

„Liquid biopsy“: Analyse molekularer Marker aus Blutproben zur Therapiesteuerung beim Lungenkarzinom

Liquid Biopsy: Detection of Molecular Markers for Treatment Decisions in Lung Cancer

Autoren

W. M. Brückl^{1,2}, R. M. Wirtz^{3,4}, T. Bertsch^{5,6}, J. H. Ficker^{1,2}, A. Jung⁷

Institute

- 1 Universitätsklinik für Pneumologie, Allergologie und Schlafmedizin, Paracelsus Medizinische Privatuniversität, Nürnberg
- 2 Medizinische Klinik 3 (Pneumologie, Allergologie, Schlafmedizin), Klinikum Nürnberg, Nürnberg
- 3 Institut für Pathologie, St. Elisabeth Krankenhaus, Köln
- 4 STRATIFYER Molecular Pathology GmbH, Köln
- 5 Universitätsinstitut für Klinische Chemie, Laboratoriumsmedizin und Transfusionsmedizin – Zentrallaboratorium, Paracelsus Medizinische Privatuniversität, Nürnberg
- 6 Institut für Klinische Chemie, Laboratoriumsmedizin und Transfusionsmedizin – Zentrallaboratorium, Klinikum Nürnberg, Nürnberg
- 7 Pathologisches Institut der Ludwig-Maximilians Universität München

eingereicht 1.9.2016

akzeptiert nach Revision 9.12.2016

Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-123803>

Online-Publikation: 14.2.2017 | *Pneumologie* 2017; 71: 151–163

© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York

ISSN 0934-8387

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Wolfgang Brückl, Leiter der Pneumologischen Onkologie, Medizinische Klinik 3 (Pneumologie, Allergologie, Schlafmedizin), Klinikum Nürnberg, Nürnberg, Universitätsklinik für Pneumologie, Allergologie und Schlafmedizin, Paracelsus Medizinische Privatuniversität, Nürnberg, Prof.-Ernst-Nathan-Str. 1, 90410 Nürnberg
Wolfgang.brueckl@klinikum-nuernberg.de

ZUSAMMENFASSUNG

Zielgerichtete Therapien haben erfolgreich Einzug in die palliative Therapie des Lungenkarzinoms gehalten, da sie eine Individualisierung oder Personalisierung ermöglichen, die mit der Testung von prädiktiven Biomarkern einhergeht. Dadurch steigt die Zahl an prädiktiven molekularbiologischen und immunhistochemischen Untersuchungsmöglichkeiten zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie und damit der Bedarf an jeweils aktuellen Tumorgewebeproben. Diese sind jedoch oft nicht ohne unverhältnismäßig hohe Belastungen für den Patienten zu gewinnen. Daher stellen Verfahren der Diagnostik aus Blutproben, die mit dem aus dem Englischen stammenden Begriff „liquid biopsy“ zusammengefasst werden, eine Alternative bzw. Ergänzung zur klassischen Gewebebiopsie dar. Derzeit können in der klinischen Routine bereits aktivierende EGFR-Mutationen sowie die inhibitorische Mutation T790M aus dem Blut detektiert werden. Dieser Artikel stellt den aktuellen Stellenwert der liquid biopsy in der Diagnostik, zur Prognose und zur Steuerung des Therapieverlaufs bei Lungenkarzinomen dar und gibt einen Ausblick auf zukünftige Möglichkeiten.

ABSTRACT

Personalized, individualized, targeted therapy has successfully found entrance in the palliative treatment of lung cancer as they enable a personalized and individualized strategy going ahead with biomarker testing. Due to the increasing amount of predictive molecular and immunohistochemical analyses at different time points during therapy the need for more and actual tumor tissue increases; however these samples cannot always be obtained without major discomfort for the patients. Therefore, analyses from blood, the so called „liquid biopsy“, is an alternative or additional method. Activating mutations in the EGFR gene and the inhibitory mutation T790M can already be detected from blood during clinical routine. This review presents the status of liquid biopsy for diagnosis, prognosis and as predictive parameter during the course of therapy in lung cancer and gives an outlook on future developments.

Einleitung

Noch bis in die frühen 2000-er Jahre wurden in Behandlungskonzepten bei Lungenkarzinomen lediglich zwischen kleinzelligem Karzinom (SCLC) und nichtkleinzelligem Karzinom (NSCLC) und bei letzterem zwischen Plattenepithel-Karzinom, Adenokarzinom und großzelligem Karzinom unterschieden [1]. Diese histomorphologische Einteilung wird heute durch eine molekularpathologische bzw. tumorgenetische Klassifika-

tion ergänzt. Durch das moderne Verständnis der Tumorbio-logie hat sich gezeigt, dass Wachstum und Differenzierung durch spezielle Signaltransduktionswege (signaling pathways) reguliert werden und dass in Tumoren zentrale Moleküle dieser Signalwege, meist Onkogene, durch Mutation eine deregulierte und damit dauerhafte Aktivierung erfahren können. Diese Mutationen „treiben“ (tumor driver mutations) das Tumorstwachstum an, damit bieten sie ideale Zielstrukturen („targets“) für eine zielgerichtete Therapie [2].

