

**Medizinische Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Eignung von Konzentrations- und Integritätsmessungen zellfreier
Plasma-DNA als Biomarker zur Differenzierung von malignen und
benignen Lungenerkrankungen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

von Julia Wagner

geboren am 15.12.1990 in Berlin

Betreuer: apl. Prof. Dr. Bernd Schmidt

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Wienke
Prof. Dr. Stefan Holdenrieder, München

02.11.2021

01.04.2022

Referat

Jährlich erkranken über 2 Millionen Menschen weltweit neu an einem Bronchialkarzinom. Über 1,7 Millionen Menschen sterben pro Jahr an dieser Tumorart. Bei den meisten Lungenkrebspatienten wird die Erkrankung in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, welches nicht mehr kurativ behandelt werden kann. Für das Bronchialkarzinom besteht demnach ein großer Bedarf nach Screening- und Früherkennungsmaßnahmen. Beim fortgeschrittenen Lungenkarzinom sowie beim Therapieversagen stellt die Liquid Biopsy bereits ein wichtiges, diagnostisches Element dar. Für die zellfreie DNA (cfDNA), welche einen Bestandteil der Flüssigbiopsie bildet, wurde das Potenzial als diagnostischer, prädiktiver und therapeutischer Biomarker für eine Vielzahl von Tumorentitäten einschließlich des Bronchialkarzinoms belegt. Neben dem Nachweis genetischer und epigenetischer Alterationen eignet sich die cfDNA auch für Konzentrations- und Integritätsmessungen. Bei Tumorpatienten konnten erhöhte zellfreie DNA-Konzentrations- und Integritätswerte im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Eignung von cfDNA-Konzentrations- und Integritätsmessungen als Biomarker zur Differenzierung von malignen und benignen Lungenerkrankungen. Hierfür wurde cfDNA aus Plasmaproben von 227 Patienten isoliert. Die absolute cfDNA-Konzentration von 3 unterschiedlich langen ERV3-Fragmenten wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmt. Anhand von 2 Kalkulationsmethoden wurde die DNA-Integrität der cfDNA ermittelt.

Es konnten keine relevanten Unterschiede bezüglich der cfDNA-Konzentration und -Integrität zwischen Lungenkarzinompatienten, Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung und Patienten mit einer anderen Tumorerkrankung als dem Bronchialkarzinom nachgewiesen werden. Weder Konzentrations- noch Integritätsmessungen zellfreier DNA waren als diagnostische Biomarker geeignet. Die geringe diskriminatorische Stärke ist einerseits auf Entzündungsreaktionen bei den benignen Lungenkranken zurückzuführen, welche erhöhte cfDNA-Konzentrations- und -Integritätswerte wie bei Tumorerkrankungen bedingen können. Außerdem erschwerte die Heterogenität des Patientenkollektivs dieser Studie die Diskrimination zwischen malignen und benignen Lungenerkrankungen anhand der cfDNA-Konzentration und -Integrität. Das Potenzial der Liquid Biopsy einschließlich der cfDNA ist insbesondere bei Tumorpatienten aufgrund der geringen Invasivität und leichten Wiederholbarkeit unstrittig. Es bedarf allerdings weiterer Forschung, um die genauen Freisetzungs- und Abbaumechanismen der cfDNA einschließlich möglicher Einflussfaktoren festzustellen. Für den klinischen Einsatz der cfDNA ist die Standardisierung der Methoden essenziell.

Wagner, Julia: Eignung von Konzentrations- und Integritätsmessungen zellfreier Plasma-DNA als Biomarker zur Differenzierung von malignen und benignen Lungenerkrankungen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2021

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Lungenkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese.....	1
1.1.3 Symptome.....	2
1.1.4 Screening.....	2
1.1.5 Histopathologische und klinische Klassifikation	3
1.1.6 Therapie des NSCLC und SCLC	4
1.2 Biomarker beim Lungenkarzinom	5
1.2.1 Definition eines Biomarkers.....	5
1.2.2 Klinische Anwendung von Biomarkern	5
1.2.3 Proteinbasierte und molekulare Biomarker.....	6
1.2.4 Liquid Biopsy.....	7
1.3 Zirkulierende zellfreie DNA	7
1.3.1 Geschichte der cfDNA	7
1.3.2 Definition und allgemeine Charakteristika der cfDNA.....	8
1.3.3 Ursprung, Freisetzungs- und Abbaumechanismen der cfDNA.....	8
1.3.4 cfDNA-Integrität	10
1.3.5 Präanalytische Bedingungen für die cfDNA-Bestimmung	10
1.3.6 Nachweismethoden der cfDNA	12
1.3.7 Quantitative Bestimmung von cfDNA beim Gesunden.....	13
1.3.8 Quantitative Bestimmung von cfDNA bei nicht-neoplastischen Erkrankungen ...	13
1.3.9 Quantitative Bestimmung von cfDNA bei Tumorerkrankungen	14
1.3.10 cfDNA-Integritätsmessungen bei Tumorpatienten	15
1.3.11 Qualitative cfDNA-Bestimmungen bei Tumorpatienten	16
1.3.12 Quantitative und qualitative cfDNA-Bestimmungen beim Lungenkarzinom.....	17
2 Zielstellung	21
3 Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Geräte	23
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
3.1.3 Kits	24
3.1.4 Reagenzien	24
3.1.5 Primer	24
3.1.6 Software	25
3.2 Methoden.....	25
3.2.1 Patientenkollektiv.....	25
3.2.2 Gewinnung von Blutplasma	26
3.2.3 Erythrozytenlyse.....	27
3.2.4 Phenolfreie DNA-Extraktion aus Leukozyten	27
3.2.5 Isolation zellfreier DNA aus den Plasmen der Patienten	27
3.2.6 Quantitätsbestimmung der Leukozyten-DNA der Blutspender	28
3.2.7 Quantitative Real-Time-PCR	28
3.2.8 Berechnungen der cfDNA-Integritätsindices	31
3.2.9 Statistische Auswertung	31

4 Ergebnisse	33
4.1 Deskriptive Statistik	33
4.1.1 Geschlechterverteilung	33
4.1.2 Altersverteilung	33
4.1.3 Raucherstatus	34
4.1.4 cfDNA-Konzentrationen	34
4.1.5 cfDNA-Integritätsindices	35
4.2 cfDNA-Konzentrationen und cfDNA-Integritätsindices als diagnostische Biomarker	35
4.2.1 Assoziation zwischen cfDNA-Konzentrationen und Diagnose	35
4.2.2 Assoziation zwischen cfDNA-Konzentrationen und Charakteristika des Patientenkollektivs	39
4.2.3 Assoziation zwischen cfDNA-Integritätsindices und Diagnose	39
4.2.4 Assoziation zwischen cfDNA-Integritätsindices und Charakteristika des Patientenkollektivs	44
4.2.5 Potenzial der cfDNA-Konzentrationen als diagnostische Biomarker	45
4.2.6 Potenzial der cfDNA-Integritätsindices als diagnostische Biomarker	46
5 Diskussion	48
5.1 Diskussion von Material und Methoden	48
5.1.1 Das Patientenkollektiv	48
5.1.2 Präanalytische und analytische Bedingungen für die cfDNA-Bestimmungen	51
5.2 Diskussion der Ergebnisse	52
5.2.1 cfDNA-Konzentrationen	52
5.2.2 cfDNA-Konzentrationen und Charakteristika des Patientenkollektivs	55
5.2.3 cfDNA-Konzentrationen als Biomarker	55
5.2.4 cfDNA-Integritätsindices	56
5.2.5 cfDNA-Integritätsindices und Charakteristika des Patientenkollektivs	57
5.2.6 cfDNA-Integrität als Biomarker	57
5.3 Ausblick	59
6 Zusammenfassung	60
7 Literaturverzeichnis	62
8 Thesen	80
Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbstständigkeitserklärung	VII
Danksagung	VIII

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abkürzung	Erklärung
Abb.	Abbildung
ALK1	Activin Receptor-Like Kinase 1
APC	Adenomatous polyposis coli
AUC	Area under the curve
BEAMing	Beads, Emulsion, Amplification, Magnetics
bp	Basenpaare
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
cfDNA	Zellfreie DNA
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CT	Computertomographie
ctDNA	Zellfreie Tumor-DNA
Ct-Wert	Cycle-Threshold-Wert
DAPK	Death-associated protein kinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERV3	Endogenes Retrovirus 3
Et al.	Et altera
FAM	6-Carboxyfluorescein
GSTP1	Glutathione-S-Transferase P1
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog
log	Logarithmus
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Anzahl
N.	Nervus
NGS	Next Generation Sequencing
NSCLC	Non-small cell lung cancer (Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom)
P53	Protein 53
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)

PCDH10	Protocadherin 10
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PD-L1	Programmed cell-death ligand 1
PET	Positronenemissionstomographie
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RAR β 2	Retinoic acid receptor beta 2
RASSF1A	Ras-Association-Domain-Family-Protein-1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROC	Receiver Operating Characteristic (Grenzwertoptimierungskurve)
ROS1	Receptor Tyrosine Kinase
ROX	Rhodamin X
Rpm	Revolutions per minute
SCLC	Small-cell lung cancer (Kleinzelliges Bronchialkarzinom)
SHOX2	Short-Stature-Homeobox-Gen 2
Tab.	Tabelle
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamine
Taq	Thermus aquaticus
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNM	Tumor, Lymphknoten, Fernmetastasen
TRIS	Tromethamine
UICC	Union internationale contre le cancer (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
WBC	White blood cells (Leukozyten)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
95%-KI	95%-Konfidenzintervall

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
Tab. 1	Geräte mit Herstellerangabe	23
Tab. 2	Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe	23
Tab. 3	Kits mit Herstellerangabe	24
Tab. 4	Reagenzien mit Herstellerangabe	24
Tab. 5	Primer mit Herstellerangabe	24
Tab. 6	Software mit Herstellerangabe	25
Tab. 7	Häufigkeitstabelle des Patientenkollektivs	26
Tab. 8	PCR-Ansatz	30
Tab. 9	Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs	33
Tab. 10	Altersverteilung des Patientenkollektivs	33
Tab. 11	Raucherstatus des Patientenkollektivs	34
Tab. 12	Konzentrationen der einzelnen cfDNA-Fragmente	34
Tab. 13	cfDNA-Integritätsindices	35
Tab. 14	cfDNA-Konzentration von ERV3-79 der Patientengruppen	35
Tab. 15	cfDNA-Konzentration von ERV3-181 der Patientengruppen	37
Tab. 16	cfDNA-Konzentration von ERV3-297 der Patientengruppen	38
Tab. 17	Assoziation von cfDNA-Konzentrationen und Charakteristika des Patientenkollektivs	39
Tab. 18	cfDNA-Integritätsindex U1 der Patientengruppen	40
Tab. 19	cfDNA-Integritätsindex U2 der Patientengruppen	41
Tab. 20	cfDNA-Integritätsindex W1 der Patientengruppen	41
Tab. 21	cfDNA-Integritätsindex W2 der Patientengruppen	42
Tab. 22	Assoziation von cfDNA-Integritätsindices und Charakteristika des Patientenkollektivs	44

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1	Darstellung der cfDNA-Konzentration von ERV3-79 der Patientengruppen als Boxplots	36
Abb. 2	Darstellung der cfDNA-Konzentration von ERV3-181 der Patientengruppen als Boxplots	37
Abb. 3	Darstellung der cfDNA-Konzentration von ERV3-297 der Patientengruppen als Boxplots	38
Abb. 4	Darstellung des cfDNA-Integritätsindex U1 der Patientengruppen als Boxplots	40
Abb. 5	Darstellung des cfDNA-Integritätsindex U2 der Patientengruppen als Boxplots	41
Abb. 6	Darstellung des cfDNA-Integritätsindex W1 der Patientengruppen als Boxplots	42
Abb. 7	Darstellung des cfDNA-Integritätsindex W2 der Patientengruppen als Boxplots	43
Abb. 8	Darstellung der cfDNA-Konzentrationen als ROC-Kurven	45
Abb. 9	Darstellung der cfDNA-Integritätsindices U1 und U2 als ROC-Kurven	46
Abb. 10	Darstellung der cfDNA-Integritätsindices W1 und W2 als ROC-Kurven	46

1 Einleitung

1.1 Das Lungenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit erkrankten im Jahr 2018 über 2,09 Millionen Menschen neu an Lungenkrebs. Männer sind von dieser Erkrankung besonders betroffen: Das Bronchialkarzinom ist die häufigste Tumorerkrankung bei Männern weltweit. Lungenkrebs ist zudem weltweit die häufigste zum Tod führende Tumorerkrankung. 2018 starben 1,76 Millionen Menschen an dieser Erkrankung (Bray et al., 2018).

Laut dem Robert Koch-Institut erkrankten im Jahr 2016 in Deutschland 57.460 Menschen neu an Lungenkrebs. Im selben Jahr starben 45.706 Menschen an einer bösartigen Neubildung der Bronchien und der Lungen. 2016 waren knapp zwei Drittel der am Lungenkrebs erkrankten bzw. verstorbenen Personen männlich, ein Drittel war weiblich. Mit 13,9% stellte das Lungenkarzinom bei Männern die zweithäufigste Krebserkrankung in Deutschland dar, bei Frauen mit 9,2% die dritthäufigste. Außerdem war das Bronchialkarzinom in Deutschland bei Männern im Jahr 2016 die häufigste tumorbedingte Todesursache, bei Frauen die zweithäufigste (Robert Koch-Institut, 2019). Im Mittel erkrankten Männer im Alter von 70 Jahren an Lungenkrebs, Frauen durchschnittlich mit 69 Jahren. Bei Erstdiagnosen wiesen über 75% der Betroffenen ein lokal fortgeschrittenes Tumorstadium auf (T3- oder T4-Stadium). Die relative 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit lag im Jahr 2016 in Deutschland für Männer bei 15% und für Frauen bei 21% (Robert Koch-Institut, 2019). Der Trend der letzten 20 Jahre für Deutschland zeigt, dass die altersstandardisierten Sterbe- und Neuerkrankungsraten für Lungenkrebs bei Männern rückläufig sind, während sie bei Frauen ansteigen. Diese Entwicklung lässt sich u.a. durch den gestiegenen Anteil an Raucherinnen erklären (Robert Koch-Institut, 2019).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Rauchen ist der Hauptrisikofaktor für das Bronchialkarzinom, insbesondere für das Auftreten von kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen. 9 von 10 Erkrankungen können bei Männern mit dem Rauchen in Verbindung gebracht werden, bei Frauen sind es 6 von 10 (Robert Koch-Institut, 2019). Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Lungenkarzinoms und dem Rauchen ist bereits seit den 1950er Jahren bekannt (Doll and Hill, 1950). Die Dauer des Rauchens stellt den wichtigsten Einflussfaktor dar, wobei das Risiko an einem Lungenkarzinom zu erkranken steigt, je früher mit dem Rauchen begonnen wird (Hegmann et al., 1993; International Agency for Research on Cancer, 2004). Daneben steigt das Erkrankungsrisiko mit der Anzahl der pro Tag gerauchten Zigaretten (International Agency for Research on Cancer, 2004). Um die Rauchdosis von Zigarettenrauchern zu definieren, werden häufig Packungsjahre angegeben. Diese Einheit berechnet sich als Anzahl der pro Tag gerauchten Zigarettenpackungen

multipliziert mit der Anzahl der Raucherjahre. Das Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, ist 23,9-mal höher für Zigarettenraucher und 7,5-mal höher für ehemalige Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern (Simonato et al., 2001).

Das Passivrauchen stellt einen weiteren relevanten Risikofaktor für das Bronchialkarzinom dar. Insbesondere die passive Exposition gegenüber Tabakrauch in der Partnerschaft und am Arbeitsplatz erhöhen das Lungenkrebsrisiko (Boffetta et al., 1998).

Die berufliche Exposition gegenüber Karzinogenen gilt als Ursache für 9-15% der Lungenkarzinome (Robert Koch-Institut, 2019). Das Erkrankungsrisiko für das Bronchialkarzinom steigt signifikant u.a. durch die Exposition gegenüber folgenden Substanzen: Asbest, Radon-222, Arsen, Beryllium, Cadmium und Nickel (Cogliano et al., 2011).

1.1.3 Symptome

Ungefähr 90% der Patienten weisen bei Diagnosestellung des Bronchialkarzinoms Symptome auf (Buccheri and Ferrigno, 2004). Das häufigste Symptom ist dabei Husten, gefolgt von weiteren respiratorischen Symptomen wie Dyspnoe, Thoraxschmerzen und Hämoptysen. Dazu kommen Allgemeinsymptome wie Schwäche, Gewichtsverlust, Fieber und Nachtschweiß (Buccheri and Ferrigno, 2004; Spiro et al., 2007). Durch die intrathorakale Ausbreitung des Tumors können Nerven infiltriert werden, was Heiserkeit (N. recurrens), einen Zwerchfellhochstand (N. phrenicus) oder eine Armplexusläsion zur Folge haben kann. Die Invasion der Pleura und der Thoraxwand kann Thoraxschmerzen auslösen, die Invasion der Vena-cava-superior kann zu einer oberen Einflusstauung führen. Ein Drittel der Patienten leidet unter Beschwerden, die durch die extrathorakale Metastasierung bedingt sind. Dazu gehören Kopfschmerzen und Übelkeit bei Hirnmetastasen, Knochenschmerzen bei Knochenmetastasen, Gewichtsverlust bei Lebermetastasen und Lymphadenopathien bei Lymphknotenmetastasen (Spiro et al., 2007).

1.1.4 Screening

Bei Erstdiagnose eines Lungenkarzinoms liegt bei einem Großteil der Patienten bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium vor, woraus eine reduzierte 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit resultiert (Robert Koch-Institut, 2019). Demzufolge besteht ein großer Bedarf nach verlässlichen, möglichst wenig invasiven Früherkennungsmaßnahmen. Laut der aktuellen deutschen S3-Leitlinie eignen sich weder Röntgen Thorax-Untersuchungen noch Bronchoskopie, Sputumzytologie oder eine Tumormarkerdiagnostik als Screeningmethoden für das Bronchialkarzinom bei asymptomatischen Risikopatienten (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

Bereits in den 1970er Jahren wurde der Einsatz von Röntgen Thorax-Aufnahmen, allein und in Kombination mit Sputumzytologieuntersuchungen, als Früherkennungsuntersuchungen für das Lungenkarzinom erforscht (Fontana et al., 1986). In mehreren randomisierten Studien konnte keine signifikante Reduktion der Lungenkrebssterblichkeit durch die genannten Untersuchungen nachgewiesen werden (Melamed et al., 1984; Oken et al., 2011).

Seit einigen Jahren wird die low-dose-Computertomographie zur Lungenkrebs-Früherkennung stark diskutiert. Im Rahmen der multizentrischen, randomisiert-kontrollierten Studie NLCT (The National Lung Cancer Trial) wurde in den USA von 2002 bis 2007 der Einsatz von Niedrigdosis-CT-Untersuchungen als mögliche Screening-Untersuchung im Vergleich zu konventionellen Röntgenuntersuchungen des Thorax untersucht. Hierfür wurden Raucher im Alter von 55 bis 74 Jahren mit über 30 Packungsjahren und ehemalige Raucher, welche innerhalb der letzten 15 Jahre den Nikotinkonsum eingestellt haben, über drei Jahre einmal jährlich mittels low-dose-CT bzw. konventioneller Röntgenuntersuchung des Thorax untersucht. Es zeigte sich eine relative Risikoreduktion an einem Lungenkarzinom zu versterben von 20% bei den Probanden, die mittels Niedrigdosis-CT untersucht wurden, im Vergleich zur Röntgengruppe. Problematisch war hingegen die hohe Rate an falsch-positiven Screeningbefunden (National Lung Screening Trial Research Team et al., 2011). Trotz dieser deutlichen Limitation wird die Niedrigdosis-CT in den USA als Screeningmethode bei Risikopatienten von den führenden Fachgesellschaften seit mehreren Jahren empfohlen (Wender et al., 2013; Moyer, 2014). Auch in Europa wurden randomisiert-kontrollierte Studien durchgeführt, die den Einsatz der Niedrigdosis-CT als Screeningmethode für das Lungenkarzinom bei Risikopatienten überprüften. Hierzu zählen u.a. der DLCST (Danish Lung Cancer Screening Trial) (Saghir et al., 2012), die DANTE-Studie (Detection and screening of early lung cancer with novel imaging Technology) (Infante et al., 2009) und die NELSON-Studie (Nederlands-Leuvens Longkanker Screenings Onderzoek) (Horeweg et al., 2013). Die NELSON-Studie ist die zweitgrößte Studie dieser Art weltweit und die größte europaweit. Die ersten Ergebnisse zeigten, dass der Einsatz der low-dose-CT zu einer deutlichen Risikoreduktion bei asymptomatischen Hochrisikopatienten führt, an einem Lungenkarzinom zu versterben (International Association for the Study of Lung Cancer, 2018). Die vollständigen Ergebnisse werden großen Einfluss auf die europäischen und deutschen Leitlinien zum Lungenkrebscreening haben. Laut der deutschen S3-Leitlinie wird der flächendeckende Einsatz der Niedrigdosis-CT als Screening-Untersuchung für das Lungenkarzinom noch nicht empfohlen. Allerdings kann eine low-dose-CT als Früherkennungsuntersuchung angeboten werden, wenn neben einem gewissen Alter und einer bestimmten Raucheranamnese weitere Risikofaktoren vorliegen und festgelegte Rahmenbedingungen erfüllt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

1.1.5 Histopathologische und klinische Klassifikation

Nach der histologischen Klassifikation der WHO aus dem Jahr 2015 wird das Lungenkarzinom in das Plattenepithelkarzinom, das Adenokarzinom, das großzellige Karzinom sowie in neuroendokrine Tumoren mit jeweils verschiedenen Subtypen unterteilt (Travis et al., 2015). Im klinischen Alltag wird neben der histologischen Differenzierung zwischen kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen unterschieden: Ca. 80 % der Lungenkarzinome sind nicht-

kleinzellig, 20 % sind kleinzellig (Kraywinkel und Schönfeld, 2018; Robert Koch-Institut, 2019). Unter dem Begriff des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC, non-small cell lung cancer) werden das Plattenepithelkarzinom (ca. 25%), das Adenokarzinom (ca. 50%) sowie das großzellige Karzinom zusammengefasst (Kraywinkel und Schönfeld, 2018; Robert Koch-Institut, 2019). Dem wird das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC, small cell lung cancer) gegenübergestellt, welches wie auch die Karzinoide den neuroendokrinen Tumoren zugeordnet wird (Travis et al., 2015).

Nach Abschluss der Ausbreitungsdiagnostik wird das Lungenkarzinom anhand der 8. TNM-Klassifikation der International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) eingeteilt (Rami-Porter, 2016; Wittekind, 2017). Hierbei wird neben der Ausdehnung des Primärtumors auch die Existenz und Verteilung von Lymphknoten- und Fernmetastasen beurteilt. Auf Basis der TNM-Klassifikation werden verschiedene Tumorstadien nach der Union internationale contre le cancer (UICC) klassifiziert, welche für die Prognose und Therapie des Lungenkarzinoms von Bedeutung sind (Rami-Porter, 2016; Wittekind, 2017).

1.1.6 Therapie des NSCLC und SCLC

Die Therapie des NSCLC richtet sich nach der Histologie, dem Tumorstadium sowie nach dem Allgemeinzustand und den Komorbiditäten des Patienten. Als therapeutische Verfahren kommen laut der aktuellen deutschen S3-Leitlinie die Operation, die adjuvante oder neoadjuvante Chemotherapie, die lokale adjuvante oder neoadjuvante Radiotherapie, die adjuvante oder neoadjuvante Radiochemotherapie sowie targeted therapies zum Einsatz (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018). Ein kurativer Therapieansatz wird in den Tumorstadien I und II sowie im Stadium T3N1M0 (IIIA) verfolgt. Das Tumorstadium III ist sehr heterogen. Es wird daher in drei Subklassen untergliedert, die sich hinsichtlich ihrer Prognose und Wahl der Therapie erheblich voneinander unterscheiden. Beim oligometastasierten Bronchialkarzinom, daher im Tumorstadium IVA, ist die Therapieentscheidung interdisziplinär und multimodal zu treffen. Im multipel metastasierten Tumorstadium IVB wird ein palliativer Behandlungsansatz verfolgt. Alle palliativ behandelbaren, nichtplattenepithelialen NSCLCs sowie alle Plattenepithelkarzinome bei Patienten, die nie oder nur leicht geraucht haben, sollen molekularpathologisch hinsichtlich therapierelevanter molekularer Veränderungen untersucht werden. Hierzu gehören folgende Alterationen: ALK- und ROS1-Fusionen, BRAF-V600 Mutationen sowie EGFR-Mutationen in den Exonen 18-21. Zudem sollen die Tumore der betroffenen Patienten immunhistochemisch auf ihre PD-L1-Expression geprüft werden. Die Therapie richtet sich nach dem individuellen Mutationsmuster des Patienten und wird daher auch als targeted therapy (zielgerichtete Therapie) bezeichnet (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

Die Therapie des SCLC richtet sich ebenfalls nach der Ausbreitung des Tumors. In Abhängigkeit der Durchführbarkeit einer Bestrahlung wird zwischen den Stadien „Very Limited Disease“ (ca.

5%), „Limited Disease“ (etwa 25-35%) und „Extensive Disease“ (60-70%) unterschieden. Bei dem Großteil der Patienten wird das SCLC erst im „Extensive Disease“ Stadium diagnostiziert und kann nur palliativ mittels einer Chemotherapie, ggf. in Kombination mit einer Ganzhirnbestrahlung, therapiert werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

1.2 Biomarker beim Lungenkarzinom

1.2.1 Definition eines Biomarkers

Unter einem biologischen Marker, auch Biomarker genannt, versteht man eine objektiv messbare und evaluierbare Eigenschaft, die als Indikator für einen normalen biologischen Prozess, einen pathologischen Prozess oder als pharmakologische Antwort auf eine therapeutische Intervention eingesetzt werden kann (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Dieser sehr weit gefassten Definition zufolge können u.a. DNA, RNA, Proteine, Metaboliten und Mikroorganismen als Biomarker fungieren (Vargas and Harris, 2016). Verschiedenste Medien eignen sich zur Bestimmung von Biomarkern wie beispielsweise Blut, Gewebe, Speichel, Stuhl und Urin (Vargas and Harris, 2016). Ebenso vielfältig ist die Anwendung von Biomarkern. Sie können als diagnostisches Hilfsmittel zur Identifizierung von Patienten mit einer bestimmten Krankheit eingesetzt werden. Auch zur Stadienbestimmung oder Klassifizierung der Ausdehnung einer Krankheit können sich Biomarker eignen. Außerdem können anhand von Biomarkern Therapien überwacht und Voraussagen über das Ansprechen auf eine Behandlung gemacht werden. Zudem können sie als Indikatoren für die Prognose einer Erkrankung dienen (Biomarkers Definitions Working Group, 2001).

1.2.2 Klinische Anwendung von Biomarkern

Damit ein Biomarker auch im klinischen Alltag Anwendung findet, müssen bestimmte Kriterien erfüllt werden. Ein Biomarker muss quantifizierbar und reproduzierbar sein sowie in einem möglichst leicht zugänglichen Medium in kleiner Menge und ohne aufwendige Präparation kosteneffektiv nachweisbar sein (Srivastava and Gopal-Srivastava, 2002; Hassanein et al., 2012). Biomarker können einzeln oder als Gruppe gemessen werden (Vargas and Harris, 2016). Von entscheidender Bedeutung für den klinischen Einsatz sind die statistischen Gütekriterien. Eine hohe Sensitivität und Spezifität sind essentiell für einen diagnostischen Biomarker, damit eine sichere Identifizierung von Patienten mit und ohne eine Krankheit gewährleistet ist (Srivastava and Gopal-Srivastava, 2002). Dadurch können die Raten an falsch-negativen und falsch-positiven Befunden niedrig gehalten werden. Werden Biomarker zu Screening-Zwecken eingesetzt, ist eine hohe Spezifität mit konsekutiv niedrigen Raten an falsch-positiven Befunden notwendig. So kann unnötige, teilweise invasive und kostenintensive, weiterführende Diagnostik vermieden werden. Bei prognostischen Biomarkern oder solchen, die zur Therapieüberwachung eingesetzt werden, bedarf es hingegen einer hohen Sensitivität mit konsekutiv niedrigen Raten an falsch-negativen Befunden (Srivastava and Gopal-Srivastava, 2002).

1.2.3 Proteinbasierte und molekulare Biomarker

Seit vielen Jahren wird der Einsatz von proteinbasierten Serummarkern für die Früherkennung, Diagnose, Prognose und Therapieüberwachung des Lungenkarzinoms intensiv erforscht. Hierzu zählen u.a. folgende Serummarker: CYFRA 21-1 (Cytokeratin-19-Fragment), die neuronenspezifische Enolase (NSE), das carcinoembryonale Antigen (CEA), SCCAg (squamous cell carcinoma antigen), TPA (tissue popyeptid antigen), CA125 (cancer-antigen 125) (Hatzakis et al., 2002). Ein routinemäßiger Einsatz der zuvor genannten Serummarker, sowohl einzeln als auch als Panel, ist aufgrund der mangelnden Sensitivität und Spezifität laut der aktuellen deutschen S3-Leitlinie weder für die Früherkennung noch für die Primär- und Rezidivdiagnostik beim Lungenkarzinom geeignet (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

Dank des stetig wachsenden Verständnisses über die Tumorgenetik sind in den letzten Jahren zunehmend molekulare Biomarker in den Vordergrund getreten. Es wurde eine Reihe von genetischen Alterationen entdeckt, anhand derer eine Einteilung in verschiedene molekulare Subgruppen möglich ist. Zu den wichtigsten Alterationen für das Lungenkarzinom zählen Mutationen im EGF-Rezeptor, ALK- und ROS1-Fusionen sowie BRAF-V600-Mutationen (Buettner und Heydt, 2013; Chan and Hughes, 2015).

Insbesondere die Entdeckung von EGFR-Mutationen hat zu einem Paradigmenwechsel bei der Therapie des NSCLC geführt (Buettner und Heydt, 2013; Ai et al., 2018). Bei Nachweis aktivierender EGFR-Mutationen kommen zielgerichtete Therapien, sogenannte „targeted therapies“, mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) zum Einsatz. Mittlerweile sind 3 TKI-Generationen erhältlich, hierzu zählen beispielsweise Gefitinib, Afatinib und Osimertinib (Ai et al., 2018). Die Anwendung der genannten TKI führt bei Patienten mit einem fortgeschrittenen NSCLC und Nachweis einer entsprechenden EGFR-Mutation zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens im Vergleich zu einer Chemotherapie (Wu et al., 2014; Mok et al., 2017; Wu et al., 2017). EGFR-Mutationen können somit als prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf eine TKI-Therapie sowie als prognostische Biomarker gewertet werden.

