

Aus dem Institut für Radiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

***Genetische Veränderungen im Verlauf der lokalablativen Behandlung
eines oligometastatischen kolorektalen Karzinoms
(GATTACA)***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Lennart Oliver Marschal

aus Braunschweig

Magdeburg 2021

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Marschal, Lennart Oliver

Genetische Veränderungen im Verlauf der lokalablativen Behandlung eines oligometastatischen kolorektalen Karzinoms (GATTACA) - 2021. - 62 Bl., 27 Abb., 20 Tab., 8 Anl.

Kurzreferat

Die vorliegende Arbeit untersucht retrospektiv und deskriptiv die Auswirkungen lokalablativer Therapien auf das genetische Mutationsprofil von 56 Patienten mit oligometastatischem Kolorektalkarzinom (max. 3 Organe, je max. 3 Läsionen; Ausnahme Leber: max. 10 Läsionen) an zwei deutschen Zentren. 27 Patienten erhielten eine einzige Ablation, 13 Patienten zwei und 16 Patienten drei oder mehr Ablationen. Statistisch signifikante Unterschiede in Bezug auf Gesamtüberleben (OS) oder progressionsfreies Überleben (PFS) konnten weder für den initialen Mutationsstatus, noch für die initial betroffene Kolonseite gezeigt werden. Lediglich das von Metastasierung betroffene Organ hatte einen statistisch signifikanten Einfluss auf das OS. Die Auswertung des gesammelten biologischen Materials von neun ausgewählten Patienten mittels Halbleitersequenzierung ergab den Nachweis mutierter Gene mit Korrelation zum klinischen und radiologischen Verlauf bei sechs der neun sequenzierten Patienten. Es konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Abfall der Allelfrequenz und dem OS gezeigt werden. Für das PFS wurde eine statistische Signifikanz knapp verfehlt, hier ist jedoch eine Tendenz ersichtlich. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen damit nahe, dass lokalablativ radiologische Verfahren, ähnlich wie eine chirurgische Metastasektomie, in der Lage sind, eine Veränderung des genetischen Profils der malignen Erkrankung durch Eradikation von Metastasen zu bewirken. Chemotherapie-resistente Klone können durch ablativ Verfahren eliminiert werden.

Schlüsselwörter: lokalablativ Therapie, oligometastatisches Kolorektalkarzinom, liquid biopsy, massive parallel sequencing

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
1 Einführung	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Oligometastatisches Kolorektalkarzinom.....	4
1.3 Die Rolle der „liquid biopsy“	4
1.4 Studiendesign	6
2 Material und Methoden	7
2.1 Patientenauswahl.....	7
2.2 Lokale Therapien	7
2.3 Begleitende systemische Therapie	10
2.4 Liquid biopsy	12
2.4.1 Blutentnahme	12
2.4.2 Zwischenlagerung	12
2.4.3 Auswertung der liquid biopsy	12
2.5 Tumorbiopsien	15
2.6 Follow ups.....	16
2.7 Beobachtungsdauer und Vorgehen bei Progress.....	17
2.8 Dokumentation	18
2.9 Literaturrecherche	19
2.10 Risiken	19
2.11 Nutzen.....	19
2.12 Statistik.....	20
3 Ergebnisse	21
3.1 Patientencharakteristika	21
3.2 Gesamtüberleben.....	28
3.3 Progressionsfreies Überleben	30
3.4 cfDNA-Analyse.....	32
3.5 Mutationsnachweis in der liquid biopsy	32
3.6 Allelfrequenzen der sequenzierten Patienten.....	38
3.7 Zusammenhang zwischen maximaler Allelfrequenz / maximalem Abfall der Allelfrequenz und klinischen Charakteristika	48

3.8	Zusammenhang zwischen Mutationsstatus und klinischen Charakteristika	49
3.9.1	Zusammenhang zwischen Abfall der Allelfrequenz mutierter ctDNA und dem OS.....	51
3.9.2	Zusammenhang zwischen Abfall der Allelfrequenz mutierter ctDNA und dem PFS.....	52
3.10	Ist ein Rezidiv gekennzeichnet durch ein anderes genetisches Profil?	54
3.11	Kann die lokale Ablation nach Progress unter systemischer Therapie entstandene, resistente Klone eliminieren?	54
4	Diskussion	55
4.1	Diskussion der Methodik	55
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	56
5	Zusammenfassung	62
	Literaturverzeichnis	63
	Danksagung	74
	Ehrenerklärung.....	75
	Darstellung des Bildungsweges	76
	Anhang.....	77

Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous poliposis coli
BRAF	B-Raf proto-oncogene
CAPOX	Capecitabin/Oxaliplatin
CCND	Cyclin D
CNV	Kopiezahlvariation
(m)CRC	(metastasiertes) Kolorektalkarzinom
CRF	case report form
CT	Computertomographie
CTNNB1	Catenin Beta 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cfDNA	Zellfreie Desoxyribonukleinsäure
ctDNA	Zirkulierende Tumor-Desoxyribonukleinsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FOLFIRI	5-Fluorouracil / Leukovorin / Irinotecan
FOLFOX	5-Fluorouracil / Leukovorin / Oxaliplatin
FOLFOXIRI	5-Fluorouracil / Leukovorin / Oxaliplatin / Irinotecan
FU	Follow up
iBT	Interstitielle Brachytherapie
KI	Konfidenzintervall
LV	Leukovorin
MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1
MDT	Multidisziplinäres Tumorboard
MRT	Magnetresonanztomographie
MWA	Mikrowellenablation
NGS	next generation sequencing
OS	Gesamtüberleben
(q)PCR	(quantitative) Polymerasekettenreaktion
PDGFRA	platelet derived growth factor receptor alpha
PFS	Progressionsfreies Überleben
RAS	rat sarcoma
RECIST	response evaluation criteria in solid tumors
RFA	Radiofrequenzablation
RFS	Rezidivfreies Überleben
RR	Response Rate
SBRT	Stereotaktische Bestrahlung
SNV	Einzelnukleotid-Variante
SOP	Standard operating procedure
TGF- β	transforming growth factor-beta
VEGF	vascular endothelial growth factor
5-FU	5-Fluorouracil

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien	7
Tabelle 2: Oncomine™ Pan-Cancer Cell-Free Assay	13
Tabelle 3: Patientencharakteristika	23
Tabelle 4: Kreuztabelle Patientencharakteristika.....	27
Tabelle 5: cfDNA-Konzentration im Verlauf der Studie (in ng/ml).....	32
Tabelle 6: Mutationsnachweis in Baseline-Stanzen (n=6) und liquid biopsy vor Intervention	33
Tabelle 7: Mutationsnachweis in Stanzen und korrespondierenden liquid biopsies im weiteren Behandlungsverlauf.....	33
Tabelle 8: Alle nachgewiesenen Mutationen in Biopsien und liquid biopsies ...	34
Tabelle 9: Mutationsnachweis in den Baseline liquid biopsies	36
Tabelle 10: liquid biopsy-Ergebnisse Patient M03.....	39
Tabelle 11: liquid biopsy-Ergebnisse Patient M10.....	40
Tabelle 12: liquid biopsy-Ergebnisse Patient M13.....	41
Tabelle 13: liquid biopsy-Ergebnisse Patient LMU12	43
Tabelle 14: liquid biopsy-Ergebnisse Patient LMU14	44
Tabelle 15: liquid biopsy-Ergebnisse Patient LMU20	45
Tabelle 16: liquid biopsy-Ergebnisse Patient LMU24	46
Tabelle 17: liquid biopsy-Ergebnisse Patient LMU28	47
Tabelle 18: Assoziation klinischer Charakteristika mit maximaler Allelfrequenz und maximalem Abfall der Allelfrequenz.....	48
Tabelle 19: Assoziation klinischer Charakteristika mit dem Mutationsstatus vor erster Ablation.....	49
Tabelle 20: Assoziation klinischer Charakteristika mit unter Therapie entstandenen Mutationen	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erstlinienchemotherapie des mCRC (entspr. AWMF S3 Leitlinie CRC 2019)	11
Abbildung 2: Ion Torrent™ Oncomine™ Knowledgebase Reporter	15
Abbildung 3: Studienablauf	18
Abbildung 4: Alter bei Einschluss	21
Abbildung 5: Durchgeführte Therapien nach Organ und Methode	22
Abbildung 6: Gesamtüberleben nach initialem Mutationsstatus	28
Abbildung 7: Gesamtüberleben nach Lokalisation des Primarius.....	29
Abbildung 8: Gesamtüberleben nach Metastasierungsort.....	29
Abbildung 9: Progressionsfreies Überleben nach initialem Mutationsstatus	30
Abbildung 10: Progressionsfreies Überleben nach Lokalisation des Primarius	31
Abbildung 11: Progressionsfreies Überleben nach Metastasierungsort	31
Abbildung 12: Mutationen und zugehörige Allelfrequenzen in der Baseline liquid biopsy	36
Abbildung 13: Mutationsfrequenz in allen ausgewerteten liquid biopsies (n=63)	37
Abbildung 14: Mutationsnachweis in mindestens einer liquid biopsy	37
Abbildung 15: Therapieverlauf Patient M03	38
Abbildung 16: Therapieverlauf Patient M10	39
Abbildung 17: Therapieverlauf Patient M13	40
Abbildung 18: Therapieverlauf Patient LMU01	42
Abbildung 19: Therapieverlauf Patient LMU12	42
Abbildung 20: Therapieverlauf Patient LMU14	44
Abbildung 21: Therapieverlauf Patient LMU20	45
Abbildung 22: Therapieverlauf Patient LMU24	46
Abbildung 23: Therapieverlauf Patient LMU28	47
Abbildung 24: OS nach Abfall der Allelfrequenz Baseline vs. +8d nach vollst. Ablation.....	51
Abbildung 25: OS nach Abfall der Allelfrequenz Baseline vs. 1. FU.....	52
Abbildung 26: PFS nach Abfall der Allelfrequenz Baseline vs. +8d nach vollst. Ablation.....	53
Abbildung 27: Progressionsfreies Überleben nach Abfall der Allelfrequenz Baseline vs. 1. FU.....	53

1 Einführung

1.1 Hintergrund

Das Kolorektalkarzinom (CRC) ist weltweit eines der führenden Malignome als Auslöser von Morbidität und Mortalität. Bezogen auf die globale Tumorzinzidenz lag es 2018 mit über 1,8 Millionen neuen Fällen an dritter Stelle, Tendenz steigend, in Bezug auf die Mortalität mit 881.000 Toten an zweiter Stelle (Arnold et al. 2017; Bray et al. 2018). In den letzten Jahrzehnten hat sich die Prognose der Patienten deutlich verbessert. Das mediane Gesamtüberleben (OS) an metastasiertem Kolorektalkarzinom (mCRC) erkrankter Patienten ist von sechs Monaten mit best supportive care angestiegen auf etwa 30 Monate mit Einführung aktiver Chemotherapie-Medikamente, wie Capecitabin, Fluoropyrimidin, Oxaliplatin, Irinotecan und monoklonaler Antikörper, welche die Angiogenese über Blockierung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Signalwegs (z.B. Bevacizumab, Aflibercept) oder den Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR) (z.B. Cetuximab, Panitumumab) hemmen (Cremolini et al. 2015). Zusätzlich wurde der Multi-Tyrosinkinaseinhibitor Regorafenib zur Therapie des unter Therapie progredienten mCRC zugelassen (Saltz et al. 2008; van Cutsem et al. 2014). Im Juni 2018 erhielt außerdem Encorafenib, ein MAP-Kinase-Inhibitor, die Zulassung in Europa. Der Wirkstoff wird in Kombination mit dem EGFR-Hemmer Cetuximab bei erwachsenen, bereits systemisch vortherapierten Patienten mit mCRC eingesetzt, bei denen eine BRAF V600E-Mutation vorliegt (Kopetz et al. 2019). Neben der systemischen Therapie empfehlen aktuelle Leitlinien im metastasierten Stadium für potentiell resektable Metastasen eine lokale Therapie mittels chirurgischer Resektion und/oder lokalablativer Therapie. Während die chirurgische Therapie in diesem Fall weiterhin den Standard darstellt, existieren mit der Radiofrequenzablation, der Mikrowellenablation, der Brachytherapie und der stereo-taktischen Bestrahlung weniger invasive, ablative Alternativen für inoperable Läsionen beziehungsweise Patienten mit Vorerkrankungen, die eine Kontraindikation für eine Operation darstellen. Mehrere Studien haben bereits einen signifikanten Benefit dieser Methoden für Patienten mit inoperablem mCRC gezeigt (Shibata et al. 2000; Ricke et al. 2004a; Stang et al. 2009; Tan et al. 2018), ein direkter Vergleich mit chirurgischer Therapie im Rahmen einer großen, randomisierten Studie fehlt aber bisher. Für Patienten mit nicht resektablen Lebermetastasen eines CRC konnte in der CLOCC-Studie für die Kombination aus Radiofrequenzablation und Chemotherapie (und sofern möglich zusätzlicher Resektion) gegenüber alleiniger systemischer Therapie ein statistisch signifikant längeres OS gezeigt werden. Auch das PFS konnte gegenüber der alleinigen systemischen Therapie signifikant verlängert werden (Ruers et al. 2017).

Für primär resektable hepatische CRC-Metastasen wird aktuell im Rahmen der COLLISION- und LAVA-Studie die thermische Ablation gegenüber der chirurgischen Resektion auf Nichtunterlegenheit untersucht (Gurusamy et al. 2018; Puijk et al. 2018).

Klonaler Selektionsdruck hat in verschiedenen Tumorentitäten wachsendes Interesse erfahren und mit der Entwicklung neuer, gerichteter Therapieoptionen an Bedeutung gewonnen (McGranahan und Swanton 2015). Im Kolorektalkarzinom stellt der Rat Sarcoma (*RAS*)-Mutationsstatus einen validierten Biomarker für die Effektivität von anti-EGFR-Antikörper-Behandlungen dar (Roock et al. 2008). Cetuximab und Panitumumab binden an den EGFR und inhibieren die Aktivierung nachgeschalteter intrazellulärer Signale, den RAS-RAF-MEK-MAPK und den PTEN-PIK3CA-AKT Signalweg. Beide Medikamente werden derzeit sowohl als Monotherapie, als auch in Kombination mit einer Chemotherapie zur Behandlung des mCRC eingesetzt (Cunningham et al. 2004; Köhne et al. 2012). Punktmutationen in K-Ras Codon 12 oder 13 im Exon 2 wurden als prädiktive Biomarker zur Wirksamkeit von Cetuximab und Panitumumab identifiziert. Später wurden auch Punktmutationen in den Exons 3 und 4 des K-Ras Gens, sowie Mutationen in den korrespondierenden Exons des N-Ras Gens als ursächlich für eine primäre Resistenz gegen die anti-EGFR Antikörper-Behandlung ausgemacht. Hieraus resultiert, dass die Testung auf K-Ras und N-Ras Mutationen aktuell den klinischen Standard zur Selektion von Patienten zur Behandlung mit diesen Medikamenten darstellt (Douillard et al. 2013; van Cutsem et al. 2015).

Interessanterweise konnte die Analyse von Subklonen K-Ras mutierter Tumorzellen zeigen, dass Patienten mit weniger als 1% an mutierten K-Ras Allelen ein vergleichbares progressionsfreies Überleben (*PFS*) und OS wie Patienten mit Wildtyp K-Ras Allelen aufweisen (Laurent-Puig et al. 2015). Eine Reduktion der Allelfrequenz anderer mutierter Gene konnte bei verschiedenen Malignomen, so auch beim CRC, mit einem klinischen Ansprechen auf Therapie assoziiert werden (Khan et al. 2018; Yan et al. 2016; Yang et al. 2016).

Im Hinblick auf eine primäre Resistenz konnte zudem gezeigt werden, dass Mutationen im PIK3CA Gen mit fehlender Wirksamkeit von anti-EGFR Antikörper Behandlungen vergesellschaftet sind, ebenso wie Mutationen in den Genen für ERBB2, EGFR, FGFR1, PDGFRA und MAP2K1 (Bertotti et al. 2015; Normanno et al. 2015; Roock et al. 2010).

Neben primärer Resistenz kann es unter einer anti-EGFR Antikörper Behandlung auch zu erworbener Resistenz kommen. Die gleichen Mechanismen wie bei der primären Resistenz scheinen hier verantwortlich zu sein. In diesem Zusammenhang wird die erworbene Resistenz auf das Auftreten von K-Ras mutierten Tumorzellklonen zurück-

geführt. Zusätzliche Mechanismen, die zu einer erworbenen Resistenz führen, wurden beschrieben, hierzu zählen FGFR1-Amplifikation unter Cetuximab (Bray et al. 2019), FGFR3-Überexpression (Fromme et al. 2018), HER2-Gen Amplifikation (etwa 4% aller unselektionierten Patienten), das Auftreten von MET Amplifikationen (12% aller Patienten mit Progress unter anti-EGFR Therapie), sowie Mutationen in der extrazellulären Domäne des EGFR (7%) und dem MAP2K1-Gen (Bronte et al. 2015; Zhou et al. 2020). Auf der anderen Seite kann die Resistenz verschwinden, wenn die anti-EGFR Therapie bei Progress nicht fortgeführt wird (Siravegna et al. 2015).

Neben den Therapieresistenz-induzierenden Mutationen haben verschiedene andere Mutationen eine klinische Bedeutung für das Kolorektalkarzinom. Die Inaktivierung des APC-Gens durch Mutation ist ein grundlegender Baustein der Adenom-Karzinom-Sequenz, auf der die Entstehung von Kolorektalkarzinomen basiert (Fodde et al. 2001).

Eine BRAF V600E Mutation, welche in circa 10% aller Patienten mit mCRC auftritt, führt zu einem deutlich schlechteren Ansprechen auf die systemische Standardtherapie mit schneller Progression und stark reduziertem PFS und OS (Clarke und Kopetz 2015; Kopetz et al. 2017; Yaeger et al. 2018).

Cyclin D1 (*CCND1*) Überexpression wurde als mit Tumorprogress und verringertem OS assoziiert beschrieben (Albasri et al. 2019). Ebenfalls zu erwähnen ist das SMAD4-Gen, ein wichtiges Tumorsuppressorgen, welches die Aktivität des transforming growth factor-beta (*TGF-β*) Signalwegs reguliert. Mutationen in diesem Gen werden als wichtiger prognostischer Marker gesehen, eine höhere Frequenz ist mit Fernmetastasierung assoziiert (Alazzouzi et al. 2005; Miyaki et al. 1999).

In Bezug auf die lokale Therapie konnte in einzelnen Studien für den RAS-Status, den BRAF-Status und Mutationen im TP53-Gen eine klinische Bedeutung nachgewiesen werden. RAS-mutierte hepatische CRC-Metastasen zeigten signifikant häufiger einen nicht tumorfreien Resektions- bzw. Ablationsrand, eine höhere Lokalrezidivrate und ein reduziertes Überleben (Brudvik et al. 2016; Odisio et al. 2017; Okuno et al. 2018). BRAF-Mutationen waren, zusätzlich zu dem oben genannten schlechteren Ansprechen auf eine systemische Therapie, mit signifikant schlechterem Outcome in Bezug auf hepatische Metastasektomie vergesellschaftet (Tsilimigras et al. 2018; Løes et al. 2016). Für die pulmonale Metastasektomie konnte eine Assoziation von RAS- und TP53-Mutationen mit reduziertem RFS gezeigt werden (Corsini et al. 2019). Während die Auswirkungen von systemischer Therapie auf den Mutationsstatus und daraus resultierende Resistenzen bereits Gegenstand der Forschung sind, fehlen vergleichbare Daten zur Veränderung des genetischen Profils des mCRC unter lokaler Therapie.

1.2 Oligometastatisches Kolorektalkarzinom

Eine metastasierte Erkrankung bei Erstdiagnose liegt in etwa 25% der Fälle vor. Obwohl jedoch eine Mehrzahl der Patienten bei Erstdiagnose eine lokalisierte Erkrankung aufweist, entwickeln circa 50% im Laufe der Erkrankung eine Metastasierung (van Cutsem et al. 2014). Die oligometastatische Erkrankung beschreibt hierbei Patienten mit einer begrenzten Anzahl an Metastasen, die einen eher benignen Charakter mit verlängertem PFS und einer lediglich begrenzten Anzahl an Metastasen bei Progress aufweisen (Weichselbaum und Hellman 2011). Einige dieser Patienten können durch eine multimodale Therapie aus systemischer Chemotherapie und chirurgischer Resektion oder lokaler Ablation von Metastasen geheilt werden, was zu einer verbesserten Prognose in dieser speziellen Gruppe von Stadium 4 CRC Patienten führt (Brandi et al. 2013). Im Gegensatz hierzu profitieren Patienten mit einer polytopen Metastasierung und eher aggressivem Erkrankungscharakter höchst wahrscheinlich nicht von lokaler Therapie.

Neben der gängigen klinischen Definition braucht es neue Biomarker, um das oligometastatische Stadium in Zukunft biologisch zu definieren und eine bessere Aussage zur Wirksamkeit und dem Auftreten von Resistenzen unter Behandlung treffen zu können. Hier liegt ein besonderes Augenmerk auf der liquid biopsy (Normanno et al. 2018).

1.3 Die Rolle der „liquid biopsy“

Es ist hinlänglich bekannt, dass Tumorzellen zirkulierende Tumor-DNA (*ctDNA*) in Körperflüssigkeiten wie das Blut abgeben, bzw. diese durch Apoptose, Nekrose oder Phagozytose (Stroun et al. 1987; Holdenrieder et al. 2001) freigesetzt wird. Ein Großteil der zirkulierenden DNA ist jedoch nicht malignen Ursprungs (Thierry et al. 2016) und die Erkennung tumorassoziierter Allele war lange unmöglich.

Dies hat sich mit der Einführung neuartiger digitaler Sequenzierungstechnologien grundlegend geändert. Sie stellen die Basis zur Detektion und Quantifizierung seltener Mutationsvarianten in komplexen DNA Mischungen dar, sowohl in Gewebe, als auch in Körperflüssigkeiten, wie dem Blut. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff „liquid biopsy“ geprägt (Esposito et al. 2016). Auf dieser Basis können einzelne Punktmutationen identifiziert und mehrere Gene parallel aus einer Probe ausgewertet werden. Darüber hinaus können Amplifikationen, Rearrangements und Aneuploidie durch next generation sequencing (NGS) detektiert werden (Diaz und Bardelli 2014).

Der Goldstandard zur Evaluierung des Therapieansprechens ist aktuell die radiologische Bildgebung, ausgewertet nach den Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (*RECIST*) (Eisenhauer et al. 2009). Genau wie die lokalen und systemischen Therapieoptionen werden diese Verfahren laufend weiterentwickelt und bieten die Möglichkeit eines verlässlichen Stagings, sowie darauf basierender Verlaufskontrollen (Tamandl et al. 2018; Baeßler et al. 2016). Schwächen sind neben der Tatsache, dass nur messbare Läsionen beurteilt werden können, die notwendige Wartezeit von mindestens zwei Monaten zwischen Therapie und Kontrolle, sowie die z.T. mit der Untersuchung einhergehende Strahlenbelastung und potentielle Nebenwirkungen verwendeter Kontrastmittel (Sharma et al. 2012).

Als Ergänzung dazu ist eine liquid biopsy aus einer Blutprobe während der Tumorthherapie, anders als eine herkömmliche Gewebebiopsie, zu jedem beliebigen Zeitpunkt unkompliziert zu gewinnen und gewährt einen Überblick der genetischen Profile sämtlicher Läsionen (Primärtumor, unterschiedliche Metastasen) (Fernández-Lázaro et al. 2020). Die Analyse wird aktuell auf ihren Nutzen als Tumormarker untersucht (He et al. 2020) und kann darüber hinaus möglicherweise Aussagen über eine Resistenzentwicklung geben (Mazouji et al. 2021). Da die liquid biopsy im Gegensatz zu einer Gewebebiopsie die Gesamtheit aller Mutationen wiedergibt, die möglicherweise zwischen den einzelnen Läsionen und auch innerhalb einer Läsion erheblich variieren, könnte sie sich zur Detektion von Resistenzen unter systemischer Therapie als überlegen erweisen (Falco et al. 2019). Bei Patienten mit mehreren Metastasen ist eine Zuordnung der in der liquid biopsy nachgewiesenen Mutationen dadurch allerdings nicht möglich, ebenso wie eine Isolierung von ctDNA aus der Gesamtmenge zirkulierender DNA. Auch sind die Kosten der Sequenzierung je nach Umfang und genutztem Verfahren aktuell noch sehr hoch. Zum sicheren Nachweis von Mutationen wird zudem eine gewisse Menge an cfDNA benötigt, das Verfahren ist darüber hinaus anfällig für präanalytische Fehler. Es ist daher zuerst nötig, die Sammlung, Verarbeitung und Lagerung zu standardisieren und das Gesamtkonzept in weiteren klinischen Studien zu verfeinern (Lussier et al. 2012; Lussier et al. 2011; Yamada et al. 2019; Kolenčik et al. 2020; Ding et al. 2020). Erste Studien zeigen bereits die Möglichkeit aus den Ergebnissen der liquid biopsy abgeleiteter Therapieplanänderungen (Osumi et al. 2019; Pereira et al. 2020).

In Bezug auf chirurgische oder alleinige medikamentöse Tumorthherapie konnte in der Vergangenheit eine Korrelation zwischen dem Level von ctDNA im Plasma und dem Rezidivrisiko eines CRC bzw. einem klinischen Progress aufgezeigt werden (Osumi et al. 2019; Garlan et al. 2017; Schøler et al. 2017; Reinert et al. 2016; Diehl et al. 2008). Ähnliche Daten für lokale radiologische Ablationsverfahren fehlen beim mCRC bisher.

Bei anderen Entitäten, wie z.B. dem hepatozellulären Karzinom, zeigen sich bereits vielversprechende Daten (Alunni-Fabbroni et al. 2019).

1.4 Studiendesign

Ziel dieser explorativen Pilotstudie war es, anhand ausgewählter Patienten aus einer Gruppe von 56 lokalablativ therapierten Patienten mit mCRC den Einfluss einer (in der Intention kompletten) lokalen Tumorablation auf die Entwicklung genetischer Alterationen, sofern klinisch möglich unter systemischer Chemotherapie und anti-EGFR Antikörpertherapie, zu untersuchen. Parallel erfolgten regelmäßige bildgebende Kontrollen. Die retrospektive Analyse des patientenspezifischen Mutationsstatus in ctDNA des Blutes wurde auf ihren Nutzen als Biomarker der Response bzw. eines Progresses nach Ablation der Metastasen geprüft. Die hier gesammelten Daten sollen in einem weiteren Schritt zur Erstellung eines größeren (randomisierten) Studiendesigns genutzt werden.

Primäre Fragestellung der Studie:

Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Abfall der Allelfrequenz mutierter ctDNA und dem PFS/OS?

Sekundäre Fragestellungen:

Ist ein Rezidiv gekennzeichnet durch ein anderes genetisches Profil?

Kann die lokale Ablation nach Progress unter systemischer Therapie entstandene, resistente Klone eliminieren?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenauswahl

Von April 2016 bis Februar 2018 wurden Patienten mit oligometastasiertem Kolorektalkarzinom an zwei Zentren eingeschlossen (Otto von Guericke Universität Magdeburg; Ludwig Maximilians Universität München ab 2017).

Zu jeder Therapie lag die Behandlungsempfehlung durch ein multidisziplinäres Tumorboard vor, alle Metastasen mussten einer kompletten Ablation zugänglich sein. Das minimale Einschlussalter wurde auf ≥ 18 Jahre festgelegt, zudem wurde eine Lebenserwartung > 12 Monate vorausgesetzt. Alle Patienten mussten nach ausführlicher Aufklärung vor Einschluss eine Einwilligungserklärung (siehe Anhang) unterschreiben. Ausgeschlossen wurden Patienten mit mehr als 3 befallenen Organen, Patienten mit Pleura- oder Peritonealkarzinose, sowie Schwangere (vgl. Tabelle 1). Die Durchführung der Studie wurde von den Ethikkommissionen aller teilnehmenden Institutionen genehmigt (DRKS00006294).

Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
histologisch nachgewiesenes oligometastatisches Tumorstadium eines Kolorektalkarzinoms	Metastasen in mehr als drei Organsystemen
Maximal 3 befallene Organe	Peritoneale oder pleurale Metastasen
Maximal 3 Läsionen pro Organ (max. 10 Läsionen der Leber)	Vorliegen einer Schwangerschaft
Metastasen sind einer kompletten Ablation zugänglich	
Behandlungsempfehlung für den Patienten durch ein institutionelles multidisziplinäres Tumorboard bestätigt	
Alter ≥ 18 Jahre	
Lebenserwartung > 12 Monate	
Vorliegen einer unterschriebenen und datierten Einwilligungserklärung	

2.2 Lokale Therapien

Die primäre Behandlungsempfehlung wurde durch ein multidisziplinäres Tumorboard (MDT) ausgesprochen. Behandlungsentscheidungen bei Einschluss sowie während

der Follow ups wurden außerdem von einem multidisziplinären Studienboard überwacht.

Die lokalen Tumoreradikationstechniken wurden nach klinisch etabliertem Standard oder Standardprozedur mittels eines der folgenden Verfahren an einem von zwei Zentren mit Spezialisierung auf lokalablativ interventionell-radiologische Therapien durchgeführt.

CT-gesteuerte interstitielle Brachytherapie

Die interstitielle Brachytherapie (*iBT*) verwendet eine in einen perkutan in die maligne Läsion eingebrachten Katheter applizierte ^{192}Ir -Quelle zur lokalen Bestrahlung. Voraussetzungen für die Durchführung sind eine nicht gestörte Gerinnung (Quick $>50\%$, Thrombozyten $>50.000/\mu\text{l}$, pTT $<50\text{s}$), sowie die Abwesenheit von Infekt-Symptomen.

Während der Behandlung wurden die Vitalparameter des Patienten durch Pulsoximetrie, Elektrokardiographie und Messung des Blutdrucks alle 5 Minuten durchgehend kontrolliert. Es erfolgte eine Analgesie mit Fentanyl und Midazolam intravenös in patientenindividueller Dosierung, danach eine Lokalanästhesie mit Xylocain 1% im Bereich der geplanten Punktionsstelle. Das Einbringen der Coaxialnadeln in die Zielläsion erfolgte unter CT-Kontrolle. Hierüber wurden die 6F Angiographie Schleuse mit hydrophiler Beschichtung (z.B. Radiofocus, Terumo, Japan) und ein steifer Angiographie-Draht (z.B. Amplatz, Boston Scientific, USA) eingeführt. Über diese wurden wiederum, abhängig von der Größe der Läsion ein oder mehrere 6F Afterloading Katheter (Primed, Halberstadt Medizintechnik GmbH, Halberstadt, Deutschland) eingeführt. Nach Einbringen der Katheter erfolgte eine kontrastmittelverstärkte Multischicht-Planungs-CT (80-120ml Jod-basiertes intravenöses Kontrastmittel nach Körpergewicht) oder -MRT (Gadolinium-basiert i.v.; 0,1 ml pro kg KG Gadobutrol oder 0,1 ml pro kg KG Gd-EOB-DTPA) mit Schichtdicke von ≤ 5 mm. Die Planung der lokalen Ablation wurde von einem Physiker, einem interventionellen Radiologen und einem Radio-Onkologen mittels einer speziellen Behandlungsplanungssoftware (BrachyVision, Varian Medical Systems, Charlottesville, VA, USA; oder Oncentra, Nucletron, Elekta AB, Stockholm, Schweden) durchgeführt. Die Katheterposition wurde als Kombination aus drei Koordinaten in die Software eingegeben. Für jeden Katheter wurde die Distanz zu den Tumorgrenzen mittels eines Systems aus Referenzpunkten codiert. Die *iBT* erfolgte mittels ^{192}Ir -Quelle mit 10 Ci (= $37 \cdot 10^{10}$ Bq) Aktivität. Entlang der implantierten Katheter kann die Iridium-Quelle beliebig verschoben und für eine vorher berechnete Dauer gestoppt werden, was das bestrahlte Volumen mit zunehmender Stopdauer vergrößert. Dies ermöglicht durch Einbringen mehrerer Katheter die Behandlung komplexer Tumorumfahrungen. Die direkte Applikation der Strahlung innerhalb des Tumors macht au-

ßerdem eine hohe Zieldosis möglich bei gleichzeitig schnellem Abfall der Dosis außerhalb der Zielläsion, sodass umliegende Organe und Strukturen geschont werden können. Die übliche Minimaldosis an den Tumorgrenzen beträgt 20 Gy, aber auch höhere Dosen sind vertretbar. Die Bestrahlungsdauer beträgt üblicherweise 10 bis 40 Minuten, abhängig vom Volumen der Zielläsion. Als oberes Limit wurden hier etwa 60 Minuten bei großen Läsionen gewählt, Daten zu einer sicheren Obergrenze existieren allerdings aktuell nicht. Idealerweise reichten die geplanten Isodosen einige Millimeter über die Läsionsgrenzen hinaus, um einen adäquaten Sicherheitsabstand zu gewährleisten. Nach der Bestrahlung wurden die Katheter entfernt und die Katheterkanäle mit Gelschaum (Leber, Lymphknoten) oder Fibrinkleber (Lunge) verschlossen (Ricke et al. 2004a; Ricke et al. 2004b; Rühl et al. 2010).

Radiofrequenzablation

Die Radiofrequenzablation (RFA) benutzt alternierende hochfrequente elektrische Ströme (300-500kHz) zwischen perkutan in eine Läsion eingebrachten Elektroden, um Hitze zu erzeugen, die das umliegende maligne Gewebe zerstört.

Es erfolgte zusätzlich zur durchgehenden Kontrolle der Vitalparameter des Patienten eine kontinuierliche Messung von Temperatur, Leistung und Widerstand der RFA-Sonden. Lagerung und (Prä-)Medikation entsprachen der bei der iBT. In der CT wurde die Läsion aufgesucht. Danach erfolgte das perkutane Einbringen der Sonde in die Läsion unter CT-Steuerung. Nach korrekter Positionierung wurde der Schirm expandiert. Für Läsionen über 3cm Durchmesser wurden mehrere, überlappende Schirme eingebracht. Die Leistung der Sonden wurde schrittweise gesteigert, sodass, abhängig von der Größe der Läsion, über eine vorher definierte Zeit die Zieltemperatur in der Läsion gehalten werden konnte. Dafür verblieb die Sonde entsprechend eines festgelegten Schemas in der Läsion, bei einer Größe von 3 cm 15 Minuten, bei 4 cm 20 Minuten und bei 5 cm 37 Minuten. Bei Rückzug der Sonde wurde der Punktionskanal ebenfalls erhitzt, um Stichkanalmetastasen zu vermeiden. Im Anschluss erfolgte eine kontrastmittelverstärkte CT-Untersuchung zur Bestätigung des technischen Erfolgs der Behandlung und zum Ausschluss potentieller Komplikationen (Tan et al. 2018).

Mikrowellenablation

Die Mikrowellenablation (MWA) benutzt Mikrowellen, d.h. elektromagnetische Wellen mit einer Frequenz von 900 bis 2450 MHz, um das umliegende Gewebe zu erhitzen und eine Koagulationsnekrose der malignen Läsion zu verursachen.

Monitoring, Lagerung und (Prä-)Medikation entsprachen denen der RFA. Nach Verabreichen des Lokalanästhetikums und Aufsuchen der Läsion erfolgte das perkutane

Einbringen der Antenne in die Läsion unter CT-Steuerung. Nach korrekter Lage der Antenne direkt im Tumor wurde diese mit dem Generator verbunden. Die Antenne emittiert am nicht isolierten Ende eine Leistung von bis zu 100W mit einer Frequenz von 2450 MHz. Die Größe der Antennenspitze wurde abhängig vom Tumordurchmesser gewählt mit 0,5cm für <2cm, 0,7cm für 2-3cm und 1,1cm für > 3cm Durchmesser. Im Anschluss erfolgte eine kontrastmittelverstärkte CT-Untersuchung zur Bestätigung des technischen Erfolgs der Behandlung und zum Ausschluss potentieller Komplikationen (Simon et al. 2005; Song et al. 2017).

2.3 Begleitende systemische Therapie

Systemische Chemotherapie wurde abhängig vom Allgemeinzustand des Patienten, sofern klinisch möglich und vom Patienten gewünscht, Leitlinien-konform (vgl. Abbildung 1; nach den ESMO Consensus Guidelines 2014 und der AWMF S3 Leitlinie Kolo- rektales Karzinom 2019) vom behandelnden Onkologen durchgeführt.

Die Erstlinie dieser palliativen Therapie sieht als Hauptbestandteil die Gabe eines Fluoropyrimidins (intravenöses 5-Fluorouracil (*5-FU*) mit Leukovorin (*LV*) oder orales Capecitabin) alleine oder in Kombination mit anderen Substanzen vor. Der Monotherapie überlegen sind Kombinationschemotherapien mit 5-FU/LV/Oxaliplatin (*FOLFOX*) oder 5-FU/LV/Irinotecan (*FOLFIRI*), sowohl bezüglich Response Rate (*RR*), als auch bezüglich PFS (Gramont et al. 2000; Grothey et al. 2004; Douillard et al. 2000; Tournigand et al. 2004). Beide Regime beinhalten eine 46- bis 48- stündige Applizierung in einem 14-tägigen Rhythmus mit Bolusgaben von 5-FU/LV.

Alternativ kann eine dosisreduzierte Capecitabin/Oxaliplatin-Therapie (*CAPOX*) erwogen werden, auch eine Dreifachkombination mit 5-FU/Oxaliplatin/Irinotecan (*FOLFOXIRI*) findet Anwendung, insbesondere bei BRAF-Mutation.

Die Zweitlinientherapie kommt bei gutem Performance-Status und adäquater Organfunktion in Frage. Unter Irinotecan refraktäre Patienten erhalten eine Oxaliplatin-basierte Therapie (*FOLFOX* oder *CAPOX*), Patienten, die unter Oxaliplatin progredient sind wiederum eine Irinotecan-basierte (Irinotecan mono oder *FOLFIRI*) (Rougier et al. 1998).

Zur weiteren Verbesserung des PFS, OS und der RR werden sowohl in der Erstlinientherapie als auch danach zusätzlich zur Chemotherapie monoklonale Antikörper gegen den VEGF und den EGFR (bei begünstigendem Mutationsstatus) eingesetzt. Bevacizumab, ein monoklonaler anti-VEGF-A-Antikörper, wird mit sämtlichen zuvor genann-

ten Schemata kombiniert verwendet (Cremolini et al. 2015; Saltz et al. 2008; Tebbutt et al. 2010).

Aflibercept, ein rekombinantes Fusionsprotein, das die Aktivität des VEGF-A, VEGF-B und des placenta growth factor hemmt, verbessert ebenfalls OS, PFS und RR in Kombination mit Zweitlinien-FOLFIRI-Chemotherapie (van Cutsem et al. 2012).

Regorafenib, ein oraler Tyrosinkinaseinhibitor, hat ebenfalls eine signifikante Verbesserung des OS und PFS gezeigt und ist aktuell in der Letztlinientherapie zugelassen (Grothey et al. 2013).

Für die Therapie von Patienten mit RAS-WT mCRC sind zudem die anti-EGFR-Antikörper Cetuximab und Panitumumab, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Chemotherapie, zugelassen, wobei die Kombination der Monotherapie überlegen ist (van Cutsem et al. 2007; Jonker et al. 2007; Cunningham et al. 2004). In der Erstlinientherapie linksseitiger CRCs ist die Kombination aus FOLFOX oder FOLFIRI mit einem anti-EGFR-Antikörper der Kombination mit einem anti-VEGF-Antikörper überlegen (Heinemann et al. 2016; Rivera et al. 2017). Beim rechtsseitigen CRC hat sich kein zusätzlicher Benefit gezeigt.

Mit Tas 102, einer oralen Kombination aus Trifluridin und Tipiracilhydrochlorid, erhielt 2015 zudem ein weiteres Medikament für Patienten mit therapieresistentem mCRC die Zulassung (Mayer et al. 2015).

