mechanische Filtration ermöglicht das System eine selektive Anreicherung lebensfähiger DTCs anhand physikalischer Zellmerkmale wie Größe und Deformierbarkeit. Neben einer verbesserten Detektion eröffnet diese Methode die Möglichkeit einer weiterführenden molekulargenetischen Analyse isolierter DTCs, einschließlich der Untersuchung von Mutationen im PIK3CA-Gen.

Da Mutationen im PIK3CA-Gen von klinischer Relevanz sind und als potenzielle therapeutische Zielstrukturen gelten, wurde diese genetische Alteration für die vorliegende Arbeit ausgewählt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Durchführbarkeit und Effizienz der Parsortix®-Technologie zur Isolation von DTCs aus kryokonservierten Knochenmarkproben zu untersuchen und die isolierten Zellen gezielt auf das Vorliegen von PIK3CA-Mutationen zu analysieren. Durch die Kombination der Parsortix®-Technologie mit der digitalen Tröpfchen-Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR) soll eine Methode etabliert werden, die eine präzise molekulargenetische Charakterisierung von DTCs sowie einen Abgleich mit dem genetischen Profil des Primärtumors ermöglicht und sich potenziell für die Anwendung in der klinischen Routine eignet.

Die zentralen Fragestellungen der Arbeit umfassen:

1. **Durchführbarkeit der mikrofluiden Zellisolierung** – insbesondere hinsichtlich der epitopunabhängigen Anreicherung und Detektionsrate von DTCs.
2. **Untersuchung des PIK3CA-Mutationsstatus in Primärtumoren einer Patient*innen-Kohorte** – um die Häufigkeit und Relevanz der Mutation im Kontext der DTC-Analyse zu bestimmen
3. **Analyse des PIK3CA-Mutationsstatus in DTCs von PIK3CA-positiven Primärtumoren** – zur Untersuchung der molekularen Übereinstimmung zwischen Primärtumor und DTCs.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeiner Versuchsplan

Zunächst wurden Vorexperimente durchgeführt, um die Funktionsfähigkeit des Parsortix-Gerätes hinsichtlich der Separation von DTCs sowie dessen Handhabung zu testen.

Für den Hauptversuch wurden initial Knochenmarkproben entnommen und unter sterilen Bedingungen (unter einer *Bench*) weiterverarbeitet und kryokonserviert. Sobald die pathologischen Daten des Primärtumors vorlagen, wurde eine retrospektive Analyse durchgeführt, um die Risikokonstellation für das Vorliegen einer PIK3CA-Mutation zu bewerten.

Die IHC stellt die Standardmethode zur Detektion von DTCs dar, mit deren Hilfe der DTC-Status evaluiert wurde. Um eine gezielte Anreicherung der DTCs zu erreichen, wurde das mikrofluidische Separationssystem Parsortix verwendet.

Für die nachfolgende molekulare Charakterisierung wurde die ddPCR als Methode eingesetzt, da sie eine hochsensitive und quantitative Analyse von Mutationen ermöglicht. Zunächst erfolgte die phänotypische Analyse der Primärtumore auf das Vorhandensein der PIK3CA-Mutation. Anschließend erfolgte die Untersuchung der mittels Parsortix isolierten und angereicherten DTCs auf das Vorliegen derselben Mutation mittels ddPCR.

2.2 Material

2.2.1 Ethikvotum

Für die Studie wurde ein Ethikvotum von der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen erteilt. Die Projektnummern lauten 528/2019BO2 und 040/2023BO2. Es wurden alle relevanten ethischen Vorschriften für die Forschung mit menschlichen Teilnehmern eingehalten.

2.2.2 Patient*innenkollektiv

Die Knochenmarkproben von Patient*innen stammen aus der Universitätsfrauenklinik Tübingen und wurden im Rahmen des operativen Primäreingriffs bei der Diagnose Mammakarzinom entnommen. Die Verarbeitung der Patient*innen-Proben erfolgte unter strikter Anonymisierung, um die Einhaltung aller datenschutzrechtlichen Vorgaben sicherzustellen. Die Patient*innen wurden vorab aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur wissenschaftlichen Verwendung ihrer Knochenmarkproben.

Einschlusskriterien: In diese Studie wurden volljährige Patient*innen, die ein erhöhtes klinisches Risiko für eine PIK3CA-Mutation beim Mammakarzinom aufwiesen, eingeschlossen. Die spezifischen Kriterien waren:

- Diagnose: Mammakarzinom
- Stadium: cM0 (keine Fernmetastasierung)
- Hormonrezeptorpositivität (Östrogenrezeptor (ER), Progesteronrezeptor (PR) +)
- HER2-negativer Status (IHC 0/1+, ggf. 2+, FISH negativ)
- Keine neoadjuvante Therapie
- Vorliegendes kryokonserviertes Knochenmark

Ausschlusskriterien: Patient*innen wurden von der Studie ausgeschlossen, wenn sie eine oder mehrere der folgenden Bedingungen erfüllten:

- Alter unter 18 Jahren
- Fehlen einer Einverständniserklärung zur wissenschaftlichen Nutzung der Proben
- Vorhandensein einer Fernmetastasierung (cM1) bei Primäroperation

- HER2-positiver Status (IHC, FISH)
- Durchführung einer neoadjuvanten Therapie
- Fehlendes oder unzureichend konserviertes Knochenmark

2.2.3 Klinische Daten

Folgende klinische Daten wurden pseudonymisiert mithilfe des in der Universitätsklinik Tübingen etablierten Softwareprogrammes SAP erhoben:

- Alter zum Zeitpunkt der Knochenmarkbiopsie
- Datum der Primäroperation
- klinisches und pathologisches TNM-Stadium
- HER2-Status
- Hormonrezeptorstatus

2.2.4 Reagenzien

Tab. 4: Reagenzien und ihre Hersteller.

Chemikalie	Hersteller, Ort
<i>basement membrane extract</i> (BME)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>bovine serum albumin</i> (BSA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Deconmatic	Parsortix, Angle North America, Philadelphia, USA
<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DNAse I, 10 mg/mL	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz (CH)
Ficoll 1,077g/mL	Biochrom, Berlin, Deutschland (DE)
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Primärantikörper: AK gegen Zytokeratin 8/18	Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA
<i>Recovery Cell Culture Freezing Medium</i> (RCCM)	Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA
Trypsin-EDTA	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.2.5 Geräte

Tab. 5: Geräte und ihre Hersteller.

Gerät	Hersteller, Ort
Automated CellCounter TC20	BioRad Laboratories, Inc., Hercules, USA
EVOS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Färbeautomat DakoAutostainer	DAKO GmbH, Hamburg, DE
Hämozytometer	Sysmex Europe SE, Norderstedt, DE
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, DE
Mikrotom	Schlitten-Mikrotom, R. Jung, DE
Parsortix PR1	Angle North America, Philadelphia, PA, USA
ScanScope imaging system	Leica Biosystems, DE
VarioScan Lux	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortex	IKA-Werke GmbH und Co. KG, Staufen, DE
Wasserbad 37 °	Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Staufen, DE
Zentrifuge Biofuge primo	Heraeus Instruments, Hamburg, DE
Zytozentrifuge	Heraeus Instruments, Hamburg, DE

2.2.6 Allgemeines Laborequipment

Tab. 6: Allgemeines Laborequipment und ihre Hersteller.

Equipment	Hersteller, Ort
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Gefrierbehälter	CoolCell™ LX, Corning, NY, USA
Zentrifuge Biofuge primo	Heraeus Instruments, Hamburg, DE
Zytozentrifuge	Heraeus Instruments, Hamburg, DE

2.2.7 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

MCF7-Luc-GFP, American Type Culture Collection (ATCC)

SKBR3-Luc-GFP, American Type Culture Collection (ATCC)

2.3 Methoden

2.3.1 Grundlagen und Techniken

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Brustkrebs-Zelllinien SKBR3 und MCF7 (PIK3CA-mutiert) wurden von *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen.

Für die Zellkultivierung wurde DMEM, ergänzt mit 10 % FCS, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin verwendet.

Die Zellen wurden bei 37 °C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert.

Für die routinemäßige Passage wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA 0,05 % gemäß den Empfehlungen der ATCC behandelt.

Für das Parsortix-Gerät wurden PBS und Wasser autoklaviert. Deconmatic wurde als Reagenz von der Firma Parsortix verwendet.

Zur Reinigung wurde 70 % Ethanol verwendet.

Für die DNA- und Ribonukleinsäure (RNA)-Extraktion aus *formaldehyde-fixed paraffin-embedded* (FFPE) wurde das ZymoResearch FFPE DNA/RNA Kit eingesetzt.

2.3.2 Standardmethode zur Detektion von disseminierten Tumorzellen

Die isolierte Detektion der DTCs aus Knochenmarkproben erfolgte mittels IHC. Zur Präparation der Knochenmarkproben wurden mononukleäre Zellen durch Dichtezentrifugation isoliert (Ficoll, 1,077 g/mL). Ficoll hat eine größere Dichte als Lymphozyten, jedoch eine kleinere Dichte als Erythrozyten und Monozyten. Wo erforderlich, wurde eine Erythrozytenlyse mit einer Pufferlösung aus 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ und 100 μmM Na₂EDTA (pH 7,4) durchgeführt. Die Zellkonzentration wurde mit einem automatisierten Hämatologie-Analysator bestimmt. Anschließend wurden jeweils 1.5×10^6 mononukleäre Zellen durch eine Zytospin-Zentrifugation auf zwei Objektträger aufgebracht und in 4 % Formalin fixiert. Ein Zytospin ist eine spezielle Zentrifuge, die Zellen aus Flüssigproben mit niedriger Geschwindigkeit auf einen Objektträger aufbringt. Dadurch entsteht eine gleichmäßige Zellverteilung, die eine optimale mikroskopische Analyse ermöglicht. Die Färbung wurde mit einem automatisierten Färbesystem durchgeführt. Als AK diente ein monoklonaler Maus-AK gegen

Zytokeratin 8/18. Als pan-cytokeratin AK wurden A45-B/B3 oder AE1/AE3, 2E11 und E29 (epithelspezifische Marker EMA, CK) genutzt. Pro Patient*in wurden zwei Objektträger gemäß den konsensbasierten Standardempfehlungen für die Tumorzellerkennung analysiert (Fehm et al., 2006). Eine Probe wurde als DTC-positiv gewertet, wenn mindestens eine CK-positive Zelle mit abnormer Morphologie pro 3.0×10^6 Zellen nachgewiesen wurde. Im Falle eines positiven Nachweises erfolgte eine standardisierte Klassifizierung der Tumorzellen (siehe Tab. 3).

2.3.3 Knochenmarkpunktion und Aufbereitung des Knochenmarks

Die Knochenmarkpunktion zur Gewinnung von Knochenmark fand in Allgemeinanästhesie statt. Punktionsstelle war die Spina iliaca anterior superior. Die Proben wurden unter sterilen Bedingungen in 20 mL Spritzen (wegen der Antikoagulation mit 1000 IE Heparin versetzt) im OP aufgenommen und nach Abzug von 12,5 mL für die Basisdiagnostik (Immunzytochemie) im Labor unter der *Bench* weiterverarbeitet und kryokonserviert.

Die Knochenmarkproben wurden mit PBS gemischt (Ratio 1:3). Das Knochenmark wurde durch ein $100\ \mu\text{m}$ -Zellsieb filtriert, um Knochentrabekel zu entfernen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei $478 \times g$. Der Überstand einschließlich Fett wurde nach der Zentrifugation verworfen, und das Zellpellet wurde in 10 ml PBS+BSA 1 % resuspendiert und in ein VacuTainer-Röhrchen mit 1,8 mg/ml $\text{K}_2\text{-EDTA}$ überführt.

2.3.4 Kryokonservierung von Knochenmarkproben

Für die Kryokonservierung der Knochenmarkproben wurde nach Protokoll gearbeitet. Dieses beinhaltete folgende Schritte (siehe Abb. 4): Waschung mit PBS (aliquotiert in 50 mL Falcons), Zentrifugieren ohne Bremse für 10 Minuten (Bild 2), dann Absaugung des Überstandes (inklusive Fett, siehe Bild 4). Zur Hämolyse der Erythrozyten wurde RBC-Lysepuffer (steril gefiltert, Puffer: 155 mM NH_4Cl + 10 mM KHCO_3 + 100 μM Na_2EDTA in H_2O ; pH: 7,4) hinzugefügt und die Probe wurde für 10 Minuten im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Dann folgte eine erneute Zentrifugation bei $478 \times g$ für 10 Minuten mit Bremse (Bild 7), so dass nach Absaugen des Überstandes ein Zellpellet mit den mononukleären Zellen (inklusive Tumorzellen) verblieb. Anschließend wurde das Pellet mit RCCM-Freezing-Medium resuspendiert und in Kryogefäßen bei -80°C im Gefrierschrank mit einer Rate von $-1^\circ\text{C}/\text{Minute}$ kryokonserviert (Bild 12). Langfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff (-196°C).



Abb. 4: Kryokonservierung einer Knochenmarkprobe.

1. Vorbereitung des Knochenmarkaspirates und PBS-Lösung
2. Zentrifugation ohne Bremse
3. Überstand
4. Absaugung des Überstandes
5. Lysepuffer
6. Inkubation im Kühlschrank bei 4 °C
7. Zentrifugation mit Bremse
8. Zellpellet mit mononukleären Zellen
9. Zellpellet nach Absaugung
10. Resuspension mit RCCM-Freezing-Medium
11. Übertragung ins Kryogefäß
12. Kryokonservierung

2.3.5 Auftauverfahren von Knochenmarkproben

Um retrospektiv die Proben zu untersuchen, wurden die kryokonservierten Proben nach Protokoll aufgetaut. Das Kryogefäß wurde ca. 45 Sekunden im Wasserbad bei 37 °C erhitzt, bis die Probe aufgetaut war. DNase I und im Anschluss DMEM wurden tröpfchenweise und über einen Zeitraum von 30 Sekunden hinzugefügt. Die Suspension wurde mit einer BSA-getränkten Pipette aufgenommen und tröpfchenweise in ein 15 mL Falcon mit DMEM überführt. Für die Homogenisierung wurde das Falcon vorsichtig geschwenkt. Daraufhin wurde die Probe bei 300 xg für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellett wurde in PBS+ 0,1 % BSA resuspendiert und in ein VacuTainer-Röhrchen überführt.

2.3.6 Mikrofluide Zellseperation

Für die Isolation der DTCs wurde das Parsortix PR1 *automated microfluidic system* genutzt. Gemäß den Anweisungen des Herstellers wurde die Trennkassette mit 6,5 µm Spaltgröße verwendet, um eine optimale Anzahl an DTCs und eine möglichst geringe Anzahl von mononukleäre Blutzellen (PBMC) zu erhalten. Das Protokollschema des Herstellers umfasst wöchentliche Vollreinigungen (Programm PX_C) und Erhaltungsreinigungen, welche regelmäßig durchgeführt und eingehalten wurden. Außerdem fand eine regelmäßige Wartung des Gerätes statt.

Zur Isolation von DTCs wurde das Knochenmark zunächst durch einen 100 µL-Filter gesiebt, um große Partikel zu entfernen. Anschließend wurde es mit PBS verdünnt und in ein VacuTainer-Röhrchen gegeben. Dadurch erreichte die Probe eine ähnliche Viskosität und ein vergleichbares Volumen wie Blut.

Die Kassette wurde mit 100 %igem Ethanol und anschließend mit PBS vorbereitet. Der Prozess der Zellseparation gemäß dem Handbuch des Herstellers von Parsortix beinhaltet das Priming PX2_F, die Separation PX2_S99F und die Ernte PX2_H. Die Zellen wurden in einem zweistufigen Verfahren geerntet, wobei zunächst 200 µL PBS geerntet wurden und anschließend 1000 µL PBS jeweils im Reverse Flow. Nach jeder Probe wurde Parsortix mit dem PX2_C-Protokoll gemäß dem Herstellerprotokoll gereinigt. Die Zellernte (*Harvest*) bezeichnet die gezielte Rückspülung der zuvor separierten, größeren bzw. weniger deformierbaren Zellen aus der Kassette ins Sammelgefäß mithilfe eines definierten Puffervolumens im

Reverse Flow, womit die Zellen für weitere Analysen isoliert werden.