ALK- und ROS-1-Fusionen können als prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf Therapie mit Crizotinib gesehen werden. Das progressionsfreie Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC und ALK- bzw. ROS-1-Fusionsnachweis verlängert sich unter der Therapie mit Crizotinib. Somit stellt das Vorliegen von ALK- und ROS-1-Fusionen auch einen prognostischen Biomarker dar (Solomon et al., 2014; Mazières et al., 2015).

Das Vorliegen einer BRAF-V600-Mutation bei Patienten mit einem fortgeschrittenen NSCLC stellt einen prädiktiven Biomarker für das Ansprechen auf eine Therapie mit Dabrafenib und Trametinib dar. Die Ansprechrate bei den genannten BRAF-positiven Patienten war deutlich höher. Die Kombinationstherapie der 2 BRAF-Inhibitoren verlängerte das progressionsfreie Überleben im Vergleich zu Patienten, die eine Chemotherapie erhielten (Planchard et al., 2017).

Daraus resultiert, dass auch der Nachweis einer BRAF-V600-Mutation als prädiktiver und prognostischer Biomarker geeignet ist.

1.2.4 Liquid Biopsy

Laut der deutschen S3-Leitlinie sollen die genannten molekularen und immunhistochemischen Untersuchungen an Gewebeproben durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018). Allerdings ist die Gewebebiopsie im klinischen Alltag mit einigen Limitationen konfrontiert. Prinzipiell stellt die Entnahme von Gewebe immer einen invasiven Eingriff mit potentiellen Komplikationen dar. Wiederholte Entnahmen zur Evaluierung von Tumordynamiken sind einem Patienten daher nur in geringem Umfang zuzumuten. Darüber hinaus liefern Gewebeproben häufig nicht ausreichend Material und spiegeln nur Ausschnitte eines Tumors wider (Santarpia et al., 2018).

Eine Ergänzung zur Gewebeprobe stellt die Liquid Biopsy dar. Unter dem Begriff werden verschiedene Verfahren zusammengefasst. Sie verfolgen das Ziel, von einem Tumor stammende Materialien in unterschiedlichen Medien nachzuweisen (Molina-Vila et al., 2016). Dazu zählen die extrazelluläre, zellfreie DNA (cfDNA) und RNA (cfRNA), zirkulierende Tumorzellen (CTCs), Exosomen sowie tumor-educated platelets (TEP) (Molina-Vila et al., 2016; Santarpia et al., 2018). Das vornehmlich verwendete Untersuchungsmedium ist Blut und dessen Bestandteile, aber auch andere Körperflüssigkeiten wie Urin, Speichel und Bronchialsekret sind geeignet (Santarpia et al., 2018). Die Liquid Biopsy bietet eine Reihe an Vorteilen im Vergleich zur Gewebeprobe: Sie ist weniger invasiv, schnell verfügbar und einfach zu wiederholen (Liang et al., 2018). Die Liquid Biopsy ist mittlerweile ein fester Bestandteil in der deutschen S3-Leitlinie des Lungenkarzinoms. Sind Gewebeproben für molekulare Untersuchungen nicht ausreichend oder Re-Biopsien nicht möglich, kann die Liquid Biopsy zum Einsatz kommen. Darüber hinaus spielt sie bei erworbenen TKI-Resistenzen eine wichtige Rolle zur Bestimmung von Resistenzmechanismen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

1.3 Zirkulierende zellfreie DNA

1.3.1 Geschichte der cfDNA

cfDNA in menschlichen Plasmaproben wurde erstmals im Jahr 1948 von Mandel und Métails entdeckt (Mandel und Métails, 1948). 1966 wurde die Idee von Tan et al. aufgegriffen. Letztere wiesen cfDNA im Serum von Patienten mit systemischen Lupus erythematodes nach, ebenso wie bei Patienten mit Lebererkrankungen und bei Lymphompatienten (Tan et al., 1966). Im Jahr 1977 konnten Leon et al. erhöhte Konzentrationen von cfDNA im Serum von Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten im Gegensatz zu Gesunden nachweisen. Signifikant höhere Konzentrationen von cfDNA konnten bei metastasierten Tumoren im Gegensatz zu nicht-metastasierten Tumoren festgestellt werden. Die Untersuchung der cfDNA-Konzentrationen nach einer Bestrahlung zeigte, dass sinkende cfDNA-Level für eine bessere Prognose mit Rückgang

der Tumorgröße und der Beschwerden sprachen. Im Gegenzug gingen gleichbleibende oder steigende Konzentrationslevel von cfDNA nach einer Behandlung mit einem geringeren Therapieansprechen einher (Leon et al., 1977). Mit dem Beweis durch Stroun und Anker im Jahr 1989, dass bei Tumorpatienten ein Teil der cfDNA vom Tumor abstammt, wurde der Grundstein für die Forschung und Entwicklung des heutigen Konzepts der Liquid Biopsy gelegt (Stroun et al., 1989; Chen et al., 1996; Nawroz et al., 1996).

1.3.2 Definition und allgemeine Charakteristika der cfDNA

Der Begriff „zellfreie DNA“ (cfDNA) bezeichnet den Gesamtpool an cfDNA in zirkulierenden Körperflüssigkeiten wie Blut und Lympheflüssigkeit und in nicht-zirkulierenden Körperflüssigkeiten wie Stuhl, Urin, Sputum, Liquor oder Bronchiallavage. In der Literatur gibt es bisher keinen Konsens über eine einheitliche Nomenklatur der cfDNA, sodass eine Vielzahl von Begriffen und Abkürzungen für die unterschiedlichen Typen von cfDNA parallel verwendet wird (Bronkhorst et al., 2020).

Bei der cfDNA handelt es sich um Doppelstrang-DNA, die resistent gegenüber RNase und Pronase, jedoch sensibel für DNase I ist (Stroun et al., 1987). Sie weist eine heterogene Verteilung der DNA-Fragmentlängen zwischen 0,5 und 21 kb auf (Stroun et al., 1987). Lo et al. konnten für zirkulierende, fetale DNA eine Halbwertszeit von 16 Minuten im Plasma ermitteln (Lo et al., 1999 a), während Yao et al. in einem in vitro Experiment eine Halbwertszeit von 2,5 Stunden für cfDNA im Serum feststellten (Yao et al., 2016). cfDNA kann in unterschiedlicher Form auftreten (Thierry et al., 2016). In Form eines Nukleosom liegt sie vor, wenn sie mit Histonen einen Komplex bildet (Holdenrieder et al., 2001). Alternativ kann cfDNA auch makromolekulare Komplexe durch Bindung an Serumproteine wie Albumin oder Immunglobuline ausbilden (Bronkhorst et al., 2019). cfDNA kommt ebenso internalisiert in Vesikeln vor, beispielsweise in Exosomen oder Apoptosekörperchen (Halicka et al., 2000; Thakur et al., 2014). Außerdem kann sie an die Oberfläche anderer Zellen wie Lymphozyten oder Erythrozyten gebunden sein (Laktionov et al., 2004).

1.3.3 Ursprung, Freisetzungs- und Abbaumechanismen der cfDNA

Der Ursprung der cfDNA, ebenso wie die Freisetzungsmechanismen, sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt (Stroun et al., 2001; Aucamp et al., 2018). Es werden 2 verschiedene Hauptquellen der cfDNA diskutiert: Zum einen werden Mechanismen des Zelluntergangs wie die Apoptose, Nekrose oder Pyroptosis als Quelle der cfDNA gesehen, zum anderen wird von aktiven Freisetzungsmechanismen als Ursprung der cfDNA ausgegangen (Aucamp et al., 2018).

Es wird angenommen, dass die cfDNA beim Gesunden hauptsächlich durch Apoptose freigesetzt wird (Jahr et al., 2001; Suzuki et al., 2008). Beim Zelluntergang durch Apoptose wird das Chromatin durch Endonukleasen fragmentiert und zu DNA-Fragmenten einer Länge von ca. 180 bp gespalten (Giacona et al., 1998; Nagata, 2000). Der größte Teil der gefundenen cfDNA-

Fragmente im Plasma oder Serum weist ebenfalls eine Länge von ca. 180 bp auf, sodass ein apoptotischer Ursprung naheliegt (Jahr et al., 2001; Suzuki et al., 2008). Beim Gesunden wird angenommen, dass die cfDNA aus hämatopoetischen Zellen stammt (Lui et al., 2002). Die cfDNA-Konzentration im Blut von Gesunden beträgt zwischen 0 und 100 ng/ml (Schwarzenbach et al., 2011). Im Mittel liegt sie bei 13 ng/ml (Jahr et al., 2001).

Die cfDNA-Konzentration im Blut von Tumorpatienten beträgt zwischen 0 und >1000 ng/ml (Schwarzenbach et al., 2011). Im Durchschnitt wurden Werte von 180 ng/ml gemessen (Jahr et al., 2001). Bei Tumorpatienten wird vermutet, dass die cfDNA sowohl apoptotischen wie auch nekrotischen Ursprung ist (Jahr et al., 2001). Die Nekrose führt im Gegensatz zur Apoptose zur Freisetzung von deutlich längeren und unterschiedlich langen cfDNA-Fragmenten (Jahr et al., 2001; Suzuki et al., 2008). Bei Tumorpatienten konnten sowohl kurze als auch lange Fragmente isoliert werden, was für einen Zelltod durch Nekrose und Apoptose spricht (Jahr et al., 2001; Wang et al., 2003). Es wird angenommen, dass es durch das expansive Tumorwachstum zu Problemen mit der Vaskularisation innerhalb des Tumorgewebes kommt: Die daraus resultierende Hypoxie führt zur Apoptose und Nekrose umliegender Tumor- und Nichttumorzellen (Jahr et al., 2001). Jahr et al. gehen davon aus, dass der überwiegende Teil der cfDNA beim Tumorpatienten von normalen, den Tumor umgebenden Zellen abstammt, die untergehen. Ein weiterer gewisser Prozentsatz der cfDNA stammt von absterbenden Tumorzellen selbst ab (Jahr et al., 2001). Dieser direkt vom Tumor ausgehende Teil der cfDNA wird auch als zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) bezeichnet (Bronkhorst et al., 2020). In Abhängigkeit von der Tumorentität, dem Tumorstadium und der Tumorlast stellt die ctDNA einen Anteil von 0,01 bis 90% der cfDNA dar (Diehl et al., 2005; Bettgowda et al., 2014; Barlebo Ahlborn and Ostrup, 2019). Einen Beleg dafür, dass mindestens ein Teil der cfDNA vom Tumor selbst abstammt, legten Stroun et al. bereits im Jahr 1989 vor. Sie zeigten, dass die isolierte cfDNA typische tumorspezifische Eigenschaften aufwies, in diesem Fall eine reduzierte Strang-Stabilität (Stroun et al., 1989). Seitdem wurden in einer Vielzahl von Studien weitere genetische und epigenetische Alternationen bei der ctDNA gefunden, die mit denen in der Tumor-DNA aus Gewebeproben übereinstimmten (Jung et al., 2010).

Als weiterer möglicher Ursprung der cfDNA wird die aktive Freisetzung selbiger diskutiert. Bei in vitro Experimenten konnten eine aktive Freisetzung bei Froschherzen (Stroun et al., 1977), Lymphozyten (Anker et al., 1975) und Zelllinien (Stroun et al., 2001) beobachtet werden.

Auch über die Abbaumechanismen der cfDNA im Blut ist nur wenig bekannt (Jung et al., 2010). Der Abbau hängt von der DNase I Aktivität ab (Tamkovich et al., 2006), von der Aufnahme durch Leber und Milz mit folgender Phagozytose durch Makrophagen durch DNase I (Gauthier et al., 1996) sowie von der renalen Exkretion in den Urin (Botezatu et al., 2000).

1.3.4 cfDNA-Integrität

Das Konzept der cfDNA-Integrität basiert auf der Annahme, dass bei Gesunden kürzere cfDNA-Fragmente apoptischen Ursprungs und bei Tumorpatienten längere Fragmente nekrotischen Ursprungs im Blut zu finden sind (Jahr et al., 2001). Zur Überprüfung dieser Hypothese isolierten Wang et al. im Jahr 2003 cfDNA aus Plasmaproben von Brustkrebspatientinnen und bestimmten anschließend den Anteil von kurzen cfDNA-Fragmenten von 100 bp Länge wie auch von längeren cfDNA-Fragmenten mit 400 bp Länge. Mittels einer eigens entwickelten Formel berechneten sie den cfDNA-Integritätsindex, der das Verhältnis von langen zu kurzen cfDNA-Fragmenten wiedergab. Wang et al. zeigten, dass der cfDNA-Integritätsindex bei Brustkrebspatientinnen signifikant höher war als der von Patientinnen ohne Neoplasie (Wang et al., 2003). Umetani et al. entwickelten eine weitere Methode zur Berechnung der cfDNA-Integrität. Sie isolierten ebenfalls cfDNA und verwendeten 2 verschiedene ALU-Sequenzen mit einer Länge von 115 bp und 247 bp, um die Verteilung von kurzen und langen cfDNA-Fragmenten zu bestimmen. Umetani et al. berechneten den cfDNA-Integritätsindex als Quotienten aus den längeren zu den kürzeren DNA-Fragmenten. Auch mit Hilfe dieser Kalkulationsmethode konnten erhöhte Werte der cfDNA-Integritätsindices für Brustkrebspatientinnen und Patienten mit einem kolorektalen Karzinom im Vergleich zu Gesunden gefunden werden. Zusätzlich eignete sich der cfDNA-Integritätsindex bei Brustkrebspatientinnen als Prädiktor für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen (Umetani et al., 2006a und 2006b).

1.3.5 Präanalytische Bedingungen für die cfDNA-Bestimmung

Für einen zuverlässigen, validen und effizienten Nachweis von zellfreier DNA müssen bestimmte präanalytische und analytische Bedingungen erfüllt sein. Aktuell bestehen jedoch weder Konsens noch standardisierte Vorgehensweisen für die Analyse von cfDNA. Die Wahl des Probenmaterials, die Gewinnung, Sammlung, Verarbeitung und Lagerung der Proben ebenso wie die Isolations- und Quantifizierungsweise können die qualitativen und quantitativen cfDNA-Messungen beeinflussen (Bronkhorst et al., 2015; Fleischhacker und Schmidt, 2020).

Für die Analyse von cfDNA wird die Verwendung von Plasmaproben empfohlen, da diese weniger anfällig für zelluläre Kontamination durch genomische DNA sind (Bronkhorst et al., 2015). Im Gegensatz zu Plasmaproben enthalten Serumproben bis zu 20-fach höhere Konzentrationen an cfDNA, was wiederum auf Gerinnungsprozesse mit konsekutiver Zelllyse von hämatopoetischen Zellen im Entnahmeröhrchen zurückzuführen ist (Lee et al., 2000).

Die Wahl des zu verwendenden Blutentnahmeröhrchens hängt von der Zeit bis zur Weiterverarbeitung der Proben ab. Wird die Plasmaprobe innerhalb weniger Stunden zentrifugiert und kühl gelagert, können EDTA-Röhrchen verwendet werden (Mehrotra et al., 2017; Schmidt et al., 2017). Bei EDTA-Röhrchen kommt es in Abhängigkeit von der Zeit bis zur Zentrifugation zu einem Anstieg der cfDNA-Konzentration: Teilweise wurde ein Konzentrationsanstieg nach 2

Stunden entdeckt (Xue et al., 2009), teilweise erst nach 8 Stunden (Jung et al., 2003). Sollen Blutproben vor der Plasmapräparation gelagert oder verschickt werden, ist die Verwendung spezieller Entnahmeröhrchen für Untersuchungen an zellfreier DNA angeraten (Fleischhacker und Schmidt, 2020), wie beispielweise cell-free DNA BCT[®] Röhrchen und PAXgene DNA Blutentnahmeröhrchen. Diese können die cfDNA-Konzentration bei Raumtemperatur für bis zu 7 Tagen stabil halten (Toro et al., 2015; Schmidt et al., 2017), indem sie die Kontamination der cfDNA mit genomischer DNA aus Leukozyten verhindern (Fleischhacker und Schmidt, 2020). Für die Plasmaisolation sollten die Blutproben zunächst für 10 Minuten bei 1200 bis 1600 g und im Anschluss für weitere 10 Minuten bei 16.000 g zentrifugiert werden (Chiu et al., 2001; El Messaoudi et al., 2013), wobei der zweite Zentrifugationsschritt auch nach dem Auftauen der Proben erfolgen kann (Swinkels et al., 2003).

In Abhängigkeit von der Zeit verändert sich die cfDNA-Konzentration bei Raumtemperatur in den zellfreien Plasmen, bei 4°C bleibt sie hingegen für bis zu 3 Stunden konstant (El Messaoudi et al., 2013). Die zellfreien Plasmen sollten daher nach spätestens 3 Stunden Lagerung bei 4°C weiterverarbeitet werden (El Messaoudi et al., 2013). Alternativ können die zellfreien Plasmen bis zu 2 Wochen bei -80°C gelagert werden, ohne dass sich die cfDNA-Konzentration signifikant verändert (Chan et al., 2005). Die Datenlage zur langfristigen Lagerung von cfDNA bzw. zellfreien Plasmen ist sehr beschränkt. Koide et al. konnten für zellfreie fetale DNA nachweisen, dass diese über einen Zeitraum von 4 Jahren bei -20°C stabil blieb (Koide et al., 2005). Sato et al. untersuchten den Nachweis von EGFR-Mutationen in cfDNA und zellfreien Plasmen, welche 7 Jahre lang bei -20°C respektive -80°C gelagert wurden. Nach diesem Zeitraum trat bei der isolierten cfDNA eine Reduktion der genannten Mutation von 25-30% auf, in den zellfreien Plasmen lag der Rückgang sogar bei 35-40% (Sato et al., 2018). Sozzi et al. ermittelten in einer vergleichbaren Studie eine jährliche Abbaurate von 30,5% bzw. 30,7% bei Lagerung von isolierter cfDNA bei -20° und von zellfreien Plasmen bei -80°C (Sozzi et al., 2005). Pinzani et al. fanden eine durchschnittliche Reduktion der absoluten cfDNA-Konzentration von 38% nach 21-monatiger Lagerung von zellfreien Plasmen bei -80°C (Pinzani et al., 2014). Zellfreie Plasmaproben können bis zu zweimal aufgetaut und wieder eingefroren werden, ohne dass es eine Änderung der cfDNA-Konzentration und -Integrität nach sich zieht (El Messaoudi et al., 2013). Für die Isolation der cfDNA aus den zellfreien Plasmen stehen unterschiedliche kommerzielle Kits zur Verfügung, wobei die überwiegend angewendeten Kits auf Silicagel-Säulenmatrix oder magnetischen Beads basieren (Sorber et al., 2017). Ein vielfach für die Isolation von cfDNA angewendetes Kit ist das QIAamp Circulating Nucleic Acid kit (Diefenbach et al., 2018), mit dem große Ausbeuten an cfDNA erreicht werden konnten (Sorber et al., 2017; Diefenbach et al. 2018; Markus et al., 2018). Eine kostengünstigere Alternative mit kürzerer Prozesszeiten stellen Isolationskits auf Basis magnetischer Beads dar (Diefenbach et al., 2018), wie beispielsweise das MagMAX cell free DNA Isolation kit (Markus et al., 2018).

Nach erfolgreicher Extraktion kann die isolierte cfDNA bei -20°C gelagert werden: El Messaoudi et al. stellten eine leichte Verringerung der cfDNA-Konzentration nach 3-monatiger Lagerung fest, der Nachweis bestimmten Sequenzen oder Mutationen gelang auch nach 9 Monaten Lagerung der isolierten cfDNA (El Messaoudi et al., 2013). Isolierte cfDNA kann bis zu dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, ohne Einfluss auf die Konzentration und cfDNA-Integrität (Chan et al., 2005; El Messaoudi et al., 2013).

1.3.6 Nachweismethoden der cfDNA

Es stehen unterschiedliche Messmethoden zur Quantifizierung zellfreier DNA zur Verfügung, wobei die quantitative PCR ebenso wie fluorimetrische Messungen am weitesten verbreitet sind (Trigg et al., 2018).

Die quantitative Real-Time-PCR stellt eine hoch sensitive Nachweismethode dar. Unterschiedliche PCR-Ansätze mit verschiedenen Fluorophoren und Zielgenen können zur Detektion zellfreier DNA eingesetzt werden (Weng et al., 2019). Eine Reihe weiterer PCR-Methoden kommt bei der Quantifizierung von cfDNA zum Einsatz (Weng et al., 2019): Die direkte quantitative PCR (Umetani et al., 2006b), die Duplex Real-Time PCR (Chen et al., 2017) und die digitale PCR, die sich durch große Genauigkeit und Sensitivität auszeichnet (Day et al., 2013; Weng et al., 2019). Zur digitalen PCR zählen die droplet digital PCR (Hindson et al., 2011) und das BEAMing (Dressman et al., 2003; Diehl et al., 2006).

Im Vergleich zur quantitativen PCR stellt die Fluorometrie ein einfacheres und kostengünstigeres Verfahren mit hoher Sensitivität dar. Häufig verwendete Farbstoffe sind SYBR Green 1 und PicoGreen (Weng et al., 2019). Die fluorimetrisch gemessenen und mittels quantitativer PCR bestimmten cfDNA-Level korrelierten in hohem Maße miteinander (Spzechinski et al., 2008; Ramachandran et al., 2013).

Auch die Spektrophotometrie kann zur quantitativen Bestimmung der cfDNA eingesetzt werden, wobei diese Methode durch die Art der Probe und die Extraktionsmethode beeinflusst werden kann (Bronkhorst et al., 2015). Es konnte keine Korrelation zwischen der spektrophotometrisch gemessenen und der mittels quantitativer PCR bestimmten cfDNA-Konzentration nachgewiesen werden (Ramachandran et al., 2013).

Für den Nachweis von Mutationen in der ctDNA bei Tumorpatienten kommen verschiedene Methoden wie beispielweise das BEAMing (Bando et al., 2019), das next-generating sequencing (NGS) (Perets et al., 2018), die digitale PCR (Morikawa et al., 2018) und die allelspezifische quantitative PCR (Douillard et al., 2014) zum Einsatz. Für den Nachweis von Methylierungsmustern in der ctDNA von Tumorpatienten eignet sich die methylierungsspezifische PCR (Nakayama et al., 2002; Dietrich et al., 2012).

1.3.7 Quantitative Bestimmung von cfDNA beim Gesunden

Erhöhte cfDNA-Konzentrationen sind nicht ausschließlich mit Erkrankungen assoziiert, sondern können auch beim Gesunden unter verschiedenen, nicht-pathologischen Umständen auftreten.

In einigen Studien konnten bei gesunden Probanden erhöhte cfDNA-Level in Abhängigkeit vom Alter nachgewiesen werden (Zhong et al., 2007; Jylhava et al., 2011; Ørntoft et al., 2021).

Über interindividuelle Unterschiede hinaus konnten signifikante, intraindividuelle bezüglich der cfDNA-Konzentration in Abhängigkeit von der Tageszeit gefunden werden: Im Laufe des Tages kam es bei gesunden Probanden zu einem signifikanten Abfall der cfDNA-Level (Madsen et al., 2019).

Erhöhte cfDNA-Konzentrationen wurden bei starker körperlicher Belastung nachgewiesen, beispielsweise bei Sportlern nach einem Halb- oder Ultramarathon (Atamaniuk et al., 2004, 2008), nach dem Gewichtheben (Atamaniuk et al., 2010) und nach Fahrradfahren auf dem Fahrradergometer (Tug et al., 2017). cfDNA stellt somit auch einen potenziellen Belastungs- und Leistungsmarker dar (Tug et al., 2017).

Neben körperlichem Stress kann auch psychosozialer Stress eine Erhöhung der cfDNA-Konzentration bei Gesunden zur Folge haben (Hummel et al., 2018).

Im Plasma und Serum von Schwangeren wurde zirkulierende fetale DNA (cffDNA) nachgewiesen (Lo et al., 1997), deren Konzentration mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft ansteigt (Lo et al., 1998a). Erhöhte cffDNA-Konzentrationen wurden aber auch bei Präeklampsie (Lo et al., 1999b) und vor einer Frühgeburt nachgewiesen (Leung et al., 1998). Darüber hinaus eignet sich die cffDNA für qualitative Untersuchungen wie beispielweise den gering invasiven Pränataltest, der u.a. als Screeningmethode zur Bestimmung des Rhesusfaktors (Lo et al. 1998b) sowie zur Detektion von Aneuploidien wie der Trisomie 13, Trisomie 18 und Trisomie 21 und der Monosomie X (Gil et al., 2017) Anwendung findet.

1.3.8 Quantitative Bestimmung von cfDNA bei nicht-neoplastischen Erkrankungen

Bei einer Reihe von nicht-neoplastischen Erkrankungen wurden ebenfalls erhöhte cfDNA-Konzentrationen im Vergleich zu Gesunden gefunden.

Bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses (Bartoloni et al., 2011; Zhang et al., 2014) und dem Sjögren-Syndrom (Bartoloni et al., 2011) wurden signifikant höhere cfDNA-Konzentrationen als bei der gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen. Gleiches lässt sich auch bei Patienten mit Viruserkrankungen wie dem Dengue-Virus (Ha et al., 2011) und dem Hantavirus (Yi et al., 2014) feststellen. Bei systemischen Entzündungsreaktionen wie der Sepsis waren ebenfalls erhöhte cfDNA-Konzentrationslevel nachweisbar, anhand derer außerdem Aussagen zur Schwere der Erkrankung und zur Sterblichkeit möglich waren (Rhodes et al., 2006; Dwivedi et al., 2012).

Bei Traumapatienten konnten nicht nur höhere cfDNA-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden, es wurde auch eine Korrelation zwischen der cfDNA-Konzentration und der Schwere des Traumas festgestellt (Lo et al., 2000; Lam et al., 2003). Außerdem konnten anhand der Höhe der cfDNA-Level bei Diagnosestellung und im Verlauf prognostische Aussagen über das Auftreten von Organversagen getroffen werden (Lam et al., 2003). Auch bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom (Cui et al., 2013) oder einem Schlaganfall (Rainer et al., 2003; Vajpeyee et al., 2018) eigneten sich quantitative Bestimmungen der cfDNA zur Beurteilung der Schwere der Erkrankung und zur Prognoseabschätzung.

Seit dem Nachweis von Spender-spezifischer zellfreier DNA im Blut des Empfängers stellt die Transplantationsmedizin ein weiteres, gut erforschtes Anwendungsgebiet für quantitative cfDNA-Bestimmungen dar (Lo et al., 1998c). Ein erhöhtes Risiko für eine akute Abstoßungsreaktion des Spenderorgans besteht bei Empfängern mit einem erhöhten Anteil an Spender-spezifischer cfDNA an der cfDNA-Gesamtkonzentration nach Leber- oder Lungentransplantation (Schütz et al., 2017; Agbor-Enoh et al., 2019).

1.3.9 Quantitative Bestimmung von cfDNA bei Tumorerkrankungen

Der Nachweis erhöhter cfDNA-Konzentrationen in Plasma und Serum von Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Probanden konnte in einer Vielzahl von Studien für unterschiedliche Tumorentitäten bestätigt werden (Fleischhacker und Schmidt, 2007). Diese Ergebnisse wurden u.a. bei Patienten mit Darmkrebs (Qi et al., 2013), Nierenzellkarzinom (Hauser et al., 2010, Skrypkina et al., 2016), hepatozellulärem Karzinom (Chen et al., 2013) oder Brustkrebs (Gal et al., 2004; Hashad et al., 2012) erzielt.

In einigen Studien gelang es darüber hinaus, zwischen Patienten mit malignen und benignen Erkrankungen anhand der cfDNA-Konzentration zu unterscheiden: Es konnten Patienten mit benignen und malignen gastrointestinalen Erkrankungen unterschieden werden (Shapiro et al., 1983; Qi et al., 2013). Ebenso konnten Patientinnen mit gutartigen Brusttumoren (z.B. Fibroadenome) von Patientinnen mit einem malignen Brusttumor differenziert werden (Kohler et al., 2009; Hashad et al., 2012). Patienten mit einer benignen Prostatahyperplasie divergierten signifikant von Prostatakarzinompatienten (Khani et al., 2019). Eine Differenzierung von Patienten mit einer Leberzirrhose und Patienten mit einem hepatozellulärem Karzinom anhand der cfDNA-Level gelang wiederum nicht (Ren et al., 2006). Signifikante Unterschiede zwischen den gesunden und benignen erkrankten Kontrollen gab es häufig nicht (Kamat et al., 2010; Hashad et al., 2012; Qi et al., 2013; Khani et al., 2019).

Darüber hinaus gelang es einigen Forschungsgruppen, Korrelationen zwischen der cfDNA-Konzentration und der Tumorgroße (Kohler et al., 2009; Huang et al., 2012) sowie dem Tumorstadium (Kamat et al., 2010; Agassi et al., 2015) zu belegen. In anderen Untersuchungen konnte keine Korrelation zwischen der cfDNA-Konzentration und klinischen sowie

demographischen Merkmalen des Patientenkollektivs nachgewiesen werden (Gal et al., 2004; Huang et al., 2006; Schou et al., 2018).

Prädiktive Aussagen zum Therapieansprechen bzw. -versagen mittels quantitativen cfDNA-Bestimmungen gelangen beispielsweise bei Patienten mit einem Rektumkarzinom: Bei Respondern kam es nach Therapieabschluss zu einer signifikanten Reduktion der cfDNA-Konzentration, während bei Non-Respondern die cfDNA-Level nach Ende der Therapie anstiegen (Zitt et al., 2008). Hohe präoperative cfDNA-Level galten außerdem als Prädiktor für das Wiederauftreten von Rektumkarzinomen (Schou et al., 2018) und als unabhängiger Prädiktor für das krankheitsspezifische Überleben bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom (Kamat et al., 2010).

Auch prognostische Angaben waren anhand von quantitativen cfDNA-Konzentrationsbestimmungen möglich: Hohe cfDNA-Level gingen mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben bei Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs einher (Cheng et al., 2018), mit einem kürzeren krankheitsspezifischen Überleben bei Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom oder einem Ovarialkarzinom (Ren et al., 2006; Kamat et al., 2010) sowie mit einem kürzeren Gesamtüberleben bei Patienten, die unter einem hepatozellulären Karzinom oder einem metastasierten Brustkrebs litten (Ren et al., 2006; Piciocchi et al., 2013; Cheng et al., 2018).