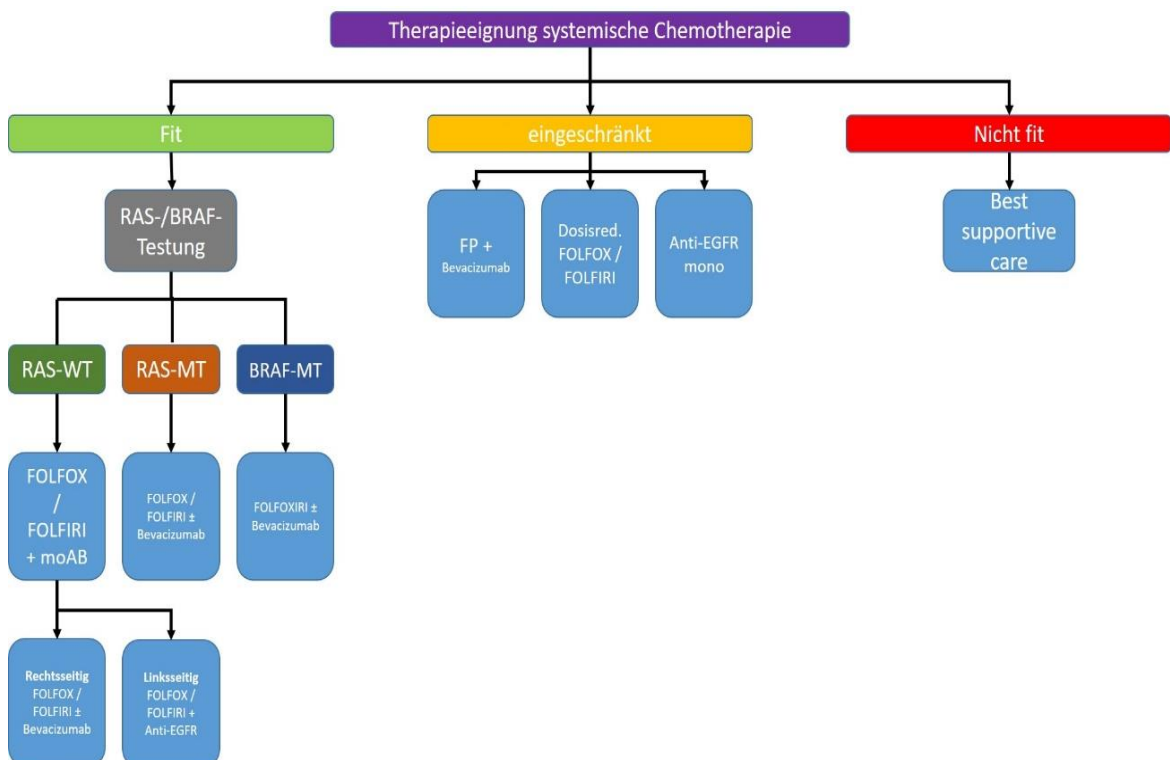


Abbildung 1: Erstlinienschchemotherapie des mCRC (entspr. AWMF S3 Leitlinie CRC 2019)

2.4 Liquid biopsy

2.4.1 Blutentnahme

Je zwei 10ml Blutproben in Cell-free DNA (*cfDNA*) BCT® - Röhrchen wurden gewonnen an d-1 (Baseline einen Tag vor Ablation), d1 und d8 nach Ablation(en), danach alle zwei Monate. Die Proben wurden via Butterfly-System aus einer peripheren Vene entnommen und entsprechen der Empfehlung des Herstellers im Anschluss 10 Mal um je 180° rotiert, sodass eine ausreichende Durchmischung erreicht wurde. Hierfür wurden für alle Mitarbeiter Standard Operating Procedures (*SOP*) entworfen (siehe Anhang), die bei externer (ambulanter) Blutentnahme in den onkologischen Praxen außerdem dem Patienten mitgegeben wurden, ebenso wie eine bruch- und kontaminationssichere Versandbox und ein TNT-Rückversandschein.

2.4.2 Zwischenlagerung

Nach Eingang der Proben im Labor der Pathologie in Magdeburg wurden diese von den dortigen Mitarbeitern analog der Verfahrensweise von Taly et al bei 4°C für 10 Minuten mit 3000g zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und in 2ml Cryotubes gefüllt. Die fertigen Proben wurden mit einem probenspezifischen Barcode versehen und nachfolgend bei -80°C gefroren (Taly et al. 2013). Die in München gewonnenen Proben wurden ebenso aufbereitet. Die Auswertung aller Proben erfolgte im Institut für Pathologie der LMU München.

2.4.3 Auswertung der liquid biopsy

Zur Isolation der *cfDNA* aus den zuvor gewonnenen Plasmaproben wurde das QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit von QIAGEN entsprechend den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Konzentration der hiermit extrahierten *cfDNA* wurde mittels Fluorometrie bestimmt. Die empfohlene Menge an *cfDNA* für den Oncomine Pan-Cancer Cell Free Assay beträgt 20ng. Das ermöglicht laut Hersteller die Detektion seltener Varianten mit Frequenzen von 0,1%, also einer mutierten Variante vor dem Hintergrund von 999 Wild-Typ DNA Varianten (Brinza et al. 2016). Um das beste Ergebnis zu erreichen, wurde so viel *cfDNA* (bis maximal 50ng) verwendet, wie aus den Plasmaproben gewonnen werden konnte. Nach Amplifikation mit probenspezifischen Barcode-adaptierten Primern wurde mittels qPCR die hierdurch erstellte library quantifiziert. Diese wurde abschließend mit dem Oncomine Pan-Cancer Cell-Free Assay von ThermoFisher analysiert, einem die folgenden 52 Gene umfassenden Panel:

Tabelle 2: Oncomine™ Pan-Cancer Cell-Free Assay

Gentyp	Gene
Einzelnukleotid-Varianten (SNVs) und kurze indels	AKT1, ALK, AR, ARAF, BRAF, CHEK2, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, NRAS, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, RET, ROS1, SF3B1, SMAD4, SMO
Fusionsgene	ALK, BRAF, ERG, ETV1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, NTRK1, NTRK3, RET, ROS1
Exon 14 skipping	MET
Kopienzahlvariationen (CNVs)	CCND1, CCND2, CCND3, CDK4, CDK6, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, MYC
Tumorsuppressorgene	APC, FBXW7, PTEN, TP53

Ein Notebook zur genauen Durchführung der Analyse ist im Anhang zu finden. Im Folgenden werden einzelne relevante Grundlagen kurz erläutert.

Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*PCR*) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Proben. Hierbei wird die Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält, mit zwei spezifischen Primern, einer hitzebeständigen DNA-Polymerase, Desoxyribonucleosidphosphaten, Magnesium-Ionen und einer Pufferlösung nach einem festgelegten, Ansatz-spezifischen Schema in einem Thermozykler erhitzt. Bei hoher Temperatur (94 bis 98°C) wird die DNA zunächst denaturiert, die DNA liegt nach Spaltung der Wasserstoffverbindungen in zwei Einzelsträngen vor. Dann binden bei niedrigerer Temperatur (50 bis 65°C) die spezifischen Primer am jeweiligen 3' Ende der Einzelstränge. Bei 72 bis 80°C beginnt eine hitzebeständige DNA-Polymerase, aus den in der Lösung vorhandenen Desoxyribonucleosidphosphaten den jeweils komplementären Strang des zuvor gewonnenen Einzelstranges ausgehend von dem zuvor gebundenen Primer aus 5'-Richtung zu synthetisieren. Nach Abschluss dieser Elongation wird die DNA erneut denaturiert und ein neuer Zyklus beginnt. So wird mit jedem vollständigen Zyklus die Menge an Doppelstrang-DNA verdoppelt (Kramer und Coen 2001).

Quantifizierung der Library mittels quantitativer PCR

Die Quantifizierung der Oncomine™ cfDNA library erfolgte mittels quantitativer PCR (*qPCR*) mit dem Ion Library TaqMan® Quantification Kit. Hierbei wird mittels Unterbrechung des Förster-Resonanzenergietransfers zwischen dem Reporter-


Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM-phosphoramidit und einem Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) durch die DNA-Polymerase während der PCR der hierdurch verursachte Anstieg der Fluoreszenz des zuvor mit einem spezifischen Amplikon verbundenen Farbstoffes gemessen (Heid et al. 1996). Mit den resultierenden Konzentrationen wurde ein Verdünnungsschema zur Sequenzierung erstellt.

Halbleitersequenzierung

Die abschließende Sequenzierung erfolgte als Halbleitersequenzierung mit Hilfe eines Halbleiter-Chips, welcher aus Wells besteht, in denen die chemische Information des Baseneinbaus in elektronische Signale umgewandelt wird. Hierzu werden die zuvor gewonnenen Amplikons auf den Chip gegeben, jedes einzelne Fragment lagert sich an einen korrespondierenden Bead an, welcher über den Chip fließt und in einem Well zu liegen kommt. Der Chip wird nachfolgend mit je einem der 4 DNA-Nukleotide gespült. Jedes Mal, wenn ein Nukleotid an einen DNA-Einzelstrang bindet, wird ein Wasserstoff-Molekül frei. Dieses verändert den pH-Wert der Lösung im Well, ein ionensensitive Feldeffekttransistor unter dem Well misst die pH-Wertveränderung und konvertiert das entstehende Potential in Volt. Diese Spannung wird aufgezeichnet und damit die Information übermittelt, dass das Nukleotid gebunden hat. Der Prozess wiederholt sich alle 15 Sekunden mit einem anderen Nukleotid. Ist das Nukleotid, welches gerade verwendet wird, nicht kompatibel zur nächsten Base des Einzelstranges, wird kein Wasserstoffmolekül frei und somit auch keine pH-Veränderung (und damit Spannung) gemessen. Liegen zwei identische Basen hintereinander, so wird die doppelte Menge Wasserstoffmoleküle frei, die Spannung verdoppelt sich dementsprechend, der Chip registriert zwei identische Basen. Auf den gesamten Chip gesehen findet dieser Vorgang parallel in Millionen Wells statt (massive parallel sequencing) (Rothberg et al. 2011). Vom Chip wurden Basenreihen wiedergegeben welche nachfolgend in Sequenzen umgewandelt wurden. Die ausgelesenen Sequenzen wurden mit einem Referenz-Genom verglichen und so vorhandene Mutationen herausgefiltert.


Identifizierung relevanter Treibermutationen

Mit Hilfe des Ensembl Variant Effect Predictor, einer über <http://grch37.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html> abrufbaren, webbasierten Gendatenbank, wurden die relevanten Treibermutationen aus der Gesamtheit der erhobenen Mutationen identifiziert, über den Ion Torrent™ OncoPrint™ Knowledgebase Reporter lässt sich direkt eine Aussage über eine Therapierelevanz der gefundenen Mutation treffen (McLaren et al. 2016).



LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

PATHOLOGISCHES INSTITUT DER LMU
 DIREKTOR: PROF. DR. THOMAS KIRCHNER



Molekularpathologie
 Leitung: Prof. Dr. Andreas Jung
 Thalkirchnerstraße 36
 80337 München
 Tel.: 089-2180-73611

Pathologie ID: GATTACA_1
Labor ID:
Datum: 25.03.2019
1 von 26

Krebsart der Probe: Darmkrebs

Zusammenfassung der Varianten

Bei dieser Krebsart
 Bei einer anderen Krebsart
 Bei dieser Krebsart und bei anderen Krebsarten
 Kontraindiziert
 Indiziert und Kontraindiziert
 Keine Hinweise

Genomveränderung	EMA	FDA	ESMO	NCCN	Klinische Tests
KRAS p.(G12D) c.35G>A	⊘ (3)	⊘ (2)	⊘ (4)	⊘ (2)	● (9)
BRAF p.(D594N) c.1780G>A	×	×	×	×	● (7)
PDGFRA p.(D842G) c.2525A>G	×	×	×	×	● (4)
EGFR p.(R108G) c.322A>G	×	×	×	×	● (3)
PDGFRA p.(?) c.932-2A>G	×	×	×	×	● (4)
SMO p.(M525V) c.1573A>G	×	×	×	×	● (1)

EMA: Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA), FDA: US-Arzneimittelbehörde FDA, ESMO: Europäische Gesellschaft für Medizinische Onkologie (ESMO), NCCN: US-National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Zahlen in Klammern geben die Anzahl relevanter Therapien mit Nachweisen an.

Treibervarianten ohne relevante Evidenz

Diese Varianten weisen keine relevante Evidenz auf, ausgehend von den enthaltenen Datenquellen. Möglicherweise weist aber das Gen hier nicht enthaltene Evidenz auf.

Abbildung 2: Ion Torrent™ OncoPrint™ Knowledgebase Reporter

2.5 Tumorbiopsien

Es wurden, soweit klinisch möglich, während der Therapie vom Radiologen aus allen Läsionen Biopsien zur Kryokonservierung entnommen, welche umgehend auf Trockeneis gelagert, nach Transport in die zuständige Pathologie mit einem probenspezifischen Barcode versehen und dann bei -80°C eingefroren wurden. Bei den Münchner Patienten wurde eine formalinfixierte Biopsie zur histologischen Aufarbeitung und Validierung des Biopsieerfolges ergänzt. Die Biopsie erfolgte bei der iBT koaxial, bei MWA und RFA über einen gesonderten Stichkanal. Zur Extraktion der DNA aus den Gewebeproben wurde das QIAamp DNA Mini Kit verwendet, das Verfahren gleicht dem zur Aufreinigung der DNA aus den liquid biopsies. Statt einer Gewinnung mittels Vakuum wurde die verwendete Säule hierbei zentrifugiert. Zuvor wurde die Probe enzymatisch lysiert, eine Pufferlösung stabilisierte die Nukleinsäuren. Abschließend wurde die Säule mit Waschpuffer ausgespült und die DNA so frei. Die übrigen Schritte entsprachen denen der Sequenzierung der liquid biopsy.

2.6 Follow ups

Das erste Follow up (*FU*) nach Intervention nach 8 Tagen bestand in der Entnahme von Patientenblut in zwei Streck Tubes für die liquid biopsy. War dies nicht möglich (z.B. aufgrund einer zu großen räumlichen Distanz zum Wohnort des Patienten), wurden die in Streck Tubes konservierten Blutproben an das jeweilige Institut geschickt. Hierfür erhielt der Patient zwei Streck Tubes, ein Butterfly-Nadelsystem, eine bruch- und kontaminationssichere Versandbox, einen TNT Rückversandschein, sowie eine SOP (siehe Anhang) zur fachgerechten Durchführung der Blutentnahme mit dem Streck Tube Röhrchen und dem Butterfly-Nadelsystem.

Die folgenden FUs mit Entnahme von Patientenblut in zwei Streck Tubes für die liquid biopsy, sowie Bildgebung aller zuvor betroffenen Körperregionen wurden alle zwei Monate, sofern möglich ebenfalls in der Klinik, in welcher die lokale Therapie erfolgt war, durchgeführt. War dies nicht möglich (z.B. aufgrund einer zu großen räumlichen Distanz zum Wohnort des Patienten), wurde die Bildgebung mit begleitender Blutentnahme ambulant durchgeführt und die Bilddaten an das jeweilige Institut geschickt, ebenso die in Streck Tubes konservierten Blutproben. Auch hierfür erhielt der Patient wieder ein vorbereitetes Blutentnahmekit mit Rückversandschein wie oben dargestellt. Die Bildgebung erfolgte abhängig von der Lokalisation der vorhandenen/therapierten Metastasen typischerweise mittels computer- bzw. magnetresonanztomographischen Aufnahmen des Abdomens, Beckens und/oder Thorax, jeweils mit Kontrastmittelgabe.

Magnetresonanztomographie

Bei der Magnetresonanztomographie (*MRT*) handelt es sich um ein auf der Darstellung von Wasserstoffmolekülen basierendes bildgebendes Verfahren zur Erzeugung von Schnittbildern in einer frei wählbaren Raumebene. Hierzu erzeugt der Magnetresonanztomograph homogene Magnetfelder sowie hochfrequente Radiowellen, erfasst die induzierten Signale und rekonstruiert entsprechend ihrer Lokalisation zweidimensionale Schnittbilder. Die MRT bietet einen hohen Weichteilkontrast, daher eignet sie sich besonders zur Beurteilung von Gelenken, Gehirn und Myelon, sowie den Becken- und Oberbauchorganen. Die MR-Bildgebung gilt bei einer Vielzahl von radiologischen Fragestellungen als diagnostischer Goldstandard (Tsili et al. 2021; Reiser et al. 2017). Im Rahmen dieser Studie wurde sie zur Darstellung der Oberbauchorgane, insbesondere der Leber, verwendet, sofern keine patientenspezifischen Kontraindikationen vorlagen (z.B. nicht MRT-fähiges Implantat/Schrittmacher). Zusätzlich kam auf Gadoxetsäure basierendes, Hepatozyten-spezifisches Kontrastmittel (z.B. Primovist®) zum Einsatz, welches den Kontrast zwischen gesundem Lebergewebe (hohe Aufnahme von Kon-

trastmittel) und Metastasengewebe (kaum Kontrastmittelaufnahme) erhöht (Zech et al. 2014).

Computertomographie

Bei der Computertomographie (CT) handelt es sich um ein Röntgenverfahren, bei dem mithilfe einer um den Patienten kreisenden Röntgenröhre mit gegenüberliegender Detektoreinheit unter Vorschub des Patiententisches transversale Röntgenbilder erzeugt werden. Die Summation der zweidimensionalen Bilder ergibt die Möglichkeit der dreidimensionalen Rekonstruktion sowie Berechnung von koronaren und sagittalen Schnittebenen (Horton et al. 2000; Reiser et al. 2017). Die CT wurde hier insbesondere zur Beurteilung der Hals- und Thoraxorgane, sowie bei einzelnen Patienten zur Beurteilung des Abdomens und Beckens verwendet.

Auswertung der Bilddateien

Die Beurteilung der Bilddateien wurde von einem radiologischen Facharzt mittels Durchmesseranalyse aller vorhandenen Läsionen zu jedem FU durchgeführt. Diese wurde nach Recist v1.1 ausgewertet (Eisenhauer et al. 2009). Zusätzlich wurde bei Leberläsionen anhand des Kontrastmittelverhaltens in der MRT mit Primovist®-Gabe eine Aussage zur Vitalität des Tumorgewebes getroffen, da postinterventionell zumeist eine, die initiale Metastase an Größe übertreffende Nekrose zur Darstellung kam, welche erst im Verlauf einiger Monate an Größe abnahm. Die Auswertung wurde in Unkenntnis der Ergebnisse der liquid biopsy-Auswertung durchgeführt.

2.7 Beobachtungsdauer und Vorgehen bei Progress

Die geplante Dauer der Beobachtung betrug mindestens 6 Monate nach kompletter Ablation oder bis zu Progress oder Intoleranz der Chemotherapie oder im Falle von inkompletter Ablation oder bei Widerspruch des Patienten.

Im Falle von lokalisierter oligotoper Progression wurde ein zweiter (oder dritter, ff.) Behandlungsversuch erwogen (nach Diskussion aller Optionen im MDT). Im Falle einer zweiten oder dritten Ablation wurde das gesamte Procedere wiederholt, dies ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Nach einer zweiten (oder dritten) Ablation war die Fortführung der Chemotherapie-Antikörper-Therapie die bevorzugte Option. Nach einer inkompletten zweiten (oder dritten) Ablation oder nach polyotoper Progression war ein Wechsel der systemischen Therapie nach aktuellen Guidelines der empfohlene Ansatz.

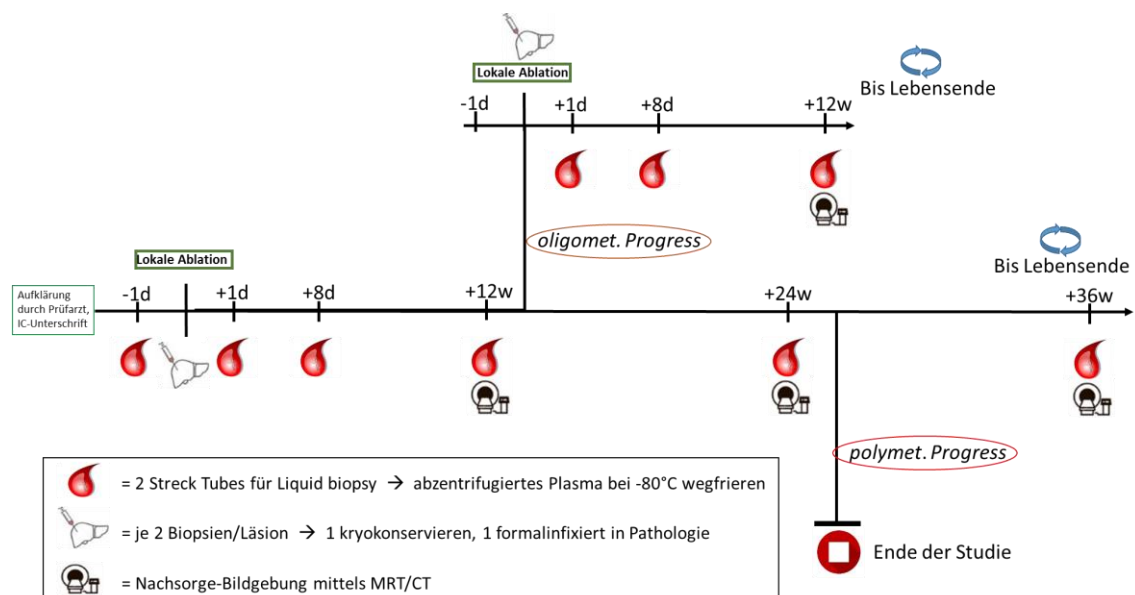


Abbildung 3: Studienablauf

2.8 Dokumentation

Zur Dokumentation des Studienverlaufes jedes Studienteilnehmers wurde ausgehend von einem bestehenden ein studienmodifiziertes case report form (CRF) erstellt (siehe Anhang). Jedem Patienten wurde zur Anonymisierung nach Behandlungszentrum und Reihenfolge des Einschlusses eine Studiennummer zugewiesen. Die an der OVGU Magdeburg therapierten Patienten erhielten den Buchstaben „M“, daraus folgte die Benennung M01, M02, ff.; Patienten, die an der LMU München therapiert wurden, erhielten die Buchstaben „LMU“, daraus folgte LMU01, LMU02, ff. Die benötigten Daten wurden aus vorhandenen Arztbriefen entnommen, fehlende Daten bei den behandelnden Onkologen und Hausärzten erfragt. Folgende Patientencharakteristika wurden erfasst: Geschlecht, Alter, Zeitpunkt der Diagnosestellung, Zeitpunkt der Erstdiagnose von Metastasen, sowie bisherige Tumorthherapie. Folgende Tumorparameter wurden erhoben: Lokalisation von Primärtumor und Metastasen, initiales Tumorstadium nach TNM-Klassifikation, Differenzierungsgrad nach WHO und Mutationsstatus (sofern bekannt). Die Therapien wurden therapiebegleitend mit Lokalisation, Verfahrensart und Anzahl therapierter Metastasen dokumentiert, die probenspezifischen Barcodes wurden im CRF, sowie einem hierfür erstellten Laboratory book (siehe Anhang) eingefügt. Auch die FUs wurden im CRF dokumentiert. Hier wurde neben dem radiologischen Ansprechen, aktueller Metastasierung und der Blutentnahme eine ggf. extern applizierte Chemotherapie erfasst.

2.9 Literaturrecherche

Für die Literaturrecherche wurde in pubmed eine Suche mit den Stichworten „liquid biopsy“, „ctDNA“, „oligometastatic cancer“, „colorectal cancer“, „brachytherapy“, „radio-frequency ablation“, „microwave ablation“, „next generation sequencing“, „ras mutation“, „chemotherapy“, sowie einer Kombination dieser Suchbegriffe durchgeführt.

2.10 Risiken

Aktuelle Leitlinien für metastasiertes Kolorektalkarzinom beinhalten die systemische Chemotherapie in Kombination mit EGFR-Antikörpern (RAS-Wildtyp) oder Angiogenesehemmern (RAS-Mutation). Die deutsche S3-Leitlinie oder die ESMO-Guidelines schlagen in der oligometastasierten Situation außerdem die lokale ablativ Therapie, z.B. mit stereotaktischer Ganzkörperbestrahlung (*SBRT*), CT-gesteuerter Brachytherapie oder Radiofrequenzablation als alternative Therapieoptionen zur chirurgischen Resektion vor (van Cutsem et al. 2014). Diese Pilotstudie richtet sich nach internationalen Therapierichtlinien, demzufolge entstand den teilnehmenden Patienten kein zusätzliches Risiko durch die Teilnahme an dieser Studie.

2.11 Nutzen

Ein direkter, über den der lokalablativen Maßnahme hinausgehender Nutzen für die Studienteilnehmer wurde nicht erwartet, da die Auswertung der liquid biopsy Proben gesammelt nach Abschluss aller Patientenfälle durchgeführt wurde.

Der intendierte Nutzen für zukünftige Patienten besteht in einer verbesserten Therapiesituation durch eine verbesserte Auswahl gezielter Tumortherapeutika durch die genaue Kontrolle der genetischen Tumoralterationen unter Therapie durch die Gewinnung peripherer Blutproben. Der Verdacht einer Resistenz gegen systemische Tumortherapie kann früher gestellt werden, er muss jedoch vor Therapiemodifikation durch Bildgebung verifiziert werden. Sofern gezeigt werden kann, dass die lokale Ablation als Zusatz zu systemischer und zielgerichteter Therapie eine Modulation oder Verzögerung genetischer Alterationen bewirken kann, könnte sie ebenfalls signifikant Resistenzen gegen zielgerichteten Medikamentenkombinationen verzögern bzw. bekämpfen.

2.12 Statistik

Bei der Erfassung von Häufigkeiten wurden deskriptive Verfahren wie Mittelwert, Minimum, Maximum und Median verwendet. Prozentuale Angaben wurden auf zwei Nachkommastellen gerundet, die absoluten Werte wurden nachfolgend angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Für die Überlebensanalysen wurden der Logrank-Test und Kaplan Meier Graphen eingesetzt. Für die Prüfung der Signifikanz der Sequenzierungsergebnisse in Bezug auf klinische Charakteristika wurde Welch's T-Test verwendet. Die statistische Signifikanz einer Assoziation zwischen verschiedenen präinterventionell sowie im weiteren Verlauf nachweisbaren Mutationen und klinischen Charakteristika wurde mittels des exakten Tests nach Fisher überprüft. Berechnungen und die Erstellung von Graphen wurden mit Hilfe von SAS Version 9.4 für Windows (Copyright SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), sowie Microsoft Excel® 2013 und dem enthaltenen Analysis ToolPack durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Von April 2016 bis Dezember 2020 wurden insgesamt 417 Blutproben und 73 Tumorstanzeln von 56 Patienten an der Otto von Guericke Universität Magdeburg (n=28) sowie der Ludwig Maximilians Universität München (n=28) gesammelt.

Alters- und Geschlechtsverteilung

Die Geschlechterverteilung aller therapierten Patienten belief sich auf 71,43 % (n=40) männliche und 28,57 % (n=16) weibliche Probanden, der Altersmedian bei Studieneinschluss lag bei 69 Jahren (Spannweite 32 bis 88).

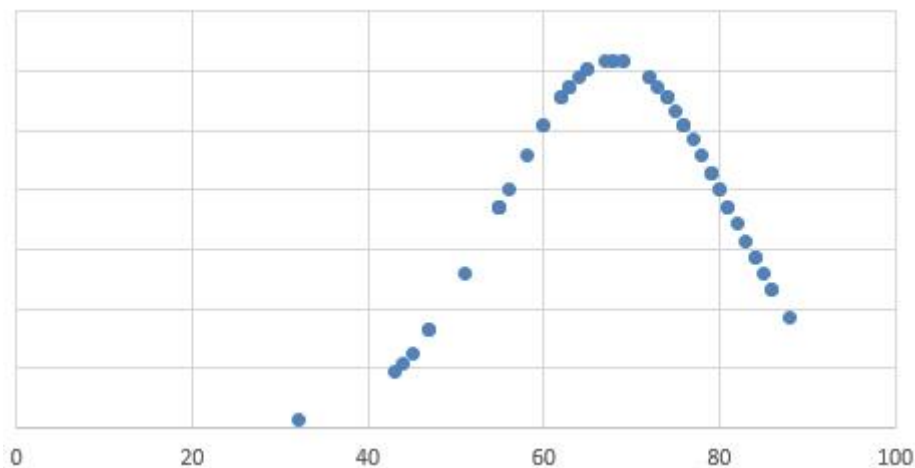


Abbildung 4: Alter bei Einschluss

Primärtumorklassifikation, Metastasierung und Mutationsstatus

Ursprüngliche Tumorklassifikation war bei 33,93% der Patienten¹ (n=19) das rechte Kolon bis zur Flexura coli sinistra, bei 66,07% (n=37) das linke Kolon oder Rektum. Von 49 Patienten lagen Ergebnisse von Mutationsanalysen am Primärtumormaterial vor, hiervon hatten 21 Patienten initial eine KRAS- und 5 Patienten eine BRAF-Mutation. 58,93% der Patienten (n=33) wiesen eine synchrone Metastasierung auf, 41,07% (n=23) eine metachrone.

¹ Im Folgenden wird im Sinne der Neutralisierung durchweg der Begriff „Patient“ und der maskuline Artikel „der“ verwendet, auch wenn der zugehörige Patient weiblich war, um eine vollständige Anonymisierung zu gewährleisten

Systemische Vortherapie

Vor Einschluss hatten 19,64% eine Chemotherapie in Kombination mit anti-EGFR Antikörpertherapie erhalten (n=11), 35,71% in Kombination mit anti-VEGF Antikörpertherapie (n=20). 8,93% der Patienten (n=5) hatten im Verlauf vor Einschluss bereits eine Kombination aus Chemotherapie und anti-VEGF, sowie anti-EGFR Antikörpertherapie erhalten. 21,45% hatten eine alleinige Chemotherapie erhalten (n=12), acht Patienten hatten vor Einschluss noch keine Systemtherapie erhalten.

Interventionen

Insgesamt wurden 113 lokale radiologische Ablationen im Verlauf der Studie durchgeführt, Hauptinterventionsorgan war mit 82,3% aller Therapien (n=93) die Leber, gefolgt von der Lunge mit 15,04% aller Eingriffen (n=17) und Lymphknotenmetastasen mit 2,65% (n=3) aller Eingriffe (vgl. Abb. 5)².

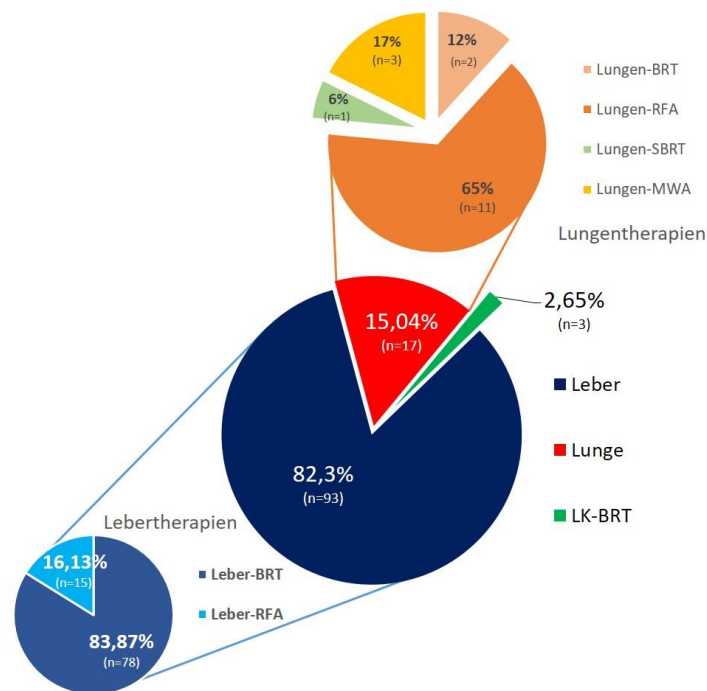


Abbildung 5: Durchgeführte Therapien nach Organ und Methode

Die mediane Anzahl erfolgreicher Interventionen pro Patient lag bei zwei Interventionen mit einer Spannweite von einer Intervention bis zu sechs Interventionen.

² Die einzelne stereotaktische Bestrahlung (SBRT) der Lunge wurde an einem anderen Institut durchgeführt, eine periinterventionelle Blutentnahme im Rahmen der Studie war aus logistischen Gründen nicht möglich.

Nachbeobachtung

Die mediane Beobachtungsdauer inklusive regelmäßiger Blutentnahmen nach Studienprotokoll bis zu polymetastatischem Progress, Tod oder Rückzug der Einverständnis des Patienten betrug sieben Monate.

Die folgende Tabelle fasst die Merkmale sämtlicher eingeschlossener Patienten zusammen:

Tabelle 3: Patientencharakteristika

Merkmale	Anzahl an Patienten
Alter bei Einschluss in Jahren	
Median (Spannweite)	69 (32 - 88)
Geschlecht (% von 56)	
männlich	40 (71,43)
weiblich	16 (28,57)
Beobachtungsdauer (inklusive Blutentnahmen) in Monaten	
Median (Spannweite)	7 (1 - 20)
Systemische Therapie vor Einschluss (% von 56)	
Keine systemische Therapie	8 (14,29)
Alleinige Chemotherapie	12 (21,43)
Chemotherapie + Anti-EGFR-Antikörper	11 (19,64)
Chemotherapie + Anti-VEGF-Antikörper	20 (35,71)
Chemotherapie + Anti-VEGF- + Anti-EGFR-Antikörper	5 (8,93)
Lokalisation des Primarius (% von 56)	
Rechtes Kolon	19 (33,93)
Linkes Kolon	37 (66,07)
Metastasierungsart (% von 56)	
Synchron	33 (58,93)
Metachron	23 (41,07)
Metastasierungsort (% von 56)	
Einzelorgan	45 (80,36)
Multiple Organe	11 (19,64)
Leber	54 (96,43)
Lunge	10 (17,86)
Lymphknoten	3 (5,36)
Initialer Mutationsstatus (% von 56)	
Keine Analyse vorhanden	7 (12,5)

Keine Mutation nachweisbar	23 (41,07)
K-Ras Mutation	21 (37,5)
BRAF-Mutation	5 (8,93)
Maximale Anzahl an radiologischen Interventionen (% von 56)	
Median (Spannweite)	2 (1 - 6)
Eine	26 (46,43)
Zwei	14 (25,0)
Drei	11 (19,64)
Vier	2 (3,57)
Fünf	1 (1,79)
Sechs	2 (3,57)
Radiologische Interventionsmaßnahme nach Art und Organ (% von 113)	
Leber	93 (82,3)
Leber-Brachytherapie	78 (69,03)
Leber-Radiofrequenzablation	15 (13,27)
Lunge	17 (15,04)
Lungen-Brachytherapie	2 (1,77)
Lungen-Radiofrequenzablation	11 (9,73)
Lungen-Mikrowellenablation	3 (2,66)
Lungen-SBRT	1 (0,89)
Lymphknoten	3 (2,66)
Lymphknoten-Brachytherapie	3 (2,66)
Systemische Therapie nach Einschluss (% von 56)	
Keine systemische Therapie	33 (58,93)
Alleinige Chemotherapie	6 (10,71)
Chemotherapie + Anti-EGFR-Antikörper	2 (3,57)
Chemotherapie + Anti-VEGF-Antikörper	11 (19,64)
Chemotherapie + Anti-VEGF- + Anti-EGFR-Antikörper	1 (1,79)
Anti-EGFR-Antikörper Monotherapie	3 (5,36)
Gesamtüberleben in Monaten	
Median (Spannweite)	19,85 (2,36 – nicht erreicht)
Median (95% KI) OS nach initialem Mutationsstatus in Monaten	
Wildtyp	27,8 (16,0 – nicht erreicht)
KRAS-mutiert	24,0 (13,0 – nicht erreicht)
BRAF-mutiert	28,4 (16,8 – nicht erreicht)
unbekannt	18,3 (12,7 – nicht erreicht)

Median (95% KI) OS nach Lokalisation des Primarius in Monaten	
Linkes Kolon	19,1 (15,7 – 43,5)
Rechtes Kolon	31,0 (21,8 – nicht erreicht)
Median (95% KI) OS nach Metastasierungsort in Monaten	
Leber	24,0 (19,0 – 36,0)
Lunge	nicht erreicht
Leber und Lunge	17,2 (13,0 – 43,5)
Leber und Lymphknoten	10,2 (4,7 – nicht erreicht)
Progressionsfreies Überleben in Monaten	
Median (Spannweite)	5,48 (1,77 – nicht erreicht)
Median (95% KI) PFS nach initialem Mutationsstatus in Monaten	
Wildtyp	6,7 (4,6 – 14,2)
KRAS-mutiert	4,6 (4,0 – 6,2)
BRAF-mutiert	6,0 (3,7 – nicht erreicht)
unbekannt	6,2 (3,2 – 11,6)
Median (95% KI) PFS nach Lokalisation des Primarius	
Linkes Kolon	5,6 (4,6 – 7,6)
Rechtes Kolon	5,2 (4,1 – 10,8)
Median (95% KI) PFS nach Metastasierungsort	
Leber	5,9 (4,5 – 8,1)
Lunge	17,6 (5,3 – 29,9)
Leber und Lunge	5,5 (3,1 – 7,1)
Leber und Lymphknoten	4,1 (3,2 – 5,1)

Die folgende Kreuztabelle gibt die Ergebnisse der Prüfung auf Zusammenhänge zwischen den einzelnen Patientencharakteristika wieder (vgl. Tabelle 4). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang besteht zwischen dem Alter bei Einschluss und der initial betroffenen Kolonseite. Patienten mit rechtsseitigem Primarius waren mit im Median 77 Jahren signifikant älter als jene mit linksseitigem Primarius mit im Median 63 Jahren ($p < 0,0001$). Darüber hinaus besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Metastasierungszeitpunkt (synchron vs. metachron) und der systemischen Vortherapie ($p < 0,0001$). Weitere statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen den Patientencharakteristika bestehen nicht (alle übrigen $p > 0,05$).

	Total (n=56)	Colonseite			Mutation					met. Organe					systemische Vortherapien				
		links (n=37)	rechts (n=19)	p-Wert	BRAF-mut (n=5)	KRAS-mut (n=21)	WT (n=23)	unknown (n=7)	p- Wert	Leber (n=43)	Lunge (n=2)	Leber+Lunge (n=8)	Sonstige (n=3)	p- Wert	keine (n=8)	nur kurativ (n=3)	nur palliativ (n=38)	Kurativ & pallia- tiv (n=7)	p-Wert
Alter bei Einschluss				< 0,0001					0,200 3					0,496 3					0,1727
Mittel- wert (SD)	68,0 (13,0)	63,8 (13,3)	76,2 (7,6)		74,6 (5,6)	68,2 (10,9)	64,4 (15,6)	74,3 (10,6)		68,3 (13,6)	69,0 (9,9)	63,0 (12,2)	76,3 (2,5)		76,75 (6,84)	62,33 (7,02)	66,26 (13,87)	69,71 (12,38)	
Median (IQR)	69,0 (19,0)	63,0 (19,0)	77,0 (14,0)		76,0 (3,0)	69,0 (14,0)	64,0 (25,0)	79,0 (18,0)		69,0 (20,0)	69,0 (14,0)	64,0 (19,5)	76,0 (5,0)		78 (10,5)	63 (7)	65 (21)	75 (12)	
Min-Max	32-88	32-88	63-86		65-79	45-86	32-88	56-85		32-88	62-76	45-80	74-79		67-85	55-69	32-88	45-80	
Ge- schlecht				0,1286					0,723 7					0,624 1					0,4677
männlich (%)	40 (71,4)	29 (78,4)	11 (57,9)		3 (60,0)	14 (66,7)	17 (73,9)	6 (85,7)		30 (69,8)	1 (50,0)	6 (75,0)	3 (100)		6 (75,0)	3 (100)	25 (65,8)	6 (85,7)	
weiblich (%)	16 (28,6)	8 (21,6)	8 (42,1)		2 (40,0)	7 (33,3)	6 (26,1)	1 (14,3)		13 (30,2)	1 (50,0)	2 (25,0)			2 (25,0)	13 (34,2)	1 (14,3)		
Colonseite									0,670 9					0,779 4					
links (%)	37 (66,1)				3 (60,0)	12 (57,1)	17 (73,9)	5 (71,4)		28 (65,1)	2 (100)	5 (62,5)	2 (66,7)						
rechts (%)	19 (33,9)				2 (40,0)	9 (42,9)	6 (26,1)	2 (28,6)		15 (34,9)		3 (37,5)	1 (33,3)						
Metasta- sierung				1,0000					0,358 5					0,930 7					< 0,0001
synchron (%)	33 (58,9)	22 (59,5)	11 (57,9)		3 (60,0)	14 (66,7)	14 (60,9)	2 (28,6)		26 (60,5)	1 (50,0)	4 (50,0)	2 (66,7)		3 (37,5)		30 (78,9)		
meta- chron (%)	23 (41,1)	15 (40,5)	8 (42,1)		2 (40,0)	7 (33,3)	9 (39,1)	5 (71,4)		17 (39,5)	1 (50,0)	4 (50,0)	1 (33,3)		5 (62,5)	3 (100)	8 (21,1)	7 (100)	
Mutation				0,6709										0,227 9					0,4516
BRAF-mut (%)	5 (8,9)	3 (8,1)	2 (10,5)							4 (9,3)		1 (12,5)					4 (10,5)	1 (14,3)	
KRAS-mut (%)	21 (37,5)	12 (32,4)	9 (47,4)							12 (27,9)	2 (100)	5 (62,5)	2 (66,7)		3 (37,5)	1 (33,3)	15 (39,5)	2 (28,6)	
WT (%)	23 (41,1)	17 (45,9)	6 (31,6)							22 (51,2)		1 (12,5)			2 (25,0)	1 (33,3)	17 (44,7)	3 (42,9)	
unknown (%)	7 (12,5)	5 (13,5)	2 (10,5)							5 (11,6)		1 (12,5)	1 (33,3)		3 (37,5)	1 (33,3)	2 (5,3)	1 (14,3)	

	Total (n=56)	Colonseite			Mutation					met. Organe					systemische Vortherapien				
		links (n=37)	rechts (n=19)	p-Wert	BRAF-mut (n=5)	KRAS-mut (n=21)	WT (n=23)	unknown (n=7)	p- Wert	Leber (n=43)	Lunge (n=2)	Leber+Lunge (n=8)	Sonstige (n=3)	p- Wert	keine (n=8)	nur kurativ (n=3)	nur palliativ (n=38)	Kurativ & palliativ (n=7)	p-Wert
met. Organe				0,7794					0,227 9									0,8001	
Leber (%)	43 (76,8)	28 (75,7)	15 (78,9)		4 (80,0)	12 (57,1)	22 (95,7)	5 (71,4)						6 (75)	3 (100)	29 (76,3)	5 (71,4)		
Lunge (%)	2 (3,6)	2 (5,4)				2 (9,5)								1 (12,5)		1 (2,6)			
Le- ber+Lunge (%)	8 (14,3)	5 (13,5)	3 (15,8)		1 (20,0)	5 (23,8)	1 (4,3)	1 (14,3)						1 (12,5)		5 (13,2)	2 (28,6)		
Sonstige (%)	3 (5,4)	2 (5,4)	1 (5,3)			2 (9,5)		1 (14,3)								3 (7,9)			
Vorthera- pien				0,7758					0,451 6					0,800 1					
keine (%)	8 (14,3)	4 (10,8)	4 (21,1)			3 (14,3)	2 (8,7)	3 (42,9)		6 (14,0)	1 (50,0)		1 (12,5)						
nur kura- tiv (%)	3 (5,4)	2 (5,4)	1 (5,3)			1 (4,8)	1 (4,4)	1 (14,3)		3 (7,0)									
nur pallia- tiv (%)	38 (67,9)	26 (70,3)	12 (63,2)		4 (80,0)	15 (71,4)	17 (73,9)	2 (28,6)		29 (67,4)	1 (50,0)		5 (62,5)	3 (100)					
kura- tiv&palliat iv (%)	7 (12,5)	5 (13,5)	2 (10,5)		1 (20,0)	2 (9,5)	3 (13,0)	1 (14,3)		5 (11,6)			2 (25,0)						

Tabelle 4: Kreuztabelle Patientencharakteristika

3.2 Gesamtüberleben

Bezogen auf den initialen Mutationsstatus

Hier zeigte sich mittels Kaplan Meier Analyse (vgl. Abbildung 6) für die Patienten mit Wildtyp ein OS von im Median 27,8 Monaten (95% KI 16,0 – nicht erreicht), für KRAS-mutierte Patienten von 24,0 Monaten (95% KI 13,0 – nicht erreicht), für BRAF-mutierte von 28,4 Monaten (95% KI 16,8 – nicht erreicht) und für Patienten mit unbekanntem initialem Mutationsstatus von 18,3 Monaten (95% KI 12,7 – nicht erreicht). Im Logrank-Test konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden ($p=0,87$), auch unter Ausschluss der Patienten mit unbekanntem Mutationsstatus nicht ($p=0,95$).