Bei Adenokarzinomen werden z. B. aktivierende Mutationen im epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) sowie aktivierende Translokationen in den anaplastische Lymphom-Kinase (ALK)- oder rather often translocated in sarcoma (ROS1)-Genen beobachtet [3]. Der Nachweis einer aktivierenden Mutation in einem der beiden Gene gilt als prädiktiver Biomarker für die klinische Wirksamkeit spezieller Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs). Bei Plattenepithelkarzinomen zeigt sich oftmals eine Überexpression des EGFR und der Nachweis einer EGFR-Expression gilt als prädiktiver Biomarker für die Wirksamkeit eines EGFR inhibierenden Antikörpers [4]. Als Konsequenz sollten daher alle Adenokarzinome molekularpathologisch auf tumorgenetische Veränderungen in den EGFR- und ALK- sowie ROS1-Genen untersucht werden. Plattenepithelkarzinome können einer immunhistochemischen Analyse der EGFR-Expression unterzogen werden.

Im klinischen Alltag werden zur Gewinnung von Tumorproben in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle endoskopische Eingriffe gewählt, wie etwa die bronchoskopische Biopsie oder die EBUS-TBNA (endobronchial mittels Ultraschall gewonnene transbronchiale Nadelaspiration) aus mediastinalen Lymphknoten [5]. Durch diese Eingriffe werden häufig nur kleine Biopsien oder nur zytologisch verwertbares Material gewonnen, das in bis zur Hälfte der Fälle nicht ausreicht, um daran die relevanten molekularen Biomarker zu testen [6]. Daher ist es notwendig, nach anderen Wegen zu suchen, um diese molekularen Analysen durchführen zu können. Hier bieten sich in neuerer Zeit alternativ zu Gewebeproben „liquid biopsies“ an, also Analysen aus Bestandteilen des Blutes, wie etwa das Serum/Plasma oder Thrombozyten, in Zukunft auch von Sputum oder Urin [7]. Der Begriff „liquid biopsy“ stammt aus dem Englischen, heißt übersetzt so viel wie „flüssige Biopsie“ und wird in Ermangelung eines treffenden deutschen Begriffs im weiteren Text für alle prädiktiven molekulargenetischen Untersuchungen verwendet, die aus Blutproben erfolgen.

Es gibt mehrere Quellen von Tumor-DNA oder -RNA, die aus Blutproben analysiert werden können, wie etwa zirkulierende zellfreie DNA (engl. circulating free DNA, cfDNA), die zu einem gewissen Anteil von Tumorzellen stammt (ctDNA, circulating tumor DNA), zirkulierende Tumorzellen (CTC, circulating tumor cells) und Exosomen [8–11].

Die cfDNA besteht dabei aus kleinen Nukleinsäure-Fragmenten von etwa 170–320 bp Länge, die weder mit Zellen noch mit Zellfragmenten assoziiert sind. CTCs dagegen sind intakte lebende Tumorzellen, die aus dem Blut isoliert werden können, im Regelfall jedoch nur in sehr geringen Mengen zu finden und zudem schwer zu isolieren sind. Exosomen schließlich sind extrazelluläre Vesikel, die von stoffwechselaktiven Zellen, wie Tumorzellen, abgegeben werden. Exosomen enthalten RNA, DNA und Proteine, die unter anderem auch nach Kontakt mit Tumorzellen von Thrombozyten aufgenommen werden können. Während Gewebebiopsien aus Tumoren oft nur schwer zugänglich sind oder sich die Patienten, gerade beim Lungenkarzinom, bereits in einem schlechten Allgemeinzustand befinden und invasive Verfahren daher einer kritischen individuellen Nutzen-Risiko-Bewertung bedürfen, können periphere Blutproben jederzeit problemlos – und auch wiederholt – abgenommen werden.

Zusätzlich ist zu beachten, dass Tumoren häufig genetisch heterogen sind und daher eine einzelne Gewebeprobe möglicherweise nicht repräsentativ sein kann und nur ein inkomplettes Bild des Tumorgenoms widerspiegelt [12]. Gewebeproben, die zu Beginn einer Antitumorthherapie gewonnen wurden, stellen für eine Folgetherapie möglicherweise nicht mehr den aktuellen Stand des zu behandelnden Tumorgenoms dar. Dies ist z. B. dann der Fall, wenn durch die Therapie neue Mutationen entstehen oder unter dem Selektionsdruck durch die Therapie resistente Subklone selektiert werden. Daher ist es in manchen Situationen sinnvoll, vor der Entscheidung zur Auswahl einer post-primären Therapie aktuelle tumorgenetische Untersuchungen durchzuführen. Dieser Schritt ist durch eine periphere Blutentnahme wesentlich einfacher und für den Patienten mit einer deutlich geringeren Belastung umzusetzen als durch eine erneute Tumorbiopsie. Einen schematischen Überblick gibt