1.3.10 cfDNA-Integritätsmessungen bei Tumorpatienten

In Studien zu unterschiedlichen Tumorentitäten wie u.a. dem Melanom (Pinzani et al., 2011), Prostatakarzinom (Khani et al., 2019), kolorektalem Karzinom (Hao et al., 2014), Lymphom (Li et al., 2017; Wu et al., 2019) und der akuten Leukämie (Gao et al., 2010) wurden signifikant erhöhte cfDNA-Integritätsindices bei Tumorpatienten im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen. Beim Mammakarzinom (Tang et al., 2018b) und beim hepatozellulären Karzinom (Chen et al., 2012) wurden erhöhte cfDNA-Integritätsindices bei Tumorpatienten im Vergleich zur gesunden bzw. benigne erkrankten Kontrollgruppe entdeckt. In anderen Studien wurden hingegen höhere cfDNA-Integritätsindices bei der gesunden bzw. benigne erkrankten Kontrollgruppe im Vergleich zu Patienten mit Mammakarzinom (Arko-Boham et al., 2019) oder mit hepatozellulärem Karzinom (Huang et al., 2016) nachgewiesen. Auch bei Blasenkarzinompatienten wurden höhere cfDNA-Integritätsindices als in der benigne erkrankten bzw. gesunden Kontrollgruppe gemessen (Hauser et al., 2012).

Teilweise konnten zusätzlich Korrelationen zwischen dem cfDNA-Integritätsindex und der Tumorgröße (Gang et al., 2010; Chen et al., 2012), dem Tumorstadium (Gang et al., 2010; Chen et al., 2012; Hao et al., 2014) sowie dem Vorliegen einer Lymphknoten- oder Fernmetastasierung (Chen et al., 2012; Khani et al., 2019) festgestellt werden. In anderen Untersuchungen konnte

keine Korrelation mit klinischen und demographischen Eigenschaften detektiert werden (Hauser et al., 2012; Huang et al., 2016; Wu et al., 2019).

Eine sichere Differenzierung zwischen maligne und benigne Erkrankten anhand des cfDNA-Integritätsindex konnte in einigen Studien erzielt werden (Hao et al., 2014; Stötzer et al., 2014; Khani et al. 2019). Signifikante Unterschiede hinsichtlich der cfDNA-Integrität zwischen benigne Erkrankten und gesunden Probanden wurden wiederum häufig nicht gefunden (Huang et al., 2016; Tang et al., 2018b; Khani et al., 2019). Patienten mit malignen Schilddrüsenknoten konnten nicht von Patienten mit benignen Schilddrüsenknoten mittels cfDNA-Integritätsindexbestimmung abgegrenzt werden (Thakur et al., 2019).

Über die diagnostische Anwendung hinaus wurde in einigen Arbeiten die prädiktive und prognostische Aussagekraft der cfDNA-Integritätsmessungen untersucht. Umetani et al. zeigten, dass die cfDNA-Integrität bei Brustkrebspatientinnen als einziger signifikanter, präoperativer Prädiktor für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen geeignet war (Umetani et al., 2006a). Bei Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs gingen erhöhte cfDNA-Integritätsindices sowohl vor als auch nach dem ersten Zyklus Systemtherapie mit einer längeren progressionsfreien Zeit und einem längeren Gesamtüberleben einher (Cheng et al., 2018). Im Gegensatz dazu wiesen Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom, bei denen eine Verringerung des cfDNA-Integritätsindex nach einer Bestrahlung auftrat, eine längere krankheitsfreie Überlebenszeit auf als Patienten, deren cfDNA-Integritätsindex nach Erhalt der Therapie weiterhin erhöht war (Chan et al., 2008).

1.3.11 Qualitative cfDNA-Bestimmungen bei Tumorpatienten

Bei dem vom Tumor abstammenden Teil der cfDNA, sprich der zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA), können dieselben spezifischen genetischen und epigenetischen Veränderungen wie bei der Tumor-DNA, die aus Tumorgewebe isoliert wurde, nachgewiesen werden. Hierzu zählen beispielweise Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, Mikrosatellitenalterationen und Hypermethylierungen unterschiedlicher Gene (Jung et al., 2010). Durch die Bestimmung dieser genetischen und epigenetischen Alternationen in der ctDNA von Tumorpatienten sind, ebenso wie bei den bereits vorgestellten quantitativen cfDNA-Konzentrations- und Integritätsmessungen, diagnostische, prädiktive und prognostische Aussagen möglich.

Bei den beiden am häufigsten untersuchten, genetischen Alterationen handelt es sich um Mutationen im Onkogen KRAS und im Tumorsuppressorgen p53 (Jung et al., 2010). KRAS-Mutationen wurden bereits 1994 in der ctDNA von Pankreastumorpatienten nachgewiesen (Sorenson et al., 1994) und seitdem in weiteren Tumoren wie dem Ovarialkarzinom (Morikawa et al., 2018) und dem kolorektalen Karzinom (Thierry et al., 2014; Bando et al., 2019). Die Konkordanz zwischen dem Mutationsnachweis in der ctDNA und im Gewebe lag bei bis zu 96% (Thierry et al., 2014). Der Nachweis bestimmter KRAS-Mutationen in der ctDNA konnte bei

Patientinnen mit einem Klarzellkarzinom des Ovars zum Therapiemonitoring eingesetzt werden (Morikawa et al., 2018) und war bei diesen sowie bei Pankreaskarzinompatienten mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Chen et al., 2010; Morikawa et al., 2018; Perets et al., 2018). Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 waren ebenfalls in der ctDNA unterschiedlicher Tumoren nachweisbar (Madic et al., 2015; Kim et al., 2019; Treger et al., 2018; Rodriguez et al., 2019; Takeda et al., 2019;) und dienten zum Therapiemonitoring (Kim et al., 2019). Als weitere wichtige, therapierelevante Mutationen sind BRAF-Mutationen zu nennen, die u.a. bei Melanompatienten (Daniotti et al., 2007; Tang et al., 2018a) und Patienten mit kolorektalem Karzinom (Thierry et al., 2014; Mas et al., 2019) mit hoher Konkordanz im Tumorgewebe und in der ctDNA zu finden waren.

Die ctDNA dient außerdem dem Nachweis von Mikrosatellitenalterationen: Mikrosatelliteninstabilität und der Verlust der Heterozygotie konnten in der ctDNA von Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten wie dem Prostatakarzinom (Müller et al., 2008; Mayrhofer et al., 2018), dem Mammakarzinom (Schwarzenbach et al., 2012) und dem Melanom (Nakayama et al., 2000; Ahmed et al., 2003) ausfindig gemacht werden.

Neben genetischen Alternationen bestand auch eine große Konkordanz zwischen epigenetischen Veränderungen im Tumorgewebe und in der ctDNA. Erstmals gelang es Wong et al. im Jahr 1999, dieselben Methylierungsanomalien des Tumorsuppressorgens p16 in Tumor-DNA und ctDNA bei Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom nachzuweisen (Wong et al., 1999). Hypermethylierungen des p16-Gens wurden seither u.a. auch in der ctDNA bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen (Nakayama et al., 2002) und Mammakarzinomen (Silva et al., 1999) detektiert. Weitere Beispiele für Übereinstimmungen zwischen dem Methylierungsmuster in der Tumor-DNA und in der ctDNA sind GSTP-Hypermethylierungen beim Prostatakarzinom (Ellinger et al., 2008), APC-Hypermethylierungen beim Ösophaguskarzinom (Kawakami et al., 2000) sowie RASSF1A- und RAR β 2-Hypermethylierungen beim Mammakarzinom (Skvortsova et al., 2006). Der Nachweis von PCDH10- und RASSF1A-Methylierungen in der ctDNA von Patienten mit Magenkrebs ging mit einer schlechteren Prognose einher (Pimson et al., 2016), ebenso wie Methylierungen von RASSF1A und APC in der ctDNA bei Brustkrebspatientinnen (Müller et al., 2003).

1.3.12 Quantitative und qualitative cfDNA-Bestimmungen beim Lungenkarzinom

Der Einsatz von quantitativen und qualitativen cfDNA-Bestimmungen als diagnostische, prädiktive und prognostische Biomarker wurde auch für das Bronchialkarzinom ausgiebig erforscht, wobei sich der überwiegende Teil der Studien mit dem NSCLC beschäftigt.

NSCLC-Patienten wiesen signifikant höhere cfDNA-Konzentrationen als gesunde Probanden auf (Paci et al., 2009; Catarino et al., 2012; Szpechcinski et al., 2015; Szpechcinski et al., 2016; Soliman et al. 2018). Die Analyse der Grenzwertoptimierungskurve zur Differenzierung der

genannten Patientengruppen ergab eine AUC zwischen 0,79 (Paci et al., 2009) und 0,9 (Szpehcinski et al., 2015), es konnte eine Sensitivität von bis zu bis 90% und eine Spezifität von 80,5% erreicht werden (Szpehcinski et al., 2015).

Signifikante cfDNA-Konzentrationsunterschiede zwischen Patienten mit einem malignen Lungentumor und Patienten mit einem benignen, pulmonalen Rundherd oder einer chronisch entzündlichen Lungenerkrankung wie beispielsweise dem Asthma bronchiale, der COPD oder der Sarkoidose wurden in einigen Studien beobachtet (Szpehcinski et al., 2015; Szpehcinski et al., 2016; Soliman et al., 2018), in anderen wiederum nicht (Schmidt et al., 2008; Sriram et al., 2012). Die diagnostische Wertigkeit bei der Differenzierung zwischen maligne und benigne Erkrankten war geringer als bei der Gegenüberstellung von maligne Erkrankten und Gesunden: Die Grenzwertoptimierungskurve zur Differenzierung von malignen und benignen Lungenkranken erreichte bei einem Cut-off-Wert von 5,25 ng/ml eine Sensitivität von nur 56% und eine Spezifität von 91% (Szpehcinski et al., 2015). Häufig wurden keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Kontrollgruppen zwischen den benigne Erkrankten und den Gesunden gefunden (Szpehcinski et al. 2015; Szpehcinski et al. 2016; Soliman et al., 2018).

Einige Studien entdeckten Korrelationen zwischen der cfDNA-Konzentration und dem Tumorstadium (Gautschi et al., 2004; Soliman et al. 2018; Ma et al., 2019; Mirtavoos-Mahyari et al., 2019) sowie der Tumorgröße (Ma et al., 2019). Der andere Teil der Arbeiten konnte keine Korrelation nachweisen (van der Drift et al., 2010; Catarino et al., 2012; Szpehcinski et al., 2015; Tissot et al., 2015). Hyun et al. berichteten, dass hohe cfDNA-Konzentrationen mit einer großen metabolischen Tumorlast einhergingen (Hyun et al., 2019). Andere Studien fanden keine Korrelation zwischen cfDNA-Level und metabolischem Tumolvolumen (Nygaard et al., 2014; Morbelli et al., 2017).

Erhöhte prätherapeutische cfDNA-Level (Gautschi et al., 2004) sowie steigende oder gleichbleibend hohe cfDNA-Level unter bzw. nach Therapie waren mit einem schlechten Therapieansprechen bei NSCLC-Patienten verbunden (Gautschi et al., 2004; Pan et al., 2012; Ma et al., 2019). Andere Forschungsgruppen sahen in der prätherapeutischen cfDNA-Konzentration keinen Prädiktor für das Ansprechen auf eine Systemtherapie (Kumar et al., 2010; Tissot et al., 2015; Li et al., 2016).

Hohe cfDNA-Konzentrationen bei NSCLC-Patienten waren mit einem kurzen progressionsfreien Überleben (Hyun et al., 2017; Hyun et al., 2019) und einem geringeren Gesamtüberleben assoziiert (Sirera et al., 2011; Tissot et al., 2015; Hyun et al., 2017; Hyun et al., 2019). In anderen Studien waren keine prognostischen Aussagen anhand der cfDNA-Konzentration möglich (Sozzi et al., 2001; Li et al., 2016).

Im Gegensatz zu den cfDNA-Konzentrationsmessungen beim NSCLC ist die Studienlage zum Einsatz von cfDNA-Integritätsmessungen als Biomarker sehr begrenzt (Szpehcinski et al., 2016). Es konnten signifikant höhere cfDNA-Integritätsindices bei NSCLC-Patienten im

Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden (Szpehcinski et al., 2016; Chudasama et al., 2018; Soliman et al., 2018). Während die diagnostische Wertigkeit bei Chudasama et al. und Soliman et al. durch niedrige Sensitivität, Spezifität und eine geringe AUC von nur 0,61 bzw. 0,65 eingeschränkt war, konnten Szpehcinski et al. bei einem Cut-off-Wert von $>2,64$ eine Sensitivität von 91% und eine Spezifität von 68,2% erreichen, die AUC betrug 0,80 (Szpehcinski et al., 2016; Chudasama et al., 2018; Soliman et al., 2018). Es waren jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich des cfDNA-Integritätsindex zwischen Patienten mit einem NSCLC und Patienten mit benignen pulmonalen Rundherden detektierbar (Szpehcinski et al., 2016). Teilweise konnten Differenzen zwischen Lungenkrebspatienten und Patienten mit benignen Lungenerkrankungen nachgewiesen werden (Soliman et al. 2018), teilweise nicht (Schmidt et al., 2008). Auch Sriram et al. konnten bei der cfDNA-Integritätsmessung von Serumproben keine Unterschiede zwischen Patienten mit malignen und benignen Lungenerkrankungen feststellen, bei der Bestimmung des cfDNA-Integritätsindex aus Pleurapunktat zeigten sich wiederum höhere Werte bei Lungenkrebspatienten als bei benigne Erkrankten (Sriram et al., 2012). Niedrige cfDNA-Integritätswerte waren mit einem besseren Überleben assoziiert (Soliman et al., 2018). Chudasama et al. zeigten, dass cfDNA-Integritätswerte von über 0,5 mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben assoziiert waren (Chudasama et al., 2018).

Während DNA-Konzentrations- und Integritätsbestimmungen von cfDNA bei Lungenkarzinompatienten im klinischen Alltag bislang nicht zum Einsatz kommen, kann unter gewissen Umständen ctDNA zum Nachweis bestimmter, therapierelevanter Mutationen bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC dienen.

EGFR-Mutationen konnten mit großer Konkordanz von bis zu 94% in der Tumor-DNA aus Tumorgewebe und in der ctDNA von NSCLC-Patienten gefunden werden (Douillard et al., 2014, Reck et al., 2016; Arriola et al., 2018). Sie eigneten sich als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine TKI-Therapie und waren mit einem längeren progressionsfreien Intervall verbunden (Kimura et al., 2007; Bai et al., 2009). EGFR T790M Mutationen sind die häufigste Ursache für eine akquirierte Resistenz gegen Erst- und Zweitlinien-TKI (Yu et al., 2013). Auch diese Mutationen können mittels ctDNA-Untersuchungen festgestellt werden (Jenkins et al., 2017). Sie dienen weiterhin als Prädiktor für das Ansprechen auf eine Therapie mit Osimertinib, einem TKI der dritten Generation (Mok et al., 2017). Auch der Nachweis von ALK-Fusionen in der ctDNA von NSCLC-Patienten war möglich, jedoch mit geringerer Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu EGFR-Mutationen (Wang et al., 2016; Kunimasa et al., 2019). Gleiches gilt für weitere therapierelevante Mutationen, die in der Tumor-DNA und in der ctDNA von Patienten mit NSCLC zu finden waren, wie BRAF-V600-Mutationen (Guibert et al., 2016; Yang et al., 2017), ROS1-Fusionen (Pawletz et al., 2016) und KRAS-Mutationen (Sacher et al., 2016).

Mikrosatellitenalterationen konnten ebenfalls in der ctDNA von Lungenkrebspatienten nachgewiesen werden (Bruhn et al., 2000; Cuda et al., 2000), allerdings bisher ohne klinische Relevanz.

Auch epigenetische Veränderungen in der ctDNA von Lungenkrebspatienten kommen als diagnostische und prognostische Biomarker im klinischen Alltag bislang nicht zum Einsatz. In präklinischen Studien wurde das Potenzial der Bestimmung des Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen wie p16, RASSF1A, APC, RAR β 2, DAPK, CDH12 und MGMT in der ctDNA zum Screening und zur Detektion von NSCLCs bereits nachgewiesen (Zhang et al., 2011; Wang et al., 2017). Der Nachweis der Methylierung einzelner Gene wie p16 und RASSF1A im Blut von NSCLC-Patienten war darüber hinaus mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Wang et al., 2011; Lou-Qian et al., 2013). Hohe Methylierungsraten von SHOX2 und TIX2 hingegen galten als Prädiktor für progressionsfreies Überleben (Dietrich et al., 2012).

2 Zielstellung

Das Lungenkarzinom ist nicht nur die häufigste Tumorerkrankung weltweit, sondern auch die am häufigsten zum Tod führende Tumorerkrankung (Bray et al., 2018). Bei einem Großteil der Patienten wird das Lungenkarzinom in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, für das häufig keine kurativen Therapiemöglichkeiten mehr zur Verfügung stehen. Daraus resultiert eine sehr geringe 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit für die betroffenen Patienten: Während das relative 5-Jahres-Überleben im Stadium I nach UICC bei Frauen bei 75% und bei Männern bei 58% liegt, beträgt es im Stadium IV nach UICC nur noch 5% bei Frauen und 3% bei Männern (Robert Koch-Institut, 2019). Es existiert demnach ein großer Bedarf nach Möglichkeiten zur Früherkennung von Lungenkarzinomen.

Die Eignung der Niedrigdosis-CT zur Früherkennung von Lungenkrebs bei Risikopatienten wird seit Jahren intensiv erforscht (Infante et al., 2009; Saghiri et al., 2012; Horeweg et al., 2013). Neben bildgebenden Verfahren wird auch der Einsatz der Liquid Biopsy als diagnostisches Verfahren vielfach untersucht: Der Nachweis von extrazellulären Nukleinsäuren, insbesondere von ctDNA und zirkulierenden Tumorzellen, aus dem Blut oder anderen Körperflüssigkeiten könnte als diagnostischer, prädiktiver und prognostischer Biomarker bei verschiedenen Tumorentitäten dienen. Dank der wenig invasiven Probengewinnung der Liquid Biopsy sind genetische Untersuchungen des Tumors auch bei multimorbiden Patienten realisierbar, bei denen die Entnahme einer Gewebeprobe oder eine Re-Biopsie nicht möglich sind (Liang et al., 2018). Bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Lungenkarzinom hat sich die Liquid Biopsy mittlerweile unter bestimmten Voraussetzungen als Alternative zur Gewebeprobe etabliert: Anhand von zellfreier Tumor-DNA können bestimmte therapierelevante Mutationen und Resistenzmechanismen nachgewiesen werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018). Neben qualitativen Untersuchungen könnten auch quantitative cfDNA-Konzentrationsbestimmungen und cfDNA-Integritätsmessungen als Biomarker zum Einsatz kommen. Bei unterschiedlichen Tumorentitäten wurden erhöhte cfDNA-Konzentrationen und cfDNA-Integritätsindices bei Tumorpatienten im Vergleich zu Gesunden und benigne Erkrankten nachgewiesen (Fleischhacker und Schmidt, 2007).

Die vorliegende Arbeit untersucht Konzentrations- und Integritätsmessungen von zellfreier DNA im Hinblick auf ihre mögliche Anwendung als diagnostische Biomarker zur Unterscheidung von Lungenkrebspatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung. Dazu werden 58 unbehandelte Lungenkrebspatienten, 58 Lungenkarzinompatienten während oder nach Therapie, 69 Patienten mit benignen Lungenerkrankungen sowie 42 Patienten mit einer anderen Tumorerkrankung als dem Lungenkarzinom wie folgt untersucht:

- 1) Aus Plasmaproben der 4 verschiedenen Patientengruppen wird cfDNA isoliert. Mittels einer quantitativen Real-Time-PCR werden 3 verschieden lange cfDNA-Fragmente amplifiziert und quantifiziert.
- 2) Im Anschluss wird untersucht, ob sich die absoluten cfDNA-Konzentrationen zwischen den einzelnen Patientengruppen und demnach in Abhängigkeit von der Diagnose unterscheiden. Zusätzlich wird geprüft, ob Zusammenhänge zwischen der cfDNA-Konzentration und klinischen sowie demographischen Eigenschaften des Patientenkollektivs vorliegen.
- 3) Anhand der absoluten cfDNA-Konzentrationen wird die cfDNA-Integrität nach den Kalkulationsmethoden von Wang et al. und Umetani et al. berechnet.
- 4) Es wird überprüft, ob sich die cfDNA-Integritätsindices zwischen den Patientengruppen und damit den verschiedenen Diagnosen voneinander unterscheiden. Außerdem wird erforscht, ob Zusammenhänge zwischen den cfDNA-Integritätsindices und klinischen sowie demographischen Eigenschaften des Patientenkollektivs bestehen.
- 5) Um die diagnostische Wertigkeit der cfDNA-Integritätsindices und der cfDNA-Konzentrationen bei der Diskriminierung von Lungenkarzinompatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung beurteilen zu können, werden ROC-Kurven erstellt. Anhand derer werden die AUCs sowie die Sensitivität und Spezifität ermittelt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Table 1 Geräte mit Herstellerangabe

Gerät	Hersteller
Allegra X-15R Tischzentrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Einkanalpipetten (0,1-10 µl, 2-20 µl, 2-100 µl, 20-200 µl, 50-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
QIAvac 24 Plus	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
Wasserbad	Grant Instruments, Shepreth, Großbritannien
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MS3 Basic Vortex Mixer	IKA GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Microfuge 16 mit Rotor	Beckman Coulter, Brea, USA
Heraeus Multifuge 3 S-R	Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
VacSafe 15 Pumpe	Labogene, Lillerød, Dänemark
Nanodrop ND1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Stuart SRT6 Rollenmischer	Stuart Equipment, Staffordshire, Großbritannien

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Table 2 Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe

Material	Hersteller
S-Monovette EDTA 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Konisches Zentrifugationsröhrchen 15 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Konisches Zentrifugationsröhrchen 50 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Safe-lock-Tubes (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter (0,1-10 µl, 2-20 µl, 2-100 µl, 20-200 µl, 50-1000 µl)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
QIAamp Mini column	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
VacConnector	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
Tube Extender, 20 ml	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
MicroAmp Optical adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA

3.1.3 Kits

Table 3 Kits mit Herstellerangabe

Kits	Hersteller
Qiagen QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit <ul style="list-style-type: none"> ▪ Elutionspuffer AVE ▪ ACB-Puffer ▪ Waschpuffer ACW1 ▪ Waschpuffer ACW2 ▪ ACL-Puffer ▪ Proteinase K 	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland

3.1.4 Reagenzien

Table 4 Reagenzien mit Herstellerangabe

Reagenz	Hersteller
Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Invitrogen Taq DNA Polymerase Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ROX 50 µM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
50 mM MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ethanol 70%	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol 100%	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tris, pH 7,4	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Lysepuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PBS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

3.1.5 Primer

Table 5 Primer mit Herstellerangabe

Gen	Primer	5'3'-Sequenz	Hersteller
ERV3 S	sense	TGC CCC AAG ATA ATT TCA CAC TAA C	Tib Molbiol, Berlin, Deutschland
ERV3 R-79	antisense	GGT TTT TAA GAA CCA GAT GCT CTG AC	
ERV3 R-297	antisense	AGG TAT TTG GAG CTT CAA GTT GGT A	
ERV3 R-181	antisense	AGT GTC TCG TTG TAA TAT TGT TGT CC	
ERV3 Sonde	TaqMan	6FAM-TCT TCC CTC GAA CCT GCA CCA TCA A--TMR	

3.1.6 Software

Tabelle 6 Software mit Herstellerangabe

Software	Hersteller
Microsoft Excel für Mac	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Microsoft Word für Mac	Microsoft, Redmond, Washington, USA
IBM SPSS Statistics, Version 22.0	IBM, Armonk, New York, USA
EndNote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
7500 Real-Time PCR System Software Version 2.0.6	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Patientenkollektiv

Für die Studie wurden insgesamt 246 Patienten untersucht. Alle Patienten stellten sich im Rahmen einer Bronchoskopie in der Pneumologie der Charité Berlin Campus Mitte vor. Die Studie wurde am 10.12.2001 vom örtlichen Ethikkomitee genehmigt (Titel des Ethikantrags: „Frühdiagnostik des Bronchialkarzinoms - Molekulare Tumormarker in der Bronchiallavage und bronchoalveolären Lavage (BAL)“). Alle Patienten wurden schriftlich über das Studienvorhaben aufgeklärt und erklärten per Unterschrift ihr Einverständnis vor Studienbeginn. Die Volljährigkeit aller Patienten wurde überprüft.

Den Patienten wurden im Zeitraum vom 14.05.2004 bis zum 02.04.2008 vor Durchführung der Bronchoskopie 2 EDTA-Röhrchen à 9 ml Blut abgenommen. Bei den Patienten handelte es sich zum einen um Tumorpatienten, zum anderen um Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung. Es wurden nur Patienten mit einer gesicherten Diagnose eingeschlossen. Im Fall der Tumorpatienten wurde die Diagnose histopathologisch gesichert, bei den benignen Lungenerkrankungen fand eine klinische, histopathologische oder röntgenologische Befund-sicherung in Abhängigkeit der spezifischen Diagnose statt. Anhand der entsprechend gesicherten Diagnose der Patienten erfolgte eine Unterteilung in 4 verschiedene Patientengruppen (siehe Tabelle 7). Der größte Anteil der untersuchten Tumorpatienten litt an einem Bronchialkarzinom, entweder an einem NSCLC oder einem SCLC. Ein Teil der Lungenkrebspatienten war therapienaiv. Diese Patienten wurden der Patientengruppe 1 zugeordnet. Der andere Teil der Lungenkrebspatienten befand sich zum Erhebungszeitpunkt in Therapie oder wurde bereits mittels OP, Chemotherapie oder Bestrahlung behandelt. Zeitpunkt der Therapie, Therapieform wie auch der Therapieerfolg wurden nicht erhoben. Diese Lungenkarzinompatienten wurden in der Patientengruppe 2 zusammengefasst. Darüber hinaus wurden in die Studie Patienten mit einer gutartigen Lungenerkrankung in die Patientengruppe 3 eingeschlossen. Diese Patienten litten unter folgenden Erkrankungen: COPD, Asthma bronchiale, Sarkoidose, Pneumonie. Des Weiteren wurden Patienten mit einer anderen Tumorerkrankung als dem Bronchialkarzinom untersucht, beispielsweise Patienten mit einem Nierenzellkarzinom oder Blasenkarzinom. Die

spezifische Tumorentität wurde vermerkt. Diese Tumorpatienten wurden in der Patientengruppe 4 zusammengefasst.

Bei allen Patienten wurde die Indikation zur Bronchoskopie gestellt, größtenteils aus diagnostischen Absichten, aber auch zu therapeutischen Zwecken. Als rechtfertigende Indikationen wurden abklärungsbedürftige radiologische Befunde (beispielsweise Rundherde, Lymphadenopathien) gewertet, ebenso wie abklärungsbedürftige bzw. therapiebedürftige klinische Befunde (z.B. langanhaltender Husten, Hämoptysen).

Neben der Diagnose wurden bei den untersuchten Patienten weitere klinische und demographische Merkmale erhoben. Hierzu zählen das Alter, das Geschlecht sowie der Raucherstatus. Beim Raucherstatus wurden 2 Kategorien definiert: Zum einen Patienten, die zum Zeitpunkt der Studie rauchten oder in der Vergangenheit geraucht haben, und zum anderen Patienten, die laut eigenen Angaben nie geraucht haben.

Tabelle 7 Häufigkeitstabelle des Patientenkollektivs

Patientengruppe	Diagnose	Häufigkeit	Prozent
1	Lungenkarzinom ohne Therapie	58	25,6
2	Lungenkarzinom unter/nach Therapie	58	25,6
3	Benigne Lungenerkrankungen	69	30,4
4	Andere maligne Tumore	42	18,5
		Σ 227	Σ 100

Zusätzlich wurden 10 gesunde Blutspender der Universitätsklinik Halle (Saale) in die Studie eingeschlossen. Ihnen wurden ebenfalls 2 EDTA-Röhrchen à 9 ml Blut abgenommen. Dieses wurde zur Extraktion von DNA aus Leukozyten verwendet, welche im weiteren Verlauf zur Erstellung von Standardkurven und als Positivkontrollen eingesetzt wurde. Dieses Forschungsvorhaben wurde von der örtlichen Ethikkommission bewilligt (Bearbeitungsnummer: 201 3-59; Aufbau einer Biobank im Rahmen des interdisziplinären Forschungsvorhaben zur molekuriologischen Charakterisierung maligner Lungenerkrankungen).

3.2.2 Gewinnung von Blutplasma

Den Blutspendern der Universitätsklinik Halle (Saale) wie auch den Patienten an der Charité wurden jeweils 2 Röhrchen à 9 ml EDTA-Blut abgenommen. Die Blutproben wurden bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von maximal 4 Stunden bei 1500 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der so gewonnene Plasmaüberstand wurde anschließend in ein 15 ml Tube überführt und für weitere 15 Minuten bei 3500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Abschließend wurden die Plasmen aliquotiert, in 2 ml Eppendorf-Gefäße transferiert und bei -80°C gelagert.

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden von der Doktorandin durchgeführt.

3.2.3 Erythrozytenlyse

Nach Abnahme des Plasmas wurde das Zellsediment der Blutspender in den EDTA-Röhrchen mit Lysepuffer aufgefüllt und sorgfältig gemischt. Im Anschluss wurde die erhaltene Lösung in ein mit 25 ml Lysepuffer gefülltes 50 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben und bis zur vollständigen Lyse der Erythrozyten für 3 bis 10 Minuten auf Eis gelagert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm. Nach Abnahme des Überstands wurden dem Zellpellet erneut 20 ml Lysepuffer zugegeben. Daran schloss sich eine weitere 10-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm und 4°C an. Der Überstand wurde wieder abgenommen. Danach wurden die verbliebenen Zellen in 800 µl PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Tube transferiert. Dieses wurde für weitere 3 Minuten bei 2700 rpm zentrifugiert. Nach letztmaliger Abnahme des Überstands wurde das trockene Zellpellet bei -80°C gelagert.