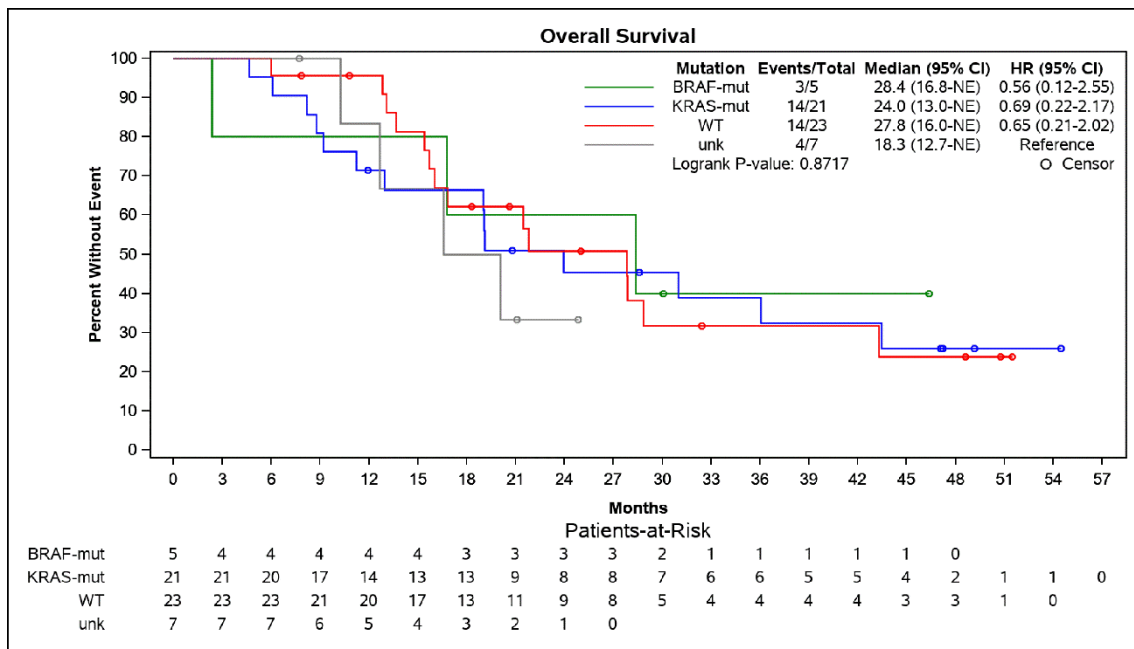


Abbildung 6: Gesamtüberleben nach initialem Mutationsstatus

Bezogen auf die initial betroffene Kolonseite

Hier zeigte sich für Patienten mit linksseitigem Primarius ein medianes OS von 19,2 Monaten (95% KI 15,7 – 43,5) im Vergleich zu 31,0 Monaten (95% KI 21,8 – nicht erreicht) für Patienten mit rechtsseitigem Primarius (vgl. Abbildung 7). Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,32$ logrank).

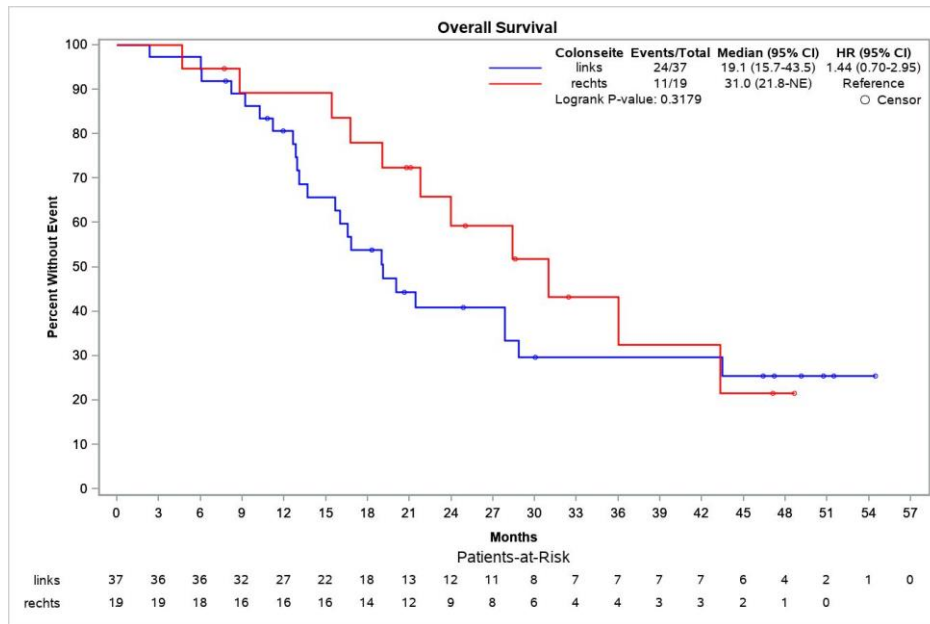


Abbildung 7: Gesamtüberleben nach Lokalisation des Primarius

Bezogen auf den Metastasierungsort

Patienten mit isolierter Lebermetastasierung hatten mit im Median 24,0 Monaten (95% KI 19,0 – 36,0) gegenüber Patienten mit kombinierter Leber- und Lungenmetastasierung mit im Median 17,2 Monaten (95% KI 13,0 – 43,5) bzw. Patienten mit kombinierter Leber- und Lymphknotenmetastasierung mit im Median 10,2 Monaten (95% KI 4,7 – nicht erreicht) ein längeres OS. Dieser Unterschied erwies sich im logrank-Test als statistisch signifikant ($p=0,01$). Die beiden Patienten mit isolierter Lungenmetastasierung lebten zum Zeitpunkt der Datenauswertung noch (vgl. Abbildung 8).

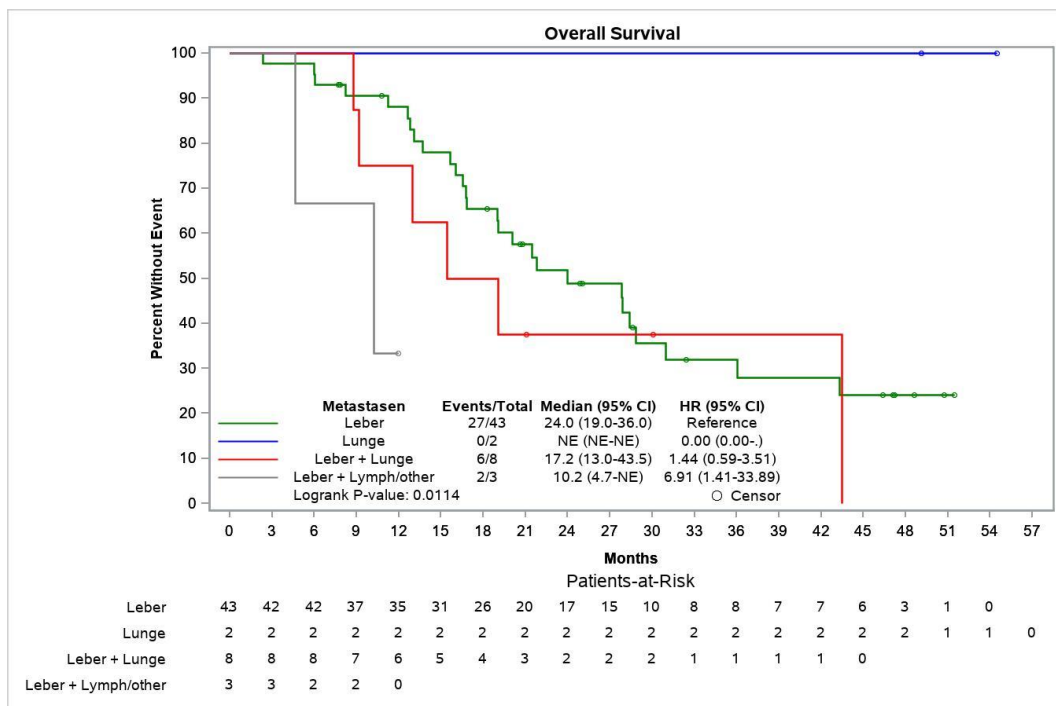


Abbildung 8: Gesamtüberleben nach Metastasierungsort

3.3 Progressionsfreies Überleben

Bezogen auf den initialen Mutationsstatus

Hier zeigte sich mittels Kaplan Meier Analyse (vgl. Abbildung 9) für die Patienten mit Wildtyp ein PFS von im Median 7,1 Monaten (95% KI 5,1 – 14,2), für KRAS-mutierte Patienten von 4,6 Monaten (95% KI 3,5 – 6,3), für BRAF-mutierte von 6,0 Monaten (95% KI 3,7 – nicht erreicht) und für Patienten mit unbekanntem initialem Mutationsstatus von 6,4 Monaten (95% KI 3,4 – 11,6). Im Logrank-Test erwies sich dieser Unterschied zwischen den Gruppen als statistisch nicht signifikant ($p=0,21$), auch unter Ausschluss der Patienten mit unbekanntem Mutationsstatus nicht ($p=0,17$).

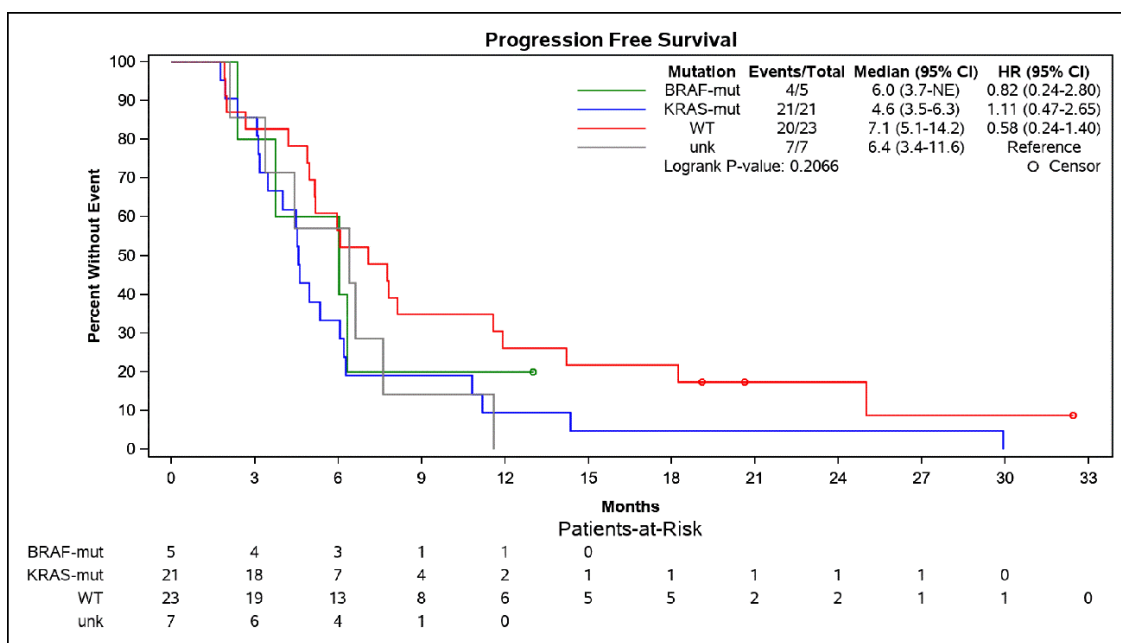


Abbildung 9: Progressionsfreies Überleben nach initialem Mutationsstatus

Bezogen auf die initial betroffene Kolonseite

Hier zeigte sich für Patienten mit linksseitigem Primarius ein PFS von im Median 6,0 Monaten (95% KI 4,9 – 7,8) im Vergleich zu Patienten mit rechtsseitigem Primarius, welche ein medianes PFS von 5,2 Monaten (95% KI 4,5 – 10,8) aufwiesen. Dieser Unterschied erwies sich im logrank-Test als nicht statistisch signifikant ($p=0,86$).

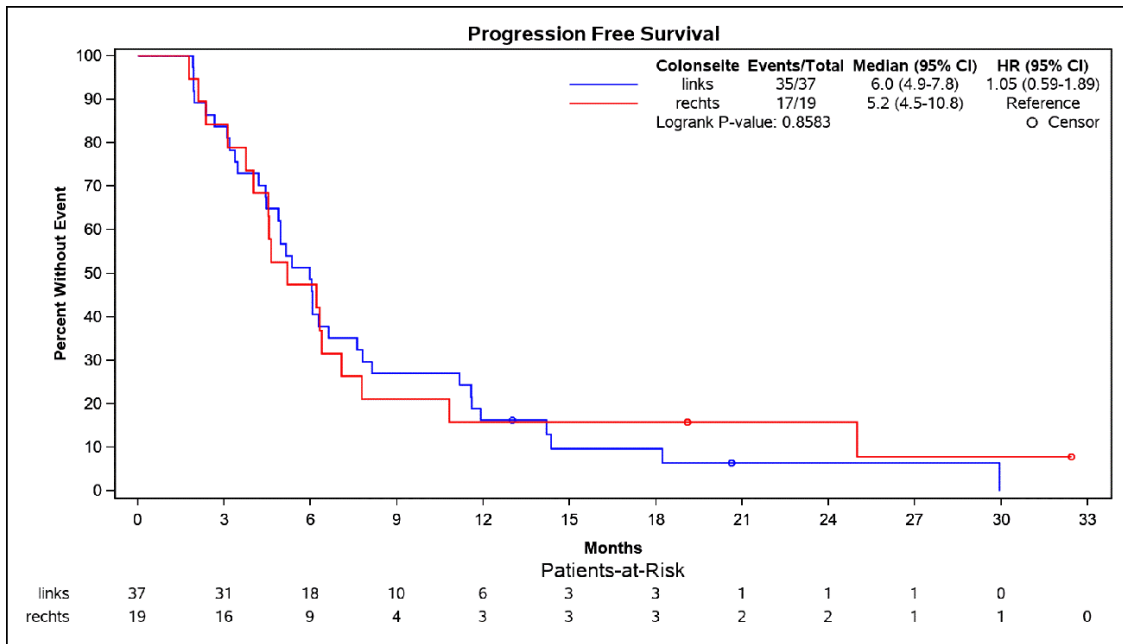


Abbildung 10: Progressionsfreies Überleben nach Lokalisation des Primarius

Bezogen auf den Metastasierungsort

Patienten mit isolierter Lungenmetastasierung hatten mit im Median 17,6 Monaten (95% KI 5,3 – 29,9) im Vergleich zu denen mit isolierter Lebermetastasierung mit im Median 6,1 Monaten (95% KI 4,6 – 8,1), denen mit kombinierter Leber- und Lungenmetastasierung mit im Median 4,1 Monaten (95% KI 3,1 – 7,1) und denen mit kombinierter Leber- und Lymphknotenmetastasierung mit im Median 4,6 Monaten (95% KI 3,4 – 6,3) ein längeres PFS (vgl. Abbildung 11). Dieser Unterschied erwies sich im logrank-Test als nicht signifikant ($p=0,1$).

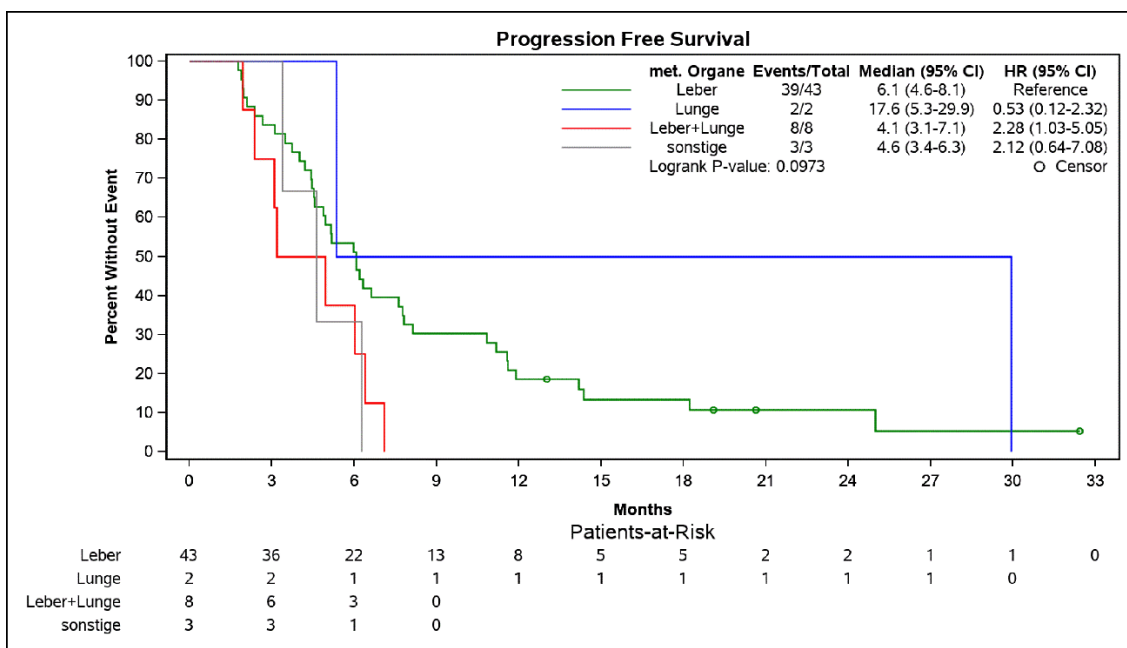


Abbildung 11: Progressionsfreies Überleben nach Metastasierungsort

3.4 cfDNA-Analyse

Aus der zuvor dargestellten Grundpopulation wurden explorativ 74 Proben von 9 Patienten ausgewertet. Auf die Sequenzierung weiterer Patienten musste zunächst aus Ressourcenmangel verzichtet werden; mit der Veröffentlichung der Ergebnisse ist an die Akquirierung öffentlicher Mittel für ergänzende Analysen gedacht.

Die cfDNA wurde mittels QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit von QIAGEN entsprechend den Anweisungen des Herstellers aus den gewonnenen Plasmaproben isoliert. Die Konzentration der hiermit extrahierten cfDNA wurde mittels Fluorometrie bestimmt. In den 63 analysierten liquid biopsies fand sich eine mediane cfDNA-Konzentration von 1,38 ng/ml (Spannweite 0,01 ng/ml bis 14,7 ng/ml). Der Verlauf der Konzentrationen je Patient ist in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben.

In den meisten Fällen ist nach Ablation ein kurzer Anstieg der cfDNA-Konzentration sichtbar mit nachfolgendem Rückgang und Wiederanstieg vor erneuter Ablation.

Tabelle 5: cfDNA-Konzentration im Verlauf der Studie (in ng/ml)³

Pat.	-1d	+1d	+8d	-1d	+1d	+8d	-1d	+1d	+8d	1.FU	-1d	+1d	+8d	2.FU	-1d	+1d	+8d	3.FU
M03	0,8 7	0,3 9	1,0 2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2,5 6	n.a.	n.a.	n.a.	6,5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M10	1,3 8	7,8 4	1,9 2	3,4 8	14, 7	7,3 2	n.a.	n.a.	n.a.	4,1 2	2,4 2	n.a.	n.a.	1,4 8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M13	1,8 2	8,9 6	4	2,2 6	4,6	n.a.	2,8 4	3,9 6	3,8 2	1,3 4	n.a.	n.a.	n.a.	1,1 8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
LMU0 1	4,7 2	1,3	1,6 7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	5,2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
LMU1 2	0,6 4	1,5 1	0,9 6	0,7 6	2,6	0,9 6	n.a.	n.a.	n.a.	0,9 4	2,0 8	1,8 4	3,0 2	0,2 5	n.a.	n.a.	n.a.	3,9 4
LMU1 4	1,0 2	0,5 8	0,4 4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,0 8	n.a.	n.a.	n.a.	0,0 1	0,3 5	0,1 7	0,3 8	1,3 3
LMU2 0	8,4 2	11, 5	n.a.	0,5 2	3,4 2	3,8 6	n.a.	n.a.	n.a.	0,3 5	n.a.	n.a.	n.a.	0,5 4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
LMU2 4	0,9 2	0,2	0,3 6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,4 1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
LMU2 8	0,7 6	1,0 1	0,9 4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

3.5 Mutationsnachweis in der liquid biopsy

18,61% (n=8) aller von Münchner Patienten entnommenen Biopsien (n=43) enthielten kein Tumormaterial, sämtliche Stenzen der sequenzierten Patienten waren jedoch positiv (n=11).

³ Farbliche Codierung der Werte zur besseren Übersichtlichkeit; grün entspricht niedrigen Werten, rot hohen

Tabelle 6: Mutationsnachweis in Baseline-Stanzen (n=6) und liquid biopsy vor Intervention

Patient	Gen	Sequenz	Stanze	Liquid biopsy
LMU01	TP53	c.524_525insA	positiv	negativ
	CCND1	CNV	positiv	negativ
			negativ ⁴	n.a.
LMU12	CTNNB1	c.133T>C	positiv	negativ
	FGFR1	CNV	positiv	negativ
	MET	CNV	positiv	negativ
	TP53	c.817C>T	positiv	
LMU14	keine Baseline-Stanze			
LMU20	MYC	CNV	positiv	negativ
	PIK3CA	c.3129G>A	positiv	
	TP53	c.637C>T	positiv	
LMU24	CCND1	CNV	positiv	negativ
	CCND3	CNV	positiv	negativ
	PIK3CA	c.1633G>A	positiv	negativ ⁵
LMU28	APC	c.3880C>T	positiv	
	TP53	c.395A>G	positiv	

Insgesamt wurden in den 11 sequenzierten Biopsien 18 verschiedene Mutationen gefunden. Von den in der Baseline-Stanze nachgewiesenen 14 Mutationen ließen sich 35,71% (n=5) auch im peripheren Blut vor Intervention nachweisen (vgl. Tabelle 6).⁶ Bei vier Patienten wurde im weiteren Behandlungsverlauf eine Stanze genommen (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Mutationsnachweis in Stanzen und korrespondierenden liquid biopsies im weiteren Behandlungsverlauf

Patient	Zeitpunkt	Gen	Sequenz	Stanze	Liquid biopsy
LMU01	Progress			negativ	negativ
LMU12	2. Therapie	CCND3	CNV	positiv	negativ
		EGFR	CNV	positiv	negativ
		FGFR1	CNV	positiv	negativ
		TP53	c.817C>T	positiv	

⁴ Es wurden zwei Stanzen entnommen, in einer konnte keine Mutation nachgewiesen werden

⁵ Positiv in der liquid biopsy von +1d

⁶ Die von den Magdeburger Patienten gewonnenen Biopsien wurden nicht sequenziert, sodass diese in die Analyse nicht einbezogen wurden; in Tbl. 7 sind die entsprechenden Ergebnisse grau hinterlegt

	3. Therapie	CCND3	CNV	positiv	keine lb
		EGFR	CNV	positiv	keine lb
		FGFR1	CNV	positiv	keine lb
		TP53	c.817C>T	positiv	keine lb ⁷
LMU14	3. Therapie	APC	c.2413C>T	positiv	negativ ⁸
		CCND1	CNV	positiv	negativ
		CCND2	CNV	positiv	negativ
		CCND3	CNV	positiv	negativ
		EGFR	CNV	positiv	negativ
		SMAD4	c.1529G>A	positiv	
LMU20	2. Therapie	PIK3CA	c.3129G>A	positiv	
		TP53	c.637C>T	positiv	

Hier fanden sich 12 verschiedene Mutationen, von denen 33,33% (n=4) zeitgleich auch im peripheren Blut nachweisbar waren.

Tabelle 8: Alle nachgewiesenen Mutationen in Biopsien und liquid biopsies

Gen	Sequenz	Mutationsart	Pat.	Biopsie	liquid biopsy
TP53	c.524_525insA	INDEL	LMU01	x	/
	c.817C>T	SNV	LMU12	x	x
	c.1118delA	INDEL		/	x
	c.412G>A	SNV		/	x
	c.818G>A	SNV		/	x
	c.532_533insC	INDEL		LMU14	/
	c.637C>T	SNV	LMU20	x	x
	c.102delC	INDEL		/	x
	c.742C>T	SNV		/	x
	c.265_266insT	INDEL		LMU24	/
	c.395A>G	SNV	LMU28	x	x
	c.436_437insC	INDEL		/	x
	c.433C>A	SNV		/	x
	c.184delG	INDEL	M03	n.a.	x
	c.256_268del	INDEL	M10	n.a.	x
c.851delC	INDEL	M13	n.a.	x	
MAP2K1	c.385T>C	SNV	LMU14	/	x
			LMU20	/	x
			LMU24	/	x
			M03	n.a.	x
			M10	n.a.	x

⁷ Positiv in der liquid biopsy vom nächsten FU

⁸ Positiv in der liquid biopsy von +1d

			M13	n.a.	x
	c.371C>T	SNV	M13	n.a.	x
	c.370C>T	SNV		n.a.	x
APC	c.2413C>T	SNV	LMU14	x	x
	c.3880C>T	SNV	LMU28	x	x
	c.4219_4220delAG	INDEL	M03	n.a.	x
	c.3340C>T	SNV	M10	n.a.	x
	c.4391_4394delAGAG	INDEL		n.a.	x
PIK3CA	c.1634A>C	SNV	LMU12	/	x
	c.3129G>A	SNV	LMU20	x	x
			M10	n.a.	x
	c.1633G>A	SNV	LMU24	x	x
KRAS	c.35G>C	SNV	M03	n.a. ⁹	x
	c.35G>A	SNV	M10	n.a.	x
			M13	n.a.	x
EGFR	c.2236_2250delGAAT TAAGAGAAGCA	INDEL	LMU12	/	x
				x	/
	c.2240_2254del c.322A>G	INDEL SNV	M13	n.a.	x
				n.a.	x
SMAD4	c.1529G>A	SNV	LMU14	x	x
	c.1068_1069delTT	INDEL	LMU24	/	x
PDGFRA	c.2525A>G	SNV	M13	n.a.	x
	c.932-2A>G	SNV		n.a.	x
MYC		CNV	LMU20	x	x
MET		CNV	LMU12	x	/
BRAF	c.1780G>A	SNV	M13	n.a.	x
SMO	c.1573A>G	SNV	M13	n.a.	x
FGFR1		CNV	LMU12	x	/
FGFR3		CNV	M13	n.a.	x
AR	c.2440T>C	SNV	M13	n.a.	x
CTNNB1	c.133T>C	SNV	LMU12	x	/
CCND1		CNV	LMU01	x	/
			LMU14	x	/
			LMU24	x	/
CCND2		CNV	LMU14	x	/
CCND3		CNV	LMU12	x	/
			LMU14	x	x
			LMU24	x	/
			LMU28	/	x

Bei acht der neun Patienten (88,89%) konnten in den 63 ausgewerteten liquid biopsies insgesamt 41 verschiedene Mutationen in 14 CRC-relevanten Genen nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 8 und Abbildungen 13 u. 14). In der Baseline liquid biopsy fanden

⁹ Der ausführliche Befund des Primärtumors bestätigte diese Mutation

sich in sieben Genen insgesamt 14 verschiedene Mutationen (vgl. Tabelle 9 und Abbildung 12).

Tabelle 9: Mutationsnachweis in den Baseline liquid biopsies

Patient	Gen	Sequenz	Allelfrequenz
M03	KRAS	c.35G>C	0,17
M10	APC	c.3340C>T	0,44
	APC	c.4391_4394delAGAG	0,32
	KRAS	c.35G>A	1,02
	TP53	c.818G>A	1,33
M13	FGFR3	CNV	
	EGFR	c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT	0,07
	KRAS	c.35G>A	5,79
LMU01		n.a.	n.a.
LMU12	EGFR	c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA	0,19
	TP53	c.817C>T	2,29
LMU14		n.a.	n.a.
LMU20	PIK3CA	c.3129G>A	14,28
	TP53	c.637C>T	34,81
LMU24	MAP2K1	c.385T>C	0,35
LMU28	APC	c.3880C>T	1,43
	TP53	c.395A>G	1,46

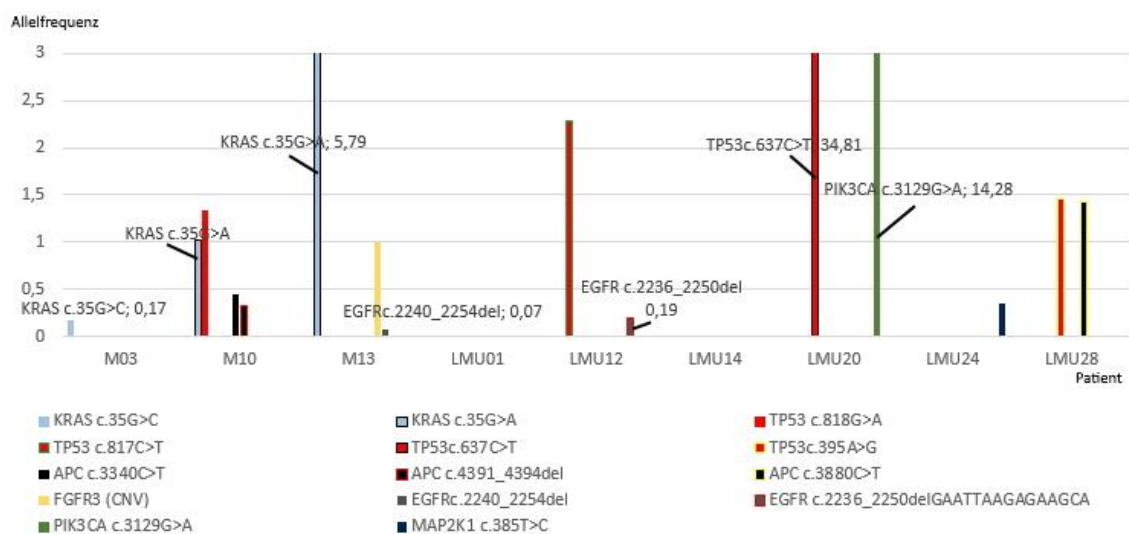


Abbildung 12: Mutationen und zugehörige Allelfrequenzen in der Baseline liquid biopsy

Für die Münchner Patienten ergab sich damit vor der ersten Therapie eine Übereinstimmung von 31,25% zwischen Stanze und liquid biopsy.

Eine TP53-Mutation (insgesamt 16 verschiedene, davon eine nur in der Biopsie nachweisbar) konnte über den gesamten Studienverlauf bei acht von neun Patienten, in 60,32% aller liquid biopsies nachgewiesen werden. Darauf folgten Mutationen im APC- (fünf verschiedene), KRAS- (zwei verschiedene) und MAP2K1-Gen (drei verschiedene) mit 33,33%, 26,98% bzw. 17,46% aller liquid biopsies und Nachweis bei vier, drei, und sechs Patienten. Eine Mutation des PIK3CA-Gens (drei verschiedene) wurde in 14,29% aller liquid biopsies und bei vier Patienten nachgewiesen. Seltener (< 10% aller liquid biopsies, < 3 Patienten) waren Nachweise von Mutationen im EGFR- (vier verschiedene, davon eine CNV nur in der Biopsie; 7,94% aller liquid biopsies, 2 Patienten), SMAD4- (zwei verschiedene; 6,35% aller liquid biopsies, 2 Patienten), CCND3 (CNV; 3,17% aller liquid biopsies, 2 Patienten), PDGFRA- (zwei verschiedene; 3,17% aller liquid biopsies, 1 Patient), MYC- (CNV; 3,17% aller liquid biopsies, 1 Patient), FGFR3- (CNV), AR-, SMO- und BRAF-Gen (je 1,59% aller liquid biopsies, 1 Patient).

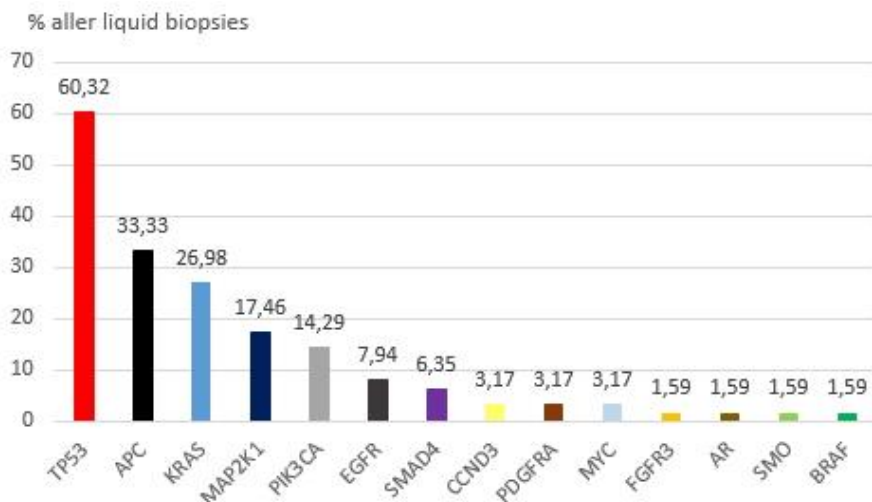


Abbildung 13: Mutationsfrequenz in allen ausgewerteten liquid biopsies (n=63)

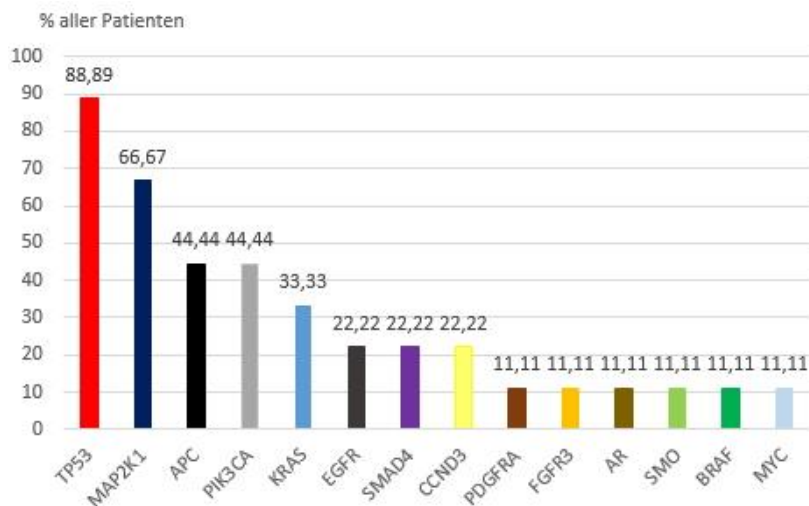


Abbildung 14: Mutationsnachweis in mindestens einer liquid biopsy

3.6 Allelfrequenzen der sequenzierten Patienten

Um eine Aussage über den Einfluss der lokalen Ablation auf die Allelfrequenz der KRAS-Mutation treffen zu können, wurden drei Patienten aus der Magdeburger Gruppe ausgewählt, die im Verlauf der Studie mindestens drei lokale Ablationen erhalten haben und im Primarius eine KRAS-Mutation aufgewiesen hatten. Diese konnte in der metastasierten Situation mittels liquid biopsy bei allen drei Patienten wiedergefunden werden, die Allelfrequenz des mutierten KRAS-Gens korrelierte in allen drei Fällen mit dem klinischen und radiologischen Ansprechen auf die Therapie.

Die Allelfrequenz der einzelnen Mutationen ist im Folgenden graphisch und tabellarisch aufgeführt (vgl. Abbildungen 15 bis 23 und Tabellen 10 bis 18).¹⁰

3.6.1 Patient M03

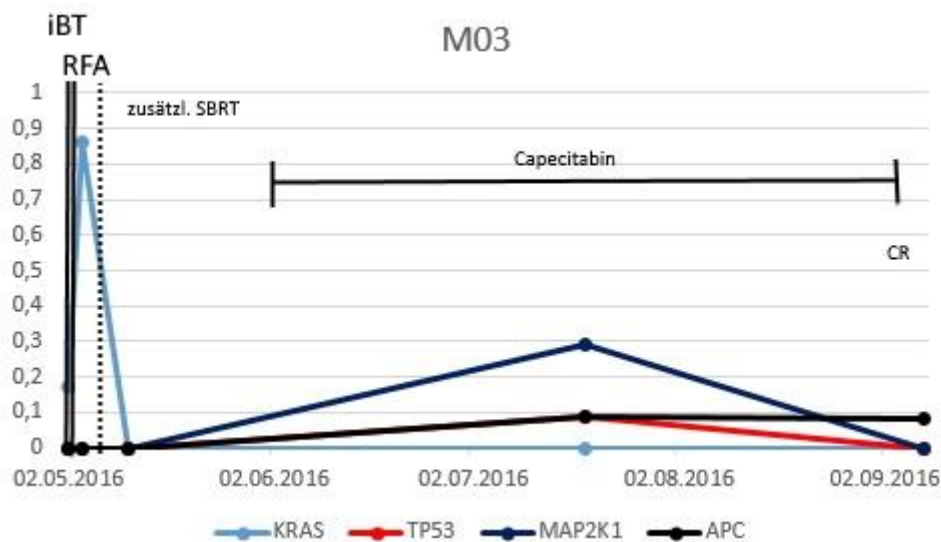


Abbildung 15: Therapieverlauf Patient M03

Patient M03 zeigte bei pulmonaler Metastasierung mit zwei Metastasen nach interstitieller Brachytherapie, Radiofrequenzablation und stereotaktischer Radiotherapie (SBRT) einen totalen Abfall der Allelfrequenz der KRAS-Mutation. Im Anschluss an die lokale Ablation hatte der Patient eine Chemotherapie mit Capecitabin mono erhalten. Zu der zwischenzeitlichen radiologischen Verlaufskontrolle war der Patient nicht erschienen, weshalb lediglich Daten aus der liquid biopsy zum ersten FU vorliegen. In der Bildgebung nach vier Monaten konnte eine komplette Remission verzeichnet wer-

¹⁰ Senkrechte schwarze Striche markieren den Zeitpunkt einer lokalen Ablation.

den. Die KRAS-Mutation war in der zugehörigen liquid biopsy weiterhin nicht nachweisbar, zwischenzeitlich nachgewiesene Mutationen im APC-, TP53- und MAP2K1-Gen waren unter Capecitabin-Gabe erneut rückläufig, bzw. nicht mehr nachweisbar.

