

Medizinische Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Molekulargenetische Untersuchung von zirkulierenden Tumorzellen bei
Lungenkrebspatienten

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

von Lisa Viktoria Keydel
geboren am 16.03.1994 in Halle (Saale)

Betreuer: Prof. Dr. Bernd Schmidt, Dr. rer. nat. Michael Fleischhacker
Gutachter: Prof. P. Michl
Prof. S. Holdenrieder, München

14.09.2021

02.05.2022

Für meine liebe Familie

Referat

Hintergrund und Zielsetzung: Die Analyse von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) aus dem Blut von Lungenkrebspatienten könnte eine supplementäre Plattform zu herkömmlichen invasiven Biopsien bieten. Ihre minimal-invasive Gewinnung macht mehrmalige Entnahmen möglich, ein Monitoring des genomischen Tumorprofils könnte damit realisierbar sein. Da jedoch trotz intensiver Forschung der Fortschritt bis heute aufgrund technischer Schwierigkeiten, von der Gewinnung bis hin zur molekularen Analyse, limitiert blieb, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Kombination aus *in-vivo*-Isolierung der CTCs mit dem CellCollector®, Detektion durch immunzytochemische Färbung sowie nachfolgender qPCR/HRMA- bzw. *Mikroarray*-Analyse zur Detektion von Mutationen in CTCs geeignet ist.

Material und Methoden: Insgesamt standen 32 Proben zur Verfügung, welche von NSCLC- sowie SCLC-Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium stammten. Das KRAS-Gen wurde als *proof-of-concept*-Modell ausgewählt. Eine zuvor durchgeführte *Multiple Displacement Amplification* (MDA) diente durch ungezielte Gesamtgenomamplifikation der Erhöhung der Matrizen-DNA. Mithilfe von Vorversuchsreihen wurde die Sensitivität sowie Spezifität des qPCR/HRMA-Assay überprüft. Auch *Spiking*-Experimente dienten der Etablierung der Methodik. Als Vergleichs-Assay diente das kommerziell erhältliche *Mikroarray-Kit* des Herstellers CHIPRON.

Ergebnisse: Der qPCR/HRMA-Assay erzielte in durchgeführten Vorversuchen mit der Detektion von 0,1 - 1 % mutierte DNA in einem Wildtyp-Hintergrund eine sehr hohe Sensitivität, auch eine hohe Spezifität konnte verzeichnet werden. Erfolgreich durchgeführte *Spiking*-Experimente demonstrierten die mögliche Kombination der Methoden. In den anschließend untersuchten Patientenproben ließ sich jedoch mithilfe des qPCR/HRMA-Assay keine Mutation detektieren. In der *Mikroarray*-Analyse ließ sich eine KRAS-G12D-Mutation detektieren. Ein falsch-positives Resultat ist jedoch nicht auszuschließen.

Schlussfolgerungen: Die in dieser Arbeit erprobte Kombination aus den Methoden CTC-Isolierung mit dem CellCollector®, immunzytochemische Detektion sowie nachfolgender qPCR/HRMA- bzw. *Mikroarray*-Analyse ist eher ungeeignet zur molekulargenetischen Charakterisierung von CTCs in Lungenkrebspatienten. Der CellCollector® ist jedoch durch seine Möglichkeit zur *in-vivo*-Applikation vielversprechend. Eine höhere Ausbeute an CTCs könnte durch Kombination epithelialer und mesenchymaler Marker erreicht werden. Um das Potenzial der "*Liquid Biopsy*" maximal auszuschöpfen, ist neben der Analyse von CTCs eine komplementäre Betrachtung von cfDNA sinnvoll.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	LUNGENKARZINOM	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2	Histopathologische Klassifikation	2
1.1.3	Klinik und Diagnose.....	3
1.1.4	Therapeutische Möglichkeiten und Prognose	4
1.2	ZIRKULIERENDE TUMORZELLEN (CTCs)	6
1.2.1	CTCs fungieren als 'Vektoren' in der metastatischen Kaskade	6
1.2.2	CTCs - Charakteristika	7
1.2.3	Methoden zur Isolierung und Detektion von CTCs	8
1.2.4	Potenzielle Anwendungsgebiete von CTCs im Lungenkarzinom.....	10
1.3	DAS PROTOONKOGEN KRAS	12
1.3.1	Bedeutung und Funktion.....	12
1.3.2	Die Bedeutung von KRAS-Mutationen im Lungenkarzinom	13
2.	ZIELSTELLUNG.....	15
3.	MATERIAL UND METHODIK.....	16
3.1	MATERIAL	16
3.1.1	Zelllinien.....	16
3.1.2	Zellkulturmedien und Zusätze	17
3.1.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien	17
3.1.4	Chemikalien und Reagenzien.....	18
3.1.5	Kits	19
3.1.6	Antikörper	19
3.1.7	Puffer und Lösungen	19
3.1.8	Software.....	19
3.1.9	Proben.....	20
3.2	METHODIK.....	21
3.2.1	<i>Multiple Displacement Amplification (MDA)</i>	22
3.2.2	<i>Mikroarray-Analyse</i>	22
3.2.3	Allelspezifische Realtime-Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	24
3.2.4	<i>High resolution melting analysis (HRMA)</i>	26
3.2.5	Verdünnungsreihen zur Sensitivitätsanalyse und Leistungsbeurteilung des qPCR/HRMA-Assays	27
3.2.6	Spezifitätsanalyse des qPCR/HRMA-Assays.....	28

3.2.7	<i>Spiking</i> -Experimente ohne CellCollector®	28
3.2.8	<i>Spiking</i> -Experimente mit dem CellCollector®	28
3.2.9	Zellkultivierung	29
3.2.10	Zellzahlbestimmung	30
3.2.11	Kryokonservierung	30
3.2.12	DNA-Isolierung	30
3.2.13	FACS	31
3.2.14	Immunfluoreszenzmikroskopie	31
4.	ERGEBNISSE	33
4.1	OPTIMIERUNG DER <i>MIKROARRAY</i> -ANALYSEN	33
4.1.1	Einsatz unterschiedlicher DNA-Mengen	33
4.1.2	Einsatz unterschiedlicher Wildtypblocker-Konzentrationen	33
4.2	EVALUIERUNG UND OPTIMIERUNG DES qPCR/HRMA-ASSAYS	34
4.2.1	Sensitivitätsanalyse mittels Standardverdünnungsreihen	34
4.2.2	Leistungsbeurteilung der qPCR	36
4.2.3	Beurteilung der Spezifität	37
4.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR EPCAM-EXPRESSION DER VERWENDETEN ZELLINIEN	39
4.3.1	Ergebnisse der FACS-Analysen	39
4.3.2	Ergebnisse der Immunzytochemischen Färbung	41
4.4	<i>SPIKING</i> -EXPERIMENTE	43
4.4.1	Ergebnisse der <i>Spiking</i> -Experimente ohne CellCollector®	43
4.4.2	Ergebnisse der <i>Spiking</i> -Experimente mit dem CellCollector® in Blut	45
4.4.3	Ergebnisse der <i>Spiking</i> -Experimente mit dem CellCollector® in Medium	46
4.5	PATIENTENPROBEN	47
4.6	KRAS-MUTATIONSANALYSEN DER PATIENTENPROBEN	48
4.6.1	Ergebnisse der <i>Mikroarray</i> -Analyse	48
4.6.2	Ergebnisse des qPCR/HRMA-Assays	51
5.	DISKUSSION	54
5.1	DER CELLCOLLECTOR® ALS CTC-ISOLATIONSMETHODE	54
5.2	VORVERSUCHE DES qPCR/HRMA-ASSAYS	57
5.2.1	Beurteilung der Sensitivität und Spezifität	58
5.2.2	Beurteilung der <i>Spiking</i> -Experimente mit dem CellCollector®	59
5.3	KRAS-MUTATIONSANALYSEN DER PATIENTENPROBEN	60
5.4	PRÄANALYTISCHE EINFLUSSFAKTOREN	62
5.5	LIMITATIONEN DER STUDIE	63
5.6	CTC- UND cfDNA-ANALYSE IM VERGLEICH	64

6.	ZUSAMMENFASSUNG	66
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	68
8.	THESEN.....	79
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	VI
	ERKLÄRUNG ZUM WAHRHEITSGEHALT DER ANGABEN	VII
	ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE	VIII
	DANKSAGUNG	IX

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

BSA	Bovines Serumalbumin
cfDNA	zirkulierende freie DNA
Ct	cycle threshold
CTCs	zirkulierende Tumorzellen
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destilliert
DLB	direkter Lyse-Puffer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRMA	High resolution melting analysis, engl. für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse
(k)bp	(Kilo)basenpaare
MDA	Multiple Displacement Amplification
MET	Mesenchymale-Epitheliale-Transition
min	Minuten
MUT	Mutiert
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NTC	No template Control
OS	Gesamtüberleben
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PFS	progressionsfreies Überleben
qPCR	Realtime-Polymerasekettenreaktion

R ²	Bestimmtheitsmaß
SCLC.....	kleinzelliges Lungenkarzinom
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Trimethamin-Puffer
WBC.....	white blood cells, engl. für Leukozyten
WGA.....	whole genome amplification, engl. für Gesamtgenom-Amplifikation
WT.....	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Lungenkarzinom

2,2 Millionen Menschen weltweit erkrankten im Jahr 2017 an Lungenkrebs. 1,2 Millionen Menschen erlagen ihrem Lungenkrebsleiden (Fitzmaurice, Abate et al. 2019)

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Lungenkrebs ist nach dem nicht-melanotischen Hautkrebs die zweithäufigste Krebserkrankung weltweit. Betrachtet man die Todesfälle, ist Lungenkrebs sogar führend (Fitzmaurice, Abate et al. 2019). Auch für Deutschland zeigen sich ähnliche Verhältnisse: Im Jahr 2016 erkrankten nach Angaben des Robert-Koch-Instituts 57460 Personen an Lungenkrebs, 45805 Personen erlagen ihrem Lungenkrebsleiden (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019). Lungenkrebs ist bei Frauen nach Brust- und Darmkrebs die dritthäufigste, bei Männern nach dem Prostatakarzinom die zweithäufigste Krebserkrankung. Diese Listenplätze verändern sich jedoch, betrachtet man die Todesraten: Brustkrebs führt bei Frauen mit 17,6% aller Krebssterbefälle weiterhin die Liste an, Lungenkrebs folgt jedoch knapp dahinter mit 15,7%. Mit 23,5% aller Krebssterbefälle ist Lungenkrebs bei Männern führend, der weitaus häufiger auftretende Prostatakrebs folgt mit 11,6% (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019). Das mittlere Erkrankungsalter für Frauen bzw. Männern liegt bei 69 bzw. 70 Jahren (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019).

Bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden Vermutungen geäußert, doch erst mit der Veröffentlichung großer epidemiologischer Studien wie denen von Doll und Hill in Großbritannien oder Wynder und Graham in den Vereinigten Staaten im Jahre 1950 konnte ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Tabakrauch und dem Auftreten von Lungenkrebs nachgewiesen werden (Doll und Hill 1950, Wynder und Graham 1950). Heute wird Tabakrauch als wichtigster ätiologischer Faktor für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms angesehen. Mehr als 50 kanzerogene Stoffe wurden im Tabakrauch beschrieben (Bade und Dela Cruz 2020). Je früher man mit dem Rauchen beginnt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, ein Lungenkarzinom zu entwickeln (Hegmann, Fraser et al. 1993). Auch die Dauer und die Anzahl täglich gerauchter Zigaretten haben dabei entscheidenden Einfluss auf das individuelle Lungenkrebsrisiko (IARC 2004). In einer europäischen, multizentrischen Studie fand sich für aktive Raucher ein 24fach-, für Raucherinnen ein 8,7fach-höheres Risiko für die Entwicklung

eines Lungenkarzinoms, verglichen mit Nichtraucher/innen (Simonato, Agudo et al. 2001). Auch für ehemalige Raucher/innen bleibt das Risiko weiterhin erhöht (Simonato, Agudo et al. 2001). In diversen (Meta-)Analysen konnte auch für Passivrauchen eine signifikante Risikoerhöhung gefunden werden, wenngleich auch geringer als bei aktiven Rauchern (Janerich, Thompson et al. 1990, Kim, Ko et al. 2018).

Lungenkrebs kann jedoch schon lange nicht mehr "stereotypisiert werden als eine bei alten, rauchenden Männern auftretende Erkrankung" (Bade und Dela Cruz 2020). Seit den 1990ern lässt sich aufgrund veränderter Rauchgewohnheiten ein gegenläufiger Trend bei beiden Geschlechtern beobachten im Sinne einer fallenden Inzidenz für Männer bei zeitgleich steigender Inzidenz für Frauen (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019). Des Weiteren sind weltweit mit einem nicht unerheblichen Anteil von rund 25% aller Lungenkrebspatienten auch Nichtraucher betroffen (Bade und Dela Cruz 2020).

Als weitere Ursachen abseits des Tabakrauchs sind vor allem berufliche Karzinogene wie Asbest, Arsen, Chrom, Cadmium, Nickel oder Dieselabgase zu nennen (Steenland, Loomis et al. 1996). Auch die Exposition zu Radon, Untertage als auch in Wohnräumen konnte mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko in Verbindung gebracht werden (Lubin, Boice et al. 1995, Darby, Hill et al. 2006). Endogene Faktoren spielen ebenso eine Rolle: für chronische Lungenerkrankungen wie bspw. COPD oder Alpha-1-Antitrypsinmangel wurde ein klarer Zusammenhang gefunden, Infektionen mit diversen Erregern wie HPV, HHV4 oder dem Masernvirus werden immer wieder diskutiert. Eine positive Lungenkrebsanamnese in der Familie gilt ebenfalls als Risikofaktor (Bade und Dela Cruz 2020).

1.1.2 Histopathologische Klassifikation

Die Grundlage für die Einteilung der Lungenkarzinome bildet die aktuell gültige Klassifikation der *World Health Organization* (WHO) aus dem Jahr 2015, wobei morphologische als auch immunhistochemische Kriterien berücksichtigt werden (Travis, Brambilla et al. 2015).

Die wichtigste Unterteilung, grundlegende Unterschiede in Therapie und Prognose mit sich bringend, erfolgt dabei in das mit einer Häufigkeit von 15% auftretende kleinzellige (SCLC) sowie das mit 85% wesentlich häufigere nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC). Wichtige Vertreter der Gruppe der NSCLC bilden dabei die Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome sowie die großzelligen Karzinome. Letztgenannte Entität wird jedoch zunehmend kleiner, da diese mittels immunhistochemischer als auch molekulargenetischer Methoden oftmals den

anderen Subgruppen zugeordnet werden können, wenngleich sie auch morphologisch schlecht differenziert erscheinen (Rossi, Mengoli et al. 2014, Travis, Brambilla et al. 2015).

Die SCLC sind der Gruppe der neuroendokrinen Tumoren zugehörig und gekennzeichnet durch eine schnelle Zellteilungsrate und eine im Krankheitsverlauf früh erfolgende Metastasierung (Bernhardt und Jalal 2016).

In den letzten Jahrzehnten nahm der Anteil der Adenokarzinome stark zu, sodass sie mittlerweile die Plattenepithelkarzinome als häufigste Entität ablösen. Hierfür wird unter anderem der in den 1960er-Jahren auftretende Wechsel von ungefilterten Zigaretten mit hohem Teergehalt zu sogenannten 'Light'-Zigaretten mit Filter und geringerem Teergehalt verantwortlich gemacht (Janssen-Heijnen und Coebergh 2001).

1.1.3 Klinik und Diagnose

Nur rund ein Viertel aller Patienten ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung asymptomatisch (Ost, Jim Yeung et al. 2013). Das Auftreten von Symptomen, wie es bei dem Großteil der Patienten der Fall ist, geht oftmals mit der Feststellung eines fortgeschrittenen Stadiums einher. Die Symptome können sich dabei über eine große Bandbreite erstrecken. Hier genannt seien bspw. Husten, Dyspnoe, Thoraxschmerzen und Hämoptysen als Folgen des lokalen Tumorwachstums sowie Dysphagie durch Kompression des Ösophagus oder Heiserkeit bei Infiltration des *Nervus laryngeus recurrens*. Bei bereits erfolgter Metastasierung sind systemische Phänomene wie Gewichtsverlust und Fatigue nicht selten (Ost, Jim Yeung et al. 2013). Auch paraneoplastische Syndrome können insbesondere beim SCLC, aber auch bei Plattenepithelkarzinomen auftreten (Thomas, Dienemann et al. 2010).

Besteht der Verdacht auf das Vorliegen eines Lungenkarzinoms, sollte laut der aktuell gültigen S3-Leitlinie am Beginn der Diagnostik nach einer ausführlichen Anamnese sowie körperlichen Untersuchung ein in zwei Ebenen angefertigtes Röntgenbild des Thorax als auch ein Routinelabor stehen. Als weitere Bildgebung ist eine kontrastmittelverstärkte Computertomographie der Lunge sowie der Oberbauchorgane oder ein PET-CT durchzuführen. Die Diagnosesicherung erfolgt histologisch. Den Goldstandard für die Probengewinnung stellt dabei die Bronchoskopie dar, bei weiter peripher gelegenen Läsionen sind aber nicht selten transthorakale oder transbronchiale Verfahren erfolgreicher. Bleibt die histologische Untersuchung ohne Ergebnis oder ist eine Biopsie aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes des Patienten nicht möglich, kann eine eindeutige Zytologie ebenfalls diagnosesichernd sein (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft 2018). Zu beachten ist jedoch, dass Verfahren wie die Sputumzytologie eine niedrigere Sensitivität aufweisen (Agusti, Xaubet et al. 2001, Schreiber und McCrory 2003).

Unabhängig vom histologischen Subtyp, metastasieren Lungenkarzinome relativ früh in die regionären Lymphknoten. Fernmetastasen finden sich häufig in Leber, Knochen, Nebennieren, und Gehirn (Ost, Jim Yeung et al. 2013). Die sich an die Diagnose anschließende gezielte Ausbreitungsdiagnostik, das *Staging*, umfasst unter Berücksichtigung der klinischen Symptome des Patienten deshalb die in Tabelle 1 aufgeführten Methoden:

Tabelle 1: Ausbreitungsdiagnostik beim Lungenkarzinom (modifiziert nach der interdisziplinären S3-Leitlinie 2018 sowie der Leitlinie der DGHO 2019)

Untersuchung	Indikation
EBUS mit Biopsie	bei V.a. mediastinalen Lymphknotenbefall, alternativ Mediastinoskopie
CT Abdomen	Suche nach Leber-, Nebennierenmetastasen
Sonographie Abdomen	ergänzend zum CT Abdomen, insbesondere auf der Suche nach Lebermetastasen
MRT Schädel	Suche nach zerebralen Metastasen, alternativ CT Schädel
Pleurapunktion	bei Vorliegen eines Pleuraergusses; bei negativer Zytologie ggf. Thorakoskopie
Knochenszintigraphie	Suche nach Knochenmetastasen
FDG-PET-CT	insbesondere bei kurativem Therapiekonzept

EBUS: endobronchialer Ultraschall ; CT: Computertomographie; MRT: Magnetresonanztomographie; FDG-PET: Fluordesoxyglukose-Positronenemissionstomographie

Nach komplettiertem *Staging* kann eine Stadieneinteilung anhand der aktuell gültigen TNM- sowie korrespondierenden UICC-8-Kriterien erfolgen. Die exakte Zuordnung ist therapeutisch als auch prognostisch von essentieller Bedeutung.

Im Falle eines geplanten thoraxchirurgischen Eingriffs muss präoperativ eine Lungenfunktionsdiagnostik erfolgen. Bei Vorliegen eines NSCLC im UICC-Stadium IV sollte vor Einleitung einer systemischen Therapie eine umfassende Mutationsanalyse stattfinden. Zum aktuellen Zeitpunkt stellen EGFR Exon 18-21 Mutationen, ALK-Translokationen, ROS1-Translokationen, BRAF V600-Mutationen sowie NTRK-Fusionen therapierelevante Mutationen dar. Auch die PD-L1-Expression auf den Tumorzellen ist aufgrund einer möglichen Therapierelevanz zu bestimmen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft 2018)).

1.1.4 Therapeutische Möglichkeiten und Prognose

Die Wahl der geeigneten Therapie wird vor allem vom vorliegenden histologischen Typ sowie Tumorstadium beeinflusst, aber auch patientenseitige Voraussetzungen wie der Allgemeinzustand und Komorbiditäten müssen berücksichtigt werden. Operation, Radiotherapie sowie die systemische Therapie stellen grundsätzliche Optionen dar, welche

oftmals in einem multimodalen Konzept miteinander kombiniert werden. In den letzten Jahren hat sich das Spektrum der systemischen Therapien enorm erweitert: neben einer Chemotherapie, meist Cisplatin-basiert, stehen heute immunologische Therapien wie der Einsatz von PD-L1-Inhibitoren sowie bei Vorhandensein aktivierender Mutationen zielgerichtete Therapien wie bspw. EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) bei Mutation im EGFR-Gen zur Verfügung.

Beim NSCLC ist bis zum Stadium IIIA₃ die operative Entfernung des Primärtumors die Therapie der Wahl, ab dem Stadium II (ggf. IB) sollte eine adjuvante Kombinationschemotherapie folgen. Im Falle der Inoperabilität bietet die stereotaktische Strahlentherapie eine Alternative. Bei lokal ausgedehntem Befall bzw. Nachweis von fixierten oder kontralateral gelegenen Lymphknotenmetastasen (IIIA₄, IIIB sowie IIIC) wird eine definitive Radiochemotherapie empfohlen. Im Anschluss kann bei Erfüllung der Voraussetzungen eine Behandlung mit dem PD-L1-Inhibitor Durvalumab erfolgen. Im Stadium IV, einen metastasierten Zustand kennzeichnend, erfolgt in palliativer Intention eine systemische Therapie. Gerade hier wird das große Spektrum der neuen Systemtherapien ausgeschöpft, viele Medikamente wie die PD-L1-Inhibitoren oder zielgerichtete Therapien sind in der Erstlinientherapie zugelassen. Ausnahmen bilden Patienten mit solitären Metastasen - hier kann ein kuratives Therapiekonzept verfolgt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft 2018)).

Das zentrale Element in der Behandlung des SCLC stellt aufgrund der enorm raschen Zellteilungsrate sowie frühen systemischen Ausbreitung die Chemotherapie dar. In lokal begrenzten Stadien (Stadium I-II) mit einer Operation, in lokal fortgeschrittenen Stadien (Stadium III) mit einer simultan stattfindenden Radiotherapie kombiniert, besteht kurativer Anspruch. Im metastasierten Stadium (Stadium IV) erfolgt die Chemotherapie hingegen in palliativer Absicht, eine begleitende Radiatio des Mediastinums kann erwogen werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft 2018)). Die prophylaktische Schädelbestrahlung ist in bestimmten Situationen ebenfalls möglich.

Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 21% für Frauen und 15% für Männer. Damit gehört das Lungenkarzinom zu den prognostisch ungünstigsten Tumoren (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019). Wesentliche, auf die Prognose Einfluss nehmende Faktoren sind das vorliegende Tumorstadium sowie der Allgemeinzustand des Patienten. Auch ein fortgeschrittenes Alter und männliches Geschlecht beeinflussen die Prognose negativ (Sculier, Chansky et al. 2008). Währenddessen die 5-Jahres-Überlebensrate in

Deutschland bei Männern im UICC-Stadium I 58% und im Stadium IV 3% beträgt, so liegt sie für Frauen im Stadium I bei 75%, im Stadium IV bei 5% (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019).

1.2 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs)

1.2.1 CTCs fungieren als 'Vektoren' in der metastatischen Kaskade

Mit fast 90% aller Fälle repräsentieren Metastasen die häufigste Todesursache bei Krebspatienten (Skovierova, Vidomanova et al. 2019). Der Prozess der Metastasierung umfasst eine komplexe Kaskade. Den Beginn stellt die Loslösung einzelner Tumorzellen oder ganzer Zellverbände (Cluster) vom Primärtumor dar, gefolgt von der Migration durch das Gewebe mit anschließender Einwanderung in das Blut- oder Lymphgefäßsystem, der sogenannten Intravasation (Joose, Gorges et al. 2015). Für eine aktive Migration der Tumorzellen sind Mobilität und die Fähigkeit zum invasiven Wachstum essentielle Eigenschaften. Ein Prozess, der in diesem Zusammenhang immer wieder Erwähnung findet, ist die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT), ein zelluläres Programm, welches man physiologisch während der Embryogenese sowie Wundheilung beobachten kann. Epitheliale Oberflächenproteine wie bspw. EpCAM und E-Cadherin werden herabreguliert, währenddessen es zur vermehrten Expression mesenchymaler Marker wie N-Cadherin oder Vimentin kommt. Der dadurch entstehende Verlust der Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakte, die Umstrukturierung des Zytoskeletts sowie der Wegfall der apiko-basalen Polarität ermächtigen Tumorzellen zur Migrations- und Invasionsfähigkeit. Die EMT lässt sich jedoch nicht als einfacher binärer Schalter zwischen epitheliale und mesenchymalem Phänotyp verstehen, vielmehr entsteht dadurch eine Bandbreite an unterschiedlichen Phänotypen (Dongre und Weinberg 2019). Für eine aktive Migration ist jedoch nicht immer eine phänotypische Veränderung notwendig (Aceto, Bardia et al. 2014, Godinho, Picone et al. 2014).

Neben einer aktiven Migration können Tumorzellen auch passiv in die Blutbahn gelangen.

Um ihren Sauerstoff- sowie Nährstoffbedarf zu decken, sind Tumoren durch Sekretion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF zur Angiogenese fähig (Ferrara 2002). Die neu entstehenden Gefäße sind aufgrund unzureichend organisierter Endothelschichten bzw. atypischer Basalmembran permeabel, was durch mechanische Kräfte im Rahmen eines verdrängenden Tumorwachstums zur 'akzidentiellen' Ausschwemmung von Tumorzellen führen kann (Hashizume, Baluk et al. 2000, Bockhorn, Jain et al. 2007).

Tumorzellen, die in das Blut- oder Lymphgefäßsystem eingewandert bzw. ausgeschwemmt worden sind, werden als zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bezeichnet. Jeden Tag werden mehrere Millionen Tumorzellen pro Gramm Tumorgewebe in die Blutbahn ausgesendet (Butler und Gullino 1975). In einem Tiermodell zeigte sich jedoch, dass nach nur 24 Stunden nur noch 1% dieser CTCs lebendig waren (Fidler 1970). Enorme Scherkräfte, der direkte Kontakt zur Immunabwehr sowie Anoikis, ein durch fehlende Zell-Matrix-Kontakte ausgelöster programmierter Zelltod sind dazu beitragende Faktoren (Joosse, Gorges et al. 2015).

Nach erfolgreicher Passage der Blutbahn folgt die Extravasation, der Austritt der CTCs aus der Blutbahn und Einwanderung in umliegende Organe. Hier scheint der entgegengesetzte Vorgang der EMT, nämlich die Mesenchymale-Epitheliale Transition (MET) von Bedeutung zu sein (Dongre und Weinberg 2019). Im entfernten Organ angekommen, werden die Zellen nun als disseminierte Tumorzellen bezeichnet. Die Zellen können in einen inaktiven Ruhezustand verfallen und sich dadurch möglicherweise systemischen Therapien entziehen oder nach Anpassung an das neue Mikromilieu Mikro- bzw. Makrometastasen ausbilden (Chaffer und Weinberg 2011).

Bei Betrachtung dieser Metastasierungskaskade wird deutlich, dass CTCs eine entscheidende Rolle in dieser einnehmen: Sie stellen das Bindeglied in der Progression von einer lokalen hin zu einer systemischen Tumorerkrankung dar.

1.2.2 CTCs - Charakteristika

CTCs sind im Blut von Lungenkrebspatienten eine seltene Entität. Bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium kommt im Durchschnitt nur eine CTC in einem Hintergrund von 10^6 - 10^7 Leukozyten vor, bei nicht-metastasierten Patienten sogar noch weniger (Alix-Panabières und Pantel 2013). Sie lassen sich dabei einzeln, in Clustern oder von Thrombozyten umgeben vorfinden (O'Flaherty, Gray et al. 2012). CTCs können sowohl vom Primärtumor als auch von Metastasen abstammen und sind demnach sehr heterogen. Diese Heterogenität, sowohl innerhalb der CTC-Population als auch zwischen CTCs und Primärtumor eines Patienten konnte in diversen Studien belegt werden (Gasch, Bauernhofer et al. 2013, Polzer, Medoro et al. 2014). Im Gegensatz zu konventionellen Biopsien ist die Gewinnung von CTCs als sogenannte '*liquid biopsy*' minimal-invasiv, schnell und kann mehrmalig wiederholt werden (Alix-Panabières und Pantel 2013). Ihr seltenes Vorkommen sowie die Heterogenität der CTCs stellen an die verwendeten Methoden jedoch hohe Ansprüche hinsichtlich Sensitivität als auch Spezifität und

lassen die Gewinnung weiterhin eine Herausforderung bleiben (Alix-Panabières und Pantel 2013).

1.2.3 Methoden zur Isolierung und Detektion von CTCs

Mittlerweile sind mehr als 40 Technologien zur Isolierung von CTCs bekannt (Parkinson, Dracopoli et al. 2012), deren gemeinsame Basis die Ausnutzung diverser Eigenschaften von CTCs ist, um sie von den sie umgebenden hämatopoetischen Zellen abzugrenzen (Alix-Panabières und Pantel 2013). Dabei können markerabhängige von markerunabhängigen Anreicherungsstrategien unterschieden werden (Lianidou und Hoon 2018).