► **Abb. 1.**

KURZ GEFASST:

Neben der Histologie kommen beim NSCLC zunehmend molekulare Marker zur Therapiesteuerung in Betracht. Derzeit sind in der klinischen Routine aktivierende Mutationen im EGF-Rezeptorgen sowie Translokationen in den ALK- oder ROS1-Genen bei Adenokarzinomen und EGFR-Expression bei Plattenepithelkarzinomen Prädiktoren für die Wirksamkeit einer zielgerichteten Therapie. Blutbasierte Gen- und Markeranalysen, die sog. „liquid biopsy“, dient als neues zusätzliches Instrumentarium der Diagnose und Therapiesteuerung bei Lungentumoren. Es wird zwischen cfDNA, CTCs und Exosomen/Thrombozytenmaterial unterschieden. Im Vergleich zu Tumorbiopsien aus Gewebe sind Blutproben jederzeit verfügbar und geben den aktuellen molekulargenetischen Stand der Tumorerkrankung wieder.

Allerdings muss auch deutlich gesagt werden, dass derzeit die liquid biopsy in keinem Fall die histologische Diagnose ersetzen, sondern allenfalls ergänzen kann. Aussagen zum Gewebetyp, zum Grading sowie zur Blut- und Lymphgefäßinvasion bleiben einstweilen der Analyse von Gewebeproben vorbehalten.

Formen der „Liquid biopsy“ im Blut

ctDNA – zirkulierende Tumor-DNA

Tumorzellen geben DNA-Fragmente in den Blutkreislauf ab, die aus zellfreien Fraktionen des Blutes, also Serum oder Plasma, gewonnen werden können. Die ctDNA (engl. circulating **tumor** DNA) findet sich hier zusammen mit DNA-Fragmenten normaler Zellen, der sog. cfDNA (engl. circulating **free** DNA), die z. B. durch entzündliche Prozesse, Immunreaktionen u. a. m. entsteht. Dadurch liegt im Blut von Tumorpatienten immer eine Mischung aus cfDNA und ctDNA vor, wobei es keine Möglichkeit gibt, den Anteil an ctDNA zu bestimmen. Dies ist ein gro-

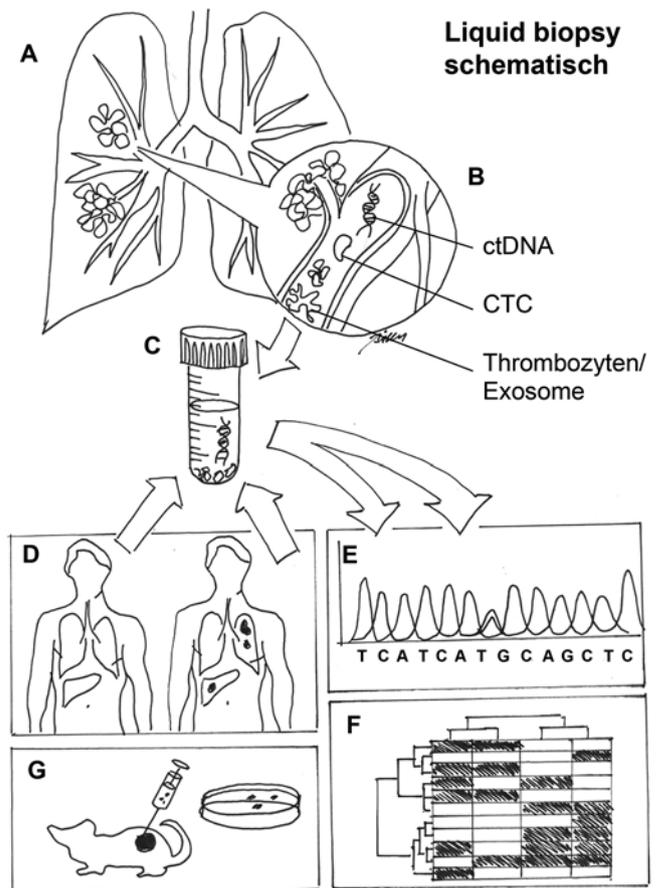
ßer Nachteil der liquid biopsy, denn immer dann, wenn keine Mutation nachgewiesen werden kann, bleibt unklar, ob es sich um eine „Wildtyp“-Genkonstellation handelt oder eine vorhandene Mutation nicht detektiert werden konnte, weil die Sensitivität des Nachweisverfahrens (LOD, limit of detection) nicht ausreichend war. Diesbezüglich ist eine Gewebeprobe deutlich sicherer, denn hier kann man mikroskopisch beurteilen, ob das Material für die Untersuchung geeignet ist und ob durch die Anreicherung des Tumorgewebes durch Mikrodissektion das LOD erreicht wurde. Entsprechend ist die Analyse aus Gewebeproben im negativen Fall deutlich verlässlicher. Umgekehrt hat die Gewebeprobe den Nachteil, dass sie im Falle deutlicher Tumorerheterogenität möglicherweise eine nicht repräsentative Stichprobe darstellt.