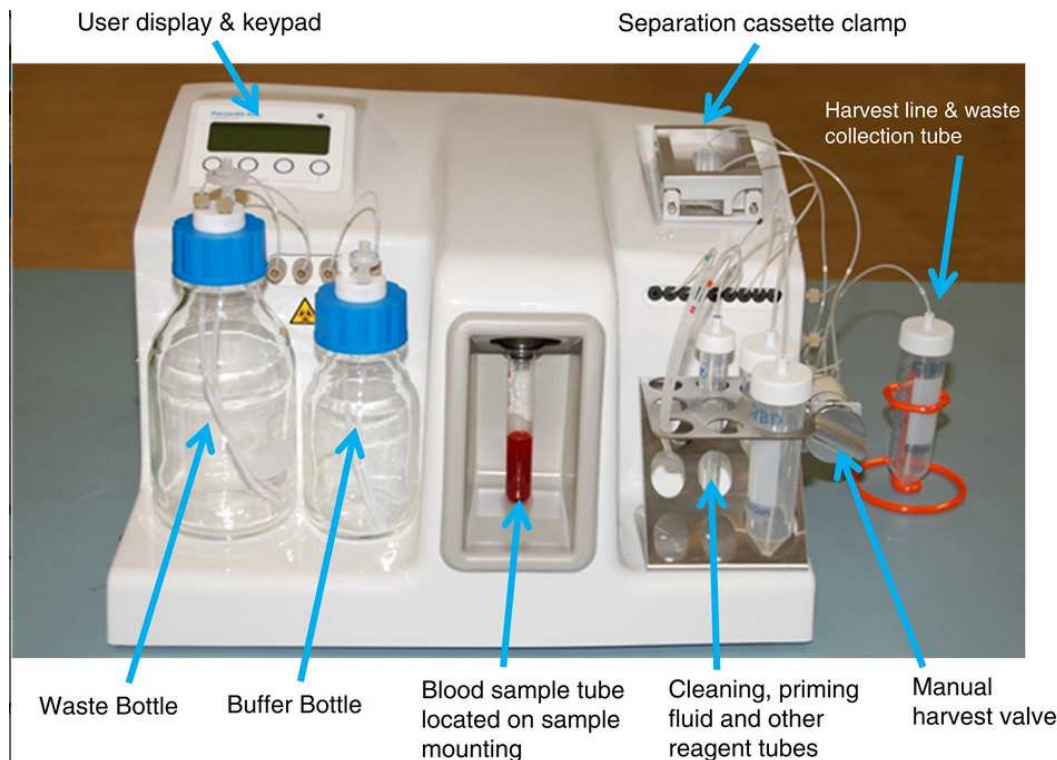


Abb. 5: Aufbau des Parsortix-Gerätes (Miller et al., 2018).

In Abb. 5 ist der Aufbau des Gerätes dargestellt. Das *User Display* wurde genutzt, um die verschiedenen Protokolle auszuführen. Die *Waste Bottle* wurde regelmäßig gereinigt. Die Probe wurde in ein VacuTainer-Gefäß überführt und anschließend befestigt. Der *Manual Harvest Valve* wurde betätigt, um die Zellen zu ernten. Die Separationskassette wurde manuell eingebaut.

Die geschätzte Anzahl der zu erwartenden DTCs wurde wie folgt berechnet: (Anzahl der zu erwartenden Zellen nach der Parsortix-Zellseparation = Anzahl der Gesamtzahlen möglicher Zytospins $\times$ Faktor 5 (Verlust von DTCs während der PBMC-Isolierung) $\times$ Erntekapazität (0,6x) der Parsortix-Methode). Die erwartbaren Zellzahlen betrugen 159 und 114. Die oben genannten Faktoren zum Zellverlust und zur Erntekapazität beruhen auf Vorversuchen (Volmer et al., 2023).

2.3.7 Vorversuche

Anfangs wurden *Spiking*-Experimente mit den MCF7-Tumorzellen und den SKBR3-Tumorzellen durchgeführt, um die Eignung des Parsortix-Gerät als Nachweis- und Analysemethode zu überprüfen. Dabei wurde eine definierte Menge oben genannter Zellen einer Probe zugesetzt (*Spiking*), um deren Quantifizierbarkeit unter den gewählten Analysebedingungen zu evaluieren. Dafür wurden die Tumorzelllinien aus der Zellkultur heraus mittels Zellzähler gezählt.

Um die Wirksamkeit der DTCs-Isolierung mittels Parsortix und die Ernterate der erfassten Zellen festzustellen, wurde ein *Spiking*-Experiment durchgeführt, bei dem SKBR3 BC-Zellen mit *CellTracker Green* angefärbt wurden. Die Zellzahl wurde mit dem AutomatedCellCounter TC20 bestimmt. Außerdem wurde die Menge der aufgestockten Zellen mikroskopisch bestimmt, indem die Probe auf Objektträger übertragen und die Zellen unter dem Mikroskop gezählt wurden. So wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Eine Anzahl an ca. 200 mit *CellTracker Green* gefärbten Zellen wurde in frisches Knochenmark gegeben und die Zellseparation wurde mittels Parsortix durchgeführt. Um die Fang- und Ernteraten zu berechnen, wurden die 6,5 μ m Kassetten vor und nach der Ernte ausgezählt. Die Zellen wurden auf einen Objektträger geerntet, und das Zytospin wurde mit 478 xg zentrifugiert. Es erfolgte die Entfernung des Überstandes, und die Zellen wurden mit Formaldehyd (3,7 %) fixiert. Zur Auszählung der positiven Zellen mit dem EVOS M7000-Mikroskop bei 10- und 20-facher Vergrößerung wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) als Eindeckmedium verwendet und über Nacht getrocknet.

In einem weiteren Vorversuch erfolgte die Überprüfung der analytischen Sensitivität des MassArray (Agena ClearSeek Panel v1). Dazu wurden unterschiedliche Mengen an MCF-7-Tumorzellen in frisches Knochenmark hinzugefügt. Die Zellseparation erfolgte mittels Parsortix, während die DNA der Probe mit dem Zymo Research Quick-DNA/RNA Miniprep Kit isoliert wurde. Abschließend wurde die DNA mittels ddPCR analysiert.

2.3.8 Definieren des Tumorareals für die DNA-Isolation

In Abb. 6 ist ein Beispiel einer HE-Färbung dargestellt, bei der das Tumorareal von einem Pathologen validiert wurde. Bei allen eingeschlossenen Patient*innen wurde die Tumorfläche definiert und je nach Tumorgroße wurde das Material des FFPE-Gewebes verwendet.

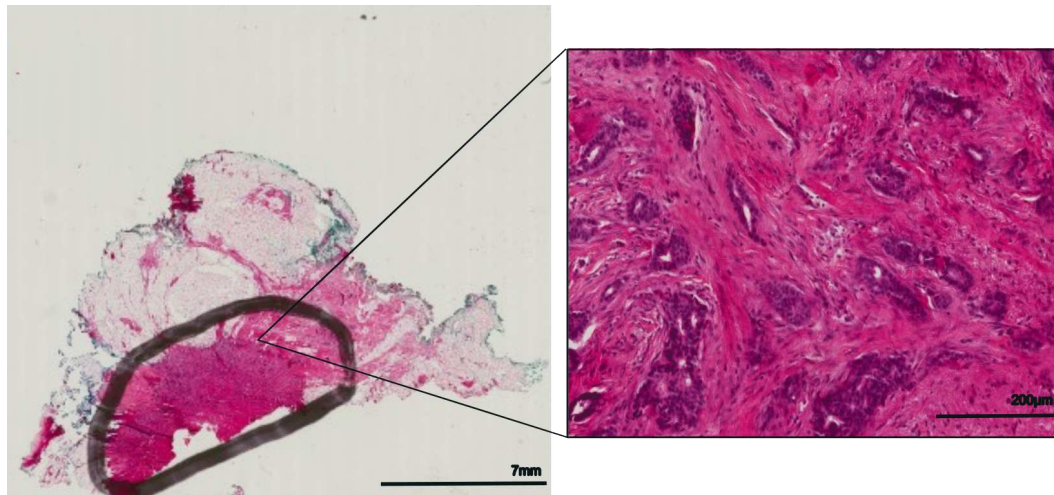


Abb. 6: Markierung des Tumorareals. HE-Färbung.

2.3.9 Isolierung von DNA aus FFPE

Für die abschließende Isolierung der Gesamt-DNA aus dem FFPE-Gewebe wurden pro Gewebeblock vier Schnitte angefertigt. Dazu wurden die Paraffinblöcke in ein Mikrotom eingespannt und es wurde eine Schnittstärke von 10 µm gewählt. Das geschnittene Material wurde entweder auf Objektträger ausgebreitet oder direkt in Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend wurde das tumorhaltige Material mithilfe von Skalpell und Pinzette in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach jeder Probe erfolgte eine Reinigung der Instrumente mit Xylolersatz. Die Schritte der DNA-Isolation wurden gemäß den Herstellerangaben mittels *Quick-DNA/RNA FFPE Kit* durchgeführt. Das Protokoll umfasste *Buffer Preparation*, *Sample Preparation*, *DNA and RNA Purification* sowie ein *DNase I Treatment* für die *RNA purification*. Abschließend wurden die Konzentrationen und die Reinheit der DNA- und RNA-Proben mittels VarioScan basierend auf den Absorptionseigenschaften bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Zusätzlich erfolgte die Isolierung der DNA aus den Knochenmarkzellen nach der Zellseparation mittels Parsortix mit dem *Zymo Research Quick-DNA/RNA Miniprep Kit*.

2.3.10 Digital droplet PCR für die Detektion der PIK3CA hotspot mutation

Die Analyse wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für klinische Pharmakologie (IKP) Stuttgart durchgeführt.

Die Primärtumore und die Knochenmark-Proben wurden zunächst mit der MassArray-Methode auf alle klinisch relevanten PIK3CA-Mutationen mit einer Sensitivität von 1 % analysiert (Agena ClearSeek Panel v1). Zur Qualitätskontrolle wurden positive Proben, einschließlich solcher mit grenzwertigen Signalen aus der ClearSEEK-Analyse, mit digitaler Tröpfchen-ddPCR auf vier Mutationen (E542K c.1624G>A, E545K c.1633G>A, H1047R c.3140A>G, N345K c.1035T>A) mit einer Sensitivität von 0,1 % erneut getestet (Biorad-System). Die PCR-Produkte wurden in den QX200 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories, Inc.) geladen, und die Analyse der Daten wurde mit dem QXManager durchgeführt. Die Varianten-Allel-Häufigkeit (VAF) wurde als das Verhältnis von Varianten- zu Wildtyp-Signal berechnet. Die Testergebnisse waren negativ (unter dem Schwellenwert im MassArray oder 0 positive Tröpfchen), schwach positiv (2-20 positive Tröpfchen im ddPCR oder VAF <0,5 %) oder stark positiv (>20 Tröpfchen im ddPCR oder VAF>1 % im MassArray). Zwei Patienten wiesen Doppelmutationen auf, die in der Gesamtzahl der Patienten nur einmal gezählt werden, aber doppelt zu den Mutationszahlen beitragen.

2.3.11 Untersuchung der DTCs auf die PIK3CA-Mutation

Nachdem die Ergebnisse des PIK3CA-Mutationsstatus von den Primärtumoren vorhanden waren, wurden die zugehörigen Knochenmarkproben auf die PIK3CA untersucht. Nachdem die Knochenmarkproben wie oben beschrieben aufgetaut und mittels Parsortix verarbeitet wurden, erfolgte die Analyse mittels ddPCR auf PIK3CA-Mutationen. Zunächst wurden die DTCs aus den Proben isoliert, deren Primärtumor eine PIK3CA-Mutation aufwies. Anschließend wurden auch Knochenmarkproben analysiert, die in der DTC-Detektiionsmethode negativ waren und deren Primärtumoren jedoch eine hohe fraktionelle Häufigkeit (FA) der PIK3CA-Mutation zeigten. FA beschreibt den Anteil mutierter Allele im Verhältnis zur Gesamtanzahl aller Allele an dieser Position im untersuchten Genom. In diesem Kontext gibt die FA an, wie groß der Anteil der PIK3CA-Mutation im Tumormaterial bzw. in der Knochenmarkprobe im Vergleich zum Wildtyp ist.

2.3.12 Berechnung prozentualer Nachweisveränderungen bei variierenden PBMC- und MCF7-Zellzahlen

Es wurden prozentuale Veränderungen zwischen verschiedenen Zell- und PBMC-Konzentrationen berechnet, um den quantitativen Einfluss der PBMC-Kontamination auf die Nachweisempfindlichkeit von PIK3CA-Mutationen zu bewerten:

Berechnung prozentualer Nachweisveränderungen bei variierenden MCF7- und PBMC-Zellzahlen:

- Für 100 MCF7-Zellen bei PBMC-Konzentrationserhöhung von 20.000 auf 100.000:

$$\text{Prozentuale Veränderung} = \frac{1,81\% - 0,22\%}{1,81\%} \times 100 = 87,85\%. \quad (1)$$

- Für 500 MCF7-Zellen bei PBMC-Konzentrationserhöhung von 20.000 auf 100.000:

$$\text{Prozentuale Veränderung} = \frac{4,90\% - 0,55\%}{4,90\%} \times 100 = 88,78\%. \quad (2)$$

- Für 500 MCF7-Zellen bei PBMC-Konzentrationserhöhung von 100.000 auf 500.000:

$$\text{Prozentuale Veränderung} = \frac{0,55\% - 0,18\%}{0,55\%} \times 100 = 67,27\%. \quad (3)$$

- Zwischen 100 und 500 MCF7-Zellen bei konstanter PBMC-Konzentration (20.000):

$$\text{Prozentuale Veränderung} = \frac{4,90\% - 1,81\%}{1,81\%} \times 100 = 170,72\%. \quad (4)$$

- Verhältnis der FA zwischen 20.000 und 100.000 PBMCs für 100 MCF7-Zellen:

$$\text{Ratio} = \frac{0,22\%}{1,81\%} \times 100 = 12\%. \quad (5)$$

2.3.13 Bildverarbeitung

Die Bildgebung erfolgte mit dem EVOS M7000 Imaging System und mit dem ScanScope.

2.3.14 Statistik

Alle Daten wurden in einer Microsoft Excel Tabelle (Version 2010, Microsoft Corporation, Redmond, Washington DC, USA) erfasst. Anschließend wurde für die statistische Analyse der Patient*innendaten SPSS15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) genutzt.

Die Korrelation zwischen Detektion von DTCs im Knochenmark und PIK3Ca-Mutation wurde mittels Chi-Square-Test evaluiert. Als signifikant wurden p-Werte < 0.05 berücksichtigt.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung des Gesamtkollektivs

Insgesamt wurden 84 Patient*innen in die Analyse einbezogen. In die Kohorte wurden Patient*innen mit folgenden Kriterien hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit einer PIK3CA-Mutation aufgenommen: Diagnose Brustkrebs (invasives Karzinom, nicht-spezzieller Typ (NST)/invasiv-lobuläres Karzinom (ILC)/andere), keine Fernmetastasierung (cM0), Hormonrezeptorpositivität (ER/PR +), HER2-Status negativ, kryokonserviertes Knochenmark vorhanden. Patient*innen mit neoadjuvanter Therapie wurden ausgeschlossen. Abbildung 7 verdeutlicht die Patientinnenselektion in der Studie, wobei von initial 2090 Patientinnen n=84 verbleiben.

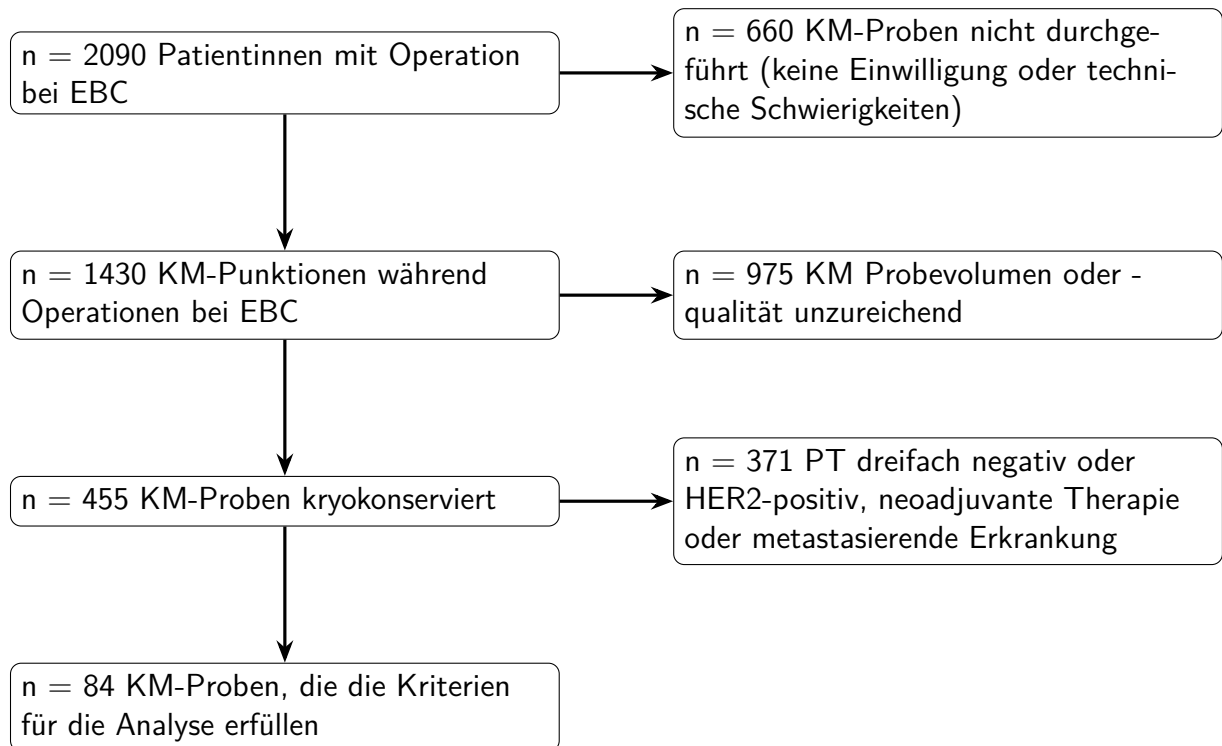


Abb. 7: Flussdiagramm zur Patientinnen- und Probenauswahl. EBC= early breast cancer, KM= Knochenmark, PT= Primärtumor. vgl. (Grollmann et al., 2026)

In Tab. 7 sind die klinischen Charakteristika dargestellt. Die meisten Patient*innen waren postmenopausal (n=67, 80 %), und der vorherrschende Tumortyp war das invasive Mammakarzinom, nicht-spezzieller Typ (NST, n=60, 71 %). Die überwiegende Tumorgroße war pT1-2 (n=52, 62 %). Die Mehrheit zeigte keine Lymphknoteninvasion (n=53, 63 %). Die Verteilung der klinisch-pathologischen Parameter pT und pN wird ergänzend durch

Kreisdiagramme veranschaulicht (siehe Abb. 9 und 10).