Tabelle 10: liquid biopsy-Ergebnisse Patient M03

Gen	Mutation	Sequenz	-1d	+1d	+8d	1.FU	2.FU
KRAS	SNV	c.35G>C	0,17	0,86	0	0	0
APC	INDEL	c.4219_4220delAG	0	0	0	0,09	0
MAP2K1	SNV	c.385T>C	0	0	0	0,29	0
TP53	SNV	c.184delG	0	0	0	0,09	0,08

Nachdem der Patient ab November 2016 zusätzlich Irinotecan erhielt, jedoch weiteren Blutentnahmen im Rahmen der Studie widersprochen hatte, sind ein radiologischer Progress im November 2018 mit nachfolgender Chemotherapie (Regime unbekannt) und ein letztes dokumentiertes Überleben am 17.11.2020 bekannt.

3.6.2 Patient M10

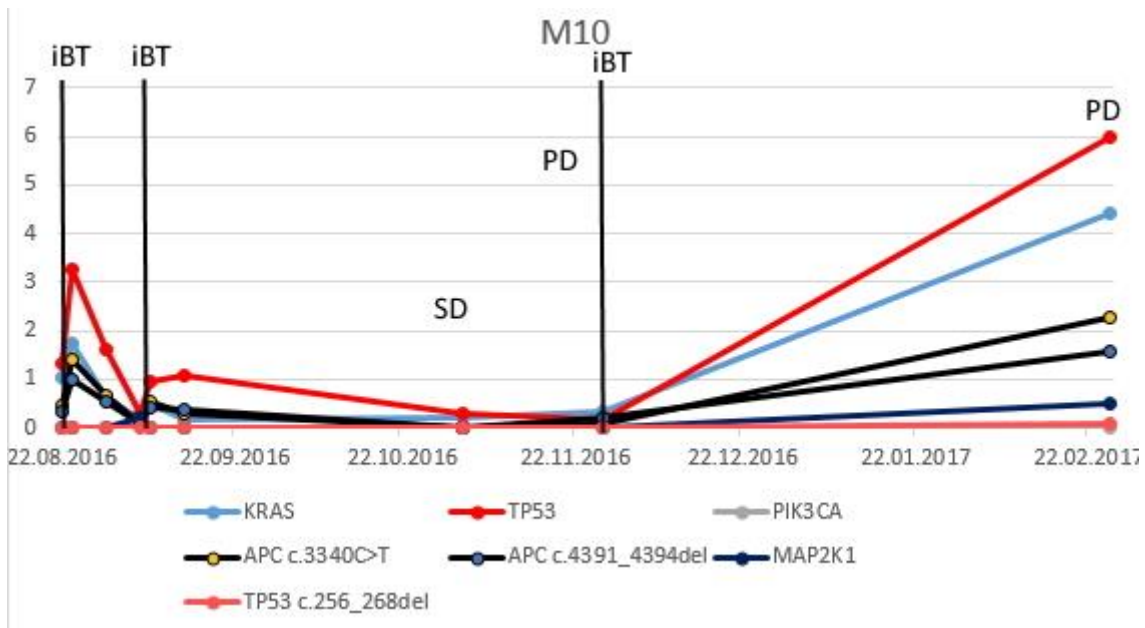


Abbildung 16: Therapieverlauf Patient M10

Patient M10 erhielt zunächst bei acht Lebermetastasen zwei iBT zur Behandlung aller sichtbaren Herde in kurzer Folge. Eine ebenfalls vorhandene Lungenmetastase sollte im weiteren Verlauf angegangen werden. Hierunter kam es zunächst zu einem Abfall der Allelfrequenz der bekannten KRAS-Mutation. Anders als die ebenfalls nachgewiesene TP53-SNV-Mutation c.818G>A, welche auch nach der zweiten Leberablation eine

rückläufige Tendenz zeigte, wurde jedoch bereits ein Anstieg beim ersten FU detektiert, welches radiologisch noch eine stabile Erkrankung zeigte. Bei folgender klinischer Verschlechterung und radiologischem Nachweis eines hepatischen und pulmonalen Progresses erhielt der Patient nochmals eine iBT der Leber, das drei Monate darauf folgende FU zeigte jedoch erneut einen, nun polymetastatischen Progress mit folgendem Abbruch der Studie. Korrelierend kam es zu einem deutlichen Anstieg der Allelfrequenz der KRAS-, TP53- und APC-Mutationen. Zwischenzeitlich detektierte Mutationen im PIK3CA- und MAP2KI-Gen ließen sich nicht mit dem klinischen und radiologischen Verlauf korrelieren.

Tabelle 11: liquid biopsy-Ergebnisse Patient M10

Gen	Mut.	Sequenz	-1d	+1d	+8d	-1d	+1d	+8d	1.FU	-1d	2.FU
KRAS	SNV	c.35G>A	1,02	1,73	0,64	0,15	0,48	0,16	0,21	0,32	4,41
APC	SNV	c.3340C>T	0,44	1,39	0,65	0,07	0,54	0,29	0	0,09	2,28
	DEL	c.4391_4394del	0,32	1	0,55	0,07	0,41	0,38	0	0,22	1,59
TP53	SNV	c.818G>A	1,33	3,28	1,61	0,3	0,96	1,08	0,31	0,15	5,97
	DEL	c.256_268del	0	0	0	0	0	0	0	0	0,07
PIK3CA	SNV	c.3129G>A	0	0	0	0,16	0	0	0	0	0
MAP2K1	SNV	c.385T>C	0	0	0	0,21	0	0	0	0	0,49

Der Patient verstarb am 17.05.2017 im Rahmen des Progresses.

3.6.3 Patient M13

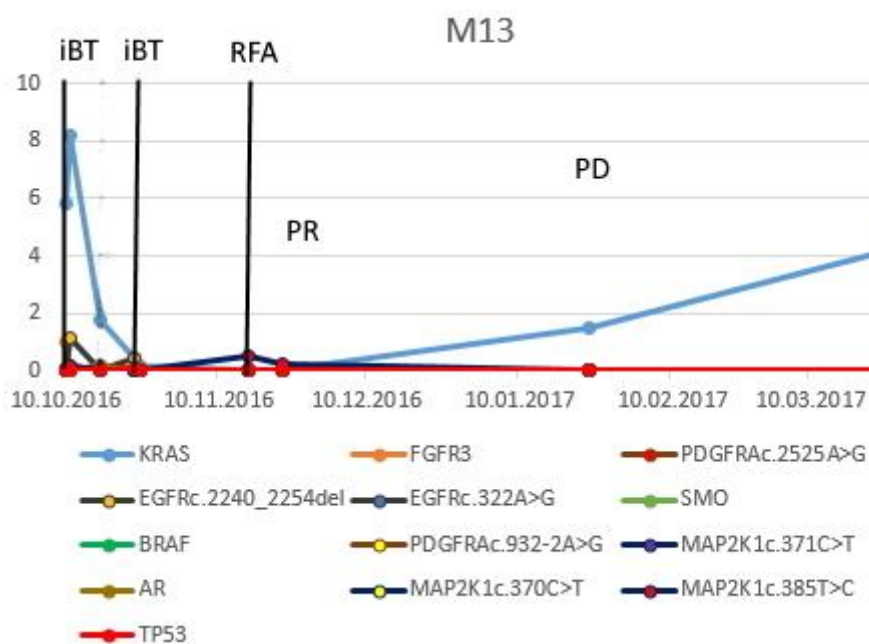


Abbildung 17: Therapieverlauf Patient M13

Patient M13 erhielt bei hepatischer Metastasierung zunächst zwei iBT der Leber, worauf die Allelfrequenz der bekannten KRAS-Mutation abfiel. Bei der Kontrolle vor der folgenden RFA der verbliebenen Lungenmetastase war diese Mutation in der liquid biopsy bereits nicht mehr nachweisbar. Korrelierend mit dem radiologischen Nachweis eines pulmonalen Progresses und im folgenden FU auch eines hepatischen Progresses kam es zu einem erneuten Anstieg der Allelfrequenz der KRAS-Mutation. Weitere, im Anschluss an eine lokale Ablation im Blut detektierte Mutationen zeigten keinen Zusammenhang mit dem radiologischen und klinischen Verlauf.

Tabelle 12: liquid biopsy-Ergebnisse Patient M13

Gen	Mut.	Sequenz	-1d	+1d	+8d	-1d	+1d	-1d	+1d	+8d	1.FU	2.FU
KRAS	SNV	c.35G>A	5,79	8,18	1,76	0,44	0,17	0	0	0	1,46	4,55
FGFR3	CNV ¹¹		1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PDGFRA	SNV	c.2525A>G	0	0	0,18	0	0	0	0	0	0	0
	SNV	c.9322A>G	0	0	0,09	0	0	0	0	0	0	0
EGFR	DEL	c.2240_2254del	0,07	1,1	0	0,46	0	0	0	0	0	0
	SNV	c.322A>G	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0
SMO	SNV	c.1573A>G	0	0	0,09	0	0	0	0	0	0	0
BRAF	SNV	c.1780G>A	0	0	0,18	0	0	0	0	0	0	0
AR	SNV	c.2440T>C	0	0	0,11	0	0	0	0	0	0	0
MAP2K1	SNV	c.371C>T	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0
	SNV	c.370C>T	0	0,14	0	0	0	0	0	0	0	0
	SNV	c.385T>C	0	0,18	0	0	0	0,51	0	0,22	0	0
TP53	DEL	c.851delC	0	0	0	0,07	0	0	0	0	0	0

Der Patient verstarb am 12.05.2018.

Um die Auswirkungen der lokalen Ablation auf Ras-Wildtyp Tumore mit erfolgter anti-EGFR-Therapie zu eruieren, wurden aus der Münchner Patientengruppe die Proben von sechs Patienten analysiert, die in der histologischen Untersuchung des Primarius einen Ras-Wildtyp-Status hatten und im Verlauf der Erkrankung eine anti-EGFR-Behandlung erhalten hatten.

¹¹ Für Gene, die eine Kopiezahlvariation (CNV) aufwiesen, wurde keine Allelfrequenz ermittelt, diese sind in den Graphen der Übersichtlichkeit halber mit dem Wert „1“ aufgeführt und grün gekennzeichnet.

3.6.4 Patient LMU01

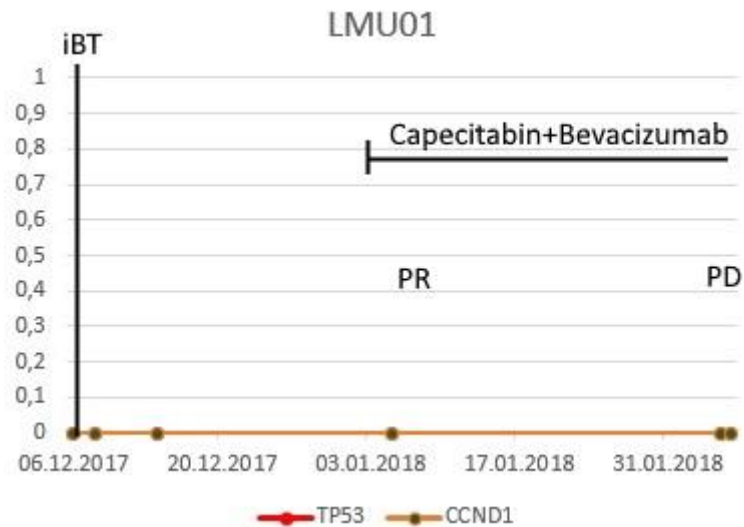


Abbildung 18: Therapieverlauf Patient LMU01

Ein Nachweis von Mutationen in der liquid biopsy gelang bei Patient LMU01 zu keiner Zeit, auch postinterventionell nach iBT der Leber ließen sich die im Gewebe nachgewiesenen Mutationen im TP53- und CCND1-Gen nicht finden (vgl. Abbildung 18). Der Patient erhielt im weiteren Verlauf weiterhin Chemotherapie mit Capecitabin und Bevacizumab, er verstarb am 04.05.2020.

3.6.5 Patient LMU12

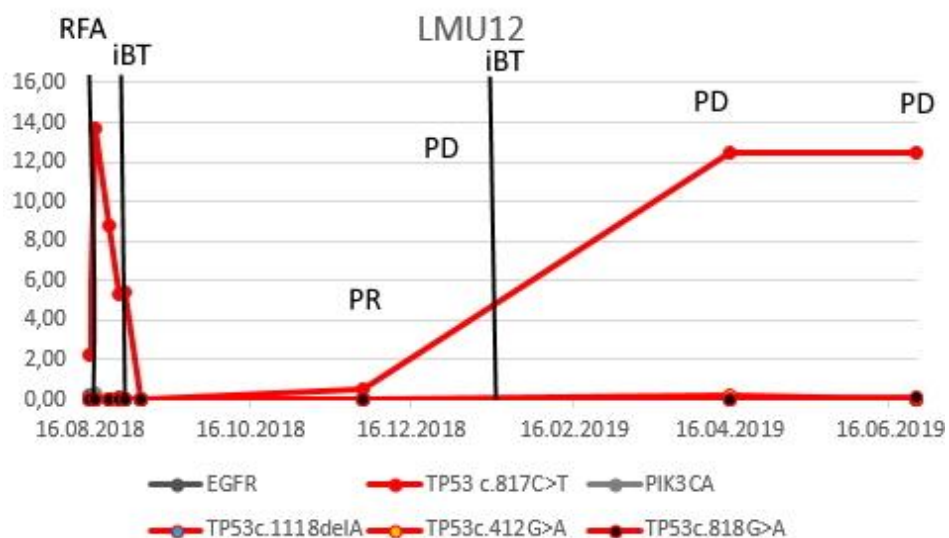


Abbildung 19: Therapieverlauf Patient LMU12

Patient LMU12 erhielt bei hepatischer Metastasierung eine RFA und eine iBT der Leber. Nach direkt postinterventionellem Anstieg der Allelfrequenz der TP53-SNV-Mutation c.817C>T kam es zu einem kompletten Abfall an Tag 8. Bereits zum ersten FU, welches eine partielle Remission zeigte, war diese Mutation jedoch wieder nachweisbar. Bei klinischer Verschlechterung und Nachweis eines Progresses erfolgte eine iBT der Leber, es kam im FU drei Monate später allerdings zu einem weiteren, nun polymetastatischen Progress. Korrelierend hierzu stieg die Allelfrequenz der TP53-Mutation weiter an.

Die nachgewiesenen Mutationen im EGFR-, PIK3CA-, sowie weitere im TP53-Gen zeigten keine Korrelation zum klinischen oder radiologischen Verlauf.

Tabelle 13: liquid biopsy-Ergebnisse Patient LMU12

Gen	Mut.	Sequenz	-1d	+1d	+8d	-1d	+1d	+8d	1.FU	2.FU	3.FU
EGFR	SNV	c.35G>A	0,19	0	0	0	0	0	0	0	0
TP53	SNV	c.817C>T	2,29	13,65	8,81	5,35	5,47	0	0,53	12,46	12,5
PIK3CA	SNV	c.1634A>C	0	0,27	0	0	0	0	0	0	0
TP53	DEL	c.1118delA	0	0	0	0,12	0	0	0	0	0
TP53	SNV	c.412G>A	0	0	0	0	0	0	0	0,21	0
TP53	SNV	c.818G>A	0	0	0	0	0	0	0	0	0,08

Bei diesem Patienten fanden sich in der Stanzbiopsie verschiedene Mutationen, die in der liquid biopsy zu keiner Zeit nachweisbar waren. Dies waren CNVs der Gene für EGFR, FGFR1, CTNNB1, MET und CCND3. Die für diesen Patienten führende TP53-SNV-Mutation c.817C>T fand sich im Gewebe wie auch im Blut wieder.

Der Patient verstarb im Rahmen des Progresses am 11.09.2019.

3.6.6 Patient LMU14

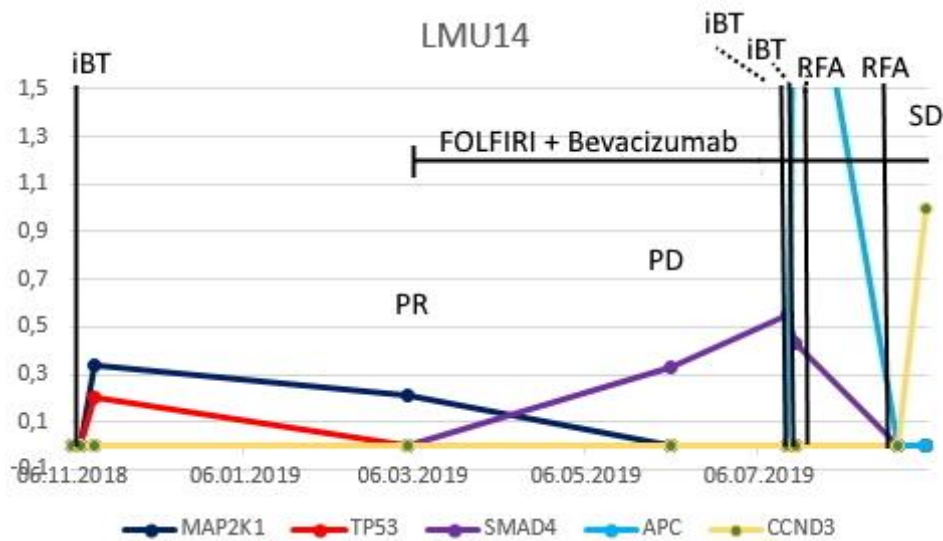


Abbildung 20: Therapieverlauf Patient LMU14

Eine Heterogenität zwischen Mutationen in der liquid biopsy und der Gewebestanze ließ sich auch bei Patient LMU14 beobachten. Während im peripheren Blut zunächst keine, dann nach einer ersten Brachytherapie der Lunge nur Mutationen von MAP2K1 und TP53 nachweisbar waren, die unter Therapie wieder verschwanden, konnten in der Biopsie einer Lebermetastase bei Folgetherapie Mutationen in den Genen für APC, CCND1, CCND2, CCND3 und EGFR nachgewiesen werden. Zwischenzeitlich hatten sich unter Therapie mit Bevacizumab und FOLFIRI neue Lungen- und Lebermetastasen gebildet. Die SMAD4-Mutation, welche im Gewebe nachgewiesen wurde, entsprach der, die im vorangegangenen FU bereits im Blut nachweisbar gewesen war. Eine KRAS-Mutation konnte unter der systemischen Therapie nicht nachgewiesen werden. Nach iBT der Lungen- und iBT und RFA der Lebermetastasen, sowie nachfolgender RFA der verbliebenen Lungenmetastasen zeigte sich radiologisch eine SD. Parallel kam es zu einem Abfall der Allelfrequenzen der SMAD4- und der APC-Mutation (vgl. Abbildung 20).

Tabelle 14: liquid biopsy-Ergebnisse Patient LMU14

Gen	Mut.	Sequenz	-1d	+1d	+8d	1.FU	2.FU	-1d	+1d	+1d	+8d
MAP2K1	SNV	c.385T>C	0	0	0,34	0,21	0	0	0	0	0
TP53	INDEL	c.532_533insC	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0
SMAD4	SNV	c.1529G>A	0	0	0	0	0,33	0,55	0,43	0	0
APC	SNV	c.2413C>T	0	0	0	0,12	0	0	2,52	0	0
CCND3	CNV		0	0	0	0	0	0	0	0	1

Der Patient erhielt auch weiterhin Chemotherapie und verstarb am 19.02.2020.

3.6.7 Patient LMU20

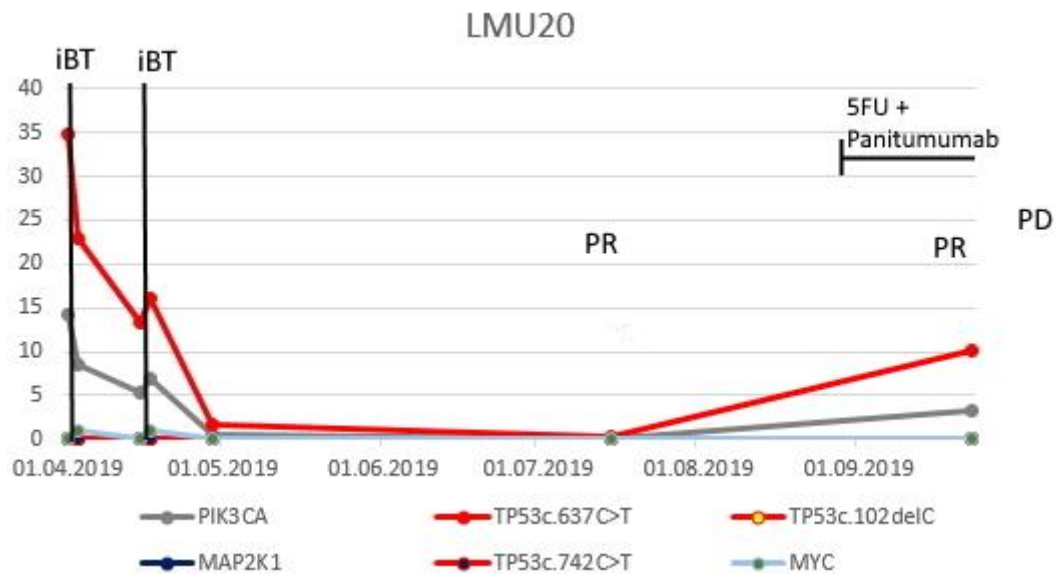


Abbildung 21: Therapieverlauf Patient LMU20

Nach zwei iBT der Leber kam es bei Patient LMU20 zu einem vollständigen Abfall der Allelfrequenz der PIK3CA SNV-Mutation c.3129G>A, sowie zu einem Abfall der Allelfrequenz der TP 53 SNV-Mutation c.637C>T um 99,43%, wobei sich radiologisch im ersten FU eine PR zeigte. Auch das zweite FU zeigte radiologisch eine PR unter systemischer Therapie mit 5-FU und Panitumumab. In der liquid biopsy ließ sich ein Anstieg der Allelfrequenz der TP53 SNV-Mutation c.637C>T und der PIK3CA Mutation nachweisen. Das FU im November 2019 zeigte einen polymetastatischen Progress in Lunge, Lymphknoten und Leber. Eine liquid biopsy wurde hier nicht mehr gewonnen.

Tabelle 15: liquid biopsy-Ergebnisse Patient LMU20

Gen	Mut.	Sequenz	-1d	+1d	-1d	+1d	+8d	1.FU	2.FU
PIK3CA	SNV	c.3129G>A	14,28	8,63	5,28	6,96	0,47	0	3,28
TP53	SNV	c.637C>T	34,81	22,83	13,24	16,01	1,68	0,2	10,18
TP53	DEL	c.102delC	0	0	0	0,12	0	0	0
MAP2K1	SNV	c.385T>C	0	0	0	0	0,16	0	0
TP53	SNV	c.742C>T	0	0	0	0	0,08	0	0
MYC	CNV		0	1	0	1	0	0	0

Der Patient verstarb am 25.01.2021.

3.6.8 Patient LMU24

Nach iBT der Leber zeigte Patient LMU24 im ersten FU eine PR. Die präinterventionell gefundene MAP2K1-Mutation ließ sich postinterventionell nicht mehr nachweisen, ebenso die postinterventionell einmalig nachgewiesenen Mutationen im SMAD4- und PIK3CA-Gen. Letztere war in der Tumorstanze ebenfalls zu finden gewesen. Das zweite FU zeigte eine SD, es ließ sich eine TP53-Mutation nachweisen.

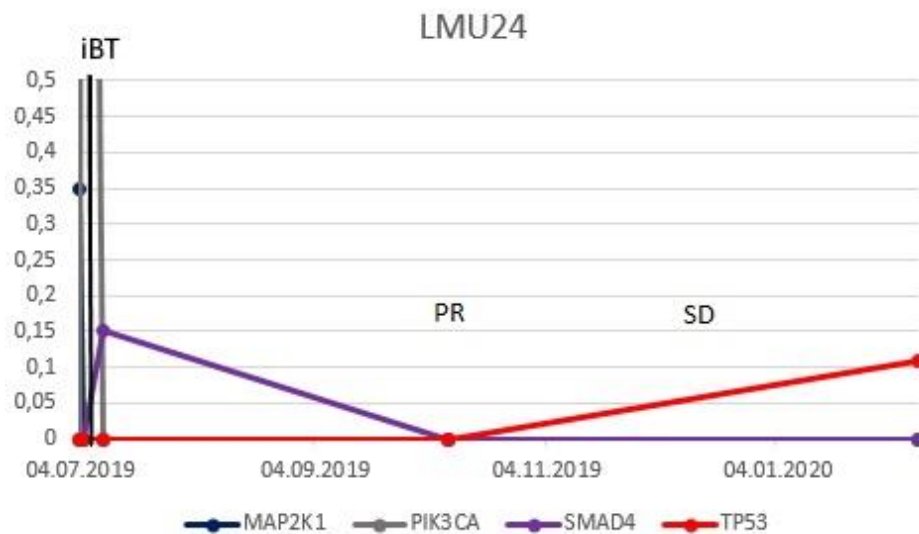


Abbildung 22: Therapieverlauf Patient LMU24

Ein Nachweis der in der Gewebesequenzierung gefundenen CCND1- und CCND3-CNV-Mutationen gelang im Blut nicht.

Tabelle 16: liquid biopsy-Ergebnisse Patient LMU24

Gen	Mut.	Sequenz	-1d	+1d	+8d	1.FU	2.FU
PIK3CA	SNV	c.1633G>A	0	2,73	0	0	0
TP53	INDEL	c.265_266insT	0	0	0	0	0,11
MAP2K1	SNV	c.385T>C	0,35	0	0	0	0
SMAD4	INDEL	c.1068_1069delTT	0	0	0,15	0	0

Der Patient weist weiterhin eine komplette Remission auf, das letzte dokumentierte Überleben ist der 24.03.2021.

3.6.9 Patient LMU28

Patient LMU28 zeigte nach iBT der Leber zunächst eine CR im ersten FU. Parallel kam es zu einem vollständigen Rückgang der Allelfrequenzen der präinterventionell gefundenen APC- und TP53-SNV (c.395A>G) Mutationen. Die Allelfrequenz der APC-Mutation zeigte beim zweiten FU einen erneuten Anstieg, radiologisch wurde eine PD diagnostiziert.

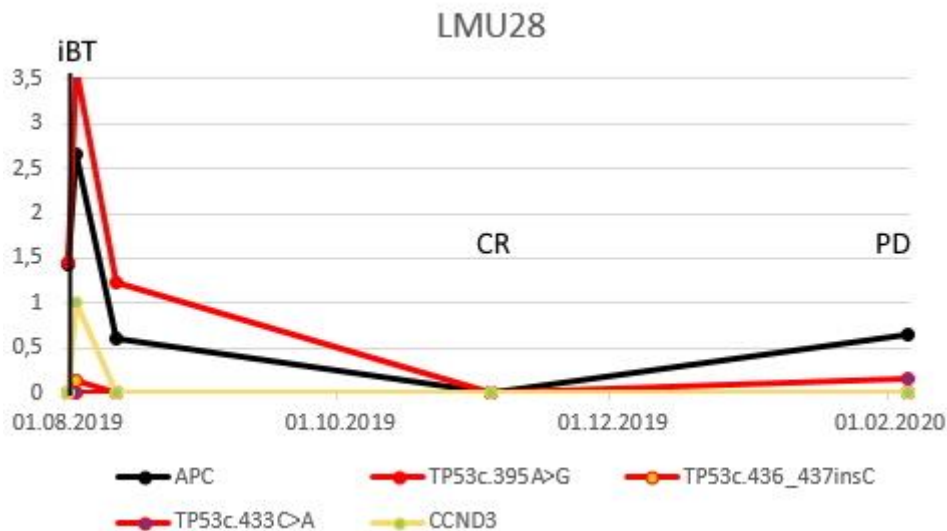


Abbildung 23: Therapieverlauf Patient LMU28

Die in der Analyse des Biopsats gefundenen APC- und TP53-Mutationen entsprachen denen in der liquid biopsy.

Tabelle 17: liquid biopsy-Ergebnisse Patient LMU28

Gen	Mut.	Sequenz	-1d	+1d	+8d	1.FU	2.FU
APC	SNV	c.3880C>T	1,43	2,67	0,6	0	0,65
TP53	SNV	c.395A>G	1,46	3,63	1,24	0	0
TP53	INDEL	c.436_437insC	0	0,13	0	0	0
TP53	SNV	c.433C>A	0	0	0	0	0,16
CCND3	CNV		0	1	0	0	0

Das letzte dokumentierte Überleben ist der 25.06.2020.

3.7 Zusammenhang zwischen maximaler Allelfrequenz / maximalem Abfall der Allelfrequenz und klinischen Charakteristika

Eine neu entstandene K-Ras-Mutation unter anti-EGFR-Therapie konnte bei keinem der analysierten Patienten festgestellt werden. Außer bei Patient LMU01, LMU14 und LMU24 gelang jedoch bei allen Patienten die Korrelation mindestens eines mutierten Gens mit dem klinischen Ansprechen. In den Fällen, in denen radiologisch mindestens eine partielle Remission erreicht wurde (n=8), kam es bei Erreichen der PR im Mittel zu einem Abfall der Allelfrequenz der mutierten Gene um 95,51 % (95% Konfidenzintervall: +/- 6,5%).

Eine statistische Signifikanz für einen Zusammenhang mit der initialen Tumorlokalisation, einer vorhandenen Lebermetastasierung, einer Lungenmetastasierung, dem Nachweis einer KRAS-Mutation in der Histologie des Primärtumors, dem Befall mehrerer Organe, mehreren Ablationen sowie dem Ansprechen konnte weder für die maximale Allelfrequenz, noch für den maximalen prozentualen Abfall der Allelfrequenz erreicht werden (alle zweiseitigen $p > 0,1$). Eine statistische Testung bezüglich der Lebermetastasierung konnte aufgrund der fehlenden Varianz in der Gruppe ohne Lebermetastasierung (n=1) nicht erfolgen. Selbiges trifft auf das radiologische Ansprechen zu, lediglich ein Patient konnte nicht mindestens eine vorübergehende PR erreichen.

Tabelle 18: Assoziation klinischer Charakteristika mit maximaler Allelfrequenz und maximalem Abfall der Allelfrequenz

Klinische Charakteristika	Maximale Allelfrequenz (Mittelwert, %) ¹²	p-Wert	Maximaler Abfall der Allelfrequenz (Mittelwert, %) ¹³	p-Wert
Primäre Tumorlokalisation				
Rechtes Kolon	14,43 (n=3)	0,46	92,65 (n=3)	0,52
Linkes Kolon	4,84 (n=6)		98,46 (n=5)	
Lebermetastasierung				
Positiv	8,94 (n=8)	n.a.	95,75 (n=7)	n.a.
Negativ	0,86 (n=1)		100 (n=1)	
Lungenmetastasierung				
Positiv	4,38 (n=4)	0,36	94,51 (n=4)	0,58
Negativ	10,96 (n=5)		98,05 (n=4)	

¹² Mittelwert der jeweils höchsten Allelfrequenz der detektierten Mutationen jedes Patienten

¹³ Mittelwert des maximalen Abfalls der Allelfrequenz der detektierten Mutationen jedes Patienten

KRAS-Status des Primärtumors				
Positiv	5,0 (n=3)	0,46	92,68 (n=3)	0,52
Negativ	9,56 (n=6)		98,44 (n=5)	
Anzahl befallener Organe				
Ein Organ	9,28 (n=6)	0,54	98,44 (n=5)	0,52
Mehrere Organe	5,56 (n=3)		92,68 (n=3)	
Bestes radiologisches Ansprechen				
CR / PR	8,30 (n=8)	n.a.	98,88 (n=7)	n.a.
SD / PD	5,97 (n=1)		78,05 (n=1)	
Anzahl lokaler Ablationen				
Eine	2,12 (n=3)	0,15	100 (n=2)	0,23
Mehrere	11,00 (n=6)		95,04 (n=6)	

Patient LMU01 wurde aufgrund des Fehlens nachweisbarer Mutationen in der liquid biopsy aus der statistischen Auswertung des maximalen Abfalls der Allelfrequenz, sowie den folgenden Zusammenhangsanalysen ausgeschlossen.

3.8 Zusammenhang zwischen Mutationsstatus und klinischen Charakteristika

Eine statistisch signifikante Assoziation von initialer Tumorlokalisation, einer vorhandenen Lebermetastasierung, einer Lungenmetastasierung, dem Befall mehrerer Organe, mehreren Ablationen sowie dem Ansprechen mit vor der ersten Ablation vorhandenen Mutationen konnte für keines der fünf am häufigsten mutierten Gene nachgewiesen werden (alle $p > 0,1$; vgl. Tabelle 19).

Tabelle 19: Assoziation klinischer Charakteristika mit dem Mutationsstatus vor erster Ablation

	TP53	p-Wert	MAP2KI	p-Wert	APC	p-Wert	PIK3CA	p-Wert	KRAS	p-Wert
Primäre Tumorlokalisation										
Rechtes Kolon (n=3)	2	0,93	0	0,63	1	0,89	1	1	1	0,71
Linkes Kolon (n=5)	2		1		1		0		2	
Lebermetastasierung										
Positiv (n=7)	4	1	1	0,5	2	1	1	1	2	1
Negativ (n=1)	0		0		0		0		1	
Lungenmetastasierung										
Positiv (n=4)	1	0,24	0	1	1	0,79	0	0,5	3	0,38
Negativ (n=4)	3		1		1		1		0	

Anzahl befallener Organe										
Ein Organ (n=5)	3	0,93	1	1	1	0,64	1	1	1	0,29
Mehrere Organe (n=3)	1		0		1		0		2	
Bestes radiologisches Ansprechen										
CR / PR (n=7)	3	0,5	1	1	1	0,25	1	1	2	0,38
SD / PD (n=1)	1		0		1		0		1	
Anzahl lokaler Ablationen										
Eine (n=2)	1	0,79	1	1	1	0,96	0	0,75	0	0,38
Mehrere (n=6)	3		0		1		1		3	

Auch für eine mögliche Assoziation der genannten klinischen Charakteristika mit unter Therapie neu entstandenen Mutationen in den vier am häufigsten nachgewiesenen Genen (keine neu entstandene KRAS-Mutation unter Therapie) konnte keine statistische Signifikanz gezeigt werden (alle $p > 0,1$; vgl. Tabelle 20).

Tabelle 20: Assoziation klinischer Charakteristika mit unter Therapie entstandenen Mutationen

	TP53	p-Wert	MAP2KI	p-Wert	APC	p-Wert	PIK3CA	p-Wert
Primäre Tumorlokalisation								
Rechtes Kolon (n=3)	3	1	3	1	1	0,89	1	0,71
Linkes Kolon (n=5)	5		2		1		2	
Lebermetastasierung								
Positiv (n=7)	7	1	4	1	1	1	3	0,5
Negativ (n=1)	1		1		1		0	
Lungenmetastasierung								
Positiv (n=4)	4	1	4	0,63	2	0,25	1	1
Negativ (n=4)	4		1		0		2	
Anzahl befallener Organe								
Ein Organ (n=5)	5	1	2	0,18	1	0,64	2	0,82
Mehrere Organe (n=3)	3		3		1		1	
Bestes radiologisches Ansprechen								
CR / PR (n=7)	7	1	4	0,63	2	1	2	0,38
SD / PD (n=1)	1		1		0		1	
Anzahl lokaler Ablationen								
Eine Intervention (n=2)	2	1	0	0,11	0	0,54	1	0,89
Mehrere Interventionen (n=6)	6		5		2		2	

3.9.1 Zusammenhang zwischen Abfall der Allelfrequenz mutierter ctDNA und dem OS

Zur Beurteilung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Abfall der Allelfrequenz mutierter ctDNA und dem OS wurden Kaplan Meier Graphen erstellt und die Patienten entsprechend des mittleren Abfalls der Allelfrequenzen aller zur Baseline in der liquid biopsy gefundenen Mutationen in Gruppen eingeteilt. Patient LMU01 und LMU14 wiesen zur Baseline keine mutierten Allele in der liquid biopsy auf, sodass sie in den folgenden Betrachtungen ausgeschlossen wurden.

Für den Abfall der Allelfrequenzen ausgehend von der liquid biopsy vor erster Ablation im Verhältnis zu der an Tag acht nach der Ablation, die zu einer ersten radiologischen Tumorfreiheit führte, zeigte sich für den Patient mit Abfall der Allelfrequenz um unter 30% ein medianes OS von 8,8 Monaten und für den Patient mit einem Abfall von 95,94% von 21,8 Monaten (vgl. Abbildung 24). Ein signifikanter Unterschied ergab sich im logrank-Test zu den Patienten mit Abfall um 36,56% bzw. 100% nicht ($p=0,11$).

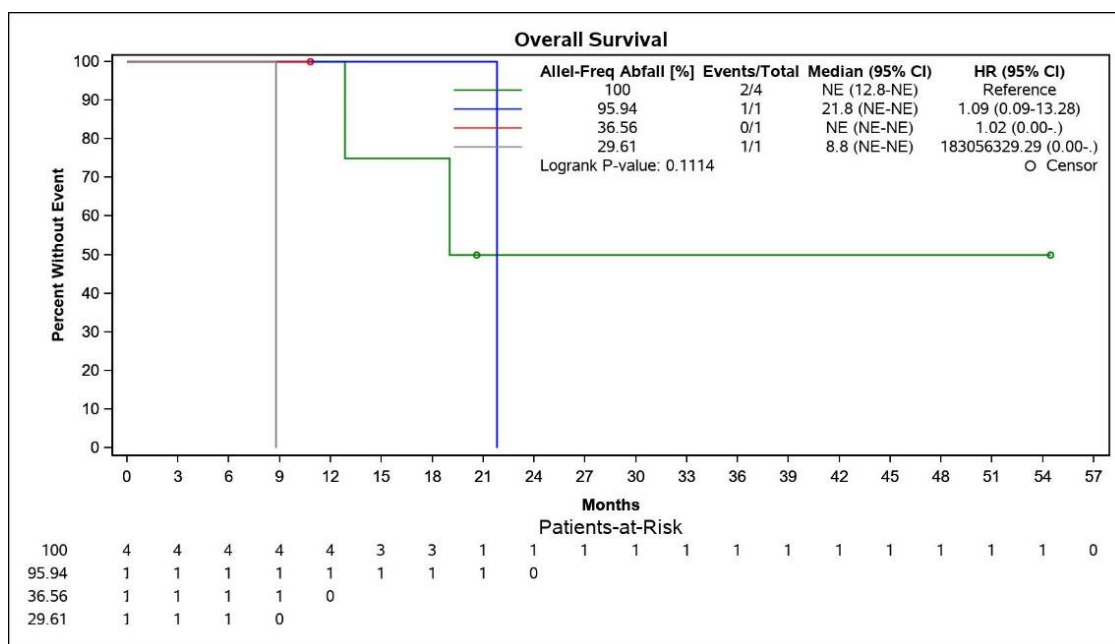


Abbildung 24: OS nach Abfall der Allelfrequenz Baseline vs. +8d nach vollst. Ablation

Für den Vergleich des Abfalls der Allelfrequenzen ausgehend von der Baseline bezogen auf die Allelfrequenz mutierter ctDNA in der liquid biopsy des ersten FU zeigte sich im logrank-Test des OS ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (vgl. Abbildung 25). Der Patient, der lediglich einen Abfall der Allelfrequenz von unter 80% erreichte, hatte mit 8,8 Monaten ein reduziertes OS im Vergleich zu dem Patienten mit einem Abfall der Allelfrequenz um 92,29% mit 12,8 Monaten, dem Patient mit einem

Abfall von 99,89% mit 21,8 Monaten und den Patienten mit einem Abfall von 100% (p=0,04).