Bislang gibt es nur sehr wenige Erkenntnisse über die Art und Weise, wie ctDNA in den Blutkreislauf gelangt. Aktuell existieren im Wesentlichen zwei Hypothesen über die Herkunft der ctDNA [13]:

1. ctDNA wird vom Tumor aktiv in den Blutkreislauf sezerniert. Dieser Mechanismus ist möglicherweise wichtig, um in entfernten Organsystemen das Einwachsen von Metastasen vorzubereiten [14]. Möglicherweise könnten ctDNAs aber auch von lysierten zirkulierenden Tumorzellen oder Mikro-metastasen stammen, die vom Tumor aktiv in den Blutkreislauf abgesondert wurden.
2. cfDNA wird passiv durch Apoptose oder Nekrose in den Blutkreislauf abgesondert [15]. Dabei wird umso mehr ctDNA freigesetzt, je höher der der Umsatz (turnover) der Tumorzellen ist. Dieser ist besonders hoch, wenn das Wachstum des Tumors mit einer unzureichenden Neoangiogenese einhergeht. Eine andere Vermutung ist, dass cfDNA von nekrotischen Tumorzellen abstammt, die von Makrophagen aufgenommen wurden und die nach ihrem Zerfall ctDNA freisetzen [16].

Da ctDNA-Fragmente eine Größe von etwa 170–320 Basenpaaren und damit nur genomische Bruchteile darstellen, geht man davon aus, dass diese im Zuge von Apoptose entstehen, da DNA-Fragmente, die bei diesem Prozess entstehen, ebenfalls dieses Größenprofil aufweisen [16, 17]. Apoptose hängt von einer Vielzahl von Eigenschaften der Tumoren ab wie der Menge nekrotischer Zellen, der Lokalisation, Größe, Vaskularisierung des Tumors und der Anzahl der Metastasen [18, 19]. Dies könnte auch die deutliche interindividuelle Variabilität der ctDNA-Konzentration aber auch intraindividuelle Schwankungen im Verlauf einer Tumorerkrankung erklären [19, 20]. ctDNA wird im Blut degradiert oder z. B. in der lymphatischen Zirkulation gefiltert, sodass die Halbwertszeit von ctDNA im Blut ca. 1 Stunde beträgt und sich dabei ein Gleichgewichtszustand (steady state level) aus Neubildung und Zerfall einstellt [21].

Weil die cfDNA einen hohen Grad an Fragmentation aufweist und häufig nur in geringen Konzentrationen im Blut nachweisbar ist, stellt die Isolierung und Anreicherung eine große technische Herausforderung dar [13, 22]. Dennoch reichen mit neuesten Methoden ca. 5–10 ml EDTA-Blut für valide Analysen aus [23]. Hierbei sollten spezielle Röhrchen eingesetzt werden (z. B. Ariosa-Röhrchen, Roche; BCT-Röhrchen, Streck; oder PAXGene



► **Abb. 1** Schematische Darstellung der liquid biopsy.

A) Lungentumorzellen geben auf aktive oder passive Weise Tumorzellen und Tumor-Erbsubstanz in das Blut ab. **B)** Diese können im peripheren Venenblut in Form von ctDNA (circulating free tumor DNA), CTC (circulating tumor cells) und in Thrombozyten (TEP) detektiert werden. **C)** Mittels technischer Verfahren gelingt es zunehmend diese Zellen aus 10 ml Venenblut zu isolieren und zu amplifizieren, was in speziellen Röhrchen erfolgen muss. Mögliche Anwendungsmöglichkeiten sind im unteren Teil der Abbildung schematisch und exemplarisch dargestellt. **D)** Frühzeitiger Nachweis von Tumorzellen bzw. ctDNA bei Progress der Erkrankung oder bei Rezidiven. **E)** Mutationsanalyse, hier am Beispiel einer T790M-Mutation des EGFR-Gens. **F)** Genexpressionsprofile aus mRNA, z. B. aus den Thrombozyten. **E)** Möglichkeit der In-vitro- und In-vivo-Diagnostik von CTCs, im Sinne von sog. Avatar-Modellen. Ausführliche Beschreibung im Text.