3.2.4 Phenolfreie DNA-Extraktion aus Leukozyten

Das Zellpellet wurde in 5 ml 1 x SE-Puffer vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Pronase (20 mg/ml) und 125 µl 20 % SDS wurde die Lösung gut gemischt und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am Folgetag wurden zur Lösung 1,5 ml gesättigte, sterile NaCl Lösung (6M) gegeben und mittels eines Vortexmischers für 15 Sekunden vermengt. Im Anschluss wurde bei Raumtemperatur eine 15-minütige Zentrifugation bei 14.000 U/min durchgeführt. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen transferiert und mit 2 Volumina 100%-igem Ethanol versetzt. Unter langsamem Drehen wurde die DNA ausgefällt. Mittels eines Glashakens wurde die DNA entnommen, mit 70%-igem Ethanol kurz gewaschen und zum Trocknen in ein neues Tube überführt. Schließlich wurde die DNA in 300 µl sterilem Bdest gelöst und bei 4°C über Nacht auf dem Rollenmischer gelagert. Zuletzt wurden 500 µl TE-Puffer zugegeben. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurden abschließend photometrisch bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

3.2.5 Isolation zellfreier DNA aus den Plasmen der Patienten

Die Isolation der cfDNA wurde mithilfe des Qiagen QIAmp Circulating Nucleic Acid Kits entsprechend der Herstelleranleitung durchgeführt. Die bei -80°C gelagerten Plasmaproben wurden hierfür zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden jeweils 2 ml Plasma in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen pipettiert. 200 µl Proteinkinase K sowie 1,6 ml ACL-Puffer wurden zum Plasma hinzugefügt und mittels eines Vortexmischers für 30 Sekunden gründlich vermischt. Es folgte eine Inkubation bei 60°C für 30 Minuten. Nach Zugabe von 3,6 ml ACB-Puffer wurden die Proben erneut für 30 Sekunden mit dem Vortexer gemischt und danach für 5 Minuten auf Eis gelagert. Im Anschluss wurde der QIAvac 24 Plus Behälter mit der VacSafe 15 Vakuumpumpe aufgebaut: Hierfür wurden VacConnectors in die vorgesehenen Vakuumventile eingesteckt und mit QIAmp Mini Säulen sowie Tube Extenders verbunden. Nach dem Einfüllen der gekühlten Lösungen wurde ein Vakuum angelegt bis das Lysat die Säulen

passiert hatte. Daraufhin erfolgten zwei Waschschriffe mit 600 μl ACW 1 Puffer und 750 μl ACW2 Puffer sowie mit 750 μl 100%-igem Ethanol. Nachfolgend wurden die Säulen aus der Vakuumpumpe entfernt und in neues 2 ml Tube überführt. Es wurde eine 3-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm durchgeführt. Die Säulen wurden in ein neues 2 ml Röhrchen transferiert und bei geöffnetem Deckel bei 56°C für 10 Minuten zum Trocknen der Membran inkubiert. Diese Inkubation diente außerdem der Verdunstung des noch vorhandenen Alkohols, um eine Inhibition bei sich anschließenden, enzymatischen Reaktionen zu verhindern. Um die gebundene cfDNA zu lösen, wurden die Säulen in ein neues 1,5 ml Tube überführt und nach Zugabe von 68 μl Elutionspuffer AVE für weitere 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend fand eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 1 Minute statt. Das so gewonnene cfDNA-Eluat wurde bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.2.6 Quantitätsbestimmung der Leukozyten-DNA der Blutspender

Die Konzentration der isolierten Leukozyten-DNA der Blutspender wurde photometrisch mithilfe des NanoDrop 1000 Spektrophotometers bei 260 nm bestimmt. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit 5 Verdünnungsschritten (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000) hergestellt. Die Ausgangs-DNA-Konzentration betrug 60 ng/ μl .

3.2.7 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time (qPCR) stellt eine Weiterentwicklung der klassischen Endpoint PCR dar. Sie bietet über die Amplifikation hinaus die Möglichkeit zur Quantifizierung der eingesetzten DNA (Holland et al., 1991). Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt anhand von Fluoreszenzmessungen, die in Echtzeit während bzw. nach jedem Amplifikationszyklus stattfinden (Heid et al., 1996). Die Detektion der DNA kann entweder sequenzspezifisch durch den Einsatz fluoreszierender Farbstoffe oder sequenzspezifisch mittels fluoreszenzmarkierter Hybridisierungssonden erfolgen (Higuchi et al., 1992; Lee et al., 1993).

Beim Einsatz fluoreszierender Farbstoffe wie SYBR Green lagert sich der Fluorophor an die Doppelstrang-DNA und erzeugt damit eine Fluoreszenzemission. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Menge der amplifizierten DNA (Higuchi et al., 1993). Die Bindung des Farbstoffs erfolgt unspezifisch an jede Doppelstrang-DNA.

Im Gegensatz dazu lagern sich fluorogene Sonden wie die Taqman Sonde spezifisch, komplementär an die gesuchte DNA-Sequenz an. Bei der Taqman Sonde handelt es sich um ein Oligonukleotid, an dessen 5' Ende ein Reporterfarbstoff gebunden ist und bei dem sich am 3' Ende ein Akzeptorfarbstoffmolekül, auch Quencher genannt, befindet. Bei intakter Sonde liegen Reporterfarbstoff und Quencher eng benachbart voneinander. Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes wird durch den Quencher unterdrückt (Gibson et al., 1996; Heid et al., 1996). Dieser Energietransfer wird auch als Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) bezeichnet (Cardullo et al., 1998). Erfolgt nun die Hybridisierung der Sonde, werden Reporterfarbstoff und

Quencher durch die 5'3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase getrennt. Der Quencher unterdrückt die Fluoreszenz nicht länger, wodurch die Emission proportional zur amplifizierten DNA-Menge zunimmt (Gibson et al., 1996; Heid et al., 1996).

Die anhand der Fluoreszenzmessungen ermittelten Werte werden graphisch in Form einer Amplifikationskurve dargestellt, wobei die Zahl der Amplifikationszyklen auf der Abszisse dargestellt wird und die Fluoreszenz auf der Ordinate. Erst ab einem gewissen Schwellenwert (Threshold) kann ein eindeutiges Fluoreszenzsignal abgeleitet werden. Der Cycle-Threshold (Ct-Wert) gibt den Zyklus an, an dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz hinaus ansteigt. Er entspricht dem Schnittpunkt zwischen Amplifikationskurve und der Schwellenwertlinie (Gibson et al., 1996; Heid et al., 1996).

Um aus den ermittelten Ct-Werten die absolute DNA-Menge der untersuchten Probe ermitteln zu können, ist ein externer Standard notwendig. Hierbei handelt es sich um eine Probe mit bekannter Ausgangskonzentration, aus der eine Verdünnungsreihe erstellt und amplifiziert wird. Die erhaltenen Ct-Werte des Standards werden gegen ihre logarithmische Konzentration aufgetragen. Anhand der Geradengleichung kann nun die Konzentration der Probe berechnet werden, da sich der Ct-Wert umgekehrt proportional zum Logarithmus der DNA-Menge verhält: Je höher der Ct-Wert, desto niedriger die Konzentration.

Die qPCR dieser Arbeit wurde mit dem 7500 Real-Time PCR System von Applied Science durchgeführt. Es wurde eine Taqman-Sonde eingesetzt, deren 5'Ende mit dem fluoreszierenden Reporterfarbstoff FAM markiert war. Am 3'Ende der Taqman-Sonde befand sich TAMRA als Quencher. Zur Normalisierung des Reporterfarbstoffs FAM wurde ROX benutzt. Als Zielgen wurde die Sequenz von ERV3 verwendet. ERV3 gehört zu den humanen endogenen Retroviren, die ca. 8% des menschlichen Genoms ausmachen (Griffiths, 2001). ERV3 wurde als drittes humanes endogenes Retrovirus in der Mitte der 1980er Jahre entdeckt. Es handelt sich um ein single-copy-Gen von 9,9 kb Länge, welches auf dem Chromosom 7q11.21 lokalisiert ist und von seinem strukturellen Aufbau Typ C Retroviren gleicht (O'Connell et al., 1984).

Die PCR wurde so konfiguriert, dass die Probe und der Vorwärts-Primer für alle drei Fragmente identisch waren und sich nur im Rückwärts-Primer unterschieden. Die drei ERV3-Fragmente hatten eine Länge von 79 bp, 181 bp und 297 bp.

Zunächst wurden Standardkurven erstellt. Dafür wurde die Leukozyten-DNA der Blutspender eingesetzt, deren Konzentration zuvor spektrophotometrisch bestimmt wurde. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes einschließlich der Endkonzentrationen sind dem in Tabelle 8 dargestellten Pipettierschema zu entnehmen.

Tabelle 8 PCR-Ansatz

Reagenzien mit Ausgangskonzentration	Eingesetzte Menge in μl	Endkonzentration
Platinum Taq DNA Polymerase PCR Puffer 10X	2,5	1x
50 mM MgCl_2	2,5	5 mM
10 nM dNTP Mix	0,24	96 μM
Sense Primer (50 pmol/ μl)	0,2	10 pM
Antisense-Primer (50 pmol/ μl)	0,2	10 pM
ERV3-Sonde (50 pmol/ μl)	0,1	200 nM
Platinum Taq DNA Polymerase (0,2 μl = 1 U)	0,2	
Rox (1:2)	0,1	
DNA	5,0	
Acqua dest.	13,96	
	Σ 25 μl	

Der Reaktionsansatz wurde nun in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen aufgetragen. Jede Probe wurde dreifach bestimmt. Zusätzlich wurde für jedes Fragment eine Negativkontrolle gemessen, welche Wasser anstelle von DNA enthielt.

Nachfolgend wurde der Cycler programmiert. Für 7 Minuten wurde die Taq-Polymerase bei 95°C aktiviert. Im Anschluss erfolgte die Amplifikation der cfDNA über 50 Zyklen. Jeder Zyklus bestand aus 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C und 40 Sekunden Annealing der Primer und Elongation bei 61°C. Abschließend wurden die PCR-Produkte für 5 Minuten auf 15°C runtergekühlt.

Die Software des Thermocyclers ermittelte nun die Ct-Werte der einzelnen Verdünnungsstufen. Die Ct-Werte wurden dann auf der Ordinate gegen den Logarithmus der DNA-Konzentration auf der Abszisse aufgetragen. Im Anschluss wurden Standardkurven für die 3 Fragmente berechnet. Die Steigung, der Schnittpunkt mit der y-Achse sowie die Effizienz wurden ermittelt. Die Effizienz der Standardkurve für ERV3-79 lag bei 101%, für ERV3-181 bei 98% und für ERV3-297 bei 95%.

Die PCR der isolierten cfDNA der Patienten erfolgte nach dem gleichen Schema. Jede Patientenprobe wurde als Triplikate in einer 96er Mikrotiterplatte gemessen. Es wurde eine Negativkontrolle für jedes Fragment erstellt, welche Wasser anstelle von cfDNA enthielt. In jeder Mikrotiterplatte wurde außerdem ein Standard mitgeführt, dessen Konzentration bekannt war. Hierbei handelte es sich um die bei der Erstellung der Standardkurven eingesetzte Leukozyten-DNA der Blutspender. Im Anschluss erfolgte die PCR entsprechend des bereits für die Standardkurven vorgestellten PCR-Programms. Abschließend erstellte die Software des Cyclers Amplifikationskurven und berechnete die Ct-Werte der einzelnen Proben.

Um die absoluten cfDNA-Konzentrationen der einzelnen Proben kalkulieren zu können, wurden zunächst Mittelwerte aus den erhaltenen Ct-Werten der Triplikate der Proben gebildet. Mit Hilfe der zuvor berechneten Standardkurven konnten nun dank der Geradengleichung die absoluten cfDNA-Konzentrationen der einzelnen Proben berechnet werden.

3.2.8 Berechnungen der cfDNA-Integritätsindices

Die cfDNA-Integrität in dieser Arbeit wurde mithilfe von 2 Kalkulationsmethoden nach Wang et al. und Umetani et al. berechnet (Wang et al., 2003; Umetani et al., 2006 a, 2006b).

Entsprechend der Berechnung von Umetani et al. wurden die zuvor berechneten cfDNA-Konzentrationen der 3 unterschiedlich langen Fragmente miteinander ins Verhältnis gesetzt. Zum einen wurde der Quotient der cfDNA-Konzentration von ERV3-297 und ERV3-79 gebildet, in der weiteren Arbeit als cfDNA-Integritätsindex U1 benannt. Außerdem wurde der Quotient der cfDNA-Konzentration von ERV3-181 und ERV3-79 berechnet, im weiteren Verlauf der Arbeit als cfDNA-Integritätsindex U2 bezeichnet.

Laut der Berechnungsmethode von Wang et al. muss zunächst für jedes Fragment die Differenz aus dem Ct-Wert eines Standards (basierend auf genomischer DNA) und dem Ct-Wert der jeweiligen Probe gebildet werden, um Δ Ct zu erhalten. Danach sollen die Δ Ct-Werte des längeren Fragments vom kürzeren Fragment subtrahiert werden. Die errechnete Differenz wird $\Delta\Delta$ Ct genannt. Der Integritätsindex wird anschließend mittels folgender Formel berechnet:

$$e^{(-\Delta\Delta Ct \times \ln(2))} \text{ (Wang et al., 2003).}$$

Analog zur Berechnungsmethode nach Wang wurden Differenzen aus den Ct-Werten der einzelnen Proben sowie dem aus Leukozyten-DNA der Blutspender stammenden Standard, welcher bei jedem Lauf mitaufgetragen wurden, gebildet. Im Anschluss wurden die Δ Ct-Werte des längsten ERV3-Fragments (ERV3-297) vom kürzesten Fragment (ERV3-79) subtrahiert. Ebenso erfolgte die Subtraktion der Δ Ct-Werte des mittleren ERV3-Fragments (ERV3-181) vom kürzesten Fragment (ERV3-79). Die erhaltenen $\Delta\Delta$ Ct-Werte wurden in die oben genannte Formel integriert. Der Integritätsindex, welcher das Verhältnis von ERV3-297 zu ERV3-79 ausdrückt, wird im weiteren Verlauf als cfDNA-Integritätsindex W1 bezeichnet. Der Integritätsindex, der das Verhältnis von ERV3-181 zu ERV3-79 widerspiegelt, wird im Folgenden cfDNA-Integritätsindex W2 genannt.

3.2.9 Statistische Auswertung

Für die cfDNA-Konzentration der 3 ERV3-Fragmente sowie für die cfDNA-Integritätsindices wurden die Median- und Mittelwerte mit Standardabweichung, die Minimal- und Maximalwerte sowie die Spannweite und die Interquartilsabstände berechnet und in Tabellenform darstellt. Zusätzlich erfolgte eine graphische Darstellung der Ergebnisse der cfDNA-Konzentrationen und der cfDNA-Integritätsindices in Form von Boxplots. Bei den Boxplots wird der Medianwert durch die zentrale Linie repräsentiert, die Begrenzungen der Box stellen die Interquartilsabstände zwischen dem 1. und 3. Quartil dar. Die Whisker geben Aufschluss über die Spannweite der Werte zwischen dem 5. und 95. Perzentil. Ausreißer wurden mit einem Kreis markiert, Extremwerte mit einem Stern.

Zum Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen den untersuchten Patientengruppen in Bezug auf die cfDNA-Konzentration der 3 ERV3-Fragmente sowie auf die cfDNA-Integritätsindices wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der cfDNA-Konzentration bzw. der cfDNA-Integrität und den untersuchten, demographischen und klinischen Merkmalen „Geschlecht“ und „Raucherstatus“ des Patientenkollektivs bestand, kam der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zum Einsatz. Das Vorliegen einer Assoziation zwischen dem Patientenalter und der cfDNA-Konzentration bzw. den cfDNA-Integritätsindices wurde durch die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman geprüft.

Es wurden ROC-Kurven erstellt, um das Potenzial der cfDNA-Konzentration der 3 ERV3-Fragmente und der cfDNA-Integritätsindices als diagnostische Biomarker beurteilen zu können. Es wurden die Flächen unterhalb der Kurven sowie die Sensitivität und Spezifität der einzelnen cfDNA-Konzentrationen und der cfDNA-Integritätsindices einschließlich der entsprechenden Cut-off-Werte ermittelt. Diese geben Aufschluss über die diskriminatorische Stärke der cfDNA-Konzentrationen respektive der cfDNA-Integritätsindices, zwischen therapie-naiven Lungenkarzinompatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung zu unterscheiden.

4 Ergebnisse

Für die Studie wurden insgesamt 246 Patienten untersucht, wovon 227 Patienten in die Auswertung eingeschlossen werden konnten. 15 Patienten mussten aufgrund einer unvollständigen Datenlage ausgeschlossen werden, da die Diagnose unklar war. Bei 4 Patienten konnte lediglich das mittlere DNA-Fragment (ERV3-181) nachgewiesen werden, sodass keine Berechnung eines cfDNA-Integritätsindex möglich war. Diese Patienten wurden daher auch nicht in die Auswertung aufgenommen.

In allen zellfreien Plasmen der eingeschlossenen Patienten konnten das ERV3-79-Fragment und das ERV3-181-Fragment nachgewiesen werden. Daraus resultiert, dass für alle Patienten die DNA-Konzentrationen von ERV3-79 und ERV3-181 bestimmt und konsekutiv auch die cfDNA-Integritätsindices U2 sowie W2 berechnet werden konnten. Bei insgesamt 46 Patienten konnte das ERV3-297-Fragment nicht ausgewertet werden: Davon gelang bei 18 Probanden die Amplifikation des ERV3-297-Fragments nicht und bei 28 Patienten wichen die Ct-Werte zwischen den Triplikaten derselben Probe um mehr als 10% voneinander ab. Bei diesen Proben wurde auf die Errechnung der cfDNA-Konzentration des ERV3-297-Fragments verzichtet. Daraus ergibt sich, dass bei 181 Patienten cfDNA-Integritätsindices U1 und W1 berechnet werden konnten.

4.1 Deskriptive Statistik

4.1.1 Geschlechterverteilung

Tabelle 9 Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs

	Häufigkeit	Prozent
Männer	141	62,1
Frauen	86	37,9
Gesamt	227	100

Für die Studie wurden 141 Männer und 86 Frauen untersucht. Damit waren knapp zwei Drittel der untersuchten Patienten männlich.

4.1.2 Altersverteilung

Tabelle 10 Altersverteilung des Patientenkollektivs

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Patientenalter	23	82	60,7	11,3

Der jüngste Patient der Studie war zum Zeitpunkt der Untersuchung 23 Jahre alt, der älteste Patient war 82 Jahre alt. Das Durchschnittsalter lag bei 60 Jahren. Durchschnittlich waren die Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung (Patientengruppe 3) mit 57 Jahren am jüngsten, während die Lungenkrebspatienten der ersten beiden Patientengruppen mit durchschnittlich knapp 62 Jahren am ältesten waren.

4.1.3 Raucherstatus

Tabelle 11 Raucherstatus des Patientenkollektivs

	Häufigkeit	Prozent
Raucher und ehemalige Raucher	161	70,9
Nichtraucher	66	29,1
Gesamt	227	100

Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren 161 Patienten Raucher bzw. haben in der Vergangenheit geraucht, 66 Patienten waren laut eigener Angabe Nichtraucher. Der Anteil der Raucher und Ex-Raucher am gesamten Patientenkollektiv ist damit mehr als doppelt so groß wie der Anteil der Patienten, die nie in ihrem Leben geraucht haben.

Der Anteil an Rauchern und ehemaligen Rauchern war unter den Lungenkrebspatienten (Patientengruppe 1 und 2) mit knapp 85% am höchsten. Bei den Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung war der Anteil von Rauchern und Nichtrauchern nahezu ausgeglichen.

4.1.4 cfDNA-Konzentrationen

Tabelle 12 Konzentration der einzelnen cfDNA-Fragmente

cfDNA-Konzentration in ng/µl	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median	Standardabweichung
ERV3-79	227	0,33	60,05	5,01	2,53	8,01
ERV3-181	227	0,09	20,18	1,01	0,57	1,79
ERV3-297	181	0,06	10,23	0,66	0,41	1,00

Für 227 Patienten konnten die cfDNA-Konzentrationen von ERV3-79 und ERV3-181 berechnet werden, allerdings nur bei 181 Patienten für ERV3-297. Bei allen 3 Fragmenten zeigten sich eine große Spannweite und Streuung der gemessenen cfDNA-Konzentrationen. Die größte Streuung bestand bei der cfDNA-Konzentration von ERV3-79, mit zunehmender Amplikonlänge nahm die Streuung ab. Aufgrund der großen Streuung der Werte wurde zusätzlich zum Mittelwert auch der Median bestimmt. Der Vergleich der cfDNA-Konzentrationen zwischen den einzelnen Fragmenten zeigt, dass die gemessenen Konzentrationswerte in Abhängigkeit der Fragmentlänge abnahm.

4.1.5 cfDNA-Integritätsindices

Tabelle 13 cfDNA-Integritätsindices

cfDNA-Integritätsindex	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median	Standardabweichung
U1	181	0,01	0,67	0,18	0,16	0,11
U2	227	0,03	0,69	0,24	0,22	0,10
W1	181	0,01	0,59	0,16	0,14	0,10
W2	227	0,03	0,63	0,21	0,19	0,09

Für 227 Patienten konnten die cfDNA-Integritätsindices U2 und W2 berechnet werden, bei 181 Patienten die cfDNA-Integritätsindices U1 und W1. Die berechneten cfDNA-Integritätsindices wiesen alle eine große Spannweite, die Streuung war bei allen 4 cfDNA-Integritätsindices vergleichbar. Die cfDNA-Integritätsindices U1 und W1 sowie U2 und W2 zeigten große Übereinstimmungen in Bezug auf die Minimal- und Maximalwerte, Mittelwerte und den Median.

4.2 cfDNA-Konzentrationen und cfDNA-Integritätsindices als diagnostische Biomarker

4.2.1 Assoziation zwischen cfDNA-Konzentrationen und Diagnose

Die folgenden Tabellen 14 bis 16 und die dazugehörigen graphischen Darstellungen als Boxplots (Abbildungen 1 bis 3) stellen die cfDNA-Konzentration von ERV3-79, ERV3-181 und ERV3-297 in Abhängigkeit von der Patientengruppe, sprich der damit verbundenen Diagnose, dar. Bei den Boxplots wurde für die cfDNA-Konzentration eine logarithmische Skala gewählt. Mittels des Kruskal-Wallis-Tests wurde geprüft, ob relevante Unterschiede hinsichtlich der cfDNA-Konzentration des jeweiligen ERV3-Fragments zwischen den Patientengruppen bestanden.

Tabelle 14 cfDNA-Konzentration von ERV3-79 der Patientengruppen

Patientengruppe	cfDNA-Konzentration von ERV3-79 in ng/μl				
	Minimum	Maximum	Median	Interquartilsbereich	Spannweite
1 Lungenkarzinom ohne Therapie	0,66	58,56	3,27	4,34	57,90
2 Lungenkarzinom unter/nach Therapie	0,42	60,05	2,57	4,71	59,63
3 Benigne Lungenkrankungen	0,59	18,85	2,27	2,69	18,26
4 Andere maligne Tumore	0,33	33,95	2,48	4,82	33,62

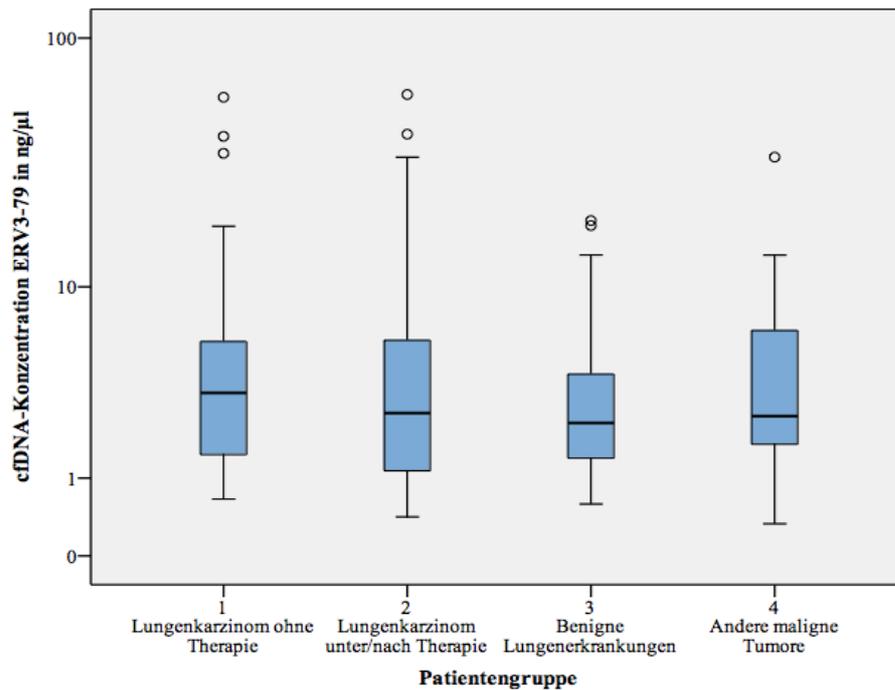


Abbildung 1 Darstellung der cfDNA-Konzentration von ERV3-79 der Patientengruppen als Boxplots

Bei den Minimalwerten als auch im Besonderen bei den Maximalwerten der cfDNA-Konzentration von ERV3-79 gab es ausgeprägte Unterschiede zwischen den Patientengruppen. Bei den Lungenkrebspatienten (Patientengruppe 1 und 2) gab es eine sehr große Spannweite hinsichtlich der cfDNA-Konzentration des kürzesten ERV3-Fragments, was auf einzelne Ausreißer zurückzuführen ist. Auch bei den Patientengruppen 3 und 4 traten Ausreißer auf, jedoch war die Spannweite deutlich geringer als bei den Patientengruppen 1 und 2. Insgesamt trat bei allen untersuchten Tumorpatienten (Patientengruppen 1, 2 und 4) eine erhebliche Streuung auf, was an den größeren Interquartilsabständen im Vergleich zu den Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung deutlich wird. Letztere wiesen den niedrigsten Medianwert der cfDNA-Konzentration von ERV3-79 auf, während bei den unbehandelten Lungenkarzinompatienten der höchste Medianwert verzeichnet werden konnte. Die cfDNA-Konzentrationen von ERV3-79 der Patientengruppen 2 und 4 lagen in der Mitte: Sie waren höher als die der benignen Lungenerkrankungen, aber geringer als die der unbehandelten Lungenkrebspatienten. Deutliche cfDNA-Konzentrationsunterschiede von ERV3-79 bestanden zwischen allen 4 Patientengruppen nicht ($p = 0,38$).

Tabelle 15 cfDNA-Konzentration von ERV3-181 der Patientengruppen

Patientengruppe	cfDNA-Konzentration von ERV3-181 in ng/µl				
	Minimum	Maximum	Median	Interquartilsbereich	Spannweite
1 Lungenkarzinom ohne Therapie	0,18	20,18	0,67	0,92	20,00
2 Lungenkarzinom unter/nach Therapie	0,09	4,52	0,58	0,68	4,43
3 Benigne Lungenerkrankungen	0,10	9,82	0,56	0,48	9,72
4 Andere maligne Tumore	0,14	9,41	0,56	0,44	9,28

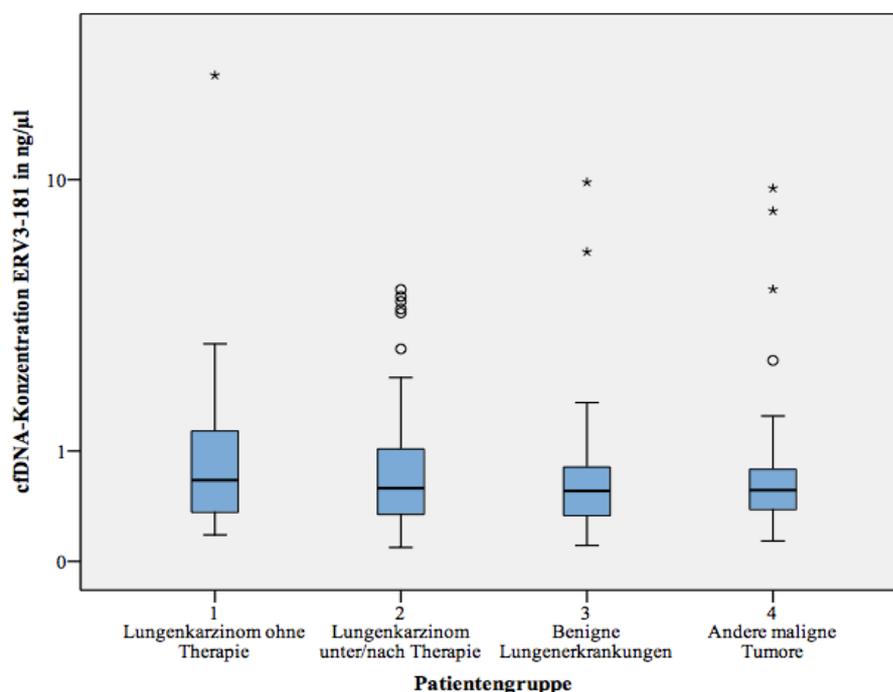


Abbildung 2 Darstellung der cfDNA-Konzentration von ERV3-181 der Patientengruppen als Boxplots

Die cfDNA-Konzentration von ERV3-181 war bei allen Patientengruppen deutlich niedriger als die von ERV3-79. Die niedrigeren Maximalwerte der cfDNA-Konzentration von ERV3-181 hatten eine geringere Spannweite der Werte bei allen Patientengruppen zur Folge. Die Interquartilsabstände und damit die Streuung waren für die cfDNA-Konzentration des mittellangen Fragments ebenfalls deutlich kleiner. Auch für die cfDNA-Konzentration von ERV3-181 wiesen die unbehandelten Lungenkarzinompatienten den höchsten Medianwert auf, während der geringste Medianwert erneut bei den unter einer benignen Lungenerkrankung leidenden Patienten zu finden war. Die cfDNA-Konzentrationen von ERV3-181 der Patientengruppen 2 und 4 lagen ebenfalls in der Mitte zwischen den unbehandelten Lungenkrebspatienten und den benigne Lungenerkrankungen. Ein Zusammenhang zwischen der

cfDNA-Konzentration von ERV3-181 und der Patientengruppe und damit der Diagnose der untersuchten Patienten konnte nicht nachgewiesen werden ($p = 0,34$).