Das Durchschnittsalter der Teilnehmenden betrug $M=59,98 \pm 1,15$ Jahre (Mittelwert $\pm$ Standardfehler), wobei die Altersspanne von 29 bis 87 Jahren reichte. Zur Charakterisierung des Gesamtkollektivs wurde die Altersverteilung erfasst und in Abb. 8 dargestellt. Der Median lag bei 59,50 Jahren.

Tab. 7: Klinische Daten der Patient*innen.

Merkmal	n (%)
Total	84 (100)
Histologie	
NST	60 (71)
ILC	21 (25)
Andere	3 (4)
Tumor Größe	
pT1-2	52 (62)
pT3-4	32 (38)
Lymphknoten Status	
N0	53 (63)
N+	30 (36)
Menopausaler Status	
Prämenopausal	17 (20)
Postmenopausal	67 (80)

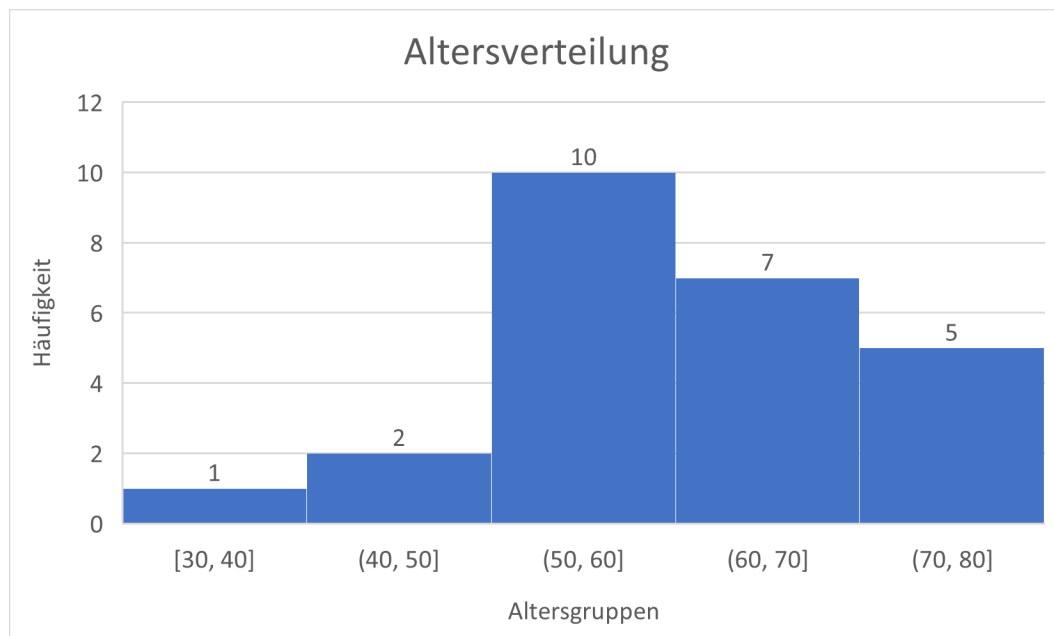


Abb. 8: Altersverteilung des Gesamtkollektives.

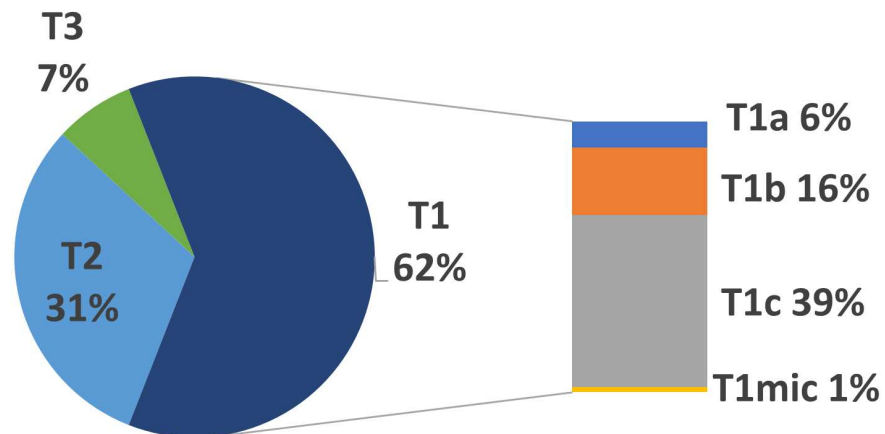


Abb. 9: Verteilung der Tumorgößen nach pT-Klassifikation.

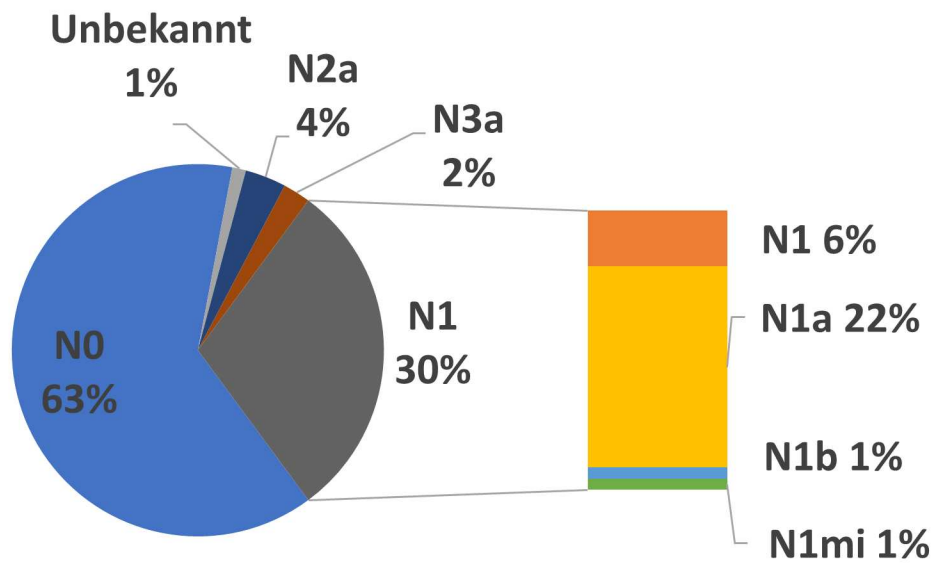


Abb. 10: Verteilung der Lymphknotenstatus nach pN-Klassifikation.

3.2 DTC Positivität

Tab. 8 zeigt die Kohortenmerkmale in Bezug auf die DTC-Positivität, die mittels Standardmethode (IHC) bestimmt wurden. Insgesamt waren 12 % der Patient*innen (n= 10 von 84) gemäß der Standardmethode DTC-positiv. Die Analyse der verschiedenen Untergruppen zeigt, dass die DTC-Positivitätsrate zwischen den histologischen Subtypen variiert, wobei 13 % der Patient*innen (n=8) mit NST und 9 % der Patient*innen (n=2) mit ILC DTCs-positiv waren, ohne signifikanten Unterschied. Patient*innen mit pT1-2-Tumoren zeigten eine DTCs-Positivität von 10 % (n=5), während diese bei pT3-4-Tumoren leicht höher lag (16 %, n=5), ebenso ohne signifikante Differenz. Die DTC-Positivität in Bezug auf den Lymphknotenstatus zeigt einen Wert von 11 % (n=6) bei nodal-negativen Patient*innen und einen Wert von 13 %, (n=4) bei nodal-positiven Patient*innen, was als nicht signifikante Differenz gewertet werden kann. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der DTCs-Positivität zwischen prämenopausalen (6 %) und postmenopausalen Patient*innen (13 %). Es zeigte sich somit keine Patient*innensubgruppe, bei der eine erhöhte DTC-Positivität zu erwarten war. In Abb. 11 ist die Verteilung der DTC-Positivität in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp, der Tumorgroße (pT), dem Lymphknotenstatus und dem menopausalen Status zum visuellen Vergleich der prozentualen DTC-Positivität dargestellt.

Tab. 8: Kohortenmerkmale in Bezug auf DTC-Positivität.

	DTC Positivität	
	n (%)	P-Wert*
Total	10/84 (12)	
Histologie		
NST	8/60 (13)	0,728
ILC	2/21 (9)	
Andere	0/3 (0)	
Tumor Größe		
pT1-2	5/52 (10)	0,409
pT3-4	5/32 (16)	
Lymphknoten Status		
N0	6/53 (11)	0,900
N+	4/30 (13)	
Menopausaler Status		
Prämenopausal	1/17 (6)	0,579
Postmenopausal	9/67 (13)	

*p-Werte berechnet mit dem Chi-Quadrat-Test von Pearson.

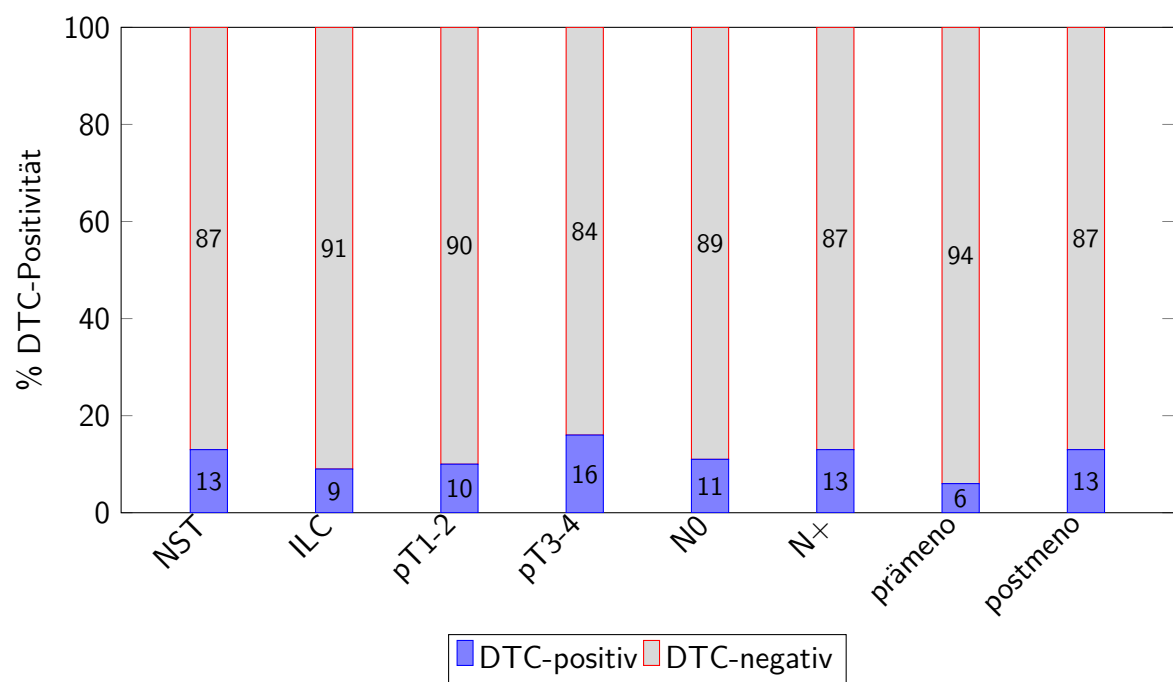


Abb. 11: DTC-Status nach klinisch-pathologischen Parametern. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen. Prämeno = prämenopausal, postmeno = postmenopausal.

3.3 Nachweis von PIK3CA-Mutationen in Primärtumoren

Grundlage

Um die Primärtumoren auf PIK3CA-Mutationen zu untersuchen und damit die Grundlage für die Auswahl geeigneter Fälle zur DTC-Analyse zu schaffen, wurden Tumorgewebeproben aus FFPE analysiert. Die DNA-Isolation erfolgte nach dem im Methodenteil beschriebenen Protokoll und der Mutationsstatus wurde anschließend mittels ddPCR bestimmt (vgl. Abb. 12).

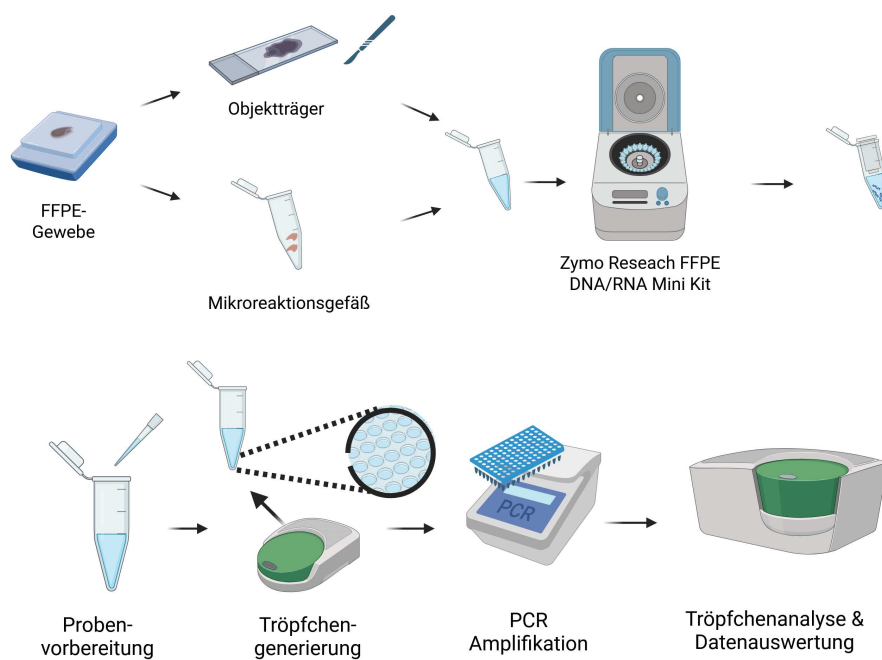


Abb. 12: Verfahrensablauf von DNA-Isolation aus Primärtumoren und anschließender digitaler Tröpfchen-Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR).

Ergebnisse

In Tab. 9 sind die Kohortenmerkmale in Bezug auf die PIK3CA-Positivität der Primärtumore dargestellt. Die DNA wurde wie zuvor beschrieben isoliert und mittels ddPCR untersucht. Insgesamt wiesen 43 % der Patient*innen (n=36) eine PIK3CA-Mutation auf. Bei den histologischen Subtypen war die PIK3CA-Positivität bei NST-Patient*innen mit 40 % und bei Patient*innen mit ILC mit 5 % feststellbar. Die Positivitätsrate war bei Tumoren des Typs pT1-2 (40 %) und bei pT3-4-Tumoren (47 %) vergleichbar. In Bezug auf den Lymphknotenstatus wurde eine PIK3CA-Mutationsrate von 38 % bei nodal-negativen und 50 % bei nodal-positiven Patient*innen festgestellt. Der menopausale Status zeigte signifikante Unterschiede ($p=0.021$): 71 % der prämenopausalen Patient*innen und 36 % der postmenopausalen Patient*innen wiesen eine PIK3CA-Mutation auf. In Abb. 13 ist die Verteilung von PIK3CA-Mutationen in Primärtumoren in Abhängigkeit von histologischem Subtyp, Tumorgroße (pT), Lymphknotenstatus und menopausalem Status im Vergleich zur prozentualen PIK3CA-Positivität dargestellt.