ccfDNA-Röhrchen, Qiagen) vor allem um eine Adsorption der cfDNA an die Plastikoberflächen zu verhindern [24]. Bei längeren präanalytischen Standzeiten zerfallen Leukozyten in der Blutprobe, wodurch genomische DNA freigesetzt wird, die die geringen Mengen ctDNA maskieren kann. Im Serum ist die Konzentration der ctDNA zwar bis zu 24-fach höher als im Plasma, dennoch sollte Plasma verwendet werden, da dies geeigneter ist, um ctDNA zu isolieren [22, 25]. Ohne spezielle Blutröhrchen sollte eine Blutprobe innerhalb von ein bis zwei Stunden verarbeitet werden. In den speziellen Röhrchen (s. o.) ist das Material für etwa 5 Tage bei Raumtemperatur stabil, sodass das Blut sogar postalisch verschickt werden kann [26].

ctDNA kann mittels einer Vielzahl von Isolationsverfahren angereichert, anschließend mittels PCR basierter Verfahren amplifiziert und schließlich analysiert werden. Solche Methoden sind beispielsweise ARMS (amplification refractory microsequencing)-basierte Plattformen, Next Generation Sequencing (NGS) und immer öfter digitale PCR-Verfahren wie BEA-Ming (beads, emulsion, amplification, magnetic) oder ddPCR (digital droplet PCR) [27]. Ein Vergleich der EGF-Rezeptormutationsanalyse und Nachweis von neuauftretenden Resistenzmutationen nach Therapie mit TKI (Tyrosinkinase)-Inhibition mit ctDNA unter Einsatz von ARMS- und digitaler PCR zeigte, dass beide Methoden eine hohe Sensibilität und Spezifität hatten, um EGFR-Mutationen zu detektieren [28]. Erwartungsgemäß zeigten digitale PCR-Methoden eine noch höhere Sensitivität und eine bessere Konkordanz als ARMS-basierte Methoden.

Bereits an dieser Stelle wird klar, dass Untersuchungen in Gewebe und liquid biopsy jeweils Vor- aber auch Nachteile aufweisen. Beide ergänzen sich daher als Quellen für Untersuchungsgut. Daher können auch beide Analysen komplementär eingesetzt werden. Aufgrund der hohen diagnostischen Sicherheit würde es sich anbieten, mit der Gewebeanalyse zu beginnen. Spricht jedoch der Allgemeinzustand des Patienten, die drängende Zeit oder ein erhöhtes Risiko bei der erneuten Gewebediagnostik für die liquid biopsy, sollte mit dieser begonnen werden.

KURZ GEFASST:

ctDNA kann im Blut nachgewiesen werden. Dazu reichen ca. 5–10 ml EDTA-Blut. Plasma eignet sich besser als Serum für die Analyse. ctDNA gelangt durch aktive oder passive Mechanismen wie Apoptose oder Nekrose ins Blut. Es bestehen zahlreiche Verfahren, um ctDNA in der größeren Menge der cfDNA nachweisen zu können, wobei die sensitiven digitalen PCR-basierten Methoden an Bedeutung gewinnen. Liquid biopsy und Gewebeanalyse haben jeweils Vor- und Nachteile. Untersuchungen am Gewebe bringen den Vorteil, dass das Tumorgewebe histomorphologisch beurteilt und durch Mikrodissektion angereichert werden kann, was in einem sicheren Ergebnis resultiert. Der Nachteil des Gewebes ist eine mangelnde Repräsentanz der heterogenen Tumorsituation. Bei den liquid biopsies ist es genau umgekehrt. Hier liegt eine hohe Repräsentanz vor, weil sich die ctDNA wahrscheinlich von vielen bis allen Metastasen ableitet, jedoch kann keine Aussage getroffen werden, wie groß der Anteil an ctDNA in der cfDNA ist. Für eine optimale Patientenversorgung sind Gewebebiopsie und liquid biopsy komplementäre Verfahren.

CTC – zirkulierende Tumorzellen

CTCs sind entweder einzelne Tumorzellen, oder seltener, kleine Zellhaufen von Tumorzellen. Sie finden sich im Blutstrom vieler Patienten mit malignen Erkrankungen, so auch beim Lungenkarzinom [29]. CTCs werden sowohl von Primärtumoren als auch metastatischen Herden in den Blutstrom abgegeben, entweder passiv oder aktiv im Rahmen einer sog. EMT (epithelomesenchymalen Transition). CTCs enthalten Subpopulationen, sog. „culprit-cells“ („Täterzellen“) [29], die für die Implantation von Metastasen verantwortlich gemacht werden und zur schlechten Prognose fortgeschrittener Tumore beitragen [30].

CTCs können sowohl quantitativ als auch qualitativ analysiert werden. Wenn ein Tumor sehr aktiv CTCs freisetzt, können so ggf. auch kleinste Tumorresiduen erkannt werden. Zusätzlich haben CTC-Konzentrationen möglicherweise prognostische Bedeutung und erlauben in vielen Fällen das Ansprechen auf antitumoröse Therapien zu erkennen bzw. zu verfolgen (monitoring) [31]. Qualitativ können CTCs mittels moderner tumorgenetischer Verfahren untersucht werden, um auf diese Weise Treibermutationen zu finden und so zielgerichtete Therapien gegen die „Täterzellen“ zu entwickeln. Da CTCs meist nur in sehr kleinen Mengen im Blut zu finden sind (z. B. 1 CTC pro Milliliter Blut), müssen sie mit aufwändigen Verfahren angereichert werden [32]. Für die Anreicherung und Detektion von CTCs stehen innovative molekulare Techniken zur Verfügung [31, 33–35].