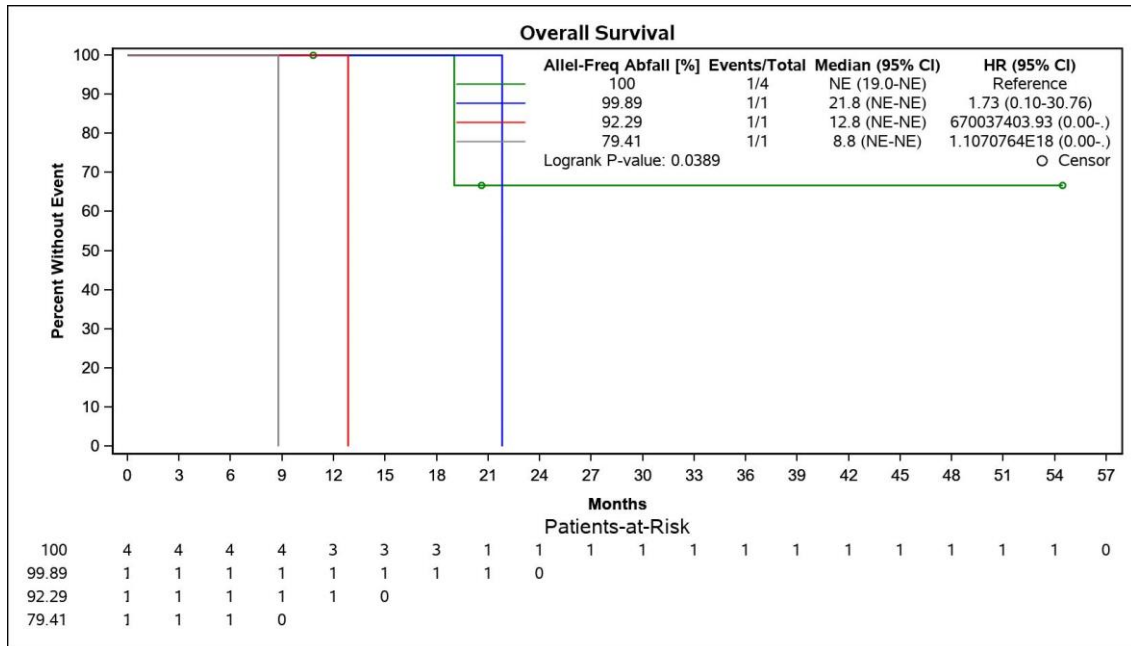


Abbildung 25: OS nach Abfall der Allelfrequenz Baseline vs. 1. FU

3.9.2 Zusammenhang zwischen Abfall der Allelfrequenz mutierter ctDNA und dem PFS

Zur Beurteilung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Abfall der Allelfrequenz mutierter ctDNA und dem PFS wurden ebenfalls Kaplan Meier Graphen erstellt und die Patienten entsprechend des mittleren Abfalls der Allelfrequenzen aller zur Baseline in der liquid biopsy gefundenen Mutationen in Gruppen eingeteilt. Für den Abfall der Allelfrequenzen ausgehend von der liquid biopsy vor erster Ablation im Verhältnis zu der an Tag acht nach der Ablation, die zu einer ersten radiologischen Tumorfreiheit führte, zeigte sich für den Patient mit Abfall der Allelfrequenz um unter 30% ein medianes PFS von 2,4 Monaten, für den Patienten mit Abfall um 36,56% von 8,1 Monaten, für den Patient mit einem Abfall von 95,94% von 7,8 Monaten und für die Patienten mit Abfall von 100% von 17,4 Monaten (vgl. Abbildung 26). Ein signifikanter Unterschied ergab sich im logrank-Test nicht (p=0,1).

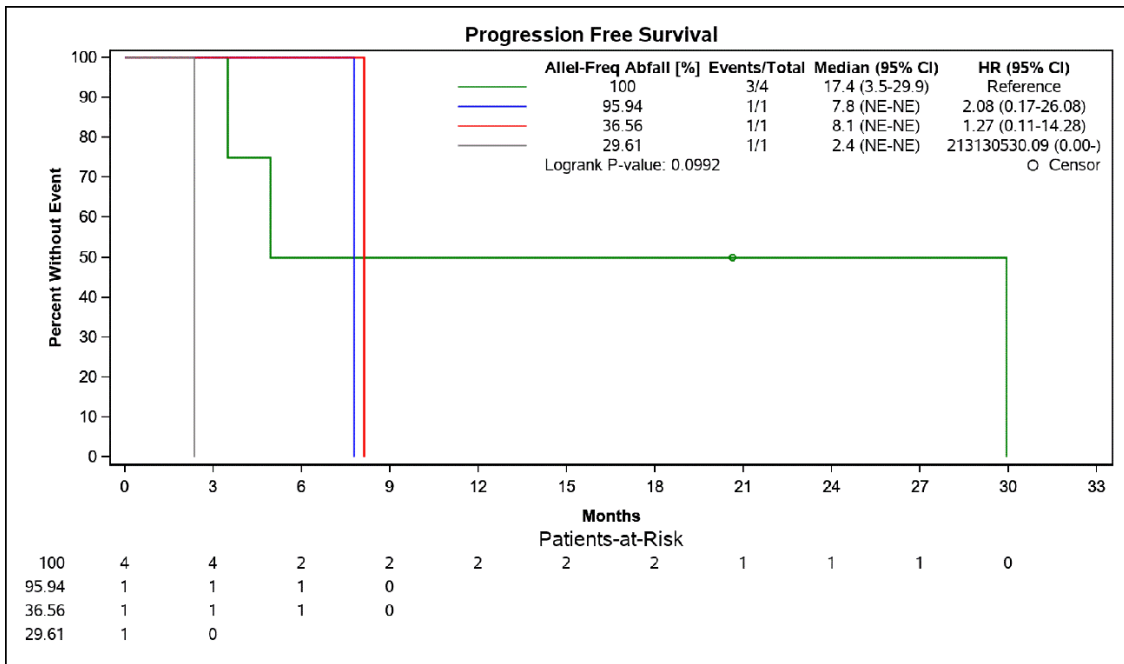


Abbildung 26: PFS nach Abfall der Allelfrequenz Baseline vs. +8d nach vollst. Ablation

Für den Vergleich des Abfalls der Allelfrequenzen ausgehend von der Baseline bezogen auf die Allelfrequenz mutierter ctDNA in der liquid biopsy des ersten FU zeigte sich im logrank-Test des PFS ein knapp nicht-signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (vgl. Abbildung 27). Der Patient, der lediglich einen Abfall der Allelfrequenz von unter 80% erreichte, hatte mit 2,4 Monaten ein reduziertes PFS im Vergleich zu dem Patienten mit einem Abfall der Allelfrequenz um 92,29% mit 5,0 Monaten, dem Patienten mit einem Abfall von 99,89% mit 7,8 Monaten und den Patienten mit einem Abfall von 100% mit 19,0 Monaten ($p=0,06$).

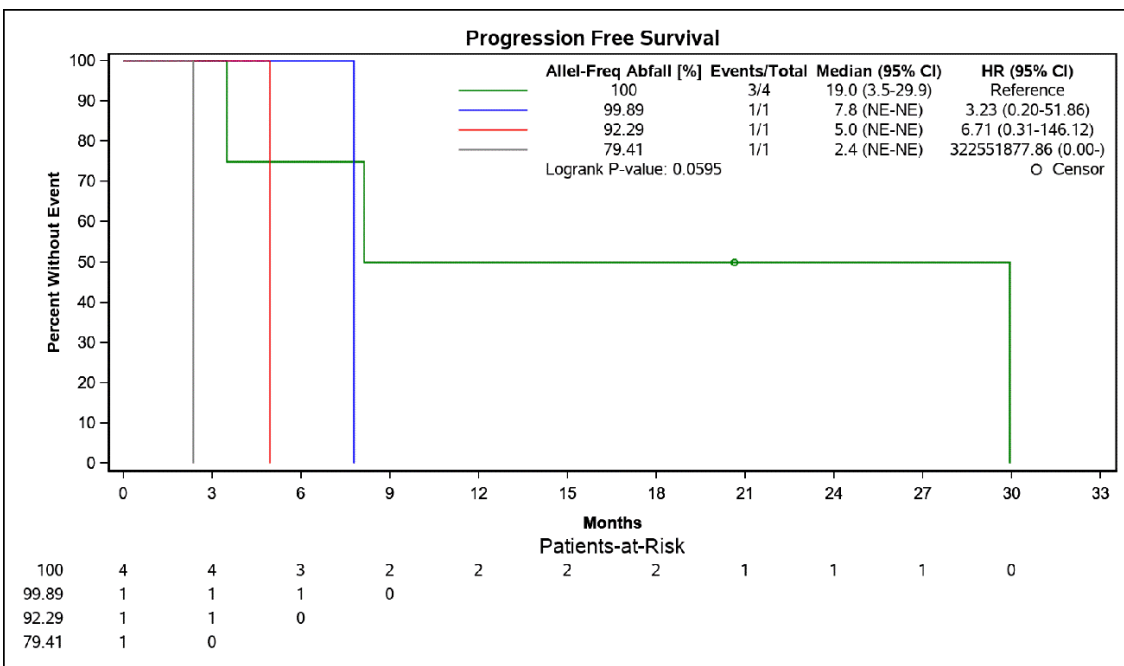


Abbildung 27: Progressionsfreies Überleben nach Abfall der Allelfrequenz Baseline vs. 1. FU

3.10 Ist ein Rezidiv gekennzeichnet durch ein anderes genetisches Profil?

Für M03 fehlen Sequenzierungsdaten im zeitlichen Zusammenhang mit dem Rezidiv. Bei Patient LMU01 wurden in der Baselinestanze Mutationen im TP53- und CCND1-Gen nachgewiesen, nicht jedoch in der liquid biopsy. Patient M10 und M13 zeigten zum Zeitpunkt des Rezidivs einen deutlichen Anstieg bereits vor der Ablation detektierter Allele, bei Patient LMU12 konnten zusätzlich zum Anstieg der bereits zuvor detektierten TP53-Mutation zwei neue TP53-Mutationen festgestellt werden. Bei Patient LMU14 zeigte sich bei radiologischem Rezidivnachweis eine bisher nicht detektierte SMAD4-Mutation in der liquid biopsy, die auch in der Stanze der Lungenmetastase nachweisbar war. Patient LMU20 wies bereits im Staging vor radiologisch sicherbarem Progress einen erneuten Anstieg der bekannten PIK3CA- und TP53-Mutationen auf. Zum Zeitpunkt des radiologischen Rezidivnachweises existieren keine Sequenzierungsdaten. Bei Patient LMU24 ließ sich zwischenzeitlich eine neue TP53-Mutation nachweisen, der Patient befand sich jedoch bei Auswertung weiterhin in Remission. Patient LMU28 zeigte bei Rezidivnachweis einen erneuten Anstieg der Allelfrequenz der bekannten APC-Mutation, sowie eine neu aufgetretene TP53-Mutation.

Insgesamt waren sechs der acht Patienten mit in der liquid biopsy nachweisbaren Mutationen nach lokaler Ablation progredient. Bei drei Patienten (M10, M13, LMU20) konnte nur ein Anstieg der Allelfrequenz bereits zuvor detektierter Mutationen nachgewiesen werden. Ein Patient (LMU14) entwickelte eine neue Mutation, die sich auch bioptisch im Metastasengewebe nachweisen lies. Zwei Patienten (LMU12, LMU28) zeigten einen Anstieg der Allelfrequenz von zuvor nachgewiesenen Mutationen, sowie zusätzlich neue Mutationen. Die beiden während des Beobachtungszeitraumes in Remission befindlichen Patienten (M03, LMU24) zeigten ebenfalls neue Mutationen.

3.11 Kann die lokale Ablation nach Progress unter systemischer Therapie entstandene, resistente Klone eliminieren?

Acht von neun Patienten zeigten nach lokaler Ablation mindestens eine partielle Remission mit >90% Abfall der Allelfrequenz mutierter Gene ausgehend von der Baseline zum ersten FU. Alle Patienten hatten vor Ablation bereits Chemotherapie erhalten, unter bzw. nach der die, die Ablation notwendig machende, Metastasierung entstanden war. Damit war die lokale Ablation in dieser Studie in der Lage, bei Progress unter Chemotherapie selektierte Klone zu eliminieren.

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden 56 Patienten mit oligometastatischem CRC untersucht, die eine (oder mehrere) lokalablative Therapien erhielten. Therapiebegleitend wurden liquid biopsies aus peripherem Blut entnommen, um mittels Sequenzierung der ctDNA eine Aussage über mögliche Zusammenhänge zwischen Abfall der Allelfrequenz und PFS/OS treffen zu können. Ferner wurde untersucht, ob ein Rezidiv mit einem veränderten genetischen Profil einhergeht und ob lokale Ablation in der Lage ist, unter systemischer Therapie entstandene, resistente Klone mit verändertem genetischem Profil zu eliminieren.

4.1 Diskussion der Methodik

Studienablauf

Über einen Zeitraum von April 2016 bis August 2019 wurden insgesamt jeweils 28 Patienten in Magdeburg und München in die Studie eingeschlossen. Im ersten Jahr der Durchführung wurde entsprechend des initial festgelegten Vorgehens eine zweimonatige FU-Frequenz angestrebt. Unter den in Magdeburg therapierten und nachbetreuten Patienten fand sich in der Folge eine hohe Rate an vorzeitigen Studienabbrüchen, a.e. aufgrund der empfundenen Mehrbelastung durch das FU Intervall von zwei Monaten. Nach Umstieg auf ein dreimonatiges Intervall konnte eine bessere Studienadhärenz verzeichnet werden. Dies sollte beim Design von Folgestudien beachtet werden.

Sequenzierung

Aufgrund der hohen Kosten der verwendeten Sequenzierungstechnologie konnten zunächst nur einzelne Proben aus der Gesamtheit der gesammelten Proben ausgewertet werden. Vor dem Hintergrund der großen Heterogenität der Tumore und Mutationsprofile patientenintern und zwischen den Patienten wurde das OncoPrint™ Pan-Cancer Cell-Free Assay Panel, welches Mutationen in 52 verschiedenen Genen nachweisen kann, verwendet. Hiervon konnten in 14 Genen Mutationen nachgewiesen werden. Basierend auf diesen Daten wäre zur weiteren Analyse eine Eingrenzung der Panel-Größe zu erwägen.

Um direkt einen Nutzen aus den Sequenzierungsergebnissen gewinnen zu können, wäre eine studienbegleitende Analysierung der liquid biopsies notwendig. Hierdurch ließen sich, wie z.B. von Cao et al durchgeführt, therapiebegleitend Aussagen über entstehende Resistenzen machen und diese früher therapeutisch angehen (Cao et al. 2020).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Von April 2016 bis Dezember 2020 wurden insgesamt 417 Blutproben und 73 Tumorstanzen von 56 Patienten gesammelt. Eine Auswahl von 74 Proben von neun Patienten wurde nach Abschluss aller Fälle mittels Halbleitersequenzierung ausgewertet.

Patientencharakteristika

Ursprüngliche Tumorlokalisation war bei 33,93% der Patienten (n=19) das rechte Kolon bis zur Flexura coli sinistra, bei 66,07% (n=37) das linke Kolon oder Rektum, was sich mit der berichteten Verteilung aus großen epidemiologischen Studien und hierauf basierenden Leitlinien deckt (van Cutsem et al. 2014; Meguid et al. 2008). Von 49 Patienten lagen Ergebnisse von Mutationsanalysen am Primärtumormaterial vor, 21 Patienten (37,5%) hatten initial eine KRAS- und 5 Patienten eine BRAF-Mutation (8,93%). Andere Autoren beschreiben die Häufigkeit einer Mutation des KRAS-Gens bei CRC-Patienten mit 30 bis 40% (Arrington et al. 2012; Zhuang et al. 2021), die Mutationshäufigkeit von BRAF wird in der Literatur mit etwa fünf bis zehn Prozent angegeben (Lièvre et al. 2010), was sich jeweils mit den Ergebnissen dieser Studie deckt.

Vor Einschluss hatten 19,64% eine Chemotherapie in Kombination mit anti-EGFR Antikörpertherapie erhalten (n=11), 35,71% in Kombination mit anti-VEGF Antikörpertherapie (n=20). 8,93% der Patienten (n=5) hatten im Verlauf vor Einschluss bereits eine Kombination aus Chemotherapie und anti-VEGF, sowie anti-EGFR Antikörpertherapie erhalten. 21,45% hatten eine alleinige Chemotherapie erhalten (n=12), acht Patienten hatten vor Einschluss noch keine Systemtherapie erhalten. Bezüglich der Frage nach der Fähigkeit der lokalen Ablation, durch Chemotherapie selektierte Klone zu eradizieren, wäre eine Vorauswahl zu erwägen, welche Patienten ausschließt, die keine Chemotherapie erhalten (wollen). Insgesamt könnte hier ein Bias vorliegen, da einzelne Patienten die lokale Ablation als Alternative zu systemischer Therapie, nicht als Ergänzung, gewählt haben. Das sollte bei der weiteren Akquisition von Probanden berücksichtigt werden.

cfDNA-Konzentration

Übereinstimmend mit dem eingangs dargelegten Model zur Entstehung von cfDNA (Thierry et al. 2016) zeigte sich nach Ablation und damit einhergehender Zerstörung von Metastasengewebe ein kurzfristiger Anstieg der gemessenen Konzentration von cfDNA im Blut zu den Zeitpunkten +1d und +8d, unabhängig vom weiteren Verlauf. Bei klinischem Progress kam es im Blut zu einem Anstieg der Konzentration.

Mutationsanalyse

Die Übereinstimmungsquote zwischen Biopsie und liquid biopsy zum Zeitpunkt der Intervention liegt mit 31,25 % unter den in anderen Arbeiten erreichten Werten von circa 55 bis 77%, jedoch konnte aus Ressourcengründen keine Sequenzierung der Biopsien der Magdeburger Patienten erfolgen, sodass das vorliegende Ergebnis aufgrund der geringen Probenzahl eingeschränkt aussagekräftig ist (Phallen et al. 2017; Cao et al. 2020). Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen lässt sich unter anderem mit der genetischen Heterogenität von Metastasen erklären. Unterschiedliche Metastasen haben nicht zwangsläufig ein identisches genetisches Profil, auch eine einzelne Metastase ist in ihrem genetischen Profil nicht homogen, sodass eine Stanzbiopsie unter Umständen nur einen Teil der in der Metastase vorhandenen Mutationen erfasst (Falco et al. 2019). Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass in der liquid biopsy eine deutlich größere Vielfalt an Mutationen gefunden werden konnte, als in den Stanzbiopsien.

Insgesamt wurden bei acht der neun analysierten Patienten mittels Halbleitersequenzierung 41 verschiedene Mutationen in 14 CRC-relevanten Genen nachgewiesen. Die fünf am häufigsten mutierten Gene in der Studienpopulation waren TP53 (insgesamt 15 verschiedene Mutationen in der liquid biopsy) bei 88,89% (n=8) der Patienten, in 60,32% aller liquid biopsies, MAP2K1 (drei verschiedene Mutationen in der liquid biopsy), APC (fünf verschiedene Mutationen in der liquid biopsy), PIK3CA (drei verschiedene Mutationen in der liquid biopsy) und KRAS (zwei verschiedene Mutationen in der liquid biopsy) mit 17,46%, 33,33%, 14,29%, bzw. 26,98% aller liquid biopsies und Nachweis bei 66,67% (n=6), 44,44% (n=4), 44,44% (n=4) und 33,33% (n=3) der Patienten. Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten decken sich diese Werte nur teilweise mit denen, die in der Literatur zu finden sind. So fanden Osumi et al unter 101 mCRC-Patienten mittels Sequenzierung von liquid biopsies bei 69,3% eine TP53-, bei 38,6% eine KRAS- und bei 23,7% eine APC-Genmutation (Osumi et al. 2019). Yaeger et al hatten hingegen bei 1134 CRC Patienten in Gewebeprobe eine Mutationsfrequenz von 79% für das APC-, 78% für das TP53-, 44% für das KRAS- (44%), 18% für das PIK3CA- und 16% für das SMAD4-Gen beschrieben (Yaeger et al. 2018). Auffällig ist hier vor allem die höhere Anzahl an MAP2K1-Mutationen.

Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben

Bezüglich des Mutationsstatus des Primärtumors hatten Patienten mit KRAS-Mutation ein mit 24,0 Monaten ähnliches medianes OS im Vergleich zu Patienten mit BRAF-Mutation (28,4 Monate) bzw. Wildtyp (27,8 Monate). Bezüglich des PFS zeigten die Patienten mit KRAS-Mutation mit im Median 4,6 Monaten im Vergleich zu den BRAF-

mutierten Patienten mit im Median 6,0 Monaten und den Wildtyp Patienten mit 7,1 Monaten das kürzeste PFS, wobei die Unterschiede bei kleiner Patientenzahl nicht signifikant waren. Die Aussagekraft dieser Daten wird durch die geringe Anzahl BRAF-mutierter Patienten in dieser Studie zusätzlich eingeschränkt. Andere Quellen beschreiben sowohl KRAS- (Okuno et al. 2018; Roock et al. 2008; Roock et al. 2010) als auch BRAF-Mutationen (Clarke und Kopetz 2015; Lièvre et al. 2010) als mit reduziertem OS und PFS vergesellschaftet.

In Bezug auf die Lokalisation des Primärtumors konnte in dieser Studie kein signifikanter Unterschied im OS oder PFS zwischen linksseitigen (19,1 bzw. 6,0 Monate) und rechtsseitigen (31,0 bzw. 5,2 Monate) Primärtumoren gezeigt werden. Es gilt als erwiesen, dass rechtsseitige CRCs ein schlechteres Outcome mit im Vergleich zu linksseitigen CRCs reduziertem OS und PFS haben (Meguid et al. 2008). Begleitend zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und der initial betroffenen Kolonseite, wobei die Patienten mit rechtsseitigem Primarius bei Einschluss in die Studie signifikant älter waren. Andere Auffälligkeiten ergaben sich in der Gruppenverteilung nicht. Diese, im wissenschaftlichen Kontext unerwarteten, Ergebnisse könnten der geringen Probandenzahl geschuldet sein.

Patienten mit isolierter Lebermetastasierung hatten in dieser Studie mit im Median 24,0 Monaten gegenüber Patienten mit kombinierter Leber- und Lungenmetastasierung mit im Median 17,2 Monaten bzw. Patienten mit kombinierter Leber- und Lymphknotenmetastasierung mit im Median 10,2 Monaten ein längeres OS. Der gefundene, statistisch signifikante Unterschied im OS bezogen auf die metastasierten Organsysteme deckt sich mit anderen Quellen, die eine Lymphknotenmetastasierung als prognostisch ungünstig beschreiben (Sun et al. 2017; van Cutsem et al. 2014). Ähnlich stellt es sich beim PFS dar, wo Patienten mit isolierter Lungenmetastasierung mit 17,6 Monaten im Vergleich zu Patienten mit Leber- (6,1 Monate), Leber- und Lungenmetastasierung (4,1 Monate), bzw. Leber- und Lymphknotenmetastasierung (4,6 Monate) ein deutlich längeres PFS aufwiesen. Eine statistische Signifikanz konnte hier nicht erreicht werden ($p=0,1$).

Zusammenhänge zwischen Abfall der Allelfrequenz und klinischen Charakteristika

Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen Abfall der Allelfrequenz und klinischen Charakteristika ließen sich in dieser Studie für keine der untersuchten Mutationen zeigen. Die geringe Anzahl sequenzierter Patienten und die dadurch bedingte geringe Häufigkeit einzelner Merkmale ist hierfür verantwortlich. Wie eingangs erläutert,

liegen für KRAS-, BRAF-, MAP2K1- und PIK3CA-Mutationen fundierte Hinweise für eine Assoziation mit schlechterem Outcome und reduziertem OS bzw. PFS vor.

Zusammenhang zwischen Abfall der Allelfrequenz und Gesamtüberleben

Bezüglich des Abfalls der Allelfrequenz ausgehend von der Baseline zum ersten FU konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen gezeigt werden. Es zeigte sich eine direkte Korrelation zwischen dem Abfall der Allelfrequenz und dem medianen OS.

Ausgehend von der Baseline zum Tag 8 nach vollständiger Ablation konnte hingegen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden. Dies liegt möglicherweise an noch nachweisbarer, durch die lokale Ablation freigesetzter ctDNA. Um eine mögliche Korrelation für diesen Zeitpunkt genauer zu evaluieren bedarf es einer größeren Patientenzahl.

Zusammenhang zwischen Abfall der Allelfrequenz und progressionsfreiem Überleben

Eine statistische Signifikanz wurde beim Vergleich der Gruppen bezogen auf den Abfall der Allelfrequenz ausgehend von der Baseline zum ersten FU bzw. zu Tag 8 nach vollständiger Ablation für das PFS jeweils knapp verpasst. Eine klare Tendenz ist aber auch für diesen Endpunkt ersichtlich. Um diese zu bestätigen sollte hier ebenfalls eine größere Probandenzahl angestrebt werden.

Genetisches Profil von Rezidiven unter Therapie

Hier zeigte sich ein heterogenes Bild mit einzelnen Patienten, bei denen im Rahmen des Rezidivs ein neuerlicher Anstieg der Allelfrequenzen bereits zuvor detektierter und zwischenzeitlich aus dem Blut eradizierter Mutationen nachgewiesen wurde (vgl. Patient M10, M13 und LMU12), sowie Patienten, bei denen neue Mutationen nachweisbar waren (vgl. Patient LMU14) und Patienten, bei denen sowohl neue, als auch bereits bekannte Mutationen auftraten. Ein Patient entwickelte zwischenzeitlich eine neue TP53-Mutation, befindet sich jedoch weiterhin radiologisch in Remission.

Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext

Eine Vielzahl von Studien zu chirurgisch therapierten Patienten kommt zu ähnlichen Ergebnissen wie die vorliegende Arbeit.

Diehl et al. konnten bereits 2008 zeigen, dass es nach einer chirurgischen Resektion von CRC-Metastasen zu einem Rückgang von ctDNA kommt, bei kompletter Resektion sogar zu einem vollständigen Verschwinden. Ebendieses war mit dem Ausbleiben ei-

nes Rezidivs verbunden, wohingegen der Nachweis von ctDNA beim ersten FU 13 bis 56 Tage nach der Operation mit einem Wiederauftreten des Tumors in 15 von 16 Fällen vergesellschaftet war. Zwei Patienten dieser Kohorte wurden, ähnlich wie viele Probanden dieser Studie, mehrfach therapiert, hier ließ sich ein ähnliches Verhalten der ctDNA zeigen, wie im vorliegenden Ansatz. Nach inkompletter Ablation kam es lediglich zu einem unvollständigen Rückgang mit baldigem Wiederanstieg, nach erneuter, diesmal kompletter Therapie dann zu einem (nahezu) vollständigen Rückgang der ctDNA. (Diehl et al. 2008).

Postoperative ctDNA Detektion konnte auch in einer anderen longitudinalen Beobachtung eine minimale Resterkrankung und im weiteren Verlauf Patienten mit einem hohen Rezidiv-Risiko identifizieren, sowie den Erfolg einer chirurgischen Intervention validieren. Hierzu wurden Proben von 27 CRC Patienten nach operativer Therapie untersucht. Tumorspezifische Mutationen in der cfDNA wurden postoperativ bei allen Patienten gefunden, die ein Rezidiv entwickelten ($n = 14$), aber bei keinem der Patienten, die rezidivfrei blieben. (Schøler et al. 2017)

Reinert et al kamen ebenfalls zu vergleichbaren Resultaten nach operativer Therapie von 11 CRC Patienten. Alle 6 Patienten, die ein Rezidiv entwickelten, zeigten einen frühzeitigen (durchschnittlich 10 Monate vor Progress in der Bildgebung) Anstieg der ctDNA. Im Gegensatz dazu blieb dieser bei den 5 Patienten ohne Rezidiv aus. (Reinert et al. 2016) Das deckt sich mit den von dieser Studie generierten Daten insofern, als dass hier ein frühzeitiger erneuter Anstieg der ctDNA mit einem raschen klinischen Progress verbunden war. Patienten, die hingegen nach Ablation keine ctDNA-Mutationen mehr aufwiesen, zeigten auch bildmorphologisch eine Remission (vergleiche Patient M03). Bei erneut ansteigenden Werten war im weiteren Verlauf ein Rezidiv auszumachen (vergleiche z.B. Patient M13).

Tie et al konnten in einer prospektiven Studie an 230 primär resezierten Stufe II CRC-Patienten zeigen, dass das postoperative Vorhandensein einer tumorspezifischen Mutation im Plasma (ctDNA-positiv) mit einem kürzeren recurrence-free survival (RFS) verbunden war, als die Abwesenheit einer solchen Mutation (ctDNA-negativ). Bei den Patienten, welche eine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten, konnte eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein von mutierter ctDNA nach Komplettierung der Chemotherapie und einer Verkürzung des RFS gezeigt werden. (Tie et al. 2016)

In der prospektiven PlaCol-Studie wurden 82 Patienten mit mCRC eingeschlossen, die mit Erst- (82,9%) oder Zweitlinien- (17,1%) Chemotherapie behandelt wurden. Vor jedem Therapiezyklus wurde die ctDNA im Plasma mittels picodroplet-digital PCR Assay auf Mutationen im KRAS-, BRAF- und TP53-Gen, sowie auf Hypermethylierung des

WIF1- und NPY-Gens untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe ctDNA Konzentration (> 10 ng/ml) vor dem ersten Zyklus Chemotherapie im Vergleich zu einer niedrigen ($< 0,1$ ng/ml) mit einem kürzeren OS korreliert (respektive 6,8 Monate vs 33,4 Monate). Anhand der Veränderung der ctDNA Konzentration zwischen den Zyklen konnten zwei Gruppen („gute“ vs. „schlechte“ ctDNA Responder) gebildet werden. Patienten mit einer guten ctDNA Response (Abfall um mindestens 80% oder auf unter 0,1 ng/ml) hatten eine bessere objektive Response Rate, ein längeres PFS (8,5 vs. 2,4 Monate) und ein längeres OS (27,1 vs. 11,2 Monate), als Patienten mit einer schlechten ctDNA Response (weniger als 80% Abfall bzw. kein Abfall unter 0,1 ng/ml) (Garlan et al. 2017). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch Tie et al, die bei 52 mCRC Patienten unter first-line Chemotherapie anhand von patientenspezifisch ausgewählten Mutationen zeigen konnten, dass eine Reduktion der ctDNA vor dem zweiten Zyklus Chemotherapie mit einer CT-Response vergesellschaftet war. Eine stärkere (zehnfache) Reduktion war zudem mit einem längeren PFS (median 14,7 vs. 8,1 Monate) verbunden (Tie et al. 2015). In Einklang mit diesen Daten zeigten alle Patienten dieser Studie, die zumindest vorübergehend eine PR erreichten, einen durchschnittlichen Abfall der Allelfrequenz um 95,51 % (95% Konfidenzintervall: $\pm 6,5\%$), wohingegen der Patient, der keine PR erreichte, lediglich einen Abfall der Allelfrequenz um 78,05% zeigte.

Die oben vorgestellten Daten zeigen damit im Einklang mit anderen Quellen, die sich auf chirurgische Therapie beziehen, dass ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Abfall der Allelfrequenz mutierter ctDNA in der liquid biopsy vor Ablation verglichen mit der beim ersten FU und sowohl dem OS als auch dem PFS besteht. Dies lässt vermuten, dass lokale radiologische Interventionen in der Lage sind, das genetische Profil des mCRC zu beeinflussen. Bei vier Patienten konnten nach Ablation im Rezidivfall neue Mutationen nachgewiesen werden, bei zwei davon zusätzlich zu einem Allelfrequenzanstieg bereits zuvor detektierter Mutationen. Um den idealen Zeitpunkt für die erste Bestimmung zu evaluieren und damit möglicherweise früher eine Aussage bezüglich eines Rezidivs machen zu können, sollte eine Erhöhung der Frequenz der liquid biopsy erwogen werden. Tag acht nach Intervention scheint basierend auf den hier erhobenen Daten, möglicherweise aufgrund der zu diesem Zeitpunkt noch postablativ nachweisbaren cfDNA, nicht geeignet.

Um diese Ergebnisse weiter validieren zu können, wurde bereits während der Durchführung der Studie der Einschluss von Patienten über die initial geplante Anzahl hinaus angestrebt. Mit der Akquisition weiterer Ressourcen für die Sequenzierung kann der Fragestellung in größerem Umfang nachgegangen werden.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine retrospektive Untersuchung und deskriptive Auswertung der Auswirkungen lokalablativer Therapien auf das genetische Mutationsprofil von Patienten mit oligometastatischem Kolorektalkarzinom (max. 3 Organe, je max. 3 Läsionen; Ausnahme Leber: max. 10 Läsionen). Insgesamt 28 Patienten erhielten im Zeitraum von 2016 bis 2018 lokalablativ Therapien in der Klinik für Radiologie und Strahlentherapie der Otto von Guericke Universität Magdeburg, weitere 28 Patienten wurden im Zeitraum von 2017 bis 2020 in der Klinik und Poliklinik für Radiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München therapiert. Diese Patienten stellten sich anschließend in regelmäßigen Abständen dort und bei ihrem weiterbehandelnden Onkologen vor, es erfolgten Bildgebungs-Follow-ups, sowie Blutentnahmen zur Gewinnung von liquid biopsies. Der Therapie- und Erkrankungsverlauf wurde therapiebegleitend dokumentiert. 27 Patienten erhielten eine einzige Ablation, 13 Patienten zwei und 16 Patienten drei oder mehr Ablationen. Statistisch signifikante Unterschiede in Bezug auf OS oder PFS konnten weder für den initialen Mutationsstatus, noch für die initial betroffene Kolonseite gezeigt werden. Lediglich das von Metastasierung betroffene Organ hatte einen statistisch signifikanten Einfluss auf das OS. Nach Abschluss der 56 Patientenfälle erfolgte die Auswertung des gesammelten biologischen Materials von neun ausgewählten Patienten mittels Halbleitersequenzierung. Bei sechs der neun sequenzierten Patienten konnten mutierte Gene detektiert werden, deren Allelfrequenz-Verlauf mit dem radiologischen Ansprechen auf die lokale Ablation korrelierte. Eine statistische Signifikanz bezüglich eines möglichen Zusammenhangs zu Lokalisation des Primarius, Metastasierungsort, Anzahl befallener Organe, radiologischem Ansprechen und Anzahl der erfolgten Ablationen konnte weder für die maximale Allelfrequenz noch für den Abfall der Allelfrequenz gezeigt werden. Auch für einen Zusammenhang zu Mutationen in den fünf am häufigsten nachgewiesenen Genen (TP53, MAP2K1, APC, PIK3CA und KRAS) vor Therapie oder unter Therapie konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden. Hingegen konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Abfall der Allelfrequenz und dem OS gezeigt werden. Für das PFS wurde eine statistische Signifikanz knapp verfehlt, hier ist jedoch eine Tendenz ersichtlich. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen damit nahe, dass lokalablativ radiologische Verfahren, ähnlich wie eine chirurgische Metastasektomie, in der Lage sind, eine Veränderung des genetischen Profils der malignen Erkrankung durch Eradikation von Metastasen zu bewirken. Chemotherapie-resistente Klone können durch ablativ Verfahren eliminiert werden. Um diese Frage auf Basis einer größeren Probandenzahl vertiefen zu können, werden weitere Patienten in die GATTACA-Studie eingeschlossen, deren biologisches Material nach Akquirierung von finanziellen Ressourcen ausgewertet werden soll.

Literaturverzeichnis

1. Alazzouzi, Hafid; Alhopuro, Pia; Salovaara, Reijo; Sammalkorpi, Heli; Järvinen, Heikki; Mecklin, Jukka-Pekka et al. (2005): SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11 (7), S. 2606–2611. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1458.
2. Albasri, Abdulkader Mohammed; Elkablawy, Mohammed Aboulmatty; Ansari, Irfan Altaf; Alhujaily, Ahmed Safar (2019): Prognostic Significance of Cyclin D1 Over-expression in Colorectal Cancer: An Experience from Madinah, Saudi Arabia. In: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 20 (8), S. 2471–2476. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.8.2471.
3. Alunni-Fabroni, Marianna; Rönsch, Kerstin; Huber, Thomas; Cyran, Clemens C.; Seidensticker, Max; Mayerle, Julia et al. (2019): Circulating DNA as prognostic biomarker in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a translational exploratory study from the SORAMIC trial. In: *Journal of translational medicine* 17 (1), S. 328. DOI: 10.1186/s12967-019-2079-9.
4. Arnold, Melina; Sierra, Mónica S.; Laversanne, Mathieu; Soerjomataram, Isabelle; Jemal, Ahmedin; Bray, Freddie (2017): Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. In: *Gut* 66 (4), S. 683–691. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
5. Arrington, Amanda K.; Heinrich, Eileen L.; Lee, Wendy; Duldulao, Marjun; Patel, Supriya; Sanchez, Julian et al. (2012): Prognostic and Predictive Roles of KRAS Mutation in Colorectal Cancer. In: *International Journal of Molecular Sciences* 13 (10), S. 12153–12168. DOI: 10.3390/ijms131012153.
6. Baeßler, Bettina; Maintz, David; Persigehl, Thorsten (2016): Imaging Procedures for Colorectal Cancer. In: *Visc Med* 32 (3), S. 166–171. DOI: 10.1159/000446143.
7. Bertotti, Andrea; Papp, Eniko; Jones, Siân; Adleff, Vilmos; Anagnostou, Valsamo; Lupo, Barbara et al. (2015): The genomic landscape of response to EGFR blockade in colorectal cancer. In: *Nature* 526 (7572), S. 263–267. DOI: 10.1038/nature14969.
8. Brandi, Giovanni; Derenzini, Enrico; Falcone, Alfredo; Masi, Gianluca; Loupakis, Fotios; Pietrabissa, Andrea et al. (2013): Adjuvant systemic chemotherapy after putative curative resection of colorectal liver and lung metastases. In: *Clinical colorectal cancer* 12 (3), S. 188–194. DOI: 10.1016/j.clcc.2013.04.002.
9. Bray, Freddie; Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Siegel, Rebecca L.; Torre, Lindsey A.; Jemal, Ahmedin (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (6), S. 394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.
10. Bray, Steven M.; Lee, Jeeyun; Kim, Seung Tae; Hur, Joon Young; Ebert, Philip J.; Calley, John N. et al. (2019): Genomic characterization of intrinsic and acquired resistance to cetuximab in colorectal cancer patients. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 15365. DOI: 10.1038/s41598-019-51981-5.

11. Brinza, Dumitru; Mongan, Ann; Chen, Richard; Dhingra, Dalia; Gu, Jian; Au-Young, Janice et al. (2016): Abstract 3959: Detection of somatic mutations at 0.1% frequency from cfDNA in peripheral blood with a multiplex next-generation sequencing assay. In: American Association for Cancer Research (Hg.): Detection of somatic mutations at 0.1% frequency from cfDNA in peripheral blood with a multiplex next-generation sequencing assay. Proceedings: AACR 107th Annual Meeting 2016; April 16-20, 2016; New Orleans, LA: American Association for Cancer Research, S. 3959.
12. Bronte, Giuseppe; Silvestris, Nicola; Castiglia, Marta; Galvano, Antonio; Passiglia, Francesco; Sortino, Giovanni et al. (2015): New findings on primary and acquired resistance to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: do all roads lead to RAS? In: *Oncotarget* 6 (28), S. 24780–24796. DOI: 10.18632/oncotarget.4959.
13. Brudvik, Kristoffer Watten; Mise, Yoshihiro; Chung, Michael Hsiang; Chun, Yun Shin; Kopetz, Scott E.; Passot, Guillaume et al. (2016): RAS Mutation Predicts Positive Resection Margins and Narrower Resection Margins in Patients Undergoing Resection of Colorectal Liver Metastases. In: *Annals of surgical oncology* 23 (8), S. 2635–2643. DOI: 10.1245/s10434-016-5187-2.
14. Cao, Hua; Liu, Xinyi; Chen, Yixin; Yang, Pan; Huang, Tanxiao; Song, Lele; Xu, Ruilian (2020): Circulating Tumor DNA Is Capable of Monitoring the Therapeutic Response and Resistance in Advanced Colorectal Cancer Patients Undergoing Combined Target and Chemotherapy. In: *Frontiers in oncology* 10, S. 466. DOI: 10.3389/fonc.2020.00466.
15. Clarke, Callisia N.; Kopetz, E. Scott (2015): BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. In: *Journal of Gastrointestinal Oncology* 6 (6), S. 660–667. DOI: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.077.
16. Corsini, Erin M.; Mitchell, Kyle G.; Mehran, Reza J.; Rice, David C.; Sepesi, Boris; Walsh, Garrett L. et al. (2019): Colorectal cancer mutations are associated with survival and recurrence after pulmonary metastasectomy. In: *Journal of surgical oncology* 120 (4), S. 729–735. DOI: 10.1002/jso.25630.
17. Cremolini, Chiara; Loupakis, Fotios; Antoniotti, Carlotta; Lupi, Cristiana; Sensi, Elisa; Lonardi, Sara et al. (2015): FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. In: *The Lancet. Oncology* 16 (13), S. 1306–1315. DOI: 10.1016/S1473-2045(15)00122-9.
18. Cunningham, David; Humblet, Yves; Siena, Salvatore; Khayat, David; Bleiberg, Harry; Santoro, Armando et al. (2004): Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. In: *The New England journal of medicine* 351 (4), S. 337–345. DOI: 10.1056/NEJMoa033025.
19. Diaz, Luis A.; Bardelli, Alberto (2014): Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 (6), S. 579–586. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.2011.
20. Diehl, Frank; Schmidt, Kerstin; Choti, Michael A.; Romans, Katharine; Goodman, Steven; Li, Meng et al. (2008): Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. In: *Nature medicine* 14 (9), S. 985–990. DOI: 10.1038/nm.1789.