Tab. 9: Kohortenmerkmale in Bezug auf PIK3CA-Positivität.

	PIK3CA Positivität (PT)	
	n (%)	P-Wert*
Total	36/84 (43)	
Histologie		
NST	24/60 (40)	0,580
ILC	10/21 (5)	
Andere	2/3 (67)	
Tumor Größe		
pT1-2	21/52 (40)	0,559
pT3-4	15/32 (47)	
Lymphknoten Status		
N0	20/53 (38)	0,283
N+	15/30 (50)	
Menopausaler Status		
Prämenopausal	12/17 (71)	0,021
Postmenopausal	24/67 (36)	

*p-Werte berechnet mit dem Chi-Quadrat-Test von Pearson.

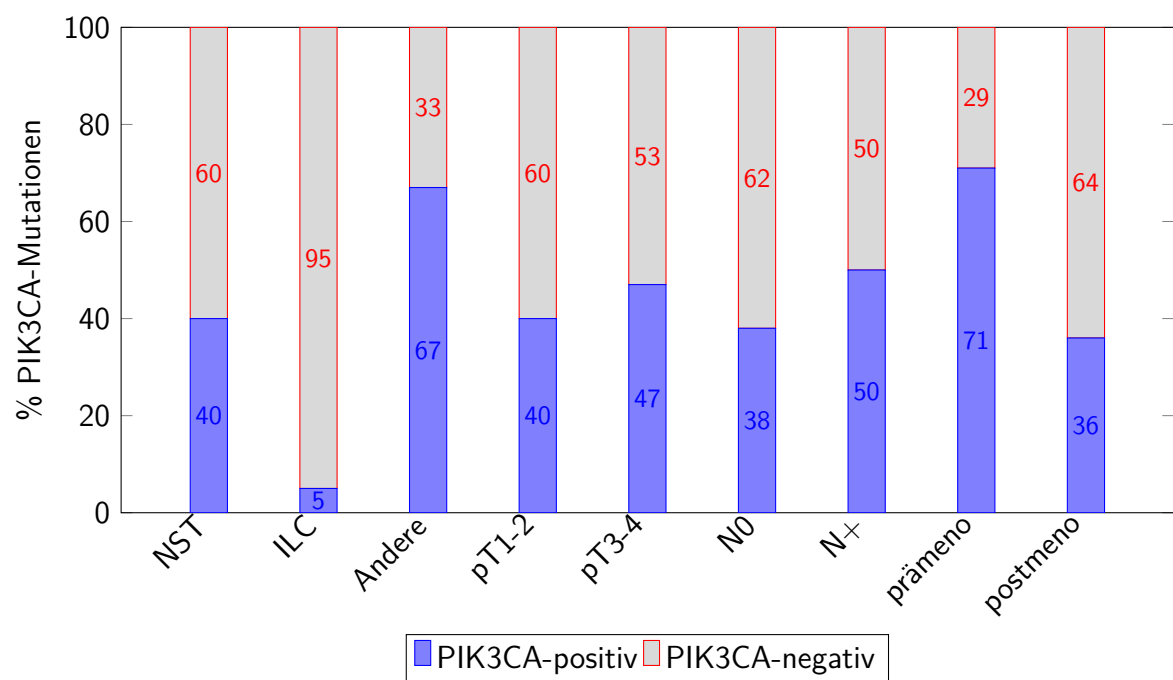


Abb. 13: PIK3CA-Mutationsstatus in Primärtumoren nach klinisch-pathologischen Parametern. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich im Zusammenhang mit dem menopausalen Status ($p = 0,021$). Prämeno = prämenopausal, postmeno = postmenopausal.

3.4 Mikrofluidische Separation zur DTC-Isolierung

Grundlage

Zur Evaluierung der Wirksamkeit der DTC-Isolierung und zur Bestimmung der Empfindlichkeit des mikrofluidischen Geräts wurden Spiking-Experimente mit der SK-BR-3-Zelllinie durchgeführt (siehe Abb. 14). Im Mittelwert wurden 116 Zellen in Knochenmark-Proben gegeben.

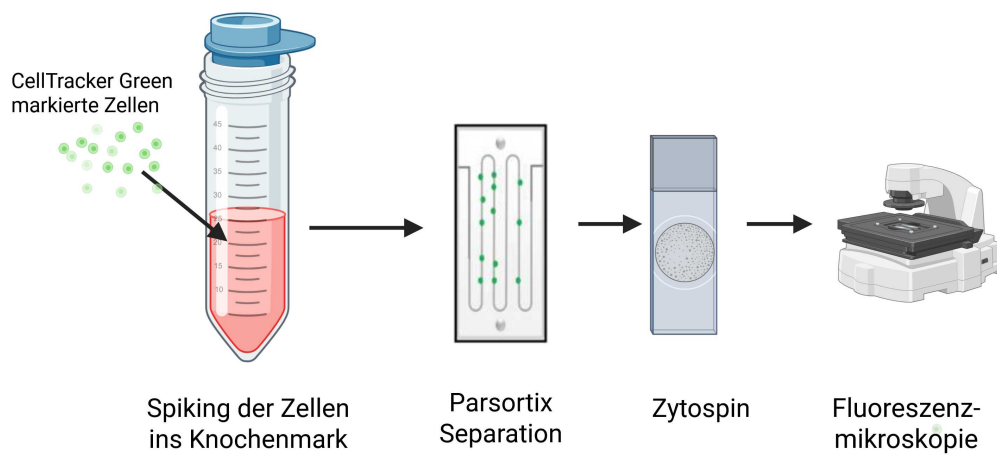


Abb. 14: Arbeitsablauf von Spiking-Experimenten mit Parsortix.

Die Zählung der Zellen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop sowohl vor, als auch nach der Ernte in der Parsortix-Kassette. Die Anzahl der gefangenen Zellen in der Kassette betrug 96 Zellen im Mittelwert. Die ausgezählten Zellen auf dem Objektträger nach der Ernte durch Parsortix betrug 48 Zellen im Mittelwert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen eine Einfangrate von 82,76 %, eine Ernterate von 50 % und eine Wiederfindungsrate von 41,38 %. Die Einfangrate wurde als Verhältnis der in die Kassette aufgenommenen zu den gespikten Zellen definiert, während die Ernterate sich auf das Verhältnis der gefangenen zu den tatsächlich geernteten Zellen bezieht. Die Wiederfindungsrate wurde als Verhältnis der ursprünglich gespikten Zellen zu den geernteten Zellen definiert. Diese Werte sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Zusammenfassung definierter Kenngrößen im Spiking-Experiment nach Parsortix-basierter DTC-Isolierung. Die Zellzählung erfolgte mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Cytospin-Analyse.

Metrik	Wert (%)	Berechnungsgrundlage*
Einfangrate	82,76	96/116 (Kassette/Spiking)
Ernterate	50,00	48/96 (Cytospin/Kassette)
Wiederfindungsrate	41,38	48/116 (Cytospin/Spiking)

*Gesamtzahl gespikter Zellen: 116, eingefangene Zellen: 96, geerntete Zellen: 48.

Die Immunfluoreszenzbilder in Abb. 15 präsentieren die erfolgreiche Identifizierung von geernteten SK-BR-3-Zellen, die mit CellTracker Green markiert wurden, nach Spiking in Knochenmark und Parsortix-Separation.

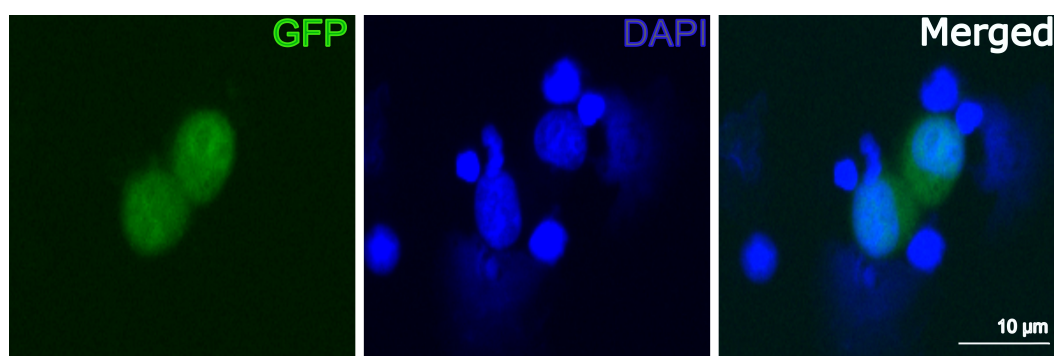


Abb. 15: Immunfluoreszenzbilder von geernteten Zellen nach Parsortix-Isolierung von DTCs aus Knochenmark. Celltracker Green wurde mit dem GFP-Modus aufgenommen und mit DAPI kombiniert, Maßstab 10 µm. (Grollmann et al., 2026).

3.5 PIK3CA-Hotspot-Mutationsnachweis in MCF7- Spiking- Experimenten

Grundlage

Zur Untersuchung des Nachweises PIK3CA-positiver DTCs mittels Parsortix und ddPCR wurden 160, 500, 800 und 20.000 MCF7-Zellen (E545K-Mutation in Exon 9) in Knochenmark gespikt und nach Zellseparation analysiert. Aufgrund des vermuteten Einflusses der Zellzahl bei der Detektion der PIK3CA-Mutation wurden ergänzende Experimente mit variierenden Mengen an MCF-7-Zellen durchgeführt. In Abb. 16 ist der Verfahrensablauf dargestellt.

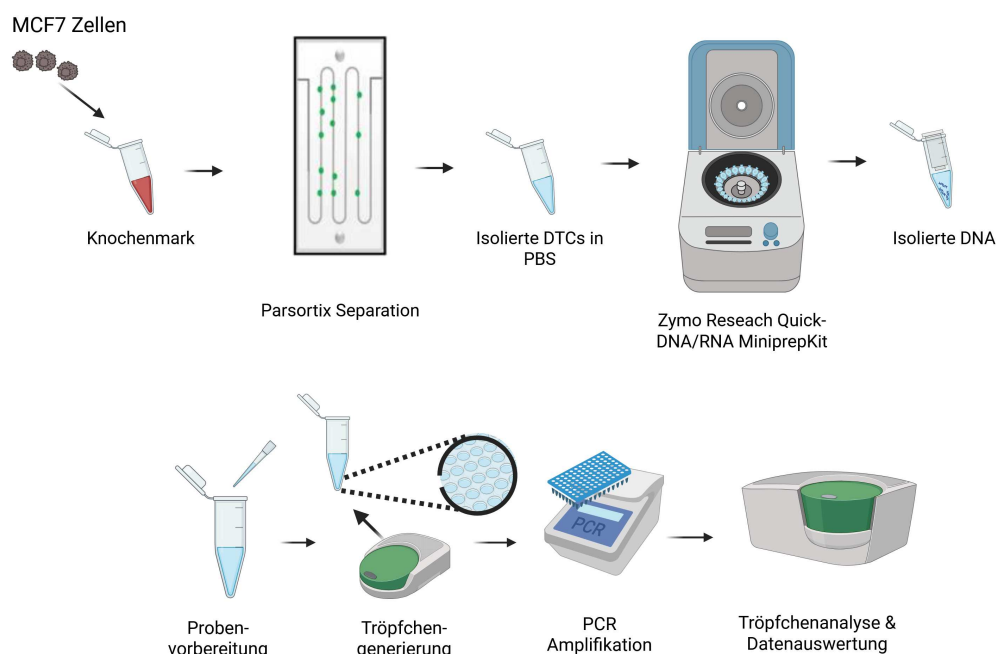


Abb. 16: Verfahrensablauf von Spiking-Experimenten mit MCF7 Zellen, Parsortix Separation und anschließender digitaler Tröpfchen-Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR).

Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass die PIK3CA-Mutation in allen Proben mit 500, 800 und 20.000 MCF7-Zellen erfolgreich nachgewiesen werden konnte (vgl. Tab. 11). Der Assay zeigte eine untere Nachweisgrenze für die PIK3CA-Mutation bei 160 MCF7-Tumorzellen. Bei 160 Zellen war die Mutation nur grenzwertig nachweisbar (1 Droplet), was als Borderline positiv klassifiziert wurde.

Tab. 11: Nachweis der PIK3CA-Mutation (E545K, Exon 9) in der digitalen Tröpfchen-Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR).

Anzahl an MCF7 Zellen (in KM)	FA (%)	PIK3CA-Mutation
20.000	7,36	Positiv
800	0,46	Positiv
500	0,51	Positiv
160	0,14	Borderline positiv

Diese Daten aus Tab. 11 belegen, dass der Nachweis der PIK3CA-Mutation bei höheren Zellkonzentrationen zuverlässig funktioniert. Bei niedrigeren Zellzahlen ist jedoch die Sensitivität der ddPCR-Methode geringer, was sich in einer niedrigeren FA widerspiegelt.

3.6 Detektion der PIK3CA-Mutation im Primärtumor

Grundlage

Insgesamt wurden 84 Primärtumore auf das Vorhandensein einer PIK3CA-Mutation untersucht. Die Analyse konzentrierte sich auf bekannte Hotspot-Mutationen innerhalb des PIK3CA-Gens, insbesondere an den Codons 542, 545 und 1047, die häufig mit onkogener Aktivität in Verbindung gebracht werden.

Ergebnisse

Von diesen Primärtumor-Proben wurden 42,9 % (36 Patient*innen, zwei mit Doppelmutation) positiv auf eine PIK3CA-Mutation getestet. Von den 38 Proben, die positiv auf PIK3CA-Mutationen getestet wurden, wiesen 16 Proben (42,1 %) Mutationen an Codon 1047 (H1047R) auf, 9 Patient*innen (23,7 %) hatten Mutationen an Codon 545 (E545G/K), 6 Patient*innen (15,8 %) hatten Mutationen an Codon 542 (E542K), 5 Patient*innen hatten Mutationen an Codon 345 (N345K) und die Mutationen C420R und Q546K wurden jeweils einmal gefunden (jeweils 2,6 %). Bei zwei Patient*innen wurden Doppelmutationen gefunden, daher ergibt sich eine Gesamtanzahl der Mutationen von 38. Von den 36 Patient*innen, bei denen die PIK3CA-Mutation im Primärtumor nachgewiesen wurde, wiesen zwei (5,6 %) auch DTCs in ihrem Knochenmark auf, wenn man die Zytokeratin-Immunhistochemie als Standardmethode für den DTC-Nachweis verwendete.

Tab. 12: Verteilung der PIK3CA Hotspot Mutationen.

Hotspot Mutation	Anzahl Mutationen	Relativer Anteil der Patient*innen (%)
H1047R	16	42,1
E545G/K	9	23,7
E542K	6	15,8
N345K	5	13,2
C420R	1	2,6
Q546K	1	2,6

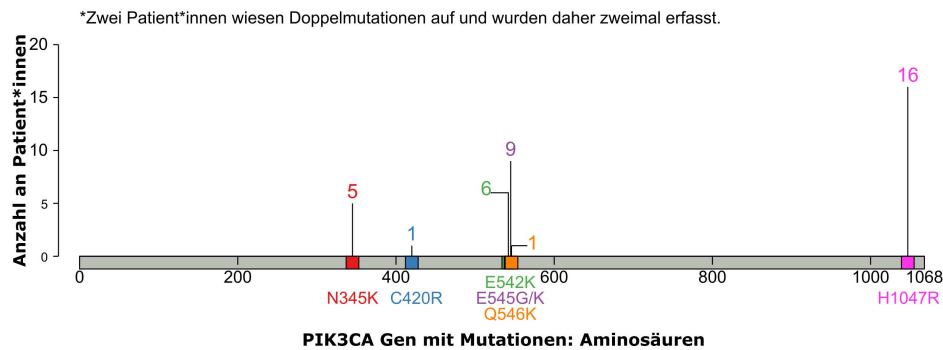


Abb. 17: Verteilung von PIK3CA-Mutationen in primären Brusttumoren. Das PIK3CA-Gen ist schematisch entlang der x-Achse (0–1068 Aminosäuren) dargestellt, wobei die Hotspot-Mutationen durch farbcodierte Balken an ihren Codonpositionen gekennzeichnet sind. Die vertikalen Linien stellen die Patient*innen pro Mutation dar. (Grollmann et al., 2026).

Die schematische Darstellung des PIK3CA-Gens entlang der Aminosäuresequenz (x-Achse) in der Abb. 17 illustriert die räumliche Verteilung der Mutationen innerhalb der kodierenden Regionen. Zudem zeigt die visuelle Darstellung der absoluten Häufigkeit des Vorkommens von einzelnen Mutationsereignisse deutlich die am häufigsten beobachtete Mutation H1047R, die bei 16 Patient*innen festgestellt wurde. Die Detektion von Mutationen wie N345K, C420R und Q546K, wenngleich mit geringerer Häufigkeit, weist auf eine heterogene Mutationslandschaft hin, die potenziell unterschiedliche biologische Relevanz und therapeutische Ansatzpunkte impliziert.