Bei den „Label-abhängigen“ Verfahren werden die CTCs auf der Basis von Zelloberflächenmarkern (z. B. EPCAM, epithelial cell adhesion molecule), angereichert. Für diese Vorgehensweise existiert mit dem CELLSEARCH-System (Janssen Diagnostics) ein von der FDA (food and drug administration U.S.A.) zugelassenes Isolationssystem für CTCs, mit dessen Hilfe in der klinischen Routine metastasierte Mamma-, Colon- oder Prostatakarzinome monitoriert werden können [36–38]. Bei den „Label-unabhängigen“ Analysen werden CTCs nach biophysikalischen Eigenschaften wie Größe oder durch Negativselektion angereichert. Unter einer Negativselektion sind dabei Verfahren zusammengefasst, bei denen nicht die CTCs angereichert werden, sondern die störenden peripheren Blutzellen z. B. über Komplement vermittelte Lyse depletiert werden. Auf diese Weise ist es sogar möglich, teilungsfähige CTCs anzureichern und in weiteren Schritten in Kultur zu bringen. Auf diese Weise können CTC-Zelllinien angelegt werden oder CTCs in Mäuse injiziert werden, um dort PDX (patient derived xenograft)-Modelle zu erstellen [39–42].

Mithilfe modernster molekularer Methoden wie der „Whole Genome Amplification“ (WGA) und anschließendem Next-Generation-Sequencing (NGS) oder Genexpressionsprofilen kann eine detaillierte Charakterisierung sogar einzelner CTCs erfolgen [39, 40, 43, 44]. Sieht man von den technischen Schwierigkeiten und Herausforderungen ab, hat die Untersuchung von CTCs klinische Relevanz. So zeigte eine Metaanalyse von 20 Publikationen, in denen insgesamt 1576 NSCLC-Patienten untersucht wurden [45], dass der Nachweis von CTCs signifikant mit einem schlechteren krankheitsfreien und Gesamtüberleben der NSCLC-Patienten einherging.

KURZ GEFASST:

CTCs können als Einzelzellen oder in kleinen Gruppen im Blut von Tumorpatienten nachgewiesen werden. Der Nachweis ist methodisch sehr aufwändig, wobei „Label-abhängige“ und „Label-unabhängige“ Verfahren zum Einsatz kommen können. Von der FDA wurde bisher lediglich ein Label-abhängiges Verfahren (CELLSEARCH®) für den klinischen Einsatz zugelassen. Schwierigkeiten bestehen unter anderem darin, CTCs von anderen Blutzellen zu differenzieren, anzureichern, auszuzählen und zu charakterisieren. Mittels modernster genetischer Verfahren kann das Genom einzelner CTCs analysiert werden. Ein anderer experimenteller Ansatz besteht darin, einzelne lebende CTCs anzuzüchten, in Kultur zu bringen oder in Mäusen zu untersuchen (PDX, patient derived xenograft).

Thrombozyten und Exosomen

Thrombozyten sind (nach den Erythrozyten) die zweithäufigste Zellart im Blut. Sie bestehen aus Zellfragmenten, da sie durch den Zerfall von *Megakaryozyten* im Knochenmark entstehen. Thrombozyten sind klassischerweise an der Blutgerinnung und an der Einleitung der Wundheilung beteiligt [46, 47]. Interessanterweise besteht eine weitere Interaktion zwischen Thrombozyten und Tumorzellen [48]. So können Thrombozyten in engen Kontakt mit Tumorzellen kommen, wobei es zum Austausch von tumorassoziierten Biomolekülen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten kommt. Dieser Vorgang wird als „Erziehung“ („education“) bezeichnet und Thrombozyten, die so „erzogen“ wurden, werden als „tumor educated platelets“ (TEP) bezeichnet [49–53]. So konnten in TEPs Tumor-DNA und -RNA nachgewiesen werden [52, 54]. Entsprechend sind TEPs für liquid biopsy-Verfahren interessant, da aus diesen das tumorgenetische Material gut isoliert und anschließend molekular-pathologisch untersucht werden kann. Insbesondere die die

KURZ GEFASST:

Thrombozyten können Tumormaterial durch Kontakt mit Tumorzellen oder durch Fusion mit Vesikeln, wie den Exosomen oder auch direkt DNA oder RNA, aus dem Blutstrom aufnehmen. Da Thrombozyten relativ robust sind und Nukleinsäuren in ihnen gut geschützt sind, stellen sie ein interessantes System für klinische Analysemethoden dar. Tumore können so über die in Thrombozyten enthaltenen Nukleinsäuren, insbesondere aber RNA charakterisiert und einzelne Mutationen nachgewiesen werden. Dies ist insbesondere für den Nachweis von Translokationen interessant, weil sich diese als Genfusionen direkt in der mRNA abbilden und somit nachweisen lassen. Bisher sind diese Verfahren jedoch noch nicht in der Routinediagnostik verfügbar.