Markerabhängige Methoden basieren auf der Anreicherung über zellspezifische Oberflächenproteine. Der am häufigsten eingesetzte Marker zur positiven Selektion von CTCs ist das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM, welches von einem Großteil der Karzinome exprimiert wird (Went, Lugli et al. 2004). Zu den Anreicherungsverfahren, die EpCAM als Zielmolekül nutzen, gehören z.B. das CellSearch®-System (Allard, Matera et al. 2004), der GILUPI CellCollector® (Saucedo-Zeni, Mewes et al. 2012), der Adna-Test® (Andreopoulou, Yang et al. 2012) sowie der CTC-iChip (Ozkumur, Shah et al. 2013). Um auch EpCAM-negative CTCs zu isolieren, ist die Nutzung anderer epithelialer Oberflächenmarker wie HER2, MUC1 oder EGFR sowie mesenchymaler und Stammzellmarker wie c-MET, N-Cadherin oder Vimentin allein oder in Kombination beschrieben worden (Pecot, Bischoff et al. 2011). Eine Negativ-Selektion von CTCs durch Lyse der Erythrozyten sowie anschließender Leukozyten-Depletion unter Nutzung leukozytenspezifischer Oberflächenmarker wie CD45 ist ebenso möglich (Liu, Fusi et al. 2011).

Markerunabhängige Anreicherungsstrategien basieren auf der Nutzung von Differenzen in physikalischen Eigenschaften wie Größe, Dichte, elektrische Ladung oder Verformbarkeit. Das ISET®-System, erstmals im Jahr 2000 von Vona und Kollegen beschrieben, nutzt einen porösen Membranfilter, um die in der Regel größeren CTCs aufzufangen, währenddessen die kleineren peripheren Blutzellen den Filter ungehindert passieren können (Vona, Sabile et al. 2000). Nachteilig ist hier der unspezifische Verlust kleinerer CTCs sowie die Anreicherung von Endothelzellen oder Megakaryozyten, resultierend in einer relativ geringen Spezifität dieser Methode (Dolfus, Piton et al. 2015). Parsortix®, ein mikrofluidisches System, nutzt neben der Größe die schlechtere Verformbarkeit von CTCs aus (Hvichia, Parveen et al. 2016).

Die Isolierung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation basiert auf der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Zellpopulationen im Blut. Mononukleäre Zellen, CTCs inkludierend, weisen eine geringere Dichte auf als Erythrozyten sowie die polymorphnukleären Leukozyten.

Währenddessen sich die zwei zuletzt genannten Entitäten absetzen, lassen sich die mononukleären Zellen sowie die CTCs in der sogenannten Interphase finden. Das FICOLL-Paque™-System arbeitet hier mit einer Trennflüssigkeit, beim neueren System OncoQuick® ist eine zusätzliche Membran enthalten, die ein Re-Suspendieren der Zellschichten nach erfolgter Zentrifugation verhindern soll (Rosenberg, Gertler et al. 2002, Lianidou und Hoon 2018).

Das CellSearch®-System gilt aktuell als Goldstandard der Isolationsmethoden, da es das einzige von der U.S. amerikanischen *Food and drug administration* (FDA) zugelassene CTC-Detektionssystem darstellt. Ein großer Nachteil dieses und der meisten anderen Anwendungen besteht jedoch in der ausschließlichen Anwendbarkeit *ex-vivo*, resultierend in kleinen Blutvolumina, die zur Analyse zur Verfügung stehen. Der von uns in dieser Arbeit verwendete GILUPI CellCollector® umgeht als *in-vivo*-Applikation diesen Nachteil. Hierbei handelt es sich um einen 16 cm langen Edelstahl Draht, dessen goldbeschichtete, 2 cm lange Spitze mit einer Polymerschicht überzogen ist. Kovalent gebundene Anti-EpCAM-Antikörper funktionalisieren die Polymer-Oberfläche. Der Draht wird über eine gewöhnliche periphere Venenverweilkanüle eingeführt. Eine Inkubationszeit von 30 Minuten erlaubt die Untersuchung von ca. 72-180ml Blut (Goubergrits und Kretzschmar 2019). Kommen CTCs mit epithelialem Charakter im Blut mit dem Draht in Kontakt, findet über eine Antigen-Antikörper-Bindung eine Anheftung der CTCs und damit deren Isolierung statt.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den angereicherten Zellen um CTCs handelt, müssen sie anschließend als solche detektiert werden. Auch hier sind mehrere Methoden entwickelt worden. Die am häufigsten und auch von uns angewendete Detektionsstrategie ist die morphologische Untersuchung kombiniert mit fluoreszenzbasierter immunzytochemischer Färbung (ICC, engl. für *immuncytochemistry*) der Zellen. Das CellSearch®-System klassifiziert dabei eine CTC als runde bis ovale, kernhaltige (DAPI⁺) Zelle, pan-Keratin⁺ sowie negativ für den Leukozytenmarker CD45⁻ (Allard, Matera et al. 2004). Der vierte Fluoreszenzkanal kann dabei beliebig besetzt werden, beispielsweise mit therapie relevanten Markern wie dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (Gasch, Bauernhofer et al. 2013) oder EMT-assoziierten Markern (Armstrong, Marengo et al. 2011). In unserem Fall wurde das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM markiert.

Eine weitere Möglichkeit, CTCs von Leukozyten abzugrenzen, besteht in der Analyse tumor-assoziiertes mRNA-Transkripte. Dabei erhält man einen indirekten Nachweis über die Existenz von vitalen, funktionsfähigen CTCs. Es existiert eine Vielzahl an potenziell einsetzbaren Markern.

Theil *et al.* nutzten zur Detektion von CTCs in Prostatakarzinom-Patienten beispielsweise tumorassoziierte Marker wie PSMA, PSA und EGFR (Theil, Fischer *et al.* 2016), aber auch die Verwendung EMT-assoziiierter Marker sowie Stammzellmarker ist mehrfach beschrieben worden (Barrière, Riouallon *et al.* 2012, Kasimir-Bauer, Hoffmann *et al.* 2012). Voraussetzung ist die Anwendung vorher festgelegter, präziser Cut-off-Werte, da einige Transkripte in geringeren Konzentrationen im Blut auch physiologisch vorkommen können. Aufgrund der Heterogenität der CTCs können sich außerdem die Expressionslevel einzelner Gene unterscheiden. Zur Verbesserung der Spezifität der CTC-Detektion auf mRNA-Ebene steht folglich aktuell die Kombination verschiedener Transkripte im Rahmen einer Multiplex-qPCR im Vordergrund (Alix-Panabières und Pantel 2013).

Ebenfalls zum indirekten Nachweis vitaler CTCs geeignet ist die EPithelial Immuno SPOT Technologie (EPISPOT), basierend auf der Detektion von Proteinen, die spezifisch von vitalen, funktionsfähigen Tumorzellen im Blut sezerniert werden. Dazu zählen beispielsweise CK19 (Zytokeratin 19), MUC1 (Mucin 1) oder FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*). Die zuvor angereicherten Zellen werden dabei auf einer mit Antikörpern beschichteten Membran maximal 48h kultiviert. Haben Proteine an die Membran gebunden, werden sie mithilfe fluoreszenzgekoppelter, sekundärer Antikörper markiert und schließlich als sogenannte Immunspots mithilfe geeigneter Software sichtbar gemacht (Alix-Panabieres 2012).

1.2.4 Potenzielle Anwendungsgebiete von CTCs im Lungenkarzinom

CTCs bieten Informationspotenzial auf mehreren Ebenen: Von ihrer reinen Präsenz, über die absolute Zahl bzw. deren Kinetik im Verlauf, von immunzytochemischen Untersuchungen bis hin zu molekulargenetischen Analysen bietet sich ein breites Spektrum (Maly, Maly *et al.* 2019).

Hofman und Kollegen konnten zeigen, dass die reine Präsenz von CTCs in NSCLC-Patienten weder vom Tumorstadium noch von der Tumorhistologie abhängig ist (Hofman, Ilie *et al.* 2011). Aufgrund ihres Auftretens in allen UICC-Stadien, wird ihr Einsatz zur Früherkennung einer Lungenkreberkrankung diskutiert. In einer Studie mit COPD-Patienten entwickelten alle Patienten, bei denen CTCs detektiert werden konnten, innerhalb eines *follow-up*-Zeitraums von vier Jahren ein Lungenkarzinom (Ilie, Hofman *et al.* 2014).

CTCs könnten auch eine prognostische Relevanz bei Lungenkrebspatienten aufweisen. In mehreren Einzelstudien konnte eine erhöhte CTC-Zahl, ermittelt vor Behandlungsbeginn, als unabhängiger, negativer prognostischer Faktor, sowohl für das progressionsfreie Überleben

(PFS) als auch das Gesamtüberleben (OS) deklariert werden (Krebs, Sloane et al. 2011, Zhang, Xiao et al. 2016, Tong, Xu et al. 2017). Die Arbeitsgruppe um Coco fand diesen Zusammenhang nicht (Coco, Alama et al. 2017). Die CTC-Zahl im Verlauf betrachtend, konnte eine Assoziation zwischen einem Anstieg der CTC-Zahl nach Chemotherapie und schlechteren PFS und OS gefunden werden (Tong, Xu et al. 2017). In einer anderen Arbeitsgruppe, welche CTCs mit dem CellCollector® isolierte, konnte gezeigt werden, dass bei Patienten, welche auf eine systemische Therapie komplett oder zumindest partiell ansprachen, rückläufige CTC-Zahlen detektiert wurden, wohingegen bei Patienten mit Krankheitsprogress die CTC-Zahl im Mittel um 4,5 Einheiten zunahm (Gorges, Penkalla et al. 2016).

Des Weiteren könnten immunzytochemische Analysen von CTCs zu einer besseren Stratifizierung von Patienten beitragen. So unterschied sich in einer Untersuchung von NSCLC-Patienten die PD-L1-Expression zwischen Primärtumor und CTCs innerhalb eines Patienten (Guibert, Delaunay et al. 2018). Folglich könnten dadurch Patienten mit PD-L1-negativen Primärtumoren, jedoch PD-L1-positiven CTCs eventuell ebenfalls von einer Therapie mit PD-L1-Inhibitoren profitieren.

Ein weiteres, vielversprechendes Anwendungsgebiet und ein Hotspot in der derzeitigen Forschung ist der Bereich der molekulargenetischen Analysen von CTCs. So könnten diese wertvolle Informationen über das Vorhandensein therapie-relevanter Mutationen liefern sowie zur Aufdeckung von Resistenzmechanismen beitragen. Marchetti und Kollegen untersuchten den EGFR-Status in CTCs von Patienten mit bekanntem EGFR-mutiertem Primärtumor und konnten eine 94%ige Übereinstimmung im Mutationsstatus feststellen (Marchetti, Del Grammastro et al. 2014). In einer anderen Studie ließ sich anhand von Mutationsanalysen im KRAS- und EGFR-Gen die Heterogenität von CTCs herausarbeiten, einerseits durch das Auftreten multipler Mutationen eines Gens innerhalb eines Patienten als auch durch Detektion von Mutationen in CTCs bei bekanntem Wildtyp-Primärtumor (Turetta, Bulfoni et al. 2018). Aufgrund der minimal-invasiven Gewinnung der CTCs und damit möglichen Wiederholung im Verlauf wird die CTC-Analyse auch als mögliches Tool zum Therapiemonitoring diskutiert: In einer Untersuchung, welche CTCs mithilfe einer Chip-Technologie isolierte, konnte eine unter der Therapie aufgetretene T790M-Mutation im EGFR-Gen festgestellt werden, welche mit einer Resistenz gegen TKIs einhergehen kann (Maheswaran, Sequist et al. 2008).

1.3 Das Protoonkogen KRAS

1.3.1 Bedeutung und Funktion

Das KRAS-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 (12p12.1) lokalisiert (Popescu, Amsbaugh et al. 1985) und gehört neben HRAS und NRAS zur RAS-Genfamilie. Es kodiert, wie alle RAS-Gene, für ein kleines, monomeres G-Protein, im Folgenden als Ras-Protein bezeichnet (Cox und Der 2010). Nach der Translation befindet sich das Ras-Protein zunächst im Zytosol, durch posttranslationale Modifikation durch die Farnesyltransferase kann es jedoch durch den nun vorhandenen Farnesylrest in der intrazellulären Membran verankert werden (Jackson, Cochrane et al. 1990). Von dort kann es extrazelluläre, mitogene Signale empfangen und durch Aktivierung diverser nachgeschalteter Signalkaskaden bis in den Zellkern leiten. Auf diese Weise wirkt KRAS in Wachstums-, Proliferations- und Differenzierungsprozessen einer Zelle entscheidend mit (Takashima und Faller 2013).

Das Ras-Protein kann zwischen zwei Zuständen wechseln. Im inaktiven Zustand hat das Ras-Protein GDP gebunden. Ein Austausch von GDP zu GTP führt zur Aktivierung. Dieser Prozess wird beschleunigt durch Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs) wie zum Beispiel SOS (Bonfini, Karlovich et al. 1992). Den GEFs vorgelagert ist die Aktivierung transmembranärer Rezeptortyrosinkinasen, vorrangig EGFR, welche über extrazelluläre Wachstumsfaktoren Zellzyklus-stimulierende Signale erhalten haben. Das Ras-Protein hat eine intrinsische GTPase-Aktivität und kann sich durch Hydrolyse von GTP zu GDP nach einer gewissen Zeit abschalten. Dieser negative Feedback-Mechanismus wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) reguliert, die intrinsische GTPase-Aktivität beschleunigend (Hennig, Markwart et al. 2015).

Durch Aktivierung erfährt das Ras-Protein eine Konformationsänderung, wodurch die Bindungsaffinität zu nachgeschalteten Effektormolekülen gesteigert wird (Hennig, Markwart et al. 2015). Ein Effektormolekül ist die Raf-Kinase, zur MAP-Kinase-Signalkaskade gehörend. Dieser Signalweg besteht in der Aktivierung dreier hintereinander geschalteter Proteinkinasen, deren letzte, die MAP-Kinasen ERK1/2, in den Nukleus transportiert werden, um dort die Transkriptionsfaktoren ETS und c-JUN zu aktivieren. Diese tragen letztlich zu einer verstärkten Expression von Cyclin-D und anderen Zellzyklus-aktivierenden Kinasen bei (Basu und Nieva 2019). Ein weiterer Signaltransduktionsprozess, der durch das Ras-Protein eingeleitet wird, ist die PI3K/AKT/mTOR-Kaskade (Takashima und Faller 2013).

KRAS ist eines der am häufigsten im menschlichen Organismus mutierten Gene (Bos 1989). Die bekannten Mutationen führen zu einer gestörten Interaktion zwischen GAPs und dem Ras-Protein. Dies hat die Persistenz des aktiven GTP-Ras-Komplexes zur Folge (Trahey und McCormick 1987). Diese '*gain-of-function*'-Mutationen verwandeln das Protoonkogen in ein Onkogen, führen zur Generierung von Wachstumssignalen in der Zelle selbst, ohne extrazellulären, adäquaten Stimulus.

1.3.2 Die Bedeutung von KRAS-Mutationen im Lungenkarzinom

KRAS-Mutationen lassen sich bei ca. 30% aller Lungenkarzinome nachweisen (Bos 1989).

Der Großteil davon entfällt auf die Gruppe der Adenokarzinome. In knapp 33% aller Adenokarzinome lassen sich KRAS-Mutationen nachweisen, dies ist die zweithäufigste genetische Alteration nach TP53-Mutationen (Cancer Genome Atlas Research 2014). In Plattenepithelkarzinomen und kleinzelligen Bronchialkarzinomen kommen KRAS-Mutationen seltener vor. Wichtige beeinflussende Determinanten sind der Raucherstatus und die Ethnizität: KRAS-Mutationen treten häufiger bei Rauchern und in der westlichen Bevölkerung auf (Dogan, Shen et al. 2012). Die am häufigsten vorkommenden Mutationen im KRAS-Gen sind allesamt Substitutionen im Exon 2, Codon 12 oder 13 betreffend: die Mutation G12C ist mit 42% am häufigsten, gefolgt von G12V (21%), G12D (17%) sowie G12A (7%) (Karachaliou, Mayo et al. 2013). Substitutionen sind Punktmutationen, durch den Austausch einzelner Nukleotide gekennzeichnet. Je nach Punktmutation wird die nachgeschaltete Signalkaskade unterschiedlich beeinflusst, was sich in einer abweichenden klinischen Präsentation, zum Beispiel dem präferierten Ort für die Ausbildung von Metastasen äußern kann (Renaud, Seitlinger et al. 2016).

Klassisch werden KRAS-mutierte Lungenkarzinome mit einem aggressiven Phänotyp und einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht (Slebos, Kibbelaar et al. 1990). Die Ergebnisse diverser (Meta-)Analysen sind jedoch kontrovers: Konnte beispielsweise in einer großen Meta-Analyse mit einem Hazard-Ratio von 1,35 eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit für NSCLC-Patienten mit KRAS-Mutation festgestellt werden (Mascaux, Iannino et al. 2005), ließ sich dieses Ergebnis in einer anderen Meta-Analyse nicht bestätigen (Shepherd, Domerg et al. 2013). Als eine mögliche Ursache dieser Dissonanz wird die Heterogenität durch zusätzlich auftretende genetische Alterationen innerhalb der KRAS-mutierten Lungenkarzinome diskutiert: So wiesen KRAS-mutierte NSCLC-Patienten mit gleichzeitig vorhandener STK11/LKB1- oder CDKN2A-Mutation eine schlechtere Prognose auf als bei gleichzeitig vorliegender TP53-Mutation (Skoulidis, Byers et al. 2015).

Zusätzlich existieren diverse Studien darüber, ob sich KRAS-Mutationen als prädiktive Marker bei Lungenkrebspatienten eignen. Aufgrund nicht einheitlicher Daten bzgl. der prädiktiven Aussagekraft über eine Chemotherapie, sollte der KRAS-Status aktuell nicht bei der Wahl eines spezifischen Chemotherapie-Regimes einbezogen werden (Roman, Baraibar et al. 2018). Hinsichtlich einer Therapie mit einem EGFR-TKI scheinen sich KRAS-Mutationen jedoch als negativer prädiktiver Marker zu eignen, zeigten sich in einer Meta-Analyse Ansprechraten von 3% bei KRAS-mutierten Patienten verglichen mit 26% bei Patienten mit KRAS-Wildtyp (WT) (Mao, Qiu et al. 2010). Für die Behandlung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren, verglichen mit der Standardbehandlung Chemotherapie, konnte für KRAS-mutierte NSCLC-Patienten ein Überlebensvorteil gezeigt werden. In der Gruppe der NSCLC-Patienten mit KRAS-WT hingegen konnte dies nicht verzeichnet werden. Somit könnte der KRAS-Status als Biomarker für das Ansprechen auf eine Immuntherapie herangezogen werden (Kim, Kim et al. 2017).

Auch KRAS selber ist aufgrund seines häufigen Vorkommens und seiner Bedeutung als Treibermutation als potenzielles therapeutisches Ziel seit Jahren im Fokus vieler Forschungsgruppen. Diverse Strategien, von direkter Inhibierung der spezifischen mutierten Ras-Proteine über indirekte Hemmung nachgeschalteter Effektoren bis hin zur Verhinderung der posttranslationalen Modifikation durch Farnesyltransferase-Inhibitoren blieben jedoch bislang im Wesentlichen ohne Erfolg (Roman, Baraibar et al. 2018). In zwei kürzlich erschienenen Studien zeigt jedoch Sotorasib als erster Wirkstoff bei KRAS G12C-mutierten NSCLC-Patienten eine relevante Wirksamkeit (Hong, Fakih et al. 2020) (Skoulidis, Li et al. 2021).

2. Zielstellung

Durch ein zunehmendes molekulares Verständnis der Tumorentstehung und -biologie nimmt die molekulare Charakterisierung einer Lungenkrebskrankung einen immer höheren Stellenwert ein. Die Detektion somatischer Mutationen kann unter anderem zu Therapieentscheidungen sowie zur Aufdeckung von Resistenzmechanismen beitragen. Aktuell erfolgen Mutationsanalysen in der Routinediagnostik anhand von Gewebeproben des Primärtumors, gewonnen durch eine invasive, Risiken mit sich bringende Biopsie. Tumorzellen sind jedoch eine sehr heterogene und dynamische Zellpopulation, ihr genomisches Profil verändert sich im Lauf einer Erkrankung. Hier könnte die Isolierung und anschließende molekulare Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen (CTCs) aus dem Blut von Krebspatienten im Sinne einer *liquid biopsy* eine supplementäre Plattform bieten, welche aufgrund ihrer minimal-invasiven Gewinnung mehrmals im Laufe einer Therapie wiederholt werden kann und somit ein Monitoring des genomischen Tumorprofils möglich machen könnte.

In einem vorangegangenen Projekt wurden CTCs *in-vivo* aus dem Blut von an fortgeschrittenem Lungenkrebs erkrankten Patienten mithilfe des CellCollector®, einem funktionalisierten Anti-EpCAM-beschichteten-Draht gewonnen. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung einer hochsensitiven und spezifischen allelspezifischen qPCR und anschließender hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (HRMA), um diese gewonnenen CTCs molekulargenetisch zu charakterisieren. Zum Vergleich wurde das kommerziell verfügbare *Mikroarray-Kit* der Firma CHIPRON eingesetzt, welches laut Herstellerangaben 1% mutierte DNA in einem Wildtyp Hintergrund detektieren kann. Als *proof-of-concept*-Modell wurde das Onkogen KRAS ausgewählt, da es mit ca. 30% relativ oft in Lungenkarzinomen mutiert ist und sich damit zur Etablierung gut eignet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Lassen sich mithilfe der allelspezifischen qPCR und HRMA KRAS-Mutationen in CTCs von Lungenkrebspatienten, welche mit dem CellCollector® isoliert wurden, detektieren?
- Können mithilfe der *Mikroarray*-Technologie KRAS-Mutationen detektiert werden?
- Wie lassen sich die Ergebnisse in den Kontext vorangegangener Studien, in denen CTCs mit dem CellCollector® isoliert worden, einordnen?
- Welche Perspektiven lassen sich für weitergehende Studien ableiten?

3. Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Die beiden Zelllinien SW1116 und LS174T wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Müller, Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums Halle (Saale) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

Name	Ursprung	Kennzeichnung	KRAS-Status
BON-1	Homo sapiens, pancreatic NET	CVCL_3985	Wildtyp (WT)
SW620	Homo sapiens, colon; derived from metastatic site: lymph node	CCL-227	G12V-Mutation
SW1116	Homo sapiens, colorectal adenocarcinoma	CCL-233	G12A-Mutation
A549	Homo sapiens, bronchial carcinoma	CCL-185	G12S-Mutation
MiaPaCa-2	Homo sapiens, pancreas carcinoma	CRL-1420	G12C-Mutation
HCT-116	Homo sapiens, colorectal carcinoma	CCL-247	G13D-Mutation
LS174T	Homo sapiens, colorectal adenocarcinoma	CL-188	G12D-Mutation

Die Tumorzelllinien wurden mittels Pyrosequenzierung auf das Vorhandensein sowie die Höhe der Allellast der jeweiligen Mutation überprüft. Diese sowie jegliche andere Pyrosequenzierungen wurden dankenswerterweise von Frau Dr. Anja Haak, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Halle (Saale) durchgeführt. Diese Zellen sowie deren extrahierte DNA wurden für Vorversuche zur Etablierung der qPCR genutzt und wurden in Abhängigkeit des KRAS-Mutationsstatus als Positiv- bzw. Negativkontrollen eingesetzt.

3.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Die in diesem Projekt verwendeten Zellkulturmedien sowie Zusätze wurden von den Herstellern Thermo Fisher Scientific, Sigma-Aldrich und PAA erworben.

Tabelle 3: Zellkulturmedien und Zusätze

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
DMEM	500 ml DMEM + 10% fetal calf serum (FCS)
DMEM GlutaMaxx	500 ml DMEM GlutaMaxx + 10% FCS
DMEM/ F-12	500 ml DMEM/F-12 (1:1) + 2,5 mM Glutamin + 15 mM HEPES + 10% FCS
Gefriermedium	10 ml DMEM + 10% FCS + 10% DMSO

3.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Geräte

Geräte	Hersteller
Cytospin™ 4 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Durchlichtmikroskop	Olympus
Immunfluoreszenzmikroskop Nikon TE 2000E	Nikon
Loading block (72x 0.1ml strip tubes)	Qiagen
LSR II Fortessa™	BD Biosciences
Magnetrührer IKAMAG REO	IKA
Mastercycler	Sigma-Aldrich
Microfuge 16	Beckman Coulter
Mini-Zentrifuge CHIPSpin FVL 2400 N	CHIPRON
NanoDrop™ 2000/2000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific
Pipetboy	Brand
Pipetten	Eppendorf
QIAxcel Advanced	QIAGEN
Rollenmischer RM 5	CAT-Ing
Seitenschneider	Roth
Slide Scanner	CHIPRON
Thermocycler Rotor Gene Q	Qiagen
Thermocycler T3000	biometra
Tischzentrifuge Rotina 380	Hettich
Vortexer MS 3 basic	IKA
Wasserbad	Julabo
Wasserbad Thermolab	GFL
Zählkammer	Neubauer
Zellbank	HeraSafe

Tabelle 5: Materialien

Materialien	Hersteller
Deckgläschen	Süsse Labortechnik
EDTA-Monovette 2.6 ml; 9 ml	Sarstedt
Einmal-Injektions-Kanüle	Braun
GILUPI CellCollector	GILUPI
Kryoröhrchen	TPP
Objektträger	Süsse Labortechnik
PCR-tube 0.1 ml	Biozym scientific
PCR-tube 0.2 ml flat cap	Nippon Genetics
Pipettenspitze, mit Filter	biozym
Pipettenspitze, ohne Filter	Laborfachhandel Ilona Schubert
Pre-separation filter (30 µm)	Miltenyi Biotec
Reagiergefäß 0.5, 1, 1.5 ml	Eppendorf
Rundbodenröhrchen PS, 5 ml	BD
serologische Einmalpipetten 5, 10 ml	greiner bio-one
TC-Flasche T75, Standard	Sarstedt
TC-Platte 24-well, Standard, Flachboden	Sarstedt
TC-Schale, 35 mm, Standard	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 15, 50 ml	greiner bio-one

3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
Aqua dest.	Promega
EDTA	Roth
Ethanol, 100 % und 70 %	Sigma-Aldrich
GoTaq G2 Colorless Master Mix	Promega
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich
NaCl-Lösung (6 M)	AppliChem
PBS	PAA
PFA	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Roche
Qx alignment marker 15 bp/1 kb	Qiagen
Qx size marker 50-800 bp	Qiagen
Roti®-Mount FluorCare DAPI	Roth
SDS	AppliChem
Tris	Roth
Trypsin	Invitrogen

3.1.5 Kits

Tabelle 7: Kits

Kit	Hersteller
LCD Array kit kras 1.4	CHIPRON
Qiagen REPLI-g® Single Cell Kit	Qiagen
Qiagen type-it HRM kit	Qiagen
QiAxcel High resolution kit	Qiagen

3.1.6 Antikörper

Tabelle 8: Antikörper

Antigen	Klone	Markierung	Spezies	Hersteller
EpCam (CD326)	monoklonal	FITC	Kaninchen	Acris Antibodies

3.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Zusammensetzung der genutzten Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
SE-Puffer, pH=8 (DNA-Isolation)	75 mM NaCl, 24 mM EDTA, dest. Wasser
TE-Puffer, pH=7,5 (DNA-Isolation)	10 mM Tris, 1 mM EDTA, dest. Wasser
Puffer D2 (MDA)	3 µl DTT 1M, 33 µl rekonstituierter Puffer DLB
Hybridisierungsmix (<i>Mikroarray</i>)	24 µl Hybridisierungspuffer, 1 µl Modulator
Waschpuffer (<i>Mikroarray</i>)	5 ml 200x Konzentrat, 995 ml deionisiertes Wasser
<i>Label-Mix (Mikroarray)</i>	270 µl <i>dilution buffer</i> , 30 µl Modulator, 2 µl <i>label</i>

3.1.8 Software

FlowJo	FlowJo, LLC
QIAxcel Screen Gel	Qiagen
Rotor Gene Q Series Software	Qiagen
Slide Reader V9 Software	CHIPRON

3.1.9 Proben

Insgesamt 32 Proben von 15 an einem fortgeschrittenen Lungenkarzinom erkrankten Patienten, die zur Behandlung im Universitätsklinikum Halle (Saale), Klinik für Innere Medizin I, Schwerpunkt Pneumologie vorstellig wurden, lagen uns vor. Das Forschungsvorhaben mit dem Titel "Klinische Studie zur in-vivo-Isolierung und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) aus dem Blut von Lungenkarzinompatienten mittels des antikörperbeschichteten Detektors CANCER01" wurde von der ortsständigen Ethikkommission am 30.01.2013 bewilligt (Bearbeitungs-Nummer 2012-127). Im Rahmen der Promotion zum Thema „In-vivo Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen (CTC) bei Lungenkrebspatienten mittels des antikörperbeschichteten Drahtes „CANCER01““ von Herrn Clemens Oerding fand die Patientenrekrutierung sowie Probengewinnung statt, auf die folglich hier nicht vertiefend eingegangen werden soll. Tabelle 10, sortiert nach der Tumorhistologie, fasst die klinischen Charakteristika der rekrutierten Patienten zusammen und gibt einen Überblick über die Anzahl der jeweils vorhandenen Proben pro Patient.