21. Ding, Yuhan; Li, Wenxia; Wang, Kun; Xu, Chang; Hao, Mengdi; Ding, Lei (2020): Perspectives of the Application of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer. In: *BioMed Research International* 2020. DOI: 10.1155/2020/6843180.
22. Douillard, J. Y.; Cunningham, D.; Roth, A. D.; Navarro, M.; James, R. D.; Karasek, P. et al. (2000): Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. In: *The Lancet* 355 (9209), S. 1041–1047. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02034-1.
23. Douillard, Jean-Yves; Oliner, Kelly S.; Siena, Salvatore; Taberero, Josep; Burkes, Ronald; Barugel, Mario et al. (2013): Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. In: *The New England journal of medicine* 369 (11), S. 1023–1034. DOI: 10.1056/NEJMoa1305275.
24. Eisenhauer, E. A.; Therasse, P.; Bogaerts, J.; Schwartz, L. H.; Sargent, D.; Ford, R. et al. (2009): New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 45 (2), S. 228–247. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.10.026.
25. Esposito, Angela; Criscitiello, Carmen; Locatelli, Marzia; Milano, Monica; Curigliano, Giuseppe (2016): Liquid biopsies for solid tumors: Understanding tumor heterogeneity and real time monitoring of early resistance to targeted therapies. In: *Pharmacology & therapeutics* 157, S. 120–124. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.11.007.
26. Falco, V. de; Vitiello, P.; Giunta, E.; Ciardiello, D.; Stefania, N.; Cardone, C. et al. (2019): Clinical practice use of liquid biopsy to identify RAS/BRAF mutational status in patients with metastatic colorectal cancer: A single institution experience. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 30 Suppl 4, iv90. DOI: 10.1093/annonc/mdz155.325.
27. Fernández-Lázaro, Diego; Hernández, Juan Luis García; García, Alberto Caballero; Castillo, Aurora Caballero Del; Hueso, María Villaverde; Cruz-Hernández, Juan Jesús (2020): Clinical Perspective and Translational Oncology of Liquid Biopsy. In: *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 10 (7). DOI: 10.3390/diagnostics10070443.
28. Fodde, R.; Smits, R.; Clevers, H. (2001): APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 1 (1), S. 55–67. DOI: 10.1038/35094067.
29. Fromme, Julia Elisabeth; Schmitz, Katja; Wachter, Astrid; Grzelinski, Marius; Zielinski, Dirk; Koppel, Christina et al. (2018): FGFR3 mRNA overexpression defines a subset of oligometastatic colorectal cancers with worse prognosis. In: *Oncotarget* 9 (63), S. 32204–32218. DOI: 10.18632/oncotarget.25941.
30. Garlan, Fanny; Laurent-Puig, Pierre; Sefrioui, David; Siauve, Nathalie; Didelot, Audrey; Sarafan-Vasseur, Nasrin et al. (2017): Early Evaluation of Circulating Tumor DNA as Marker of Therapeutic Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer Patients (PLACOL Study). In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 23 (18), S. 5416–5425. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3155.

31. Gramont, A. de; Figuer, A.; Seymour, M.; Homerin, M.; Hmissi, A.; Cassidy, J. et al. (2000): Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18 (16), S. 2938–2947. DOI: 10.1200/JCO.2000.18.16.2938.
32. Grothey, Axel; Sargent, Daniel; Goldberg, Richard M.; Schmoll, Hans-Joachim (2004): Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (7), S. 1209–1214. DOI: 10.1200/JCO.2004.11.037.
33. Grothey, Axel; van Cutsem, Eric; Sobrero, Alberto; Siena, Salvatore; Falcone, Alfredo; Ychou, Marc et al. (2013): Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. In: *The Lancet* 381 (9863), S. 303–312. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61900-X.
34. Gurusamy, Kurinchi; Corrigan, Neil; Croft, Julie; Twiddy, Maureen; Morris, Stephen; Woodward, Nick et al. (2018): Liver resection surgery versus thermal ablation for colorectal LiVer MetAstases (LAVA): study protocol for a randomised controlled trial. In: *Trials* 19 (1), S. 105. DOI: 10.1186/s13063-018-2499-5.
35. He, Yiping; Ma, Xiaoji; Chen, Ke; Liu, Fangqi; Cai, Sanjun; Han-Zhang, Han et al. (2020): Perioperative Circulating Tumor DNA in Colorectal Liver Metastases: Concordance with Metastatic Tissue and Predictive Value for Tumor Burden and Prognosis. In: *Cancer management and research* 12, S. 1621–1630. DOI: 10.2147/CMAR.S240869.
36. Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J.; Williams, P. M. (1996): Real time quantitative PCR. In: *Genome research* 6 (10), S. 986–994. DOI: 10.1101/gr.6.10.986.
37. Heinemann, Volker; Rivera, Fernando; O'Neil, Bert H.; Stintzing, Sebastian; Koukakis, Reija; Terwey, Jan-Henrik; Douillard, Jean-Yves (2016): A study-level meta-analysis of efficacy data from head-to-head first-line trials of epidermal growth factor receptor inhibitors versus bevacizumab in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 67, S. 11–20. DOI: 10.1016/j.ejca.2016.07.019.
38. Holdenrieder, S.; Stieber, P.; Bodenmüller, H.; Fertig, G.; Fürst, H.; Schmeller, N. et al. (2001): Nucleosomes in serum as a marker for cell death. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 39 (7), S. 596–605. DOI: 10.1515/CCLM.2001.095.
39. Horton, K. M.; Abrams, R. A.; Fishman, E. K. (2000): Spiral CT of colon cancer: imaging features and role in management. In: *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 20 (2), S. 419–430. DOI: 10.1148/radiographics.20.2.g00mc14419.
40. Jonker, Derek J.; O'Callaghan, Chris J.; Karapetis, Christos S.; Zalcborg, John R.; Tu, Dongsheng; Au, Heather-Jane et al. (2007): Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. In: *The New England journal of medicine* 357 (20), S. 2040–2048. DOI: 10.1056/NEJMoa071834.

41. Khan, Khurum; Rata, Mihaela; Cunningham, David; Koh, Dow-Mu; Tunariu, Nina; Hahne, Jens C. et al. (2018): Functional imaging and circulating biomarkers of response to regorafenib in treatment-refractory metastatic colorectal cancer patients in a prospective phase II study. In: *Gut* 67 (8), S. 1484–1492. DOI: 10.1136/gutjnl-2017-314178.
42. Köhne, Claus-Henning; Hofheinz, Ralf; Mineur, Laurent; Letocha, Henry; Greil, Richard; Thaler, Josef et al. (2012): First-line panitumumab plus irinotecan/5-fluorouracil/leucovorin treatment in patients with metastatic colorectal cancer. In: *Journal of cancer research and clinical oncology* 138 (1), S. 65–72. DOI: 10.1007/s00432-011-1061-6.
43. Kolenčik, Drahomír; Shishido, Stephanie N.; Pitule, Pavel; Mason, Jeremy; Hicks, James; Kuhn, Peter (2020): Liquid Biopsy in Colorectal Carcinoma: Clinical Applications and Challenges. In: *Cancers* 12 (6). DOI: 10.3390/cancers12061376.
44. Kopetz, Scott; Grothey, Axel; Yaeger, Rona; van Cutsem, Eric; Desai, Jayesh; Yoshino, Takayuki et al. (2019): Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. In: *The New England journal of medicine* 381 (17), S. 1632–1643. DOI: 10.1056/NEJMoa1908075.
45. Kopetz, Scott; McDonough, Shannon L.; van Morris, Karllye; Lenz, Heinz-Josef; Magliocco, Anthony Martin; Atreya, Chloe Evelyn et al. (2017): Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in BRAF -mutant metastatic colorectal cancer (SWOG 1406). In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (4_suppl), S. 520. DOI: 10.1200/JCO.2017.35.4_suppl.520.
46. Kramer, M. F.; Coen, D. M. (2001): Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. In: *Current protocols in molecular biology* Chapter 15, Unit 15.1. DOI: 10.1002/0471142727.mb1501s56.
47. Laurent-Puig, Pierre; Pekin, Deniz; Normand, Corinne; Kotsopoulos, Steve K.; Nizard, Philippe; Perez-Toralla, Karla et al. (2015): Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (5), S. 1087–1097. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0983.
48. Lièvre, A.; Rouleau, E.; Buecher, B.; Mitry, E. (2010): Intérêt clinique des mutations de BRAF dans le cancer colorectal. In: *Bulletin du cancer* 97 (12), S. 1441–1452. DOI: 10.1684/bdc.2010.1225.
49. Løes, Inger Marie; Immervoll, Heike; Sorbye, Halfdan; Angelsen, Jon-Helge; Horn, Arild; Knappskog, Stian; Lønning, Per Eystein (2016): Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA, TP53 status and intraindividual mutation heterogeneity on outcome after liver resection for colorectal cancer metastases. In: *International journal of cancer* 139 (3), S. 647–656. DOI: 10.1002/ijc.30089.
50. Lussier, Yves A.; Khodarev, Nikolai N.; Regan, Kelly; Corbin, Kimberly; Li, Haiquan; Ganai, Sabha et al. (2012): Oligo- and polymetastatic progression in lung metastasis(es) patients is associated with specific microRNAs. In: *PloS one* 7 (12), e50141. DOI: 10.1371/journal.pone.0050141.

51. Lussier, Yves A.; Xing, H. Rosie; Salama, Joseph K.; Khodarev, Nikolai N.; Huang, Yong; Zhang, Qingbei et al. (2011): MicroRNA expression characterizes oligometastasis(es). In: *PloS one* 6 (12), e28650. DOI: 10.1371/journal.pone.0028650.
52. Mayer, Robert J.; van Cutsem, Eric; Falcone, Alfredo; Yoshino, Takayuki; Garcia-Carbonero, Rocio; Mizunuma, Nobuyuki et al. (2015): Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. In: *The New England journal of medicine* 372 (20), S. 1909–1919. DOI: 10.1056/NEJMoa1414325.
53. Mazouji, Omayma; Ouhajjou, Abdelhak; Incitti, Roberto; Mansour, Hicham (2021): Updates on Clinical Use of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer Screening, Diagnosis, Follow-Up, and Treatment Guidance. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. DOI: 10.3389/fcell.2021.660924.
54. McGranahan, Nicholas; Swanton, Charles (2015): Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. In: *Cancer cell* 27 (1), S. 15–26. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.12.001.
55. McLaren, William; Gil, Laurent; Hunt, Sarah E.; Riat, Harpreet Singh; Ritchie, Graham R. S.; Thormann, Anja et al. (2016): The Ensembl Variant Effect Predictor. In: *Genome biology* 17 (1), S. 122. DOI: 10.1186/s13059-016-0974-4.
56. Meguid, Robert A.; Slidell, Mark B.; Wolfgang, Christopher L.; Chang, David C.; Ahuja, Nita (2008): Is There a Difference in Survival Between Right-Versus Left-Sided Colon Cancers? In: *Annals of surgical oncology* 15 (9), S. 2388–2394. DOI: 10.1245/s10434-008-0015-y.
57. Miyaki, M.; Iijima, T.; Konishi, M.; Sakai, K.; Ishii, A.; Yasuno, M. et al. (1999): Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. In: *Oncogene* 18 (20), S. 3098–3103. DOI: 10.1038/sj.onc.1202642.
58. Normanno, N.; Rachiglio, A. M.; Lambiase, M.; Martinelli, E.; Fenizia, F.; Esposito, C. et al. (2015): Heterogeneity of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in metastatic colorectal cancer and potential effects on therapy in the CAPRI GOIM trial. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 26 (8), S. 1710–1714. DOI: 10.1093/annonc/mdv176.
59. Normanno, Nicola; Cervantes, Andres; Ciardiello, Fortunato; Luca, Antonella de; Pinto, Carmine (2018): The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: Current applications and future scenarios. In: *Cancer treatment reviews* 70, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.07.007.
60. Odisio, B. C.; Yamashita, S.; Huang, S. Y.; Harmoush, S.; Kopetz, S. E.; Ahrar, K. et al. (2017): Local tumour progression after percutaneous ablation of colorectal liver metastases according to RAS mutation status. In: *The British journal of surgery* 104 (6), S. 760–768. DOI: 10.1002/bjs.10490.
61. Okuno, Masayuki; Goumard, Claire; Kopetz, Scott; Vega, Eduardo A.; Joechle, Katharina; Mizuno, Takashi et al. (2018): RAS Mutation is Associated with Unsalvageable Recurrence Following Hepatectomy for Colorectal Cancer Liver Metastases. In: *Annals of surgical oncology* 25 (8), S. 2457–2466. DOI: 10.1245/s10434-018-6517-3.

62. Osumi, Hiroki; Shinozaki, Eiji; Takeda, Yoshinori; Wakatsuki, Takeru; Ichimura, Takashi; Saiura, Akio et al. (2019): Clinical relevance of circulating tumor DNA assessed through deep sequencing in patients with metastatic colorectal cancer. In: *Cancer medicine* 8 (1), S. 408–417. DOI: 10.1002/cam4.1913.

63. Pereira, José; Alves, Fatima; Ferreira, Filipa; Vasconcelos de Matos, Leonor; Massena, Ana; Martins, Ana (2020): Liquid Biopsies in Progressing Metastatic Colorectal Cancer- Application and their Therapeutic Implications According to the RAS Status. In: *Cureus* 12 (2), e7035. DOI: 10.7759/cureus.7035.

64. Phallen, Jillian; Sausen, Mark; Adleff, Vilmos; Leal, Alessandro; Hruban, Carolyn; White, James et al. (2017): Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. In: *Sci. Transl. Med.* 9 (403), eaan2415. DOI: 10.1126/scitranslmed.aan2415.

65. Puijk, Robbert S.; Ruarus, Alette H.; Vroomen, Laurien G. P. H.; van Tilborg, Aukje A. J. M.; Scheffer, Hester J.; Nielsen, Karin et al. (2018): Colorectal liver metastases: surgery versus thermal ablation (COLLISION) - a phase III single-blind prospective randomized controlled trial. In: *BMC cancer* 18 (1), S. 821. DOI: 10.1186/s12885-018-4716-8.

66. Reinert, Thomas; Schøler, Lone V.; Thomsen, Rune; Tobiasen, Heidi; Vang, Søren; Nordentoft, Iver et al. (2016): Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. In: *Gut* 65 (4), S. 625–634. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-308859.

67. Reiser, Maximilian; Kuhn, Fritz-Peter; Debus, Jürgen (2017): Radiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

68. Ricke, Jens; Wust, Peter; Stohlmann, Anna; Beck, Alexander; Cho, Chie Hee; Pech, Maciej et al. (2004a): CT-guided interstitial brachytherapy of liver malignancies alone or in combination with thermal ablation: phase I-II results of a novel technique. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 58 (5), S. 1496–1505. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2003.09.024.

69. Ricke, Jens; Wust, Peter; Wieners, Gero; Beck, Alexander; Cho, Chie Hee; Seidensticker, Max et al. (2004b): Liver malignancies: CT-guided interstitial brachytherapy in patients with unfavorable lesions for thermal ablation. In: *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR* 15 (11), S. 1279–1286. DOI: 10.1097/01.RVI.0000141343.43441.06.

70. Rivera, Fernando; Karthaus, Meinolf; Hecht, J. Randolph; Sevilla, Isabel; Forget, Frédéric; Fasola, Gianpiero et al. (2017): Final analysis of the randomised PEAK trial: overall survival and tumour responses during first-line treatment with mFOLFOX6 plus either panitumumab or bevacizumab in patients with metastatic colorectal carcinoma. In: *International journal of colorectal disease* 32 (8), S. 1179–1190. DOI: 10.1007/s00384-017-2800-1.

71. Roock, W. de; Piessevaux, H.; Schutter, J. de; Janssens, M.; Hertogh, G. de; Personeni, N. et al. (2008): KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 19 (3), S. 508–515. DOI: 10.1093/annonc/mdm496.

72. Roock, Wendy de; Claes, Bart; Bernasconi, David; Schutter, Jef de; Biesmans, Bart; Fountzilias, George et al. (2010): Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. In: *The Lancet Oncology* 11 (8), S. 753–762. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70130-3.
73. Rothberg, Jonathan M.; Hinz, Wolfgang; Rearick, Todd M.; Schultz, Jonathan; Mileski, William; Davey, Mel et al. (2011): An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. In: *Nature* 475 (7356), S. 348–352. DOI: 10.1038/nature10242.
74. Rougier, P.; van Cutsem, E.; Bajetta, E.; Niederle, N.; Possinger, K.; Labianca, R. et al. (1998): Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer. In: *The Lancet* 352 (9138), S. 1407–1412. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)03085-2.
75. Ruers, Theo; van Coevorden, Frits; Punt, Cornelis J. A.; Pierie, Jean-Pierre E. N.; Borel-Rinkes, Inne; Ledermann, Jonathan A. et al. (2017): Local Treatment of Unresectable Colorectal Liver Metastases: Results of a Randomized Phase II Trial. In: *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 109 (9). DOI: 10.1093/jnci/djx015.
76. Rühl, Ricarda; Lüdemann, Lutz; Czarnecka, Anna; Streitparth, Florian; Seidensticker, Max; Mohnike, Konrad et al. (2010): Radiobiological restrictions and tolerance doses of repeated single-fraction HDR-irradiation of intersecting small liver volumes for recurrent hepatic metastases. In: *Radiation oncology (London, England)* 5, S. 44. DOI: 10.1186/1748-717X-5-44.
77. Saltz, Leonard B.; Clarke, Stephen; Díaz-Rubio, Eduardo; Scheithauer, Werner; Figer, Arie; Wong, Ralph et al. (2008): Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (12), S. 2013–2019. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.9930.
78. Schøler, Lone V.; Reinert, Thomas; Ørntoft, Mai-Britt W.; Kassentoft, Christine G.; Árnadóttir, Sigrid S.; Vang, Søren et al. (2017): Clinical Implications of Monitoring Circulating Tumor DNA in Patients with Colorectal Cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 23 (18), S. 5437–5445. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0510.
79. Sharma, Manish R.; Maitland, Michael L.; Ratain, Mark J. (2012): RECIST: no longer the sharpest tool in the oncology clinical trials toolbox---point. In: *Cancer research* 72 (20), 5145-9; discussion 5150. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0058.
80. Shibata, T.; Niinobu, T.; Ogata, N.; Takami, M. (2000): Microwave coagulation therapy for multiple hepatic metastases from colorectal carcinoma. In: *Cancer* 89 (2), S. 276–284.
81. Simon, Caroline J.; Dupuy, Damian E.; Mayo-Smith, William W. (2005): Microwave ablation: principles and applications. In: *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 25 Suppl 1, S69-83. DOI: 10.1148/rg.25si055501.
82. Siravegna, Giulia; Mussolin, Benedetta; Buscarino, Michela; Corti, Giorgio; Cassingena, Andrea; Crisafulli, Giovanni et al. (2015): Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. In: *Nature medicine* 21 (7), S. 795–801. DOI: 10.1038/nm.3870.

83. Song, Pengyuan; Sheng, Lijun; Sun, Yahong; An, Yuji; Guo, Ya; Zhang, Yafei (2017): The clinical utility and outcomes of microwave ablation for colorectal cancer liver metastases. In: *Oncotarget* 8 (31), S. 51792–51799. DOI: 10.18632/oncotarget.15244.
84. Stang, Axel; Fischbach, Roman; Teichmann, Wolfgang; Bokemeyer, Carsten; Braumann, Dietrich (2009): A systematic review on the clinical benefit and role of radiofrequency ablation as treatment of colorectal liver metastases. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 45 (10), S. 1748–1756. DOI: 10.1016/j.ejca.2009.03.012.
85. Stroun, Maurice; Anker, Philippe; Lyautey, Jacqueline; Lederrey, Christine; Maurice, Pierre A. (1987): Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. In: *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 23 (6), S. 707–712. DOI: 10.1016/0277-5379(87)90266-5.
86. Sun, Zhen-Qiang; Ma, Shuai; Zhou, Quan-Bo; Yang, Shuai-Xi; Chang, Yuan; Zeng, Xiang-Yue et al. (2017): Prognostic value of lymph node metastasis in patients with T1-stage colorectal cancer from multiple centers in China. In: *World journal of gastroenterology* 23 (48), S. 8582–8590. DOI: 10.3748/wjg.v23.i48.8582.
87. Taly, Valerie; Pekin, Deniz; Benhaim, Leonor; Kotsopoulos, Steve K.; Le Corre, Delphine; Li, Xinyu et al. (2013): Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. In: *Clinical chemistry* 59 (12), S. 1722–1731. DOI: 10.1373/clinchem.2013.206359.
88. Tamandl, Dietmar; Mang, Thomas; Ba-Ssalamah, Ahmed (2018): Imaging of colorectal cancer – the clue to individualized treatment. In: *Innovative Surgical Sciences* 3 (1), S. 3–15. DOI: 10.1515/iss-2017-0049.
89. Tan, Hon Lyn; Lee, Matilda; Vellayappan, Balamurugan A.; Neo, Wee Thong; Yong, Wei Peng (2018): The Role of Liver-Directed Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. In: *Current colorectal cancer reports* 14 (5), S. 129–137. DOI: 10.1007/s11888-018-0409-6.
90. Tebbutt, Niall C.; Wilson, Kate; GebSKI, Val J.; Cummins, Michelle M.; Zannino, Diana; van Hazel, Guy A. et al. (2010): Capecitabine, bevacizumab, and mitomycin in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the Australasian Gastrointestinal Trials Group Randomized Phase III MAX Study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (19), S. 3191–3198. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.7723.
91. Thierry, A. R.; El Messaoudi, S.; Gahan, P. B.; Anker, P.; Stroun, M. (2016): Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. In: *Cancer metastasis reviews* 35 (3), S. 347–376. DOI: 10.1007/s10555-016-9629-x.
92. Tie, J.; Kinde, I.; Wang, Y.; Wong, H. L.; Roebert, J.; Christie, M. et al. (2015): Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 26 (8), S. 1715–1722. DOI: 10.1093/annonc/mdv177.
93. Tie, Jeanne; Wang, Yuxuan; Tomasetti, Cristian; Li, Lu; Springer, Simeon; Kinde, Isaac et al. (2016): Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. In: *Science translational medicine* 8 (346), 346ra92. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf6219.

94. Tournigand, Christophe; André, Thierry; Achille, Emmanuel; Lledo, Gérard; Flesh, Michel; Mery-Mignard, Dominique et al. (2004): FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (2), S. 229–237. DOI: 10.1200/JCO.2004.05.113.
95. Tsili, Athina C.; Alexiou, George; Naka, Christina; Argyropoulou, Maria I. (2021): Imaging of colorectal cancer liver metastases using contrast-enhanced US, multidetector CT, MRI, and FDG PET/CT: a meta-analysis. In: *Acta Radiol* 62 (3), S. 302–312. DOI: 10.1177/0284185120925481.
96. Tsilimigras, Diamantis I.; Ntanasis-Stathopoulos, Ioannis; Bagante, Fabio; Moris, Demetrios; Cloyd, Jordan; Spartalis, Eleftherios; Pawlik, Timothy M. (2018): Clinical significance and prognostic relevance of KRAS, BRAF, PI3K and TP53 genetic mutation analysis for resectable and unresectable colorectal liver metastases: A systematic review of the current evidence. In: *Surgical oncology* 27 (2), S. 280–288. DOI: 10.1016/j.suronc.2018.05.012.
97. van Cutsem, E.; Cervantes, A.; Nordlinger, B.; Arnold, D. (2014): Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 25 Suppl 3, iii1-9. DOI: 10.1093/annonc/mdu260.
98. van Cutsem, Eric; Lenz, Heinz-Josef; Köhne, Claus-Henning; Heinemann, Volker; Tejpar, Sabine; Melezínek, Ivan et al. (2015): Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (7), S. 692–700. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.4812.
99. van Cutsem, Eric; Peeters, Marc; Siena, Salvatore; Humblet, Yves; Hendlisz, Alain; Neyns, Bart et al. (2007): Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (13), S. 1658–1664. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.1620.
100. van Cutsem, Eric; Tabernero, Josep; Lakomy, Radek; Prenen, Hans; Prausová, Jana; Macarulla, Teresa et al. (2012): Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (28), S. 3499–3506. DOI: 10.1200/JCO.2012.42.8201.
101. Weichselbaum, Ralph R.; Hellman, Samuel (2011): Oligometastases revisited. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 8 (6), S. 378–382. DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.44.
102. Yaeger, Rona; Chatila, Walid K.; Lipsyc, Marla D.; Hechtman, Jaclyn F.; Cercek, Andrea; Sanchez-Vega, Francisco et al. (2018): Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer. In: *Cancer cell* 33 (1), 125-136.e3. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.12.004.
103. Yamada, Takeshi; Matsuda, Akihisa; Koizumi, Michihiro; Shinji, Seiichi; Takahashi, Goro; Iwai, Takuma et al. (2019): Liquid Biopsy for the Management of Patients with Colorectal Cancer. In: *Digestion* 99 (1), S. 39–45. DOI: 10.1159/000494411.

-
104. Yan, Weixin; Zhang, Aiguo; Powell, Michael J. (2016): Genetic alteration and mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA (cfDNA) for diagnosis and targeted therapy of gastrointestinal stromal tumors. In: *Chinese journal of cancer* 35 (1), S. 68. DOI: 10.1186/s40880-016-0131-1.
105. Yang, Xue; Zhuo, Minglei; Ye, Xin; Bai, Hua; Wang, Zhijie; Sun, Yun et al. (2016): Quantification of mutant alleles in circulating tumor DNA can predict survival in lung cancer. In: *Oncotarget* 7 (15), S. 20810–20824. DOI: 10.18632/oncotarget.8021.
106. Zech, C. J.; Korpraphong, P.; Huppertz, A.; Denecke, T.; Kim, M-J; Tanomkiat, W. et al. (2014): Randomized multicentre trial of gadoxetic acid-enhanced MRI versus conventional MRI or CT in the staging of colorectal cancer liver metastases. In: *British Journal of Surgery* 101 (6), S. 613–621. DOI: 10.1002/bjs.9465.
107. Zhou, Qing; Perakis, Samantha O.; Ulz, Peter; Mohan, Sumitra; Riedl, Jakob M.; Talakic, Emina et al. (2020): Cell-free DNA analysis reveals POLR1D-mediated resistance to bevacizumab in colorectal cancer. In: *Genome medicine* 12 (1), S. 20. DOI: 10.1186/s13073-020-0719-6.
108. Zhuang, Yan; Wang, Hailong; Jiang, Da; Li, Ying; Feng, Lixia; Tian, Caijuan et al. (2021): Multi gene mutation signatures in colorectal cancer patients: predict for the diagnosis, pathological classification, staging and prognosis. In: *BMC cancer* 21 (1), S. 380. DOI: 10.1186/s12885-021-08108-9.

Danksagung

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Genetische Veränderungen im Verlauf der lokalablativen Behandlung eines oligometastatischen kolorektalen Karzinoms (GATTACA)“

im Institut für Radiologie und Nuklearmedizin

mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. Ricarda Seidensticker (Bildbefundung), Herrn Prof. Dr. Andreas Jung und Herrn Dipl. Biol. Sebastian Heucke (Sequenzierungen), sowie Frau Regina Schinner (Statistik)

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Unterschrift

Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Anhang

1. Patienteninformation und Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Studie

Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Medizinische Fakultät
Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.
Prof. Dr. med. Jens Ricke



Patienteninformation und Einwilligungserklärung
zur Teilnahme an der Studie:

Genetische Veränderungen während der Behandlung eines metastasierten kolorektalen Karzinoms

(GATTACA - Genetic alterations during treatment of oligometastatic colorectal cancer)

Prüfstelle:
Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Medizinische Fakultät
Leipziger Straße 44
39120 Magdeburg
Tel.: 0391-6714426 (Studiensekretariat)

Prüfärzte:
Prof. Dr. med. J. Ricke, Uniklinik München

Prof. Dr. med. F. Lordick, Universitäres Krebszentrum Leipzig
Prof. Dr. med. M. Pech, Uniklinik Magdeburg

PATIENTENINFORMATION

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Ihnen hiermit die Teilnahme an der oben genannten Studie vorschlagen. Auf den folgenden Seiten erhalten Sie Informationen über den Inhalt und die Durchführung der klinischen Studie. Wir bitten Sie um sorgfältige Kenntnisnahme der beiliegenden Informationen und stehen Ihnen für weitere Fragen selbstverständlich jederzeit sehr gerne zur Verfügung.

Diese klinische Prüfung wird in der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchgeführt.

Ihre Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Sie werden in diese Prüfung also nur dann einbezogen, wenn Sie dazu schriftlich Ihre Einwilligung erklären. Sofern Sie nicht an der klinischen Prüfung teilnehmen oder später aus ihr ausscheiden möchten, erwachsen Ihnen daraus keinerlei Nachteile.

1. Warum wird diese Prüfung durchgeführt?

Bei Ihnen wurden in einer vorhergehenden Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) Tumorabsiedelungen in der Leber, Lunge oder Lymphknoten diagnostiziert, die von einem bösartigen Tumor des Darmes ausgehen. Eine operative Behandlung der Metastasen ist leider nicht möglich. Es stehen jedoch andere Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung.

Diese Tumorabsiedelungen können mit einer lokalen, indirekten Abtragung (Ablation) entfernt werden. Dazu führen wir entweder eine sogenannte Brachytherapie (Therapie mit umschlossenen Strahlenquellen oder Kurzdistanztherapie), eine sog. Radiofrequenzablation (thermische Abtragung der Raumforderung), eine sog. Mikrowellenablation oder stereotaktische Bestrahlung (fokussierte Bestrahlung von außen) durch. Alle o.g. Behandlungen erfolgen bildgestützt, d.h. unter computertomographischer und kernspintomographischer Kontrolle.

Mit dieser Studie soll der Einfluss der o.g. lokalen Tumorthherapie auf die Entwicklung von genetischen Veränderungen der im Blut frei zirkulierenden Tumor-DNA bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom, die eine systemische Chemotherapie und tumorgerichtete Ablationstherapie erhalten, überprüft werden.

Die o.g. Tumor-DNA liegt frei im Blut vor und kann aus einer einfachen Blutprobe gewonnen werden.

2. Wie ist der Ablauf der Studie und was muss ich bei der Teilnahme beachten?

Zu Beginn erfordert die Studie einen Krankenhausbesuch. Der erste Besuch dient dazu, den Zustand Ihrer Erkrankung zu beurteilen und alle Untersuchungen zur Vorbereitung der Brachytherapie/Radiofrequenzablation durchzuführen. Dazu gehören z.B. eine Computertomographie oder eine Kernspintomographie sowie eine Blutentnahme am Tag vor der Ablationsbehandlung (Tag 0).

Abhängig von diesen Untersuchungen wird dann entschieden, welche der o.g. Therapien für Sie geeignet ist (z.B. in Abhängigkeit von der Größe und Lage der Raumforderung). Die Art der Ablationsbehandlung wird durch die Teilnahme an dieser Studie nicht beeinflusst. Es werden weitere Blutentnahmen einen Tag nach der Ablationsbehandlung sowie 8 Tage danach erfolgen. Die Blutentnahme am ersten Tag nach der Ablati-

onsbehandlung erfolgt während Ihres stationären Aufenthaltes im Rahmen der klinischen Routine. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme 8 Tage nach der Ablationsbehandlung haben Sie für gewöhnlich unser Krankenhaus bereits verlassen. Daher bitten wir Sie, zu diesem Zeitpunkt eine Blutentnahme bei Ihrem Hausarzt oder Onkologen durchführen zu lassen (Plasma-Röhrchen), welches uns dann bitte für die weitere Analyse zugesandt werden soll. Diese Blutproben werden zur Analyse in ein auswärtiges Zentrum versendet. Auch hier stehen wir für Rückfragen seitens Ihres betreuenden Arztes sehr gern zur Verfügung.

Die bei den Blutuntersuchungen gewonnenen Daten werden sorgfältig dokumentiert und analysiert. Die erhobenen Daten werden pseudonymisiert, so dass kein Rückschluss auf ihre Person erfolgen kann.

Im weiteren Verlauf dieser Studie sind erneute Blutentnahmen alle zwei Monate nach der Behandlung vorgesehen, die aber zusammen mit den routinemäßigen bildgebenden Kontrollen mittels Computertomographie und/oder Kernspintomographie erfolgen, welche das Ansprechen auf die Therapie untersuchen. Das heißt, Sie müssen sich wegen dieser Studie nicht zusätzlich in unserer Klinik vorstellen.

Zunächst sollen 36 Patienten mit lokaler Ablationsbehandlung nach erfolgter Chemotherapie untersucht werden.

3. Nachsorgeuntersuchungen

Wie bereits erwähnt werden der Anteil der freien Tumor-DNA im Blut und das Ansprechen auf die Behandlung mittels MRT und CT alle 2 Monate nach der Behandlung am Universitätsklinikum Magdeburg überprüft. Durch diese gründlichen Kontrollen kann bei einem möglichen Rezidiv (Rückkehr der Tumorerkrankung), welches durch genetisch veränderte Tumor-DNA bedingt ist, bei Ihnen dieses möglichst früh erkannt und ggf. entsprechend angepasst behandelt werden.

4. Gibt es Risiken, wenn ich mich für die Teilnahme an der Studie entscheide?

Bei der Teilnahme an dieser Studie besteht kein zusätzliches Risiko. Da Sie mit einem standardisierten Verfahren behandelt werden und im Rahmen dieser Studie lediglich die Daten über die freie Tumor-DNA im Blut dokumentiert werden.

5. Andere Behandlungen während der Studie

Es ist wichtig, dass Sie Ihren Arzt über andere Behandlungen oder Medikamente informieren, die Sie ggf. erhalten. Dazu zählen auch rezeptfreie Medikamente, frei erhältliche Medikamente, Vitamine, pflanzliche Mittel, ergänzende Medikamente, Akupunktur oder andere alternative Heilmittel. Sie müssen Ihren Arzt auch darüber informieren, wenn sich im Laufe der Studienteilnahme irgendetwas in Bezug auf die oben genannten Punkte ändert.

Sobald Sie an der Studie teilnehmen, müssen Sie mit Ihrem Arzt sprechen, bevor Sie neue Medikamente einnehmen.

Ihr Studienarzt wird Ihnen unter Umständen empfehlen, dass unmittelbar vor der Therapie eine Probeentnahme der zu behandelnden Raumforderung durchgeführt wird (Biopsie). Diese Gewebeentnahme dient dazu genaue histologische bzw. zytologische oder laborchemische Analysen durchzuführen (z.B. Genmutationen), um ggf. eine nachfolgende systemische Therapie besser anzupassen zu können.

Falls diese Gewebeprobe erforderlich sein sollte, werden Sie von Ihrem Arzt über Risiken und Nebenwirkungen aufgeklärt. Im Rahmen dieser Studie wird kein zusätzliches

Gewebe entnommen. Es werden lediglich die resultierenden Befundergebnisse der Biopsie gesammelt und dokumentiert. Wir möchten Sie um Ihre Zustimmung bitten, diese Berichte für die Auswertung der Studienergebnisse verwenden zu dürfen.

6. Entstehen für mich Kosten durch die Teilnahme an der klinischen Prüfung?

Durch Ihre Teilnahme an dieser klinischen Prüfung entstehen Ihnen keine zusätzlichen Kosten.

7. Werden mir neue Erkenntnisse während der klinischen Prüfung mitgeteilt?

Sie werden über neue Erkenntnisse, die in Bezug auf diese klinische Prüfung bekannt werden und die für Ihre Bereitschaft zur weiteren Teilnahme wesentlich sein können, informiert. Auf dieser Basis können Sie dann Ihre Entscheidung zur weiteren Teilnahme an dieser klinischen Prüfung überdenken.

8. Kann meine Teilnahme an der klinischen Prüfung vorzeitig beendet werden?

Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Teilnahme beenden, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile bei Ihrer medizinischen Behandlung entstehen.

9. Was geschieht mit meinen Daten?

Die Ergebnisse der Blutuntersuchung vor und nach der Therapie werden nach Abschluss der Prüfung pseudonymisiert 10 Jahre aufbewahrt. Die für die klinische Prüfung wichtigen Daten werden zusätzlich in pseudonymisierter Form gespeichert, ausgewertet und gegebenenfalls weitergegeben.

Pseudonymisiert bedeutet, dass keine Angaben von Namen oder Initialen verwendet werden, sondern nur ein Nummern- und / oder Buchstabencode.

Die Daten sind gegen unbefugten Zugriff gesichert. Eine Entschlüsselung erfolgt nur unter den vom Gesetz vorgeschriebenen Voraussetzungen.

10. An wen wende ich mich bei weiteren Fragen?

Sie haben stets die Gelegenheit zu weiteren Beratungsgesprächen mit den auf Seite 1 genannten Prüfärzten. Vielen Dank, dass Sie sich die Zeit genommen haben, dieses Informationsblatt durchzulesen und (falls Sie sich dafür entscheiden) für Ihre Teilnahme an dieser Studie.

Mit freundlichen Grüßen,

Prof. Dr. med. Ricke

**GATTACA****Einwilligungserklärung**

(Diese Erklärung muss vom Patienten persönlich und von der Person, die das Informationsgespräch zur Einwilligung geführt hat, unterschrieben und datiert werden.)

Ich, der/die Unterzeichnende

..... bestätige hier, dass ich von Herrn/Frau Dr. med.

..... zufriedensstellende Erklärungen zu der genannten Studie und zum Inhalt des beiliegenden Informationsblattes erhalten habe. Ein Informationsblatt wurde mir zeitgerecht übergeben.

Ich hatte Gelegenheit, diese Erklärungen zu besprechen und alle notwendigen Fragen zu stellen, auf die ich zufriedensstellende Antworten erhalten habe. Des Weiteren hatte ich Gelegenheit, Informationen zu Einzelheiten der Studie sowie die Nutzung der Daten für wissenschaftliche Zwecke von einer mir vertrauten Person einzuholen.

Infolgedessen erkläre ich mich freiwillig zur Teilnahme bereit. Ich habe die Bedeutung der Anfrage und die damit verbundenen Risiken und Nutzen verstanden. Ich verstehe, dass ich das Recht habe, jederzeit aus der Studie zurückzutreten.

Unterschrift (Patient) Name in Druckbuchstaben Datum (TT/MM/JJJJ) Uhrzeit (hh:mm)

Unterschrift (Prüfarzt) Name in Druckbuchstaben Datum (TT/MM/JJJJ) Uhrzeit (hh:mm)

(Wenn der Patient nicht lesen oder schreiben kann, muss ein unabhängiger Zeuge, der in keiner Beziehung zum Prüfarzt oder Sponsor steht, während des gesamten Informations-/Einwilligungsgespräches anwesend sein. Der Zeuge/die Zeugin muss die Information und die Einwilligungserklärung persönlich unterschreiben und datieren, nachdem das Formular und andere schriftliche Informationen dem Probanden vorgelesen und erklärt wurden und dieser seine/ihre mündliche Zustimmung zur Teilnahme an der Studie gegeben hat.)

In diesem Fall:

Ich, der/die Unterzeichnende:
bezeuge hiermit, dass Herr/Frau Dr. med. Herr/Frau
..... die Merkmale der oben genannten Studie laut Inhalt des beiliegenden Informationsblattes ausführlich erklärt hat und dass dem oben genannten Probanden Gelegenheit zum Stellen aller von ihm/ihr als notwendig befundenen Fragen eingeräumt wurde und dass er/sie sich freiwillig zur Teilnahme an der Studie bereit erklärt hat.

Datum: Unterschrift des unabhängigen Zeugen:

Datum: Unterschrift des informierenden Arztes.

2. SOP Blutentnahme

Laboratory Requirements: Blutentnahme

- 1.) Entnehmen Sie **2 Blutproben** vom Patienten
(Bitte die Röhren komplett füllen!)

2x Streck Tubes

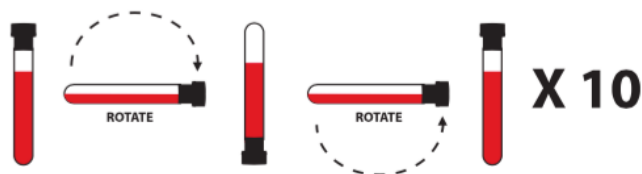


△ Rückfluss vermeiden



Sofort **8- bis 10-mal** durch **Rotieren des Handgelenks um 180°** durchmischen

△ Achtung: Ungenügendes oder verspätetes Mischen kann zu falschen Testergebnissen führen.



- 2.) Wickeln Sie die Röhren in Papier ein.

- 3.) Verstauen Sie diese in der beiliegenden Box.

△ Achtung: Der Inhalt der Röhren ist **bei 6-37°C stabil**, bitte lagern Sie die Box dementsprechend.

- 4.) Senden Sie die Box so schnell wie möglich, spätestens aber innerhalb von 7 Tagen an die aufgedruckte Adresse.

Vielen Dank für Ihre Kooperation!

5. SOP Biopsie



Laboratory Requirements: Blood Draw

1.) Draw blood sample from patient
(2x10 ml blood per patient)

2x Plasma (EDTA tubes)

Δ Within 1 hour



2.) Centrifugation of plasma at **3000 x g** for **10 minutes** (4°C)



3.) Collect the plasma in multiple 1 ml aliquots (use freezing resistant labels)



1 aliquot = 1 cryotube (1 – 2 ml)



4.) Repeat the operation once.