Tumor-RNA aus TEPs ist wertvoll, denn diese besteht im Vergleich zu cfRNA aus größeren Fragmenten, ist im Unterschied zum Blutplasma stabil und kann routinemäßig aus Blutproben gewonnen werden. Hiermit lassen sich auch komplexe tumorgenetische Untersuchungen, wie etwa der Nachweis von Translokationen, durchführen. Dabei führt selbst eine lange Lagerung von bis zu 48 Stunden bei Raumtemperatur zu keiner wesentlichen Degradierung der Tumor-Erbsubstanz in den TEPs [48, 55].

Eine weitere Quelle von genetischem Material aus Tumorzellen sind Exosomen. Hierbei handelt es sich um kleine, Membran-umgebene Vesikel, die von den Tumorzellen abgegeben werden. Exosomen enthalten Tumor-DNA, -RNA und auch -Proteine, wodurch es möglich ist, Tumor-spezifische Exosomen mithilfe von Antikörpern, wie EpCAM, anzureichern, wie es bereits für die CTCs beschrieben wurde [56].

Klinische Anwendungsformen der „Liquid biopsy“ bei Lungenkarzinomen

EGFR-Mutationen

Beim Adenokarzinom der Lunge können mittlerweile Treiber-mutationen in etwa der Hälfte aller Fälle detektiert werden, die zum Teil auch von klinischer und therapeutischer Relevanz sind. Die prominenteste Rolle spielen aktivierende Mutationen im EGFR-Gen, die wir in etwa 10–15% der Patienten nachweisen konnten [57]. In ca. 90% der Fälle handelt es sich um Deletionen im Exon 19 (meist ELREA-Motiv) oder die Punktmutation L858R im Exon 21 des EGFR-Gens. Sie sind ein Prädiktor für gutes Ansprechen auf EGFR-zielgerichtete spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) [58–61]. Dabei werden TKIs der ersten Generation (Erlotinib und Gefitinib; binden den EGFR reversibel), der zweiten Generation (Afatinib und Dacomitinib; binden den EGFR irreversibel) und der dritten Generation (Osimertinib, Rocicetinib und Olmutinib; binden den EGFR in bestimmten Situationen der Resistenz) unterschieden [62, 63].

Wenn es im Verlauf einer Erkrankung schwierig ist, invasiv Tumorgewebe zu asservieren, oder wenn der Nachweis einer Mutation aus dem Gewebe nicht möglich ist [13], dann ist für die Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) beim Einsatz des TKI Gefitinib der Nachweis einer EGFR-Mutation aus dem Blut als Ersatz- oder sekundäre Lösung durch die EMA zugelassen worden [64]. Diese Zulassung basiert auf einer Vielzahl an Daten, die zeigen, dass der EGFR-Mutationsstatus im Plasma nachgewiesen werden kann [65]. An 42 Patienten, die mit Gefitinib behandelt wurden, konnte eine Mutationsrate von 16,7% im Plasma der Patienten detektiert werden; die Konkordanz mit der Mutation im Tumor des gleichen Patienten lag dabei bei 92,9%. Falsch negative Bestimmungen lagen kaum vor, was sich an einer Sensitivität der Methode von 97% widerspiegelt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von EGFR-Mutationen im Plasma mit dem Ansprechen auf Gefitinib eng korrelierte. Die Möglichkeit zum Nachweis von EGFR-Mutationen aus dem Blut bestätigte eine weitere Studie, die diese genetische Veränderung in 49,3% der Fälle nachweisen konnte [66]. Patienten mit einer EGFR-Mutation im Plasma hat-