Tabelle 10: Klinische Charakteristika der Patienten, sortiert nach histologischem Subtyp

Patient Nr.	Geschlecht	Alter	UICC-Stadium	Histologie	Probenanzahl
1	m	60	IV	Ad.-C.	1
2	m	57	IV	Ad.-C.	1
3	m	69	IV	Ad.-C.	3
4	m	66	IV	Ad.-C.	3
5	m	66	IV	Ad.-C.	2
6	m	61	IIIA	Ad.-C.	3
7	m	77	IV	SCC	1
8	w	71	IIIB	SCC	2
9	m	75	IV	SCC	2
10	m	63	IV	SCC	3
11	m	61	IV	SCLC	1
12	m	68	IV	SCLC	2
13	m	54	IV	SCLC	1
14	m	71	IIIB	SCLC	4
15	m	66	IV	SCLC	3
15 Patienten					32 Proben

Ad.-C.= Adenokarzinom, SCC=Plattenepithelkarzinom, SCLC=Kleinzelliges Bronchialkarzinom

Eine Probe wurde gewonnen, indem der CellCollector® 30 Minuten in der Kubitalvene des Patienten, in Ausnahmefällen der Unterarmvene, inkubierte, eingeführt über eine periphere Venenverweilkanüle (Größe 20G, Firma BRAUN). In 3 Waschschritten mit PBS wurde er anschließend von unspezifisch gebundenen Blutzellen befreit und für 10 min bei Raumtemperatur in Aceton fixiert. Nach Permeabilisierung (0.1 % Triton X-100/PBS für 10 min)

und Blockierung (3 % BSA/PBS für 30 min) konnten die gebundenen Zellen mittels der fluoreszenzmarkierten Antikörper Hoechst-Kernfärbung 33342, Anti-CD45-APC (exbio, clone MEM-28-Alexa647), Anti-Pan-Cytokeratin (CK8, CK18, CK19: Exbio, clone C11-Alexa488; Millipore, clone LP5K- FITC; Exbio, clone A53-B/A2-Alexa488) sowie Anti-EpCAM-Farbstoff (Acris, clone HEA 125-FITC) gefärbt werden. Anhand der unterschiedlichen Anfärbung der Zellen in Abhängigkeit vorhandener Antigene konnte eine Differenzierung in Leukozyten (white blood cells, WBC) und CTCs erfolgen (siehe Abbildung 1). Außerdem konnte mithilfe zellmorphologischer Kriterien wie eine Zellgröße zwischen 5 bis 50 µm, ein runder bis ellipsoider Zellkern sowie ein zum Zellkern verschobenes Zellkern/Zytoplasma-Verhältnis die Differenzierung präzisiert werden (Theil et. al, 2016). Danach wurden die Drähte bei - 80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

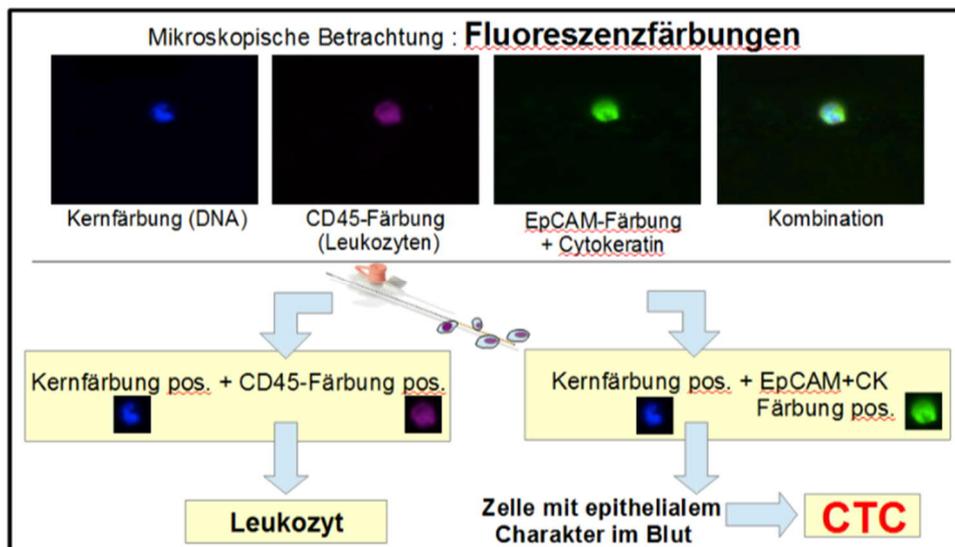


Abbildung 1: Mikroskopische Auswertung nach Fluoreszenzfärbung der gebundenen Zellen am CellCollector® (Quelle: Oerding 2019)

3.2 Methodik

Um die Ausgangsmenge an DNA zu erhöhen, wurde mittels *Multiple Displacement Amplification* (MDA) die Gesamt-DNA vervielfältigt. Das anschließende Screening der Proben auf eine Mutation im Codon 12 bzw. 13 des KRAS-Gens erfolgte durch zwei unterschiedliche Methoden. Im Labor wurde eine allelspezifische *Realtime*-Polymerasekettenreaktion (im Folgenden mit qPCR abgekürzt) mit anschließender *High Resolution Melting Analysis* (HRMA) etabliert. Zum Vergleich stand die kommerziell erhältliche *Mikroarray*-Analyse des Herstellers CHIPRON.

3.2.1 *Multiple Displacement Amplification (MDA)*

Die MDA ist eine Methode der Gesamtgenom-Vervielfältigung (*whole genome amplification*, WGA). Sie beruht auf der zufälligen Anlagerung unspezifischer Hexamer-Primer an die Matrizen-DNA mit anschließender Polymerisierung durch die ϕ 29-Polymerase, wodurch ein neuer, komplementärer DNA-Strang entsteht. Die Polymerase besitzt eine Strangverdrängungsaktivität, wodurch während der Polymerisierung kontinuierlich neue Einzelstränge generiert werden, die wiederum als Ausgangspunkt für neue Replikationen dienen. Aus diesem Grund sind zyklische Denaturierungsschritte nicht notwendig und die gesamte Reaktion kann bei gleichbleibender Temperatur stattfinden (isothermales Reaktionsprinzip). Die hohe Prozessivität der ϕ 29-Polymerase ermöglicht die Generierung von DNA-Mengen im μ g-Bereich mit einer durchschnittlichen Fragmentlänge von 10 kbp aus kleinsten Mengen genomischer DNA (Dean, Hosono et al. 2002).

Es wurde der Repli-g Single Cell Kit von Qiagen eingesetzt und nach dem "WI-DN-10-000-WGA-Protokoll" der Firma GILUPI gearbeitet, welches das 1,2-fache der im Originalprotokoll angegebenen Volumina verwendet. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. 4,8 μ l PBS je Reaktionsgefäß wurden vorgelegt. Der aktivierte, goldbeschichtete Teil des CellCollector® wurde mittels eines DNA-freien Seitenschneiders in ca. 2 mm lange Stücke direkt in das Reaktionsgefäß geschnitten. 3,6 μ l Puffer D2 wurden zugegeben, der Ansatz kurz zentrifugiert. Die Zelllyse erfolgte durch Inkubation im Mastercycler (Sigma-Aldrich) für 10 Minuten bei 65 °C. Die Zugabe von 3,6 μ l *Stop Solution* beendete die Reaktion. Ein Mastermix aus 10,8 μ l H₂O, 34,8 μ l REPLI-g sc Reaction buffer und 2,4 μ l REPLI-g sc DNA-Polymerase je Ansatz wurde hergestellt und hinzugefügt. Die hitzelabile Polymerase wurde dabei erst unmittelbar vor Benutzung aus dem Kühler genommen. Anschließend wurde der Ansatz für 8 Stunden bei 30 °C inkubiert. Durch terminale Temperaturerhöhung auf 65 °C für drei Minuten wurde die Polymerase inaktiviert. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Ansatz bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C für maximal einen Tag bzw. -20 °C bei längerer Lagerung aufbewahrt.

3.2.2 *Mikroarray-Analyse*

Mittels des von uns eingesetzten DNA-Mikroarray können neun Punktmutationen, sechs im Codon 12 und drei im Codon 13, des KRAS-Gens detektiert werden (siehe Tabelle 11). Der Chip umfasst acht identische Array-Felder mit jeweils 7x7 Reaktionsfeldern. Pro Array kann eine Probe untersucht werden. Auf dem Boden jedes Reaktionsfeldes befinden sich spezifische DNA-Sonden, die jeweils komplementär zur Wildtypsequenz (Nr. 2-4) oder einer definierten Mutation im Codon 12 bzw. 13 des KRAS-Onkogens (Nr. 5-13) sind. Drei Kontrollfelder (Nr. 1) in den Ecken jedes Arrays bestätigen eine erfolgreiche Hybridisierungs- und Farbreaktion (siehe Abbildung 2).

Tabelle 11: Übersicht über die einzelnen Felder eines Arrays

Feld	Bezeichnung	Sequenz	Mutation
1	Kontrollfeld		
2	WT-5'Ende (Codon 12)	GGT	
3	WT-Zentrum		
4	WT-3'-Ende (Codon 13)	GGC	
5	Cod-12-Val	GTT	G12V
6	Cod-12-Ala	GCT	G12A
7	Cod-12-Asp	GAT	G12D
8	Cod-12-Ser	AGT	G12S
9	Cod-12-Cys	TGT	G12C
10	Cod12-Arg	CGT	G12R
11	Cod-13-Asp	GAC	G13D
12	Cod-13-Arg	CGC	G13R
13	Cod-13-Cys	TGC	G13C

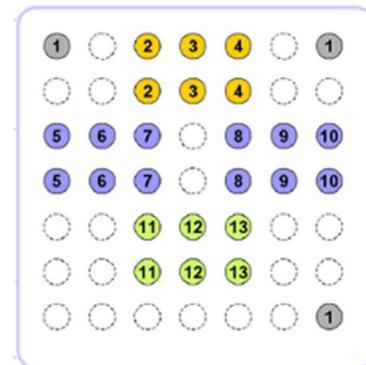


Abbildung 2: Aufbau eines Array-Feldes (Quelle: Chipron 2013)

Basis bildet die Amplifikation eines 170 bp langen PCR-Fragmentes, Codon 12 und 13 umfassend. Um auch kleinste Mengen mutierter KRAS-Sequenzen in einem Überschuss an Wildtyp-DNA zu erfassen, wurde die PCR in Gegenwart eines Wildtypblockers (WT-Blocker) durchgeführt. Dieses Reagenz unterdrückt selektiv die Amplifikation von Wildtyp-Sequenzen. Je nach Mutationslast der Probe kann die WT-Blocker-Konzentration angepasst werden. Durch den Einsatz biotinylierter Primer ist das anschließende PCR-Produkt bereits Biotin-markiert. Mittels Gel-Elektrophorese wird das Ergebnis der PCR verifiziert. Anschließend erfolgt der Hybridisierungsschritt auf dem Array: Komplementäre DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Probe binden an die Array-gebundenen DNA-Sonden durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Nach erfolgreicher Hybridisierung werden gebundene PCR-Fragmente in einer Farbreaktion mittels Biotin-Streptavidin-Enzym-Substrat-Kaskade visualisiert (siehe Abbildung 3). Die Farbreaktion wird durch Messung der Lichtdurchlässigkeit analysiert und die Auswertung erfolgt mittels der Slide-Reader V9-Software am Computer.

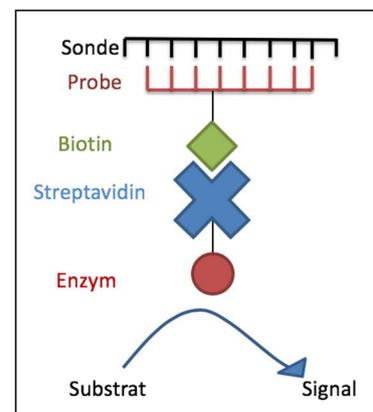


Abbildung 3: Visualisierung der Hybridisierungsreaktion mittels Biotin-Streptavidin-Enzym-Substrat-Kaskade

Die PCR wurde auf dem Thermocycler T3000 der Firma biometra durchgeführt und lief unter den in Tabelle 12 vermerkten Bedingungen:

Tabelle 12: PCR-Bedingungen

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
<i>Hold</i>	94 °C	5 min	1x
<i>Cycling</i>	94 °C	45 s	48x
	60 °C	45 s	
	72 °C	45 s	
<i>Hold</i>	72 °C	3 min	1x

Tabelle 13 zeigt die eingesetzten Reagenzien in definierten Volumina:

Tabelle 13: Reaktionsansatz der PCR

Reaktionsansatz der PCR	Volumen
GoTaq G2 Colorless MM	12,5 µl
Primer-Mix	1 µl
0,5 WT-Blocker	1,25 µl
Wasser (nukleasefrei)	7,75 µl
DNA-Probe	1 µl (10 ng/µl)
Gesamtvolumen	23,5 µl

Das Vorhandensein einer Bande bei 170 bp in der Kapillar-Elektrophorese mittels des QIAxcel Advanced wurde als Kriterium für eine erfolgreiche PCR herangezogen.

Für nachfolgende Waschschrte wurden 3 Wannen mit je 150 ml des Waschpuffers vorbereitet. 25 µl Hybridisierungsmix wurde zu je 10 µl PCR-Produkt gegeben, der Ansatz gemischt und anschließend 30 µl dieser Lösung auf je ein Array gegeben. Der Chip wurde in einer feuchten Kammer bei 35 °C für 30 Minuten inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte zur Entfernung von nicht gebundener DNA: Der Chip wurde in die erste und zweite Wanne kurz eingetaucht und in der dritten Wanne anschließend für 1 Minute inkubiert. Zur Trocknung erfolgte eine kurze Zentrifugation. Für 5 Minuten wurde anschließend 30 µl *Label-mix* auf jeden Array gegeben. Es folgten erneut die zuvor beschriebenen Wasch- und Trocknungsschrte. Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 30 µl *Stain solution* pro Array. Dieser Prozess wurde, sobald Punkte in den Array-Feldern sichtbar wurden, durch kurze Spülung im Waschpuffer beendet. Durch erneute Zentrifugation wurde der Chip getrocknet. Der Array konnte nun mittels des *Slide Scanners* (CHIPRON) eingescannt und analysiert werden.

3.2.3 Allelspezifische Realtime-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein enzymkatalysiertes Verfahren zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes. Es beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus, wobei Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsprodukte für nachfolgende Zyklen dienen, was eine exponentielle Vervielfältigung gestattet.

Nach initialer fünfminütiger Aktivierung der hitzestabilen taq-Polymerase bei 95 °C werden in jedem Zyklus folgende Schritte durchlaufen: Nach thermischer Auftrennung der doppelsträngigen DNA in ihre beiden Einzelstränge (Denaturierung) kommt es zur Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die jeweiligen Enden des zu amplifizierenden DNA-Bereichs (Annealing). Die gewählte Temperatur während dieses Schrittes ist maßgeblich von der Primersequenz abhängig. Anschließend verlängert die taq-Polymerase mithilfe von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) den zum Matrizenstrang komplementären DNA-Strang, vom 3'-OH-Ende der Primer ausgehend (Elongation).

Aus einer großen Menge heute verfügbarer PCR-Techniken haben wir auf die qPCR zurückgegriffen. Dem Reaktionsansatz wird hierbei ein Farbstoff, in unserem Fall EvaGreen, zugesetzt, der durch Anlagerung an doppelsträngige DNA – die Amplifikate – aktiviert wird und nach Anregung mittels Lichts einer Wellenlänge von 470 nm fluoresziert. Während des Annealing-Schrittes wird in jedem Zyklus die Fluoreszenz gemessen und aufgezeichnet. Die Zunahme der PCR-Amplifikate korreliert daher mit einem Anstieg der Fluoreszenzintensität von Zyklus zu Zyklus, der Amplifikationsvorgang lässt sich damit in Echtzeit verfolgen. Die gemessene Fluoreszenz lässt sich dann auf der Ordinate gegen die Zyklenzahl auf der Abszisse darstellen. Der Zyklus, an dem die Fluoreszenz dann erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, wird als Ct-Wert (engl. für *cycle threshold*) bezeichnet.

Der von uns eingesetzte Farbstoff EvaGreen wirkt weniger inhibitorisch auf die PCR als das vielfach verwendete SYBR-Green. Dies ermöglicht einen Einsatz in Sättigungskonzentration, wodurch in der sich anschließenden HRMA ein maximales Signal erzielt werden kann.

Die Sequenzen der verwendeten Primer nach (Mouliere, El Messaoudi et al. 2013) sind in Tabelle 14 dargestellt. Aufgrund gezielter Veränderung des jeweils letzten Nukleotids am 3'-Ende der Rückwärts-Primer, verhalten sich die Primer komplementär zur jeweils namensgebenden Mutation, sodass diese im Idealfall nur an mutierte Sequenzen binden. Aufgrund des Einsatzes dieser allelspezifischen Primer spricht man auch von einer allelspezifischer PCR. Der eingesetzte Vorwärts-Primer war dabei immer derselbe.

Somit konnte auf fünf verschiedene Punktmutationen im Codon 12 des KRAS-Gens untersucht werden: G12D, G12A, G12V, G12S sowie G12C.

Als Positivkontrollen diente DNA folgender Zelllinien: LS174T für G12D, SW1116 für G12A, SW620 für G12V, A549 für G12S sowie MiaPaCa-2 für G12C.

Aufgrund des anzunehmenden großen Wildtyphintergrunds unserer Proben wurde außerdem ein Wildtyp-Blocker, am 3'-Ende einen Phosphatrest enthaltend, eingesetzt (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Verwendete Primer in der qPCR

Name	Direktion	Sequenz 5' – 3'
A1	vorwärts	GCCTGCTGAAAATGACTGA
G12D	rückwärts	CTCTTGCCTACGCCAT
G12A	rückwärts	CTCTTGCCTACGCCAG
G12V	rückwärts	CTCTTGCCTACGCCAA
G12S	rückwärts	TCTTGCCTACGCCACT
G12C	rückwärts	TCTTGCCTACGCCACA
WT-Blocker	rückwärts	GCCTACGCCACCAGCTC-PHO

Die Sequenzen der eingesetzten Primer wurden mittels der *blast*-Funktion des *pubmed* auf Korrektheit überprüft.

Die qPCR lief unter den in Tabelle 15 aufgezeigten Bedingungen:

Tabelle 15: qPCR-Bedingungen

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
<i>Hold</i>	95 °C	5 min	1x
<i>Cycling</i>	95 °C 60 °C	10 s 30 s	45x
<i>HRM step</i>	65 °C - 95 °C	0.1 °C aller 2 s	1x

Tabelle 16 zeigt die eingesetzten Reagenzien in definierten Volumina:

Tabelle 16: Reaktionsansatz der qPCR

Reaktionsansatz qPCR	Volumen in µl
2x HRM PCR Master Mix	12,5 µl
Vorwärts-Primer (5 µM)	1,5 µl
Rückwärts-Primer (5 µM)	1,5 µl
WT-Blocker (10 µM)	3 µl
Wasser (nukleasefrei)	4,5 µl
DNA-Probe	2 µl (10 ng/µl)
Gesamtvolumen	25 µl

3.2.4 High resolution melting analysis (HRMA)

Zur Charakterisierung der PCR-Produkte wurde im Anschluss eine hochauflösende Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Amplifikate wurden dazu einem Temperaturgradienten ausgesetzt und das Schmelzverhalten mithilfe von EvaGreen beobachtet. Da die Temperatur alle zwei Sekunden um nur 0,1 °C stieg (siehe Tabelle 15), können mittels der HRMA sehr feine Unterschiede im Schmelzverhalten herausgearbeitet werden.

Der Schmelzpunkt T_M ist die Temperatur, bei der die doppelsträngige DNA in ihre zwei Einzelstränge zerfällt. Diese ist neben der Größe auch von der Basensequenz des Amplifikats, insbesondere des Guanin-Cytosin-Gehaltes, abhängig. Wird die Schmelztemperatur T_M erreicht, wird gebundenes EvaGreen freigesetzt, was sich in der Schmelzkurve als rasche Abnahme des Fluoreszenz-Signals zeigt.

Eine untersuchte Probe wurde als mutiert eingestuft, wenn sie nach erfolgreicher Amplifikation außerdem ein vergleichbares Schmelzverhalten bzw. T_M wie die jeweilige mitgeführte Positivkontrolle aufwies ($\pm 0,4$ °C).

Da die qPCR mit anschließender HRMA in unserem Labor noch nicht etabliert war, waren im Voraus folgende Schritte notwendig:

3.2.5 Verdünnungsreihen zur Sensitivitätsanalyse und Leistungsbeurteilung des qPCR/HRMA-Assays

Da in den zu untersuchenden Proben eine relativ geringe Mutationslast zu erwarten war, war eine möglichst hohe Sensitivität des qPCR/HRMA-Assays Voraussetzung für unser Vorhaben.

Zur Feststellung der Nachweisgrenze von Mutationen in einem Wildtypintergrund wurde dazu für die Zelllinien SW620, SW1116, LS174T, MiaPaCa-2 und A549 jeweils eine Verdünnungsreihe erstellt: Hierzu wurde die jeweilige Zelllinien-DNA mit WBC-DNA gesunder Spender (KRAS-WT) in den Verhältnissen 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:33; 1:100 sowie 1:1000 gemischt und eingesetzt.

Die niedrigste Verdünnungsstufe, in der die Mutation detektiert werden konnte, diente als Indikator für die Sensitivität des Assays.

Zur Erstellung der Standardverdünnungskurven wurde der Logarithmus der eingesetzten DNA-Menge der Positivkontrolle (x-Achse: log DNA (pg)) gegen den ermittelten Ct-Wert (y-Achse: Ct-Wert) in ein Punktediagramm aufgetragen und deren Regressionsgerade bestimmt. Mithilfe der Steigung m dessen konnte anhand folgender Formel die Effizienz E der PCR-Reaktion berechnet werden:

$$E = 1 - 10^{\left(\frac{-1}{m}\right)}$$

Eine Effizienz von $E=1$ gilt dabei als ideal und bedeutet eine Verdopplung der amplifizierten DNA pro Zyklus. Als weiterer Leistungsparameter wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 herangezogen. Durch diesen wird das Maß der Abweichung der einzelnen Datenpunkte von der Regressionsgeraden der Standardverdünnungsreihe angegeben. Ein Wert nahe 1 wird als sehr gute Linearität definiert.

3.2.6 Spezifitätsanalyse des qPCR/HRMA-Assays

Zur Verifizierung der Spezifität der eingesetzten Primerpaare wurden mehrere Negativproben, d.h. Proben mit KRAS-Wildtyp (KRAS-WT) oder anderen KRAS-Mutationen als der zu untersuchenden eingesetzt und deren Amplifikation sowie Schmelzverhalten beurteilt.

Bei jeder durchgeführten Analyse wurde außerdem eine Negativkontrolle in Form von WBC-DNA (KRAS-WT) sowie eine *No template Control* (NTC, Wasser anstelle von DNA) mitgeführt.

3.2.7 *Spiking*-Experimente ohne CellCollector®

Unter *Spiking* versteht man das Versehen von Proben mit einer definierten Anzahl von Tumorzellen. Als Probe diente in diesem Fall eine Suspension aus 20 BON-1-Zellen (KRAS-WT), denen 4 Zellen einer KRAS-mutierten Zelllinie zugesetzt wurden. Die Mutationslast in der Probe betrug demnach 16,7%. Dieses Experiment wurde fünfmal durchgeführt mit folgenden Zelllinien: SW1116 (G12A-MUT), SW620 (G12V-MUT), LS174T (G12D-MUT), MiaPaCa-2 (G12C-MUT) und A549 (G12S-MUT).

Dazu wurden die sich in Kultur befindlichen Zellen nach ihrer Gewinnung durch Trypsin-Behandlung gewaschen, gezählt und auf 1 Zelle/ μ l verdünnt. Anschließend wurden 4 μ l (4 Zellen) der jeweiligen KRAS-mutierten-Zellsuspension und 20 μ l (20 Zellen) der BON-1-Zellsuspension in ein 0,1 ml PCR-Tube pipettiert, herunterzentrifugiert und der Überstand bis auf 4 μ l verworfen.

Es folgte die MDA entsprechend des Originalprotokolls (da hier kein CellCollector® verwendet wurde). Nachfolgend wurde die Probe in die qPCR mit anschließender HRMA eingesetzt. Das Ergebnis wurde per Pyrosequenzierung verifiziert.

3.2.8 *Spiking*-Experimente mit dem CellCollector®

Für diese Experimente wurden die Zelllinien SW620, SW1116 und LS174T verwendet. Es gab 4 verschiedene Versuchsaufbauten (siehe Tabelle 17). Für die ersten drei Versuchsaufbauten wurde 2,6 ml EDTA-Blut gesunder Spender, welches kurz vor Versuchsbeginn abgenommen wurde, verwendet. Im 4. Versuchsaufbau wurde statt 2,6 ml Blut die gleiche Menge DMEM-Medium verwendet. Dazu wurde eine 2,6 ml EDTA-Monovette für 30 Sekunden zentrifugiert, um anschließend das EDTA abzusaugen. Nach zweimaligem Spülen mit DMEM wurde sie mit 2,6ml DMEM befüllt.

Tabelle 17: Versuchsaufbauten der *Spiking*-Experimente mit dem CellCollector®

	verwendete Zelllinie/n	zugesetzte Zellzahl	Medium	Inkubationszeit des CellCollector®
1.Versuchsaufbau	SW620 LS174T SW1116	100 Zellen	Blut eines gesunden Spenders (2,6 ml)	30 min
2.Versuchsaufbau	SW620	100 Zellen	Blut eines gesunden Spenders (2,6 ml)	90 min
3.Versuchsaufbau	SW620	240 Zellen	Blut eines gesunden Spenders (2,6 ml)	90min
4.Versuchsaufbau	SW620 LS174T	100 Zellen	DMEM-Medium (2,6 ml)	90min

Die kultivierten Zellen wurden durch Trypsinierung abgelöst, in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zugabe von Medium wurde der Trypsin-Verdau gestoppt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 5 ml PBS aufgenommen. Nach erfolgter Zellzählung wurde die Suspension entsprechend verdünnt.

Anschließend wurde je nach Versuchsaufbau eine definierte Zahl an Tumorzellen in die Monovette gegeben. Über eine Injektionskanüle eingeführt, inkubierte der CellCollector® in der Monovette für 30 bzw. 90 min auf einem Rollmischer bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Draht dreimal kurz in PBS getaucht und für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Der aktivierte Abschnitt des CellCollector® wurde mit einer Drahtschere in maximal 2 mm große Teile direkt in ein 0,1 ml PCR-Tube geschnitten, welches vorher mit 4,8 µl PBS befüllt wurde. Anschließend folgten MDA und qPCR mit nachfolgender HRMA.

3.2.9 Zellkultivierung

Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Zelllinien SW620, A549, MiaPaCa-2, LS174T wurden in DMEM + 10% FCS kultiviert. Für die Kultivierung der SW1116-Zellen wurde DMEM GlutaMaxx + 10% FCS verwendet und für die BON-1-Zellen das Medium DMEM/F-12 (1:1) + 10 % FCS + 2,5 mM Glutamin + 15 mM HEPES.

Der Wechsel des Mediums erfolgte alle zwei Tage. Die Zellen wurden je nach Zelldichte alle fünf bis 10 Tage passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 2 ml Trypsin für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 ml Medium wurde die Reaktion gestoppt. Die gewonnene Suspension wurde in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen für 3 Minuten bei 396x g zentrifugiert und das übrig gebliebene Zellpellet nach Absaugen des

Überstandes in der gewünschten Verdünnung resuspendiert. Die Zellsuspension konnte nun in bereits mit Medium befüllte T75-Zellkulturflaschen ausgesät werden.

3.2.10 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 8 µl der resuspendierten Zellsuspension auf die Zählkammer gegeben und die Anzahl der Zellen mit einem Zählkreuz ermittelt. Dafür wurde der Mittelwert zweier Großquadrate bestimmt. Die Zellkonzentration der Ausgangssuspension wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \text{gezählte Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.2.11 Kryokonservierung

Um eine langfristig sichere Lagerung garantieren zu können, wurden die Zellen in Gefriermedium aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen im 37°C-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, 5 ml Medium dazu gegeben und bei Raumtemperatur 3 Minuten bei 396x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das übrig gebliebene Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche ausgesät.

3.2.12 DNA-Isolierung

Aus allen kultivierten Zelllinien wurde DNA isoliert. Die DNA-Isolierung erfolgt in zwei Schritten, der Proteolyse und der DNA-Fällung. Zuerst wurde das Zellpellet in 5 ml SE-Puffer vollständig resuspendiert, anschließend 25 µl Proteinase K und 250 µl 10% SDS zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 1,5 ml gesättigter, steriler Natriumchlorid-Lösung (6 M) gefällt, die Suspension bei Raumtemperatur 15 Minuten bei 5251x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Durch Zugabe von 2 Volumina reinem Ethanol und langsamem Drehen wurde die DNA ausgefällt. Mittels eines Glashakens wurde die DNA gewonnen, anschließend in 70 % Ethanol gewaschen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. In 500 µl sterilem Wasser wurde die DNA aufgenommen und anschließend über Nacht bei 4 °C auf einem Rollmischer bewegt. Danach wurden 500 µl TE-Puffer hinzugegeben und das Röhrchen erneut bis zum vollständigen Lösen der DNA auf dem Rollmischer bei 4 °C gehalten. Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des NanoDrop™ 2000/2000c ermittelt. Dazu wurde 1 µl der DNA-Lösung auf den Sensor pipettiert.

Anhand der Ratio A260/A280, die sich im Idealfall bei ~1,8 befindet, konnte die Reinheit beurteilt werden.

3.2.13 FACS

FACS ermöglicht in kurzer Zeit die Typisierung von Einzelzellen aufgrund ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Bei einer FACS-Analyse passieren die Zellen einer Suspension nach hydrodynamischer Fokussierung einzeln einen Lichtstrahl, was zur Streuung desselbigen führt. Diese Streuung wird mittels Detektoren erfasst. Dabei unterscheidet man die Streuung in Vorwärtsrichtung als ein Maß für die Zellgröße und die Streuung in Seitwärtsrichtung als Maß für die Zellgranularität. Des Weiteren wird die Zellfluoreszenz gemessen. Besitzt die Zelle eine Fluoreszenzmarkierung (z.B. durch einen FITC-direkt-markierten Antikörper) wird der Farbstoff durch den Lichtstrahl (488nm) zur Emission angeregt und kann detektiert werden. Bei Verwendung von Fluorochromen wird die Autofluoreszenz einer Negativ-Kontrolle, die keinen Fluorochromzusatz enthält, bestimmt, um sie von positiven Fluorochromsignalen abzugrenzen.

Die Überprüfung der Expression des Oberflächenantigens EpCAM unserer eingesetzten Zelllinien war Voraussetzung für die *Spiking*-Experimente mit dem CellCollector®.

Dazu wurden die *in vitro* kultivierten Zelllinien LS174T, A549, MiaPaCa2, SW620 und SW1116 durch Trypsinierung abgelöst. Nach Zählung wurden ca. 20 000 Zellen in je 25 µl PBS + 5% FCS aufgenommen, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und vor der Messung auf 400 µl mit PBS + 5% FCS aufgefüllt. Zielgröße dieser Messung war die Autofluoreszenz der ungefärbten Zellen.