5.) Store all labeled aliquots at -80°C



ΔCaution: It is important to **avoid defreezing** of the samples.

6.) Place „GATTACA-CRF“ label on the respective page of the CRF (e.g. page 7 for day 0)

- Stereotaxie (SBRT)
 - minimal-invasive Chirurgie
 - Andere
- Wenn ja, welche: _____

Blutentnahme vor Ablation für „Liquid Biopsie“ am:

---/---/--- (TT.MM.JJ)



Blutentnahme 1 Tag nach Ablation für „Liquid Biopsie“ am:

---/---/--- (TT.MM.JJ)

nicht erfolgt

⇒ Please note down date & time of the blood draw according to individual patient visiting schedule.

⇒ Documentation CRF: exact timepoint of blood sampling is important.

7.) Place the „GATTACA-Book“ label on the provided „Lab-Book, Blood draw“ and write the patient's name and date of birth.



6. SOP liquid biopsy Handhabung



GATTACA
ProtokollID RAD254

Laboratory Requirements: Biopsy before Ablation

1.) Pre-Biopsy:

- Check for a signed informed consent.
- Be sure to have all labels ready.
- Preparation of adequate devices for shock-freezing of fresh tissue (liquid nitrogen / dry ice).



- Labelling of cryo-tubes:
Place GATTACA-biopsy labels on tubes (preferably 20 min. prior to freezing to prevent the label from falling off)
- Place the GATTACA-Book label on the provided „Lab-Book, Biopsy“ sheet and write the patient's name and date of birth.



2.) Sample available



3.) Give sample to pathology laboratory

4.) Duty medical laboratory scientific officer calls for pathologist and biopsy collection research technician.

5.) Pathologist dissects clinical samples from biopsy and supplies research technician with sample for cryogenic storage.

6.) Freeze sample in liquid nitrogen. Divide material available for research into small pieces roughly 5mm square between several cryotubes

7.) Store all tubes (**prelabeled and precooled on dry ice**) and the frozen sample (placed into a prelabeled and precooled tube) at -80°C



⚠Caution: It is important to **avoid defreezing** of the samples.

8.) Place „GATTACA-CRF“ label on page 2 of the CRF

Zentrum-Nr.: ---	Seite 2
Registrierungs-Log	

Tumorgewebeprobe:

Primärtumorbioptie vom: ---/---/--- Tumorblock-Nr.: _____

Primärtumorresektat vom: ---/---/--- Tumorblock-Nr.: _____

Metastase vom: ---/---/--- Tumorblock-Nr.: _____

Organisystem: _____

Fixierung der Tumorgewebeprobe: Paraffin-eingebettet tiefgefroren



⇒ Write the code of the „GATTACA-CRF“ label by hand on the CRF page to enable copying of the label code to the CRF.

7. Dokumentationsbogen

Genetische Veränderungen im Verlauf der Behandlung eines oligometastatischen kolorektalen Karzinoms (GATTACA)

Dokumentationsbogen (CRF) GATTACA - Studie

Zentrumscode: _____

Pat.-Nr.: _____ - _____

(Erklärung zu Patientenummer:

Vor dem Bindestrich steht der Zentrumscode: M – Magdeburg, L – Leipzig, LMU – München;

Nach dem Bindestrich folgt die fortlaufende Nummerierung der Patienten des jeweiligen Studienzentrums)

Geburtsjahr: 19_____

Aufnahme in die Studie: ____/____/____ (TT/MM/JJ)

(Entspricht Datum der Unterschrift des Informed Consent durch den Patienten.)

Sponsoren: **Universität Magdeburg**
 Universität Leipzig
 Universität München

Studienleitung: **Prof. Dr. med. Jens Ricke (Deutschland)**
 Klinikum der Universität München
 Campus Großhadern
 Marchioninstr. 15
 81377 München

Prof. Dr. med. Florian Lordick (international)
Universitäres Krebszentrum Leipzig (UCCL)
Liebigstraße 20, Haus 4
04103 Leipzig

Studienzentrale: Lokale Studienzentren der beteiligten Universitäten

Einschluss-/Ausschlusskriterien

Patient erfüllt alle folgenden Einschlusskriterien und keine der folgenden Ausschlusskriterien:

ja nein

Einschlusskriterien:

ja **nein**

- | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1. histologisch nachgewiesenes oligometastatisches kolorektales Karzinom (oligometastatischer Status der Krankheit ist wie folgt definiert: bis zu drei involvierte Organsysteme; bis zu drei Metastasen pro Organsystem; Ausnahme Leber: bis zu 10 Metastasen) | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 2. Behandlungsempfehlung für den Patienten durch ein institutionelles multidisziplinäres Tumorboard bestätigt | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 3. Metastasen sind einer kompletten Ablation durch Nutzung verschiedener Techniken (z. B. Radiofrequenzablation, Thermoablation, Brachytherapie, Stereotaxie (SBRT), minimal-invasiver Chirurgie) zugänglich | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 4. Alter \geq 18 Jahre | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 5. Lebenserwartung $>$ 12 Monate | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 6. Vorliegen einer unterschriebenen und datierten Einwilligungserklärung | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

ACHTUNG! Falls eine der oben genannten Fragen mit **NEIN** beantwortet wurde, kann der Patient **NICHT** in die Studie eingeschlossen werden!

Ausschlusskriterien:

ja **nein**

- | | | |
|----------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1. Metastasen in mehr als drei Organsystemen | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 2. Peritoneale oder pleurale Metastasen | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 3. Vorliegen einer Schwangerschaft | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

ACHTUNG! Falls eine der oben genannten Fragen mit **JA** beantwortet wurde, kann der Patient **NICHT** in die Studie eingeschlossen werden!

Pathologie

Tumorgewebeprobe

Primärtumorbiopsie vom: ___/___/___ Tumorblock-Nr.: _____

Primärtumorresektat vom: ___/___/___ Tumorblock-Nr.: _____

Metastase vom: ___/___/___ Tumorblock-Nr.: _____

Organsystem: _____

Fixierung der Tumorgewebeprobe

Paraffin-eingebettet

tiefgefroren

Pathologe: _____

Adresse der Pathologie:

Visite 1 – Teil 1

Pat.-Nr.: _ _ _ - _ _

DEMOGRAPHIE

Geschlecht: männlich weiblich andere

TUMORANAMNESE

Erstdiagnose des kolorektalen Karzinoms am: ____/____(MM/JJJJ)

Lokalisation des Tumors: Kolon Rektum

Spezifizierte Primär-Tumorlokalisierung (nur eine Angabe möglich):

- Zökum
- Colon ascendens
- Colon transversum
- Colon descendens
- Colon sigmoideum
- Rektum
- unbekannt

Initiales Tumorstadium:

- Initial lokalisierter Tumor ohne Fernmetastasen (M0)
 - Nodaler Tumorbefall (N1, N2, N3)
 - Kein nodaler Tumorbefall
- Initial fernmetastasierter Tumor (M1)
- unbekannt

Differenzierungsgrad der Tumorzellen nach WHO:

- G1 (hoch)
- G2 (mittel)
- G3 (gering)
- G4 (undifferenziert)
- unbekannt

Visite 1 – Teil 2

Pat.-Nr.: _ _ _ - _ _

Erstdiagnose von Metastasen am: ____/____ (MM/JJJJ)

nicht bekannt

Lokalisation der Fernmetastasen (mehrere Angaben möglich)

- Lymphknoten
Lokalisation: _____
- Leber
Segment unbekannt
 I II III IVa IVb V VI VII VIII
- Lunge
 rechts links
 OL ML UL OL UL
 unbekannt
- Rippenfell (Pleura; Ausschlusskriterium!)
- Bauchfell (Peritoneum; Ausschlusskriterium!)
- Gehirn/Zentrales Nervensystem
- Knochen
- Haut/Weichgewebe
- Andere Organe wenn ja, welche: _____

Visite 1 – Teil 3

Pat.-Nr.: _ _ _ - _ _

MUTATIONSSTATUS

Bestimmung des **KRAS-Status** am: ___/___/___ (TT/MM/JJ)
Ergebnis: negativ positiv

Wenn positiv,

- | | |
|----------------------------------------|----------------------------------------|
| <input type="radio"/> Exon 2 Codon 12 | <input type="radio"/> Exon 2 Codon 13 |
| <input type="radio"/> Exon 3 Codon 59 | <input type="radio"/> Exon 2 Codon 61 |
| <input type="radio"/> Exon 4 Codon 117 | <input type="radio"/> Exon 4 Codon 146 |
| <input type="radio"/> nicht bestimmt | |

Bestimmung des **NRAS-Status** am: ___/___/___ (TT/MM/JJ)
Ergebnis: negativ positiv

Wenn positiv,

- | | |
|----------------------------------------|----------------------------------------|
| <input type="radio"/> Exon 2 Codon 12 | <input type="radio"/> Exon 2 Codon 13 |
| <input type="radio"/> Exon 3 Codon 59 | <input type="radio"/> Exon 2 Codon 61 |
| <input type="radio"/> Exon 4 Codon 117 | <input type="radio"/> Exon 4 Codon 146 |
| <input type="radio"/> nicht bestimmt | |

Bestimmung des **BRAF-Status** am: ___/___/___ (TT/MM/JJ)
Ergebnis: negativ positiv

Wenn positiv, Exon und Position: _____

- nicht bestimmt

Bestimmung des **PIK3CA-Status** am: ___/___/___ (TT/MM/JJ)
Ergebnis: negativ positiv

Wenn positiv, Exon und Position: _____

- nicht bestimmt

Bestimmung des **TP53-Status** am: ___/___/___ (TT/MM/JJ)
Ergebnis: negativ positiv

Wenn positiv, Exon und Position: _____

- nicht bestimmt

Visite 1 – Teil 4

Pat.-Nr.: _ _ _ - _ _

PRIMÄRTUMORBEHANDLUNG

- Operation durchgeführt: Nein
 wenn ja, am ____/____ (MM/JJJJ)
- R0-Resektion? Nein Ja

- Chemotherapie durchgeführt? Nein wenn ja,
 Neoadjuvante Chemotherapie nicht durchgeführt
 von – bis: ____/____ (MM/JJJJ) - ____/____ (MM/JJJJ)
 Abbruchgrund: Progress, Toxizität, anderer

Mit folgenden Substanzen:

- | | |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 5-Fluorouracil | <input type="checkbox"/> Bevacizumab |
| <input type="checkbox"/> Capecitabin | <input type="checkbox"/> Cetuximab |
| <input type="checkbox"/> Irinotecan | <input type="checkbox"/> Panitumumab |
| <input type="checkbox"/> Oxaliplatin | <input type="radio"/> unbekannt |
| <input type="checkbox"/> Andere Wenn ja, welche: _____ | |

- Adjuvante Chemotherapie** nicht durchgeführt
 von – bis: ____/____ (MM/JJJJ) - ____/____ (MM/JJJJ)
 FOLFOX/XELOX 5-FU/Capecitabin mono
 Andere: _____

- 1. Therapielinie** nicht durchgeführt
 von – bis: ____/____ (MM/JJJJ) - ____/____ (MM/JJJJ)
 Abbruchgrund: Progress, Toxizität, anderer

Mit folgenden Substanzen:

- | | |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 5-Fluorouracil | <input type="checkbox"/> Bevacizumab |
| <input type="checkbox"/> Capecitabin | <input type="checkbox"/> Cetuximab |
| <input type="checkbox"/> Irinotecan | <input type="checkbox"/> Panitumumab |
| <input type="checkbox"/> Oxaliplatin | <input type="radio"/> unbekannt |
| <input type="checkbox"/> Andere Wenn ja, welche: _____ | |

Visite 1 – Teil 4

Pat.-Nr.: _ _ _ - _ _ _

- 2. Therapielinie** nicht durchgeführt
 von – bis: ____/____ (MM/JJJJ) - ____/____ (MM/JJJJ)
 Abbruchgrund: Progress, Toxizität, anderer

Mit folgenden Substanzen:

- | | |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 5-Fluorouracil | <input type="checkbox"/> Bevacizumab |
| <input type="checkbox"/> Capecitabin | <input type="checkbox"/> Cetuximab |
| <input type="checkbox"/> Irinotecan | <input type="checkbox"/> Panitumumab |
| <input type="checkbox"/> Oxaliplatin | <input type="radio"/> unbekannt |
| <input type="checkbox"/> Andere Wenn ja, welche: _____ | |

- 3. Therapielinie** nicht durchgeführt
 von – bis: ____/____ (MM/JJJJ) - ____/____ (MM/JJJJ)
 Abbruchgrund: Progress, Toxizität, anderer

Mit folgenden Substanzen:

- | | |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 5-Fluorouracil | <input type="checkbox"/> Bevacizumab |
| <input type="checkbox"/> Capecitabin | <input type="checkbox"/> Cetuximab |
| <input type="checkbox"/> Irinotecan | <input type="checkbox"/> Panitumumab |
| <input type="checkbox"/> Oxaliplatin | <input type="radio"/> unbekannt |
| <input type="checkbox"/> Andere Wenn ja, welche: _____ | |

- Strahlentherapie (Rektum)** nicht durchgeführt
 von – bis: ____/____ (MM/JJJJ) - ____/____ (MM/JJJJ)
 präoperativ postoperativ
 unbekannt

Visite 1 – Teil 5

Pat.-Nr.: _ _ _ - _ _

ABLATIVES VERFAHREN FÜR DIE METASTASIERTE ERKANKUNG

	Datum: ____/____/____ (TT/MM/JJJJ)		Barcode Biopsie <input type="checkbox"/> Biopsie nicht er- folgt	
Organ	<input type="checkbox"/> Leber		<input type="checkbox"/> Lunge	
	Segment <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IVa <input type="checkbox"/> IVb <input type="checkbox"/> V <input type="checkbox"/> VI <input type="checkbox"/> VII <input type="checkbox"/> VIII		<input type="checkbox"/> Rechts <input type="checkbox"/> OL <input type="checkbox"/> ML <input type="checkbox"/> UL <input type="checkbox"/> Links <input type="checkbox"/> OL <input type="checkbox"/> UL	
			<input type="checkbox"/> Lymphknoten	<input type="checkbox"/> Andere
	Lokalisation:			
Ablation	<input type="checkbox"/> RFA <input type="checkbox"/> AL <input type="checkbox"/> MWA <input type="checkbox"/> SBRT <input type="checkbox"/> Chirurgie <input type="checkbox"/> andere: _____			

Besonderheiten/Komplikationen: _____

Blutentnahme **vor** Ablation für „Liquid Biopsie“ am:

Barcode Blut -1d

____/____/____ (TT/MM/JJJJ)

nicht erfolgt

Blutentnahme **1 Tag** nach Ablation für „Liquid Biopsie“ am:

Barcode Blut +1d

____/____/____ (TT/MM/JJJJ)

nicht erfolgt

Datum: ____/____/____ (TT/MM/JJJJ)

Name des Prüfers

Unterschrift des Prüfers

Visite 2 **nach 8 Tagen**

Pat.-Nr.: _ _ _ - _ _

Blutentnahme für „Liquid Biopsie“ am: ___/___/___ (TT/MM/JJJJ)

 nicht erfolgt**Barcode Blut +8d**

Datum: ___/___/___ (TT/MM/JJJJ)

Name des Prüfers_____
Unterschrift des Prüfers

Visite ___ – Teil 1 nach ___ Wochen nach Einschluss (entsprechend ___ Wochen nach letzter Intervention)

Pat.-Nr.: ___ - ___ - ___

ÜBERLEBENSSTATUS:

Patient lebt Ja

wenn nein, Todesdatum: ___/___/___ (TT/MM/JJJJ)

Grund des Todes: krebsbedingt nicht krebsbedingt

unbekannt

Patient zuletzt lebend gesehen am: ___/___/___ (TT/MM/JJJJ)

BESTES DOKUMENTIERTES TUMORANSPRECHEN:

CR = komplette Remission

PR = partielle Remission

SD = stabile Erkrankung

PD = progressiv Disease

ND = nicht bestimmt

Lokalrezidiv

Blutentnahme für „Liquid Biopsie“ am: ___/___/___ (TT/MM/JJJJ)

nicht erfolgt

Barcode Blut

Falls Rezidiv, oligometastatisch polymetastatisch

Lokalisation der Fernmetastasen (mehrere Angaben möglich)

Lymphknoten Lokalisation: _____

Leber

Segment I II III IVa IVb V VI

VII VIII

Lunge

rechts

links

OL

ML

UL

OL

UL

Rippenfell (Pleura; Ausschlusskriterium!)

Bauchfell (Peritoneum; Ausschlusskriterium!)

Gehirn/Zentrales Nervensystem

Knochen

Haut/Weichgewebe

Andere Organe wenn ja, welche: _____

Visite __ – Teil 2 nach __ __ Wochen nach Einschluss
(entsprechend __ __ Wochen nach letzter Intervention)

Pat.-Nr.: __ __ __ - __ __

Wenn polymetastatisch, Chemotherapie eingeleitet?

- nein
- wenn ja, am ____/____/____ (TT/MM/JJJJ)

Mit folgenden Substanzen:

- | | |
|-----------------------------------------|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 5-Fluorouracil | <input type="checkbox"/> Bevacizumab |
| <input type="checkbox"/> Capecitabin | <input type="checkbox"/> Cetuximab |
| <input type="checkbox"/> Irinotecan | <input type="checkbox"/> Panitumumab |
| <input type="checkbox"/> Oxaliplatin | <input type="radio"/> unbekannt |
- Andere Wenn ja, welche: _____

Wenn oligometastatisch, Ablation geplant?

- nein ja

Teil 1 Re-Intervention nach ___ Wochen nach Einschluss (entsprechend ___ Wochen nach letzter Intervention)

Pat.-Nr.: _ _ _ - _ _

ABLATIVES VERFAHREN FÜR DIE METASTASIERTE ERKANKUNG

	Datum: ___/___/___ (TT/MM/JJJJ)		Barcode Biopsie <input type="checkbox"/> Biopsie nicht erfolgt	
Organ	<input type="checkbox"/> Leber	<input type="checkbox"/> Lunge	<input type="checkbox"/> Lymphknoten	<input type="checkbox"/> Andere
	Segment <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IVa <input type="checkbox"/> IVb <input type="checkbox"/> V <input type="checkbox"/> VI <input type="checkbox"/> VII <input type="checkbox"/> VIII	<input type="checkbox"/> Rechts <input type="checkbox"/> OL <input type="checkbox"/> ML <input type="checkbox"/> UL <input type="checkbox"/> Links <input type="checkbox"/> OL <input type="checkbox"/> UL	Lokalisation:	
Ablation	<input type="checkbox"/> RFA <input type="checkbox"/> AL <input type="checkbox"/> MWA <input type="checkbox"/> SBRT <input type="checkbox"/> Chirurgie <input type="checkbox"/> andere: _____			

Besonderheiten/Komplikationen: _____

Blutentnahme **vor** Ablation für „Liquid Biopsie“ am:

Barcode Blut -1d

___/___/___ (TT/MM/JJJJ)
 nicht erfolgt

Blutentnahme **1 Tag** nach Ablation für „Liquid Biopsie“ am:

Barcode Blut +1d

___/___/___ (TT/MM/JJJJ)
 nicht erfolgt

Datum: ___/___/___ (TT/MM/JJJJ)

Name des Prüfers

Unterschrift des Prüfers

Teil 3 nach **Wochen + 8 Tagen nach Einschluss**
(entsprechend Wochen nach letzter Intervention)Pat.-Nr.: -

Blutentnahme für „Liquid Biopsie“ am:

 / / (TT/MM/JJJJ) nicht erfolgt**Barcode Blut Re-
Intervention +8d**

Datum: _____

Name des Prüfers_____
Unterschrift des Prüfers

8 Notebook für die Sequenzierung

Library preparation

The recommended input amount for cfDNA for the *Oncomine Pan-Cancer Cell Free Assay* is 20ng. This would enable the detection of rare variants present at 0.1% frequency. More explicit it represents detection of one variant containing DNA template in the background of 999 DNA templates with wild type reference sequence. For best results I will use as much cfDNA (up to 50ng) as I got from the cell free blood fraction.

Samples

Plasma

After defreezing the samples nearly all had some solid white stuff in them:



It could be denatured plasma proteins from freezing or residuals of the buffy coat, caused by careless removal of plasma from the blood tube. Anyhow I did try to to exclude it by centrifuging the samples before using the clear liquid. The amount of plasma was around 2 ml per case. 1-1.5ml per Tube, which is not ideal usually one would expect around 4ml. The purification of cfDNA was done by using the QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Cat. No 55114).

Procedure for 4ml Plasma

1. Pipet 400 μ l QIAGEN Proteinase K into a 50ml centrifuge tube.
2. Add 4ml of plasma to the 50ml tube.
3. Add 3.2ml Buffer ACL (containing 1.0 μ g carrier RNA ; 5 μ l from Aliquots).
Close the cap and mix by pulse-vortexing for 30sec.
4. Incubate at 60°C for 30mins in water bath.
5. Place the tube back on the lab bench and unscrew the cap.
6. Add 7.2ml Buffer ACB to the lysate in the tube. Close the cap and mix thoroughly by pulse-vortexing for 30sec.
7. Incubate the lysate-buffer ACB mixture in the tube for 5min on ice.
8. Insert the QIAamp Mini column into the VacConnector on the QIAvac 24 Plus. Insert a 20ml tube extender into the open QIAamp Mini column.

9. Carefully apply the lysate-buffer ACB mixture from step 7 into the tube extender of the QIAamp Mini column. Switch on the vacuum pump. When all lysates have been drawn through the columns completely, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0mbar. Carefully remove and discard the tube extender.
10. Apply 600µl Buffer ACW1 to the QIAamp Mini column. Leave the Lid of the column open, and switch on the vacuum pump. After all of the Buffer ACW1 has been drawn through the QIAamp Mini column, switch the vacuum pump off and release the pressure to 0mbar.
11. Apply 750µl Buffer ACW2 to the QIAamp Mini column. Leave the lid of the column open, and switch on the vacuum pump. After all of Buffer ACW2 has been drawn through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar.
12. Apply 750µl of ethanol (96%-100%) to the QIAamp Mini column. Leave the lid of the column open, and switch on the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar.
13. Close the lid of the QIAamp Mini column. Remove it from the vacuum manifold. Place the QIAamp Mini column in a clean 2ml collection tube, and centrifuge at full speed 20000x g for 3 minutes.
14. Place the QIAamp Mini column into a new 2ml collection tube. Open the lid, and incubate the assembly at 56°C for 10 minutes to dry the membrane completely.
15. Place the QIAamp Mini column in a clean 1.5ml lowDNAbind Elution tube and discard the 2ml collection tube from step 14. Carefully apply 30µl of Buffer AVE to the center of the QIAamp Mini membrane. Close the lid and incubate at room temperature for 3 minutes.
16. Centrifuge in a microcentrifuge at full speed 20000x g for 1 min to elute the nucleic acids.

Biopsy

The biopsy samples:



There was unrecoverable red stuff in the screw threads and some solid stuff in the tubes which looked like from a needle aspiration biopsy. I did use a QIAamp DNA Mini Kit (Cat.No 51304) to extract the genomic DNA by using the standard protocol which came with the Kit.

Qubit quantification with HS DNA Kit

Reverse transcribe cell-free total nucleic acid

1. For each sample, add the following components into a single 0.2ml PCR tube (stripe) on ice or in pre-chilled 4°C cold block.

Component Volume

Superscript VILO Master Mix 2.6µl

Cell-free total nucleic acid (50ng) <=10.4µl

Nuclease-free Water to 13µl

Component Volume**Total volume per well 13µl**

```

In [1]: 1 import pandas as pd
        2 import numpy as np
        3
        4 libprep = pd.read_csv('GATTACA_newSamples.csv')
        5
        6 # add columns with calculations
        7 libprep.set_index('NGS-ID', inplace=True)
        8 libprep['cfDNA volume'] = (50 / libprep['cfDNA']).round(2)
        9 libprep['VILO Mix'] = 2.6
       10 libprep.loc[libprep['cfDNA volume'] > 10.4, 'cfDNA volume'] = 10.4 # if volume over max possible set to possible
       11 libprep['Water'] = (13 - (libprep['VILO Mix'] + libprep['cfDNA volume'])).round(2)
       12 libprep['DNA library input'] = (libprep['cfDNA'] * libprep['cfDNA volume']).round(2)
       13 libprep

```

Out[1]:**NGS-ID Pat.ID barcode material entry date cfDNA cfDNA volume VILO Mix Water DNA library input**

```

1 LMU-001 LMU-JR003561 Plasma 04.12.2017 4.720 10.40 2.6 0.00 49.09
2 LMU-012 LMU-JR000985 Plasma 16.08.2018 0.638 10.40 2.6 0.00 6.64
3 LMU-014 LMU-JR000005 Plasma 06.11.2018 1.020 10.40 2.6 0.00 10.61
4 LMU-020 LMU-JR000910 Plasma 01.04.2019 8.420 5.94 2.6 4.46 50.01
5 LMU-024 LMU-JR000542 Plasma 04.07.2019 0.920 10.40 2.6 0.00 9.57
6 LMU-028 LMU-JR002127 Plasma 01.08.2019 0.760 10.40 2.6 0.00 7.90
7 LMU-001 LMU-JR003573 Plasma 08.12.2017 1.300 10.40 2.6 0.00 13.52
8 LMU-012 LMU-JR000980 Plasma 18.08.2018 1.510 10.40 2.6 0.00 15.70
9 LMU-014 LMU-JR000843 Plasma 09.11.2018 0.580 10.40 2.6 0.00 6.03
10 LMU-020 LMU-JR000736 Plasma 03.04.2019 11.500 4.35 2.6 6.05 50.02
11 LMU-028 LMU-JR002130 Plasma 05.08.2019 1.010 10.40 2.6 0.00 10.50
12 LMU-001 LMU-JR003665 Plasma 14.12.2017 1.670 10.40 2.6 0.00 17.37
13 LMU-012 LMU-JR000978 Plasma 23.08.2018 0.958 10.40 2.6 0.00 9.96
14 LMU-014 LMU-JR000851 Plasma 16.11.2018 0.440 10.40 2.6 0.00 4.58
15 LMU-024 LMU-JR002027 Plasma 10.07.2019 0.356 10.40 2.6 0.00 3.70
16 LMU-028 LMU-JR002156 Plasma 12.08.2019 0.938 10.40 2.6 0.00 9.76
17 LMU-012 LMU-JR000973 Plasma 27.08.2018 0.758 10.40 2.6 0.00 7.88
18 LMU-014 LMU-JR002021 Plasma 14.07.2019 0.346 10.40 2.6 0.00 3.60

```

NGS-ID Pat.ID barcode material entry date cfDNA cfDNA volume VILO Mix Water DNA library input

```

19 LMU-020 LMU-JR000678 Plasma 15.04.2019 0.518 10.40 2.6 0.00 5.39
20 LMU-012 LMU-JR000924 Plasma 29.08.2018 2.600 10.40 2.6 0.00 27.04
21 LMU-020 LMU-JR000675 Plasma 17.04.2019 3.420 10.40 2.6 0.00 35.57
22 LMU-012 LMU-JR000961 Plasma 04.09.2018 0.960 10.40 2.6 0.00 9.98
23 LMU-020 LMU-JR000684 Plasma 29.04.2019 3.860 10.40 2.6 0.00 40.14
24 LMU-012 LMU-JR000795 Plasma 15.01.2019 2.080 10.40 2.6 0.00 21.63
25 LMU-012 LMU-JR000791 Plasma 17.01.2019 1.840 10.40 2.6 0.00 19.14
26 LMU-014 LMU-JR000215 Plasma 19.07.2019 0.174 10.40 2.6 0.00 1.81
27 LMU-012 LMU-JR000786 Plasma 22.01.2019 3.020 10.40 2.6 0.00 31.41
28 LMU-024 LMU-JR002031 Plasma 05.07.2019 0.200 10.40 2.6 0.00 2.08
29 LMU-001 LMU-JR003516 Biopsie 07.12.2017 22.200 2.25 2.6 8.15 49.95
30 LMU-012 LMU-JR000984 Biopsie 17.08.2018 8.760 5.71 2.6 4.69 50.02
31 LMU-020 LMU-JR000738 Biopsie 02.04.2019 25.600 1.95 2.6 8.45 49.92
32 LMU-024 LMU-JR002034 Biopsie 04.07.2019 75.800 0.66 2.6 9.74 50.03
33 LMU-028 LMU-JR002001 Biopsie 02.08.2019 23.000 2.17 2.6 8.23 49.91
34 LMU-001 LMU-JR003648 Biopsie 06.02.2018 17.500 2.86 2.6 7.54 50.05
35 LMU-012 LMU-JR000930 Biopsie 28.08.2018 29.200 1.71 2.6 8.69 49.93
36 LMU-020 LMU-JR000676 Biopsie 16.04.2019 13.300 3.76 2.6 6.64 50.01
37 LMU-012 LMU-JR000794 Biopsie 16.01.2019 28.200 1.77 2.6 8.63 49.91
38 LMU-014 LMU-JR002014 Biopsie 18.07.2019 21.800 2.29 2.6 8.11 49.92
39 LMU-001 LMU-JR003516 Biopsie 07.12.2017 91.600 0.55 2.6 9.85 50.38
40 LMU-014 LMU-JR002133 Plasma 24.08.2019 0.380 10.40 2.6 0.00 3.95
41 LMU-014 LMU-JR002116 Plasma 12.09.2019 1.330 10.40 2.6 0.00 13.83
42 LMU-001 LMU-JR003662 Plasma 05.02.2018 5.200 9.62 2.6 0.78 50.02
43 LMU-012 LMU-JR000838 Plasma 28.11.2018 0.940 10.40 2.6 0.00 9.78
44 LMU-014 LMU-JR000750 Plasma 04.03.2019 1.080 10.40 2.6 0.00 11.23
45 LMU-020 LMU-JR002024 Plasma 15.07.2019 0.350 10.40 2.6 0.00 3.64
46 LMU-024 LMU-JR002139 Plasma 09.10.2019 0.410 10.40 2.6 0.00 4.26

```

NGS-ID Pat.ID barcode material entry date cfDNA cfDNA volume VILO Mix Water DNA library input

```

47 LMU-012 LMU-JR000221 Plasma 16.04.2019 0.250 10.40 2.6 0.00 2.60
48 LMU-014 LMU-JR000607 Plasma 05.06.2019 0.010 10.40 2.6 0.00 0.10
49 LMU-020 LMU-JR000554 Plasma 23.09.2019 0.540 10.40 2.6 0.00 5.62
50 LMU-012 LMU-JR000577 Plasma 25.06.2019 3.940 10.40 2.6 0.00 40.98

```

```
In [2]: 1 #how many samples do not reach the recommended 20ng input
        2 below20 = libprep.loc[libprep['DNA library input'] < 20, 'Pat.ID'].count()
        3 print(f"There are {below20} samples below the recommended 20ng out of the " \
        4       + str(libprep['DNA library input'].count()) + " samples.")
```

There are 29 samples below the recommended 20ng out of the 50 samples.

2. After pipetting everything together, vortex thoroughly, then centrifuge briefly to collect droplets.
3. Load the plate in the thermal cycler, then run the following program to synthesize cDNA.

Temperature Time

42°C 30 minutes
85°C 5 minutes
10°C Indefinite

STOPPING POINT Store at -20°C for longer periods

4. Centrifuge the stripe briefly to collect any droplets at the bottom of the tubes, then proceed to the next step.

Amplify targets

1. Thaw the following components on ice:

cfDNA Library PCR Master Mix

Oncomine Pan-Cancer Cell-Free Panel

IMPORTANT! Confirm both components thaw completely with no visible ice remaining. Vortex to mix, then centrifuge briefly to collect the contents before pipetting the required volumes.

2. Set up the target amplification reaction by adding the following components in the order listed to each sample tube:

Component Volumen

Cell-free total nucleic acid reverse transcription products 13µl

Oncomine Pan-Cancer Cell-Free Panel 2µl

cfDNA Library PCR Master Mix 15µl

Total volume 30µl

Note! Add cfDNA Library PCR Master Mix last to minimize the time the reaction mixture is at room temperature, or set up the PCR reaction on ice or in a pre-chilled (4°C) cold block.

3. Vortex to mix, then centrifuge briefly to collect contents.
4. Pre-heat a Thermal Cycler to 90°C.

IMPORTANT! Failure to pre-heat the thermal cycler to 90°C may lead to the formation of unwanted amplification byproducts.

5. Load the plate into the pre-heated PCR-Machine, then run the following program:

Stage Temperature Time

Hold 98°C 1 minute

2 Cycles 98°C 15 seconds

. 64°C 2 minutes

. 62°C 2 minutes

. 60°C 4 minutes

. 58°C 2 minutes

. 72°C 30 seconds

Hold 72°C 2 minutes

Hold 4°C up to 1 hour

STOPPING POINT PCR products may be stored at 4°C for up to one hour

Purify the target amplicons

IMPORTANT!

If performing this procedure in a hood with high air flow, turn off the ventilation to avoid excessive ethanol evaporation during bead clean-up.

Incubate the AMPure XP Reagent at room temperature for at least 30 minutes, then vortex thoroughly to disperse the beads before use. Pipet the solution slowly.

1. Briefly centrifuge the stripe to collect the contents.
2. Add 45µl (1.5x sample volume) of Agencourt AMPure XP Reagent to each sample.
3. Vortex for 15 seconds, then incubate at room temperature for 5 minutes.

IMPORTANT! Thorough mixing of the beads with samples is very important. After vortexing check that the contents of each well is homogeneous in color.

4. Repeat Step 3, then centrifuge briefly to collect contents. **Note:** Total incubation time, with repeating the step, ~10 minutes.

Do not centrifuge the beads too fast, because this can damage the beads.

5. Place the stripe in the magnetic stand, incubate for 5 minutes or until the solution clears, then remove the supernatant without disturbing the pellet.

6. Wash the magnetic beads with freshly prepared 80% ethanol.

A. Add 150µl of 80% ethanol to each sample.

B. Incubate at room temperature for 30 seconds until the solution clears, then remove and discard the supernatant without disturbing the pellet.

NOTE: Do not disturb the pellet or move the stripe side-to-side between positions on the magnet during the wash steps.

7. Repeat step 6.

8. Keeping the stripe in the magnetic stand, use a smaller pipette to remove any remaining ethanol, then air-dry the beads at room temperature for 5 minutes.

9. Add 24µl of Low TE buffer to the pellet, vortex thoroughly to disperse the beads, then incubate at room temperature for 5 minutes.

10. Transfer the stripe to the magnetic stand, incubate for at least 2 minutes, then transfer 23µl of the supernatant to a new stripe.

IMPORTANT! PCR amplification can be inhibited by small amounts of carry-over beads. Remove any beads before proceeding to the second round of PCR. If you

see beads in the pipette tip containing supernatant, slowly pipet the supernatant and beads back into their respective well on the side of the tube next to the magnet

so that the beads pass over the magnet. Then repeat step 10, repelleting the beads for an additional 1 minute.

Amplify the target amplicons with barcode adapted primers

1. Thaw the following components on ice:

cfDNA Library PCR Master Mix

cfDNA Library Primer P1

Tag Sequencing Barcodes

Note: Tag Sequencing barcodes are required. This library method is not compatible with other library barcoding kits.

2. Set up the second round of PCR with the plate still on the magnetic stand. Add the following components to each 23µl sample:

Component Volume

DNA from step 15 in the previous procedure 23µl

Tag Sequencing BC(#1-24) 1µl

cfDNA Library Primer P1 1µl

cfDNA Library PCR Master Mix 25µl

Total volume 50µl

Note: cfDNA Library PCR Master Mix should be added last to minimize the amount of time the reaction mixture is held at room temperature.

3. Vortex thoroughly to mix, then centrifuge briefly to collect the contents.

4. Pre-heat a Thermal Cycler to 90°C, and then load the stripe in the PCR machine and run the following program:

Stage Temperature Time

Hold 98°C 1 minute

18 cycles 98°C 15 seconds

. 98°C 15 seconds

. 64°C 15 seconds

. 72°C 15 seconds

Hold 72°C 5 minutes

Hold 4°C Indefinite

STOPPING POINT PCR products can be stored overnight at 4°C. For longer term, store at -20°C hour.

Purify the barcoded library

IMPORTANT!

If performing this procedure in a hood with high air flow, turn off the ventilation to avoid excessive ethanol evaporation during bead clean-up.

Incubate the AMPure XP Reagent at room temperature for at least 30 minutes, then vortex thoroughly to disperse the beads before use. Pipet the solution slowly.

1. Briefly centrifuge the PCR stripe to collect the contents.

2. Use a 100µl pipette to measure the reaction volume in each tube. If the volume is <50µl, add nuclease-free water to bring the volume in each well to 50µl.

3. Add 57.5µl (1.15x sample volume) of Agencourt AMPure XP Reagent to each sample.

4. Vortex for 15 seconds, then incubate at room temperature for 5 minutes.

5. Transfer the stripe to the magnetic stand, incubate for 5 minutes or until the solution clears, then remove and discard the supernatant without disturbing the pellet.

6. Wash the magnetic beads with freshly prepared 80% ethanol.

Add 150µl 80% ethanol to each sample.

Incubate at room temperature for 30 seconds until solution clears, then remove and discard the supernatant without disturbing the pellet.

Note: Do not disturb the pellet or move the stripe side-to-side between positions on the magnet during the wash steps.

7. Repeat step 7.

8. Keeping the stripe in the magnetic stand, use a smaller pipette (10µl) to remove any remaining ethanol, then air-dry the beads at room temperature for 5 minutes.

9. Add 50µl of Low TE buffer to the pellet.

10. Vortex thoroughly to disperse the beads, incubate at room temperature for 5 minutes.

11. Transfer the stripe to the magnetic stand and incubate for at least 2 minutes, then transfer 50µl of the supernatant to new stripes.

Note: Occasionally, carry-over of small amount of beads occurs. This does not inhibit the procedures that follow.

Size select the barcoded library

1. Add 50µl (1.0x sample volume) of Agencourt AMPure XP Reagent to each sample.

2. Vortex to disperse the beads, then incubate at room temperature for 5 minutes.

3. Place the stripe in the magnetic stand, incubate for 5 minutes or until the solution clears, then remove and discard the supernatant without disturbing the pellet.

4. Wash the magnetic beads with freshly prepared 80% ethanol.

Add 150µl 80% ethanol to each sample.

Incubate at room temperature for 30 seconds until the solution clears, then remove and discard the supernatant without disturbing the pellet.

Note: Do not disturb the pellet or move the stripe side-to-side between positions on the magnet during the wash steps.

5. Repeat step 4.

6. Keeping the stripe in the magnetic stand, use a smaller pipette (10µl) to remove any remaining ethanol, then air-dry the beads at room temperature for 5 minutes.

7. Add 30µl of Low TE buffer to the pellet, mix to disperse the beads, then incubate at room temperature for 5 minutes.

8. Transfer the plate to the magnetic stand for at least 2 minutes, then transfer 28µl of the supernatant to new PCR tubes.

Note: Transfer a slightly smaller volume to avoid carry-over during this step. Keep the final library on ice (or store at -20°C) during set-up for "Quantify the library by qPCR".

Quantify the library by qPCR

Determine the concentration of each Oncomine™ cfDNA library by qPCR with the Ion Library TaqMan Quantification Kit ([Link to official description of Kit](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4468802) (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4468802>)). The standards and no template control (NTC) are analyzed in triplicate reactions, the samples as duplicates in a 1:1000 dilution.

1. Prepare five 10-fold serial dilutions of the E.coli DH10B Ion Control Library (~68pM; from the Ion Library TaqMan® Quantification Kit) at 6.8pM, 0.68pM, 0.068pM, 0.0068pM, and 0.00068pM.

```
In [3]: 1 # the standard of 6.8 pM is diluted in a 10 fold series (1,10,100,1000)
        2 # create a list of the dilutions
        3 conc_pM = [round(6.8 / 10 ** n,6) for n in range(5)] # rounds to 6 digits
        4 conc_pM
```

```
Out[3]: [6.8, 0.68, 0.068, 0.0068, 0.00068]
```

```
In [4]: 1 import numpy as np
        2
        3 conc_ln = np.log(conc_pM) #log values of the concentrations in an numpy array
        4 conc_ln
```

```
Out[4]: array([ 1.91692261, -0.38566248, -2.68824757, -4.99083267, -7.29341776])
```

2. Mark the five dilutions as standards (1-5), then use these concentrations in the qPCR instrument software.
3. Dilute each sample library as follows:
 - A. Make a 1:100 dilution by combining 2µl library with 198µl nuclease-free water, vortex to mix, then centrifuge briefly to collect the contents.
 - B. Add 3µl of the 1:100 diluted library to 27µl nuclease-free water to make a 1:1000 dilution, vortex to mix, then centrifuge briefly to collect the contents.
4. Calculate, then prepare the required volume of PCR master mix for duplicate reactions of each library sample and triplicates for standard and NTC using the following table. Include a 5-10% overage to accommodate pipetting errors.