Tabelle 16 cfDNA-Konzentration von ERV3-297 der Patientengruppen

Patientengruppe	cfDNA-Konzentration von ERV3-297 in ng/μl				
	Minimum	Maximum	Median	Interquartilsbereich	Spannweite
1 Lungenkarzinom ohne Therapie	0,06	2,41	0,53	0,70	2,35
2 Lungenkarzinom unter/nach Therapie	0,08	3,07	0,42	0,59	2,99
3 Benigne Lungenerkrankungen	0,10	10,23	0,36	0,48	10,13
4 Andere maligne Tumore	0,08	4,32	0,39	0,42	4,24

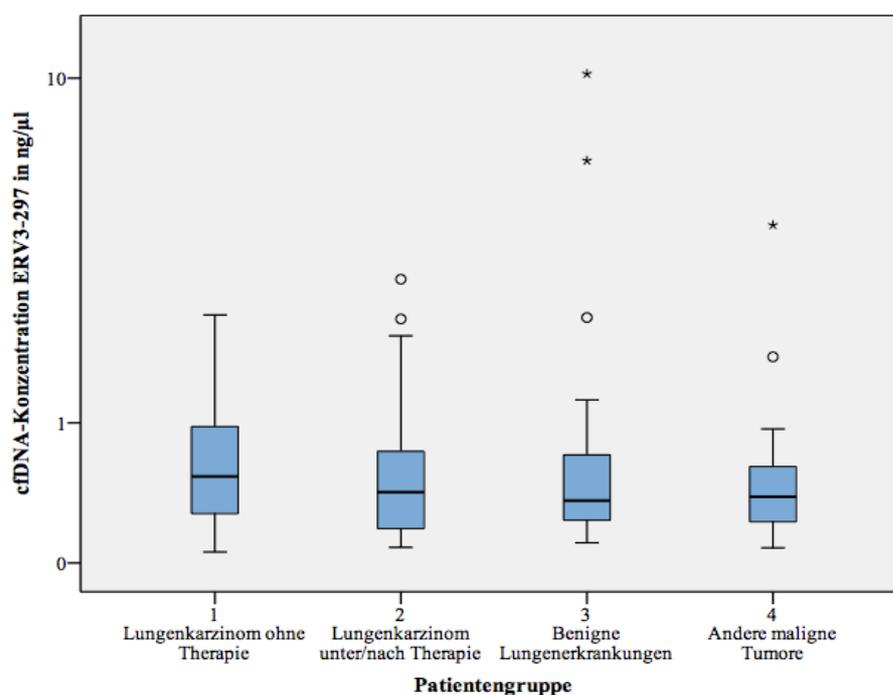


Abbildung 3 Darstellung der cfDNA-Konzentration von ERV3-297 der Patientengruppen als Boxplots

Die cfDNA-Konzentration von ERV3-297 war im Vergleich zu den anderen beiden ERV3-Fragmenten in allen Patientengruppen am geringsten. Entsprechend waren auch die Medianwerte der cfDNA-Konzentration des längsten ERV3-Fragments am niedrigsten. Auch die Streuung der cfDNA-Konzentration des längsten ERV3-Fragments war von allen untersuchten Fragmenten am wenigsten ausgeprägt, was aus den geringeren Interquartilsabständen und den kleineren Spannweiten zu schließen war. Wie schon bei der cfDNA-Konzentration der anderen beiden ERV3-Fragmente wiesen ebenfalls die unbehandelten Lungenkrebspatienten den höchsten und die benigne Lungenerkrankten den niedrigsten Medianwert der cfDNA-Konzentrationen von ERV3-

297 auf. Auch bei den cfDNA-Konzentrationen des längsten ERV3-Fragments lagen die Patientengruppen 2 und 4 im mittleren Bereich. Für die cfDNA-Konzentrationen des ERV3-297-Fragments waren keine relevanten cfDNA-Konzentrationsunterschiede zwischen den 4 Patientengruppen erkennbar ($p = 0,31$).

Aus der Analyse der Tabellen 14 bis 16 und der Abbildungen 1 bis 3 wird deutlich, dass die cfDNA-Konzentration in Abhängigkeit von der Fragmentlänge in allen Patientengruppen abnahm. Daraus resultiert, dass die cfDNA-Konzentration von ERV3-79 in allen Patientengruppen am höchsten war, absteigend folgten die cfDNA-Konzentration von ERV3-181 und ERV3-297. Es zeigte sich weiterhin, dass die Spannweite und die Interquartilsabstände der cfDNA-Konzentration bei dem kürzesten ERV3-Fragment am größten und beim längsten ERV3-Fragment am geringsten waren. Unabhängig von der Patientengruppe waren für alle 3 Fragmente Ausreißer nachweisbar. Für alle ERV3-Fragmente wiesen die unter einer benignen Lungenerkrankungen leidenden Patienten die niedrigsten und die unbehandelten Lungenkarzinompatienten die höchsten Medianwerte der cfDNA-Konzentration auf. Dennoch waren für alle untersuchten ERV3-Fragmente keine starken cfDNA-Konzentrationsunterschiede zwischen den Patientengruppen ersichtlich. Ein Zusammenhang zwischen der jeweiligen Patientengruppe und der damit verbundenen Diagnose und der cfDNA-Konzentration für die 3 genannten ERV3-Fragmente konnte nicht nachgewiesen werden (p für ERV3-79 = 0,38; p für ERV3-181 = 0,34; p für ERV3-297 = 0,31).

4.2.2 Assoziation zwischen cfDNA-Konzentrationen und Charakteristika des Patientenkollektivs

Ferner wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der cfDNA-Konzentration der 3 ERV3-Fragmente mit den anderen erhobenen, klinischen und demographischen Merkmalen des untersuchten Patientenkollektivs bestand. Für alle 3 untersuchten Fragmente konnten keine relevanten cfDNA-Konzentrationsunterschiede in Abhängigkeit vom Geschlecht, Raucherstatus und vom Alter ermittelt werden.

Tabelle 17 Assoziation von cfDNA-Konzentrationen und Charakteristika des Patientenkollektivs

	p-Werte		
	Geschlecht	Raucherstatus	Alter
ERV3-79	0,58	0,44	0,09
ERV3-181	0,93	0,52	0,23
ERV3-297	0,96	0,83	0,59

4.2.3 Assoziation zwischen cfDNA-Integritätsindices und Diagnose

Analog zu den cfDNA-Konzentrationen stellen die Tabellen 18 bis 21 und die dazugehörigen graphischen Darstellungen in Form von Boxplots (Abbildungen 4 bis 7) die cfDNA-

Integritätsindices für die einzelnen Patientengruppen dar. Mittels des Kruskal-Wallis-Tests wurde geprüft, ob sich die cfDNA-Integritätsindices in den einzelnen Patientengruppen deutlich voneinander unterscheiden.

Tabelle 18 cfDNA-Integritätsindex U1 der Patientengruppen

Patientengruppe	cfDNA-Integritätsindex U1				
	Minimum	Maximum	Median	Interquartilsbereich	Spannweite
1 Lungenkarzinom ohne Therapie	0,01	0,52	0,17	0,17	0,51
2 Lungenkarzinom unter/nach Therapie	0,02	0,38	0,15	0,08	0,36
3 Benigne Lungenerkrankungen	0,02	0,57	0,18	0,12	0,54
4 Andere maligne Tumoren	0,04	0,67	0,15	0,12	0,63

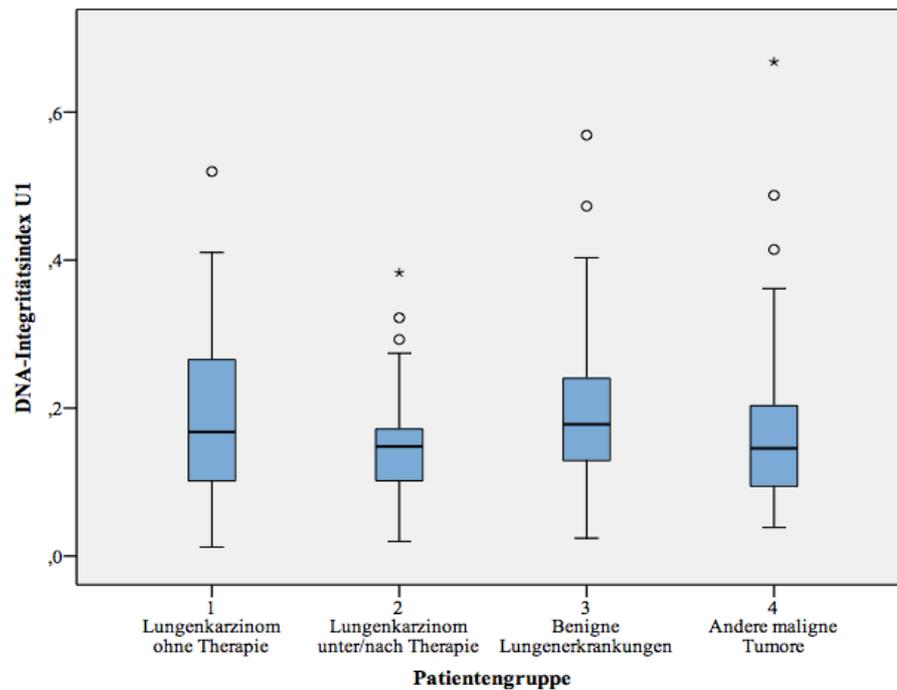


Abbildung 4 Darstellung des cfDNA-Integritätsindex U1 der Patientengruppen als Boxplots

Tabelle 19 cfDNA-Integritätsindex U2 der Patientengruppen

Patientengruppe	cfDNA-Integritätsindex U2				
	Minimum	Maximum	Median	Interquartilsbereich	Spannweite
1 Lungenkarzinom ohne Therapie	0,05	0,57	0,23	0,09	0,53
2 Lungenkarzinom unter/nach Therapie	0,03	0,54	0,23	0,12	0,50
3 Benigne Lungenerkrankungen	0,07	0,55	0,23	0,10	0,47
4 Andere maligne Tumoren	0,09	0,69	0,21	0,11	0,60

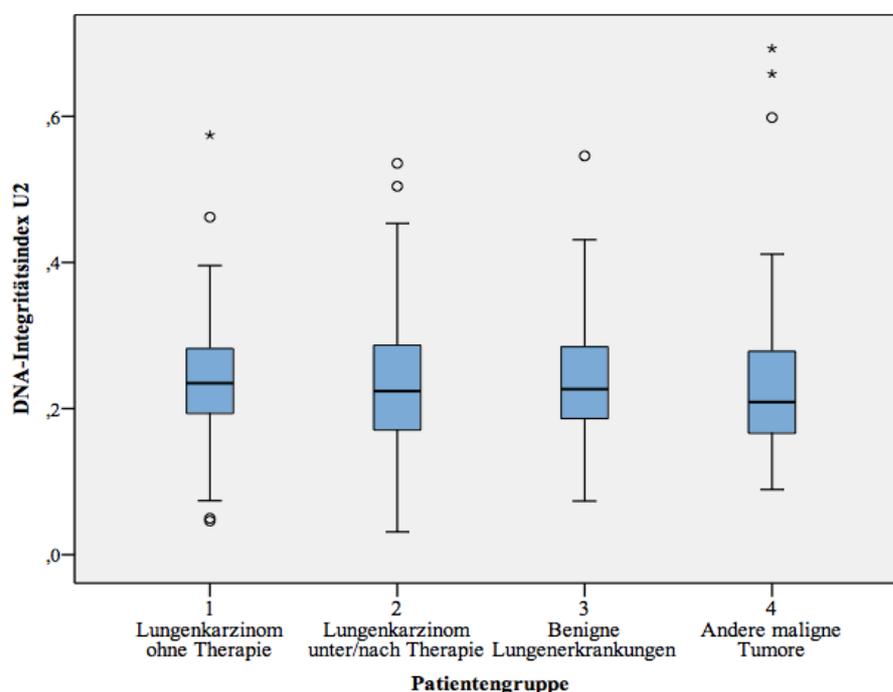


Abbildung 5 Darstellung des cfDNA-Integritätsindex U2 der Patientengruppen als Boxplots

Tabelle 20 cfDNA-Integritätsindex W1 der Patientengruppen

Patientengruppe	cfDNA-Integritätsindex W1				
	Minimum	Maximum	Median	Interquartilsbereich	Spannweite
1 Lungenkarzinom ohne Therapie	0,01	0,47	0,15	0,15	0,46
2 Lungenkarzinom unter/nach Therapie	0,02	0,34	0,13	0,07	0,33
3 Benigne Lungenerkrankungen	0,02	0,54	0,16	0,12	0,52
4 Andere maligne Tumoren	0,03	0,59	0,13	0,11	0,56

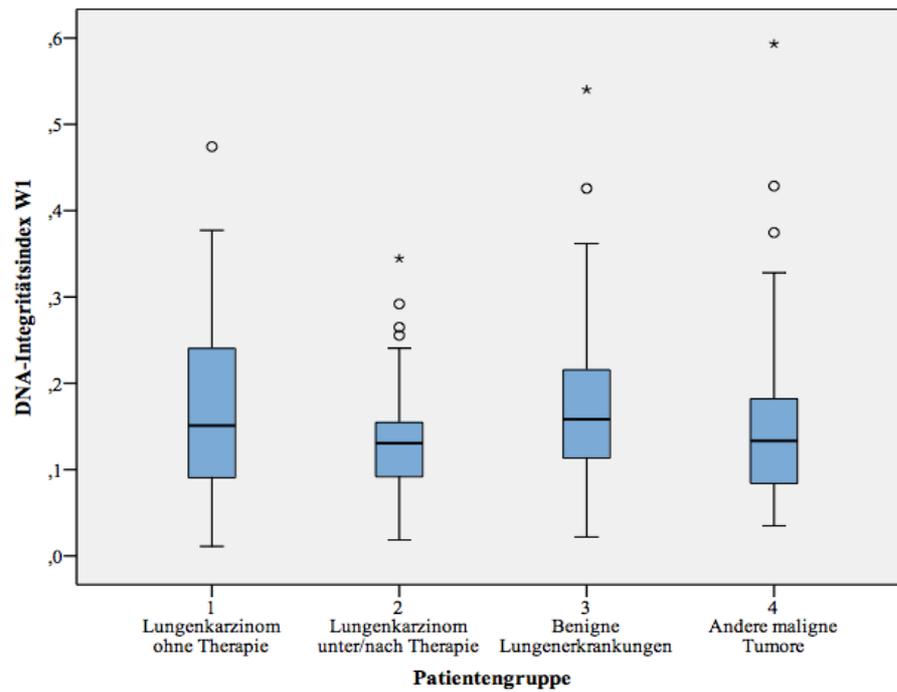


Abbildung 6 Darstellung des cfDNA-Integritätsindex W1 der Patientengruppen als Boxplots

Tabelle 21 cfDNA-Integritätsindex W2 der Patientengruppen

Patientengruppe	cfDNA-Integritätsindex W2				
	Minimum	Maximum	Median	Interquartilsbereich	Spannweite
1 Lungenkarzinom ohne Therapie	0,04	0,53	0,20	0,08	0,49
2 Lungenkarzinom unter/nach Therapie	0,03	0,48	0,19	0,10	0,45
3 Benigne Lungenerkrankungen	0,06	0,49	0,20	0,09	0,43
4 Andere maligne Tumoren	0,08	0,63	0,18	0,09	0,55

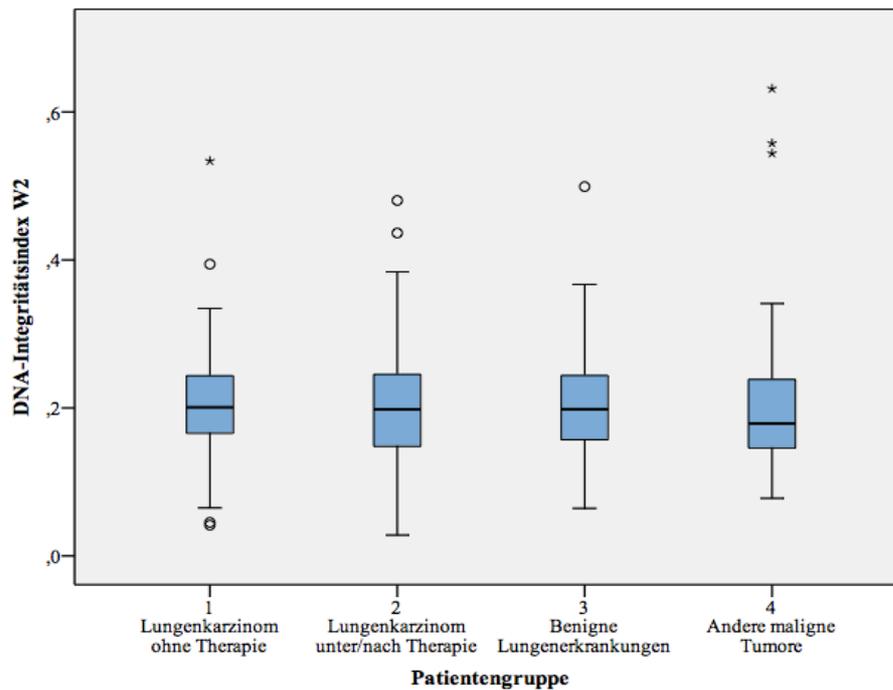


Abbildung 7 Darstellung des cfDNA-Integritätsindex W2 der Patientengruppen als Boxplots

Die nach Umetani und Wang berechneten cfDNA-Integritätsindices wiesen in allen Patientengruppen große Spannweiten auf, was auf eine Reihe von Ausreißern und Extremwerten zurückzuführen war.

Die Minimalwerte der cfDNA-Integritätsindices U1 und W1 in den einzelnen Patientengruppen unterschieden sich nur unwesentlich voneinander. Gleiches war für das 1. Quartil festzustellen. Unterschiede zwischen den Patientengruppen bei den cfDNA-Integritätsindices U1 und W1 zeigten sich beim 3. Quartil: Es war in der Patientengruppe 2 am niedrigsten, aufsteigend folgten die Patientengruppe 4, 3 und 1. Daraus ergaben sich weiterhin Unterschiede zwischen den Patientengruppen in Bezug auf die Interquartilsabstände. Die Gruppe der unbehandelten Lungenkarzinompatienten wies den größten Interquartilsabstand und damit die größte Streuung auf. Die Interquartilsabstände der Patientengruppen 3 und 4 für die cfDNA-Integritätsindices U1 und W1 waren geringer, die geringste Streuung trat in der Gruppe der benignen Lungenerkrankungen auf. Der Median der cfDNA-Integritätsindices U1 und W1 unterschied sich nicht wesentlich in den einzelnen Patientengruppen.

Bei der Auswertung der cfDNA-Integritätsindices U2 und W2 werden noch kleinere Unterschiede zwischen den Patientengruppen deutlich. Auch hier differierten die Minimalwerte und das 1. Quartil zwischen den Patientengruppen nur wenig. Im Gegensatz zu den cfDNA-Integritätsindices U1 und W1 waren bei den cfDNA-Integritätsindices U2 und W2 bei allen Patientengruppe das 3. Quartil und damit auch die Interquartilsabstände annähernd gleich. Auch in Bezug auf die Medianwerte der cfDNA-Integritätsindices U2 und W2 konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen ausgemacht werden.

Bei der Gegenüberstellung der Boxplots der cfDNA-Integritätsindices U1 und W1 sowie der cfDNA-Integritätsindices U2 und W2 zeigt sich, dass es keine starken Unterschiede zwischen den Berechnungsmethoden nach Umetani und Wang vorliegen.

Die cfDNA-Integritätsindices der einzelnen Patientengruppen unterschieden sich nur minimal voneinander. Ein Zusammenhang zwischen der jeweiligen Patientengruppe und der damit verbundenen Diagnose und den cfDNA-Integritätsindices konnte nicht nachgewiesen werden (p für cfDNA-Integritätsindex U1 = 0,10; p für cfDNA-Integritätsindex U2 = 0,87; p für cfDNA-Integritätsindex W1 = 0,11; p für cfDNA-Integritätsindex W2 = 0,87)

4.2.4 Assoziation zwischen cfDNA-Integritätsindices und Charakteristika des Patientenkollektivs

Auch für die cfDNA-Integritätsindices wurde untersucht, ob ein Zusammenhang mit den anderen erhobenen, klinischen und demographischen Merkmalen des untersuchten Patientenkollektivs vorlag. Wie bereits für die cfDNA-Konzentrationen der 3 Fragmente, konnten auch für die cfDNA-Integritätsindices keine relevanten Unterschiede in Abhängigkeit vom Geschlecht, Raucherstatus und vom Alter ermittelt werden.

Tabelle 22 Assoziation von cfDNA-Integritätsindices und Charakteristika des Patientenkollektivs

	p-Werte		
	Geschlecht	Raucherstatus	Alter
cfDNA-Integritätsindex U1	0,37	0,39	0,25
cfDNA-Integritätsindex U2	0,84	0,91	0,09
cfDNA-Integritätsindex W1	0,39	0,39	0,25
cfDNA-Integritätsindex W2	0,80	0,93	0,09

4.2.5 Potenzial der cfDNA-Konzentrationen als diagnostische Biomarker

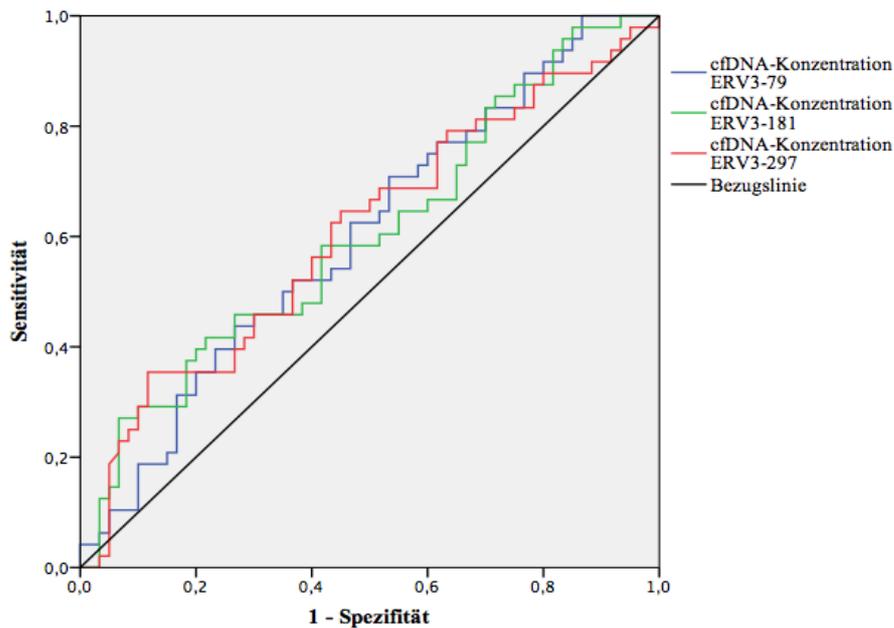


Abbildung 8 Darstellung der cfDNA-Konzentrationen als ROC-Kurven

Für die Erstellung der ROC-Kurven wurden die unbehandelten Lungenkrebspatienten (Patientengruppen 1) den Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung (Patientengruppe 3) gegenübergestellt. Die ROC-Kurven der cfDNA-Konzentrationen der ERV3-Fragmente zeigen anschaulich die sehr geringen Area under the curves (AUC). Die AUC war für die cfDNA-Konzentration von ERV3-297 mit 0,61 (95%-KI; 0,50-0,72) am größten. Die Flächen unter der Kurve des ERV3-181- und des ERV3-297 Fragments betragen 0,60 (95%-KI; 0,50-0,71). Aus den niedrigen Flächen unter der Kurve kann abgeleitet werden, dass eine Differenzierung von unbehandelten Lungenkrebspatienten und benignen Lungenkranken anhand der cfDNA-Konzentrationen der untersuchten ERV3-Fragmente nicht möglich war.

Anhand der cfDNA-Konzentration von ERV3-79 konnten bei einem Cut-off-Wert von 2,28 ng/μl unbehandelte Lungenkarzinompatienten mit einer Sensitivität von 62,5% und einer Spezifität von 53,3% von Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung abgegrenzt werden. Die Differenzierung der genannten Patientengruppen mittels der cfDNA-Konzentration von ERV3-181 gelang mit einer Sensitivität und Spezifität von 58,3% bei einem Cut-off-Wert von 0,59 ng/μl. Die cfDNA-Konzentration von ERV3-297 erlaubte die Klassifizierung in benigne bzw. therapienaive, maligne lungenkranke Patienten mit einer Sensitivität von 62,5% und einer Spezifität von 56,7% bei einem Cut-off-Wert von 0,39 ng/μl.

4.2.6 Potenzial der cfDNA-Integritätsindices als diagnostische Biomarker

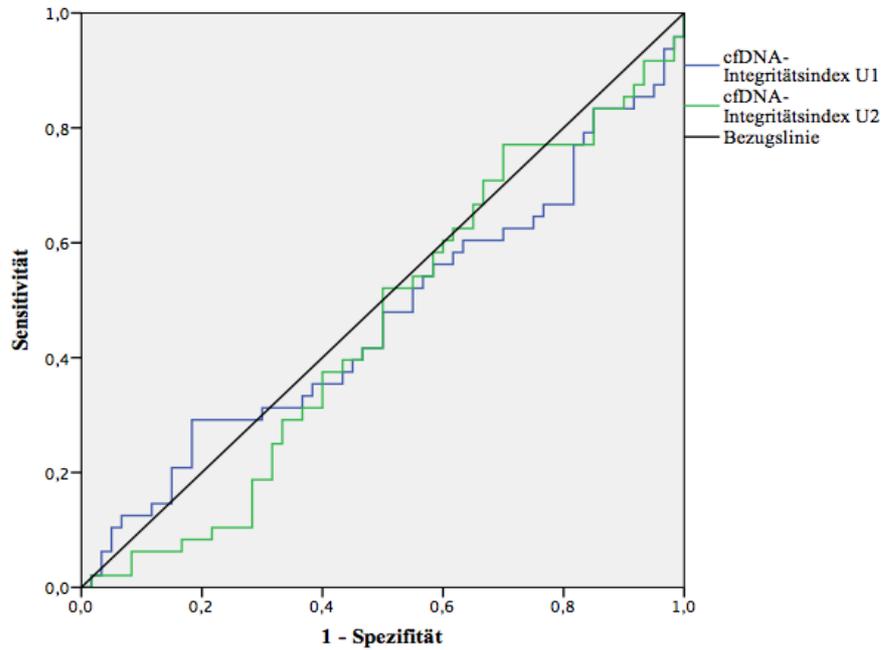


Abbildung 9 Darstellung der cfDNA-Integritätsindices U1 und U2 als ROC-Kurven

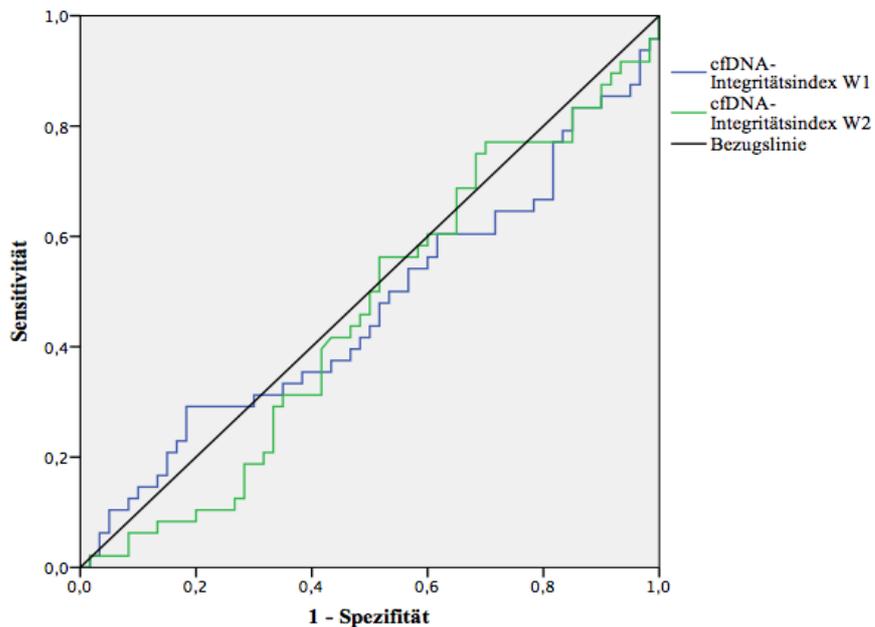


Abbildung 10 Darstellung der cfDNA-Integritätsindices W1 und W2 als ROC-Kurven

Analog zu den cfDNA-Konzentrationen wurden auch für die Erstellung der ROC-Kurven der cfDNA-Integritätsindices die unbehandelten Lungenkrebspatienten (Patientengruppe 1) den unter einer benignen Lungenerkrankung leidenden Patienten (Patientengruppe 3) gegenübergestellt. Bei den ROC-Kurven der cfDNA-Integritätsindices zeigt sich ein vergleichbares Bild: Sie wiesen ebenfalls nur sehr geringe AUCs auf. Bei den cfDNA-

Integritätsindices U1 und W1 lag die AUC bei 0,47 (95%-KI; 0,36-0,57), bei den cfDNA-Integritätsindices U2 und W2 betrug die AUC lediglich 0,46 (95%-KI; 0,35-0,57). Aus den niedrigen Flächen unter der Kurve kann abgeleitet werden, dass eine Differenzierung von unbehandelten Lungenkrebspatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung anhand der cfDNA-Integritätsindices U1, U2, W1 und W2 nicht möglich war.

Anhand des cfDNA-Integritätsindex U1 konnten bei einem Cut-off-Wert von 0,16 unbehandelte Lungenkarzinompatienten mit einer Sensitivität von 56,3% und einer Spezifität von 41,7% von Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung abgegrenzt werden. Die Differenzierung der genannten Patientengruppen mittels des cfDNA-Integritätsindex U2 gelang mit einer Sensitivität von 58,3% und einer Spezifität bei 41,7% bei einem Cut-off-Wert von 0,22.

Der cfDNA-Integritätsindex W1 erlaubte die Einordnung in therapienaive Lungenkarzinompatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung mit einer Sensitivität von 54,2% und einer Spezifität von 43,3% bei einem Cut-off-Wert von 0,15. Die Differenzierung der genannten Patientengruppen mittels des cfDNA-Integritätsindex W2 war mit einer Sensitivität von 56,3% und einer Spezifität von 48,3% bei einem Cut-off-Wert von 0,19 möglich.