Für die darauffolgende Messung wurden 20 000 Zellen in 22,5 µl PBS + 5% FCS + 2,5 µl FITC-direktmarkiertem Anti-EpCAM-Antikörper aufgenommen und für eine Stunde bei Dunkelheit inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen und Zentrifugation mit 1 ml PBS entfernt und das Zellpellet anschließend in 400 µl PBS + 5% FCS resuspendiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software Flow Jo durch einen quantitativen Vergleich der Floreszenzen aus beiden Messungen.

3.2.14 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist durch den Einsatz Farbstoff-markierter Antikörper zur Lokalisierung zellulärer Oberflächenantigene geeignet. Dieser bindet an das Antigen, sofern vorhanden - anschließend kann der Farbstoff unter dem Mikroskop durch Licht definierter Wellenlänge zur Emission angeregt und detektiert werden. Die Antigenexpression lässt sich

dadurch sowohl qualitativ als auch quantitativ beurteilen. Die Zellkernfärbung erfolgt mittels des Farbstoffs DAPI.

Die qualitative Verteilung des Oberflächenproteins EpCAM der zuvor in der FACS-Analyse als positiv gewerteten Zelllinien sollte hier betrachtet werden. Dazu wurde ein FITC-direktmarkierter Anti-EpCAM-Antikörper verwendet.

Die Zelllinien SW620, SW1116 und LS174T wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen in einer mit Medium gefüllten Kulturschale ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Deckgläschen wurden in eine 24-well-Platte überführt und durch dreimaliges Befüllen mit PBS und anschließendem Absaugen von restlichem Medium befreit. Die Fixierung der Zellen fand durch Inkubation in 4 % PFA/PBS für zehn Minuten statt.

Zusätzlich wurde die Zelllinie SW1116 in einer T75-Zellkulturflasche kultiviert, durch EDTA-Behandlung abgelöst und anschließend gezählt sowie verdünnt. 2300, 4600, 9200 sowie 23000 Zellen wurden mithilfe einer Cytospin 4 Zentrifuge auf die Objektträger aufgebracht. Die Fixierung erfolgte auch hier durch Inkubation in 4 % PFA/PBS-Lösung für zehn Minuten. Anschließend wurde der Objektträger kurz mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Aufgrund optimaler Verhältnisse wurde zur Auswertung der Objektträger mit 9000 Zellen herangezogen.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen fand eine Inkubation in 1 % Magermilch/PBS für 30 Minuten statt. Anschließend inkubierte der Anti-EpCAM-Antikörper für eine Stunde in dunkler Umgebung. Durch dreimaliges Waschen mit PBS konnten ungebundene Antikörper entfernt werden. Nach kurzem Eintauchen in Wasser und Ethanol wurden die Deckgläschen bzw. der Objektträger getrocknet. Letztlich wurde auf die Objektträger ein Tropfen Eindeckmedium inklusive des Kernfarbstoffs DAPI gegeben, die Deckgläschen in diesen Tropfen hineingelegt und ein Deckglas oben aufgelegt. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte mittels des Immunfluoreszenzmikroskops Nikon TE 2000E.

4. Ergebnisse

4.1 Optimierung der *Mikroarray*-Analysen

4.1.1 Einsatz unterschiedlicher DNA-Mengen

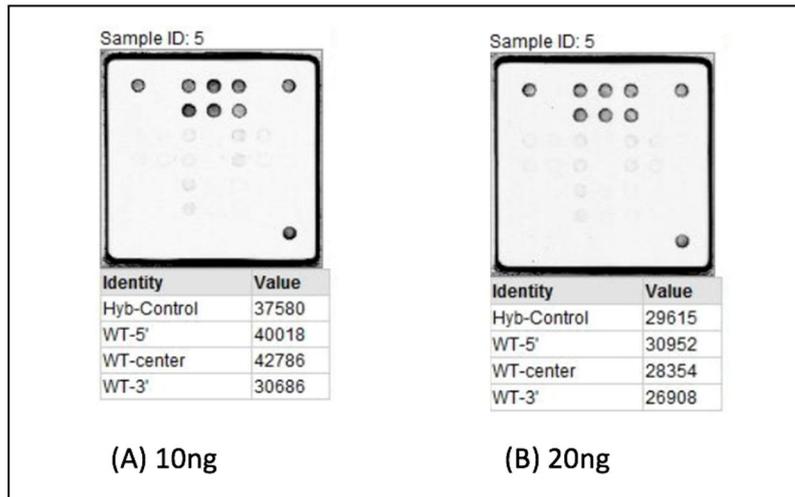


Abbildung 4: Einsatz unterschiedlicher DNA- Mengen unter ansonsten identischen Bedingungen

Um die optimale Menge an Matrizen-DNA für die Mutationsanalysen mit dem *Mikroarray* zu bestimmen, wurden zuvor (A) 10 ng sowie (B) 20 ng der Probe 5 eingesetzt (siehe Abbildung 4). Es zeigte sich, dass das Signal bei 20 ng eingesetzter DNA deutlich schwächer ausfällt als bei 10ng. Möglicherweise lässt sich dieser Sachverhalt durch Inhibierung aufgrund zu viel Matrizen-DNA erklären. Für nachfolgende Analysen wurden aus diesem Grund folglich 10 ng Matrizen-DNA eingesetzt.

4.1.2 Einsatz unterschiedlicher Wildtypblocker-Konzentrationen

Zur Bestimmung der optimalen Wildtypblocker-Konzentration für eindeutige Ergebnisse wurden unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt und das Ergebnis beurteilt. Da in den von uns zu untersuchenden Proben eine hohe Wildtyplast zu erwarten war, wurden nur hohe Blocker-Konzentrationen von 0,5 bis 0,75 eingesetzt (zum Vergleich: im CHIPRON-Protokoll werden Konzentrationen von 0,1 - 0,5 vorgeschlagen). Als ideal wird eine sichtbare, aber nicht vollständige Unterdrückung des Wildtyps angesehen. Ist der Wildtyp vollständig unterdrückt, fehlt dem WT-Blocker der Bindungspartner und es kann zu Fehlhybridisierungen mit der mutierten DNA kommen.

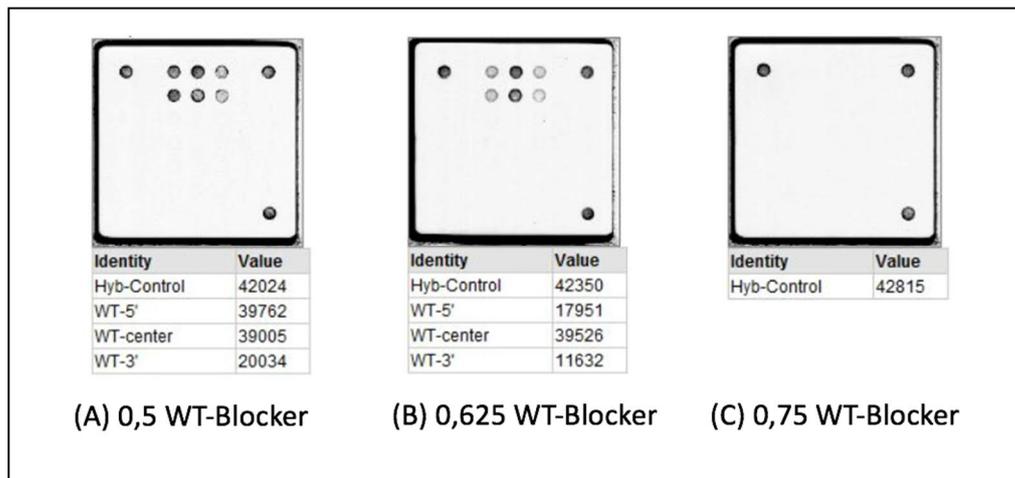


Abbildung 5: Einsatz verschiedener Wildtypblocker-Konzentrationen unter ansonsten identischen Bedingungen

Mit steigender Konzentration des eingesetzten WT-Blockers ist eine zunehmende Inhibierung des Wildtyps zu verzeichnen (siehe Abbildung 5). Während unter Einsatz von (A) 0,5 WT-Blocker der Wildtyp noch deutlich sichtbar ist, wird er durch (C) 0,75 WT-Blocker vollständig unterdrückt. Die Verwendung von (B) 0,625 WT-Blocker brachte eine deutliche, jedoch nicht komplette Inhibierung des Wildtyps mit sich. Diese Konzentration erschien somit passend und wurde für folgende Analysen der Patientenproben eingesetzt.

4.2 Evaluierung und Optimierung des qPCR/HRMA-Assays

4.2.1 Sensitivitätsanalyse mittels Standardverdünnungsreihen

Zur Überprüfung der Sensitivität unseres Assays und der verwendeten Primerpaare diente die Erstellung von Standardverdünnungsreihen. Dazu wurde die DNA der jeweiligen Positivkontrolle mit WBC-DNA (KRAS-WT) "verdünnt". Die niedrigste Verdünnungsstufe, in der die Mutation detektiert werden konnte, diente als Indikator für die Sensitivität des Assays.

Insgesamt ließ sich eine hohe Sensitivität in der Detektion von Punktmutationen verzeichnen: Die Mutationen G12A, G12D, G12S und G12V ließen sich bis zu einer Verdünnungsstufe von 0,1% mutierter DNA in einem Wildtyphintergrund von 99,9 % detektieren. G12C erreichte eine Sensitivität von 1 %. Abbildung 6A zeigt exemplarisch die Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe der Zelllinie SW1116 (G12A). In Abbildung 6B sind die dazugehörigen Schmelzkurven zu sehen. Der gemeinsame Schmelzpunkt T_M der einzelnen Verdünnungsstufen liegt bei 76,1 °C. Nur die letzte Verdünnungsstufe 0,1 % zeigte mit $T_M=76,32$ °C leichte Abweichungen, die jedoch im Rahmen liegenden Schwankungen ($\pm 0,4$ °C) entspricht.

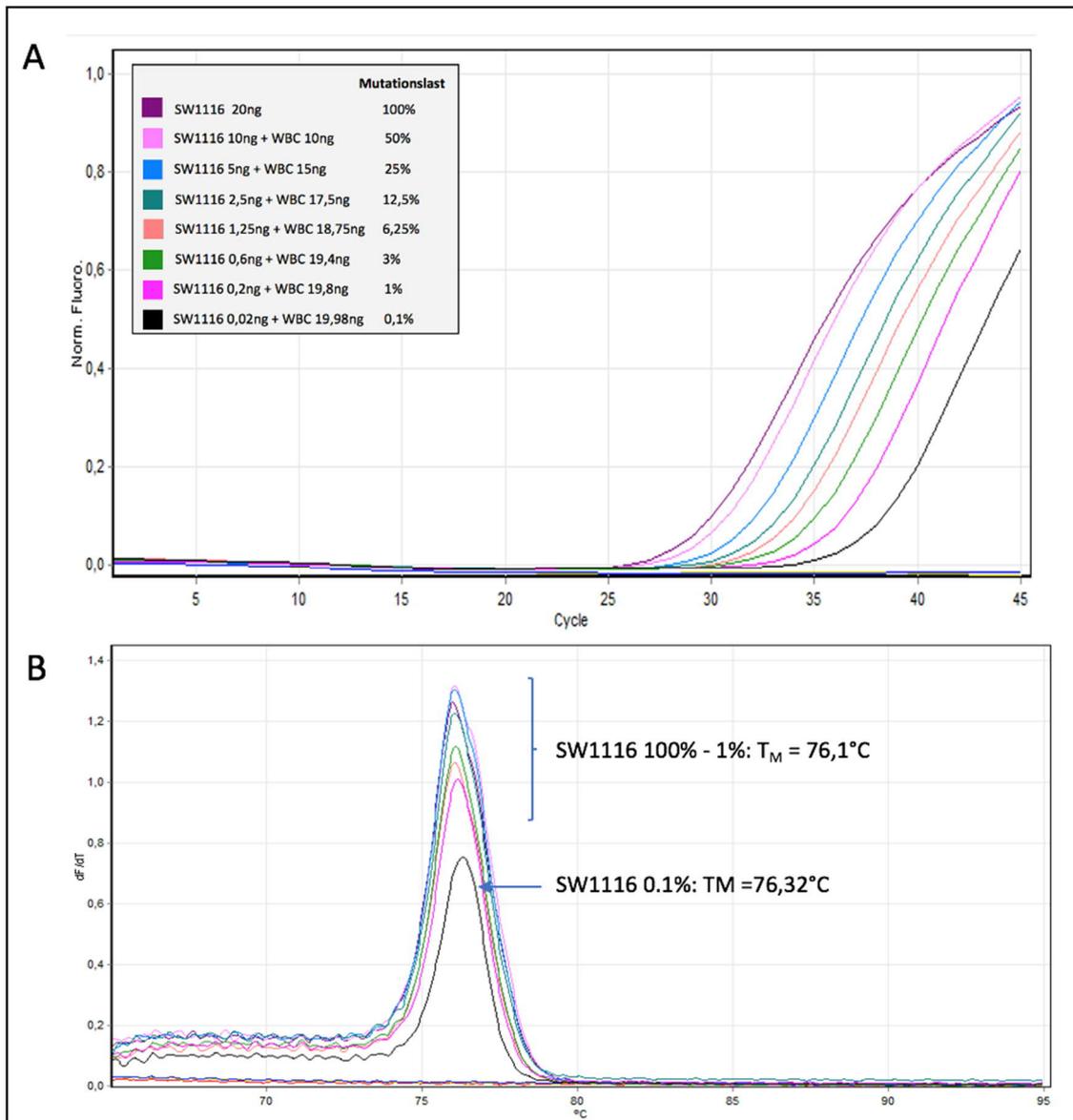


Abbildung 6: Amplifikationskurven (A) und dazugehörige HRMA (B) der Verdünnungsreihe SW1116/G12A.

Tabelle 18 fasst für die jeweils untersuchten Punktmutationen die erreichten Sensitivitätslevel sowie den gemessenen Schmelzpunkt T_M der Positivkontrolle mit der Spannweite R_{TM} innerhalb der Verdünnungsreihen zusammen.

Tabelle 18: Charakteristika der Verdünnungsreihen. Die Spannweite R_{TM} berechnet sich aus der Differenz der maximal gemessenen Schmelztemperatur abzüglich der minimal gemessenen Schmelztemperatur innerhalb der Verdünnungsreihe.

Verdünnungsreihe	Sensitivitätslevel	T_M Positivkontrolle (unverdünnt)	Spannweite R_{TM}
SW11116/G12A	0,1%	76,10°C	0,22°C
SW620/G12V	0,1%	75,67°C	0,08°C
MiaPaCa2/G12C	1%	75,28°C	0,29°C
LS174T/G12D	0,1%	75,60°C	0,1°C
A549/G12S	0,1%	75,25°C	0,35°C

4.2.2 Leistungsbeurteilung der qPCR

Um die Leistung zu beurteilen, wurden die Parameter Effizienz E sowie das Bestimmtheitsmaß R^2 , welche mithilfe der erstellten Regressionsgeraden der Standardverdünnungsreihen ermittelt wurden, herangezogen.

Insgesamt ließen sich gute bis sehr gute Effizienzen verzeichnen: 1,03 für G12A, 0,9 für G12V, 0,99 für G12C, 0,98 für G12D und 0,92 für G12S (siehe Tabelle 19). Auch die ermittelten R^2 -Werte lagen in einem Bereich von minimal 0,95 bis maximal 0,99 (siehe Tabelle 19), was einer guten Linearität entspricht.

Abbildung 7 zeigt exemplarisch die Regressionsgerade der Standardverdünnungsreihe SW11116/G12A, deren Regressionsgeradengleichung sowie R^2 . Die berechnete Effizienz lag bei 1,03, der Regressionskoeffizient R^2 bei 0,99, was beides nahezu Idealwerten entspricht.

Tabelle 19: Parameter E und R^2 zur Leistungsbeurteilung des qPCR-Assays

Standardverdünnungsreihe	Steigung m	Effizienz E	Bestimmtheitsmaß R^2
SW11116 / G12A	-3,5217	1,03	0,99
SW620 / G12V	-3,5882	0,9	0,99
MiaPaCa2 / G12C	-3,1725	0,99	0,98
LS174T / G12D	-3,3763	0,98	0,95
A549 / G12S	-3,5103	0,92	0,99

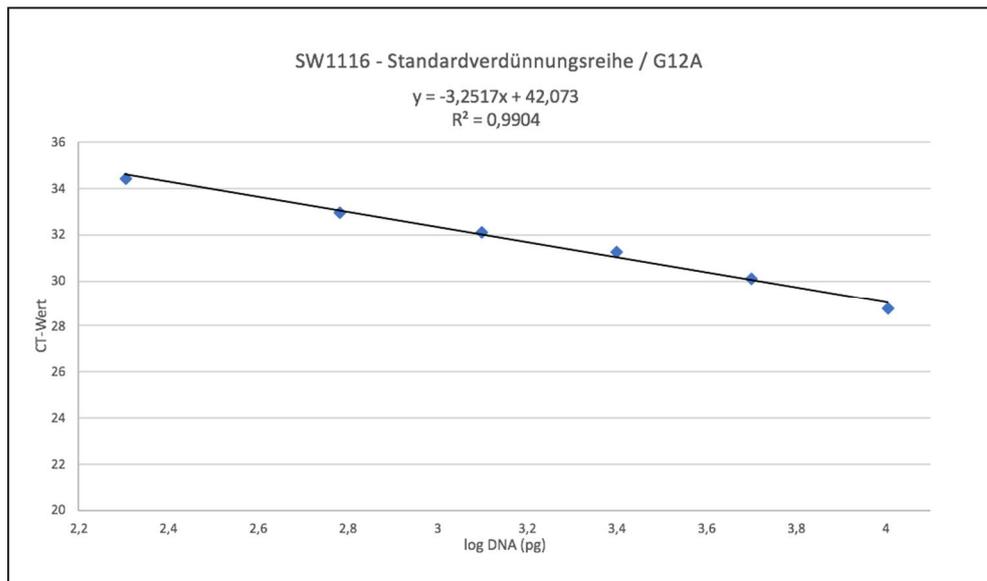


Abbildung 7: Regressionsgerade der Standardverdünnungsreihe SW1116/G12A-Mutation. Aufgetragen sind die ermittelten Ct-Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten DNA-Menge (pg) der Positivkontrolle. Die Regressionsgeradengleichung und das Bestimmtheitsmaß sind ebenfalls angegeben.

4.2.3 Beurteilung der Spezifität

Jedes Primerpaar wurde außerdem hinsichtlich seiner Spezifität getestet. Dazu wurde die Amplifikation bzw. das Schmelzverhalten eingesetzter Negativproben analysiert (siehe 3.2.6). In der Regel wurden sechs verschiedene Negativproben eingesetzt.

Bei der Detektion der Mutationen G12A, G12C und G12V zeigte sich eine sehr hohe Spezifität: Selbst in hohen Amplifikationszyklen $Ct > 38$ konnte keinerlei Amplifikation verzeichnet werden. Unter Verwendung der Primer zum Nachweis der Mutation G12D kam es in einem späten Zyklus von $Ct = 42$ zur Amplifikation von WBC-DNA. (siehe Abbildung 8A). Das Amplifikat schmolz jedoch bei $T_M = 71$ °C und damit deutlich eher als die Positivkontrolle LS174T bei $T_M = 75,6$ °C (siehe Abbildung 8B). Aufgrund der niedrigen Schmelztemperatur kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem entstandenen Produkt um Primer-Dimere handelt. Alle 5 weiteren eingesetzten Negativproben blieben ohne Amplifikation.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Spezifitätsanalyse des Primerpaars G12S. Auch hier kam es in einem recht hohen Zyklus $Ct = 37,71$ zur Amplifikation von HCT116-DNA (G13D-Mutation) (siehe Abbildung 9A). Doch auch hier konnte anhand der deutlich voneinander abweichenden Schmelztemperaturen in der HRMA zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimer unterschieden werden (siehe Abbildung 9B).

Außerdem ersichtlich wird dabei, wie wichtig bei der Auswertung und Einordnung der Daten nicht die alleinige Betrachtung der Amplifikationskurven, sondern immer die Zusammenschau aus Amplifikation und Schmelzverhalten ist.

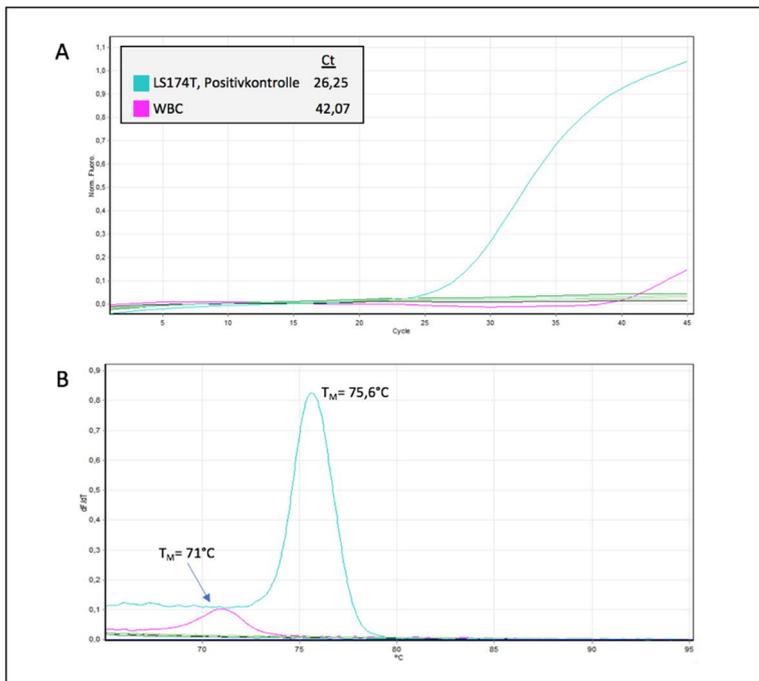


Abbildung 8: Spezifitätsanalyse G12D. A: Amplifikationskurven der Positivkontrolle LS174T-DNA sowie der Negativprobe WBC-DNA. B: Dazugehörige Schmelzkurvenanalyse.

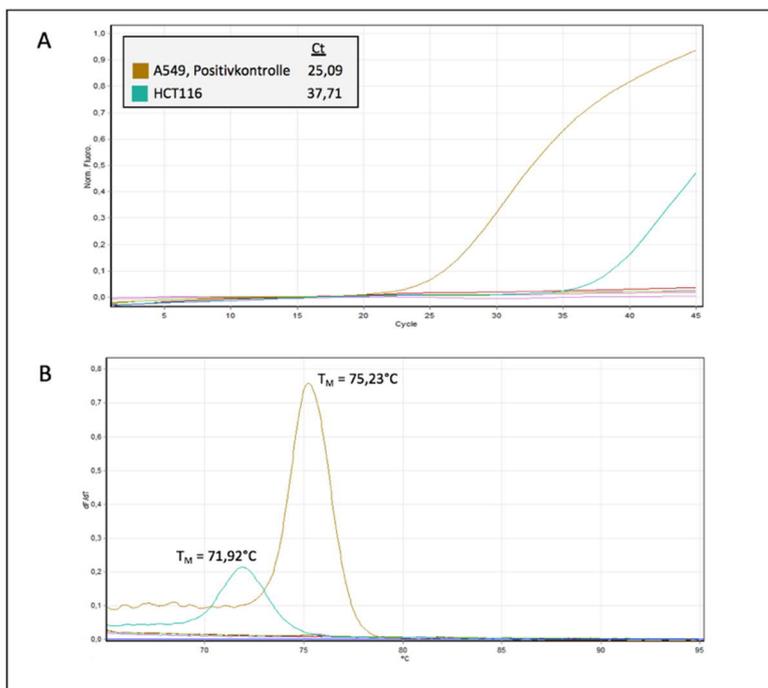


Abbildung 9: Spezifitätsanalyse G12S. A: Amplifikationskurven der Positivkontrolle A549-DNA sowie der Negativprobe HCT116-DNA. B: Dazugehörige Schmelzkurvenanalyse.

4.3 Untersuchungen zur EpCAM-Expression der verwendeten Zelllinien

4.3.1 Ergebnisse der FACS-Analysen

Für sich anschließende *Spiking*-Experimente mit dem CellCollector® waren EpCAM-exprimierende Zellen Voraussetzung und damit Anlass für die folgenden Untersuchungen.

Dazu wurde die gemessene Fluoreszenzintensität nach Inkubation eines FITC-markierten-Anti-EpCAM-Antikörpers der Eigenfluoreszenz der jeweiligen Zelllinie, aus einer ersten Messung stammend, in einem Histogramm gegenübergestellt. Bei einem deutlichen *Shift* auf der X-Achse und damit einer Zunahme des Fluoreszenzsignals wurde eine Zelllinie als EpCAM-positiv gewertet. Kein bzw. lediglich ein marginaler *Shift* wiesen auf eine EpCAM-Negativität hin.

Als EpCAM-positiv gewertet wurden die Zelllinien SW1116, SW620 sowie LS174T (siehe Abbildung 10): Hier zeigte sich eine wesentliche Verstärkung des Fluoreszenzsignals nach Inkubation des Antikörpers.

MiaPaCa-2 sowie A549 erwiesen sich hingegen als EpCAM-negativ (siehe Abbildung 10). Diese Zelllinien wurden für weitergehende *Spiking*-Experimente mit dem CellCollector® nicht verwendet.

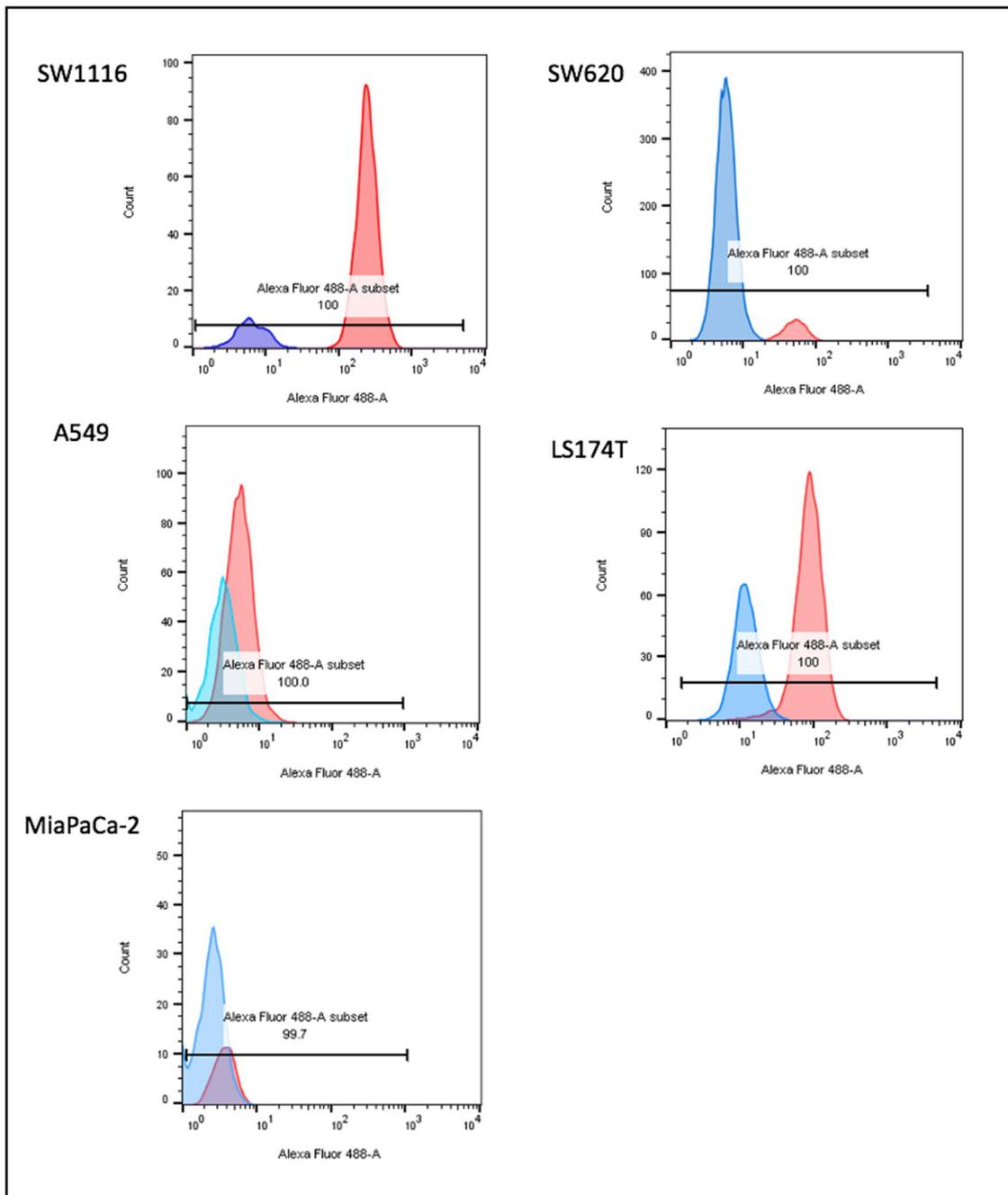


Abbildung 10: Histogramme der EpCAM-Expressionsanalyse der verwendeten Zelllinien. Dargestellt sind die EpCAM-Expressionsanalysen von 5 Zelllinien. Die X-Achse gibt die gemessene Fluoreszenz an, auf der Y-Achse wird die Zellzahl angegeben. Die Autofluoreszenz der Zellen ist dabei jeweils blau, die Fluoreszenz nach Inkubation des Anti-EpCAM-Antikörpers rot dargestellt.

4.3.2 Ergebnisse der Immunzytochemischen Färbung

Um die Lokalisation bzw. Verteilung von EpCAM auf der Oberfläche der mittels FACS als positiv gewerteten Zelllinien SW1116, SW620 und LS174T genauer zu untersuchen, folgte eine immunzytochemische Färbung dieser Zellen mittels des FITC-markierten Anti-EpCAM-Antikörpers und anschließender Visualisierung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Die Zelllinien SW620 und LS174T zeigten eine über die gesamte Oberfläche aller Zellen des Zellverbandes homogene Verteilung des Zelladhäsionsmoleküls EpCAM (siehe Abbildung 11A).