Component Volume per reaction 96-well plate

2X TaqMan®Master Mix 10µl

20X Ion TaqMan®Assay 1µl

Total 11µ**Calculate Master Mix and create Pipetting shema**

For the the 50 new GATTACA Samples two 96 well plates are necessary for quantification of libraries. The sample names will start from GATTACA_25, because the Samples 1-24 are already in the Ion Reporter System Database from last year. The first 96-well plate will collect the first 39 new samples and the second plate all the rest. In the code below I do use "_32" for variables, this is because I thought at first there are only 32 samples and then I did not wanted to go through and change everything.

```
In [5]: 1 # calculate master mix for first plate
2 from itertools import repeat
3 qPCR_Samples_32 = [("GATTACA_" + str(x + 24)) for x in libprep.index if x <= 39 for x in repeat(x, 2)]
4 standards = ['Std1', 'Std2','Std3','Std4', 'Std5','NTC']
5 plate_standards = [x for x in standards for x in repeat(x, 3)]
6 std_plus_Samples_32 = pd.Series(plate_standards + qPCR_Samples_32)
7 std_plus_Samples_10percent_more = round((len(std_plus_Samples_32) * 10) * 1.1)
8 print("Mix " + str(std_plus_Samples_10percent_more) + "µl 2XTaqManMasterMix and " \
9       + str(std_plus_Samples_10percent_more / 10) + "µl 20XIonTaqManAssay")
```

Mix 1056µl 2XTaqManMasterMix and 105.6µl 20XIonTaqManAssay

```
In [6]: 1 # calculate master mix for second plate
2 from itertools import repeat
3 qPCR_Samples_rest = [("GATTACA_" + str(x + 24)) for x in libprep.index if x > 39 for x in repeat(x, 2)]
4 standards = ['Std1', 'Std2','Std3','Std4', 'Std5','NTC']
5 plate_standards = [x for x in standards for x in repeat(x, 3)]
6 std_plus_Samples_rest = pd.Series(plate_standards + qPCR_Samples_rest)
7 std_plus_Samples_10percent_more = round((len(std_plus_Samples_rest) * 10) * 1.1)
8 print("Mix " + str(std_plus_Samples_10percent_more) + "µl 2XTaqManMasterMix and " \
9       + str(std_plus_Samples_10percent_more / 10) + "µl 20XIonTaqManAssay")
```

Mix 440µl 2XTaqManMasterMix and 44.0µl 20XIonTaqManAssay

5. In an Optical 96-well Fast PCR plate, set up the PCR for each sample, standard, and NTC by adding the following components:

Component Volume per reaction 96-well plate

PCR Master Mix 11µl

1:1000 dilution of the sample 9µl

Create a table in a 96-well format as pipetting shema

```
In [7]: 1 # create a printable pipetting shema for 96-well plate format of first plate
2 shema = pd.read_csv('wellplate.csv') # read template in
3 shema_qPCR = pd.DataFrame(shema[['column', 'row']])
4 shema_qPCR['Samples'] = std_plus_Samples_32 # add the column with the samples
5 plate_shema_32 = shema_qPCR.pivot("column", "row", "Samples")
6 plate_shema_32.index.name = None
7 plate_shema_32.columns.name = None
8 plate_shema_32
```

Out[7]:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	Std1	Std1	Std1	Std2	Std2	Std2	Std3	Std3	Std3	Std4	Std4
B	Std5	Std5	Std5	NTC	NTC	NTC	GATTACA_25	GATTACA_25	GATTACA_26	GATTACA_26	GATTACA_27
C	GATTACA_28	GATTACA_28	GATTACA_29	GATTACA_29	GATTACA_30	GATTACA_30	GATTACA_31	GATTACA_31	GATTACA_32	GATTACA_32	GATTACA_33
D	GATTACA_34	GATTACA_34	GATTACA_35	GATTACA_35	GATTACA_36	GATTACA_36	GATTACA_37	GATTACA_37	GATTACA_38	GATTACA_38	GATTACA_39
E	GATTACA_40	GATTACA_40	GATTACA_41	GATTACA_41	GATTACA_42	GATTACA_42	GATTACA_43	GATTACA_43	GATTACA_44	GATTACA_44	GATTACA_45
F	GATTACA_46	GATTACA_46	GATTACA_47	GATTACA_47	GATTACA_48	GATTACA_48	GATTACA_49	GATTACA_49	GATTACA_50	GATTACA_50	GATTACA_51
G	GATTACA_52	GATTACA_52	GATTACA_53	GATTACA_53	GATTACA_54	GATTACA_54	GATTACA_55	GATTACA_55	GATTACA_56	GATTACA_56	GATTACA_57
H	GATTACA_58	GATTACA_58	GATTACA_59	GATTACA_59	GATTACA_60	GATTACA_60	GATTACA_61	GATTACA_61	GATTACA_62	GATTACA_62	GATTACA_63

```
In [8]: 1 # create a printable pipetting shema for 96-well plate format of second plate
2 shema = pd.read_csv('wellplate.csv') # read template in
3 shema_qPCR = pd.DataFrame(shema[['column','row']])
4 shema_qPCR['Samples'] = std_plus_Samples_rest # add the column with the samples
5 plate_shema_rest = shema_qPCR.pivot("column", "row", "Samples")
6 plate_shema_rest.index.name = None
7 plate_shema_rest.columns.name = None
8 plate_shema_rest
```

```
Out[8]:
```

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	Std1	Std1	Std1	Std2	Std2	Std2	Std3	Std3	Std3	Std4	Std4
B	Std5	Std5	Std5	NTC	NTC	NTC	GATTACA_64	GATTACA_64	GATTACA_65	GATTACA_65	GATTACA_66
C	GATTACA_67	GATTACA_67	GATTACA_68	GATTACA_68	GATTACA_69	GATTACA_69	GATTACA_70	GATTACA_70	GATTACA_71	GATTACA_71	GATTACA_72
D	GATTACA_73	GATTACA_73	GATTACA_74	GATTACA_74	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
E	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
F	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
G	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
H	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN

```
In [9]: 1 # transform the pandas df object in html and save pipetting_shema_plate1.html file
2 pd.set_option('colheader_justify', 'center') # FOR TABLE <th>
3
4 html_string = ''
5 <html>
6 <head><title>HTML Pipetting Shema qPCR Plate</title></head>
7 <link rel="stylesheet" type="text/css" href="df_style.css"/>
8 <body>
9 {table}
10 </body>
11 </html>.
12 ''
13
14 # Save the as output as html file
15 with open('pipetting_shema_plate1.html', 'w') as f:
16     f.write(html_string.format(table=plate_shema_32.to_html(classes='mystyle')))
```

```
In [10]: 1 # show the saved html file in jupyter notebook
2 from IPython.core.display import HTML
3 HTML('pipetting_shema_plate1.html')
```

```
Out[10]:
```

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	Std1	Std1	Std1	Std2	Std2	Std2	Std3	Std3	Std3	Std4	Std4
B	Std5	Std5	Std5	NTC	NTC	NTC	GATTACA_25	GATTACA_25	GATTACA_26	GATTACA_26	GATTACA_27
C	GATTACA_28	GATTACA_28	GATTACA_29	GATTACA_29	GATTACA_30	GATTACA_30	GATTACA_31	GATTACA_31	GATTACA_32	GATTACA_32	GATTACA_33
D	GATTACA_34	GATTACA_34	GATTACA_35	GATTACA_35	GATTACA_36	GATTACA_36	GATTACA_37	GATTACA_37	GATTACA_38	GATTACA_38	GATTACA_39
E	GATTACA_40	GATTACA_40	GATTACA_41	GATTACA_41	GATTACA_42	GATTACA_42	GATTACA_43	GATTACA_43	GATTACA_44	GATTACA_44	GATTACA_45
F	GATTACA_46	GATTACA_46	GATTACA_47	GATTACA_47	GATTACA_48	GATTACA_48	GATTACA_49	GATTACA_49	GATTACA_50	GATTACA_50	GATTACA_51
G	GATTACA_52	GATTACA_52	GATTACA_53	GATTACA_53	GATTACA_54	GATTACA_54	GATTACA_55	GATTACA_55	GATTACA_56	GATTACA_56	GATTACA_57
H	GATTACA_58	GATTACA_58	GATTACA_59	GATTACA_59	GATTACA_60	GATTACA_60	GATTACA_61	GATTACA_61	GATTACA_62	GATTACA_62	GATTACA_63

```
In [11]: 1 # transform the pandas df object in html and save pipetting_shema_plate2.html file
2 pd.set_option('colheader_justify', 'center') # FOR TABLE <th>
3
4 html_string = ''
5 <html>
6 <head><title>HTML Pipetting Shema qPCR Plate</title></head>
7 <link rel="stylesheet" type="text/css" href="df_style.css"/>
8 <body>
9 {table}
10 </body>
11 </html>.
12 ''
13
14 # Save the as output as html file
15 with open('pipetting_shema_plate2.html', 'w') as f:
16     f.write(html_string.format(table=plate_shema_rest.to_html(classes='mystyle')))
```

```
In [12]: 1 # show the saved html file in jupyter notebook
2 from IPython.core.display import HTML
3 HTML('pipetting_shema_plate2.html')
```

```
Out[12]:
```

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	Std1	Std1	Std1	Std2	Std2	Std2	Std3	Std3	Std3	Std4	Std4
B	Std5	Std5	Std5	NTC	NTC	NTC	GATTACA_64	GATTACA_64	GATTACA_65	GATTACA_65	GATTACA_66
C	GATTACA_67	GATTACA_67	GATTACA_68	GATTACA_68	GATTACA_69	GATTACA_69	GATTACA_70	GATTACA_70	GATTACA_71	GATTACA_71	GATTACA_72
D	GATTACA_73	GATTACA_73	GATTACA_74	GATTACA_74	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
E	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
F	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
G	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
H	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN

6. Load the plate in the BioRad™ CFX96 Real-Time PCR Instrument, then run the following program:

Stage Temperature Time

Hold 50°C 2 minutes

Hold 95°C 20 seconds

40 cycles 95°C 1 second

. 60°C 20 seconds

After the qPCR is finished get the results Cq.csv file and read the content into a dataframe.

```
In [13]: 1 # read in the csv file created by the BioRad CFX96 Real-Time PCR machine for plate 1
2 df_qPCR_32 = pd.read_csv('PAN_Onco_20201401_plate1.csv', sep=',')
3 df_qPCR_32.head()
```

```
Out[13]:
```

Unnamed: 0	Well	Fluor	Target	Content	Sample	Biological Set Name	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev	Set Point	Well Note
0	NaN	A01	FAM	NaN	Std-01	NaN	14.38	14.43	0.155	6.8	0.833	6.8	0.0	60	NaN
1	NaN	A02	FAM	NaN	Std-01	NaN	14.30	14.43	0.155	6.8	0.833	6.8	0.0	60	NaN
2	NaN	A03	FAM	NaN	Std-01	NaN	14.60	14.43	0.155	6.8	0.833	6.8	0.0	60	NaN
3	NaN	A04	FAM	NaN	Std-02	NaN	17.68	17.75	0.085	6.8	0.833	6.8	0.0	60	NaN
4	NaN	A05	FAM	NaN	Std-02	NaN	17.73	17.75	0.085	6.8	0.833	6.8	0.0	60	NaN

```
In [32]: 1 # read in the csv file created by the BioRad CFX96 Real-Time PCR machine for plate 2
2 df_qPCR_rest = pd.read_csv('PAN_Onco_20201401_plate2.csv', sep=',')
3 df_qPCR_rest.head()
```

```
Out[32]:
```

Unnamed: 0	Well	Fluor	Target	Content	Sample	Biological Set Name	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev	Set Point	Well Note	
0	nan	A01	FAM	nan	Std-01	NaN	nan	14.61	14.52	0.09	6.80	0.83	6.80	0.00	60	nan
1	nan	A02	FAM	nan	Std-01	NaN	nan	14.51	14.52	0.09	6.80	0.83	6.80	0.00	60	nan
2	nan	A03	FAM	nan	Std-01	NaN	nan	14.44	14.52	0.09	6.80	0.83	6.80	0.00	60	nan
3	nan	A04	FAM	nan	Std-02	NaN	nan	17.97	17.84	0.13	6.80	0.83	6.80	0.00	60	nan
4	nan	A05	FAM	nan	Std-02	NaN	nan	17.71	17.84	0.13	6.80	0.83	6.80	0.00	60	nan

Copy the Cq column from the dataframe into the 96-well-template and then visualize the the qPCR results.

plate 1

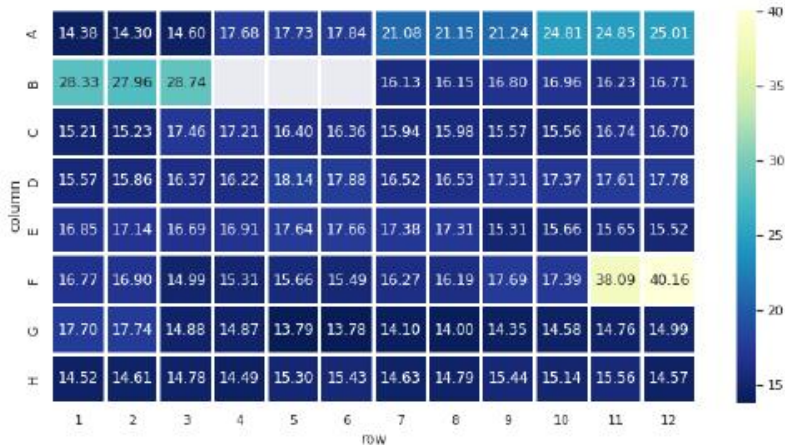
```
In [15]: 1 # copy the Cq column from BioRad file into 96-WellPlate template
2 wellplate = pd.read_csv('wellplate.csv')
3 wellplate_qPCR_32 = pd.DataFrame(wellplate[['column', 'row']])
4 wellplate_qPCR_32['Cq'] = df_qPCR_32['Cq']
5 wellplate_qPCR_32.head()
```

```
Out[15]:
```

	column	row	Cq
0	A	1	14.38
1	A	2	14.30
2	A	3	14.60
3	A	4	17.68
4	A	5	17.73

```
In [24]: 1 # visualize the qPCR results
2 import matplotlib.pyplot as plt
3 import seaborn as sns
4 sns.set()
5
6 results_32 = wellplate_qPCR_32.pivot("column", "row", "Cq")
7
8 # Draw a heatmap with the numeric values in each well
9 f, ax = plt.subplots(figsize=(12, 6))
10 ax = sns.heatmap(results_32, annot=True, linewidths=2, ax=ax, cmap="YlGnBu_r", fmt='.2f')
11 bottom, top = ax.get_ylim()
12 ax.set_ylim(bottom + 0.5, top - 0.5)

Out[24]: (8.0, 0.0)
```



There is one sample F11,F12 which is the sample NGS-ID 27 and GATTACA_51 (LMU-012; LMU-JR000786). There is no library or very low amount, I dont know what the problem here was, cfDNA was not very low. I will load as much as in can for sequencing and in parallel I will repeat the library preparation starting from cfDNA.

Extract the mean Cq values of the standards and samples and then do a linear regression to get the sample concentrations.

```
In [27]: 1 # extract the mean Cq values
2 standards_32 = df_qPCR_32['Cq Mean'][:15:3]
3 standards_32
```

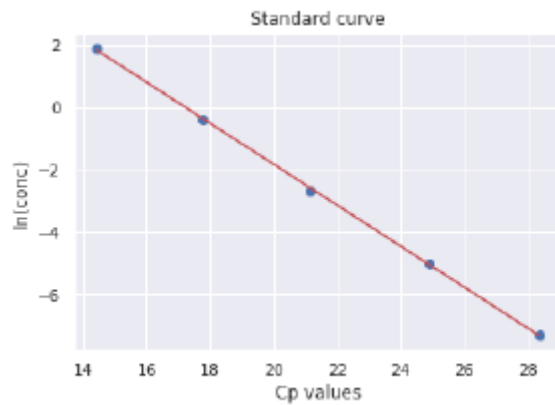
```
Out[27]: 0      14.43
3      17.75
6      21.16
9      24.89
12     28.35
Name: Cq Mean, dtype: float64
```

```
In [28]: 1 samples_32 = pd.Series(df_qPCR_32['Cq Mean'][18::2])
         2 samples_32 = samples_32[samples_32 > 0]
         3 samples_32
```

```
Out[28]: 18    16.14
         20    16.88
         22    16.47
         24    15.22
         26    17.34
         28    16.38
         30    15.96
         32    15.57
         34    16.72
         36    15.71
         38    16.30
         40    18.01
         42    16.52
         44    17.34
         46    17.69
         48    17.00
         50    16.80
         52    17.65
         54    17.35
         56    15.48
         58    15.59
         60    16.84
         62    15.15
         64    15.58
         66    16.23
         68    17.54
         70    39.12
         72    17.72
         74    14.87
         76    13.78
         78    14.05
         80    14.46
         82    14.88
         84    14.57
         86    14.63
         88    15.36
         90    14.71
         92    15.29
         94    15.06
         Name: Cq Mean, dtype: float64
```

```
In [29]: 1 # standard curve and linear regression
         2 %matplotlib inline
         3 import numpy as np
         4 import matplotlib.pyplot as plt
         5 from scipy import stats
         6
         7 x = standards_32
         8 y = conc_ln
         9 gradient, intercept, r_value, p_value, std_err = stats.linregress(x,y)
        10 print(stats.linregress(x,y))
        11 mn=np.min(x)
        12 mx=np.max(x)
        13 x1=np.linspace(mn,mx,500)
        14 y1=gradient*x1+intercept
        15 plt.plot(x,y,'ob')
        16 plt.plot(x1,y1,'-r')
        17 plt.title('Standard curve')
        18 plt.xlabel('Cp values')
        19 plt.ylabel('ln(conc)')
        20 plt.show()
```

LinregressResult(slope=-0.657997973936181, intercept=11.337637238617607, rvalue=-0.999802771733327, pvalue=3.324870584170194e-06, stderr=0.007546190326481958)



```
In [41]: 1 f = lambda x: np.exp(gradient*x+intercept)*1000 #dilution factor 1000
2 df_qPCR_32['conc'] = samples_32.apply(f)
3 df_qPCR_32['100pM(H2O+2yl)'] = df_qPCR_32['conc'] / 100*2-2 #volume to dilute to 100pM with 2yl DNA
4
5 # create a file for printing
6 pd.options.display.float_format = '{:.2f}'.format # formats the numbers to 2 decimal points only
7 df_printout_32 = df_qPCR_32.drop(['Unnamed: 0', 'Well', 'Fluor', 'Target', 'Content',
8 'Biological Set Name', 'Cq', 'Cq Std. Dev',
9 'Starting Quantity (SQ)', 'Log Starting Quantity', 'SQ Mean',
10 'SQ Std. Dev', 'Set Point', 'Well Note'], axis='columns')
11 df_printout_32.dropna(inplace=True) # this drops all NaN (empty values)
12 # the next line renames the columns
13 df_printout_32.rename(columns={'conc': 'conc in pM', '100pM(H2O+2yl)': 'H2O for 100pM/2µl DNA',
14 'Sample': 'NGS-ID'}, inplace=True)
15 df_printout_32["NGS-ID"] = df_printout_32["NGS-ID"].astype(int)
16 df_printout_32.set_index('NGS-ID')
17 df_printout_32.head()
```

```
Out[41]:
```

NGS-ID	Cq Mean	conc in pM	H2O for 100pM/2µl DNA
18	1	16.14	2105.91
20	2	16.88	1334.85
22	3	16.47	1718.46
24	4	15.22	3712.01
26	5	17.34	1005.42

plate 2

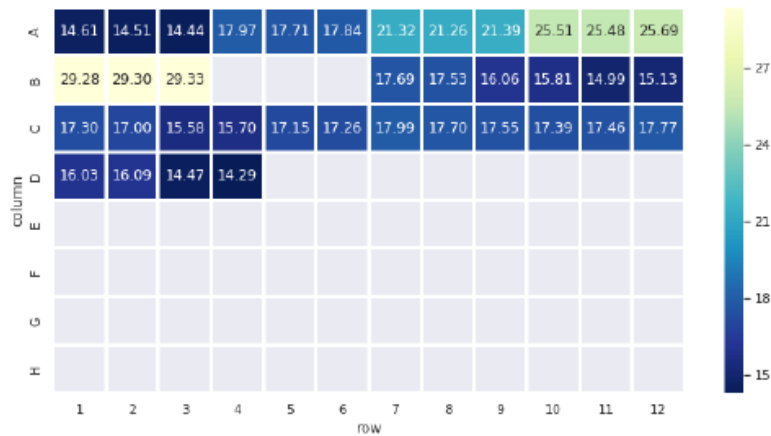
```
In [34]: 1 # copy the Cq column from BioRad file into 96-WellPlate template
2 wellplate = pd.read_csv('wellplate.csv')
3 wellplate_qPCR_rest = pd.DataFrame(wellplate[['column', 'row']])
4 wellplate_qPCR_rest['Cq'] = df_qPCR_rest['Cq']
5 wellplate_qPCR_rest.head()
```

```
Out[34]:
```

	column	row	Cq
0	A	1	14.61
1	A	2	14.51
2	A	3	14.44
3	A	4	17.97
4	A	5	17.71

```
In [35]: 1 # visualize the qPCR results
2 import matplotlib.pyplot as plt
3 import seaborn as sns
4 sns.set()
5
6 results_rest = wellplate_qPCR_rest.pivot("column", "row", "Cq")
7
8 # Draw a heatmap with the numeric values in each well
9 f, ax = plt.subplots(figsize=(12, 6))
10 ax = sns.heatmap(results_rest, annot=True, linewidths=2, ax=ax, cmap="YlGnBu_r", fmt='.2f')
11 bottom, top = ax.get_ylim()
12 ax.set_ylim(bottom + 0.5, top - 0.5)
```

```
Out[35]: (8.0, 0.0)
```



Extract the mean Cq values of the standards and samples and then do a linear regression to get the sample concentrations.


```
In [36]: 1 # extract the mean Cq values
         2 standards_rest = df_qPCR_rest['Cq Mean'][:15:3]
         3 standards_rest
```

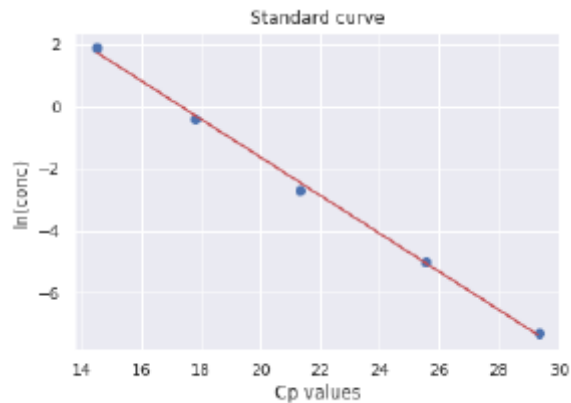
```
Out[36]: 0    14.52
         3    17.84
         6    21.33
         9    25.56
        12    29.31
         Name: Cq Mean, dtype: float64
```

```
In [37]: 1 samples_rest = pd.Series(df_qPCR_rest['Cq Mean'][:18::2])
         2 samples_rest = samples_rest[samples_rest > 0]
         3 samples_rest
```

```
Out[37]: 18    17.61
         20    15.93
         22    15.06
         24    17.15
         26    15.64
         28    17.20
         30    17.84
         32    17.47
         34    17.61
         36    16.06
         38    14.38
         Name: Cq Mean, dtype: float64
```

```
In [38]: 1 # standard curve and linear regression
         2 %matplotlib inline
         3 import numpy as np
         4 import matplotlib.pyplot as plt
         5 from scipy import stats
         6
         7 x = standards_rest
         8 y = conc_ln
         9 gradient, intercept, r_value, p_value, std_err = stats.linregress(x,y)
        10 print(stats.linregress(x,y))
        11 mn=np.min(x)
        12 mx=np.max(x)
        13 xl=np.linspace(mn,mx,500)
        14 yl=gradient*xl+intercept
        15 plt.plot(x,y,'ob')
        16 plt.plot(xl,yl,'-r')
        17 plt.title('Standard curve')
        18 plt.xlabel('Cp values')
        19 plt.ylabel('ln(conc)')
        20 plt.show()
```

LinregressResult(slope= -0.6161154799321054, intercept=10.688851726479843, rvalue= -0.9990279341681756, pvalue=3.6375924496022085e-05, stderr=0.015695715995653448)



```
In [43]: 1 f = lambda x: np.exp(gradient*x+intercept)*1000 #dilution factor 1000
2 df_qPCR_rest['conc'] = samples_rest.apply(f)
3 df_qPCR_rest['100pM(H2O+2yl)'] = df_qPCR_rest['conc'] / 100*2-2 #volume to dilute to 100pM with 2yl DNA
4
5 # create a file for printing
6 pd.options.display.float_format = '{:.2f}'.format # formats the numbers to 2 decimal points only
7 df_printout_rest = df_qPCR_rest.drop(['Unnamed: 0', 'Well', 'Fluor', 'Target', 'Content',
8   'Biological Set Name', 'Cq', 'Cq Std. Dev',
9   'Starting Quantity (SQ)', 'Log Starting Quantity', 'SQ Mean',
10  'SQ Std. Dev', 'Set Point', 'Well Note'], axis='columns')
11 df_printout_rest.dropna(inplace=True) # this drops all NaN (empty values)
12 # the next line renames the columns
13 df_printout_rest.rename(columns={'conc': 'conc in pM', '100pM(H2O+2yl)': 'H2O for 100pM/2µl DNA',
14   'Sample': 'NGS-ID'}, inplace=True)
15 df_printout_rest["NGS-ID"]=df_printout_rest["NGS-ID"].astype(int)
16 df_printout_rest.set_index('NGS-ID')
17 df_printout_rest.head()
```

```
Out[43]:
```

	NGS-ID	Cq Mean	conc in pM	H2O for 100pM/2µl DNA
18	40	17.61	851.34	15.03
20	41	15.93	2396.79	45.94
22	42	15.06	4096.58	79.93
24	43	17.15	1130.29	20.61
26	44	15.64	2865.68	55.31

Combine the results of the two plates

```
In [53]: 1 df_all_rows = pd.concat([df_printout_32, df_printout_rest])
2 df_all_rows.to_csv('qPCR_results_all.csv') #save results so that they can be printed later for pipetting
3 df_all_rows
```

```
Out[53]:
```

	NGS-ID	Cq Mean	conc in pM	H2O for 100pM/2µl DNA
18	1	16.14	2105.91	40.12
20	2	16.88	1334.85	24.70
22	3	16.47	1718.46	32.37
24	4	15.22	3712.01	72.24
26	5	17.34	1005.42	18.11
28	6	16.38	1816.44	34.33
30	7	15.96	2352.90	45.06
32	8	15.57	2991.97	57.84
34	9	16.72	1473.15	27.46
36	10	15.71	2744.72	52.89
38	11	16.30	1908.22	36.16
40	12	18.01	665.39	11.31
42	13	16.52	1666.33	31.33
44	14	17.34	1005.42	18.11
46	15	17.69	810.40	14.21
48	16	17.00	1239.72	22.79
50	17	16.80	1402.30	26.05
52	18	17.65	830.62	14.61
54	19	17.35	999.25	17.98
56	20	15.48	3162.57	61.25
58	21	15.59	2955.33	57.11
60	22	16.84	1368.16	25.36
62	23	15.15	3875.61	75.51
64	24	15.58	2973.60	57.47
66	25	16.23	1992.32	37.85
68	26	17.54	888.86	15.78

	NGS-ID	Cq Mean	conc in pM	H2O for 100pM/2µl DNA
70	27	39.12	0.00	-2.00
72	28	17.72	795.56	13.91
74	29	14.87	4605.33	90.11
76	30	13.78	9014.01	178.28
78	31	14.05	7632.61	150.65
80	32	14.46	5928.80	116.58
82	33	14.88	4577.04	89.54
84	34	14.57	5540.30	108.81
86	35	14.63	5339.23	104.78
88	36	15.36	3405.25	66.10
90	37	14.71	5082.45	99.65
92	38	15.29	3555.32	69.11
94	39	15.06	4096.58	79.93
18	40	17.61	851.34	15.03
20	41	15.93	2396.79	45.94
22	42	15.06	4096.58	79.93
24	43	17.15	1130.29	20.61
26	44	15.64	2865.68	55.31
28	45	17.20	1096.00	19.92
30	46	17.84	738.86	12.78
32	47	17.47	928.04	16.56
34	48	17.61	851.34	15.03
36	49	16.06	2212.31	42.25
38	50	14.38	6228.35	122.57

```
In [84]: 1 # Merge the qPCR results with the sample dataframe
2 df_combined = pd.read_csv('GATTACA_newSamples_NGS.csv')
3 df_combined.set_index('NGS-ID', inplace=True)
4 df_combined = pd.merge(df_combined, df_all_rows, on=['NGS-ID'])
5 df_combined
```

```
Out[84]:
```

	NGS-ID	PatID	sample_name	ngs_barcode	barcode	material	entry date	cDNA	chip	Cq Mean	conc in pM	H2O for 100pM/2µl DNA
0	1	LMU-001	GATTACA_25	1	LMU-JR003561	Plasma	04.12.2017	4.72	GATTACA_2020_Chip1	16.14	2105.91	40.12
1	2	LMU-012	GATTACA_26	2	LMU-JR000985	Plasma	16.08.2018	0.64	GATTACA_2020_Chip1	16.88	1334.85	24.70
2	3	LMU-014	GATTACA_27	3	LMU-JR000005	Plasma	06.11.2018	1.02	GATTACA_2020_Chip1	16.47	1718.46	32.37
3	4	LMU-020	GATTACA_28	4	LMU-JR000910	Plasma	01.04.2019	8.42	GATTACA_2020_Chip1	15.22	3712.01	72.24
4	5	LMU-024	GATTACA_29	5	LMU-JR000542	Plasma	04.07.2019	0.92	GATTACA_2020_Chip1	17.34	1005.42	18.11
5	6	LMU-028	GATTACA_30	6	LMU-JR002127	Plasma	01.08.2019	0.76	GATTACA_2020_Chip1	16.38	1816.44	34.33
6	7	LMU-001	GATTACA_31	7	LMU-JR003573	Plasma	08.12.2017	1.30	GATTACA_2020_Chip1	15.96	2352.90	45.06
7	8	LMU-012	GATTACA_32	8	LMU-JR000980	Plasma	18.08.2018	1.51	GATTACA_2020_Chip1	15.57	2991.97	57.84
8	9	LMU-014	GATTACA_33	9	LMU-JR000843	Plasma	09.11.2018	0.58	GATTACA_2020_Chip2	16.72	1473.15	27.46
9	10	LMU-020	GATTACA_34	10	LMU-JR000736	Plasma	03.04.2019	11.50	GATTACA_2020_Chip2	15.71	2744.72	52.89
10	11	LMU-028	GATTACA_35	11	LMU-JR002130	Plasma	05.08.2019	1.01	GATTACA_2020_Chip2	16.30	1908.22	36.16
11	12	LMU-001	GATTACA_36	12	LMU-JR003665	Plasma	14.12.2017	1.67	GATTACA_2020_Chip2	18.01	665.39	11.31
12	13	LMU-012	GATTACA_37	13	LMU-JR000978	Plasma	23.08.2018	0.96	GATTACA_2020_Chip2	16.52	1666.33	31.33
13	14	LMU-014	GATTACA_38	14	LMU-JR000851	Plasma	16.11.2018	0.44	GATTACA_2020_Chip2	17.34	1005.42	18.11
14	15	LMU-024	GATTACA_39	15	LMU-JR002027	Plasma	10.07.2019	0.36	GATTACA_2020_Chip2	17.69	810.40	14.21

NGS-ID	Pat.ID	sample_name	ngs_barcode	barcode	material	entry date	cfDNA	chip	Cq Mean	conc in pM	H2O for 100pM/2µl DNA	
15	16	LMU-028	GATTACA_40	16	LMU-JR002156	Plasma	12.08.2019	0.94	GATTACA_2020_Chip2	17.00	1239.72	22.79
16	17	LMU-012	GATTACA_41	17	LMU-JR000973	Plasma	27.08.2018	0.76	GATTACA_2020_Chip3	16.80	1402.30	26.05
17	18	LMU-014	GATTACA_42	18	LMU-JR002021	Plasma	14.07.2019	0.35	GATTACA_2020_Chip3	17.65	830.62	14.61
18	19	LMU-020	GATTACA_43	19	LMU-JR000678	Plasma	15.04.2019	0.52	GATTACA_2020_Chip3	17.35	999.25	17.98
19	20	LMU-012	GATTACA_44	20	LMU-JR000924	Plasma	29.08.2018	2.60	GATTACA_2020_Chip3	15.48	3162.57	61.25
20	21	LMU-020	GATTACA_45	21	LMU-JR000675	Plasma	17.04.2019	3.42	GATTACA_2020_Chip3	15.59	2955.33	57.11
21	22	LMU-012	GATTACA_46	22	LMU-JR000961	Plasma	04.09.2018	0.96	GATTACA_2020_Chip3	16.84	1368.16	25.36
22	23	LMU-020	GATTACA_47	23	LMU-JR000684	Plasma	29.04.2019	3.86	GATTACA_2020_Chip3	15.15	3875.61	75.51
23	24	LMU-012	GATTACA_48	24	LMU-JR000795	Plasma	15.01.2019	2.08	GATTACA_2020_Chip3	15.58	2973.60	57.47
24	25	LMU-012	GATTACA_49	1	LMU-JR000791	Plasma	17.01.2019	1.84	GATTACA_2020_Chip4	16.23	1992.32	37.85
25	26	LMU-014	GATTACA_50	2	LMU-JR000215	Plasma	19.07.2019	0.17	GATTACA_2020_Chip4	17.54	888.86	15.78
26	27	LMU-012	GATTACA_51	3	LMU-JR000786	Plasma	22.01.2019	3.02	GATTACA_2020_Chip4	39.12	0.00	-2.00
27	28	LMU-024	GATTACA_52	4	LMU-JR002031	Plasma	05.07.2019	0.20	GATTACA_2020_Chip4	17.72	795.56	13.91
28	29	LMU-001	GATTACA_53	5	LMU-JR003516	Biopsie	07.12.2017	22.20	GATTACA_2020_Chip4	14.87	4605.33	90.11
29	30	LMU-012	GATTACA_54	6	LMU-JR000984	Biopsie	17.08.2018	8.76	GATTACA_2020_Chip4	13.78	9014.01	178.28
30	31	LMU-020	GATTACA_55	7	LMU-JR000738	Biopsie	02.04.2019	25.60	GATTACA_2020_Chip4	14.05	7632.61	150.65
31	32	LMU-024	GATTACA_56	8	LMU-JR002034	Biopsie	04.07.2019	75.80	GATTACA_2020_Chip4	14.46	5928.80	116.58
32	33	LMU-028	GATTACA_57	9	LMU-JR002001	Biopsie	02.08.2019	23.00	GATTACA_2020_Chip5	14.88	4577.04	89.54
NGS-ID	Pat.ID	sample_name	ngs_barcode	barcode	material	entry date	cfDNA	chip	Cq Mean	conc in pM	H2O for 100pM/2µl DNA	
33	34	LMU-001	GATTACA_58	10	LMU-JR003648	Biopsie	06.02.2018	17.50	GATTACA_2020_Chip5	14.57	5540.30	108.81
34	35	LMU-012	GATTACA_59	11	LMU-JR000930	Biopsie	28.08.2018	29.20	GATTACA_2020_Chip5	14.63	5339.23	104.78
35	36	LMU-020	GATTACA_60	12	LMU-JR000676	Biopsie	16.04.2019	13.30	GATTACA_2020_Chip5	15.36	3405.25	66.10
36	37	LMU-012	GATTACA_61	13	LMU-JR000794	Biopsie	16.01.2019	28.20	GATTACA_2020_Chip5	14.71	5082.45	99.65
37	38	LMU-014	GATTACA_62	14	LMU-JR002014	Biopsie	18.07.2019	21.80	GATTACA_2020_Chip5	15.29	3555.32	69.11
38	39	LMU-001	GATTACA_63	15	LMU-JR003516	Biopsie	07.12.2017	91.60	GATTACA_2020_Chip5	15.06	4096.58	79.93
39	40	LMU-014	GATTACA_64	16	LMU-JR002133	Plasma	24.08.2019	0.38	GATTACA_2020_Chip5	17.61	851.34	15.03
40	41	LMU-014	GATTACA_65	17	LMU-JR002116	Plasma	12.09.2019	1.33	GATTACA_2020_Chip6	15.93	2396.79	45.94
41	42	LMU-001	GATTACA_66	18	LMU-JR003662	Plasma	05.02.2018	5.20	GATTACA_2020_Chip6	15.06	4096.58	79.93
42	43	LMU-012	GATTACA_67	19	LMU-JR000838	Plasma	28.11.2018	0.94	GATTACA_2020_Chip6	17.15	1130.29	20.61
43	44	LMU-014	GATTACA_68	20	LMU-JR000750	Plasma	04.03.2019	1.08	GATTACA_2020_Chip6	15.64	2865.68	55.31
44	45	LMU-020	GATTACA_69	21	LMU-JR002024	Plasma	15.07.2019	0.35	GATTACA_2020_Chip6	17.20	1096.00	19.92
45	46	LMU-024	GATTACA_70	22	LMU-JR002139	Plasma	09.10.2019	0.41	GATTACA_2020_Chip6	17.84	738.86	12.78
46	47	LMU-012	GATTACA_71	23	LMU-JR000221	Plasma	16.04.2019	0.25	GATTACA_2020_Chip6	17.47	928.04	16.56
47	48	LMU-014	GATTACA_72	24	LMU-JR000607	Plasma	05.06.2019	0.01	GATTACA_2020_Chip6	17.61	851.34	15.03
48	49	LMU-020	GATTACA_73	1	LMU-JR000554	Plasma	23.09.2019	0.54	GATTACA_2020_Chip7	16.06	2212.31	42.25
49	50	LMU-012	GATTACA_74	2	LMU-JR000577	Plasma	25.06.2019	3.94	GATTACA_2020_Chip7	14.38	6228.35	122.57

Note: Prepare a fresh dilution of each library before use with the Ion Chef™ System. Store diluted libraries at 4°C, and use the library dilutions within 48 hours.

Combine libraries

Multiple barcoded libraries can be sequenced on a single chip by combining equal volumes of each library before template preparation.

Ion sequencing chip Maximum number of libraries Final Library Concentration

Ion 550™ Chip 8

1. Dilute all individual barcoded libraries to 55pM concentration.
2. Combine 10µl of each library in a single 1.5ml Eppendorf LoBind™ tube.

3. After adding the last library, pipet up and down 5 times to mix, then centrifuge briefly to collect the contents.

STOPPING POINT Store the combined library pool at 4°C before use, if templating the same day. For longer term, store at -20°C.

Guidelines for templating and sequencing

Chip Template System Sequencer Kit User Guide

Ion 550™ Chip Ion Chef™ Ion GeneStudio™ S5 Prime Ion 550™ Kit-Chef (Cat.No.A34541) *Ion 550™ Kit-Chef User Guide* (Pub.No.MAN0017275)

Create a Run Plan

In the Torrent Suite™ Software use the OncoPrint™ TagSeq S550 Liquid Biopsy template. This is a planned run template for use with cell-free DNA (cfDNA)

research samples. Analysis parameters are optimized for the sensitive and specific detection of rare somatic variants (SNPs, InDels) present at 0.1% frequency in cfDNA.

Create a table with necessary information for runplanning

STOPPING POINT Store the combined library pool at 4°C before use, if templating the same day. For longer term, store at -20°C.

From the previous table unnecessary columns will be removed and a new column with the chip information will be added, also the NGS-ID will be replaced with the straightforward sample name "GATTACA_".

```
In [85]: 1 df_run = df_combined.copy()
2 df_run.drop(columns=['sample_name', 'material', 'entry date', 'Cq Mean', 'cfDNA', 'conc in pM'], inplace=True)
3 df_run['NGS-ID'] = ['GATTACA_' + str(x + 24) for x in df_run['NGS-ID']]
4 df_run.head()
```

```
Out[85]:
```

	NGS-ID	PatID	ngs_barcode	barcode	chip	H2O for 100pM/2µl DNA
0	GATTACA_25	LMU-001	1	LMU-JR003561	GATTACA_2020_Chip1	40.12
1	GATTACA_26	LMU-012	2	LMU-JR000985	GATTACA_2020_Chip1	24.70
2	GATTACA_27	LMU-014	3	LMU-JR000005	GATTACA_2020_Chip1	32.37
3	GATTACA_28	LMU-020	4	LMU-JR000910	GATTACA_2020_Chip1	72.24
4	GATTACA_29	LMU-024	5	LMU-JR000542	GATTACA_2020_Chip1	18.11

```
In [86]: 1 df_run.to_csv('runplanning.csv')
```