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methoden

5.1.1 Das Patientenkollektiv

Von den 246 in diese Studie eingeschlossenen Patienten konnten die Daten von 227 Patienten ausgewertet werden. Das Patientenkollektiv wurde in 4 Patientengruppen aufgeteilt: Die Patientengruppe 1 beinhaltete 58 Patienten mit einem unbehandelten Lungenkarzinom. Die Patientengruppe 2 umfasste 58 Patienten, die bereits therapiert wurden oder noch in Behandlung waren. Der Patientengruppe 3 gehörten 69 Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung an. Die Patientengruppe 4 schloss 42 Patienten mit anderen Tumorentitäten als dem Lungenkarzinom ein. Ziel dieser Arbeit war es, die genannten Patientengruppen auf Unterschiede hinsichtlich ihrer cfDNA-Konzentration und -Integrität zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehr Patienten untersucht als in den meisten Studien, die sich mit cfDNA-Konzentrationsmessungen und cfDNA-Integritätsbestimmungen bei Lungenkarzinompatienten beschäftigten (Szpechinski et al., 2016; Chudasama et al., 2018; Wei et al. 2018). Das Patientenkollektiv dieser Arbeit zeichnete sich durch die Vielfältigkeit der untersuchten Krankheitsbilder, Tumor- und Therapiestadien aus, was dem Patientenaufkommen im klinischen Alltag sehr nahekommt.

Als Einschlusskriterien dieser Arbeit wurden die Indikation zur Bronchoskopie, der Diagnosenachweis sowie die Angabe von Alter, Geschlecht und Raucherstatus definiert. Eine Randomisierung nach Diagnose, Alter, Geschlecht oder Raucherstatus fand nicht statt. Die Indikation zur Bronchoskopie wurde aufgrund einer abklärungsbedürftigen Klinik oder Bildgebung gestellt. Bei der Diagnose wurde zwischen Lungenkarzinom (NSCLC oder SCLC), benigner Lungenerkrankung und anderen Tumorentitäten als dem Lungenkarzinom unterschieden. Außerdem wurde von allen Patienten das Alter, Geschlecht und der Raucherstatus aufgenommen, um mögliche Zusammenhänge zwischen den klinischen und demographischen Patientenmerkmalen und der cfDNA-Konzentration und cfDNA-Integrität nachweisen zu können. Folgende Ausschlusskriterien wurden für diese Studie festgelegt: Unvollständige Patientendaten, Differenzen von über 10% zwischen den Triplikaten bei der qPCR sowie Patientenproben, die keine Kalkulation der cfDNA-Integrität ermöglichten.

Bei den Lungenkarzinompatienten der Patientengruppen 1 und 2 wurden NSCLC- als auch SCLC-Patienten zusammengefasst. Auf eine separate Betrachtung der NSCLC- und SCLC-Patienten wurde aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit kleinzelligen Lungenkarzinomen verzichtet. Der Großteil vergleichbarer Studien befasste sich ausschließlich mit NSCLC-Patienten, nur in einzelnen Arbeiten wurden gemischte Patientenkollektive aus NSCLC- und SCLC-Patienten untersucht (Fournié et al., 1995; Schmidt et al., 2008). Es existieren nur vereinzelte Daten zur cfDNA-Konzentration und cfDNA-Integrität bei Patienten

mit einem kleinzelligen Bronchialkarzinom (Board et al., 2008; Almodovar et al., 2018). Studien, die die cfDNA-Konzentration und cfDNA-Integrität von NSCLC- und SCLC-Patienten vergleichen, existieren nicht. Durch die höhere Teilungs- und Wachstumsrate sowie durch die frühzeitige Metastasierung im Vergleich zu NSCLCs (Almodovar et al., 2018; Mohan et al., 2019) könnten höhere cfDNA-Konzentrationen und cfDNA-Integritätsindices bei Patienten mit kleinzelligen Lungenkarzinomen resultieren. Ob und inwieweit die Zusammenfassung von NSCLC- und SCLC-Patienten die Ergebnisse dieser Studie beeinflusst hat, kann infolge der begrenzten Studienlage nicht evaluiert werden.

Neben therapienaiven Lungenkrebspatienten der Patientengruppe 1 befand sich ein Teil der Lungenkrebspatienten dieser Studie (Patientengruppe 2) zum Zeitpunkt der Untersuchung noch in Therapie. Die weiteren Lungenkrebspatienten der Patientengruppe 2 hatten zum Erhebungszeitpunkt der Studie bereits eine Therapie erhalten. Es wurde jedoch nicht erhoben, wann die einzelnen Therapien stattgefunden haben und ob die Behandlungsmaßnahmen erfolgreich waren. Sowohl eine Radiatio, Chemotherapie als auch eine Operation können durch Tumorabbau, Tumorlyse oder begleitende Entzündungsreaktionen zu einer Erhöhung der cfDNA-Konzentration führen (Pan et al., 2012; Kageyama et al., 2018; Ma et al., 2019). Es ist demzufolge möglich, dass die Lungenkrebspatienten unter Therapie in dieser Arbeit gleich hohe oder sogar höhere cfDNA-Konzentrationen und cfDNA-Integritätsindices aufwiesen als die unbehandelten Lungenkarzinompatienten. Bei den bereits behandelten Lungenkarzinompatienten der Patientengruppe 2 könnten demnach sowohl erhöhte als auch erniedrigte cfDNA-Konzentrationen und -Integritätsindices auftreten.

Das Tumorstadium, die Tumorgöße sowie der Status der Lymphknoten- und Fernmetastasierung wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Mögliche Korrelationen zwischen Tumorstadium, Tumorgöße und Metastasierungsstatus und der cfDNA-Konzentration sowie dem cfDNA-Integritätsindex, wie sie bereits in anderen Studien nachgewiesen wurden (Soliman et al., 2018; Ma et al., 2019; Mirtavoos-Mahyari et al., 2019), konnten demzufolge nicht untersucht werden. Für die beiden ersten Patientengruppen kann abschließend eine große Heterogenität der Patienten in Bezug auf Tumorart (NSCLC/SCLC) und Therapiestadium (unbehandelt, unter Therapie, nach Therapie) festgestellt werden.

Der Patientengruppe 3 wurden Patienten mit verschiedenen benignen Lungenerkrankungen wie dem Asthma bronchiale, der COPD, der Sarkoidose oder der Pneumonie zugeordnet. Szpehcinski et al. konnten bei der gesonderten Gegenüberstellung von Patienten mit COPD und gesunden Probanden signifikante Unterschiede in Bezug auf die cfDNA-Konzentration zeigen, während die Gegenüberstellung von Patienten mit Sarkoidose oder Asthma bronchiale und Gesunden keine signifikanten Unterschiede aufdeckte (Szpehcinski et al., 2015). Daraus kann abgeleitet werden, dass die cfDNA-Konzentration von der jeweiligen benignen Lungenerkrankung abhängig ist. Die ermittelten cfDNA-Konzentrationen und -Integritätsindices

der Patientengruppe 3 können somit durch die Häufigkeit einzelner benigner Lungenerkrankungen wie der COPD beeinflusst sein.

Alle Tumorpatienten, die an einem anderen Tumor als dem NSCLC oder dem SCLC litten, wurden in der Patientengruppe 4 vereint. Die spezifische Tumorentität der Patienten wurde erhoben. Aufgrund der Vielzahl an verschiedenen Tumorarten wurde jedoch auf eine separate Darstellung und Auswertung der einzelnen Tumore verzichtet. Eine gesonderte Untersuchung der einzelnen Tumorentitäten war folglich nicht durchführbar. Mit der Patientengruppe 4 sollte geprüft werden, ob sich die cfDNA-Konzentration und cfDNA-Integrität von Lungenkarzinompatienten deutlich von Patienten mit anderen Tumorerkrankungen unterscheidet.

Die Geschlechterverteilung dieser Arbeit mit 141 untersuchten Männern und 86 untersuchten Frauen entsprach der Geschlechterverteilung, die auch bei den Lungenkrebsneuerkrankungen weltweit zu beobachten ist: Zwei Drittel der neu am Lungenkarzinom erkrankten Personen sind Männer, ein Drittel der Neuerkrankten sind Frauen (Bray et al., 2018). Auch in anderen Studien zum Thema cfDNA-Konzentration oder cfDNA-Integrität beim Lungenkarzinom war eine ähnliche Geschlechterverteilung bei den Patienten zu beobachten (Hyun et al., 2017; Soliman et al., 2018).

Das Durchschnittsalter der in diese Studie eingeschlossenen Patienten lag bei 60 Jahren, wobei die Lungenkrebspatienten der Patientengruppen 1 und 2 im Mittel fast 62 Jahre alt waren. Damit lag das mittlere Patientenalter deutlich unter dem durchschnittlichen Erkrankungsalter bei Erstdiagnose eines Lungenkarzinoms, welches in Deutschland bei Männern bei 70 Jahren und bei Frauen bei 69 Jahren liegt (Robert Koch-Institut, 2019). Auch in anderen Arbeiten zum selben Thema konnte ein vergleichbares, mittleres Patientenalter wie in dieser Studie festgestellt werden (Chudasama et al., 2018; Mirtavoos-Mahyari et al., 2019).

Bei der Erhebung des Raucherstatus in dieser Arbeit wurde zwischen Nichtrauchern, die anamnestisch in ihrem Leben nie geraucht haben, sowie Rauchern und ehemaligen Rauchern, die laut eigenen Angaben zum Zeitpunkt der Untersuchung rauchten oder in der Vergangenheit geraucht haben, unterschieden. In anderen Studien wurden Raucher und ehemalige Raucher separat voneinander betrachtet (van der Drift et al., 2010; Morbelli et al., 2017). Mehr als 70% der untersuchten Probanden dieser Studie waren Raucher oder ehemalige Raucher. Der Anteil an Rauchern und ehemaligen Rauchern war bei den Lungenkrebspatienten in den Patientengruppen 1 und 2 mit knapp 85% noch deutlich höher, während der überwiegende Teil der Nichtraucher bei den Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung zu verorten war. In Deutschland können 90% der Lungenkarzinome bei Männern mit Nikotinkonsum in Zusammenhang gebracht werden, bei Frauen sind es 60% (Robert Koch-Institut, 2019). Damit gleicht die Verteilung des Raucherstatus dieser Arbeit der deutschlandweiten Verteilung ebenso wie der anderer, vergleichbarer Studien (Soliman et al., 2018).

5.1.2 Präanalytische und analytische Bedingungen für die cfDNA-Bestimmungen

In dieser Arbeit wurden Plasmaproben verwendet, da diese weniger anfällig für zelluläre Kontamination durch genomische DNA sind als Serumproben und damit trotz ihrer geringeren cfDNA-Konzentration eine bessere Vergleichbarkeit ermöglichen (Lee et al., 2000; Bronkhorst et al., 2015). In anderen vergleichbaren Studien wurde hingegen mit Serumproben gearbeitet, wodurch ein Vergleich mit den in dieser Arbeit gemessenen cfDNA-Konzentrationen kaum möglich ist.

Für die Blutentnahme wurden EDTA-Röhrchen verwendet, in aktuelleren Studien wurden hingegen häufig spezielle Blutabnahmeröhrchen für zellfreie DNA verwendet (Morikawa et al., 2018; Rodriguez et al., 2019). Durch die zeitnahe Weiterverarbeitung der Blutproben wurde verhindert, dass die cfDNA-Konzentration nachträglich durch die Lyse von Leukozyten verfälscht wurde (Mehrotra et al., 2017; Schmidt et al., 2017).

Die durch eine 2-schrittige Zentrifugation erhaltenen zellfreien Plasmen wurden anschließend bei -80°C gelagert, die Zeit bis zur Isolation der cfDNA betrug zwischen 8 und 9 Jahren. Welchen Einfluss die langfristige Lagerung der zellfreien Plasmen auf die cfDNA-Konzentration und cfDNA-Integrität hat, ist nur wenig erforscht. Sato et al. stellten in zellfreien Plasmen von Patienten mit einem fortgeschrittenen NSCLC eine Reduktion des Nachweises von EGFR-Mutationen von 35-40% nach 7-jähriger Lagerung der zellfreien Plasmen bei -80°C fest (Sato et al., 2018). Sozzi et al. berichteten über eine jährliche Abbaurate von 30,7% bei Lagerung zellfreier Plasmen bei -80°C (Sozzi et al., 2005). Pinzani et al. stellten einen Rückgang der absoluten cfDNA-Konzentration von 38% nach 21-monatiger Lagerung von zellfreien Plasmen bei -80°C fest. Häufig wird in anderen Studien der Zeitraum von der Lagerung der zellfreien Plasmen bis zur cfDNA-Isolation nicht angegeben, was die Vergleichbarkeit der Studien zusätzlich beschränkt.

Für die Isolation der cfDNA aus den Plasmen wurde das QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit verwendet. Dieses Kit auf Silicagelbasis wurde in einer Vielzahl von Studien für die cfDNA-Isolation verwendet, es konnten damit große cfDNA-Ausbeuten erreicht werden (Sorber et al., 2017; Diefenbach et al., 2018). In anderen Studien wurden häufig auch Isolationskits auf Basis magnetischer beads benutzt, die eine effiziente Alternative zum QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit darstellen (Markus et al., 2018; Sorber et al., 2018). Die Wahl des Isolationskits kann die gemessenen cfDNA-Konzentrationen beeinflussen (Fleischhacker et al., 2011). Unterschiedliche Studienergebnisse könnten demnach auch auf die Verwendung unterschiedlicher Isolationskits zurückgeführt werden.

Die isolierte cfDNA dieser Arbeit wurde teilweise bei -20°C für einige Tage gelagert, teilweise wurde die cfDNA unverzüglich bei der quantitativen PCR eingesetzt. Eine Änderung der cfDNA-Konzentration durch die kurzfristige Lagerung der isolierten cfDNA bei -20°C ist nicht zu erwarten (El Messaoudi et al., 2013).

Die Quantifizierung der cfDNA-Konzentration erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR, welche als hocheinsensitive Nachweismethode in vielen anderen Studien verwendet wurde. Spektralfluorimetrische Messungen zur Quantifizierung der cfDNA kamen nur in wenigen Studien zum Einsatz (Agassi et al., 2015). Für die qPCR wurde die Sequenz von ERV3 gewählt, welche bereits in anderen Studien für die Quantifizierung von cfDNA Anwendung fand (Schmidt et al., 2005; Schmidt et al., 2008; Fleischhacker et al., 2011). Für die Quantifizierung von cfDNA eignen sich unterschiedliche Zielgene wie beispielsweise β -Aktin, β -Globin und GAPDH (Fleischhacker et al., 2011). Viele Studien arbeiteten außerdem mit 2 verschiedenen langen ALU-Sequenzen (Umetani et al., 2016a, 2016b; Stötzer et al., 2014; Soliman et al., 2018). Die Wahl des Zielgens für die Quantifizierung der cfDNA kann zu signifikant unterschiedlichen Ergebnissen führen: Mit β -Globin als Zielgen konnte deutlich mehr cfDNA nachgewiesen werden als mit ERV3, β -Aktin oder GAPDH (Fleischhacker et al., 2011). Daraus ergibt sich einerseits, dass die Ergebnisse dieser Studie durch die Wahl von ERV3 als Zielgen beeinflusst sein können. Andererseits bedeutet es, dass die Ergebnisse von Studien mit unterschiedlichen Zielgenen nur bedingt einen Vergleich zulassen.

Es wurden 3 verschiedene DNA-Fragmente mit einer Länge von 79, 181 und 297 bp gewählt. Die ERV3-79- und ERV3-181-Fragmente wurden ausgesucht, um cfDNA apoptotischen Ursprungs nachweisen zu können. Das ERV3-297-Fragment diente überwiegend dem Nachweis längerer cfDNA-Fragmente, die unter anderem durch Nekrose und andere Arten des Zelltods freigesetzt wurden.

Die cfDNA-Integritätsindices in dieser Arbeit wurden anhand der Formeln von Wang et al. und Umetani et al. berechnet (Wang et al., 2003; Umetani et al., 2006 a, 2006b). Am häufigsten wurde die Kalkulationsmethode nach Umetani et al. verwendet, Stötzer et al. hingegen berechneten die cfDNA-Integrität wie in dieser Arbeit anhand beider Kalkulationsmethoden (Stötzer et al., 2014). Für die Berechnung der cfDNA-Integrität bei Lungenkarzinompatienten wendeten Schmidt et al. sowie Szpechciski et al. eine weitere Berechnungsmethode an, bei der die Differenz zwischen der cfDNA-Konzentration des langen und des kurzen Fragments gebildet wird (Schmidt et al., 2008; Szpechciski et al., 2016). Die bereits limitierte Studienlage zur cfDNA-Integrität bei Lungenkarzinompatienten wurde durch die Anwendung dieser alternativen Kalkulation der cfDNA-Integrität noch weiter begrenzt: Ein wirklicher Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist kaum möglich.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 cfDNA-Konzentrationen

Die cfDNA-Konzentrationen der 3 untersuchten Fragmente zeigten eine große Spannweite. Die Tumorpatienten wiesen eine besonders große Spannweite im Vergleich zu den benignen Erkrankten auf. Vergleichbare Ergebnisse wurden sowohl für Lungenkarzinompatienten

(Szpechcinski et al., 2016; Hyun et al., 2019) als auch für Patienten mit anderen Tumorerkrankungen nachgewiesen (Hashad et al., 2012; Qi et al., 2013; Skrypina et al., 2016). Der Medianwert der cfDNA-Konzentration war bei allen ERV3-Fragmenten bei den Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung am niedrigsten, während die unbehandelten Lungenkarzinompatienten für alle 3 Fragmente die höchsten Medianwerte aufwiesen. Die cfDNA-Konzentrationen der Lungenkrebspatienten unter bzw. nach Therapie (Patientengruppe 2) und der Patienten mit anderen malignen Tumorerkrankungen (Patientengruppe 4) lagen im mittleren Bereich: Sie waren geringfügig niedriger als die der unbehandelten Lungenkarzinompatienten, aber größer als die der unter einer benignen Lungenerkrankung leidenden Patienten. Insgesamt waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen allerdings nur schwach ausgeprägt. Eine Reihe von Faktoren könnte zu diesen Ergebnissen geführt haben. Eine mögliche Ursache stellt die Heterogenität des Patientenkollektivs dar. Die geringen cfDNA-Konzentrationsunterschiede zwischen den Lungenkrebspatienten der ersten beiden Patientengruppen könnten sich unter anderem darauf zurückführen lassen, dass beide Gruppen sowohl NSCLC- als auch SCLC-Patienten mit Anfangsstadien wie auch fortgeschrittenen Tumorstadien, unterschiedlichen Tumorgrößen und Metastasierungsgraden beinhalteten. Dazu kommt, dass Lungenkarzinompatienten während und nach Therapie zu einer Patientengruppe zusammengefasst wurden. Hierdurch konnten mögliche Unterschiede zwischen therapie-naiven und bereits therapierten Lungenkrebspatienten nicht abgeleitet werden. Die Heterogenität der Tumorarten sowie der Tumor- und Therapiestadien könnte eine Erklärung dafür sein, dass keine deutlichen cfDNA-Konzentrationsunterschiede zwischen den Lungenkarzinompatienten auszumachen waren.

Die geringfügigen Unterschiede bei der cfDNA-Konzentration zwischen den Lungenkrebspatienten (Patientengruppen 1 und 2) und den Patienten mit einer anderen malignen Tumorerkrankung (Patientengruppe 4) könnten sich damit erklären lassen, dass es sich bei allen Probanden dieser Gruppen um Tumorpatienten handelte. Eine Erhöhung der cfDNA-Konzentration ist nicht spezifisch für eine bestimmte Tumorentität, sondern konnte bei einer Vielzahl verschiedener Tumore nachgewiesen werden (Hashad et al., 2012; Chen et al., 2013; Qi et al., 2013; Skrypina et al., 2016). Diese Aussage wird durch die fehlenden, relevanten cfDNA-Konzentrationsunterschiede zwischen den Tumorpatienten dieser Arbeit bekräftigt.

Zuletzt stellt sich die Frage, warum die unter einer benignen Lungenerkrankung leidenden Patienten nicht deutlich geringere cfDNA-Konzentrationen aufwiesen als Tumorpatienten, insbesondere als Lungenkarzinompatienten. Ein Teil der benignen Lungenkranken dieser Studie litt unter einer entzündlichen Lungenerkrankung wie der COPD oder der Pneumonie. Entzündungsreaktionen können erhöhte cfDNA-Level zur Folge haben (Gormally et al., 2004; Frank 2016; van der Meer et al., 2019). Dies könnte eine weitere mögliche Ursache für die

geringfügigen cfDNA-Konzentrationsunterschiede zwischen benigne und maligne Lungenkranken darstellen.

In dieser Arbeit konnten erhöhte cfDNA-Konzentrationen bei Lungenkarzinompatienten im Vergleich zu Patienten mit benignen Lungenerkrankungen festgestellt werden, wobei diese Unterschiede nicht stark ausgeprägt waren. In anderen Studien konnten deutlichere Differenzen zwischen den genannten Gruppen nachgewiesen werden (Szpechciski et al., 2015; Szpechciski et al., 2016; Soliman et al., 2018). Die Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit war dadurch erschwert, dass sich bislang nur eine sehr geringe Anzahl von Studien mit dem Vergleich der cfDNA-Konzentration von Lungenkrebspatienten und benigne Lungenerkrankten beschäftigt hat. Der überwiegende Teil der Studien verglich hingegen die cfDNA-Konzentration von Lungenkrebspatienten und gesunden Probanden (Wei et al., 2018; Ma et al., 2019; Ye et al., 2019). Für diese Arbeit wurde hingegen von einem klinischen Standpunkt ausgegangen. Es wurde bewusst auf eine gesunde Kontrollgruppe verzichtet, da im klinischen Alltag die Differenzierung von benignen und malignen Erkrankten im Vordergrund steht (Fleischhacker und Schmidt, 2020).

Bei einer Vielzahl von weiteren, nicht-neoplastischen Erkrankungen konnten ebenfalls erhöhte cfDNA-Konzentrationen ermittelt werden. Hierzu zählen beispielweise Autoimmun- (Bartoloni et al., 2011), Virus- (Ha et al., 2011; Yi et al., 2014) und Herz-Kreislaufkrankungen (Cui et al., 2013). In dieser Arbeit ist vor dem Hintergrund des hohen Durchschnittsalters der Patienten, dem hohen Anteil an Rauchern und der Schwere der untersuchten Tumorerkrankungen davon auszugehen, dass viele der eingeschlossenen Patienten zusätzlich unter Begleiterkrankungen gelitten haben. Es ist anzunehmen, dass die cfDNA-Konzentrationen dieser Studie durch die Komorbiditäten der Patienten beeinflusst wurden (Ørntoft et al., 2021).

Darüber hinaus wurde bei Gesunden für eine Reihe weiterer Einflussgrößen ohne jeglichen Krankheitswert nachgewiesen, dass diese ebenfalls eine Steigerung der cfDNA-Konzentration bedingen können. Hierzu zählen u.a. das Alter (Jyhava et al., 2001; Zhong et al., 2007; Ørntoft et al., 2021), körperliche Betätigungen (Atamaniuk et al., 2004, 2008, 2010), psychische Belastungen (Hummel et al., 2018), Schwangerschaft und Menstruation (Fleischhacker und Schmidt, 2020). Auch die Tageszeit der Blutentnahme kann sich auf die cfDNA-Konzentration auswirken (Madsen et al., 2019). Es ist anzunehmen, dass die ermittelten cfDNA-Konzentrationen dieser Arbeit auch durch die genannten Faktoren beeinflusst wurden. Solange die genauen Freisetzungsmechanismen der cfDNA unklar sind, ist von weiteren, bisher nicht erforschten Einflussfaktoren für die cfDNA-Konzentration auszugehen.

Auch präanalytische und analytische Bedingungen müssen als Ursache für die geringen cfDNA-Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen in Betracht gezogen werden. Welchen Einfluss die Lagerung der zellfreien Plasmen bei -80°C über mehrere Jahre für die Ergebnisse hatte, kann aufgrund der geringen Datenlage nur schwer abgeschätzt werden. Basierend auf den Ergebnissen von Sozzi et al. und Pinzani et al. kann allerdings angenommen

werden, dass sich die cfDNA-Konzentration mit den Jahren der Lagerung deutlich reduziert hat (Sozzi et al., 2005; Pinzani et al., 2014). Die Lagerungseffekte sollten wiederum für die untersuchten Patientengruppen identisch sein, da alle Proben dieser Arbeit über einen vergleichbaren Zeitraum und unter denselben Bedingungen gelagert wurden.

5.2.2 cfDNA-Konzentrationen und Charakteristika des Patientenkollektivs

Als mögliche Einflussfaktoren für die cfDNA-Konzentrationen wurden in dieser Studie das Patientenalter, der Raucherstatus sowie das Geschlecht geprüft. Für die cfDNA-Konzentrationen der einzelnen Fragmente konnte kein Zusammenhang zwischen den untersuchten klinischen und demographischen Merkmalen des Patientenkollektivs nachgewiesen werden. Das entspricht auch den Ergebnissen anderer Studien, die ebenfalls keine entsprechenden Assoziationen zwischen der cfDNA-Konzentration und dem Alter, dem Geschlecht oder dem Raucherstatus der Patienten detektieren konnten (Pan et al., 2012; Mirtavoos-Mahyari et al., 2019).

5.2.3 cfDNA-Konzentrationen als Biomarker

Mit dieser Arbeit wurde außerdem das Ziel verfolgt, die diagnostische Wertigkeit der cfDNA-Konzentration zu beurteilen. Hierfür wurden ROC-Kurven erstellt, um die diskriminatorische Stärke der cfDNA-Konzentration der verwendeten ERV3-Fragmente zu bewerten, zwischen unbehandelten Lungenkrebspatienten (Patientengruppe 1) und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung (Patientengruppe 3) zu unterscheiden. Die errechneten Flächen unter der Kurve betragen zwischen 0,60 (95%-KI; 0,50-0,71) und 0,61 (95% KI; 0,50-0,72), wobei die AUC des längsten ERV3-Fragments am größten war. Die niedrigen AUCs in dieser Arbeit könnten auf die geringen Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen zurückzuführen sein. Für diese Studie lässt sich daraus ableiten, dass eine sichere Diskriminierung von Lungenkrebspatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung nicht möglich war. Als diagnostische Biomarker waren die cfDNA-Konzentrationen der quantifizierten ERV3-Fragmente aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität zwischen 53,3% und 62,5% ungeeignet. Schmidt et al. kamen in einer Pilotstudie mit 60 Patienten zum selben Ergebnis (Schmidt et al., 2008).

Der überwiegende Teil der Studien zu diesem Thema untersuchte die Fähigkeit der cfDNA-Konzentration, zwischen Lungenkrebspatienten und gesunden Probanden zu unterscheiden. Hierbei bewies die cfDNA-Konzentration eine sehr gute diskriminatorische Stärke, es konnten AUCs von bis zu 0,9 erreicht werden sowie Sensitivitäts- und Spezifitätswerte von 90% respektive von 80,5% bei einem Cutoff-Wert von 2,8 ng/ml (Szpehcinski et al., 2015).

Im Gegensatz dazu beschäftigten sich deutlich weniger Studien mit der diagnostischen Wertigkeit der cfDNA-Konzentrationen bei Patienten mit Lungenkarzinom und benignen Lungenerkrankungen. Trotz signifikanter cfDNA-Konzentrationsunterschiede zwischen diesen beiden Patientengruppen (Szpehcinski et al., 2015; Soliman et al., 2018) waren bei einem Cutoff-Wert

von $>5,25$ ng/ml die AUC mit 0,76, die Sensitivität von 56% und Spezifität von 91% deutlich niedriger als bei der Gegenüberstellung von Lungenkrebspatienten und Gesunden (Spzeczinski et al., 2015). Die geringe diskriminatorische Stärke der cfDNA-Konzentration, zwischen Lungenkarzinompatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung unterscheiden zu könnten, könnte darauf zurückzuführen sein, dass Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung höhere cfDNA-Konzentrationen als Gesunde aufweisen (Schmidt et al., 2008; Spzeczinski et al., 2015). Die Überlappung der cfDNA-Level von unter einer benignen Lungenerkrankung leidenden Patienten und Lungenkrebspatienten ist demnach deutlich größer als bei Lungenkarzinompatienten und Gesunden, was die Diskrimination erschwert bzw. unmöglich macht (Chudasama et al., 2018).

5.2.4 cfDNA-Integritätsindices

Auch die cfDNA-Integritätsindices der verwendeten Proben wiesen eine große Spannweite auf. Als Ursache hierfür kann die ebenfalls große Spannweite der cfDNA-Konzentrationen angenommen werden, auf denen die Berechnungen der cfDNA-Integrität basierten. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in anderen Studien zur cfDNA-Integrität nachgewiesen (Chudasama et al., 2018; Soliman et al., 2018).

Die cfDNA-Integritätsindices U1 und U2 sowie W1 und W2, die anhand der beiden Berechnungsmethoden erhalten wurden, korrelierten in hohem Maß miteinander und wiesen keine deutlichen Unterschiede auf. Diese starke Korrelation zwischen den cfDNA-Indices bekräftigt, dass cfDNA-Integritätsmessungen unabhängig von ihrer Berechnungsmethode nicht zur Differenzierung zwischen benignen und malignen Lungenkranken geeignet sind. Auch Stötzer et al. konnten belegen, dass die cfDNA-Integritätsindices bei Brustkrebspatientinnen unabhängig von der Berechnungsmethode nach Wang oder Umetani nahezu übereinstimmten (Stötzer et al., 2014).

Bei allen cfDNA-Integritätsindices dieser Studie ließen sich nur minimale Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen feststellen. Insbesondere waren keine relevanten Unterschiede zwischen den Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung und Lungentumorpatienten bzw. anderen Tumorerkrankten erkennbar. Wie schon bei der cfDNA-Konzentration könnten auch für die cfDNA-Integrität die geringen Differenzen zwischen den Lungenkrebspatienten der ersten beiden Patientengruppen u.a. auf die Heterogenität der Patienten hinsichtlich Tumorart, Therapie- und Tumorstadium zurückzuführen sein. Die geringfügigen Unterschiede zwischen den Tumorpatienten der Patientengruppen 1, 2 und 4 bekräftigen, dass weder die Erhöhung der cfDNA-Integrität noch die die Steigerung der cfDNA-Konzentration spezifisch für eine Tumorerkrankung sind (Yu et al., 2014).

Auch bei nicht-neoplastischen, benignen Erkrankungen können vermehrt Zelluntergänge durch Nekrose auftreten (Holdenrieder et al., 2008), was zu einer Erhöhung der cfDNA-Integrität führen kann (Chudasama et al., 2018). Daraus resultiert eine große Überlappung zwischen der cfDNA-

Integrität von Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen (Chudasama et al., 2018; Holdenrieder et al., 2008). Diese Überlappung sowie die Heterogenität der Patienten könnten erklären, weshalb eine sichere Abgrenzung von Patienten mit benignen Lungenerkrankungen und von Tumorpatienten, speziell von Lungenkrebspatienten, anhand der cfDNA-Integrität in dieser Arbeit nicht möglich war.