Die Zelllinie SW1116 zeigte nur auf der Oberfläche der außen liegenden Zellen des Zellverbandes eine homogene Verteilung. Die daraus resultierende These, die SW1116-Zellen verlieren im Inneren des Zellverbandes ihre EpCAM-Expression, konnte in einem sich anschließenden Experiment, in welchem die Zellen nach Vereinzeln mithilfe einer CytospinTM-Zytozentrifuge auf den Objektträger aufgebracht und angefärbt wurden, nicht bestätigt werden: Es zeigte sich eine homogene EpCAM-Expression über allen Zelloberflächen (siehe Abbildung 11B).

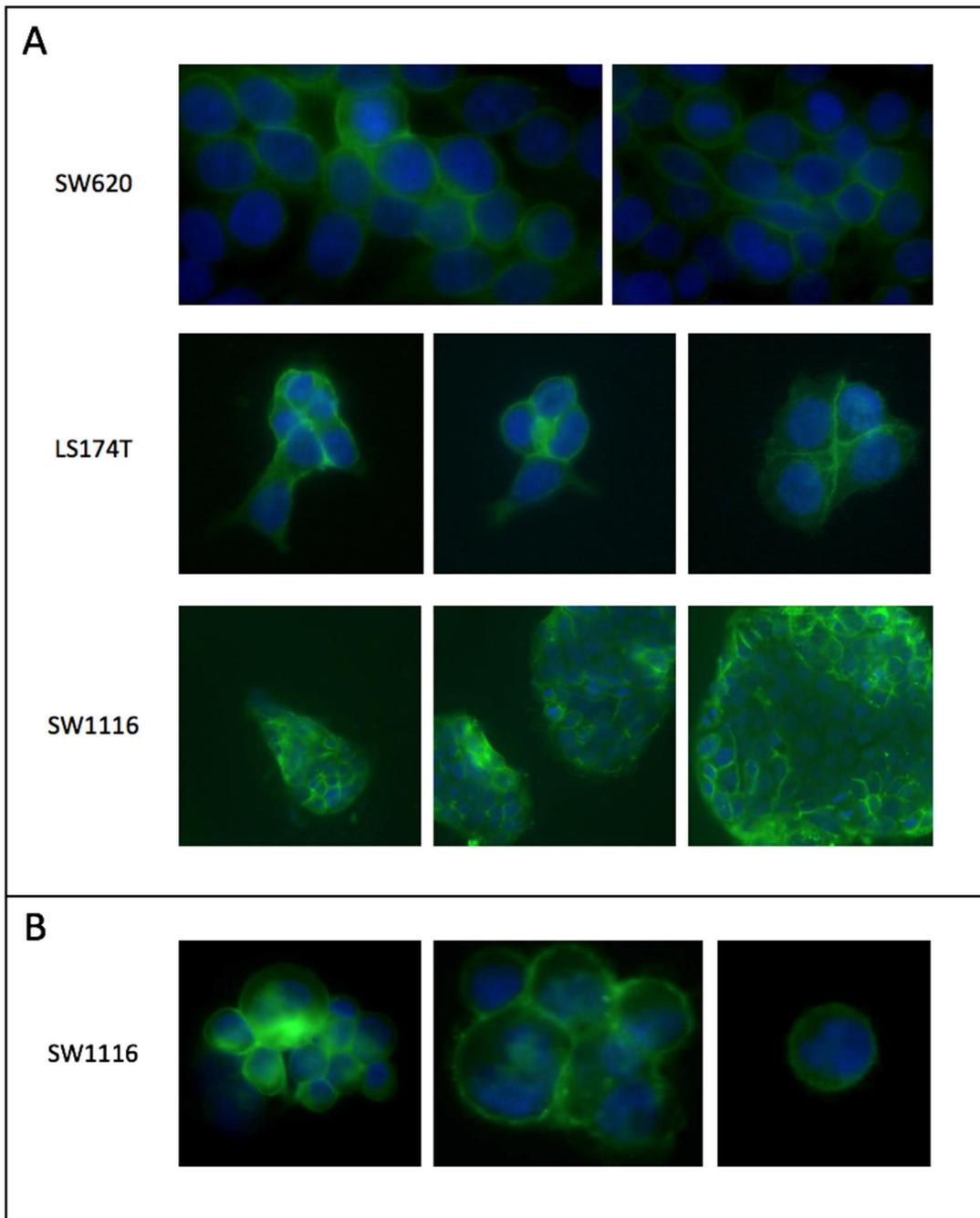


Abbildung 11: Immunzytochemische Färbung der EpCAM-Expression bzw. -Verteilung. Dargestellt ist jeweils ein *Overlay* aus der Kernfärbung mithilfe des Farbstoffs DAPI (blau) sowie der EpCAM-Lokalisation mithilfe des FITC-gekoppelten EpCAM-Antikörpers (grün). A: EpCAM-Expression der Zelllinien SW620, LS174T, SW1116; Anfärbung im Zellverband nach direkter Kultivierung auf Deckgläschen. B: EpCAM-Expression der Zelllinie SW1116, mithilfe einer Cytospin™-Zytozentrifuge vereinzelt auf den Objektträger aufgebracht.

4.4 *Spiking*-Experimente

4.4.1 Ergebnisse der *Spiking*-Experimente ohne CellCollector®

Mithilfe dieses Experimentes galt es herauszufinden, ob die Kombination aus MDA und nachfolgender qPCR sowie HRMA geeignet war für molekulargenetische Untersuchungen an zirkulierenden Tumorzellen. Denn die relativ ungezielte Amplifikation während der MDA ließ die Frage aufkommen, ob ein dadurch schon bestehendes ungünstiges Verhältnis aus Mutation < WT weiter in Richtung des WT verschoben werden könnte und damit eine Mutationsanalyse erschwert bzw. unmöglich macht. In allen fünf durchgeführten Experimenten ließ sich ein positives Ergebnis im Sinne der erfolgreichen Detektion der jeweiligen Mutation verzeichnen, welches jeweils anschließend per Pyrosequenzierung bestätigt werden konnte. Zur Veranschaulichung soll auf zwei Experimente eingegangen werden.

In Abbildung 12 ist das Ergebnis der Zelllinie SW620 (G12V-MUT) zusammengefasst. Der Ct-Wert der *Spiking*-Probe liegt mit 27,64 etwas höher verglichen mit dem der Positivkontrolle bei Ct=25,25, was sich durch die niedrige Zahl von 4 zugesetzten SW620-Zellen erklären lässt (siehe Abbildung 12A). Mittels Schmelzkurvenanalyse lässt sich anhand der identischen Schmelztemperatur $T_M = 75,6^\circ\text{C}$ (siehe Abbildung 12B) die Mutation G12V detektieren. Zur Verifizierung wurde die Probe pyrosequenziert: Die Mutation c.35 G>T (G12V) wurde mit einer Allellast von 42% gefunden (siehe Abbildung 12C) und bestätigt damit das qPCR/HRMA-Ergebnis.

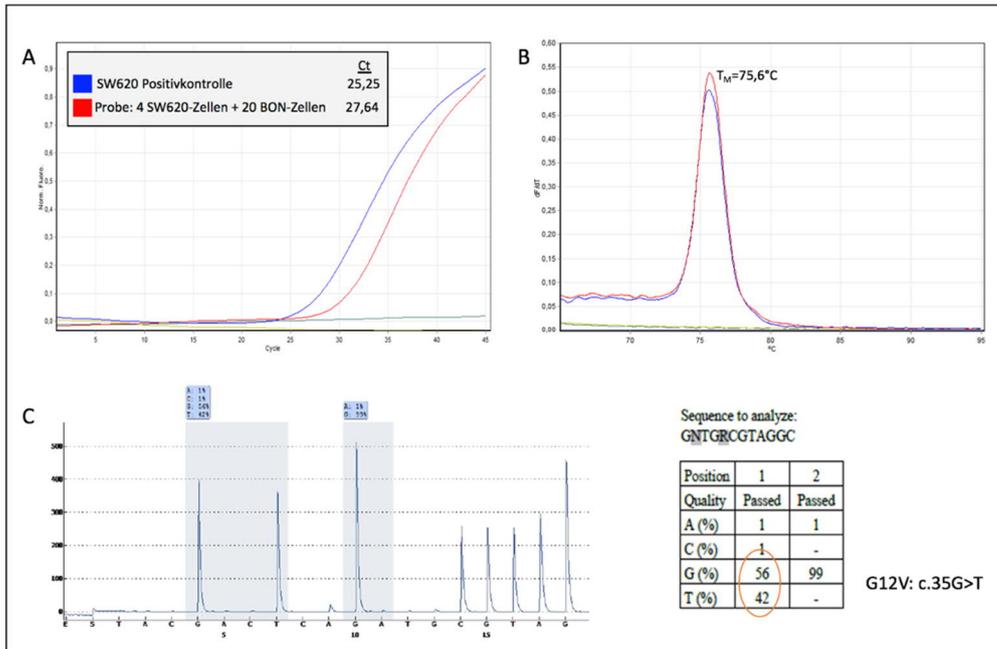


Abbildung 12: *Spiking*-Experiment ohne CellCollector®: 4 SW620-Zellen (G12V-MUT) wurden einer Suspension aus 20 BON-1-Zellen (KRAS-WT) zugesetzt. A: Amplifikationskurven der *Spiking*-Probe sowie Positivkontrolle B: Dazugehörige Schmelzkurvenanalyse; C: Pyrosequenzierung der *Spiking*-Probe

Die Ergebnisse der Zelllinie SW1116 (G12A-MUT) sind in Abbildung 13 zusammengefasst. Auch hier weist die Probe einen etwas höheren Ct-Wert auf als die Positivkontrolle (siehe Abbildung 13A), schmilzt jedoch bei exakt derselben Temperatur $T_M = 76,2^\circ\text{C}$ (siehe Abbildung 13B). In der Pyrosequenzierung zeigte sich die Mutation jedoch nur in einer Höhe von 6 % (siehe Abbildung 13C), was an der Nachweisgrenze der Pyrosequenzierung liegt. Aus diesem Grund wurde die Probe zusätzlich auf einen *Mikroarray* aufgetragen (Sensitivitätslevel: 1 %), welcher die Mutation detektieren und damit bestätigen konnte (siehe Abbildung 13D).

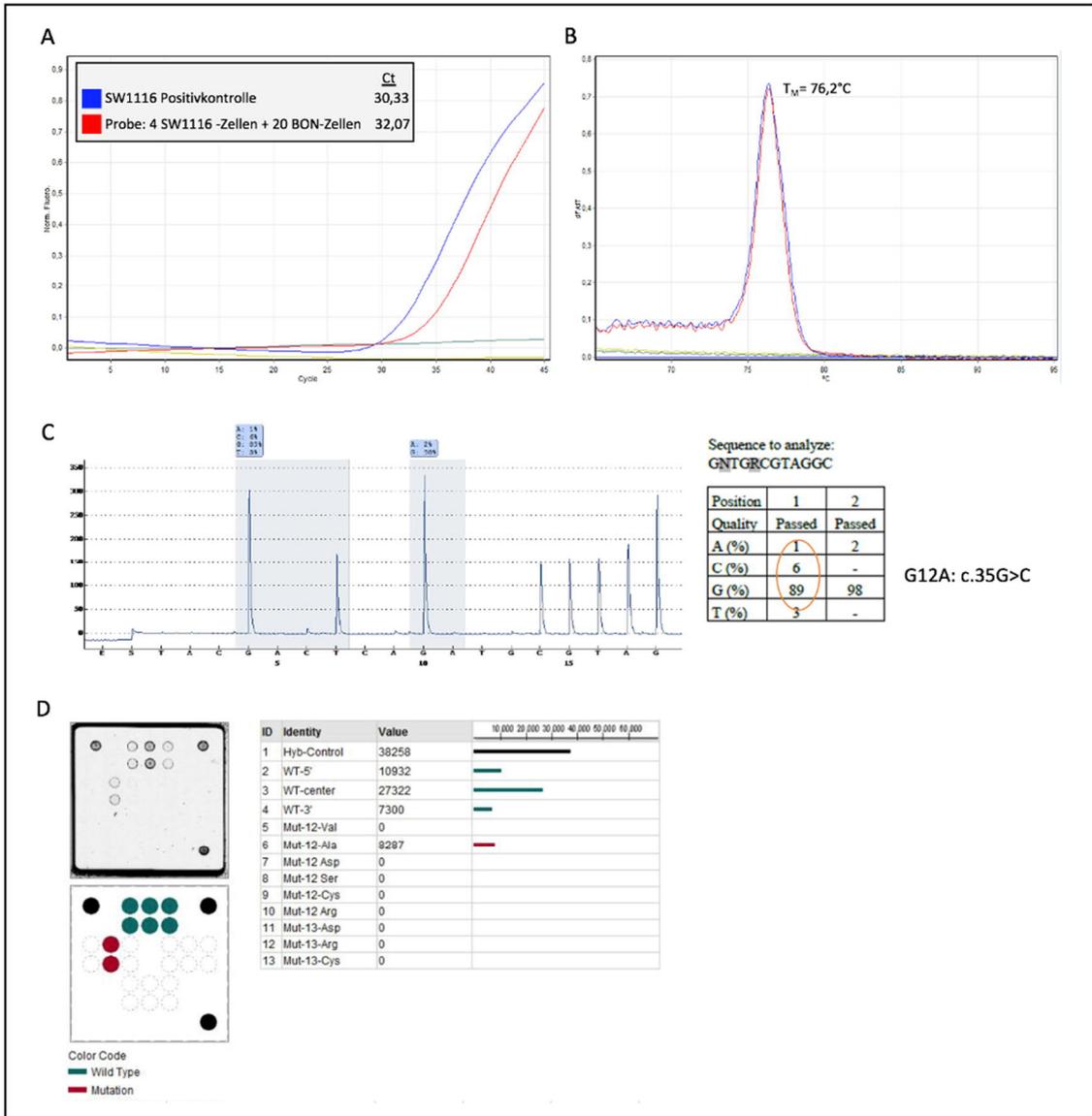


Abbildung 13: *Spiking*-Experiment ohne CellCollector®: 4 SW1116-Zellen (G12A-MUT) wurden einer Suspension aus 20 BON-1-Zellen (KRAS-WT) zugesetzt. A: Amplifikationskurven der *Spiking*-Probe sowie Positivkontrolle B: Dazugehörige Schmelzkurvenanalyse C: Pyrosequenzierung der *Spiking*-Probe D: *Mikroarray*-Analyse der *Spiking*-Probe

4.4.2 Ergebnisse der *Spiking*-Experimente mit dem CellCollector® in Blut

Anschließend folgten *Spiking*-Experimente mit dem CellCollector®.

Alle fünf in Blut gesunder Spender durchgeführten *Spiking*-Experimente verliefen ohne Erfolg.

Trotz der Änderung folgender Rahmenbedingungen (siehe 3.2.8, Versuchsaufbauten 1 bis 3)

konnte in keinem Experiment eine Amplifikation verzeichnet werden:

- Verlängerung der Inkubationszeit des CellCollector® von 30 auf 90 min
- Erhöhung der Anzahl der zugesetzten Tumorzellen in den Blutproben
- Variation der Blutspender

- Ablösung der Zellen in der Kultur mit EDTA/PBS anstatt Trypsin

Eine mögliche Ursache, die für die Erfolglosigkeit des Experimentes trotz Änderung o.g. Rahmenbedingungen in Betracht kam, war die Überlegung, dass vorhandene immunkompetente Zellen in der Blutprobe gesunder Spender die Tumorzellen innerhalb der Inkubationszeit erkennen und eliminieren könnten.

4.4.3 Ergebnisse der *Spiking*-Experimente mit dem CellCollector® in Medium

Aus diesem Grund wurde das *Spiking*-Experiment mit dem CellCollector® in ähnlicher Weise wiederholt, wobei jedoch dieses Mal die Tumorzellen nicht Blut, sondern dem Zellkulturmedium DMEM zugesetzt wurden (siehe 3.2.8, Versuchsaufbau 4). In beiden Experimenten, die durchgeführt wurden, konnte die Mutation detektiert werden. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierungen konnten dies bestätigen.

Exemplarisch zeigt Abbildung 14 die Ergebnisse mit der Zelllinie SW620 (G12V-mutiert). Der mit 35,51 relativ hohe Ct-Wert der *Spiking*-Probe (siehe Abbildung 14A) deutet auf einen geringen DNA-Gehalt hin. Trotz des Einsatzes von 100 Zellen haben demnach vermutlich eher wenige Zellen am Draht gebunden. Dennoch ermöglicht die Schmelzkurvenanalyse die Detektion der Mutation (siehe Abbildung 14B). Die Pyrosequenzierung bestätigt dieses Ergebnis, wobei die Allellast von 99 % Ausdruck dessen ist, dass nur mutierte Tumorzellen einer zellfreien Lösung zugesetzt wurden (siehe Abbildung 14C).

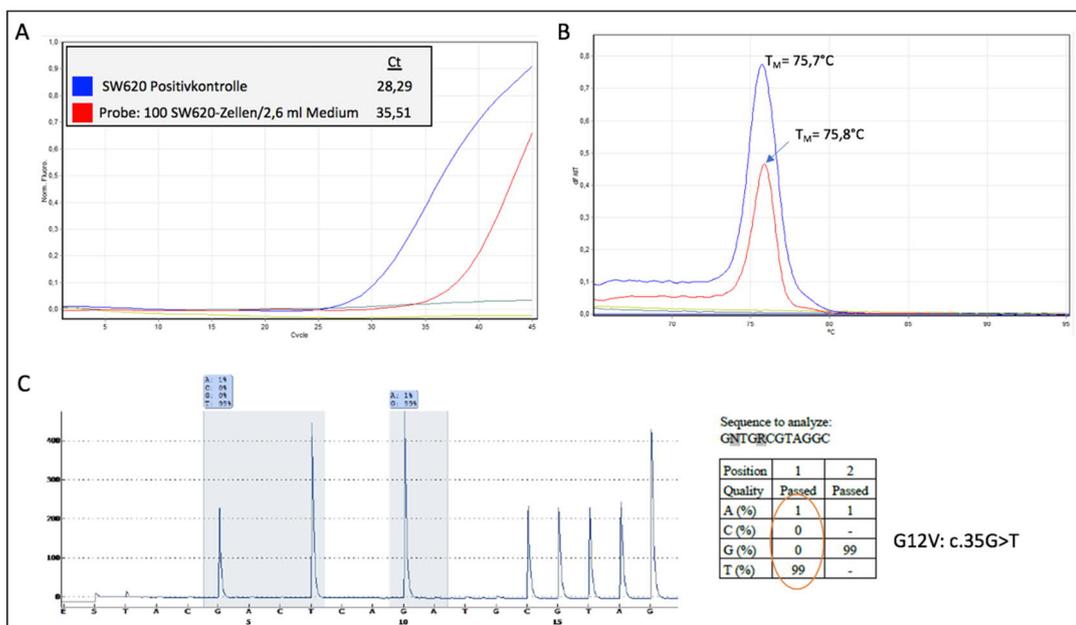


Abbildung 14: *Spiking*-Experiment mit dem CellCollector® in Medium mit SW620 (G12V-MUT). A: Amplifikationskurven der *Spiking*-Probe sowie der Positivkontrolle. B: Dazugehörige Schmelzkurvenanalyse. C: Pyrosequenzierung der *Spiking*-Probe

4.5 Patientenproben

Es lagen insgesamt 53 Proben vor, von denen jedoch 21 Proben keine CTCs gebunden hatten und somit nicht verwendet werden konnten. Die verbliebenen 32 Proben, von insgesamt 15 Patienten stammend, die von mir in dieser Arbeit untersucht wurden, sind in Tabelle 20 dargestellt. Der Median der gebundenen CTCs am CellCollector® lag bei 4, das Minimum bei 1 und das Maximum bei 32 CTCs. Eine weitere wichtige Kennzahl im Hinblick auf die benötigte Sensitivität der angewendeten molekulargenetischen Methoden war das Verhältnis von CTC- zu Gesamtzellzahl. Hier lag der Median bei 2%, der Minimalwert bei 0,3% und der Maximalwert bei 21,9%.

Tabelle 20: Auflistung der Patientenproben mit Übersicht über gebundene Zellen und deren Verhältnis

Patienten-Nr.	Proben-Nr.	CTC-Zahl	WBC-Zahl	Ratio CTC/(WBC+CTC)
1	1A	3	1000	0,3 %
2	2A	2	500	0,4 %
3	3A	4	50	7,4 %
	3B	5	50	9,1 %
	3C	4	350	1,1 %
4	4A	6	50	10,7 %
	4B	7	50	12,3 %
	4C	1	50	2,0 %
5	5A	5	50	9,1 %
	5B	5	300	1,6 %
6	6A	9	1000	0,9 %
	6B	15	100	13,0 %
	6C	2	100	2,0 %
7	7A	1	100	1,0 %
8	8A	4	500	0,8 %
	8B	3	1000	0,3 %
9	9A	8	500	1,6 %
	9B	2	50	3,8 %
10	10A	2	500	0,4 %
	10B	4	200	2,0 %
	10C	14	50	21,9 %
11	11A	2	200	1,0 %
12	12A	1	100	1,0 %
	12B	1	200	0,5 %
13	13A	2	200	1,0 %
14	14A	2	50	3,8 %
	14B	4	50	7,4 %
	14C	9	300	2,9 %
	14D	4	150	2,6 %
15	15A	8	200	3,8 %
	15B	32	2000	1,6 %

Patienten-Nr.	Proben-Nr.	CTC-Zahl	WBC-Zahl	Ratio CTC/(WBC+CTC)
	15C	3	50	5,7 %

Es wurden Kategorien hinsichtlich der Anzahl gebundener CTCs gebildet (siehe Abbildung 15). Nur 9 % der Proben hatten 10 CTCs oder mehr gebunden, lediglich 19 % wiesen zwischen 6 und 9 CTCs auf. Zwischen 1 und 5 CTCs konnten dementsprechend 72 % der Proben aufweisen. Betrachtet man diese wiederum genauer und bildet Subgruppen, hatten davon 13 % nur eine, 22 % zwei, 9 % drei, 19 % vier und 9 % 5 CTCs gebunden.

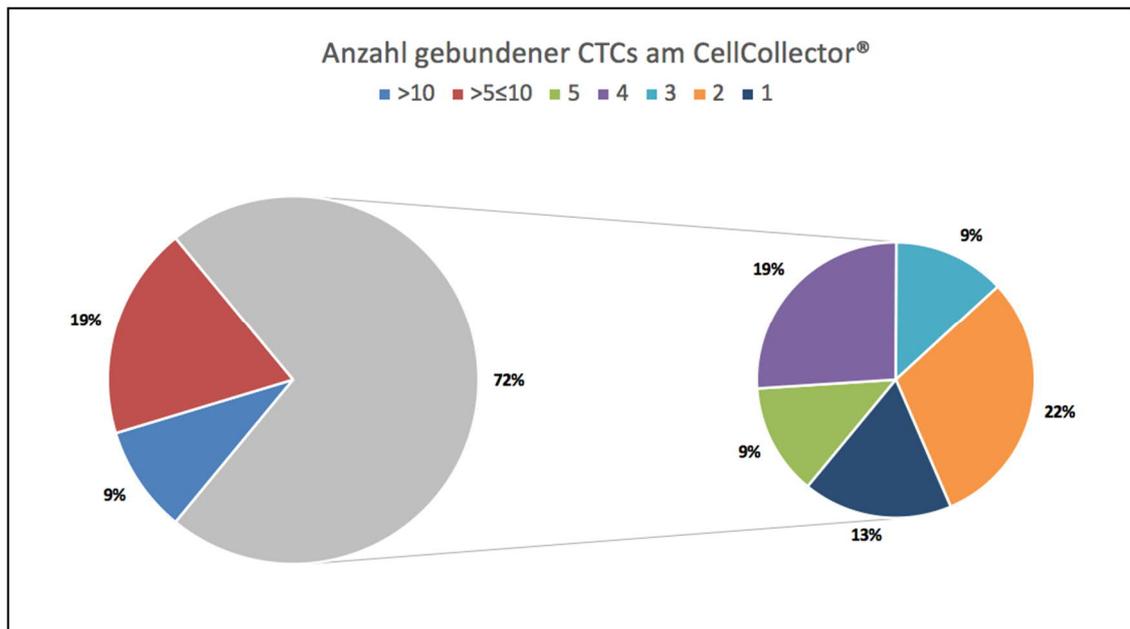


Abbildung 15: Kreisdiagramm zu relativen Häufigkeiten der Anzahl gebundener CTCs am CellCollector® pro Probe

4.6 KRAS-Mutationsanalysen der Patientenproben

4.6.1 Ergebnisse der *Mikroarray*-Analyse

In 3 der 32 Proben detektierte die Software eine KRAS-Mutation, welche zusammengefasst in Abbildung 16 dargestellt sind. Die übrigen 29 Proben blieben mit negativem Befund.

Probe 15C wies eine G12D-Mutation (c.34G>A) auf (siehe Abbildung 16A). Der Einsatz des WT-Blockers während der PCR war erfolgreich, es sind nur schwache Wildtyp-Signale zu verzeichnen. Das Sondensignal der Mutationssequenz G12D ist stärker als das Wildtypsignal.

Es gibt keine störenden Hintergrundsignale. In diesem Fall liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine G12D-Mutation vor.

In Probe 12A wurde eine G12S-Mutation (c.34G>T) detektiert (siehe Abbildung 16B). Das Wildtypsignal ist allerdings deutlich sichtbar und tritt stärker hervor als das Sondersignal der Mutationssequenz G12S. Außerdem sind auch in den Feldern der Mutationen G13D, G12C und G12D schwache Hintergrundsignale sichtbar. Trotz detektierter Mutation durch die Software ist das Vorliegen einer G12S-Mutation in dieser Probe eher unwahrscheinlich.

In der Probe 12B und damit ebenfalls vom Patienten 12 stammend, konnte eine G12D-Mutation (c.34G>A) festgestellt werden (siehe Abbildung 16C). Das Wildtypsignal ist allerdings deutlich stärker als das Sondersignal der Mutationssequenz G12D. Außerdem lässt sich im Bereich des Mutationsfeldes G13D ein schwaches Hintergrundsignal verzeichnen. Auch hier ist das Vorliegen der detektierten G12D-Mutation eher unwahrscheinlich.

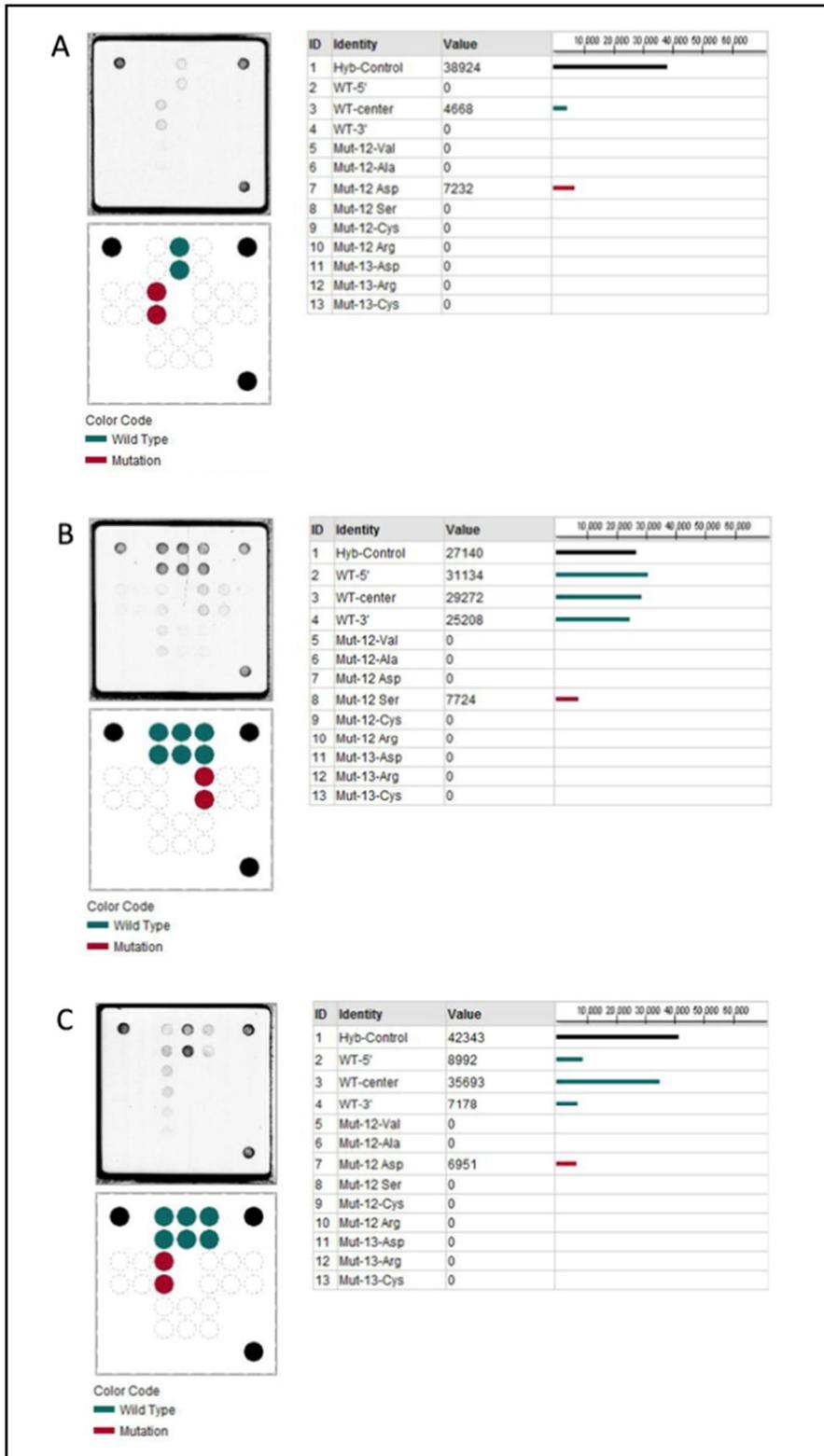


Abbildung 16: Ergebnisse der *Mikroarray*-Analysen der Proben mit positivem Mutationsbefund. A: Ergebnis der Probe 15C. B: Ergebnis der Probe 12A. C: Ergebnis der Probe 12B

4.6.2 Ergebnisse des qPCR/HRMA-Assays

Es wurde ein *Workflow* erstellt, mithilfe dessen die Auswertung der untersuchten Proben in zwei Schritten vorgenommen wurde (siehe Abbildung 17).