3.7 Untersuchung der Knochenmarksproben von Brustkrebspatient*innen

Grundlage

Auf der Grundlage der Ergebnisse der Spiking-Experimente, die gezeigt haben, dass die DTC-Isolierung mittels mikrofluidischer Zellseparation durchführbar ist und die PIK3CA-Mutation mittels ddPCR nachgewiesen werden kann, wurden insgesamt vier Knochenmarksproben von Brustkrebspatient*innen analysiert (siehe Abb. 18). Um die Durchführbarkeit in der klinischen Routine zu evaluieren. Zwei DTC-positive Knochenmarksproben von Patient*innen mit nachweisbarer PIK3CA-Mutation im Primärtumor wurden zur Isolierung von DTCs mit Parsortix verarbeitet. Die geschätzte Anzahl der zu erwartenden DTCs betrug 159 und 114 (siehe Tab. 13). Zusätzlich wurden zwei Proben mit einer erhöhten Allelfrequenz bzw. FA der PIK3CA-Mutation im Primärtumor untersucht, die allerdings bei der Standardmethode DTC-negativ waren.

Tab. 13: Geschätzte Anzahl an DTCs nach Parsortix-Anreicherung in Knochenmarksproben von PIK3CA-positiven Patient*innen.

Patient* innen-ID	PIK3CA- Mutation im PT	Anzahl DTCs*	KM-Volumen (mL) kryokonserviert	Geschätzte DTCs in der Probe**
41	Ja	1–3	5	159
15	Ja	1–3	5	114

* Nachweismethode: Standardverfahren, Anzahl pro $3,0 \times 10^6$ Zellen.

** Geschätzte DTCs = (DTCs nach Standardmethode) $\times$ Probenvolumen $\times$ Erntequote im Spiking-Experiment (0,6).

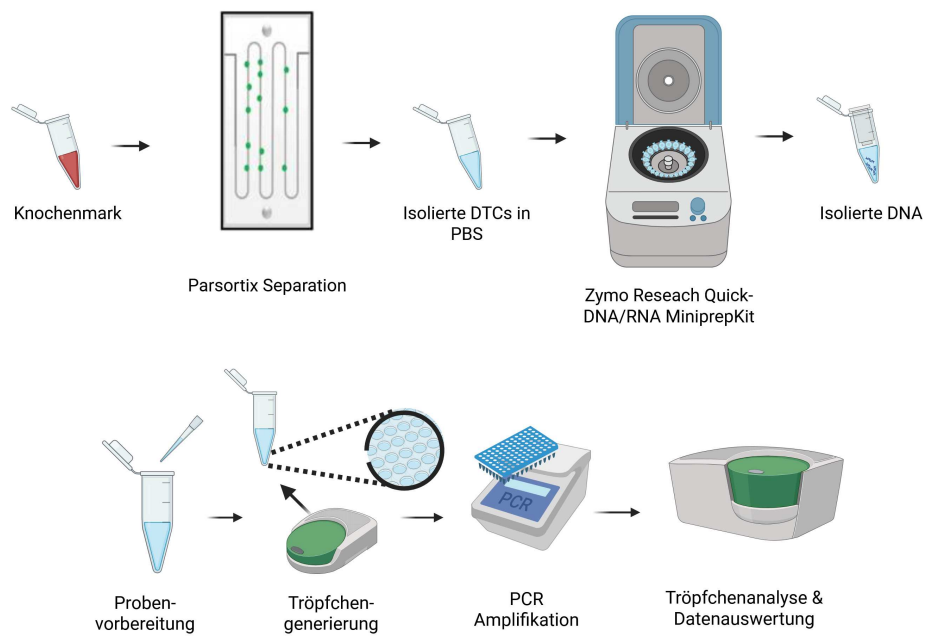


Abb. 18: Versuchsablauf der DNA-Isolation von Knochenmarksproben mittels Parsortix und ddPCR.

Ergebnisse

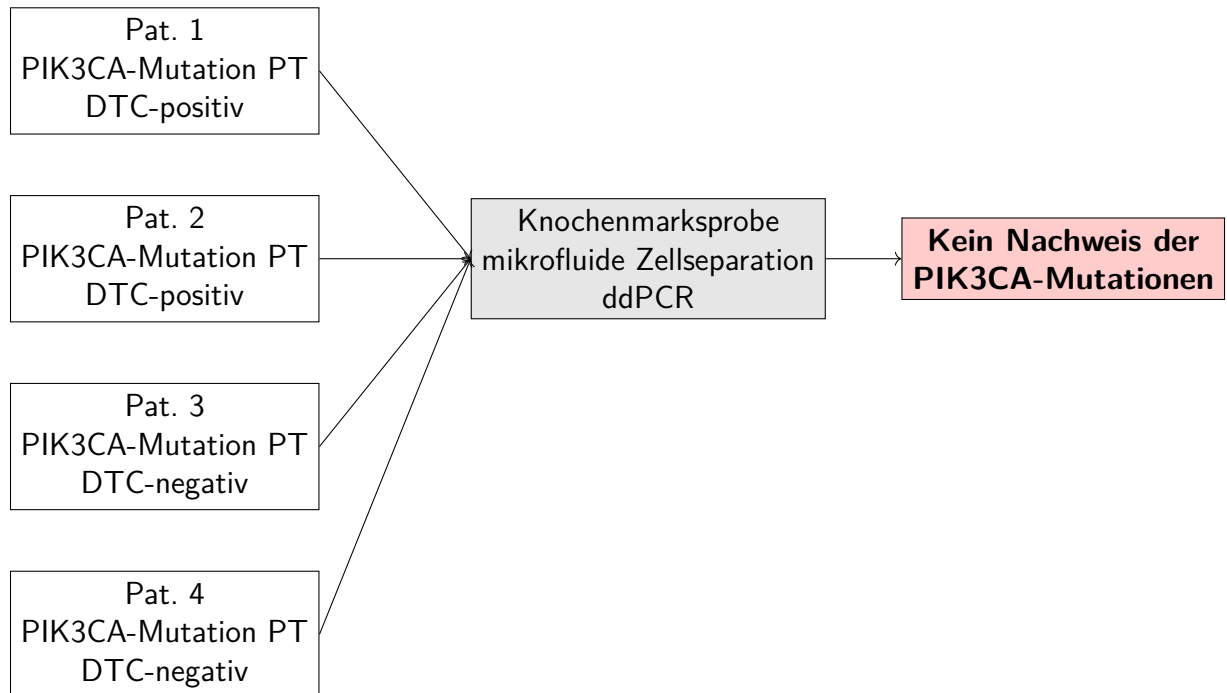


Abb. 19: Schematische Übersicht der Knochenmarksanalysen mittels Zellseparation und ddPCR. Kein Nachweis der PIK3CA-Hotspot-Mutationen in den Knochenmarksproben.

Bei allen vier BM-Proben wurden die im Primärtumor vorhandenen PIK3CA-Hotspot-Mutationen (E545K c.1633G>A, H1047R c. 3140A>G) mittels ddPCR-Assay nicht identifiziert (siehe Abb. 19).

Um eventuelle Auswirkungen der Probenqualität auf die Mutations-Detektion zu untersuchen, wurde die quantitative Auswirkung zellulärer Interferenz auf die Sensitivität der ddPCR eingehend untersucht. Dabei liegt der Fokus auf dem Einfluss variierender Konzentrationen von PBMCs auf die Mutationsnachweisraten, um mögliche Ursachen für die fehlende Detektion der PIK3CA-Mutation in den Knochenmarksproben zu identifizieren.

3.8 Quantitative Analyse der zellulären Interferenz: Prozentuale Veränderungen der Nachweisraten bei variierenden PBMC-Konzentrationen

Grundlage

Die Sensitivität des Nachweises der PIK3CA-Mutation mittels ddPCR kann durch Kontamination der Proben mit PBMCs beeinträchtigt werden. Um diese Problematik zu untersuchen, wurden Spiking-Experimente mit der PIK3CA-mutierten Zelllinie MCF7 in Knochenmarkproben durchgeführt, die unterschiedlich stark mit PBMCs belastet wurden. Ziel dieser Experimente war es, den Einfluss der PBMC-Konzentration auf die FA und die Nachweisgrenze der Mutation zu bestimmen.

In diesen Experimenten wurden MCF7-Zellen in Proben mit unterschiedlichen Mengen an PBMCs (20.000, 100.000 und 500.000) versetzt. Die MCF7-Zellen wurden in zwei Konzentrationen verwendet: 100 Zellen und 500 Zellen pro Probe. Nach der Zellseparation mittels Parsortix und DNA-Extraktion wurde die PIK3CA-Mutation p.E545K durch ddPCR analysiert. Die Ergebnisse wurden sowohl hinsichtlich der FA als auch der Nachweisgrenze untersucht, um den Einfluss der PBMC-Konzentration zu quantifizieren.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Experimente zeigten eine signifikante Abnahme der FA mit steigender PBMC-Konzentration, wie in Tab. 14 dargestellt.

Tab. 14: Ergebnisse der Nachweisgrenzen für die PIK3CA-Mutation mit unterschiedlicher Anzahl an mononukleären Blutzellen (PBMCs).

Anzahl an MCF7 Zellen (in KM)	Anzahl an PBMCs	FA (%)	PIK3CA-Mutation
100	20.000	1,81	Positiv
100	100.000	0,22	Borderline Positiv
500	20.000	4,90	Positiv
500	100.000	0,55	Positiv
500	500.000	0,18	Borderline Positiv

Eine Erhöhung der PBMC-Konzentration von 20.000 auf 100.000 führte bei 100 MCF7-Zellen zu einem Rückgang der FA um 87,85 % (siehe Berechnung 1, Material und Methoden). Bei 500 MCF7-Zellen sank die FA unter denselben Bedingungen von 4,90 % auf 0,55 %, was einer Reduktion um 88,78 % entspricht (siehe Berechnung 2). Eine Erhöhung der PBMC-Belastung von 100.000 auf 500.000 Zellen reduzierte die FA um 67,27 % (siehe Berechnung 3). Die FA konnte durch eine Erhöhung der MCF7-Zellen von 100 auf 500 Zellen bei konstanter PBMC-Konzentration (20.000) um 170,72 % gesteigert werden (siehe Berechnung 4). Die Analyse des Verhältnisses der FA bei unterschiedlichen PBMC-Konzentrationen zeigt, dass die FA bei 100.000 PBMCs nur 12 % der FA bei 20.000 PBMCs beträgt (siehe Berechnung 5).

Die Ergebnisse bestätigen, dass die PBMC-Kontamination einen wesentlichen Einfluss auf die Sensitivität des ddPCR-Assays zur Detektion der PIK3CA-Mutation hat. Eine höhere Konzentration von PBMCs verringert die Wahrscheinlichkeit, die Mutation zuverlässig nachzuweisen, was durch die Verdünnung der Tumorzell-DNA und mögliche unspezifische Effekte erklärbar ist. Um eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten, sind entweder niedrigere PBMC-Konzentrationen oder eine optimierte Probenaufbereitung erforderlich.

4 Diskussion

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass DTCs im Knochenmark bei Brustkrebs auch nach Abschluss einer Standardtherapie mit einem Wiederauftreten der Krankheit assoziiert sind, was ihre Rolle als limitierenden Faktor für das rezidivfreie Überleben unterstreicht (Riethdorf and Pantel, 2008, Gruber et al., 2014, Hartkopf et al., 2021b). Die frühe Dissemination einzelner Tumorzellen stellt einen wichtigen Schritt in der Metastasierung dar und könnte als Marker für residuale Tumorzellpopulationen dienen. Trotz verschiedener Therapieansätze und großer Fortschritte in der Onkologie treten bei etwa 30% der Patient*innen Rezidive oder Metastasen auf. Vor diesem Hintergrund ist die Charakterisierung der DTCs entscheidend, um das Verständnis des Krankheitsverlaufs und die Identifikation von therapeutischen Angriffspunkten weiter zu verbessern. Aktuell erfolgt der Nachweis von DTCs überwiegend immunhistochemisch. Die geringe Anzahl der Zellen und die Einschränkungen der derzeitigen Nachweismethoden stellen jedoch eine große Herausforderung für die molekulare Charakterisierung von DTCs dar. Es besteht daher ein hoher Bedarf an robusten Methoden für eine präzisere molekulare Typisierung von DTCs in der klinischen Routine.

4.1 Bezugnahme auf initiale Fragestellungen

Im Rahmen der Arbeit wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. **Durchführbarkeit der mikrofluiden Zellisolierung zur Anreicherung von DTCs**

Die Anwendung des Parsortix-Systems auf kryokonservierte Knochenmarksproben zeigte prinzipiell die technische Machbarkeit der DTC-Isolierung mittels mikrofluider Zellseparation. Dies wurde durch Spiking-Experimente belegt, die die Anreicherung von DTCs demonstrierten.

2. **PIK3CA-Mutationsanalyse in Primärtumoren**

Die Analyse des PIK3CA-Mutationsstatus bestätigte die erwartete Mutationsprävalenz im Primärtumorgewebe im Einklang mit publizierten Daten. Diese Daten bilden die Grundlage für die anschließende molekulare Vergleichsanalyse mit den aus dem Knochenmark isolierten Zellen.

3. **PIK3CA-Mutationsstatus in DTCs PIK3CA-positiver Tumoren**

In den Knochenmark-Proben, die aus PIK3CA-positiven Primärtumoren stammten, konnte das Vorliegen der PIK3CA-Mutation in den isolierten Zellen nicht eindeutig detektiert werden. Dieses Ergebnis lässt sowohl biologische als auch technische Ursachen als Erklärungsansätze zu.

4.2 Interpretation und Diskussion einzelner Ergebnisse

Vorergebnisse zur mikrofluidischen Separation von DTCs zeigten eine signifikant höhere Ausbeute an isolierten Tumorzellen im Vergleich zur konventionellen Methode der immunhistochemischen Färbung (Volmer et al., 2023). Unsere Ergebnisse zeigen eine Einfangrate von 82,76 %, eine Ernterate von 50 % und eine Wiederfindungsrate von 41,38 %, und stehen im Einklang mit Studien zur DTC-Wiederfindungsrate, die zwischen 26 % bei der DTC-Isolierung aus dem Knochenmark (Pillai et al., 2021) und 54-69 % für CTCs und 72,8 % für Melanom-DTCs (Hvichia et al., 2016, Cohen et al., 2022) liegen. Die in verschiedenen Studien beobachteten Unterschiede bei den Erfassungs- und Wiederfindungsraten lassen sich vermutlich auf eine Vielzahl technischer und biologischer Faktoren zurückführen, darunter unterschiedliche Geräteeinstellungen, Variationen in der Probenverarbeitung sowie heterogene, intrinsische Eigenschaften der Tumorzellen wie Zellgröße, Plastizität oder Oberflächenmarkerexpression. Trotz dieser Variabilität zeigt sich, dass mikrofluidische Systeme wie Parsortix grundsätzlich für die Anreicherung von DTCs aus dem Knochenmark geeignet sind. Allerdings bleibt die Probenreinheit der isolierten Zellfraktionen weiterhin eine zentrale Herausforderung, die durch Optimierung der Zellseparation und der nachfolgenden Analyseverfahren in Folgestudien beachtet werden muss. Die im Vergleich dazu bislang überwiegend qualitativ eingesetzte klassische immunhistochemische DTC-Detektion bietet derzeit keine standardisierte quantitative Grundlage für direkte methodische Vergleiche, unterstreicht jedoch die klinische Relevanz der DTC-Analyse insgesamt.

PIK3CA-Mutationen gelten als eine der häufigsten genetischen Veränderungen bei Brustkrebs, was sich sowohl auf das Tumorverhalten als auch auf die klinische Behandlung auswirkt (Reinhardt et al., 2022). So haben sich potenzielle therapeutische Optionen für Brustkrebs-Patient*innen mit PI3K-mutierten Tumoren etabliert (Fusco et al., 2021, Turner et al., 2023). Die Ergebnisse der PIK3CA-Analyse der Primärtumore mit 42,9 % Mutationsnachweis zeigte eine ähnliche Verteilung wie bereits in vorliegenden Studien (Gonzalez-Angulo et al., 2011, Martínez-Sáez et al., 2020, Lambert et al., 2019).