In einigen wenigen Studien konnten signifikante Unterschiede in Bezug auf die cfDNA-Integrität zwischen Patienten mit benignen Lungenerkrankungen bzw. benignen pulmonalen Raumforderungen und Lungenkrebspatienten nachgewiesen werden (Chudasama et al., 2018; Soliman et al., 2018), in anderen Arbeiten wiederum nicht (Schmidt et al., 2008; Szepechinski et al., 2016). Insgesamt war der Vergleich der Ergebnisse dieser Untersuchung durch die geringe Anzahl von Studien, die sich mit der Gegenüberstellung der cfDNA-Integrität von Lungenkrebspatienten und benigne Lungenerkrankten beschäftigt haben, begrenzt.

Der Vergleich mit Studien, die Unterschiede bei der cfDNA-Integrität von benignen Erkrankten und Patienten mit anderen Tumorentitäten als dem Lungenkarzinom untersucht haben, ist nur eingeschränkt möglich. Nicht alle benignen Erkrankungen gehen mit Entzündungsreaktionen und vermehrten Zelluntergängen einher wie es bei der COPD oder der Pneumonie möglich ist. Es erscheint daher plausibel, dass bei Patienten mit Tumorarten wie dem Prostatakarzinom deutliche cfDNA-Integritätsunterschiede zwischen maligne und benigne Erkrankten nachweisbar waren (Khani et al., 2019), während bei Patienten mit anderen Tumorerkrankungen wie dem Mamma- und dem Lungenkarzinom geringe bis keine Differenzen gefunden werden konnten (Schmidt et al., 2008; Stötzer et al., 2014).

Analog zur cfDNA-Konzentration könnten auch präanalytische und analytische Bedingungen wie die Probenlagerung sowie die Gen- und Fragmentauswahl ursächlich für die geringfügigen cfDNA-Integritätsunterschiede zwischen den untersuchten Patientengruppen sein.

5.2.5 cfDNA-Integritätsindices und Charakteristika des Patientenkollektivs

Diese Arbeit verfolgte außerdem das Ziel, mögliche Zusammenhänge zwischen der cfDNA-Integrität und klinischen sowie demographischen Merkmalen des Patientenkollektivs aufzudecken. Es konnte Zusammenhang zwischen den errechneten cfDNA-Integritätsindices und dem Alter, Geschlecht oder dem Raucherstatus der untersuchten Patienten nachgewiesen werden. Damit schließen sich die Ergebnisse ähnlichen Arbeiten an (Schmidt et al., 2008; Soliman et al., 2018)

5.2.6 cfDNA-Integrität als Biomarker

Mit dieser Arbeit wurde beabsichtigt, die diagnostische Wertigkeit der cfDNA-Integrität zu beurteilen. Analog zur cfDNA-Konzentration wurden hierfür die unbehandelten Lungenkrebspatienten (Patientengruppe 1) den benignen Lungenkranken (Patientengruppe 3) gegenübergestellt. Es wurden ebenfalls ROC-Kurven erstellt, um die diskriminatorische Stärke

der cfDNA-Integrität zu bewerten, zwischen therapienaiven Lungenkrebspatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung zu unterscheiden. Die ermittelten AUCs lagen zwischen 0,46 (95%-KI; 0,36-0,57) und 0,47 (95%-KI; 0,35-0,57). Daraus ergibt sich, dass in dieser Arbeit keine suffiziente Diskriminierung von unbehandelten Lungenkarzinompatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung anhand der cfDNA-Integrität möglich war. Die cfDNA-Integrität erwies sich aufgrund der geringen Sensitivitäts- und Spezifitätswerte von 41,7% bis 58,3% in dieser Studie ungeeignet als diagnostischer Biomarker. Die Ergebnisse kamen durch die geringen Unterschiede hinsichtlich der cfDNA-Integritätsindices zwischen den einzelnen Patientengruppen zustande. Diese geringen Differenzen könnten wiederum auf die Heterogenität der Patienten und der Überlappung der cfDNA-Integrität zwischen maligne und benigne Erkrankten zurückzuführen sein (Holdenrieder et al., 2008; Chudasama et al., 2018). Auch Schmidt et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die cfDNA-Integrität nicht zur Differenzierung von Patienten mit Lungenkrebs und Patienten mit gutartigen Lungenerkrankungen geeignet war (Schmidt et al., 2008).

Obwohl es in anderen Studien gelang, signifikante Unterschiede in Bezug auf die cfDNA-Integrität zwischen Patienten mit Lungenkrebs und benignen Lungenerkrankungen nachzuweisen, waren die gemessenen AUCs mit 0,61 (Chudasama et al., 2018) und 0,65 (Soliman et al., 2018) nur unwesentlich größer als in dieser Arbeit. Diese Ergebnisse waren ebenfalls auf die Überlappung der cfDNA-Integrität zwischen maligne und benigne Lungenkranken zurückzuführen (Chudasama et al., 2018). Im Gegensatz dazu konnten Szpechcinski et al. für die cfDNA-Integrität eine große diskriminatorische Stärke bei der Differenzierung von Lungenkrebspatienten und Patienten mit einem solitären Lungenrundherd belegen und erzielten AUC-Werte von 0,8 (Szpechcinski et al. 2016). Bei 80% dieser solitären Lungenrundherde handelt sich um Granulome, bei 10% um Hamartome (Szpechcinski et al. 2016). Diese solitären Lungenrundherde sind häufig auch noch Monate bis Jahre nach einer Infektion nachweisbar, ohne dass eine relevante Entzündungsreaktion fortbesteht. Diese fehlende Entzündungsaktivität bei Patienten mit einem solitären Lungenrundherd könnte die Ursache dafür sein, dass diese Patienten besser von Lungenkarzinompatienten differenziert werden können als beispielsweise COPD-Patienten.

Bei der Gegenüberstellung der AUCs sowie der Sensitivitäts- und Spezifitätswerte der cfDNA-Konzentrationen und der cfDNA-Integritätsindices zeigte sich, dass die Konzentrationsmessungen von cfDNA in dieser Arbeit eine höhere diagnostische Wertigkeit als die cfDNA-Integritätsmessungen aufwiesen. Gleichwohl erwiesen sich beide cfDNA-Messungen in dieser Arbeit als ungeeignete Biomarker für den klinischen Einsatz.

5.3 Ausblick

Das Potenzial der cfDNA als Biomarker wird seit Jahren ausgiebig erforscht und wurde bereits in unzähligen Studien nachgewiesen. Dank des großen technischen Fortschritts hat die cfDNA als Teil der Liquid Biopsy mittlerweile auch Einzug in den klinischen Alltag erhalten. Durch ihre geringe Invasivität, ihre schnelle Verfügbarkeit und unkomplizierte Wiederholbarkeit stellt die Liquid Biopsy eine vielversprechende, komplementäre Methode zur Gewebeprobe dar, insbesondere bei multimorbiden Patienten.

Es bleibt dennoch fraglich, inwieweit cfDNA-Konzentrations- und Integritätsmessungen als Biomarker in der Klinik Anwendung finden könnten. Erhöhte cfDNA-Konzentrationslevel und -Integritätsindices wurden bei einer Vielzahl unterschiedlicher Tumorentitäten nachgewiesen. Eine Erhöhung der cfDNA-Konzentration wie auch der cfDNA-Integrität ist demnach nicht tumorspezifisch, was den klinischen Einsatz als diagnostische Biomarker erheblich beschränkt. Dazu kommt, dass auch nicht-neoplastische Erkrankungen wie Autoimmun-, Virus- und Herzkreislauferkrankungen eine Steigerung der cfDNA-Konzentration zur Folge haben können. Diese Erkrankungen treten häufig als Komorbiditäten bei Tumorpatienten auf, wodurch die klinische Anwendung von quantitativen cfDNA-Messungen als Biomarker weiter erschwert wird. Des Weiteren wurde bereits für eine Reihe weiterer Faktoren ohne Krankheitswert nachgewiesen, dass diese bei Gesunden ebenfalls zu einer Erhöhung der cfDNA-Konzentration führen können: Alter, körperliche Betätigung, psychische Belastungen, Schwangerschaft und Menstruation sind nur einige Beispiele hierfür. Solange die genauen Freisetzungs- und Abbaumechanismen der cfDNA bzw. der ctDNA einschließlich deren Einflussgrößen nicht näher untersucht wurden, erscheint der Einsatz von cfDNA-Konzentrations- und Integritätsmessungen als Biomarker, insbesondere im klinischen Alltag, ungeeignet. Ferner bedarf es weiterer Forschung zu qualitativen Untersuchungen von ctDNA: Als Teil der cfDNA stellt die ctDNA ein vielversprechendes Instrument zum Nachweis tumorassoziierter genetischer und epigenetischer Alterationen dar.

Darüber hinaus wird der klinische Einsatz der cfDNA und ctDNA durch die fehlende Standardisierung von präanalytischen und analytischen Bedingungen aktuell stark limitiert. Es bedarf standardisierter Prozeduren, die die Wahl des Untersuchungsmediums, die Gewinnung, Sammlung, Verarbeitung und Lagerung der Proben regulieren sowie einheitliche Isolations- und Quantifizierungsmethoden schaffen. Große randomisiert-kontrollierte Studien können dabei helfen, einen internationalen Konsens über die optimalen präanalytischen und analytischen Konditionen für die Bestimmung von cfDNA zu finden. Nur so kann die cfDNA als Teil der Liquid Biopsy ein verlässlicher Biomarker werden und einen festen Stellenwert im klinischen Alltag erlangen.

6 Zusammenfassung

Mit jährlich über 2 Millionen Neuerkrankten und über 1,7 Millionen Verstorbenen ist das Bronchialkarzinom sowohl die verbreitetste Tumorerkrankung als auch die am häufigsten zum Tod führende Tumorentität weltweit. Bei dem überwiegenden Teil der Patienten wird das Lungenkarzinom erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt, in dem häufig kein kurativer Therapieansatz mehr verfolgt werden kann. Demnach besteht für Bronchialkarzinompatienten ein großer Bedarf nach verlässlichen Screening- und Früherkennungsuntersuchungen. Hierbei wird insbesondere der Einsatz der Niedrigdosis-CT als mögliche Reihenuntersuchung für Hochrisikopatienten diskutiert. In den letzten Jahren hat die Liquid Biopsy als komplementäres Untersuchungsmedium zur Gewebeprobe Einzug in den klinischen Alltag erhalten. Durch ihre geringe Invasivität, ihre schnelle Verfügbarkeit und unkomplizierte Wiederholbarkeit stellt die Liquid Biopsy insbesondere bei multimorbiden Tumorpatienten eine vielversprechende Untersuchungsmethode dar. Bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Bronchialkarzinom kann die ctDNA als Bestandteil der Flüssigbiopsie zum qualitativen Nachweis therapierelevanter genetischer und epigenetischer Alterationen dienen. Darüber hinaus könnten auch quantitative Bestimmungen der cfDNA sowie cfDNA-Integritätsmessungen als Biomarker bei unterschiedlichen Tumorarten wie auch bei nicht-neoplastischen Erkrankungen geeignet sein. Die cfDNA-Integrität gibt das Verhältnis von längeren zu kürzeren DNA-Fragmenten wieder. Anhand der Länge der zellfreien DNA-Fragmente können wiederum Rückschlüsse auf die Entstehung und Freisetzung der cfDNA gezogen werden: Durch Apoptose entstehen vornehmlich zellfreie DNA-Fragmente einer Länge von ca. 180 bp, hingegen treten bei der Nekrose deutlich längere Fragmente auf. Während bei Gesunden der Zelluntergang vorwiegend via Apoptose stattfindet, sind bei Tumorpatienten zusätzlich Nekrosen zu beobachten. Für eine Reihe von Tumorentitäten einschließlich des Bronchialkarzinoms konnten erhöhte cfDNA-Konzentrationen wie auch gesteigerte cfDNA-Integritätsindices im Blut von Tumorpatienten im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden.

Diese Arbeit ging von einer klinischen Fragestellung aus, wobei die Diskriminierung von Patienten mit benignen und malignen Lungenkrankheiten im Vordergrund stand. Es wurde das Potenzial von Konzentrations- und Integritätsmessungen zellfreier DNA im Plasma als Biomarker zur Differenzierung von Lungenkrebspatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung untersucht. Hierfür erfolgte die Isolation von cfDNA aus Plasmaproben von insgesamt 227 Patienten. Das Patientenkollektiv untergliederte sich in Abhängigkeit der vorliegenden Diagnose in 4 Patientengruppen. Die untersuchten Patienten litten unter einem Lungenkarzinom, einer benignen Lungenerkrankung oder einer anderen Tumorerkrankung als dem Bronchialkarzinom. Die Konzentration von 3 unterschiedlich langen cfDNA-Fragmenten wurde durch eine quantitative Real-Time-PCR mit dem Zielgen ERV3 bestimmt. Ausgehend von

den Konzentrationen der cfDNA wurde mithilfe von 2 Kalkulationsmethoden die cfDNA-Integrität berechnet.

Es waren keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der cfDNA-Konzentration und -Integrität zwischen den Patientengruppen nachweisbar. Des Weiteren konnten keine Zusammenhänge zwischen dem Alter, Geschlecht und dem Raucherstatus des untersuchten Patientenkollektivs mit der cfDNA-Konzentration und -Integrität nachgewiesen werden. Weder für die Konzentrations- noch für die Integritätsmessungen der cfDNA konnten suffiziente AUCs, Sensitivitäts- und Spezifitätswerte erzielt werden. Eine hinreichende Diskriminierung von therapie-naiven Lungenkrebspatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung anhand der cfDNA-Konzentrationen oder -Integrität war nicht möglich. Beide cfDNA-Messungen erwiesen sich als ungeeignete, diagnostische Biomarker. Unter Umständen könnten sich cfDNA-Konzentrations- und Integritätsmessungen als Biomarker zum Therapiemonitoring bzw. -ansprechen eignen.

Die geringen Unterschiede zwischen malignen und benignen Lungenkranken in Bezug auf die cfDNA-Konzentration und cfDNA-Integrität könnten u.a. auf eine vermehrte Freisetzung zellfreier DNA via Apoptose als auch via Nekrose bei allen Patienten zurückzuführen sein. Als mögliche Ursache für die erhöhten cfDNA-Konzentrations- und Integritätswerte bei den Lungenkarzinompatienten und den anderen Tumorpatienten kommt ein vermehrter Tumorstoffwechsel im Rahmen des Tumorwachstums mit konsekutiven Zelluntergängen durch Nekrose und Apoptose in Betracht. Bei den Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung wiederum könnten die erhöhten cfDNA-Konzentrations- und Integritätslevel durch Entzündungsreaktionen mit einhergehenden, vermehrten apoptotischen und nekrotischen Zelluntergängen bedingt sein. Die geringe diskriminatorische Stärke der cfDNA-Konzentration und -Integrität in dieser Studie könnte außerdem durch die ausgeprägte Heterogenität innerhalb des Patientenkollektivs begründet sein. Es wurden sowohl Patienten mit einem NSCLC als auch mit einem SCLC in unterschiedlichen Tumor- und Therapiestadien sowie Patienten mit verschiedenen benignen Lungenerkrankungen eingeschlossen, um das Patientenaufkommen im klinischen Alltag widerzuspiegeln. Auch präanalytische und analytische Bedingungen bei der cfDNA-Bestimmung könnten die Resultate dieser Arbeit bedingt haben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen den dringenden Bedarf nach grundlegender Forschung zum Ursprung sowie zu den Freisetzungs- und Abbaumechanismen der cfDNA einschließlich möglicher Einflussfaktoren. Der Vergleich mit anderen Studien hebt den zwingenden Bedarf nach Standardisierung im Umgang mit der cfDNA hervor. Die Regulierung ist essenziell, um einen Einsatz der cfDNA im klinischen Alltag zu ermöglichen. Unabhängig von den Ergebnissen dieser Studie stellt die cfDNA einschließlich der ctDNA als Teil der Liquid Biopsy ein vielversprechendes Untersuchungsmedium dar. Besonders bei Tumorpatienten erweist sich die Flüssigbiopsie durch ihre geringere Invasivität und problemlose Wiederholbarkeit zunehmend als komplementäres Verfahren zur Gewebeprobe.

7 Literaturverzeichnis

- Agassi R, Czeiger D, Shaked G, Avriel A, et al. (2015). Measurement of circulating cell-free DNA levels by a simple fluorescent test in patients with breast cancer. *Am J Clin Pathol* 143(1), 18-24.
- Agbor-Enoh S, Wang Y, Tunc I, Jang MK, et al. (2019). Donor-derived cell-free DNA predicts allograft failure and mortality after lung transplantation. *EBioMedicine* 40, 541-553, doi: 10.1016/j.ebiom.2018.12.029.
- Ahmed M, Giles F, Joe Y, Weber DM, et al. (2003). Use of plasma DNA in detection of loss of heterozygosity in patients with multiple myeloma. *Eur J Haematol.* 71(3), 174-178.
- Ai B, Liu H, Huang Y, Peng P. (2016). Circulating cell-free DNA as a prognostic and predictive biomarker in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7(28), 44583-44595, doi: 10.18632/oncotarget.10069.
- Ai X, Guo X, Wang J, Stancu AL, et al. (2018). Targeted therapies for advanced non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 9(101), 37589–37607, doi: 10.18632/oncotarget.26428.
- Almodovar K, Iams WT, Meador CB, Zhao Z, et al. (2018). Longitudinal cell-free DNA analysis in patients with small cell lung cancer reveals dynamic insights into treatment efficacy and disease relapse. *J Thorac Oncol* 13(1), 112-123, doi: 10.1016/j.jtho.2017.09.1951.
- Anker P, Stroun M, Maurice PA. (1975). Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res.* 35(9), 2375-2382.
- Arko-Boham B, Aryee NA, Blay RM, Owusu EDA, et al. (2019). Circulating cell-free DNA integrity as a diagnostic and prognostic marker for breast and prostate cancers. *Cancer Genet* 235-236, 65-71.
- Arriola E, Paredes-Lario A, Garcia-Gomez R, Diz-Tain P, et al. (2018). Comparison of plasma ctDNA and tissue/cytology-based techniques for the detection of EGFR mutation status in advanced NSCLC: Spanish data subset from ASSESS. *Clin Transl Oncol* 20(10), 1261-1267.
- Atamaniuk J, Stuhlmeier KM, Vidotto C, Tschan H, et al. (2008). Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *Eur J Appl Physiol* 104(4), 711-717.
- Atamaniuk J, Vidotto C, Kinzlbauer M, Bachl N, et al. (2010). Cell-free plasma DNA and purine nucleotide degradation markers following weightlifting exercise. *Eur J Appl Physiol* 110(4), 695-701.
- Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, Bachl N, et al. (2004). Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem* 50(9), 1668-1670.
- Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. (2018). The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biol Rev Camb Philos Soc* 93(3), 1649-1683.
- Bai H, Mao L, Wang HS, Zhao J, et al. (2009). Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages IIIB to IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 27(16), 2653-2659.

- Bando H, Kagawa Y, Kato T, Akagi K, et al. (2019). A multicentre, prospective study of plasma circulating tumour DNA test for detecting RAS mutation in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 120(10), 982-986.
- Barlebo Ahlborn L, Ostrup O. (2019). Toward liquid biopsies in cancer treatment: application of circulating tumor DNA. *APMIS* 127(5), 329-336.
- Bartoloni E, Ludovini V, Alunno A, Pistola L, et al. (2011). Increased levels of circulating DNA in patients with systemic autoimmune diseases: A possible marker of disease activity in Sjögren's syndrome. *Lupus* 20(9), 928-935.
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, et al. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6(224), 224ra24, doi: 10.1126/scitranslmed.3007094.
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69(3), 89-95.
- Board RE, Williams VS, Knight L, Shaw J, et al. (2008). Isolation and extraction of circulating tumor DNA from patients with small cell lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1137, 98-107.
- Boffetta P, Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, et al. (1998). Multicenter case-control study of exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer in Europe. *J Natl Cancer Inst.* 90(19), 1440-1450.
- Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, et al. (2000). Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin Chem.* 46(8), 1078-1084.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, et al. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68(6), 394-424.
- Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. (2015). Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin Chim Acta* 450, 243-253.
- Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. (2019). The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif* 17, 100087, doi: 10.1016/j.bdq.2019.100087.
- Bronkhorst AJ, Ungerer V, Diehl F, Anker P, et al. (2020). Towards systematic nomenclature for cell-free DNA. *Hum Genet.* <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02227-2>
- Bruhn N, Beinert T, Oehm C, Jandrig B, et al. (2000). Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 906, 72-82.
- Buccheri G, Ferrigno D. (2004). Lung cancer: clinical presentation and specialist referral time. *Eur Respir J* 24(6), 898-904.
- Buettner R, Heydt C. (2013). [Biomarker analysis from a pathologist's view. Founding the rationale for personalised treatment of lung cancer]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 56(11), 1502-1508.

- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, et al. (1988). Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 8790-8794, doi: 10.1073/pnas.85.23.8790.
- Catarino R, Coelho A, Araujo A, Gomes M, et al. (2012). Circulating DNA: diagnostic tool and predictive marker for overall survival of NSCLC patients. *PLoS One* 7(6), e38559, doi: 10.1371/journal.pone.0038559.
- Chan BA, Hughes BG. (2015). Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Transl Lung Cancer Res* 4(1), 36-54.
- Chan KC, Leung SF, Yeung SW, Chan AT, et al. (2008). Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 14(13), 4141-4145.
- Chan KC, Yeung SW, Lui WB, Rainer TH, et al. (2005). Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem* 51(4), 781-784.
- Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, et al. (1996). Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med*. 2(9), 1033-1035. doi: 10.1038/nm0996-1033.
- Chen D, Pan S, Xie E, Gao L, et al. (2017). Development and evaluation of a Duplex Real-Time PCR assay with a novel internal standard for precise quantification of plasma DNA. *Ann Lab Med* 37(1), 18-27.
- Chen H, Sun LY, Zheng HQ, Zhang QF, et al. (2012). Total serum DNA and DNA integrity: diagnostic value in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Pathology* 44(4), 318-324.
- Chen H, Tu H, Meng Z Q, Chen Z, et al. (2010). K-ras mutational status predicts poor prognosis in unresectable pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 36(7), 657-662.
- Chen K, Zhang H, Zhang LN, Ju SQ, et al. (2013). Value of circulating cell-free DNA in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 19(20), 3143-3149.
- Cheng J, Holland-Letz T, Wallwiener M, Surowy H, et al. (2018). Circulating free DNA integrity and concentration as independent prognostic markers in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 169(1), 69-82.
- Chiu RW, Poon LL, Lau TK, Leung TN, et al. (2001). Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem*. 47(9), 1607-1613.
- Chudasama DY, Aladag Z, Felicien MI, Hall M, et al. (2018). Prognostic value of the DNA integrity index in patients with malignant lung tumors. *Oncotarget* 9(30), 21281-21288, doi: 10.18632/oncotarget.25086.
- Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, et al. (2011). Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst* 103(24), 1827-1839.
- Cuda G, Gallelli A, Nisticò A, Tassone P, et al. (2000). Detection of microsatellite instability and loss of heterozygosity in serum DNA of small and non-small cell lung cancer patients: a tool for early diagnosis? *Lung Cancer* 30(3), 211-214.
- Cui M, Fan M, Jing R, Wang H, et al. (2013). Cell-Free circulating DNA: a new biomarker for the acute coronary syndrome. *Cardiology* 124(2), 76-84.

- Daniotti M, Vallacchi V, Rivoltini L, Patuzzo R, et al. (2007). Detection of mutated BRAFV600E variant in circulating DNA of stage III-IV melanoma patients. *Int J Cancer* 120(11), 2439-2444.
- Day E, Dear PH, McCaughan F. (2013). Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine. *Methods* 59(1), 101-107.
- Diefenbach RJ, Lee JH, Kefford RF, Rizos H. (2018). Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA. *Cancer Genet* 228-229, doi: 10.1016/j.cancergen.2018.08.005.
- Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, et al. (2005). Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(45), 16368-16373.
- Diehl F, Li M, He Y, Kinzler KW, et al. (2006). BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods*. 3(7), 551-9. doi: 10.1038/nmeth898.
- Dietrich D, Hasinger O, Liebenberg V, Field JK, et al. (2012). DNA methylation of the homeobox genes PITX2 and SHOX2 predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients. *Diagn Mol Pathol*. 21(2), 93-104.
- Doll R, Hill BA. (1950). Smoking and carcinoma of the lung. *Br Med J*. 2, 739-748.
- Douillard JY, Osoros G, Cobo M, Ciuleanu T, et al. (2014). Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for getermination of EGFR status. *J Thorax Oncol* 9(9), 1345-1353, doi: 10.1097/JTO.0000000000000263.
- Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, et al. (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15), 8817-8822.
- Dwivedi DJ, Toltl LJ, Swystun LL, Pogue J, et al., Canadian Critical Care Translational Biology Group. (2012). Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Crit Care* 16(4), R151, doi: 10.1186/cc11466.
- El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. (2013). Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta* 424, 222-230.
- Ellinger J, Haan K, Heukamp LC, Kahl P, et al. (2008). CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer. *Prostate* 68(1), 42-49.
- Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, Fersching DM, et al. (2011). Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin Chim Acta* 412(23-24), 2085-2088.
- Fleischhacker M, Schmidt B. (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta* 1775(1), 181-232.
- Fleischhacker M, Schmidt B. (2018). Editorial for "Longitudinal cell-free DNA analysis in patients with small cell lung cancer reveals dynamic insights into treatment efficacy and disease relapse". *Transl Lung Cancer Res* 7(Suppl 4), S367-S369.
- Fleischhacker M, Schmidt B. (2020). Pre-analytical issues in liquid biopsy - where do we stand? *J Lab Med* 2020 44(3), 117-142.
- Fontana RS, Sanderson DR, Woolner LB, Taylor WF, et al. (1986). Lung cancer screening: the Mayo program. *J Occup Med*. 28(8), 746-750.

- Fournié GJ, Courtin JP, Laval F, Chalé JJ, et al. (1995). Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett* 91(2), 221-227.
- Frank MO. (2016). Circulating cell-free DNA differentiates severity of inflammation. *Biol Res Nurs* 18(5), 477-488.
- Gal S, Fidler C, Lo YM, Taylor M, et al. (2004). Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. *Br J Cancer* 90(6), 1211-1215.
- Gang F, Guorong L, An Z, Anne GP, et al. (2010). Prediction of clear cell renal cell carcinoma by integrity of cell-free DNA in serum. *Urology* 75(2), 262-265.
- Gao YJ, He YJ, Yang ZL, Shao HY, et al. (2010). Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. *Clin Chem Lab Med* 48(11), 1651-1656.
- Gauthier VJ, Tyler LN, Mannik M. (1996). Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice. *J Immunol.* 156(3), 1151-1156.
- Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, et al. (2004). Circulating deoxyribonucleic acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol* 22(20), 4157-4164.
- Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, et al. (1998) Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*, 17(1), 89-97.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6(10), 995-1001.
- Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, et al. (2017). Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 50(3), 302-314.
- Gormally E, Hainaut P, Caboux E, Airoidi L, et al. (2004). Amount of DNA in plasma and cancer risk: a prospective study. *Int J Cancer* 111(5), 746-749.
- Griffiths DJ. (2001). Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol.* 2(6) reviews1017.1-1017.5, doi: 10.1186/gb-2001-2-6-reviews1017.
- Guibert N, Pradines A, Casanova A, Farella M, et al. (2016). Detection and monitoring of the BRAF Mutation in circulating tumor cells and circulating tumor DNA in BRAF-mutated lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 11(9), e109-112, doi: 10.1016/j.jtho.2016.05.001.
- Ha TT, Huy NT, Murao LA, Lan NT, et al. (2011). Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. *PLoS One* 6(10), e25969, doi: 10.1371/journal.pone.0025969.
- Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. (2000). Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 260(2), 248-256.
- Hao TB, Shi W, Shen XJ, Qi J, et al. (2014). Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *Br J Cancer* 111(8), 1482-1489.

- Hashad D, Sorour A, Ghazal A, Talaat I. (2012). Free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *J Clin Lab Anal* 26(6), 467-472.
- Hassanein M, Callison JC, Callaway-Lane C, Aldrich MC, et al. (2012). The state of molecular biomarkers for the early detection of lung cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 5(8), 992-1006.
- Hatzakis KD, Froudarakis ME, Bouros D, Tzanakis N, et al. (2002). Prognostic value of serum tumor markers in patients with lung cancer. *Respiration* 69(1), 25-29.
- Hauser S, Kogej M, Fechner G, Von Ruecker A, et al. (2012). Cell-free serum DNA in patients with bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *Anticancer Res.* 32(8), 3119-3124.
- Hauser S, Zahalka T, Ellinger J, Fechner G, et al. (2010). Cell-free circulating DNA: Diagnostic value in patients with renal cell cancer. *Anticancer Res.* 30(7), 2785-2789.
- Hegmann KT, Fraser AM, Keaney RP, Moser SE, et al. (1993). The effect of age at smoking initiation on lung cancer risk. *Epidemiology* 4(5), 444-448.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(19), 986-994.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10(4), 413-417.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11(9), 1026-1030.
- Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, et al. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83(22), 8604-8610.
- Holdenrieder S, Burges A, Reich O, Spelsberg FW, et al. (2008). DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1137, 162-170.
- Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, et al. (2001). Circulating nucleosomes in serum. *Ann N Y Acad Sci.* 945, 93-102.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Sci U S A* 88(16), 7276-7280.
- Horeweg N, van der Aalst CM, Thunnissen E, Nackaerts K, et al. (2013). Characteristics of lung cancers detected by computer tomography screening in the randomized NELSON trial. *Am J Respir Crit Care Med* 187(8), 848-854.
- Huang A, Zhang X, Zhou SL, Cao Y, et al. (2016). Plasma circulating cell-free DNA integrity as a promising biomarker for diagnosis and surveillance in patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer* 7(13), 1798-1803.
- Huang ZH, Li LH, Hua D. (2006). Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. *Cancer Lett* 243(1), 64-70.
- Huang Z, Hua D, Hu Y, Cheng Z, et al. (2012). Quantitation of plasma circulating DNA using quantitative PCR for the detection of hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res* 18(2), 271-276.