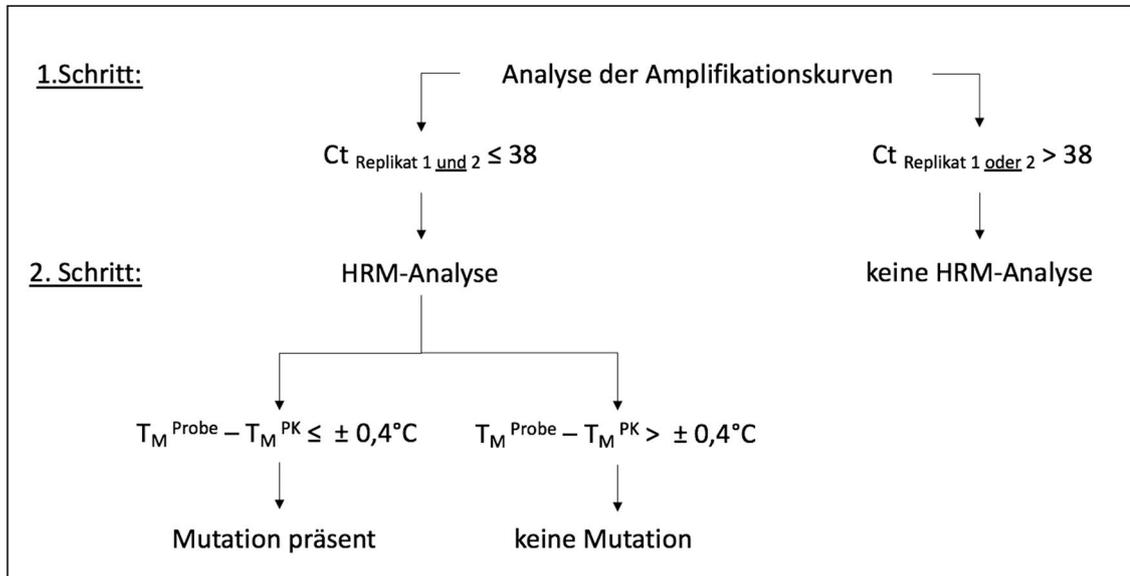


Abbildung 17: *Workflow* zur Auswertung der qPCR- und HRMA-Daten

Zuerst erfolgte die Analyse der Amplifikationskurven. Eine Übersicht über alle gemessenen Ct-Werte gibt Tabelle 21. Insgesamt wurden 4 Proben identifiziert, deren Ct-Werte beider Replikate bei ≤ 38 lagen. Hier erfolgte nun in einem zweiten Schritt die Betrachtung der Schmelzkurven. Jedoch wiesen alle untersuchten Proben ein von der mitgeführten jeweiligen Positivkontrolle abweichendes Schmelzverhalten auf, die Schmelztemperatur T_M wich in allen Fällen um mehr als ± 0,4°C von der T_M der Positivkontrolle ab. Exemplarisch ist in Abbildung 18 das Ergebnis der Probe 10B dargestellt, hier untersucht auf eine G12A-Mutation. Abbildung 18A zeigt die Amplifikationskurven, 18B die dazugehörigen Schmelzkurvenanalysen. Die Positivkontrollen schmelzen allesamt bei einer Temperatur von $T_M = 76,1^\circ\text{C}$, währenddessen die Schmelztemperatur der Probe 10B bei $T_M = 74,1^\circ\text{C}$ liegt. Das Vorliegen einer G12A-Mutation in der Probe 10B ist demnach unwahrscheinlich.

Somit konnte mittels der allelspezifischen qPCR und anschließenden HRM-Analyse keine Mutation detektiert werden.

Tabelle 21: Übersicht über die gemessenen Ct-Werte aller Proben. Rot hinterlegt sind die Daten der Proben, bei denen aufgrund der Ct-Werte eine HRM-Analyse erfolgte.

Proben-Nr.	G12A		G12V		G12S		G12C		G12D	
	Ct _{Replik1}	Ct _{Replik2}								
1A	negativ	negativ	negativ	negativ	39,91	38,7	negativ	negativ	negativ	negativ
2A	negativ	negativ	negativ	negativ	42,57	37,46	39,01	41,82	negativ	negativ
3A	negativ	negativ	negativ	negativ	36,86	40,46	36,61	negativ	negativ	negativ
3B	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	38,57	negativ	40,14	negativ
3C	negativ	negativ	negativ	negativ	38,06	negativ	negativ	negativ	37,34	negativ
4A	negativ	42,11	negativ							
4B	negativ									
4C	negativ	38,54	negativ							
5A	negativ									
5B	negativ	negativ	negativ	negativ	40,96	negativ	35,92	negativ	negativ	negativ
6A	39,56	negativ	negativ	negativ	39,23	negativ	43,38	negativ	40,86	negativ
6B	negativ									
6C	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	43,21	negativ	negativ	negativ
7A	negativ									
8A	42,93	negativ	negativ	negativ	41,03	negativ	negativ	negativ	42,58	negativ
8B	39,03	negativ	negativ	negativ	37,68	36,74	negativ	negativ	41,06	negativ
9A	32,53	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35,72	negativ	34,84	negativ
9B	negativ									
10A	negativ									
10B	33,71	34,54	negativ	negativ	38,66	negativ	negativ	negativ	34,6	34
10C	negativ	negativ	negativ	negativ	39,06	37,99	negativ	negativ	40,97	negativ
11A	negativ									
12A	negativ	39,08	negativ							
12B	negativ	negativ	negativ	negativ	37,63	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
13A	negativ	negativ	negativ	negativ	40,91	negativ	38,29	negativ	negativ	negativ
14A	39,81	40,91	negativ	negativ	40,04	38,99	negativ	negativ	41,96	negativ
14B	33,13	36,58	negativ							
14C	negativ									
14D	negativ									
15A	negativ									
15B	negativ									
15C	41,79	negativ	negativ	negativ	39,29	negativ	negativ	negativ	39,23	negativ

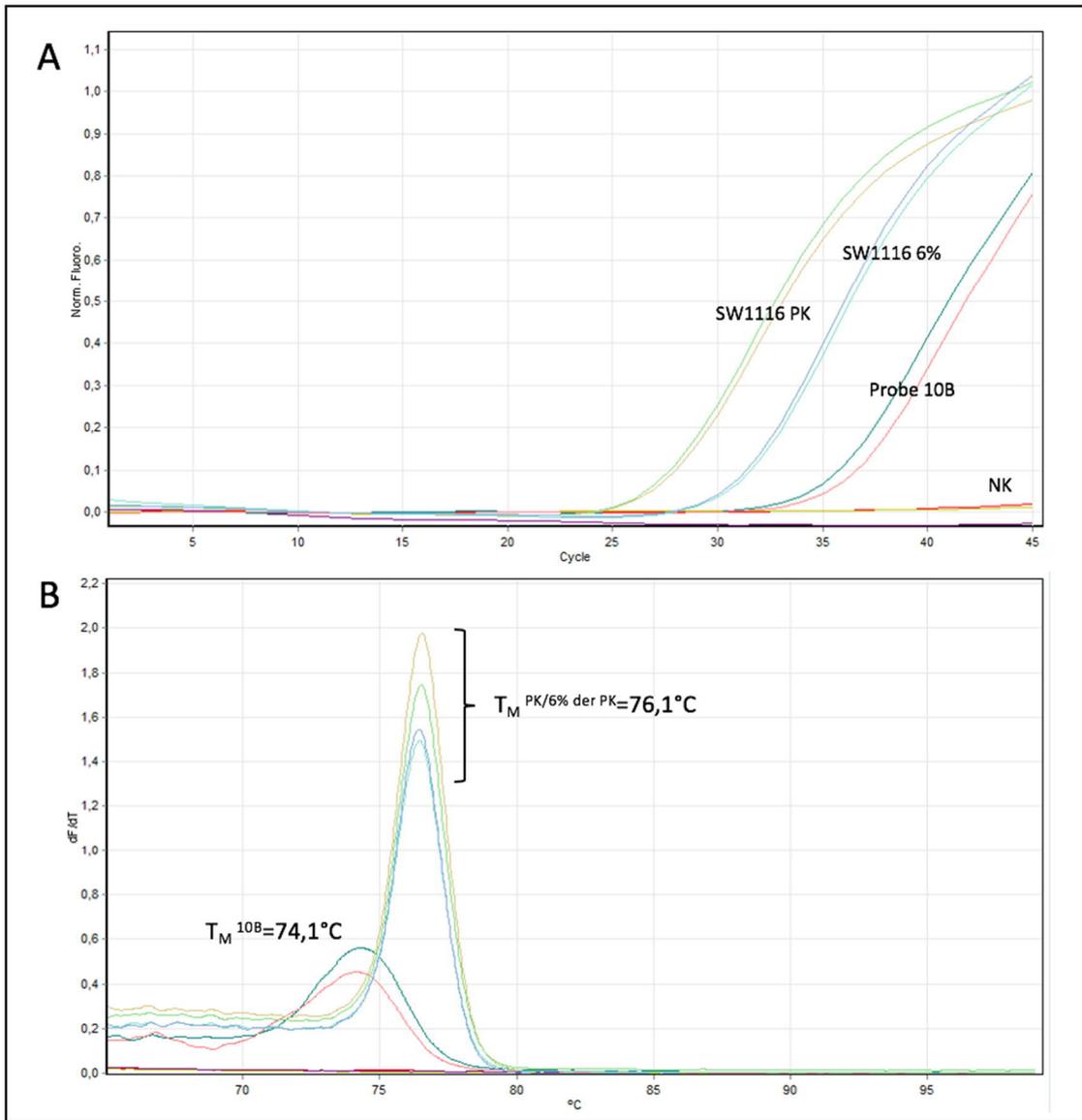


Abbildung 18: Exemplarische Darstellung der qPCR- und HRM-Analyse (G12A) der Probe 10B. A: Amplifikationskurven der unverdünnten sowie verdünnten (6% Mutationslast) Positivkontrolle (PK) SW1116, der Probe 10B sowie Negativkontrolle (NK). B: Dazugehörige Schmelzkurvenanalyse mit T_M der Positivkontrolle bei $76,1^\circ\text{C}$ und T_M der Probe 10B mit $74,1^\circ\text{C}$.

5. Diskussion

Durch ein zunehmendes molekulares Verständnis der Tumorentstehung und -biologie nimmt die molekulare Charakterisierung einer Lungenkrebserkrankung einen immer höheren Stellenwert ein. Die Detektion somatischer Mutationen kann im Sinne einer personalisierten Krebsmedizin unter anderem zu Therapieentscheidungen sowie zur Aufdeckung von Resistenzmechanismen beitragen. Als Goldstandard dafür gilt weiterhin die Untersuchung einer Gewebeprobe (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft 2018). Tumorzellen verstehen sich jedoch als heterogene, dynamische Zellpopulation, ihr genomisches Profil verändert sich im Verlauf der Erkrankung, nicht zuletzt mitbedingt durch Selektionsdruck unter der Therapie. Zur Beobachtung dieser Kinetik wäre eine longitudinale Untersuchung erstrebenswert. Aufgrund des Risikos, welches wiederholte Gewebeentnahmen mit sich bringen würden, sowie der unter eingeleiteter Therapie oftmals nicht mehr möglichen Darstellung des Tumors und damit verbunden fehlender Möglichkeit der Gewebeentnahme ist dies jedoch in den meisten Fällen nicht möglich. CTCs könnten hier eine supplementäre Plattform zur Gewebebiopsie bieten. Ihre Gewinnung ist minimal-invasiv und kann zu beliebigen Zeitpunkten im Verlauf einer Erkrankung wiederholt werden. Dies könnte ein Monitoring des Tumorprofils in Echtzeit erlauben und eine schnellere und gezieltere Therapiestratifizierung des Patienten möglich machen. Nichtsdestotrotz haben bis heute technische Schwierigkeiten, von der Isolierung bis hin zur molekularen Analyse von CTCs, den Fortschritt limitiert und weitere Forschung ist notwendig.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob CTCs, die mithilfe des CellCollector® *in-vivo* aus dem Blut von Lungenkrebspatienten isoliert wurden, mithilfe eines im Labor etablierten Assays molekulargenetisch charakterisiert werden können. Dieser Assay bestand aus einer allelspezifischen qPCR mit zusätzlich eingesetztem Wildtypblocker und anschließender hochauflösender Schmelzkurvenanalyse. Zum Vergleich wurde die kommerziell erhältliche Mikroarray-Analyse des Herstellers CHIPRON eingesetzt. Da das KRAS-Gen in Lungenkrebspatienten mit ca. 30% recht häufig mutiert ist (Bos 1989), sollte es als *proof-of-concept*-Modell dienen.

5.1 Der CellCollector® als CTC-Isolationsmethode

Die notwendige Voraussetzung für die Untersuchung von CTCs ist ihre vorherige Gewinnung aus dem Blut. Im Durchschnitt lässt sich bei Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium eine CTC in einem Hintergrund von 10^6 - 10^7 Leukozyten vorfinden (Alix-Panabières und Pantel

2013). Vergleicht man die Absolutzahlen miteinander, scheinen CTCs in Lungenkrebspatienten noch seltener vorzukommen als in anderen Tumorentitäten (Gorges, Penkalla et al. 2016). Vor allem NSCLC-Patienten, welche mit ca. 85% aller Lungenkrebspatienten einen Großteil ausmachen, weisen zehnmal niedrigere CTC-Zahlen auf als SCLC-Patienten (Heidrich, Ackar et al. 2020).

Um dieser Herausforderung gerecht zu werden, wurde in dieser Arbeit der GILUPI CellCollector® zur CTC-Isolation verwendet. Ein entscheidender Vorteil des CellCollector® im Gegensatz zu anderen Isolationstechniken besteht in seiner Anwendbarkeit *in-vivo*. Das Blutvolumen, welches bei einer Verweildauer von 30 Minuten in der Unterarmvene eines Patienten untersucht werden kann, wird mit 70-180 ml angegeben (Goubergrits und Kretzschler 2019). Im Vergleich dazu lassen sich mit CellSearch®, dem bislang einzigen von der FDA zugelassenen und aktuell als Goldstandard geltenden CTC-Isolationssystem, lediglich 7,5 ml Blut *ex-vivo* untersuchen (Cristofanilli, Budd et al. 2004). Es existieren einige Arbeiten, die beide Systeme miteinander verglichen haben. So konnte die Arbeitsgruppe um Gorges, beide Systeme in 50 Lungenkrebspatienten in einem fortgeschrittenem Stadium miteinander vergleichend, mithilfe des CellCollector® einerseits signifikant höhere Detektionsraten erzielen (58% mithilfe des CellCollector® vs. 27% mithilfe CellSearch®) als auch durchschnittlich drei CTCs mehr pro Anwendung isolieren verglichen mit dem CellSearch®-System. Andere Arbeitsgruppen fanden in Untersuchungen von Patienten mit neuroendokrinen Tumoren (Mandair, Vesely et al. 2016) bzw. Prostatakrebs-Patienten (Chen, Tauber et al. 2019) ebenfalls signifikante Differenzen zugunsten des CellCollector®.

Im Kontrast dazu existiert eine Untersuchung in Darmkrebspatienten, welche weder bzgl. der CTC-Detektionsrate (41,3% mithilfe des CellCollector® vs. 31,3% mithilfe des CellSearch®-Systems) noch der Absolutzahl detektierter CTCs einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Systemen feststellen konnte (Dizdar, Fluegen et al. 2019). Mittels einer *in-siliko*-Analyse schätzten die Autoren das mögliche zu untersuchende Blutvolumen mit dem CellCollector® auf 0,33- 18ml, was im starken Kontrast steht zu den vom Hersteller angegeben Werten zwischen 72-180 ml. Diese *in-siliko*-Analyse basiert auf der Annahme, dass der Draht gerade in der Vene liegt. In einer Gegendarstellung, durch Goubergrits und Kretzschler von der Charité Berlin veröffentlicht, ließ sich jedoch mittels Ultraschallanalyse eine eher schräge Position in der Vene visualisieren. Aufgrund dieser Gegebenheit resultieren u.a. durch Ablenkung des Blutstroms unterschiedliche Flusskomponenten bzw. Schichten, welche bei gerader Position in der Vene nicht auftreten. Auch eine Abbremsung des Blutstroms hinter dem Draht sorgt für einen längeren Kontakt zur Drahtoberfläche. Je nach Venendurchmesser (2-3 mm) sowie

Durchschnittsgeschwindigkeit des Blutes (3-5 cm/s) schätzen die Autoren das Blutvolumen, welches mit der Drahtoberfläche in Kontakt kommt und somit mit dem CellCollector® untersucht werden kann, auf 72-180 ml (Goubergrits und Kretzschmer 2019). Nichtsdestotrotz unterliegt die Methode einigen intra- und interindividuellen Schwankungen, weswegen eine genaue Angabe des Blutvolumens nicht möglich ist. Hier zu nennen sind der Gefäßdurchmesser, lokale Gefäßstrukturen, wie bspw. das Vorliegen von Venenklappen, sowie die unter anderem davon abhängige Flussgeschwindigkeit. Auch eine Kompression durch das umliegende Gewebe bzw. die Lage der Venenverweilkanüle und damit des CellCollector® im Gefäß beeinflussen das in Kontakt tretende Blutvolumen und damit die CTC-Ausbeute. Die daraus resultierende fehlende Möglichkeit der Standardisierung des CellCollector® könnte dazu beigetragen haben, dass trotz der Tatsache, dass prinzipiell größere Blutmengen verglichen mit dem CellSearch®-System untersucht werden können, nicht immer signifikant höhere Detektionsraten oder Absolutzahlen erreicht werden.

Ein Nachteil des CellCollector® liegt darin begründet, dass für die Isolation von CTCs die Expression des epithelialen Oberflächenproteins EpCAM zwingend notwendig ist. Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, können EMT-assoziierte Veränderungen zur Herabregulation der EpCAM-Expression und damit zu falsch-niedrigen, wenn nicht sogar falsch-negativen Ergebnissen führen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass CTCs in NSCLC-Patienten außerdem möglicherweise eher als in anderen Tumorentitäten dazu neigen, den Prozess der EMT zu durchlaufen (Heidrich, Ackar et al. 2020). Interessant ist in diesem Zusammenhang jedoch eine Untersuchung, in welcher das Vorhandensein von CTCs mit hoher EpCAM-Expression in NSCLC-Patienten in einem fortgeschrittenem Stadium mit einer negativen Prognose assoziiert werden konnte, währenddessen CTCs mit niedriger EpCAM-Expression keine Einflussnahme auf die Prognose zeigten (de Wit, Rossi et al. 2019). Dies ist konsistent mit der Hypothese, dass CTCs mit mesenchymalem Phänotyp zwar eine größere Tendenz haben, in den Blutkreislauf zu disseminieren, jedoch nicht die Fähigkeit besitzen, Metastasen zu bilden (Dongre und Weinberg 2019). Dennoch, um eine möglichst hohe Ausbeute an CTCs zu erzielen, könnte sich für Lungenkrebspatienten, insb. für NSCLC-Patienten, eine Methode besser eignen, welche nicht allein auf der Expression von EpCAM beruht. Für zukünftige Optimierungen des CellCollector® könnte demnach die kombinierte Nutzung von Antikörpern gegen sowohl epitheliale als auch mesenchymale Antigene ein vielversprechender Ansatzpunkt sein. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Arbeit, in welcher mithilfe von magnetischen Nanopartikeln, beschichtet mit einem Antikörpermix gegen epitheliale (EpCAM, EGFR) als auch mesenchymale Marker (N-Cadherin, TROP-2, Vimentin), CTCs aus dem Blut von 14 NSCLC-Patienten isoliert wurden (Lee,

Choi et al. 2018). In dieser *proof-of-principle*-Studie betrug der Median an isolierten CTCs 10 aus lediglich einem ml Blut, währenddessen der Median an isolierten CTCs mit dem CellCollector® in unserer Untersuchung bei 4 lag (siehe Kapitel 4.5). Dies könnte für eine höhere Sensitivität der Methode sprechen. Eine erfolgte immunzytochemische Färbung konnte dabei zeigen, dass sich die Mehrheit der CTCs durch die Expression mesenchymaler Marker wie CD44 oder Vimentin unter Beibehaltung epithelialer Eigenschaften charakterisieren ließ (Lee, Choi et al. 2018).

Weiterhin könnte zur Verbesserung der CTC-Ausbeute mit dem CellCollector® eine längere Verweildauer des Drahtes in der Vene des Patienten erwogen werden, da der Draht in unserer Untersuchung problemlos von den Patienten toleriert wurde. Auch die funktionalisierte Oberfläche des Drahtes könnte durch Veränderung der Drahtgeometrie vergrößert werden.

Ein weiterer Anknüpfungspunkt für zukünftige Untersuchungen könnte außerdem die Kombination mehrerer Isolationsstrategien sein. Eine Untersuchung, welche die Systeme CellCollector®, CellSearch® sowie den markerunabhängigen EPISPOT-Assay vergleichend einsetzte, zeigte für die einzelnen Methoden CTC-Detektionsraten zwischen 37 % bis 58,7 %, währenddessen durch Kombination aller drei Assays eine gepoolte Detektionsrate von 81,3 % erzielt werden konnte. Eine Konkordanzanalyse der Ergebnisse der drei Assays ergab lediglich eine Übereinstimmung von 37,4 %, was einerseits die Komplementarität der Methoden widerspiegelt und andererseits das mögliche Potenzial einer Kombination mehrerer Strategien unterstreicht (Kuske, Gorges et al. 2016). In diesem Zusammenhang sei der MagWIRE erwähnt, welcher durch Ergänzung einer magnetischen Fangkomponente zur immunologischen die Fangeffektivität im Vergleich zum CellCollector® deutlich steigern konnten (Vermesh, Aalipour et al. 2018). Dies konnte bis dato jedoch nur im lebenden Schweinmodell untersucht werden und größer angelegte Validierungsstudien sind erforderlich, bevor eine Applikation im Menschen denkbar ist.

5.2 Vorversuche des qPCR/HRMA-Assays

Für die sich anschließenden molekulargenetischen Untersuchungen wurde die Methode der allelspezifischen qPCR mit anschließender HRMA gewählt und etabliert. Einer der Vorteile hierbei ist, dass der Prozess vollautomatisiert abläuft. Die gesamte Reaktion, PCR sowie sich anschließende HRMA, kann ohne Unterbrechung in einem geschlossenen System stattfinden. Eine Kontamination durch post-PCR-Manipulation wird dadurch vermieden. Mit Ausnahme eines Thermocycler bedarf es keine weiteren speziellen Geräte oder Materialien. Außerdem ist

es im Vergleich zu anderen Methoden relativ kostengünstig. Da ein Testergebnis bereits nach ca. 3 Stunden vorliegt sowie die Testung von mehreren Proben gleichzeitig möglich ist (in unserem Fall 34 Proben gleichzeitig bei Untersuchung der Proben in Duplikaten sowie eingesetzter Negativ- als auch Positivkontrolle), erlaubt es die Analyse von Proben in einem relativ hohen Durchsatz.

5.2.1 Beurteilung der Sensitivität und Spezifität

Die Patientenproben wiesen eine relativ geringe Anzahl gebundener CTCs am CellCollector® bei gleichzeitig vergleichend dazu großer Menge unspezifisch gebundener Leukozyten (siehe Kapitel 4.5) auf. Eine hohe Sensitivität als auch Spezifität der Methode waren deshalb notwendig.

Zur Erhöhung der Sensitivität wurde ein zusätzlicher Wildtypblocker in die qPCR eingesetzt. Die Effektivität eines Wildtypblockers konnten Breitenbuecher *et. al* demonstrieren. Die Arbeitsgruppe etablierte einen Assay bestehend aus asymmetrischer PCR und anschließender HRMA zur Detektion einer Deletion im Exon 19 des EGFR-Gens in CTCs von NSCLC-Patienten, welche mithilfe einer immunomagnetischen Positiv- als auch Negativselektion *ex-vivo* isoliert worden sind. Im Rahmen der Etablierung wurden Verdünnungsreihen sowohl mit als auch ohne Einsatz eines Wildtypblockers durchgeführt. Währenddessen sich ohne Einsatz eines Blockers die Mutante nur bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:8 in einem Wildtyphintergrund detektieren ließ, war unter Einsatz eines Wildtypblockers eine Detektion bis zur Verdünnungsstufe 1:1024 möglich. Die erreichte Sensitivität lag damit bei 0,1 % (Breitenbuecher, Hoffarth et al. 2014). In den von uns durchgeführten Verdünnungsreihen konnte ebenfalls eine vergleichend hohe Sensitivität verzeichnet werden. Alle Primerpaare detektierten die jeweilige Mutation bis zu einer Nachweisgrenze von 0,1 % in einem Wildtyphintergrund. Eine Ausnahme bildete das Primerpaar zur Detektion der Mutation G12C, wo sich die Nachweisgrenze bei 1 % befand. Da der Median des Verhältnisses gebundene CTCs/Gesamtzellzahl in unseren Patientenproben bei 2 % lag und das Minimum bei 0,3 % (siehe Kapitel 4.5 Tabelle 20), beurteilten wir den Assay hinsichtlich der erreichten Sensitivität als geeignet für die Analyse der Patientenproben.

Auch die Überprüfung der Spezifität aller fünf Primerpaare lieferte sehr gute Ergebnisse. Die Amplifikation mithilfe von allelspezifischen Primern gewährleistet eine hohe Spezifität. Sie sind komplementär zur jeweiligen gesuchten Mutation, sodass sie unter optimalen Bedingungen nur an die mutierte Sequenz binden und diese amplifizieren. So ließ sich unter Verwendung der Primerpaare zur Detektion der Mutationen G12A, G12C und G12V selbst in hohen

Amplifikationszyklen keinerlei Amplifikation mit Ausnahme der Positivkontrolle verzeichnen. Eine unspezifische Primerhybridisierung kann jedoch auch unter Einsatz allelspezifischer Primer nicht gänzlich ausgeschlossen werden. So kam es unter Verwendung der Primerpaare zur Detektion der Mutationen G12D bzw. G12S in hohen Zyklen (Ct 42 bzw. 38) zu einer Amplifikation. Durch die anschließend durchgeführte Schmelzkurvenanalyse konnten beide Amplifikate aufgrund der deutlich niedrigeren Schmelztemperatur verglichen mit der jeweiligen Positivkontrolle allerdings eindeutig als unspezifische Produkte, am ehesten Primer-Dimere, eingestuft werden. Dies hat außerdem gezeigt, wie wichtig bei der Auswertung und Einordnung der Daten die Zusammenschau aus Amplifikationskurve und Schmelzverhalten ist.

5.2.2 Beurteilung der *Spiking*-Experimente mit dem CellCollector®

Das Versehen von Blutproben gesunder Spender/innen mit einer Anzahl von Tumorzellen, das sogenannte *Spiking*, stellt ein wichtiges Instrument zur Etablierung der Methodik dar und spart als geeignetes Modellsystem wertvolle Ressourcen (Patientenproben) für weiterführende Experimente nach erfolgter Etablierung.

Die *Spiking*-Experimente mit dem CellCollector® in EDTA-Blut gesunder Spender verliefen ohne Erfolg (siehe Kapitel 4.4.2). Es ist denkbar, dass vorhandene immunkompetente Zellen in der Blutprobe die Tumorzellen innerhalb der Inkubationszeit erkennen und eliminieren könnten. Diese These wird unterstützt durch die Tatsache, dass die Änderung des *Spiking*-Mediums von EDTA-Blut in DMEM-Zellkulturmedium unter Belassen der übrigen Rahmenbedingungen dazu führte, dass das *Spiking*-Experiment erfolgreich verlief und die mithilfe des qPCR/HRMA-Assays detektierten Mutationen auch per Pyrosequenzierung bestätigt werden konnten (siehe Kapitel 4.4.3). Hinzu kommt die in unserer Arbeit vergleichsweise kleine Menge verwendeter Tumorzellen von 100 bis maximal 240 Zellen, welche einem Volumen von 2,6ml Blut bzw. DMEM zugesetzt worden sind. Dies entspricht zwischen 38 bis maximal 92 Zellen/ml. Dabei muss eingeräumt werden, dass es herausfordernd sein kann, die korrekte Zellzahl zuzusetzen, da diese Methode Erfahrung bedarf hinsichtlich der Auszählung von Zellen unter einem Mikroskop (Theil, Fischer et al. 2016). Theil *et al.*, welche ebenfalls *Spiking*-Experimente mit einer Prostatakrebs-Zelllinie zur Einschätzung der Fangeffektivität des CellCollector® durchführten, verwendeten dagegen zwischen 750 und 3000 Zellen in 15ml EDTA-Blut (50 - 200 Zellen/ml). Trotz der vergleichsweise großen Menge zugesetzter Tumorzellen betrug die Fangeffektivität hinsichtlich der ursprünglich eingesetzten Menge an Tumorzellen jedoch nur zwischen 10 % in kleineren Zellkonzentrationen (50 Zellen/ml) und 35 % in höheren Zellkonzentrationen (200 Zellen/ml) (Theil, Fischer et al. 2016).

5.3 KRAS-Mutationsanalysen der Patientenproben

Nach erfolgter Etablierung folgte die Untersuchung der 32 Patientenproben. Der qPCR/HRMA-Assay konnte keine Mutation detektieren. Mithilfe der vergleichend eingesetzten *Mikroarray*-Analyse konnte die Mutation G12D in Probe 15C detektiert werden. Diese stammt von einem Patienten mit einem SCLC im Stadium IV (siehe Kapitel 3.1.9).