In den analysierten Knochenmarkproben, die DTCs enthielten, wurden jedoch keine PIK3CA-Mutationen nachgewiesen. Mögliche Gründe für das Fehlen von PIK3CA-Mutationen in der ddPCR-Analyse sind sowohl Tumorheterogenität als auch technische Einschränkungen. Diese

werden im Folgenden diskutiert:

Angesichts der molekularen Heterogenität zwischen DTCs, Makrometastasen und Primärtumor (Magbanua et al., 2018, Thulin et al., 2021) und der Entwicklung der genotypischen Divergenz im Laufe der Zeit (Deng et al., 2014) ist es plausibel, dass die DTCs in den Knochenmarkproben tatsächlich PIK3CA-negativ waren, was die biologische Tumorerheterogenität widerspiegelt. Solche klonalen Unterschiede können sich bereits früh im Verlauf der Dissemination entwickeln und im weiteren Krankheitsverlauf durch Selektion und Therapie weiter verstärken (Deng et al., 2014).

Zusätzlich müssen auch technische Einschränkungen berücksichtigt werden. Die niedrige Anzahl von DTCs, die typischerweise in Knochenmarkproben vorhanden sind - es wird von ca. 10-20 DTCs pro Millionen Knochenmark-Zellen berichtet (Riethdorf and Pantel, 2008) -, erhöht die Wahrscheinlichkeit falsch-negativer Ergebnisse aufgrund einer begrenzten Nachweisempfindlichkeit. Unsere Ergebnisse deuten auf eine untere Nachweisgrenze für PIK3CA-Mutationen von etwa 160 Zellen pro Probe hin, wenn die mikrofluidische Methodik und ddPCR verwendet werden. Darüber hinaus sollten die möglichen Auswirkungen der Kryokonservierung berücksichtigt werden, da sie zu einem Zellverlust führen kann, der die Nachweisempfindlichkeit weiter beeinträchtigt. In dieser Studie war die Kryokonservierung aufgrund der retrospektiven Analyse der histopathologischen Details notwendig.

Dies unterstreicht die Notwendigkeit, die DTC-Isolierungs- und Konservierungsmethoden zu optimieren, um die Mutationsanalyse in Knochenmarkproben zu verbessern.

Die Kontamination mit Nicht-Zielzellen, insbesondere die Anwesenheit von mononukleären und Knochenmark-Stammzellen stellt eine große Herausforderung bei der Analyse dar. Es liegt nahe, dass die mikrofluidische Methode zur Zellseparation zu einer übermäßigen Anreicherung dieser nicht-tumoralen Zelltypen geführt hat. Die Parsortix-Methode neigt dazu, mononukleäre Knochenmark-Zellen zu ko-isolieren, wie bereits in früheren Studien beschrieben wurde (Pillai et al., 2021). Infolge dessen könnte die DTC-Population in den isolierten Proben stark verdünnt worden sein. Dies hätte zur Folge, dass das PIK3CA-Signal möglicherweise abgeschwächt oder vollständig maskiert wurde. Diese Hypothese wird durch

die durchgeführten Spiking-Experimente gestützt, bei denen der Nachweis von Mutationen in kleinen Mengen von DTCs in Anwesenheit von einer geringen und einer hohen Anzahl von PBMC mittels ddPCR untersucht wurde. Insgesamt zeigte sich, dass die FA bei einer höheren PBMC-Konzentration nur 4-12 % beträgt, verglichen mit der FA bei einer niedrigeren PBMC-Konzentration. Daher könnten weitere Anreicherungsschritte nach mikrofluider Isolation erforderlich sein, um eine höhere Reinheit der isolierten DTCs zu gewährleisten.

Dennoch bleibt offen, was der tatsächliche Grund für den fehlenden Nachweis von PIK3CA-Mutationen in den untersuchten Knochenmarkproben war. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Parsortix in Bezug auf die Menge der Nicht-Zielzellen weder kontrollierbar noch vorhersehbar ist.

4.3 Methodische Überlegungen

Die mikrofluide Zellseparation wurde gewählt, da diese Methode eine schonende, effiziente und reproduzierbare Anreicherung von DTCs ermöglicht. Sie bietet den Vorteil, dass sie ohne Markierungen arbeitet und somit epitopunabhängig ist, so dass die DTCs unverfälscht isoliert werden. Alternative Verfahren wie immunomagnetische Separation oder Dichtegradientenzentrifugation weisen zwar ebenfalls Vorteile auf, sind jedoch entweder mit einem höheren Risiko der Zellmanipulation verbunden oder weniger präzise in der Trennung bestimmter Zellpopulationen. Die mikrofluide Plattform bot zudem die Chance auf eine Automatisierung und Standardisierung des Prozesses der DTC-Isolierung und dessen Aufarbeitung. Verschiedene Faktoren können jedoch zu Schwankungen in der Zellausbeute führen. Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit standardisierte Protokolle und Kontrollproben eingesetzt wurden, um diese Effekte zu minimieren, kann eine vollständige Eliminierung solcher systematischen Variabilitäten nicht garantiert werden.

Obwohl es verschiedene molekulargenetische Methoden zur Mutationsanalyse gibt, die verwendet werden könnten, wie z.B. Next-Generation-Sequencing (NGS) oder klassische PCR, wurde in dieser Arbeit die ddPCR gewählt. Diese Methode bietet eine präzise Quantifizierung von Allelfrequenzen, was für die diagnostische Interpretation von Mutationen essenziell ist. So ist die Methode gekennzeichnet durch eine hohe Spezifität und Sensitivität bei der Detektion von geringen DNA-Mengen, wie z.B. bei DTCs. Im Kontext dieser Arbeit war es wichtig, eine Methode zu wählen, die auch in der klinischen Routine umsetzbar wäre, d.h. die robust, kosteneffizient, relativ einfach in der Handhabung und ohne extrem hohen technischen oder bioinformatischen Aufwand ist.

4.4 Limitationen der Arbeit

Ein weiterer limitierender Faktor dieser Arbeit ist die geringe Anzahl an DTC-Proben, die aus Patient*innen mit PIK3CA-positiven Primärtumoren stammten. Insgesamt zeigten sich zwei der 82 Proben PIK3CA-positiv im Primärtumor und gleichzeitig DTC-positiv in der Standardmethode. Diese geringe Anzahl limitiert die Aussagekraft der Studie insbesondere in Bezug auf die Konkordanz der Mutationslast zwischen Primärtumor und DTCs sowie hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine breitere Patientinnenpopulation.

Aufgrund der relativ engen Einschlusskriterien sowie des limitierten Patientenkollektivs kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass die untersuchte Kohorte nur bedingt repräsentativ für die Gesamtheit der Patientinnen mit dieser Tumorentität ist. Möglicherweise hätten alternative Einschlusskriterien — beispielsweise eine gezielte Rekrutierung von Patientinnen mit bekannten Hochrisikokonstellationen, höherer Tumorlast oder fortgeschrittenem Erkrankungsstadium — zu einer höheren Rate an DTC-positiven Proben geführt bzw. höhere Anzahlen an DTCs pro Probe geliefert und damit die statistische Aussagekraft der Analyse erhöht.

4.5 Schlussfolgerungen und Relevanz für die Klinik

Die Ergebnisse zeigen, dass Parsortix unter bestimmten Voraussetzungen, z.B. bei höherer DTC-Zahl und geringer Kontamination, prinzipiell für molekulare DTC-Analysen geeignet ist. Gleichzeitig unterstreichen die Ergebnisse die Limitationen der Methode bei niedriger Tumorlast und hoher PBMC-Kontamination. Zusätzliche Zellanreicherungsverfahren könnten die Reinheit und damit die molekulare Detektionsrate verbessern. Der Einsatz sensitiver Methoden wie Einzelzellsequenzierungen könnte eine alternative Methode zur Charakterisierung der DTCs darstellen, ist jedoch derzeit für die breite klinische Anwendung noch nicht praktikabel. Für die klinische Praxis könnte die Etablierung standardisierter Anreicherungs- und Analyseverfahren langfristig helfen, den prognostischen und therapeutischen Nutzen der DTC-Analyse besser nutzbar zu machen.

4.6 Ausblick

Für zukünftige Studien wäre die Erweiterung der Mutationsanalysen auf weitere therapeutisch relevante Gene (z.B. ESR1, TP53, HER2) sinnvoll, um ein umfassenderes molekulares Profil der DTCs zu erhalten. Darüber hinaus wäre ein Vergleich der molekularen Profile zwischen Primärtumor, DTCs und Fernmetastasen wünschenswert, um die klonale Evolution besser zu verstehen und prädiktive Marker für Metastasierung und Therapieresistenz zu identifizieren. Eine prospektive Studie an größeren Kohorten mit nativen Proben könnte dabei helfen, methodenbedingte Limitationen wie Zellverlust durch Kryokonservierung zu vermeiden.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der epitopunabhängigen Detektion und genetischen Charakterisierung disseminierter Tumorzellen (DTCs) bei Brustkrebs. Ausgangspunkt war die Herausforderung, dass konventionelle immunhistochemische Nachweisverfahren aufgrund ihrer Abhängigkeit von Oberflächenmerkmalen eine begrenzte Sensitivität aufweisen und somit potentiell relevante DTCs übersehen werden könnten. Im Rahmen dieser Studie wurde erstmals die Kombination einer mikrofluiden Isolation durch Parsortix und der nachfolgenden genetischen Analyse mittels anschließender ddPCR durchgeführt. Es erfolgte eine Vergleichsanalyse zur Präsenz von PIK3CA-Hotspot-Mutationen in Brustkrebstumoren und entsprechenden DTCs. Ziel war es daher, das mikrofluidische Parsortix-System hinsichtlich seiner Eignung zur Anreicherung einer hohen Anzahl an DTCs aus kryokonservierten Knochenmarkproben zu evaluieren und diese mittels digitaler Tröpfchen-PCR (ddPCR) gezielt auf PIK3CA-Mutationen zu untersuchen – eine Mutation, die mit Tumorprogression und Therapieresistenz in Verbindung steht.

Die Untersuchung gliederte sich entlang drei zentraler Fragestellungen: Erstens wurde die Durchführbarkeit und Leistungsfähigkeit der Parsortix-Methode hinsichtlich einer epitopunabhängigen DTC-Isolation bewertet. Hier zeigte sich, dass Parsortix im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren eine deutlich höhere Zellanzahl liefern kann und lebensfähige Zellen zur Verfügung stellt, die theoretisch für weiterführende molekulare Analysen oder Organoidkulturen geeignet sind. Zweitens wurde der Mutationsstatus von PIK3CA in Primärtumoren einer Patient*innenkohorte bestimmt, wobei erwartungsgemäß bei einem relevanten Anteil PIK3CA-Hotspot-Mutationen detektiert wurden. Drittens wurde geprüft, ob diese Mutationen auch in den zugehörigen DTCs nachweisbar sind. Hier zeigten die ddPCR-Analysen, dass die entsprechenden PIK3CA-Mutationen in den DTCs nicht detektiert werden konnten.

Diese Ergebnisse weisen entweder auf eine Diskrepanz zwischen dem genetischen Profil von Primärtumoren und DTCs, oder auf technische Ursachen hin. Insbesondere die Kontamination mit Nicht-Zielzellen stellt eine zentrale Limitation der Parsortix-Methode dar und beeinträchtigt die Aussagekraft auch hochsensitiver molekularer Analysen wie der ddPCR. Die ergänzenden Versuche mit mononukleären Zellen untermauern die Einschätzung, dass

trotz der erfolgreichen Anreicherung der Zellen im Vergleich zu konventionellen Verfahren, die erforderliche Reinheit zur zuverlässigen Detektion von Mutationen nicht erreicht wird. Damit verdeutlicht die Studie sowohl das technische Potenzial als auch die gegenwärtigen Grenzen der mikrofluiden Parsortix-Technologie. Während die Methode eine vielversprechende Alternative zur klassischen Immunhistochemie bietet, bleibt ihre Anwendbarkeit für molekulare Untersuchungen derzeit eingeschränkt – vor allem durch die nicht kontrollierbare Beimischung von nicht-tumoralen Zellen, die die Sensitivität genetischer Nachweisverfahren erheblich mindern kann.

Die fehlende Detektion von PIK3CA-Mutationen in DTCs unterstreicht daher den Bedarf an sensitiveren Anreicherungstechnologien, umfassenderen genetischen Analysen, die eine höhere Reinheit der Zielzellen gewährleisten und zugleich mit molekularen Assays wie NGS kompatibel sind. Diese könnten das komplexe Zusammenspiel zwischen DTCs und dem Fortschreiten von Brustkrebs detaillierter aufschlüsseln und so die Grundlage für personalisierte Therapiemöglichkeiten legen.

Insgesamt macht die Arbeit deutlich, dass für eine zuverlässige genetische Charakterisierung von DTCs, insbesondere im Hinblick auf klinisch relevante Mutationen wie PIK3CA, weiterentwickelte Anreicherungstechnologien und ergänzende Analyseverfahren erforderlich sind. Die Kombination solcher Methoden könnte zukünftig helfen, die molekulare Heterogenität von DTCs präziser zu erfassen und deren Bedeutung für Metastasierung und Therapieansprechen besser zu verstehen. Die gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen somit sowohl das Potenzial mikrofluidischer Systeme als auch die Notwendigkeit weiterer technologischer Optimierung zur Etablierung einer präzisen und personalisierten Krebsdiagnostik.

Literaturverzeichnis

- Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer*, 7(11):834–846.
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., and Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 50(1):33.
- Alix-Panabières, C., Mader, S., and Pantel, K. (2017). Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 95(2):133–142.
- Borriello, L., Coste, A., Traub, B., Sharma, V. P., Karagiannis, G. S., Lin, Y., Wang, Y., Ye, X., Duran, C. L., Chen, X., Friedman, M., Sosa, M. S., Sun, D., Dalla, E., Singh, D. K., Oktay, M. H., Aguirre-Ghiso, J. A., Condeelis, J. S., and Entenberg, D. (2022). Primary tumor associated macrophages activate programs of invasion and dormancy in disseminating tumor cells. *Nature Communications*, 13(1):626.
- Braun, S., Vogl, F. D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M. P., Coombes, R. C., Schlimok, G., Diel, I. J., Gerber, B., Gebauer, G., Pierga, J.-Y., Marth, C., Oruzio, D., Wiedswang, G., Solomayer, E.-F., Kundt, G., Strobl, B., Fehm, T., Wong, G. Y., Bliss, J., Vincent-Salomon, A., and Pantel, K. (2005). A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(8):793–802.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., and Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3):229–263.
- Brierley, J., Gospodarowicz, M. K., and Wittekind, C., editors (2017). *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons, Inc, Chichester, West Sussex, UK Hoboken, NJ, eighth edition edition.
- Broeders, M., Moss, S., Nyström, L., Njor, S., Jonsson, H., Paap, E., Massat, N., Duffy, S., Lynge, E., and Paci, E. (2012). The Impact of Mammographic Screening on Breast Cancer Mortality in Europe: A Review of Observational Studies. *Journal of Medical Screening*, 19(1_suppl):14–25.