- Hummel EM, Hesas E, Müller S, Beiter T, et al. (2018). Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. *Transl Psychiatry* 8(1), 236, doi: 10.1038/s41398-018-0264-x.
- Hyun MH, Lee ES, Eo JS, Kim S, et al. (2019). Clinical implications of circulating cell-free DNA quantification and metabolic tumor burden in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 134, 158-166.
- Hyun MH, Sung JS, Kang EJ, Choi YJ, et al. (2017). Quantification of circulating cell-free DNA to predict patient survival in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 8(55), 94417-94430.
- Infante M, Cavuto S, Lutman FR, Brambilla G, et al. (2009). A randomized study of lung cancer screening with spiral computed tomography: three-year results from the DANTE trial. *Am J Respir Crit Care Med* 180(5), 445-453.
- International Agency for Research on Cancer: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 83 Tobacco smoke and involuntary smoking. Lyon, France, 2004. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono83.pdf> (Abrufdatum 17.10.2021).
- International Association for the Study of Lung Cancer: NELSON study shows CT screening for nodule volume management reduces lung cancer mortality by 26 percent in men. Toronto, Canada, 2018. <https://www.iaslc.org/About-IASLC/News-Detail/nelson-study> (Abrufdatum 17.10.2021)
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, et al. (2001). DNA Fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Canc Res.* 61(4), 1659-1665.
- Jenkins S, Yang JC, Ramalingam SS, Yu K, et al. (2017). Plasma ctDNA Analysis for detection of the EGFR T790M mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 12(7), 1061-1070.
- Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. (2010). Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker--a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta* 411(21-22), 1611-1624.
- Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, et al (2003). Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem.* 49(6 Pt 1), 1028-1029.
- Jylhava J, Kotipelto T, Raitala A, Jylha M, et al. (2011). Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: the Vitality 90+ study. *Mech Ageing Dev* 132(1-2), 20-26.
- Kageyama SI, Nihei K, Karasawa K, Sawada T, et al. (2018). Radiotherapy increases plasma levels of tumoral cell-free DNA in non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget* 9(27), 19368-19378.
- Kamat AA, Baldwin M, Urbauer D, Dang D, et al. (2010). Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. *Cancer* 116(8), 1918-1925.
- Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, et al. (2000). Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 92(22), 1805-1811.

- Khani M, Hosseini J, Mirfakhraie R, Habibi M, et al. (2019). The value of the plasma circulating cell-free DNA concentration and integrity index as a clinical tool for prostate cancer diagnosis: a prospective case-control cohort study in an Iranian population. *Cancer Manag Res* 11, 4549-4556.
- Kim YM, Lee SW, Lee YJ, Lee HY, et al. (2019). Prospective study of the efficacy and utility of TP53 mutations in circulating tumor DNA as a non-invasive biomarker of treatment response monitoring in patients with high-grade serous ovarian carcinoma. *J Gynecol Oncol* 30(3), e32, doi: 10.3802/jgo.2019.30.e32.
- Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, Sone T, et al. (2007). Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer* 97(6), 778-784.
- Kohler C, Radpour R, Barekati Z, Asadollahi R, et al. (2009). Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer* 8, 105, doi: 10.1186/1476-4598-8-105.
- Koide K, Sekizawa A, Iwasaki M, Matsuoka R, et al. (2005). Fragmentation of cell-free fetal DNA in plasma and urine of pregnant women. *Prenat Diagn* 25(7), 604-607.
- Kraywinkel K, Schönfeld I. (2018). Epidemiologie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms in Deutschland. *Der Onkologe* 24(12), 946-951.
- Kumar S, Guleria R, Singh V, Bharti AC, et al. (2010). Plasma DNA level in predicting therapeutic efficacy in advanced nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 36(4), 885-892.
- Kunimasa K, Kato K, Imamura F, Kukita Y. (2019). Quantitative detection of ALK fusion breakpoints in plasma cell-free DNA from patients with non-small cell lung cancer using PCR-based target sequencing with a tiling primer set and two-step mapping/alignment. *PLoS One* 14(9), e0222233, doi: 10.1371/journal.pone.0222233.
- Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, Bryzgunova OE, et al. (2004). Cell-surface-bound nucleic acids: Free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients. *Ann N Y Acad Sci.* 1022, 221-227.
- Lam NY, Rainer TH, Chan LY, Joynt GM, et al. (2003). Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin Chem.* 49(8). 1286-1291.
- Lee LG, Connell CR, Bloch W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21(6). 3761-3766.
- Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. (2000). Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* 41(2), 276-282.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0, 2018, AWMF-Registernummer: 020/007OL, https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-007OL_1_S3_Lungenkarzinom_2018-03.pdf (Abrufdatum 17.10.2021).
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 37(3), 646-650.

- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, et al. (1998). Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *The Lancet* 352(9144), 1904-1905.
- Li BT, Drilon A, Johnson ML, Hsu M, et al. (2016). A prospective study of total plasma cell-free DNA as a predictive biomarker for response to systemic therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancers. *Ann Oncol* 27(1), 154-159.
- Li M, Jia Y, Xu J, Cheng X, et al. (2017). Assessment of the circulating cell-free DNA marker association with diagnosis and prognostic prediction in patients with lymphoma: a single-center experience. *Ann Hematol* 96(8), 1343-1351.
- Liang W, Zhao Y, Huang W, Liang H, et al. (2018). Liquid biopsy for early stage lung cancer. *J Thorac Dis* 10(Suppl 7), S876-S881.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, et al. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet* 350(9076), 485-487.
- Lo YM, Tein MS, Pang CC, Yeung CK, et al. (1998c). Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *The Lancet* 351(9112), 1329-1330.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, et al. (1998a). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 62(4), 768-775.
- Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, et al. (1998b). Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med*. 339(24), 1734-1738.
- Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, et al. (1999b). Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem*. 45(2), 184-188.
- Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, et al. (2000). Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem*. 46(3), 319-323.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, et al. (1999a). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*. 64(1), 218-224.
- Lou-Qian Z, Rong Y, Ming L, Xin Y, et al. (2013). The prognostic value of epigenetic silencing of p16 gene in NSCLC patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 8(1), e54970, doi: 10.1371/journal.pone.0054970.
- Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, et al. (2002). Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*. 48(3), 421-427.
- Ma L, Du J, Sui Y, Wang S. (2019). Clinical significance of plasma free DNA in patients with non-small cell lung cancer. *J Int Med Res* 47(11), 5593-5600.
- Madic J, Kiialainen A, Bidard F C, Birzele F, et al. (2015). Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients. *Int J Cancer* 136(9), 2158-2165.
- Madsen AT, Hojbjerg JA, Sorensen BS, Winther-Larsen A. (2019). Day-to-day and within-day biological variation of cell-free DNA. *EBioMedicine* 49, 284-290.
- Mandel P, Métais P. (1948). Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *C R Seances Soc Biol Fil*. 142, 241-243.

- Markus H, Contente-Cuomo T, Farooq M, Liang WS, et al. (2018). Evaluation of pre-analytical factors affecting plasma DNA analysis. *Sci Rep* 8(1), 7375, doi: 10.1038/s41598-018-25810-0.
- Mas L, Bachet JB, Taly V, Bouche O, et al. (2019). BRAF mutation status in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: Extended mutation analysis from the AGEO RASANC study. *Cancers (Basel)* 11(7), E998, doi: 10.3390/cancers11070998.
- Mayrhofer M, De Laere B, Whittington T, Van Oyen P, et al. (2018). Cell-free DNA profiling of metastatic prostate cancer reveals microsatellite instability, structural rearrangements and clonal hematopoiesis. *Genome Med* 10(1), 85, doi: 10.1186/s13073-018-0595-5.
- Mazières J, Zalcman G, Crino L, Biondani P, et al. (2015). Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *J Clin Oncol* 33(9), 992-999.
- Mehrotra M, Singh RR, Chen W, Huang RSP, et al. (2017). Study of preanalytic and analytic variables for clinical next-generation sequencing of circulating cell-free nucleic acid. *J Mol Diagn* 19(4), 514-524.
- Melamed MR, Flehinger BJ, Zaman MB, Heelan RT, et al. (1984). Screening for early lung cancer. Results of the Memorial Sloan-Kettering study in New York. *Chest* 86(1), 44-53.
- Mirtavoos-Mahyari H, Ghafouri-Fard S, Khosravi A, Motevaseli E, et al. (2019). Circulating free DNA concentration as a marker of disease recurrence and metastatic potential in lung cancer. *Clin Transl Med* 8(1), 14, doi: 10.1186/s40169-019-0229-6.
- Mohan S, Foy V, Ayub M, Leong HS, et al. (2019). Profiling of circulating free DNA using targeted and genome wide sequencing in patients with Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. doi: 10.1016/j.jtho.2019.10.007.
- Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, et al. (2017). Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer. *N Engl J Med* 376(7), 629-640.
- Molina-Vila MA, Mayo-de-Las-Casas C, Gimenez-Capitan A, Jordana-Ariza N, et al. (2016). Liquid Biopsy in non-small cell lung cancer. *Front Med (Lausanne)* 3, 69, doi: 10.3389/fmed.2016.00069.
- Morbelli S, Alama A, Ferrarazzo G, Coco S, et al. (2017). Circulating tumor DNA reflects tumor metabolism rather than tumor burden in chemotherapy-naive patients with advanced non-small cell lung cancer: ¹⁸F-FDG PET/CT Study. *J Nucl Med* 58(11), 1764-1769.
- Morikawa A, Hayashi T, Shimizu N, Kobayashi M, et al. (2018). PIK3CA and KRAS mutations in cell free circulating DNA are useful markers for monitoring ovarian clear cell carcinoma. *Oncotarget* 9(20), 15266-15274.
- Moyer VA; U.S Preventive Services Task Force. (2014). Screening for lung cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 160(5), 330-338.
- Müller HM, Widschwendter A, Fiegl H, Ivarsson L, et al. (2003). DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res*. 63(22), 7641-7651.
- Müller I, Beeger C, Alix-Panabieres C, Rebillard X, et al. (2008). Identification of loss of heterozygosity on circulating free DNA in peripheral blood of prostate cancer patients: potential and technical improvements. *Clin Chem* 54(4), 688-696.

- Nagata S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256(1), 12-18.
- Nakayama H, Hibi K, Taguchi M, Takase T, et al A. (2002). Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Lett.* 188(1-2), 115-119.
- Nakayama T, Taback B, Nguyen DH, Chi DD, et al. (2000). Clinical significance of circulating DNA microsatellite markers in plasma of melanoma patients. *Ann N Y Acad Sci.* 906, 87-98.
- National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, Berg CD, et al. (2011). Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med* 365(5), 395-409.
- Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, et al. (1996) Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 2(9), 1035–37. <https://doi.org/10.1038/nm0996-1035>
- Nygaard AD, Holdgaard PC, Spindler KL, Pallisgaard N, et al. (2014). The correlation between cell-free DNA and tumour burden was estimated by PET/CT in patients with advanced NSCLC. *Br J Cancer* 110(2), 363-368.
- O’Connell C, O’Brien S, Nash WG, Cohen M. (1984). ERV3, a full-length human endogenous provirus: chromosomal localization and evolutionary relationships. *Virology* 138(2), 225-235.
- Oken MM, Hocking WG, Kvale PA, Andriole GL, et al. (2011). Screening by chest radiograph and lung cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) randomized trial. *JAMA* 306(17), 1865-1873.
- Ørntoft MW, Jensen SØ, Øgaard N, Henriksen TV, et al. (2021). Age-stratified reference intervals unlock the clinical potential of circulating cell-free DNA as a biomarker of poor outcome for healthy individuals and patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 148(7), 1665-1675. doi: 10.1002/ijc.33434.
- Paci M, Maramotti S, Bellesia E, Formisano D, et al. (2009). Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 64(1), 92-97.
- Pan S, Xia W, Ding Q, Shu Y, et al. (2012). Can plasma DNA monitoring be employed in personalized chemotherapy for patients with advanced lung cancer? *Biomed Pharmacother* 66(2), 131-137.
- Pawelcz CP, Sacher AG, Raymond C K, Alden RS, et al. (2016). Bias-corrected targeted Next-Generation Sequencing for rapid, multiplexed detection of actionable alterations in cell-free DNA from advanced lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 22(4), 915-922.
- Perets R, Greenberg O, Shentzer T, Semenisty V, et al. (2018). Mutant KRAS Circulating Tumor DNA Is an Accurate Tool for Pancreatic Cancer Monitoring. *Oncologist* 23(5), 566-572.
- Piciocchi M, Cardin R, Vitale A, Vanin V, et al. (2013). Circulating free DNA in the progression of liver damage to hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* 7(4), 1050-1057.
- Pimson C, Ekalaksananan T, Pientong C, Promthet S, et al. (2016). Aberrant methylation of PCDH10 and RASSF1A genes in blood samples for non-invasive diagnosis and prognostic assessment of gastric cancer. *PeerJ* 4, e2112, doi: 10.7717/peerj.2112.
- Pinzani P, Salvianti F, Zaccara S, Massi D, et al. (2011). Circulating cell-free DNA in plasma of melanoma patients: qualitative and quantitative considerations. *Clin Chim Acta* 412(23-24), 2141-2145.

- Pinzani P, Salvianti F, Orlando C, Pazzagli M. (2014). Circulating cell-free DNA in cancer. *Methods Mol Biol.* 1160, 133-145. doi: 10.1007/978-1-4939-0733-5_13.
- Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, et al. (2017). Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 18(10), 1307-1316.
- Qi J, Qian C, Shi W, Wu X, et al. (2013). Alu-based cell-free DNA: a potential complementary biomarker for diagnosis of colorectal cancer. *Clin Biochem* 46(1-2), 64-69.
- Rainer TH, Wong LK, Lam W, Yuen E, et al. (2003). Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem* 49(4), 562-569.
- Ramachandran K, Speer CG, Fiddy S, Reis IM, et al. (2013). Free circulating DNA as a biomarker of prostate cancer: comparison of quantitation methods. *Anticancer Res.* 33(10), 4521-4529.
- Rami-Porter R: IASLC Staging handbook in thoracic oncology, 2nd Edition, 2016. https://s3.us-east-1.amazonaws.com/fonteva-customer-media/00D3i00000D3mbEAC/qpDjqzbp_8th_staging_manual_2016_hi_res_pdf (Abrufdatum 22.08.2021).
- Reck M, Hagiwara K, Han B, Tjulandin S, et al. (2016). ctDNA Determination of EGFR Mutation Status in European and Japanese Patients with Advanced NSCLC: The ASSESS Study. *J Thorac Oncol* 11(10), 1682-1689.
- Ren N, Ye QH, Qin LX, Zhang BH, et al. (2006). Circulating DNA level is negatively associated with the long-term survival of hepatocellular carcinoma patients. *World J Gastroenterol.* 12(24), 3911-3914.
- Rhodes A, Wort SJ, Thomas H, Collinson P, et al. (2006). Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit Care* 10(2), R60, doi: 10.1186/cc4894.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.): Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe, Berlin, 2019, S. 16-63.
- Rodriguez BJ, Cordoba GD, Aranda AG, Alvarez M, et al. (2019). Detection of TP53 and PIK3CA mutations in circulating tumor DNA using Next-Generation Sequencing in the screening process for early breast cancer diagnosis. *J Clin Med* 8(8), E1183, doi: 10.3390/jcm8081183.
- Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg S E, Alden RS, et al. (2016). Prospective validation of rapid plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer. *JAMA Oncol* 2(8), 1014-1022.
- Saghir Z, Dirksen A, Ashraf H, Bach KS, et al. (2012). CT screening for lung cancer brings forward early disease. The randomised Danish Lung Cancer Screening Trial: status after five annual screening rounds with low-dose CT. *Thorax* 67(4), 296-301.
- Santarpia M, Liguori A, D'Aveni A, Karachaliou N, et al. (2018). Liquid biopsy for lung cancer early detection. *J Thorac Dis* 10(Suppl 7), S882-S897.

- Sato A, Nakashima C, Abe T, Kato J, et al. (2018). Investigation of appropriate pre-analytical procedure for circulating free DNA from liquid biopsy. *Oncotarget* 9(61), 31904-31914. doi: 10.18632/oncotarget.25881.
- Schmidt B, Reinicke D, Reindl I, Bork I, et al. (2017). Liquid biopsy - Performance of the PAXgene(R) Blood ccfDNA Tubes for the isolation and characterization of cell-free plasma DNA from tumor patients. *Clin Chim Acta* 469, 94-98.
- Schmidt B, Weickmann S, Witt C, Fleischhacker M. (2005). Improved method for isolating cell-free DNA. *Clin Chem*. 51(8), 1561-1563.
- Schmidt B, Weickmann S, Witt C, Fleischhacker M. (2008). Integrity of cell-free plasma DNA in patients with lung cancer and nonmalignant lung disease. *Ann N Y Acad Sci* 1137, 207-213.
- Schou JV, Larsen FO, Sorensen BS, Abrantes R, et al. (2018). Circulating cell-free DNA as predictor of treatment failure after neoadjuvant chemo-radiotherapy before surgery in patients with locally advanced rectal cancer. *Ann Oncol* 29(3), 610-615.
- Schütz E, Fischer A, Beck J, Harden M, et al. (2017). Graft-derived cell-free DNA, a noninvasive early rejection and graft damage marker in liver transplantation: A prospective, observational, multicenter cohort study. *PLoS Med* 14(4), e1002286, doi: 10.1371/journal.pmed.1002286.
- Schwarzenbach H, Eichelsler C, Kropidowski J, Janni W, et al. (2012). Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 18(20), 5719-5730.
- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11(6), 426-437.
- Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. (1983). Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 51(11), 2116-2120.
- Silva JM, Dominguez G, Villanueva MJ, Gonzalez R, et al. (1999). Aberrant DNA methylation of the p16^{INK4a} gene in plasma DNA of breast cancer patients. *Br J Cancer* 80(8), 1262-1264.
- Simonato L, Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, et al. (2001). Lung cancer and cigarette smoking in Europe: an update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity. *Int. J. Cancer* 91(6), 876-887.
- Sirera R, Bremnes RM, Cabrera A, Jantus-Lewintre E, et al. (2011). Circulating DNA is a useful prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 6(2), 286-290.
- Skrypkina I, Tsyba L, Onyshchenko K, Morderer D, et al. (2016). Concentration and methylation of cell-free DNA from blood plasma as diagnostic markers of renal Cancer. *Dis Markers* 2016, 3693096, doi:10.1155/2016/3693096.
- Skvortsova TE, Rykova EY, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, et al. (2006). Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br J Cancer* 94(10), 1492-1495.
- Soliman SE, Alhanafy AM, Habib MSE, Hagag M, et al. (2018). Serum circulating cell free DNA as potential diagnostic and prognostic biomarker in non small cell lung cancer. *Biochem Biophys Rep* 15, 45-51.

- Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu Y L, et al. (2014). First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 371(23), 2167-2177.
- Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Roeyen G, et al. (2017). A comparison of cell-free DNA isolation kits: isolation and quantification of cell-free DNA in Plasma. *J Mol Diagn* 19(1), 162-168.
- Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, et al. (1994). Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 3(1), 67-71.
- Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, et al. (2001). Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res.* 61(12), 4675-4678.
- Sozzi G, Roz L, Conte D, Mariani L, et al. (2005). Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. *J Natl Cancer Inst* 97(24), 1848-1850.
- Spiro SG, Gould MK, Colice GL; American College of Chest Physicians. (2007). Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 132(3 Suppl), 149S-160S.
- Sriram KB, Relan V, Clarke BE, Duhig EE, et al. (2012). Pleural fluid cell-free DNA integrity index to identify cytologically negative malignant pleural effusions including mesotheliomas. *BMC Cancer* 12, 428, doi: 10.1186/1471-2407-12-428.
- Srivastava S, Gopal-Srivastava R. (2002). Biomarkers in cancer screening: A public health perspective. *J Nutr.* 132(8 Suppl), 2471S-2475S.
- Stötzer OJ, Lehner J, Fersching-Gierlich D, Nagel D, et al. (2014). Diagnostic relevance of plasma DNA and DNA integrity for breast cancer. *Tumour Biol* 35(2), 1183-1191.
- Stroun M, Anker P, Gahan P, Henri J. (1977). Spontaneous release of newly synthesized DNA from frog auricles. *Archives des sciences* 30(2), 229-241.
- Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, et al. (1987). Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 23(6), 707-712.
- Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, et al. (1989). Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46(5), 318-322.
- Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, et al. (2001) About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 313(1-2), 139-142.
- Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y. (2008). Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta* 387(1-2), 55-58.
- Swinkels DW, Wiegerinck E, Steegers EA, de Kok JB. (2003). Effects of blood-processing protocols on cell-free DNA quantification in plasma. *Clin Chem.* 49(3), 525-526.

- Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, Kupis W, et al. (2015). Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. *Br J Cancer* 113(3), 476-483.
- Szpechcinski A, Rudzinski P, Kupis W, Langfort R, et al. (2016). Plasma cell-free DNA levels and integrity in patients with chest radiological findings: NSCLC versus benign lung nodules. *Cancer Lett* 374(2), 202-207.
- Szpechcinski A, Struniawska R, Zaleska J, Chabowski M, et al. (2008). Evaluation of fluorescence-based methods for total vs. amplifiable DNA quantification in plasma of lung cancer patients. *J Physiol Pharmacol.* 59 (Suppl 6), 675-681.
- Takeda K, Yamada T, Takahashi G, Iwai T, et al. (2019). Analysis of colorectal cancer-related mutations by liquid biopsy: Utility of circulating cell-free DNA and circulating tumor cells. *Cancer Sci* 110(11), 3497-3509.
- Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, et al. (2006). Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Ann N Y Acad Sci* 1075, 191-196.
- Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. (1966). Desoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 45(11), 1732-1740.
- Tang H, Kong Y, Si L, Cui C, et al. (2018a). Clinical significance of BRAF(V600E) mutation in circulating tumor DNA in Chinese patients with melanoma. *Oncol Lett* 15(2), 1839-1844.
- Tang Z, Li L, Shen L, Shen X, et al. (2018b). Diagnostic value of serum concentration and integrity of circulating cell-free DNA in breast Cancer: A comparative study with CEA and CA15-3. *Lab Med* 49(4), 323-328.
- Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, et al. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 24(6), 766-769.
- Thakur S, Tobey A, Daley B, Auh S, et al. (2019). Limited utility of circulating cell-free DNA Integrity as a diagnostic tool for differentiating between malignant and benign thyroid nodules with indeterminate cytology (Bethesda Category III). *Front Oncol* 9, 905, doi: 10.3389/fonc.2019.00905.
- Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, et al. (2016). Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* 35(3), 347-376.
- Thierry AR, Moulière F, El Messaoudi S, Mollevi C, et al. (2014). Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 20(4), 430-435.
- Tissot C, Toffart AC, Villar S, Souquet PJ, et al. (2015). Circulating free DNA concentration is an independent prognostic biomarker in lung cancer. *Eur Respir J* 46(6), 1773-1780.
- Toro PV, Erlanger B, Beaver JA, Cochran RL, et al. (2015). Comparison of cell stabilizing blood collection tubes for circulating plasma tumor DNA. *Clin Biochem* 48(15), 993-998.
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, et al, WHO Panel. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 10(9), 1243-1260.

- Treger TD, Chagtai T, Butcher R, Cresswell GD, et al. (2018). Somatic TP53 mutations are detectable in circulating tumor DNA from children with anaplastic wilms tumors. *Transl Oncol* 11(6), 1301-1306.
- Trigg RM, Martinson LJ, Parpart-Li S, Shaw JA. (2018). Factors that influence quality and yield of circulating-free DNA: A systematic review of the methodology literature. *Heliyon* 4(7), e00699, doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00699.
- Tug S, Mehdorn M, Helmig S, Breitbach S, et al. (2017). Exploring the potential of cell-free-DNA measurements after an exhaustive cycle-ergometer test as a marker for performance-related parameters. *Int J Sports Physiol Perform* 12(5), 597-604.
- Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, et al. (2006a). Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol* 24(26), 4270-4276.
- Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, et al. (2006b). Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 52(6), 1062-1069.
- Vajpeyee A, Wijatmiko T, Vajpeyee M, Taywade O. (2018). Cell free DNA: A novel predictor of neurological outcome after intravenous thrombolysis and/or mechanical thrombectomy in acute ischemic stroke patients. *Neurointervention* 13(1), 13-19.
- van der Drift MA, Hol BE, Klaassen CH, Prinsen CF, et al. (2010). Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 68(2), 283-287.
- van der Meer AJ, Kroeze A, Hoogendijk AJ, Soussan AA, et al. (2019). Systemic inflammation induces release of cell-free DNA from hematopoietic and parenchymal cells in mice and humans. *Blood Adv* 3(5), 724-728.
- Vargas AJ, Harris CC. (2016). Biomarker development in the precision medicine era: lung cancer as a case study. *Nat Rev Cancer* 16(8), 525-537.
- Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, et al. (2003). Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* 63(14), 3966-3968.
- Wang BH, Li YY, Han JZ, Zhou LY, et al. (2017). Gene methylation as a powerful biomarker für detection and screening of non-small cell lung cancer in blood. *Oncotarget* 8(19), 31692-31704.
- Wang J, Wang B, Chen X, Bi J. (2011). The prognostic value of RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Carcinogenesis* 32(3), 411-416.
- Wang Y, Tian PW, Wang WY, Wang K, et al. (2016). Noninvasive genotyping and monitoring of anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearranged non-small cell lung cancer by capture-based next-generation sequencing. *Oncotarget* 7(40), 65208-65217.
- Wei L, Wu W, Han L, Yu W, et al. (2018). A quantitative analysis of the potential biomarkers of non-small cell lung cancer by circulating cell-free DNA. *Oncol Lett* 16(4), 4353-4360.
- Wender R, Fontham ET, Barrera E, Jr., Colditz GA, et al. (2013). American Cancer Society lung cancer screening guidelines. *CA Cancer J Clin* 63(2), 107-117.

- Weng JL, Atyah M, Zhou CH, Ren N. (2019). Progress in quantitative technique of circulating cell free DNA and its role in cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Genet* 239, 75-84.
- Wittekind C: TNM Klassifikation maligner Tumoren. 8. Auflage Wiley-VCH, Weinheim, 2017, S. 141-156.
- Wong IH, Lo YM, Zhang J, Liew CT, et al. (1999). Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res.* 59(1), 71-73.
- Wu J, Tang W, Huang L, Hou N, et al. (2019). The analysis of cell-free DNA concentrations and integrity in serum of initial and treated of lymphoma patients. *Clin Biochem* 63, 59-65.
- Wu YL, Saijo N, Thongprasert S, Yang JC, et al. (2017). Efficacy according to blind independent central review: Post-hoc analyses from the phase III, randomized, multicenter, IPASS study of first-line gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in Asian patients with EGFR mutation-positive advanced NSCLC. *Lung Cancer* 104, 119-125.
- Wu Y-L, Zhou C, Hu C-P, Feng J, et al. (2014). Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 15(2), 213-222.
- Xue X, Teare MD, Hoken I, Zhu YM, et al. (2009). Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta* 404(2), 100-104.
- Yang Y, Shen X, Li R, Shen J, et al. (2017). The detection and significance of EGFR and BRAF in cell-free DNA of peripheral blood in NSCLC. *Oncotarget* 8(30), 48773-49782.
- Yao W, Mei C, Nan X, Hui L. (2016). Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. *Gene* 590(1), 142-148.
- Ye Y, Luo Z, Shi D. (2019). Use of cell free DNA as a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer patients with bone metastasis. *Int J Biol Markers.* 34(4), 381-388.
- Yi J, Zhang Y, Zhang Y, Ma Y, et al. (2014). Increased plasma cell-free DNA level during HTNV infection: correlation with disease severity and virus load. *Viruses* 6(7), 2723-2734.
- Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima C S, et al. (2013). Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res* 19(8), 2240-2247.
- Yu J, Gu G, Ju S. (2014). Recent advances in clinical applications of circulating cell-free DNA integrity. *Lab Med* 45(1), 6-11.
- Zhang S, Lu X, Shu X, Tian X, et al. (2014). Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus. *Intern Med* 53(24), 2763-2771.
- Zhang Y, Wang R, Song H, Huang G, et al. (2011). Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 303(1), 21-28.
- Zhong XY, Hahn S, Kiefer V, Holzgreve W. (2007). Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with gender, age and frequency of blood donations? *Ann Hematol* 86(2), 139-143.

Zitt M, Müller HM, Rochel M, Schwendinger V, et al. (2008). Circulating cell-free DNA in plasma of locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative chemoradiation: a potential diagnostic tool for therapy monitoring. *Dis Markers* 25(3), 159-165.

8 Thesen

1. Eine ununterbrochene Lagerung von zellfreien Plasmaproben bei -80°C ermöglicht die Isolation von genügend cfDNA für eine Analyse mittels Real-Time-PCR.
2. Mithilfe einer quantitativen Real-Time PCR kann die cfDNA-Konzentration von 3 unterschiedlich langen ERV3-Fragmenten in Plasmaproben bestimmt werden.
3. Die cfDNA-Konzentration von Lungenkrebspatienten ist höher als die von Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung.
4. Die cfDNA-Integrität von Lungenkrebspatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander.
5. Die cfDNA-Konzentration bei malignen und benignen Lungenkranken ist unabhängig von Alter, Geschlecht oder Raucherstatus.
6. Die cfDNA-Integrität bei malignen und benignen Lungenkranken ist unabhängig von Alter, Geschlecht oder Raucherstatus.
7. Die cfDNA-Konzentration eignet sich nicht als diagnostischer Biomarker zur Differenzierung von unbehandelten Lungenkrebspatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung.
8. Die cfDNA-Integrität eignet sich nicht als diagnostischer Biomarker zur Differenzierung von therapienaiven Lungenkrebspatienten und Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung.
9. Die cfDNA-Konzentration und -Integrität von Lungenkarzinompatienten unterscheiden sich nicht von denen anderer Tumorpatienten.

Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbstständigkeitserklärung

1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum

Julia Wagner

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernd Schmidt bedanken, der mir das Thema dieser Arbeit überlassen und den gesamten Prozess der Erstellung dieser Dissertation begleitet hat. Ein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. rer. nat. Michael Fleischhacker, der mir jederzeit sowohl bei der Durchführung des experimentellen Teils als auch bei der anschließenden Erstellung der Arbeit beratend und unterstützend zur Seite stand.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Kollegen des pneumologischen Forschungslabors des Universitätsklinikums Halle (Saale) bedanken. Mein besonderer Dank gilt hierbei vor allem Dana Reinicke, die mich mit Rat und Tat bei allen Arbeiten im Labor unterstützt hat.

Außerdem möchte ich Frau Behl aus dem Studienzentrum des Universitätsklinikums Halle (Saale) und Herrn Prof. Dr. Wienke aus dem Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Universität Halle-Wittenberg meinen Dank aussprechen, die mich bei der statistischen Auswertung dieser Dissertation begleitet und beraten haben.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mit viel Geduld und hartnäckiger Motivation zum Abschluss dieser Arbeit geführt haben.