Mutationen im KRAS-Gen treten in Lungenkrebspatienten mit ca. 30 % relativ häufig auf (Bos 1989). Der Großteil entfällt dabei auf die Adenokarzinome, zur Gruppe der NSCLC gehörend (Cancer Genome Atlas Research 2014). In SCLC-Patienten kommen sie weitaus seltener vor, in der Literatur lassen sich im Allgemeinen Häufigkeiten zwischen 0-5 % finden (Ross, Wang et al. 2014, Wakuda, Kenmotsu et al. 2014, Abdelraouf, Sharp et al. 2015). Demgegenüber steht eine Arbeit von Kodaz und Kollegen, welche in 16,1 % aller analysierten Gewebeproben von SCLC-Patienten eine KRAS-Mutation detektieren konnten. Da auch in NSCLC-Patienten die Mutationsfrequenz entlang ethnischer und geographischer Differenzen schwankt, schlussfolgern die Autoren ähnliche Verhältnisse auch in SCLC-Patienten und sprechen sich dafür aus, KRAS-Mutationen auch in SCLC-Patienten zu testen und nicht von vornherein auszuschließen (Kodaz, Tastekin et al. 2016).

Von diesem Patienten wurden noch zwei weitere Proben analysiert, Probe 15A sowie 15B, in denen die Mutationsanalyse negativ blieb. Dies lässt sich durch zwei mögliche Faktoren erklären. Die Absolutzahlen der gebundenen CTCs am CellCollector® sind zwar in Probe 15A mit 8 und Probe 15B mit 32 deutlich höher als in Probe 15C mit drei gebundenen CTCs, allerdings sind in beiden erstgenannten Proben auch deutlich mehr unspezifisch gebundene Leukozyten zu finden, sodass das Verhältnis CTC/Gesamtzellzahl in Probe 15C mit 3 CTCs /50 WBC (5,7 %) am höchsten ist, gefolgt von Probe 15A mit 8 CTCs / 200 WBC (3,8 %) und abschließend Probe 15B mit 32 CTCs / 2000 WBC (1,6 %). Ein zweiter, möglicher Erklärungsansatz ist die vorhandene Heterogenität innerhalb der CTC-Population, sowohl inter-, aber auch intraindividuell. So konnte in einer Untersuchung durch CTC-Einzelzellanalyse in nur 5 von insgesamt 15 untersuchten CTCs einer Patientenprobe eine bereits im Primärtumor bestätigte KRAS-Mutation detektiert werden (Gasch, Bauernhofer et al. 2013). In einer anderen Studie konnten zwei unterschiedliche Mutationen im PIK3CA-Gen durch CTC-Einzelzellanalyse innerhalb eines Patienten gefunden werden (Polzer, Medoro et al. 2014).

Die o.g. Mutation G12D ließ sich mithilfe des qPCR/HRMA-Assays in Probe 15C nicht detektieren. Die Sensitivität der *Mikroarray*-Analyse wird vom Hersteller mit einer Nachweisgrenze von 1 % mutierter DNA in einem Wildtyp Hintergrund angegeben. Unser Assay bot mit 0,1 % eine höhere

Sensitivität. Aus diesem Grund können wir nicht ausschließen, dass es sich bei der mithilfe der *Mikroarray*-Analyse detektierten Mutation auch um ein falsch-positives Resultat handeln könnte.

Letztlich muss im Hinblick auf die Gesamtheit der erzielten Resultate in den Patientenproben geschlussfolgert werden, dass die in dieser Arbeit erprobte Kombination an Methoden zur molekulargenetischen Charakterisierung von CTCs aus Lungenkrebspatienten, isoliert mit dem CellCollector® eher weniger gut dafür geeignet ist.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist der Autorin nur eine weitere Arbeit bekannt, die in Kapitel 5.2.2 bereits erwähnte Untersuchung von Breitenbuecher *et al.*, welche ebenfalls mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse molekulargenetische Untersuchungen von CTCs in Lungenkrebspatienten durchführten. Nach Etablierung der Methodik wurden acht CTC-Proben von EGFR-mutierten NSCLC-Patienten untersucht. In allen Proben konnte die zuvor im Primärtumor nachgewiesene Mutation im EGFR-Gen detektiert werden. Interessanterweise ließen sich diese Mutationen mithilfe einer *Next Generation Sequencing*-Plattform (NGS) nicht bestätigen, was für eine höhere Sensitivität des HRMA-Assay spricht (Breitenbuecher, Hoffarth et al. 2014). Ein Faktor, der jedoch zu einer nur einschränkenden Vergleichbarkeit mit unserer Arbeit beiträgt, ist, dass keine Angaben über die Anzahl isolierter CTCs gemacht wurde, da nach Isolation der CTCs keine Auszählung/Detektion folgte, sondern direkt die molekulargenetische Analyse durchgeführt wurde. Dadurch ist außerdem unbekannt, wie hoch der Anteil unspezifisch gebundener Blutzellen und damit der Wildtyphintergrund ist. Die Tatsache, dass es sich um eine *ex-vivo*-Methode handelt, lässt jedoch die Annahme zu, dass es weniger sind als in unserer Arbeit. Diese Schlussfolgerung beruht auf Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, da der CellCollector® neben *in-vivo*-Applikation auch *ex-vivo* in EDTA-Blutproben von Lungentumorpatienten eingesetzt wurde. Hier wurden deutlich niedrigere Zahlen unspezifisch gebundener Leukozyten detektiert. Da die CTC-Detektionsrate des CellCollector® bei *in-vivo*-Applikation jedoch mit 62 % deutlich höher lag als bei *ex-vivo*-Applikation mit 19 %, ist die *in-vivo*-Applikation vielversprechender und damit, ungeachtet der Anzahl unspezifisch gebundener Blutzellen, die Methode der Wahl (Daten nicht publiziert).

Es existieren nur wenige Arbeiten, welche erfolgreich eine Mutationsanalyse an mit dem CellCollector® isolierten CTCs aus Lungenkrebspatienten demonstrieren konnten. Der Arbeitsgruppe um Gorges gelang es, in CTC-Proben zweier Patienten mithilfe einer digitalen PCR zwei bereits im Primärtumor nachgewiesene Mutationen im EGFR- bzw. KRAS-Gen zu

detektieren. Dabei waren zwischen 1 und 5 CTCs am CellCollector® gebunden (Gorges, Penkalla et al. 2016). Anzumerken ist, dass die Autoren keine Aussage zur Menge an unspezifisch gebundenen Leukozyten und damit über den Wildtyp-Hintergrund treffen. Bei jedoch gleicher Isolierungstechnik *in-vivo* sowie ebenfalls 30-minütiger Inkubation, kann angenommen werden, dass die Zahlen denen in unserer Arbeit ähneln. In einer erst kürzlich erschienenen Arbeit wurden CTCs, welche mithilfe des CellCollector® aus dem Blut von 15 NSCLC-Patienten isoliert wurden, mithilfe der *Next generation sequencing*-Technologie (NGS) auf Mutationen in 50 verschiedenen Genen untersucht. Die Ergebnisse aus der Analyse von Primärtumorgewebe dazu vergleichend, ergab sich eine Konkordanz von 71 %. Die Autoren konkludierten die Mutationsanalyse von CTCs als vielversprechenden, wenn auch eher supplementären Ansatz zur Mutationsanalyse von Primärtumorgewebe (He, Shi et al. 2020).

Auch wenn beide Arbeiten zeigen, dass Mutationsanalysen in CTCs, welche mit dem CellCollector® isoliert worden sind, in Lungenkrebspatienten grundsätzlich möglich sind, ist bei beiden Arbeiten der limitierende Faktor der kleinen Studienpopulation mit 15 (He, Shi et al. 2020) respektive gar nur 2 (Gorges, Penkalla et al. 2016) Probanden gemeinsam. Eine Validierung in größeren Patientenpopulationen ist zwingend notwendig, bevor definitive Aussagen über das mögliche klinische Potenzial getroffen werden können.

5.4 Präanalytische Einflussfaktoren

Hinsichtlich der erzielten Resultate dieser Arbeit lässt sich eine mögliche Beeinflussung durch präanalytische Faktoren diskutieren.

Als potenzieller Einflussfaktor ist hier die vergleichsweise lange Lagerungszeit der Proben zu nennen. Zwischen der Gewinnung der Proben und der Mutationsanalyse lagen ca. 2 Jahre. Bis auf die erfolgte Färbung der Drähte zur Detektion/Auszählung der CTCs direkt im Anschluss an ihre Isolierung wurden die Proben durchgängig bei -80°C gelagert. Die CTCs lagen weiterhin am Draht gebunden vor, welcher sich innerhalb eines Glasröhrchens befand. Ein Gefriermedium wurde nicht verwendet.

Es existiert eine Untersuchung, welche den Effekt der Langzeitlagerung von CTCs bei -80°C mithilfe von sich anschließender WGA und Multiplex-PCR zur Überprüfung der DNA-Integrität untersuchte. Unabhängig von der Lagerungszeit, welche zwischen minimal elf Tagen und maximal 37 Monaten lag, konnten vergleichbare Ergebnisse gemessen werden, sodass die Autoren einen schädigenden Effekt auf die DNA-Integrität durch Langzeitlagerung für unwahrscheinlich halten (Mesquita, Rothwell et al. 2017). Trotz dessen ist eine Einflussnahme

in unserer Arbeit nicht gänzlich auszuschließen. Dafür könnte in einer weiterführenden Untersuchung die Mutationsanalyse an frischen mit dem CellCollector® isolierten CTCs durchgeführt werden.

Des Weiteren fand vor der molekulargenetischen Untersuchung der CTCs eine immunzytochemische Anfärbung zur Detektion der selbigen statt. Dazu wurden die Zellen in einem ersten Schritt mit Aceton fixiert. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass genannte Substanz sowie Prozedur schädigenden Einfluss auf die DNA-Integrität genommen haben könnten. In einer vergleichenden Untersuchung zu unterschiedlichen Fixierungsmethoden von Gewebeproben ließen sich mit Aceton sehr gute Ergebnisse hinsichtlich PCR-basierter DNA-Detektion erzielen (Yan, Wu et al. 2010). Dies ist jedoch nur bedingt vergleichbar, da in unserer Arbeit Zellen und kein Gewebe fixiert wurden.

Es existieren Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, welche ebenfalls eine Aceton-Fixierung der am CellCollector® gebundenen CTCs durchführten und DNA-basierte Untersuchungen ausführen konnten (Gorges, Penkalla et al. 2016, El-Heliebi, Hille et al. 2018).

Um jedoch eine sichere Einschätzung treffen zu können, empfiehlt es sich, in zukünftigen Arbeiten im Rahmen der *Spiking*-Experimente eine mögliche Beeinflussung nachgeschalteter molekulargenetischer Untersuchungen durch die Fixierung bzw. die Wahl des jeweiligen Fixiermittels zu untersuchen.

5.5 Limitationen der Studie

Als Limitation im Studiendesign muss die mit 32 Proben von insgesamt 15 Patienten stammende vergleichsweise kleine Probenzahl genannt werden. KRAS-Mutationen lassen sich zwar bei ca. 30 % aller Lungenkarzinome nachweisen (Bos 1989), jedoch entfällt davon der Großteil auf die Gruppe der Adenokarzinome (Cancer Genome Atlas Research 2014). Von den zur Analyse zur Verfügung stehenden 32 Proben stammten jedoch lediglich 13 Proben von Patienten mit einem Adenokarzinom. Dies sollte für zukünftige Untersuchungen bei Studieneinschluss vermehrt berücksichtigt werden.

Als weitere Schwäche des Studiendesigns ist außerdem der nicht bekannt gewesene KRAS-Status des Primärtumors zu benennen, da nicht ausreichend Gewebematerial zur Verfügung stand. Ein bekannter Mutationsstatus des Primärtumors hätte mehr Sicherheit in die Einordnung und Bewertung unserer Ergebnisse als auch der Methodik gebracht. Auch dies sollte für sich anschließende Untersuchungen berücksichtigt werden.

5.6 CTC- und cfDNA-Analyse im Vergleich

Unter den Begriff der "*Liquid Biopsy*", d.h. eine Entnahme und Analyse von Tumormaterial aus einer Flüssigkeit, meist Blut, fällt nicht nur allein die Untersuchung von CTCs, sondern auch anderer Substrate wie zirkulierende freie DNA (cfDNA), Exosomen oder auch mikroRNA (Ilie, Hofman et al. 2014).

Lohnenswert ist ein Vergleich mit dem Forschungsgebiet der cfDNA, welches analog dem Gebiet der CTCs seit den letzten zwei Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewonnen hat und zu denen etliche Studien existieren, welche ähnliche Fragestellungen bearbeiten. Nukleinsäuren scheinen vorrangig im Rahmen von Apoptose und Nekrose von Tumorzellen in die Blutbahn zu gelangen, eine aktive Sekretion wird jedoch ebenfalls beschrieben (Schwarzenbach, Hoon et al. 2011). Auch eine Freisetzung durch zugrunde gehende CTCs in der Blutbahn wird diskutiert (Lianidou und Hoon 2018). Zirkulierende Nukleinsäuren im Blut sind kein ausschließlich bei Krebspatienten vorkommendes Phänomen, erhöhte Konzentrationen lassen sich auch in Patienten mit benignen Läsionen, inflammatorischen Erkrankungen sowie nach Trauma vorfinden (Fleischhacker und Schmidt 2007). Selbst in Gesunden sind aufgrund physiologischer Umbauprozesse im Gewebe geringe Konzentrationen an cfDNA im Blut nachweisbar (Rijavec, Coco et al. 2019). CfDNA lässt sich analog CTCs in Blut und Lymphflüssigkeit vorfinden, aber auch in anderen Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Urin, Zerebrospinalflüssigkeit, Speichel oder Pleurapunktat (Lianidou und Hoon 2018). So eignete sich cfDNA, gewonnen aus dem Pleurapunktat von NSCLC-Patienten mit TKI-Resistenz, zur Detektion der T790M-Resistenzmutation im EGFR-Gen (Lee, Hur et al. 2018).

Eine in der Wissenschaft vieldiskutierte Fragestellung ist, ob für die Detektion somatischer Mutationen CTCs oder cfDNA als Substrat besser geeignet ist. Ein potenzieller Benefit von CTCs ist deren hohe DNA-Integrität, da die DNA aus intakten Zellen isoliert wird, währenddessen cfDNA in der Regel fragmentiert und degradiert vorliegt (Freidin, Freydina et al. 2015). Kritisch muss die Frage gestellt werden, ob eine geringe Anzahl an isolierten CTCs den Primärtumor in seiner Gesamtheit widerspiegeln kann aufgrund der bereits zuvor erwähnten Heterogenität eines Tumors. CfDNA hingegen könnte eine Summation des gesamten Mutationsstatus des Primärtumors darstellen (Freidin, Freydina et al. 2015). Des Weiteren ist cfDNA in größerer Menge vorhanden verglichen mit DNA aus isolierten CTCs stammend. Relativierend dazu muss jedoch der vergleichsweise große Hintergrund an cfDNA aus nicht-malignen Zellen stammend gesehen werden (Sundaresan, Sequist et al. 2016).

Während in einer Studie mit Lungenkrebspatienten KRAS-Mutationen etwas häufiger in cfDNA verglichen mit CTCs nachgewiesen werden konnte (30,5% vs. 23,2%) (Freidin, Freydina et al. 2015), zeigten in einer anderen Untersuchung in Lungenkrebspatienten wiederum CTCs eine deutlich höhere Sensitivität hinsichtlich der Detektion therapierelevanter EGFR-Mutationen (92% vs. 33%) (Maheswaran, Sequist et al. 2008). Sundaresan und Kollegen wiederum untersuchten in 40 Patienten mit EGFR-mutierten NSCLC und Progress unter TKI-Therapie das Vorhandensein einer T790M-Resistenzmutation. Die Genotypisierung war in 75% der Biopsien, 76% der CTC- sowie 80% der cfDNA-Proben möglich. Alle drei Assays erzielten jeweils ähnliche Detektionsraten (zwischen 47 und 50%). Interessant ist der Fakt, dass die kombinierte CTC- und cfDNA-Analyse die Genotypisierung aller Patienten erlaubte und eine T790M-Mutation in 14 Patienten detektieren konnte, wo die Tumorbiopsie negativ blieb (Sundaresan, Sequist et al. 2016). Dieses Ergebnis legt nahe, statt einer exklusiven Betrachtung von CTC und cfDNA viel mehr eine komplementäre Herangehensweise in Betracht zu ziehen. In diesem Zusammenhang ist eine Arbeit von Lee und Kollegen erwähnenswert, welche magnetische Nanopartikel entwickelten, die nach jeweiliger Modifikation der Beschichtung (Polyethylenimin oder ein Antikörper-Cocktail bestehend aus Anti-EpCAM, EGFR, N-Cadherin, TROP-2, Vimentin) in der Lage sind, sowohl CTCs als auch cfDNA zu isolieren (Lee, Choi et al. 2018). Der hohe Anteil an erfolgreich isolierten Biomarkern und die relativ hohe Übereinstimmungsrate der Ergebnisse bei gleichzeitig eher geringen Kosten lassen die Autoren auch hier eine eher komplementäre Betrachtung von cfDNA und CTCs schlussfolgern, um die Aussagekraft und möglicherweise daraus resultierende therapiebestimmende Entscheidungen zu stärken.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch das Forschungsfeld der cfDNA vielversprechend ist und in vielerlei Hinsicht Parallelen zu dem der CTCs zeigt. Für beide Substrate konnte zumindest in kleineren Studien der Nachweis erbracht werden, dass sie zur Detektion somatischer Mutationen geeignet sind und somit therapeutisch relevante Informationen liefern können. Vor dem Hintergrund, dass CTCs in Lungenkrebs-, im Speziellen NSCLC-Patienten, möglicherweise noch seltener vorkommen als in anderen Tumorentitäten (Gorges, Penkalla et al. 2016), könnte in Zukunft eine komplementäre Herangehensweise vielversprechender sein als die alleinige Betrachtung von CTCs respektive cfDNA, um das Potenzial, welches die "*Liquid Biopsy*" bieten kann, maximal auszuschöpfen.

6. Zusammenfassung

Aktuell fußt die molekulargenetische Charakterisierung einer Lungenkrebserkrankung auf der Untersuchung einer Gewebeprobe, gewonnen durch eine konventionelle Biopsie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Eine Biopsie ist risikobehaftet, engmaschige Kontrollen im Sinne von Re-Biopsien zur Beobachtung der Kinetik von genetischen Veränderungen unter der Therapie sind damit in der Regel nicht möglich. Hier bietet sich die minimal-invasive Isolierung von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) aus dem Blut der Krebspatienten als supplementäre Plattform an. Eine mehrmalige Gewinnung im Verlauf einer Erkrankung ist möglich und könnte ein Monitoring des genomischen Tumorprofils erlauben. Nicht zuletzt mitbedingt durch ihr seltenes Vorkommen in einem großen Hintergrund an Blutzellen, haben trotz intensiver Forschung seit zwei Jahrzehnten bis heute technische Schwierigkeiten, von der Isolierung bis hin zur molekularen Analyse, den Fortschritt limitiert, sodass weiterer Forschungsbedarf notwendig ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob CTCs, welche *in-vivo* aus dem Blut von 15 Patienten mit einem fortgeschrittenen Lungenkarzinom (NSCLC und SCLC) mit dem CellCollector® gewonnen wurden, mithilfe eines im Labor etablierten Assays bestehend aus allelspezifischer qPCR und HRMA molekulargenetisch charakterisiert werden können. Durch immunzytochemische Färbung wurden die gebundenen Zellen am CellCollector® detektiert und ausgezählt. Insgesamt standen 32 Proben zur Verfügung, der Median gebundener CTCs/Probe betrug 4. Das KRAS-Gen wurde hier als *proof-of-concept*-Modell ausgewählt. Zum Vergleich wurde die kommerziell verfügbare *Mikroarray*-Technologie eingesetzt. Eine zuvor durchgeführte MDA diente der Erhöhung des genomischen Ausgangsmaterials.

In Vorversuchsreihen zur Etablierung des qPCR/HRMA-Assays konnte eine Sensitivität von 0,1 % zum Nachweis der Mutationen G12A, G12D, G12S und G12V bzw. 1 % zum Nachweis der Mutation G12C erreicht werden. Auch eine hohe Spezifität ließ sich verzeichnen. Erfolgte *Spiking*-Experimente mit vorher als EpCAM-positiv gewerteten Zelllinien konnten die Eignung der gewählten Kombination an Methoden demonstrieren. In den anschließend untersuchten 32 Patientenproben konnte jedoch keine KRAS-Mutation detektiert werden.

Der *Mikroarray* detektierte eine G12D-Mutation in einer Probe eines SCLC-Patienten (Probe 15C). Da der qPCR/HRMA-Assay jedoch trotz höherer Sensitivität diese Mutation nicht

detektieren konnte, muss die Möglichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses in Betracht gezogen werden.

Eine mögliche Beeinflussung der Resultate durch präanalytische Faktoren ist nicht auszuschließen. Dennoch ist abschließend zu sagen, dass die hier gewählte Kombination an Methoden eher ungeeignet ist für die molekulargenetische Charakterisierung von CTCs in Lungenkrebspatienten.

Nichtsdestotrotz stellen CTCs eine vielversprechende, wenn auch am ehesten supplementäre Plattform zu herkömmlichen Biopsien dar. Für zukünftige Untersuchungen könnte die Optimierung des CellCollector® durch Einsatz sowohl epithelialer als auch mesenchymaler Marker in Betracht gezogen werden, um die Ausbeute an CTCs zu erhöhen.

Neben CTCs bietet auch die cfDNA-Analyse viel Potenzial. Gerade vor dem Hintergrund, dass CTCs in Lungenkrebspatienten möglicherweise noch seltener vorkommen als in anderen Tumorentitäten ist eine komplementäre Betrachtung beider Substrate ein vielversprechender Ansatz, um maximalen Informationsgewinn mithilfe einer "*Liquid Biopsy*" zu erzielen.

7. Literaturverzeichnis

Abdelraouf, F., A. Sharp, M. Maurya, D. Mair, A. Wotherspoon, A. Leary, D. Gonzalez de Castro, J. Bhosle, A. Nassef, T. Gaafar, S. Popat, T. A. Yap and M. O'Brien (2015). "Focused molecular analysis of small cell lung cancer: feasibility in routine clinical practice." BMC Res Notes 8: 688.

Aceto, N., A. Bardia, D. T. Miyamoto, M. C. Donaldson, B. S. Wittner, J. A. Spencer, M. Yu, A. Pely, A. Engstrom, H. Zhu, B. W. Brannigan, R. Kapur, S. L. Stott, T. Shioda, S. Ramaswamy, D. T. Ting, C. P. Lin, M. Toner, D. A. Haber and S. Maheswaran (2014). "Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis." Cell 158(5): 1110-1122.

Agusti, C., A. Xaubet, C. Monton, M. Sole, N. Soler, M. Carrion and R. Rodriguez Roisin (2001). "Induced sputum in the diagnosis of peripheral lung cancer not visible endoscopically." Respir Med 95(10): 822-828.

Alix-Panabieres, C. (2012). "EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients." Recent Results Cancer Res 195: 69-76.

Alix-Panabières, C. and K. Pantel (2013). "Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer." Clin Chem 59(1): 110-118.

Allard, W. J., J. Matera, M. C. Miller, M. Repollet, M. C. Connelly, C. Rao, A. G. Tibbe, J. W. Uhr and L. W. Terstappen (2004). "Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases." Clin Cancer Res 10(20): 6897-6904.

Andreopoulou, E., L. Y. Yang, K. M. Rangel, J. M. Reuben, L. Hsu, S. Krishnamurthy, V. Valero, H. A. Fritsche and M. Cristofanilli (2012). "Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ system." Int J Cancer 130(7): 1590-1597.

Armstrong, A. J., M. S. Marengo, S. Oltean, G. Kemeny, R. L. Bitting, J. D. Turnbull, C. I. Herold, P. K. Marcom, D. J. George and M. A. Garcia-Blanco (2011). "Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers." Mol Cancer Res 9(8): 997-1007.

Bade, B. C. and C. S. Dela Cruz (2020). "Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention." Clin Chest Med 41(1): 1-24.

Barrière, G., A. Riouallon, J. Renaudie, M. Tartary and M. Rigaud (2012). "Mesenchymal and stemness circulating tumor cells in early breast cancer diagnosis." BMC Cancer 12: 114.

Basu, A. and J. Nieva (2019). KRAS-Mutated Lung Cancer. Targeted Therapies for Lung Cancer. R. Salgia. Cham, Springer International Publishing: 195-216.

Bernhardt, E. B. and S. I. Jalal (2016). Small Cell Lung Cancer. Cancer Treat Res. 170: 301-322.

Bockhorn, M., R. K. Jain and L. L. Munn (2007). "Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed?" Lancet Oncol 8(5): 444-448.

Bonfini, L., C. A. Karlovich, C. Dasgupta and U. Banerjee (1992). "The Son of sevenless gene product: a putative activator of Ras." Science 255(5044): 603-606.

Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." Cancer Res 49(17): 4682-4689.

Breitenbuecher, F., S. Hoffarth, K. Worm, D. Cortes-Incio, T. C. Gauler, J. Kohler, T. Herold, K. W. Schmid, L. Freitag, S. Kasper and M. Schuler (2014). "Development of a highly sensitive and specific method for detection of circulating tumor cells harboring somatic mutations in non-small-cell lung cancer patients." PLoS One 9(1): e85350.

Butler, T. P. and P. M. Gullino (1975). "Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma." Cancer Res 35(3): 512-516.

Cancer Genome Atlas Research, N. (2014). "Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma." Nature 511(7511): 543-550.

Chaffer, C. L. and R. A. Weinberg (2011). "A perspective on cancer cell metastasis." Science 331(6024): 1559-1564.

Chen, S., G. Tauber, T. Langsenlehner, L. M. Schmölder, M. Pötscher, S. Riethdorf, A. Kuske, G. Leitinger, K. Kashofer, Z. T. Czyż, B. Polzer, K. Pantel, P. Sedlmayr, T. Kroneis and A. El-Heliebi (2019). "In Vivo Detection of Circulating Tumor Cells in High-Risk Non-Metastatic Prostate Cancer Patients Undergoing Radiotherapy." Cancers (Basel) 11(7).

Chipron (2013). DataSheet LCD-Array K-RAS 1.4.

Coco, S., A. Alama, I. Vanni, V. Fontana, C. Genova, M. G. Dal Bello, A. Truini, E. Rijavec, F. Biello, C. Sini, G. Burrafato, C. Maggioni, G. Barletta and F. Grossi (2017). "Circulating Cell-Free DNA and Circulating Tumor Cells as Prognostic and Predictive Biomarkers in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with First-Line Chemotherapy." Int J Mol Sci 18(5).

Cox, A. D. and C. J. Der (2010). "Ras history: The saga continues." Small GTPases 1(1): 2-27.

Cristofanilli, M., G. T. Budd, M. J. Ellis, A. Stopeck, J. Matera, M. C. Miller, J. M. Reuben, G. V. Doyle, W. J. Allard, L. W. Terstappen and D. F. Hayes (2004). "Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer." N Engl J Med 351(8): 781-791.

Darby, S., D. Hill, H. Deo, A. Auvinen, J. M. Barros-Dios, H. Baysson, F. Bochicchio, R. Falk, S. Farchi, A. Figueiras, M. Hakama, I. Heid, N. Hunter, L. Kreienbrock, M. Kreuzer, F. Lagarde, I. Mäkeläinen, C. Muirhead, W. Oberaigner, G. Pershagen, E. Ruosteenoja, A. S. Rosario, M. Tirmarche, L. Tomásek, E. Whitley, H. E. Wichmann and R. Doll (2006). "Residential radon and lung cancer--detailed results of a collaborative analysis of individual data on 7148 persons with lung cancer and 14,208 persons without lung cancer from 13 epidemiologic studies in Europe." Scand J Work Environ Health 32 Suppl 1: 1-83.

de Wit, S., E. Rossi, S. Weber, M. Tamminga, M. Manicone, J. F. Swennenhuis, C. G. M. Groothuis-Oudshoorn, R. Vidotto, A. Facchinetti, L. L. Zeune, E. Schuurung, R. Zamarchi, T. J. N. Hiltermann, M. R. Speicher, E. Heitzer, L. Terstappen and H. J. M. Groen (2019). "Single tube liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer." Int J Cancer 144(12): 3127-3137.

Dean, F. B., S. Hosono, L. Fang, X. Wu, A. F. Faruqi, P. Bray-Ward, Z. Sun, Q. Zong, Y. Du, J. Du, M. Driscoll, W. Song, S. F. Kingsmore, M. Egholm and R. S. Lasken (2002). "Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification." Proc Natl Acad Sci U S A 99(8): 5261-5266.

Dizdar, L., G. Fluegen, G. van Dalum, E. Honisch, R. P. Neves, D. Niederacher, H. Neubauer, T. Fehm, A. Rehders, A. Krieg, W. T. Knoefel and N. H. Stoecklein (2019). "Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer patients using the GILUPI CellCollector: results from a prospective, single-center study." Mol Oncol 13(7): 1548-1558.

Dogan, S., R. Shen, D. C. Ang, M. L. Johnson, S. P. D'Angelo, P. K. Paik, E. B. Brzostowski, G. J. Riely, M. G. Kris, M. F. Zakowski and M. Ladanyi (2012). "Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers." Clin Cancer Res 18(22): 6169-6177.

Dolfus, C., N. Piton, E. Toure and J. C. Sabourin (2015). "Circulating tumor cell isolation: the assets of filtration methods with polycarbonate track-etched filters." Chin J Cancer Res 27(5): 479-487.

Doll, R. and A. B. Hill (1950). "Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report." Br Med J 2(4682): 739-748.

Dongre, A. and R. A. Weinberg (2019). "New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer." Nat Rev Mol Cell Biol 20(2): 69-84.