- Burstein, H., Curigliano, G., Gnant, M., Loibl, S., Regan, M., Loi, S., Denkert, C., Poortmans, P., Cameron, D., Thurlimann, B., Weber, W., Aebi, S., Al-Foheidi, M., Bago-Horvath, Z., Bidard, F.-C., Boughey, J., Morales, D. B., Brucker, S., Burstein, H. J., Cameron, D., Cardoso, M.-J., Carey, L., Chia, S., Coles, C., Cortes, J., Curigliano, G., Dawood, S., de Boniface, J., Demichele, A., Denkert, C., Fastner, G., Francis, P., Galimberti, V. E., Mahmoud, H. G., Giuliano, A., Gnant, M., Gulluoglu, M. B., Harbeck, N., Huang, C.-S., Huober, J., Janni, W., Jhaveri, K., Jiang, Z., Kaidar-Person, O., Kaklamani, V., Kalinsky, K., Kauer-Dorner, D., Kelly, C. M., Kim, S. Y., Kok, M., Lambertini, M., Loi, S., Loibl, S., Mamounas, E., Metcalfe, K., Michel, L., Morrow, M., Munshi, A., Oliveira, M., Paluch-Shimon, S., Piccart, M., Pistilli, B., Poortmans, P., Potter, S., Regan, M., Isabel, Rubio, Rugo, H. S., Saji, S., Manich, C. S., Senkus, E., Shao, Z., Singer, C., Solbach, C., Symmans, W. F., Tausch, C., Thürlimann, B., Tokunaga, E., Turner, N., Tutt, A., Urban, C., Vetter, M., Villarreal-Garza, C., Vrancken Peeters, M. J., Weber, W., Wildiers, H., Xu, B., and Yin, Y. (2025). Tailoring treatment to cancer risk and patient preference: the 2025 St Gallen International Breast Cancer Consensus Statement on individualizing therapy for patients with early breast cancer. *Annals of Oncology*, 36(12):1433–1446.
- Cackowski, F. C., Wang, Y., Decker, J. T., Sifuentes, C., Weindorf, S., Jung, Y., Wang, Y., Decker, A. M., Yumoto, K., Szerlip, N., Buttitta, L., Pienta, K. J., Morgan, T. M., and Taichman, R. S. (2019). Detection and isolation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with clinically localized prostate cancer. *The Prostate*, 79(14):1715–1727.
- Catsburg, C., Miller, A. B., and Rohan, T. E. (2015). Active cigarette smoking and risk of breast cancer: **A** ctive Cigarette Smoking and Risk of Breast Cancer. *International Journal of Cancer*, 136(9):2204–2209.
- Chemi, F., Mohan, S., Guevara, T., Clipson, A., Rothwell, D. G., and Dive, C. (2021). Early Dissemination of Circulating Tumor Cells: Biological and Clinical Insights. *Frontiers in Oncology*, 11:672195.
- Cohen, E. N., Jayachandran, G., Moore, R. G., Cristofanilli, M., Lang, J. E., Khoury, J. D., Press, M. F., Kim, K. K., Khazan, N., Zhang, Q., Zhang, Y., Kaur, P., Guzman, R., Miller, M. C., Reuben, J. M., and Ueno, N. T. (2022). A Multi-Center Clinical Study to

- Harvest and Characterize Circulating Tumor Cells from Patients with Metastatic Breast Cancer Using the Parsortix® PC1 System. *Cancers*, 14(21):5238.
- Deng, G., Krishnakumar, S., Powell, A. A., Zhang, H., Mindrinos, M. N., Telli, M. L., Davis, R. W., and Jeffrey, S. S. (2014). Single cell mutational analysis of PIK3CA in circulating tumor cells and metastases in breast cancer reveals heterogeneity, discordance, and mutation persistence in cultured disseminated tumor cells from bone marrow. *BMC Cancer*, 14(1):456.
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, A. (2024). Leitlinienprogramm Onkologie. S3- Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4, 2021, AWMF Registernummer: 032-045OL. Technical Report AWMF Registernummer: 032-045OL, AWMF.
- Diel, I., Kaufmann, M., Costa, S., Kaul, S., Krempien, B., Goerner, R., and Bastert, G. (1990). Prognostische Bedeutung des Tumorzellnachweises im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 50(12):923–928.
- Dupont Jensen, J., Laenkholm, A.-V., Knoop, A., Ewertz, M., Bandaru, R., Liu, W., Hackl, W., Barrett, J. C., and Gardner, H. (2011). *PIK3CA* Mutations May Be Discordant between Primary and Corresponding Metastatic Disease in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(4):667–677.
- Erdmann, F., Spix, C., Katalinic, A., Christ, M., Folkerts, J., Hansmann, J., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Treml, K., Vollmer, G., Weg-Remers, S., Barnes, B., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Fiebig, J., Franke, M., Gurung-Schönfeld, I., Haberland, J., Imhoff, M., Kraywinkel, K., Starker, A., Von Berenberg-Gossler, P., and Wienecke, A. (2021). Krebs in Deutschland für 2017/2018. Technical report, Robert Koch-Institut.
- Fehm, T., Banys, Hartkopf, Krawczyk, Meier-Stiegen, Neubauer, and Kaiser (2012). Dormancy in breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, page 183.
- Fehm, T., Braun, S., Muller, V., Janni, W., Gebauer, G., Marth, C., Schindlbeck, C., Wallwiener, D., Borgen, E., Naume, B., Pantel, K., and Solomayer, E. (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.

- Friberg, S. and Nystrom, A. (2015). Cancer Metastases: Early Dissemination and Late Recurrences. *Cancer Growth and Metastasis*, 8:CGM.S31244.
- Fusco, N., Malapelle, U., Fassan, M., Marchiò, C., Buglioni, S., Zupo, S., Criscitiello, C., Vigneri, P., Dei Tos, A. P., Maiorano, E., and Viale, G. (2021). PIK3CA Mutations as a Molecular Target for Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11:644737.
- Geyer, C., Garber, J., Gelber, R., Yothers, G., Taboada, M., Ross, L., Rastogi, P., Cui, K., Arahmani, A., Aktan, G., Armstrong, A., Arnedos, M., Balmaña, J., Bergh, J., Bliss, J., Delaloge, S., Domchek, S., Eisen, A., Elsafty, F., Fein, L., Fielding, A., Ford, J., Friedman, S., Gelmon, K., Gianni, L., Gnant, M., Hollingsworth, S., Im, S.-A., Jager, A., Jóhannsson, O., Lakhani, S., Janni, W., Linderholm, B., Liu, T.-W., Loman, N., Korde, L., Loibl, S., Lucas, P., Marmé, F., Martinez de Dueñas, E., McConnell, R., Phillips, K.-A., Piccart, M., Rossi, G., Schmutzler, R., Senkus, E., Shao, Z., Sharma, P., Singer, C., Španić, T., Stickeler, E., Toi, M., Traina, T., Viale, G., Zoppoli, G., Park, Y., Yerushalmi, R., Yang, H., Pang, D., Jung, K., Mailliez, A., Fan, Z., Tennevet, I., Zhang, J., Nagy, T., Sonke, G., Sun, Q., Parton, M., Colleoni, M., Schmidt, M., Brufsky, A., Razaq, W., Kaufman, B., Cameron, D., Campbell, C., Tutt, A., Sevela, P., Haslbauer, F., Penzinger, M., Öhler, L., Tinchon, C., Greil, R., Heibl, S., Bartsch, R., Wette, V., Singer, C. F., Pasterk, C., Helfgott, R., Pristauz-Telsnigg, G., Stöger, H., Weltermann, A., Egle, D., Thiel, I., Fuchs, D., Rumpold, H., Strasser-Weippl, K., Rautenberg, B., Müller, V., Schmidt, M., Paepke, S., Aydogdu, M., Thomssen, C., Rom, J., Mau, C., Fasching, P., Göhring, U.-J., Kühn, T., Noeding, S., Kümmel, S., Hackmann, J., Stickeler, E., Joshi, A., Dewar, J., Friedlander, M., Phillips, K.-A., Antill, Y., Woodward, N., Abdi, E., Tiley, S., George, M., Boadle, D., Goodwin, A., van der Westhuizen, A., Kannourakis, G., Murray, N., McCarthy, N., Kroep, J., de Boer, M., Heijns, J., Jager, A., Erdkamp, F., Bakker, S., Sonke, G. S., Sami, A., Mackey, J., Prady, C., Eisen, A., Desbiens, C., Patocskai, E., Ferrario, C., Gelmon, K., Bordeleau, L., Chalchal, H., Niraula, S., ido wolf, Senkus, E., Duhoux, F., Randal d'Hondt, Luce, S., Roodenbeke, D. t. d., Papadimitriou, K., Borms, M., Quaghebeur, C., Jacot, W., Brain, E., Venat-Bouvet, L., Lortholary, A., Nowecki, Z., Cardoso, F., Hayward, R., Bella, S., Lazzaro, M. F., Pilnik, N., Fein, L. E., Blajman, C., Lerzo, G., Varela, M., Zarba, J. J., Kaen, D., Constanzo, M. V., Tio, J., Siggelkow, W., Jackisch, C., Grischke, E. M., Zahm, D., Tato-Varela, S., Schmatloch, S., Klare, P., Stefek, A., Rhiem,

K., Hoffmann, O., Kümmel, S., Deryal, M., Gröll, I., Ledwon, P., Uleer, C., Krabisch, P., Potenberg, J., Darsow, M., Park-Simon, T.-W., Höffkes, H.-G., Emde, T.-O., Graffunder, G., Tomé, O., Forstmeyer, D., Terhaag, J., Salat, C., Kast, K., Weniger, S., Schreiber, C., Heinrich, B., Dieterich, M., Wüllner, M. P., Conejero, R. A., García Saenz, J. A., Martinez, L. C., Lanza, A. A., Murillo, S. M., Carrasco, F. H., Tormo, S. B., López, I., Delgado Mingorance, J. I., Gomez, E. A., Santisteban, M., Jurado, J. C., Quiroga, V., Borrego, M. R., Martínez de Dueñas, E., Alés Martínez, J. E., De la Haba, J., Jañez, N. M., Lescure, A. R., Torres, A. A., Crusades, G. L., González-Santiago, S., Aragones, A. M., Ortega, A. L., Molins, A. B., Chacón López-Muniz, J. I., Jiménez, M. M., Bertrán, A. S., Rodríguez, C., Cortijo, L. G., Cretella, E., Cortesi, L., Ruggeri, E. M., Verusio, C., Gori, S., Bonetti, A., Mosconi, A. M., Johannsson, O., Jerusalem, G., Neven, P., Nagy, T., Pinotti, G., Colleoni, M. A., Bernardo, A., Gianni, L., Bucci, E., Biganzoli, L., Dedes, K., Novak, U., Zaman, K., Braybrooke, J., Winter, M., Rea, D., Kelleher, M., Barrett, S., Chan, S., Hickish, T., Hurwitz, J., Conibear, J., Jegannathen, A., Parton, M., Tutt, A., Allerton, R., Borley, A., Armstrong, A., Copson, E., Levitt, N., Abraham, J., Perren, T., Roylance, R., Ishida, K., Toyama, T., Masuda, N., Watanabe, J., Tokunaga, E., Kinoshita, T., Rai, Y., Takada, M., Yanagita, Y., Nakamura, R., Nakayama, T., Naoi, Y., Iwata, H., Nakamura, S., Takahashi, M., Aogi, K., Tsugawa, K., Mukai, H., Takano, T., Osaki, A., Sato, N., Yamauchi, H., Tokuda, Y., Ito, M., Sugimoto, T., Bahadur, S. W., Ganz, P. A., Lu, M. J., Lu, M. J., Mita, M. M., Waisman, J., Polikoff, J. A., Telli, M. L., Seaward, S. A., Suga, J. M., Seaward, S. A., Suga, J. M., Durna, L. N., Carney, J. F., Menter, A., Suga, J. M., Puthillath, A., Polikoff, J. A., Suga, J. M., Rohatgi, N., Suga, J. M., Polikoff, J. A., Polikoff, J. A., Feusner, J. H., Bobolis, K. A., Polikoff, J. A., Eisenberg, P. D., Suga, J. M., Polikoff, J. A., Wong, D., Borges, V. F., Urquhart, A. T., Hofstatter, E. W., Hofstatter, E. W., Hofstatter, E. W., McCarron, E. C., Isaacs, C., Herbolzheimer, P., Varadarajan, R., Raben, A., Deveras, R. A. E., Valdes-Albini, F., Mahtani, R. L., Mahtani, R. L., Meisel, J. L., Sumrall, B. T., Jones, C. F., Ofori, S. N., Sumida, K. N., Sumida, K. N., Karwal, M., Wilbur, D. W., Singh, J., Spector, D. M., Schallenkamp, J., Merkel, D. E., Lo, S. S., Khosla, P. G., Cristofanilli, M., Flaum, L., Hoskins, K. F., Cobleigh, M. A., Lambiase, E. A., Hahn, O. M., Oliff, I. A., Faller, B. A., Wade, J. L., Burhani, N. D., Wade, J. L., Gil, A., Einhorn, H. E., Storniolo, A. M., Chang, B. K., Kalra, M., Robin, E. L., Ansari, B., Sharma, P., Dakhil, S. R., Dakhil, S. R., Deming,

R. L., Cole, J. T., Cole, J. T., Cole, J. T., Hanson, D. S., Ochoa, A. C., Cole, J. T., Ochoa, A. C., Garber, J. E., Garber, J. E., Zimbler, H., Armstrong, D. K., Tkaczuk, K. H., Riseberg, D. A., Armstrong, D. K., O'Connor, B. M., Openshaw, T. H., Openshaw, T. H., Openshaw, T. H., Zakalik, D., Vakhariya, C. M., Schott, A. F., Simon, M. S., Doyle, T. J., Al Baghdadi, T., VanderWoude, A., Flynn, P. J., Zera, R. T., Friday, B. E., Ruddy, K. J., Zera, R. T., Smith, R., Flynn, P. J., Ademuyiwa, Olabisi, F., Ellis, R., Carlson, J. W., Carlson, J. W., Marchello, T. B., Levine, E. A., Marcom, P. K., Harkness, C. B., Tan, A. R., Charles, W. J., Kuzma, C. S., Asaad, S., Radford, J. E., Steen, P. D., Unnikrishnan, M., Seeger, G. R., Leu, K. M., Copur, M. S., Hauke, R. J., Soori, G. S., Hauke, R. J., Arrick, B. A., Reeder, J. G., Toppmeyer, D. L., Dayao, Z. R., Adams, S., Andreopoulou, E., Allison, M., Anampa Mesias, J. D., Sharma, R., Ramaswamy, B., Gerds, A. T., Shenk, R. R., Gross, H. M., Trehan, S., Gross, H. M., Gross, H. M., Gross, H. M., Shenk, R. R., Gross, H. M., Shenk, R. R., Razaq, W., Mansoor, A. H., Hilton, C. J., Brufsky, A. M., Huynh, C., Chowdhury, N., Domchek, S. M., Sigurdson, E. R., Cescon, T. P., Rovito, M. A., DeNittis, A. S., Vogel, V. G., Julian, T. B., Boyle, L., Baez-Diaz, L., Brescia, F. J., Doster, J. E., Siegel, R. D., Wong, L., Patel, T., Nangia, J. R., Jones, C. A., Cannon, G. M., Cannon, G. M., Bear, H. D., Vachhani, H., Wilkinson, M., Wood, M. E., Wood, M. E., Yan, F., Sui, X., van Haelst, C. M., Specht, J. M., Zhuo, Y., Qamar, R., Ryan, M. L., Stockham, A., Virani, S., Qamar, R., Gayle, A. A., Qamar, R., Qamar, R., Jubelirer, S. J., Kurian, S., Salkeni, M. A., Loman, N., Linderholm, B., Silander, G., Hallbeck, A.-L., von Wachenfeldt Våppling, A., Curtit, E., Cardoso, C., Braga, S., Abreu, M., Casa-Nova, M., Nave, M., Ciruelos Gil, E. M., Gelpi, J. B., Ortega, A. F., Padró, J. G., Bermejo de las Heras, B., Cao, M. G., Bañuelos, J. C., Company, J. A., Villaró, G. V., Estevez, L. G., Huober, J., Busch, S., Fehm, T., Hahn, A., Grafe, A., Noesselt, T., Dewitz, T., Wagner, H., Bechtner, C., Weigel, M., Kolberg, H.-C., Decker, T., Thomalla, J., Hesse, T., Harbeck, N., Jens-Uwe Blohmer, J. S., Wolf Sütterlin, M., Altena, R., Chiu, C.-F., Chen, S.-C., Hou, M.-F., Chang, Y.-C., Chen, S.-H., Chen, S.-T., Huang, C.-S., Yeh, D.-C., Yu, J.-C., Tseng, L.-M., Chung, W.-P., Mailliez, A., Petit, T., Delaloge, S., Lévy, C., Dalivoust, P., Extra, J.-M., Mouret-Reynier, M.-A., Hardy-Bessard, A.-C., Simon, H., L'Haridon, T., Mege, A., Giacchetti, S., Chakiba-Brugere, C., Gratet, A., Pottier, V., Ferrero, J.-M., Tennevet, I., Perrin, C., Canon, J.-L., Joris, S., Shao, Z., Xu, B., Jiang, Z., Sun, Q., Shen, K., Pang, D., Zhang, J., Wang, S., Yang, H., Liao, N., Zheng, H., Fu, P., Song,