El-Heliebi, A., C. Hille, N. Laxman, J. Svedlund, C. Haudum, E. Ercan, T. Kroneis, S. Chen, M. Smolle, C. Rossmann, T. Krzywkowski, A. Ahlford, E. Darai, G. von Amsberg, W. Alsdorf, F. Konig, M. Lohr, I. de Kruijff, S. Riethdorf, T. M. Gorges, K. Pantel, T. Bauernhofer, M. Nilsson and P. Sedlmayr (2018). "In Situ Detection and Quantification of AR-V7, AR-FL, PSA, and KRAS Point Mutations in Circulating Tumor Cells." Clin Chem 64(3): 536-546.

Ferrara, N. (2002). "VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors." Nat Rev Cancer 2(10): 795-803.

Fidler, I. J. (1970). "Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine." J Natl Cancer Inst 45(4): 773-782.

Fitzmaurice, C., D. Abate, N. Abbasi and e. al (2019). "Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study." JAMA Oncol 5(12): 1749-1768.

Fleischhacker, M. and B. Schmidt (2007). "Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey." Biochim Biophys Acta 1775(1): 181-232.

Freidin, M. B., D. V. Freydina, M. Leung, A. Montero Fernandez, A. G. Nicholson and E. Lim (2015). "Circulating tumor DNA outperforms circulating tumor cells for KRAS mutation detection in thoracic malignancies." Clin Chem 61(10): 1299-1304.

Gasch, C., T. Bauernhofer, M. Pichler, S. Langer-Freitag, M. Reeh, A. M. Seifert, O. Mauermann, J. R. Izbicki, K. Pantel and S. Riethdorf (2013). "Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer." Clin Chem 59(1): 252-260.

Godinho, S. A., R. Picone, M. Burute, R. Dagher, Y. Su, C. T. Leung, K. Polyak, J. S. Brugge, M. Thery and D. Pellman (2014). "Oncogene-like induction of cellular invasion from centrosome amplification." Nature 510(7503): 167-171.

Gorges, T. M., N. Penkalla, T. Schalk, S. A. Joosse, S. Riethdorf, J. Tucholski, K. Lucke, H. Wikman, S. Jackson, N. Brychta, O. von Ahsen, C. Schumann, T. Krahn and K. Pantel (2016). "Enumeration and Molecular Characterization of Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Novel In Vivo Device for Capturing Circulating Tumor Cells." Clin Cancer Res 22(9): 2197-2206.

Goubergrits, L. and U. Kretzschmer (2019). "GILUPI CellCollector: Estimation of blood volume contacting CellCollector."

Guibert, N., M. Delaunay, A. Lusque, N. Boubekour, I. Rouquette, E. Clermont, J. Mourlanette, S. Gouin, I. Dormoy, G. Favre, J. Mazieres and A. Pradines (2018). "PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab." Lung Cancer 120: 108-112.

Hashizume, H., P. Baluk, S. Morikawa, J. W. McLean, G. Thurston, S. Roberge, R. K. Jain and D. M. McDonald (2000). "Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness." Am J Pathol 156(4): 1363-1380.

He, Y., J. Shi, B. Schmidt, Q. Liu, G. Shi, X. Xu, C. Liu, Z. Gao, T. Guo and B. Shan (2020). "Circulating Tumor Cells as a Biomarker to Assist Molecular Diagnosis for Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer." Cancer Manag Res 12: 841-854.

Hegmann, K. T., A. M. Fraser, R. P. Keaney, S. E. Moser, D. S. Nilasena, M. Sedlars, L. Higham-Gren and J. L. Lyon (1993). "The effect of age at smoking initiation on lung cancer risk." Epidemiology 4(5): 444-448.

Heidrich, I., L. Ackar, P. M. Mohammadi and K. Pantel (2020). "Liquid biopsies: potential and challenges." Int J Cancer.

Hennig, A., R. Markwart, M. A. Esparza-Franco, G. Ladds and I. Rubio (2015). "Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems." Biol Chem 396(8): 831-848.

Hofman, V., M. I. Ilie, E. Long, E. Selva, C. Bonnetaud, T. Molina, N. Vénissac, J. Mouroux, P. Vielh and P. Hofman (2011). "Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the

CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method." Int J Cancer 129(7): 1651-1660.

Hong, D. S., M. G. Fakih, J. H. Strickler, J. Desai, G. A. Durm, G. I. Shapiro, G. S. Falchook, T. J. Price, A. Sacher, C. S. Denlinger, Y. J. Bang, G. K. Dy, J. C. Krauss, Y. Kuboki, J. C. Kuo, A. L. Coveler, K. Park, T. W. Kim, F. Barlesi, P. N. Munster, S. S. Ramalingam, T. F. Burns, F. Meric-Bernstam, H. Hensley, J. Ngang, G. Ngarmchamnanrith, J. Kim, B. E. Houk, J. Canon, J. R. Lipford, G. Friberg, P. Lito, R. Govindan and B. T. Li (2020). "KRAS(G12C) Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors." N Engl J Med 383(13): 1207-1217.

Hvichia, G. E., Z. Parveen, C. Wagner, M. Janning, J. Quidde, A. Stein, V. Müller, S. Loges, R. P. Neves, N. H. Stoecklein, H. Wikman, S. Riethdorf, K. Pantel and T. M. Gorges (2016). "A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells." Int J Cancer 138(12): 2894-2904.

IARC (2004). "Tobacco smoke and involuntary smoking." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 83: 1-1438.

Ilie, M., V. Hofman, E. Long, O. Bordone, E. Selva, K. Washetine, C. H. Marquette and P. Hofman (2014). "Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine?" Ann Transl Med 2(11): 107.

Ilie, M., V. Hofman, E. Long-Mira, E. Selva, J. M. Vignaud, B. Padovani, J. Mouroux, C. H. Marquette and P. Hofman (2014). ""Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease." PLoS One 9(10): e111597.

Jackson, J. H., C. G. Cochrane, J. R. Bourne, P. A. Solski, J. E. Buss and C. J. Der (1990). "Farnesol modification of Kirsten-ras exon 4B protein is essential for transformation." Proc Natl Acad Sci U S A 87(8): 3042-3046.

Janerich, D. T., W. D. Thompson, L. R. Varela, P. Greenwald, S. Chorost, C. Tucci, M. B. Zaman, M. R. Melamed, M. Kiely and M. F. McKneally (1990). "Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household." N Engl J Med 323(10): 632-636.

Janssen-Heijnen, M. L. and J. W. Coebergh (2001). "Trends in incidence and prognosis of the histological subtypes of lung cancer in North America, Australia, New Zealand and Europe." Lung Cancer 31(2-3): 123-137.

Josse, S. A., T. M. Gorges and K. Pantel (2015). "Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells." EMBO Mol Med 7(1): 1-11.

Karachaliou, N., C. Mayo, C. Costa, I. Magri, A. Gimenez-Capitan, M. A. Molina-Vila and R. Rosell (2013). "KRAS mutations in lung cancer." Clin Lung Cancer 14(3): 205-214.

Kasimir-Bauer, S., O. Hoffmann, D. Wallwiener, R. Kimmig and T. Fehm (2012). "Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells." Breast Cancer Res 14(1): R15.

Kim, A. S., H. J. Ko, J. H. Kwon and J. M. Lee (2018). "Exposure to Secondhand Smoke and Risk of Cancer in Never Smokers: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies." Int J Environ Res Public Health 15(9).

Kim, J. H., H. S. Kim and B. J. Kim (2017). "Prognostic value of KRAS mutation in advanced non-small-cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors: A meta-analysis and review." Oncotarget 8(29): 48248-48252.

Kodaz, H., E. Tastekin, B. Erdogan, I. Hacibekiroglu, H. Tozkir, H. Gurkan, E. Turkmen, B. Demirkan, S. Uzunoglu and I. Cicin (2016). "KRAS Mutation in Small Cell Lung Carcinoma and Extrapulmonary Small Cell Cancer." Balkan Med J 33(4): 407-410.

Krebs, M. G., R. Sloane, L. Priest, L. Lancashire, J. M. Hou, A. Greystoke, T. H. Ward, R. Ferraldeschi, A. Hughes, G. Clack, M. Ranson, C. Dive and F. H. Blackhall (2011). "Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol 29(12): 1556-1563.

Kuske, A., T. M. Gorges, P. Tennstedt, A. K. Tiebel, R. Pompe, F. Preißer, S. Prues, M. Mazel, A. Markou, E. Lianidou, S. Peine, C. Alix-Panabières, S. Riethdorf, B. Beyer, T. Schlomm and K. Pantel (2016). "Improved detection of circulating tumor cells in non-metastatic high-risk prostate cancer patients." Sci Rep 6: 39736.

Lee, H., M. Choi, J. Lim, M. Jo, J. Y. Han, T. M. Kim and Y. Cho (2018). "Magnetic Nanowire Networks for Dual-Isolation and Detection of Tumor-Associated Circulating Biomarkers." Theranostics 8(2): 505-517.

Lee, J. S., J. Y. Hur, I. A. Kim, H. J. Kim, C. M. Choi, J. C. Lee, W. S. Kim and K. Y. Lee (2018). "Liquid biopsy using the supernatant of a pleural effusion for EGFR genotyping in pulmonary adenocarcinoma patients: a comparison between cell-free DNA and extracellular vesicle-derived DNA." BMC Cancer 18(1): 1236.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF) (2018). Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Lang- version 1.0, 2018, AWMF-Registernummer: 020/007OL.

Lianidou, E. and D. Hoon (2018). Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. Principles and Applications of Molecular Diagnostics, Elsevier.

Liu, Z., A. Fusi, E. Klopocki, A. Schmittel, I. Tinhofer, A. Nonnenmacher and U. Keilholz (2011). "Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients." J Transl Med 9: 70.

Lubin, J. H., J. D. Boice, Jr., C. Edling, R. W. Hornung, G. R. Howe, E. Kunz, R. A. Kusiak, H. I. Morrison, E. P. Radford, J. M. Samet and et al. (1995). "Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure." J Natl Cancer Inst 87(11): 817-827.

Maheswaran, S., L. V. Sequist, S. Nagrath, L. Ulkus, B. Brannigan, C. V. Collura, E. Inserra, S. Diederichs, A. J. Iafrate, D. W. Bell, S. Digumarthy, A. Muzikansky, D. Irimia, J. Settleman, R. G.

Tompkins, T. J. Lynch, M. Toner and D. A. Haber (2008). "Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells." N Engl J Med 359(4): 366-377.

Maly, V., O. Maly, K. Kolostova and V. Bobek (2019). "Circulating Tumor Cells in Diagnosis and Treatment of Lung Cancer." In Vivo 33(4): 1027-1037.

Mandair, D., C. Vesely, L. Ensell, H. Lowe, V. Spanswick, J. A. Hartley, M. E. Caplin and T. Meyer (2016). "A comparison of CellCollector with CellSearch in patients with neuroendocrine tumours." Endocr Relat Cancer 23(10): L29-32.

Mao, C., L. X. Qiu, R. Y. Liao, F. B. Du, H. Ding, W. C. Yang, J. Li and Q. Chen (2010). "KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies." Lung Cancer 69(3): 272-278.

Marchetti, A., M. Del Grammastro, L. Felicioni, S. Malatesta, G. Filice, I. Centi, T. De Pas, A. Santoro, A. Chella, A. A. Brandes, P. Venturino, F. Cuccurullo, L. Crino and F. Buttitta (2014). "Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: toward a real-time liquid biopsy for treatment." PLoS One 9(8): e103883.

Mascaux, C., N. Iannino, B. Martin, M. Paesmans, T. Berghmans, M. Dusart, A. Haller, P. Lothaire, A. P. Meert, S. Noel, J. J. Lafitte and J. P. Sculier (2005). "The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis." Br J Cancer 92(1): 131-139.

Mesquita, B., D. G. Rothwell, D. J. Burt, F. Chami, F. Fernandez-Gutierrez, D. Slane-Tan, J. Antonello, M. Carter, L. Carter, M. Parry, L. Franklin, R. Marais, F. Blackhall, C. Dive and G. Brady (2017). "Molecular analysis of single circulating tumour cells following long-term storage of clinical samples." Mol Oncol 11(12): 1687-1697.

Mouliere, F., S. El Messaoudi, C. Gongora, A. S. Guedj, B. Robert, M. Del Rio, F. Molina, P. J. Lamy, E. Lopez-Crapez, M. Mathonnet, M. Ychou, D. Pezet and A. R. Thierry (2013). "Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load." Transl Oncol 6(3): 319-328.

O'Flaherty, J. D., S. Gray, D. Richard, D. Fennell, J. J. O'Leary, F. H. Blackhall and K. J. O'Byrne (2012). "Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer." Lung Cancer 76(1): 19-25.

Oerding, C. (2019). In-vivo Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen (CTC) bei Lungenkrebspatienten mittels des antikörperbeschichteten Drahtes CANCER01, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Ost, D. E., S. C. Jim Yeung, L. T. Tanoue and M. K. Gould (2013). "Clinical and organizational factors in the initial evaluation of patients with lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines." Chest 143(5 Suppl): e121S-e141S.

Ozkumur, E., A. M. Shah, J. C. Ciciliano, B. L. Emmink, D. T. Miyamoto, E. Brachtel, M. Yu, P. I. Chen, B. Morgan, J. Trautwein, A. Kimura, S. Sengupta, S. L. Stott, N. M. Karabacak, T. A. Barber, J. R. Walsh, K. Smith, P. S. Spuhler, J. P. Sullivan, R. J. Lee, D. T. Ting, X. Luo, A. T. Shaw, A. Bardia, L. V. Sequist, D. N. Louis, S. Maheswaran, R. Kapur, D. A. Haber and M. Toner (2013). "Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells." Sci Transl Med 5(179): 179ra147.

Parkinson, D. R., N. Dracopoli, B. G. Petty, C. Compton, M. Cristofanilli, A. Deisseroth, D. F. Hayes, G. Kapke, P. Kumar, J. Lee, M. C. Liu, R. McCormack, S. Mikulski, L. Nagahara, K. Pantel, S. Pearson-White, E. A. Punnoose, L. T. Roadcap, A. E. Schade, H. I. Scher, C. C. Sigman and G. J. Kelloff (2012). "Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use." J Transl Med 10: 138.

Pecot, C. V., F. Z. Bischoff, J. A. Mayer, K. L. Wong, T. Pham, J. Bottsford-Miller, R. L. Stone, Y. G. Lin, P. Jaladurgam, J. W. Roh, B. W. Goodman, W. M. Merritt, T. J. Pircher, S. D. Mikolajczyk, A. M. Nick, J. Celestino, C. Eng, L. M. Ellis, M. T. Deavers and A. K. Sood (2011). "A novel platform for detection of CK+ and CK- CTCs." Cancer Discov 1(7): 580-586.

Polzer, B., G. Medoro, S. Pasch, F. Fontana, L. Zorzino, A. Pestka, U. Andergassen, F. Meier-Stiegen, Z. T. Czyz, B. Alberter, S. Treitschke, T. Schamberger, M. Sergio, G. Bregola, A. Doffini, S. Gianni, A. Calanca, G. Signorini, C. Bolognesi, A. Hartmann, P. A. Fasching, M. T. Sandri, B. Rack, T. Fehm, G. Giorgini, N. Manaresi and C. A. Klein (2014). "Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention." EMBO Mol Med 6(11): 1371-1386.

Popescu, N. C., S. C. Amsbaugh, J. A. DiPaolo, S. R. Tronick, S. A. Aaronson and D. C. Swan (1985). "Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization." Somat Cell Mol Genet 11(2): 149-155.

Renaud, S., J. Seitlinger, P. E. Falcoz, M. Schaeffer, A. C. Voegeli, M. Legrain, M. Beau-Faller and G. Massard (2016). "Specific KRAS amino acid substitutions and EGFR mutations predict site-specific recurrence and metastasis following non-small-cell lung cancer surgery." Br J Cancer 115(3): 346-353.

Rijavec, E., S. Coco, C. Genova, G. Rossi, L. Longo and F. Grossi (2019). "Liquid Biopsy in Non-Small Cell Lung Cancer: Highlights and Challenges." Cancers (Basel) 12(1).

Roman, M., I. Baraibar, I. Lopez, E. Nadal, C. Rolfo, S. Vicent and I. Gil-Bazo (2018). "KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target." Mol Cancer 17(1): 33.

Rosenberg, R., R. Gertler, J. Friederichs, K. Fuehrer, M. Dahm, R. Phelps, S. Thorban, H. Nekarda and J. R. Siewert (2002). "Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood." Cytometry 49(4): 150-158.

Ross, J. S., K. Wang, O. R. Elkadi, A. Tarasen, L. Foulke, C. E. Sheehan, G. A. Otto, G. Palmer, R. Yelensky, D. Lipson, J. Chmielecki, S. M. Ali, J. Elvin, D. Morosini, V. A. Miller and P. J. Stephens (2014). "Next-generation sequencing reveals frequent consistent genomic alterations in small cell undifferentiated lung cancer." J Clin Pathol 67(9): 772-776.

Rossi, G., M. C. Mengoli, A. Cavazza, D. Nicoli, M. Barbareschi, C. Cantaloni, M. Papotti, A. Tironi, P. Graziano, M. Paci, A. Stefani, M. Migaldi, G. Sartori and G. Pelosi (2014). "Large cell carcinoma of the lung: clinically oriented classification integrating immunohistochemistry and molecular biology." Virchows Arch 464(1): 61-68.

Saucedo-Zeni, N., S. Mewes, R. Niestroj, L. Gasiorowski, D. Murawa, P. Nowaczyk, T. Tomasi, E. Weber, G. Dworacki, N. G. Morgenthaler, H. Jansen, C. Propping, K. Sterzynska, W. Dyszkiewicz, M. Zabel, M. Kiechle, U. Reuning, M. Schmitt and K. Lücke (2012). "A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire." Int J Oncol 41(4): 1241-1250.

Schreiber, G. and D. C. McCrory (2003). "Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence." Chest 123(1 Suppl): 115S-128S.

Schwarzenbach, H., D. S. Hoon and K. Pantel (2011). "Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients." Nat Rev Cancer 11(6): 426-437.

Sculier, J. P., K. Chansky, J. J. Crowley, J. Van Meerbeeck, P. Goldstraw, C. International Staging and I. Participating (2008). "The impact of additional prognostic factors on survival and their relationship with the anatomical extent of disease expressed by the 6th Edition of the TNM Classification of Malignant Tumors and the proposals for the 7th Edition." J Thorac Oncol 3(5): 457-466.

Shepherd, F. A., C. Domerg, P. Hainaut, P. A. Janne, J. P. Pignon, S. Graziano, J. Y. Douillard, E. Brambilla, T. Le Chevalier, L. Seymour, A. Bourredjem, G. Le Teuff, R. Pirker, M. Filipits, R. Rosell, R. Kratzke, B. Bandarchi, X. Ma, M. Capelletti, J. C. Soria and M. S. Tsao (2013). "Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of adjuvant chemotherapy." J Clin Oncol 31(17): 2173-2181.

Simonato, L., A. Agudo, W. Ahrens, E. Benhamou, S. Benhamou, P. Boffetta, P. Brennan, S. C. Darby, F. Forastiere, C. Fortes, V. Gaborieau, M. Gerken, C. A. Gonzales, K. H. Jockel, M. Kreuzer, F. Merletti, F. Nyberg, G. Pershagen, H. Pohlman, F. Rosch, E. Whitley, H. E. Wichmann and P. Zamboni (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.

Skoulidis, F., L. A. Byers, L. Diao, V. A. Papadimitrakopoulou, P. Tong, J. Izzo, C. Behrens, H. Kadara, E. R. Parra, J. R. Canales, J. Zhang, U. Giri, J. Gudikote, M. A. Cortez, C. Yang, Y. Fan, M. Peyton, L. Girard, K. R. Coombes, C. Toniatti, T. P. Heffernan, M. Choi, G. M. Frampton, V. Miller, J. N. Weinstein, R. S. Herbst, K. K. Wong, J. Zhang, P. Sharma, G. B. Mills, W. K. Hong, J. D. Minna, J. P. Allison, A. Futreal, J. Wang, Wistuba, II and J. V. Heymach (2015). "Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities." Cancer Discov 5(8): 860-877.

Skoulidis, F., B. T. Li, G. K. Dy, T. J. Price, G. S. Falchook, J. Wolf, A. Italiano, M. Schuler, H. Borghaei, F. Barlesi, T. Kato, A. Curioni-Fontecedro, A. Sacher, A. Spira, S. S. Ramalingam, T. Takahashi, B. Besse, A. Anderson, A. Ang, Q. Tran, O. Mather, H. Henary, G. Ngarmchamnanrith,

G. Friberg, V. Velcheti and R. Govindan (2021). "Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation." N Engl J Med.

Skovierova, H., E. Vidomanova, M. Skoviera, B. Tothova, E. Halasova and J. Strnadel (2019). "Circulating tumor cells in lung carcinogenesis: minireview." Neoplasma 66(1): 1-7.

Slebos, R. J., R. E. Kibbelaar, O. Dalesio, A. Kooistra, J. Stam, C. J. Meijer, S. S. Wagenaar, R. G. Vanderschueren, N. van Zandwijk, W. J. Mooi and et al. (1990). "K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung." N Engl J Med 323(9): 561-565.

Steenland, K., D. Loomis, C. Shy and N. Simonsen (1996). "Review of occupational lung carcinogens." Am J Ind Med 29(5): 474-490.

Sundaresan, T. K., L. V. Sequist, J. V. Heymach, G. J. Riely, P. A. Jänne, W. H. Koch, J. P. Sullivan, D. B. Fox, R. Maher, A. Muzikansky, A. Webb, H. T. Tran, U. Giri, M. Fleisher, H. A. Yu, W. Wei, B. E. Johnson, T. A. Barber, J. R. Walsh, J. A. Engelman, S. L. Stott, R. Kapur, S. Maheswaran, M. Toner and D. A. Haber (2016). "Detection of T790M, the Acquired Resistance EGFR Mutation, by Tumor Biopsy versus Noninvasive Blood-Based Analyses." Clin Cancer Res 22(5): 1103-1110.

Takashima, A. and D. V. Faller (2013). "Targeting the RAS oncogene." Expert Opin Ther Targets 17(5): 507-531.

Theil, G., K. Fischer, E. Weber, R. Medek, R. Hoda, K. Lucke and P. Fornara (2016). "The Use of a New CellCollector to Isolate Circulating Tumor Cells from the Blood of Patients with Different Stages of Prostate Cancer and Clinical Outcomes - A Proof-of-Concept Study." PLoS One 11(8): e0158354.

Thomas, M., H. Dienemann, F. Herth and J. Debus (2010). Lungenkarzinom. Die Onkologie. W. Hiddemann and C. Bartram. Berlin, Heidelberg, Springer.

Tong, B., Y. Xu, J. Zhao, M. Chen, J. Xing, W. Zhong and M. Wang (2017). "Prognostic significance of circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy." Oncotarget 8(49): 86615-86624.

Trahey, M. and F. McCormick (1987). "A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants." Science 238(4826): 542-545.

Travis, W. D., E. Brambilla, A. G. Nicholson, Y. Yatabe, J. H. M. Austin, M. B. Beasley, L. R. Chirieac, S. Dacic, E. Duhig, D. B. Flieder, K. Geisinger, F. R. Hirsch, Y. Ishikawa, K. M. Kerr, M. Noguchi, G. Pelosi, C. A. Powell, M. S. Tsao, I. Wistuba and W. H. O. 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.

Turetta, M., M. Bulfoni, G. Brisotto, G. Fasola, A. Zanello, E. Biscontin, L. Mariuzzi, A. Steffan, C. Di Loreto, D. Cesselli and F. Del Ben (2018). "Assessment of the Mutational Status of NSCLC Using Hypermetabolic Circulating Tumor Cells." Cancers (Basel) 10(8).

Vermesh, O., A. Aalipour, T. J. Ge, Y. Saenz, Y. Guo, I. S. Alam, S. M. Park, C. N. Adelson, Y. Mitsutake, J. Vilches-Moure, E. Godoy, M. H. Bachmann, C. C. Ooi, J. K. Lyons, K. Mueller, H. Arami, A. Green, E. I. Solomon, S. X. Wang and S. S. Gambhir (2018). "An intravascular magnetic wire for the high-throughput retrieval of circulating tumour cells in vivo." Nat Biomed Eng 2(9): 696-705.

Vona, G., A. Sabile, M. Louha, V. Sitruk, S. Romana, K. Schütze, F. Capron, D. Franco, M. Pazzagli, M. Vekemans, B. Lacour, C. Bréchot and P. Paterlini-Bréchot (2000). "Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells." Am J Pathol 156(1): 57-63.

Wakuda, K., H. Kenmotsu, M. Serizawa, Y. Koh, M. Isaka, S. Takahashi, A. Ono, T. Taira, T. Naito, H. Murakami, K. Mori, M. Endo, T. Nakajima, Y. Ohde, T. Takahashi and N. Yamamoto (2014). "Molecular profiling of small cell lung cancer in a Japanese cohort." Lung Cancer 84(2): 139-144.

Went, P. T., A. Lugli, S. Meier, M. Bundi, M. Mirlacher, G. Sauter and S. Dirnhofer (2004). "Frequent EpCam protein expression in human carcinomas." Hum Pathol 35(1): 122-128.

Wynder, E. L. and E. A. Graham (1950). "Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma." The Journal of the American Medical Association 143(4): 329-336.

Yan, F., X. Wu, M. Crawford, W. Duan, E. E. Wilding, L. Gao, S. P. Nana-Sinkam, M. A. Villalona-Calero, R. A. Baiocchi and G. A. Otterson (2010). "The search for an optimal DNA, RNA, and protein detection by in situ hybridization, immunohistochemistry, and solution-based methods." Methods 52(4): 281-286.

Zentrum für Krebsregisterdaten, R.-K.-I. (2019). Krebs in Deutschland - Lunge.

Zentrum für Krebsregisterdaten, R.-K.-I. (2019). "Krebs in Deutschland - gesamt."

Zhang, Z., Y. Xiao, J. Zhao, M. Chen, Y. Xu, W. Zhong, J. Xing and M. Wang (2016). "Relationship between circulating tumour cell count and prognosis following chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer." Respirology 21(3): 519-525.

8. Thesen

1. Der etablierte qPCR/HRMA-Assay zur Detektion von KRAS-Mutationen erreichte in Vorversuchsreihen eine Sensitivität von 0,1 % zum Nachweis der Mutationen G12A, G12D, G12S und G12V bzw. 1 % zum Nachweis der Mutation G12C. Auch eine hohe Spezifität ließ sich verzeichnen.
2. Die Zelllinien SW1116, SW620 und LS174T exprimieren EpCAM und konnten für *Spiking*-Experimente mit dem CellCollector® genutzt werden. Die Zelllinien A549 und Mia-PaCa2 hingegen stellten sich in der FACS-Analyse EpCAM-negativ dar.
3. In den 32 Patientenproben ließ sich mithilfe des qPCR/HRMA-Assays keine KRAS-Mutation detektieren.
4. Mithilfe der *Mikroarray*-Analyse ließ sich die Mutation G12D in Probe 15C detektieren. Ein falsch-positives Resultat kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.
5. Eine Beeinflussung der Resultate durch präanalytische Faktoren (Lagerungszeit, Fixierung mit Aceton) ist nicht auszuschließen.
6. Die in dieser Arbeit erprobte Kombination an Methoden bestehend aus *in-vivo*-Isolierung von CTCs mit dem CellCollector®, Detektion durch immunzytochemische Färbung sowie folgender qPCR/HRMA bzw. *Mikroarray*-Analyse zur Detektion von KRAS-Mutationen ist eher nicht geeignet für die molekulargenetische Untersuchung von CTCs in Lungenkrebspatienten.
7. Der CellCollector® ist aufgrund seiner relativ unkomplizierten Anwendbarkeit *in-vivo* weiterhin eine vielversprechende Isolationsstrategie. Eine höhere CTC-Ausbeute könnte durch Kombination epithelialer sowie mesenchymaler Marker erreicht werden.
8. Eine komplementäre Betrachtung von CTCs und cfDNA ist sinnvoll, um das Potenzial der "*Liquid Biopsy*" in Lungenkrebspatienten voll auszuschöpfen.

Selbstständigkeitserklärung

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.

Halle (Saale), den

Lisa Viktoria Keydel

Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

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

Halle (Saale), den

Lisa Viktoria Keydel

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe. Diese Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule oder Universität im In- oder Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), den

Lisa Viktoria Keydel

Danksagung

Das Entstehen dieser Arbeit haben viele Personen möglich gemacht, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Zunächst möchte ich mich recht herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Bernd Schmidt für das Überlassen dieses interessanten Themas, der Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten sowie das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer im Labor, Herrn Dr. rer. nat. Michael Fleischhacker. Ich danke Ihnen für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit, Ihre stetige Hilfsbereitschaft, sowohl im Labor als auch beim Anfertigen der Dissertation, sowie Ihr zu jeder Zeit offenes Ohr bei Fragen und Problemen. Auch bei Frau Dana Reinicke möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfe bei der praktischen Durchführung sowie der moralischen Unterstützung, wenn mal etwas nicht so lief, wie es sollte, bedanken.

Auch Herrn apl. Prof. Dr. rer. nat., rer. medic. habil. M. S. Staeger möchte ich herzlich danken für die Möglichkeit der Nutzung des Thermocyclers.

Ein großer Dank geht auch an Frau Dr. rer. nat. Anja Haak sowie Frau Beate Heydel für die Unterstützung bei der Durchführung der *Mikroarray*-Analysen sowie der Pyrosequenzierungen.

Frau Dr. rer. nat. Gerit Theil möchte ich herzlich für die Hilfe bei den immunzytochemischen Färbungen danken.

Maria - danke, dass du immer und vor allem auch in schwierigen Zeiten an meiner Seite gestanden und mich unterstützt hast.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie und meinen Freunden, jedoch insbesondere meinen Eltern Alexandra und Jörg, welche mich während meines gesamten Studiums so liebevoll, uneingeschränkt und bedingungslos unterstützt und zu jeder Zeit an mich geglaubt haben. Euch soll diese Arbeit gewidmet sein, denn ohne euch stünde ich jetzt nicht da, wo ich bin. Vielen Dank!