- C., Wang, Y., Fan, Z., Geng, C., Tredan, O., Landherr, L., Kaufman, B., Yerushalmi, R., Uziely, B., Conte, P., Zamagni, C., Bianchini, G., De Laurentiis, M., Tondini, C., Gebbia, V., Ciccarese, M., Sarosiek, T., Mackiewicz, J., Słowińska, A., Kalinka, E., Huzarski, T., Im, S.-A., Jung, K. H., Sohn, J. H., Kim, J. H., Lee, K. S., Park, Y. H., Lee, K. E., Chae, Y. S., and Cho, E. K. (2022). Overall survival in the OlympiA phase III trial of adjuvant olaparib in patients with germline pathogenic variants in BRCA1/2 and high-risk, early breast cancer. *Annals of Oncology*, 33(12):1250–1268.
- Gonzalez-Angulo, A. M., Ferrer-Lozano, J., Stemke-Hale, K., Sahin, A., Liu, S., Barrera, J. A., Burgues, O., Lluch, A. M., Chen, H., Hortobagyi, G. N., Mills, G. B., and Meric-Bernstam, F. (2011). PI3K Pathway Mutations and PTEN Levels in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(6):1093–1101.
- Grollmann, H., Volz, B., Schroth, W., Bahlinger, V., Hartkopf, A., Brucker, S. Y., Volmer, L. L., and Koch, A. (2026). Feasibility of PIK3CA Mutation Detection via Microfluidic Isolation of Disseminated Tumor Cells from Bone Marrow in Breast Cancer Patients. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, pages a–2764–9625.
- Gruber, I., Fehm, T., Taran, F. A., Wallwiener, M., Hahn, M., Wallwiener, D., Krawczyk, N., Hoffmann, J., and Hartkopf, A. D. (2014). Disseminated tumor cells as a monitoring tool for adjuvant therapy in patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 144(2):353–360.
- Hartkopf, A. D., Brucker, S. Y., Taran, F.-A., Harbeck, N., Von Au, A., Naume, B., Pierga, J.-Y., Hoffmann, O., Beckmann, M. W., Rydén, L., Fehm, T., Aft, R., Solà, M., Walter, V., Rack, B., Schuetz, F., Borgen, E., Ta, M.-H., Bittner, A.-K., Fasching, P. A., Fernö, M., Krawczyk, N., Weilbaecher, K., Margelí, M., Hahn, M., Jueckstock, J., Domschke, C., Bidard, F.-C., Kasimir-Bauer, S., Schoenfish, B., Kurt, A. G., Wallwiener, M., Gebauer, G., Klein, C. A., Wallwiener, D., Janni, W., and Pantel, K. (2021a). Disseminated tumour cells from the bone marrow of early breast cancer patients: Results from an international pooled analysis. *European Journal of Cancer*, 154:128–137.
- Hartkopf, A. D., Brucker, S. Y., Taran, F.-A., Harbeck, N., von Au, A., Naume, B., Pierga, J.-Y., Hoffmann, O., Beckmann, M. W., Rydén, L., Fehm, T., Aft, R., Solà, M., Walter, V., Rack, B., Schuetz, F., Borgen, E., Ta, M.-H., Bittner, A.-K., Fasching, P. A., Fernö,

- M., Krawczyk, N., Weilbaecher, K., Margelí, M., Hahn, M., Jueckstock, J., Domschke, C., Bidard, F.-C., Kasimir-Bauer, S., Schoenfish, B., Kurt, A. G., Wallwiener, M., Gebauer, G., Klein, C. A., Wallwiener, D., Janni, W., and Pantel, K. (2021b). Disseminated tumour cells from the bone marrow of early breast cancer patients: Results from an international pooled analysis. *European Journal of Cancer*, 154:128–137.
- Hartkopf, A. D., Taran, F.-A., Wallwiener, M., Hahn, M., Becker, S., Solomayer, E.-F., Brucker, S. Y., Fehm, T. N., and Wallwiener, D. (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*, 50(15):2550–2559.
- Hvichia, G., Parveen, Z., Wagner, C., Janning, M., Quidde, J., Stein, A., Müller, V., Loges, S., Neves, R., Stoecklein, N., Wikman, H., Riethdorf, S., Pantel, K., and Gorges, T. (2016). A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells. *International Journal of Cancer*, 138(12):2894–2904.
- Johnston, S., Martin, M., O'Shaughnessy, J., Hegg, R., Tolaney, S., Guarneri, V., Del Mastro, L., Campone, M., Sohn, J., Boyle, F., Cortes, J., Rugo, H., Goetz, M., Hamilton, E., Huang, C.-S., Senkus, E., Cicin, I., Testa, L., Neven, P., Huober, J., Shao, Z., Wei, R., Munoz, M., San Antonio, B., Shahir, A., Rastogi, P., and Harbeck, N. (2026). Overall survival with abemaciclib in early breast cancer. *Annals of Oncology*, 37(2):155–165.
- Kellner, U., Frahm, S. O., Mawrin, C., Krams, M., and Schüller, S. (2019). *Kurzlehrbuch Pathologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3 edition. Pages: b-007-167433.
- Lambert, A., Salleron, J., Lion, M., Rouyer, M., Lozano, N., Leroux, A., Merlin, J. L., and Harlé, A. (2019). Comparison of Three Real-Time PCR Assays for the Detection of PIK3CA Somatic Mutations in Formalin-Fixed Paraffin Embedded Tissues of Patients with Breast Carcinomas. *Pathology & Oncology Research*, 25(3):1117–1123.
- Luthra, R., Singh, R. R., and Patel, K. P., editors (2016). *Clinical applications of PCR*. Number 1392 in Methods in molecular biology. Humana Press, New York Heidelberg, third edition edition.
- Madsen, R. R., Vanhaesebroeck, B., and Semple, R. K. (2018). Cancer-Associated PIK3CA Mutations in Overgrowth Disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 24(10):856–870.

- Magbanua, M. J. M., Rugo, H. S., Hauranieh, L., Roy, R., Scott, J. H., Lee, J. C., Hsiao, F., Sosa, E. V., van't Veer, L., Esserman, L. J., and Park, J. W. (2018). Genomic and expression profiling reveal molecular heterogeneity of disseminated tumor cells in bone marrow of early breast cancer. *npj Breast Cancer*, 4(1):31.
- Martínez-Sáez, O., Chic, N., Pascual, T., Adamo, B., Vidal, M., González-Farré, B., Sanfeliu, E., Schettini, F., Conte, B., Brasó-Maristany, F., Rodríguez, A., Martínez, D., Galván, P., Rodríguez, A. B., Martinez, A., Muñoz, M., and Prat, A. (2020). Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 22(1):45.
- McDonald, E. S., Clark, A. S., Tchou, J., Zhang, P., and Freedman, G. M. (2016). Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, 57(Supplement 1):9S–16S.
- Miller, M. C., Robinson, P. S., Wagner, C., and O'Shannessy, D. J. (2018). The Parsortix™ Cell Separation System—A versatile liquid biopsy platform. *Cytometry Part A*, 93(12):1234–1239.
- Miricescu, D., Totan, A., Stanescu-Spinu, I.-I., Badoiu, S. C., Stefani, C., and Greabu, M. (2020). PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1):173.
- Moo, T.-A., Sanford, R., Dang, C., and Morrow, M. (2018). Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clinics*, 13(3):339–354.
- Mosele, F., Stefanovska, B., Lusque, A., Tran Dien, A., Garberis, I., Droin, N., Le Tourneau, C., Sablin, M.-P., Lacroix, L., Enrico, D., Miran, I., Jovelet, C., Bièche, I., Soria, J.-C., Bertucci, F., Bonnefoi, H., Campone, M., Dalenc, F., Bachelot, T., Jacquet, A., Jimenez, M., and André, F. (2020). Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 31(3):377–386.
- Nunnery, S. E. and Mayer, I. A. (2020). Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Hormone-Positive Breast Cancer. *Drugs*, 80(16):1685–1697.
- Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams,

- C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., and Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797):747–752.
- Phan, T. G. and Croucher, P. I. (2020). The dormant cancer cell life cycle. *Nature Reviews Cancer*, 20(7):398–411.
- Pillai, S. G., Siddappa, C. M., Ma, C., Snider, J., Kaushal, M., Watson, M. A., and Aft, R. (2021). A microfluidic-based filtration system to enrich for bone marrow disseminated tumor cells from breast cancer patients. *PloS One*, 16(5):e0246139.
- Postel, M., Roosen, A., Laurent-Puig, P., Taly, V., and Wang-Renault, S.-F. (2018). Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(1):7–17.
- Reinhardt, K., Stückerath, K., Hartung, C., Kaufhold, S., Uleer, C., Hanf, V., Lantzsch, T., Peschel, S., John, J., Pöhler, M., Bauer, M., Bürrig, F. K., Weigert, E., Buchmann, J., Kantelhardt, E. J., Thomssen, C., and Vetter, M. (2022). PIK3CA-mutations in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 196(3):483–493.
- Riethdorf, S. and Pantel, K. (2008). Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow and Circulating Tumor Cells in Blood of Breast Cancer Patients: Current State of Detection and Characterization. *Pathobiology*, 75(2):140–148.
- Ring, A., Spataro, M., Wicki, A., and Aceto, N. (2022). Clinical and Biological Aspects of Disseminated Tumor Cells and Dormancy in Breast Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10:929893.
- Robert Koch Institut (2023). Brustkrebs (Mammakarzinom), Zentrum für Krebsregisterdaten.
- Schindlbeck, C., Andergassen, U., Jueckstock, J., Rack, B., Janni, W., and Jeschke, U. (2016). Disseminated and circulating tumor cells in bone marrow and blood of breast cancer patients: properties, enrichment, and potential targets. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 142(9):1883–1895.
- Schlimok, G., Funke, I., Holzmann, B., Göttlinger, G., Schmidt, G., Häuser, H., Swierkot, S., Warnecke, H. H., Schneider, B., Koprowski, H., and Riethmüller, G. (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.
- Schmid, P., Cortes, J., Pusztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J., Denkert, C., Park, Y. H., Hui, R., Harbeck, N., Takahashi, M., Foukakis, T., Fasching, P. A., Cardoso, F., Untch, M., Jia, L., Karantza, V., Zhao, J., Aktan, G., Dent, R., and O'Shaughnessy, J. (2020). Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 382(9):810–821.
- Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M., Ahr, A., Blankenstein, T. J. F., Kaufmann, M., Diebold, J., Arnholdt, H., Müller, P., Bischoff, J., Harich, D., Schlimok, G., Riethmüller, G., Eils, R., and Klein, C. A. (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.
- Tao, Z., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z., and Zhao, J. (2015). Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(2):333–338.
- Thulin, A., Andersson, C., Werner Rönnerman, E., De Lara, S., Chamalidou, C., Schoenfeld, A., Kovács, A., Fagman, H., Enlund, F., and Linderholm, B. K. (2021). Discordance of PIK3CA and TP53 mutations between breast cancer brain metastases and matched primary tumors. *Scientific Reports*, 11(1):23548.
- Turner, N. C., Oliveira, M., Howell, S. J., Dalenc, F., Cortes, J., Gomez Moreno, H. L., Hu, X., Jhaveri, K., Krivorotko, P., Loibl, S., Morales Murillo, S., Okera, M., Park, Y. H., Sohn, J., Toi, M., Tokunaga, E., Yousef, S., Zhukova, L., de Bruin, E. C., Grinsted, L., Schiavon, G., Foxley, A., and Rugo, H. S. (2023). Capivasertib in Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 388(22):2058–2070.
- Valastyan, S. and Weinberg, R. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*, 147(2):275–292.
- Vasconcelos, I., Hussainzada, A., Berger, S., Fietze, E., Linke, J., Siedentopf, F., and Schoenegg, W. (2016). The St. Gallen surrogate classification for breast cancer subtypes successfully predicts tumor presenting features, nodal involvement, recurrence patterns and disease free survival. *The Breast*, 29:181–185.

- Vegunta, S., Lester, S. P., Pruthi, S., and Mussallem, D. M. (2020). Effects of major lifestyle factors on breast cancer risk: impact of weight, nutrition, physical activity, alcohol and tobacco. *Breast Cancer Management*, 9(4):BMT51.
- Volmer, L. L., Önder, C. E., Volz, B., Singh, A. R., Brucker, S. Y., Engler, T., Hartkopf, A. D., and Koch, A. (2023). Microfluidic Isolation of Disseminated Tumor Cells from the Bone Marrow of Breast Cancer Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18):13930.
- Walter, V. P., Taran, F.-A., Wallwiener, M., Hahn, M., Brucker, S. Y., and Hartkopf, A. D. (2018). Simultaneous detection of circulating and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients following neoadjuvant chemotherapy. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 297(3):785–790.
- Weyerstahl, T. and Stauber, M., editors (2013). *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4 edition. Pages: b-002-94109.
- Wiedswang, G., Borgen, E., Kåresen, R., Kvalheim, G., Nesland, J., Qvist, H., Schlichting, E., Sauer, T., Janbu, J., Harbitz, T., and Naume, B. (2003). Detection of Isolated Tumor Cells in Bone Marrow Is an Independent Prognostic Factor in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(18):3469–3478.

6 Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. med S. Brucker.

Außerdem danke ich meiner Betreuerin Léa Louise Volmer, die mir eine große Unterstützung bei der Durchführung und der Erstellung der Doktorarbeit war.

Ebenfalls danken möchte ich allen Patient*innen für die Bereitstellung der Knochenmarksproben zur wissenschaftlichen Auswertung.

Besonderer Dank gilt dem ganzen Team der Arbeitsgruppe AG Koch des Forschungsinstituts für Frauengesundheit. André Koch war eine große Unterstützung während der Phase im Labor. Auch Barbara Volz, Angelika Aman, Ingrid Teufel, Sabine Hofmeister und Susanne Bruckner waren tatkräftig mit großer fachlicher Kompetenz und ständiger Unterstützung eine unverzichtbare Hilfe bei der Bearbeitung des Untersuchungsmaterials. Ohne Massimo Granai wären die DNA-Extraktionen nicht möglich gewesen. Auch Lena Mesch mit ihrer Expertise im wissenschaftlichen Schreiben war sehr hilfreich.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meiner lieben Freundin Theresa Kramer, meiner Cousine Tami Goseberg und meinen Eltern Marlies und Stefan Grollmann, die meine Arbeit mit Korrekturlesen begleitet und mir wertvolle Rückmeldungen gegeben haben. Ihre Unterstützung hat maßgeblich dazu beigetragen, die Qualität dieser Arbeit zu verbessern. Ebenso möchte ich meinen Freundinnen Nina Rödiger, Luzia Uhlig und Juliane Köstlin aus der Studienzeit danken, die mir stets mit Rat und Motivation zur Seite standen und diese Zeit unvergesslich gemacht haben.

Schließlich möchte ich noch meinen besonderen Dank meinem Freund Max Beyer, meinen Eltern Marlies und Stefan Grollmann, sowie meinem Bruder Nils Grollmann aussprechen. Sie standen mir stets zur Seite.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitäts-Frauenklinik unter Betreuung von Prof. Dr. Brucker (Ärztliche Direktorin Department für Frauengesundheit) und Dr. Léa Volmer (Oberärztin, Universitätsfrauenklinik Tübingen) durchgeführt. Außerdem wurden die Laborarbeiten in dem Forschungsinstitut für Frauengesundheit (FFG) in der Arbeitsgruppe Koch durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte gemeinsam mit den oben genannten Betreuern und in Zusammenarbeit mit Dr. André Koch (Laborleiter FFG) und Dr. Léa Volmer.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Labormitglieder Ingrid Teufel, Susanne Bruckner) von mir eigenständig durchgeführt. Die Definierung des Tumorareals in den HE-Schnitten wurde durch Dr. Massimo Granai durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von Dr. Léa Volmer eigenständig durch mich.

Die Erstellung der Abbildungen erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Dr. Léa Volmer.

Zur Überprüfung von Rechtschreibung und Grammatik, sowie Hilfestellungen bei dem Code für LaTeX wurde das Programm ChatGPT Version 4.1 verwendet.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Zusätzliche Erklärung zur Veröffentlichung

Im Rahmen der Dissertation entstand die folgende Publikation: Grollmann, H., Volz, B., Schroth, W., Bahlinger, V., Hartkopf, A., Brucker, S., Volmer, L., Koch, A. (2025). Feasibility of PIK3CA Mutation Detection via Microfluidic Isolation of Disseminated Tumor Cells from Bone Marrow in Breast Cancer Patients. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde Science* (2026).

Der wissenschaftliche Anteil meiner Arbeit an dieser Publikation umfasste die Mitgestaltung der Konzeption an wesentlichen Teilen der Studie, die selbstständige Durchführung und Auswertung der Laborversuche, die Datenerhebung, die Erstellung der grafischen Darstellungen sowie die Erstfassung des Manuskripts.

Prof. Dr. Sara Y. Brucker trug zur konzeptionellen Planung, zur Interpretation der Ergebnisse und zur finalen Durchsicht des Manuskripts bei.

Dr. Léa Volmer begleitete die Studie inhaltlich, übernahm die Projektkoordination und leistete Unterstützung bei der statistischen Analyse und Manuskriptüberarbeitung.

Dr. André Koch übernahm die Projektkoordination, stellte infrastrukturelle Ressourcen und fachliche Unterstützung im Labor zur Verfügung und leistete Unterstützung bei der Interpretation der Ergebnisse.

Barbara Volz unterstützte bei der Durchführung der Laborarbeiten. Werner Schroth (IKP Stuttgart) leistete wertvolle Beiträge bei der Interpretation der Ergebnisse sowie bei der Formulierung einzelner Textpassagen. Veronica Bahlinger beteiligte sich an der pathologischen Beurteilung und Interpretation der Gewebeproben. Prof. Dr. Andreas Hartkopf unterstützte bei der inhaltlichen Abstimmung und der abschließenden Durchsicht des Manuskripts.

Alle Coautor*innen stimmten der Veröffentlichung in der vorliegenden Form zu.

Tübingen, den

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht: Grollmann, H., Volz, B, Schroth, W., Bahlinger, V., Hartkopf, A., Brucker, S., Volmer, L., Koch, A. (2025). Feasibility of PIK3CA Mutation Detection via Microfluidic Isolation of Disseminated Tumor Cells from Bone Marrow in Breast Cancer Patients. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde Science* (2026)