ten ein längeres medianes progressionsfreies Überleben (PFS) als diejenigen mit EGFR-Wildtyp (7,6 vs. 2,9 Monate), wenn sie mit Gefitinib als Zweitlinientherapie behandelt wurden. Im bisher größten veröffentlichten Kollektiv wurden Tumor- und Plasmaproben von 1162 NSCLC-Patienten aus 56 Zentren in Europa und Japan mit unterschiedlichen molekularen Methoden auf EGFR-Mutationen hin untersucht [67]. Die Mutationsfrequenz lag in dieser retrospektiven Studie aus der klinischen Praxis bei 16% für die Tumorphproben und 9% für die Plasmaproben. Dabei ergab sich eine Konkordanz von 89%; die Sensitivität lag bei 46% und die Spezifität bei 97%. Eine Gruppe von 25 Patienten mit einem vermeintlich falsch positiven EGFR-Mutationsstatus im Plasma wies häufig als „Standard“ nur eine Zytologie auf und/oder es wurden weniger sensitive molekulare Nachweisverfahren verwendet. Zudem zeigten sich in der Tumorkategorie M1B mit 13% deutlich mehr Serumproben positiv für eine EGFR-Mutation als bei Patienten in der Tumorkategorie M1A mit 7%. Hier folgerten die Autoren, dass bei Patienten mit Fernmetastasen häufiger ctDNA in das Blut abgegeben wird. Diese und weitere Publikationen zum Nachweis von EGFR-Mutationen im Serum und Plasma waren jedoch retrospektiv erhoben worden [13, 68–74].

Prospektive Ergebnisse zur EGFR-Bestimmung aus dem Blutplasma lieferte die FASTACT II-Studie [75]. In dieser Studie wurden NSCLC-Patienten im Stadium UICC IV für eine Chemotherapie randomisiert, die aus 6 Zyklen Gemcitabine und Platin bestand und sich durch die sequentielle Gabe von Erlotinib oder Placebo unterschied. In FASTACT II wurden Blutproben zu Beginn der Therapie, zum Zeitpunkt des Zyklus 3 und bei Progress der Erkrankung abgenommen. Insgesamt lagen 238 Paare von Blut- und zugehörigen Tumorphproben vor; dabei lag die Konkordanz der EGFR-Mutation zwischen Blut und Gewebetests bei 88%, die Sensitivität bei 75% und die Spezifität bei 96%. In der Gruppe der Patienten, die Erlotinib erhalten hatten, lag das mediane PFS bei 13,1 Monaten, wenn vor Beginn der Therapie eine aktivierende EGFR-Mutation im Plasma nachgewiesen werden konnte; dagegen war das mediane PFS in der gleichen Kohorte bei lediglich 6,2 Monaten, wenn der EGFR-Status den Wildtyp im Plasma zeigte. Noch interessanter stellten sich die Ergebnisse nach Zyklus 3 dar. Hier konnte mittels ctDNA-Analyse gezeigt werden, dass unter Therapie die Anzahl von EGFR-Kopien deutlich zurückging. Wenn zum Zyklus 3 keine EGFR-Mutation mehr nachgewiesen werden konnte, lag das mediane PFS bei Patienten, die Erlotinib erhalten hatten, bei 16,6 Monaten und das mediane Überleben (OS) bei 32,4 Monaten. Im Vergleich dazu war das mediane PFS bei Patienten, bei denen zum Zyklus 3 noch eine EGFR-Mutation im Blut nachgewiesen werden konnte, bei 7,8 Monaten und das mediane OS bei 17,7 Monaten. Die Autoren konnten damit zeigen, dass es nicht nur möglich ist, EGFR-Mutationen im Blutplasma verlässlich zu detektieren, sondern dass dieser Marker auch zur Prädiktion des Erfolgs einer EGFR-TKI-Therapie eingesetzt werden kann.

Auch in der IFUM-Studie, einer Phase IV-Studie mit Gefitinib als Erstlinientherapie, wurde der EGFR-Mutationsstatus aus dem Tumor von 652 Patienten mit metastasiertem NSCLC vor Beginn der Therapie mit den Ergebnissen aus ctDNA-Analysen verglichen [69]. Die Konkordanz zwischen Tumor und Plasma

betrug 94,3%, die Sensitivität 65,7% und die Spezifität 99,8%. Wiederholte Analysen aus mehreren Plasmaproben des gleichen Patienten ergaben gleiche Konkordanzen und eine hohe Reproduzierbarkeit des Tests (THERASCREEN EGFR-RGQ-Kit). Patienten, die eine Konkordanz zwischen Tumor und Plasma hatten, zeigten ein Ansprechen von 76,9% (50 von 65 Patienten). Dagegen lag das Ansprechen lediglich bei 59%, wenn die EGFR-Mutation nur im Tumor, nicht aber im Blutplasma nachgewiesen werden konnte.

Schließlich wurden verschiedene Testmethoden zum Nachweis von EGFR-Mutationen im Blutplasma verglichen [28]. Hierbei wurden der COBAS-Test, Thera-Screen und BEAMing gegeneinander getestet. Tumor und Blutproben von 38 NSCLC-Patienten, die im Rahmen der AURA-1-Studie mit Osimertinib behandelt wurden, konnten dabei untersucht werden. Des Weiteren wurden zwischen den beiden häufigsten vorkommenden aktivierenden EGFR-Mutationen, nämlich Exon-19-Deletionen und der L858R-Mutation im Exon 21 unterschieden. Es zeigte sich durchgehend für alle verglichenen Testmethoden eine hohe Sensitivität zwischen 78 und 100% sowie eine Spezifität von 93–100%. Die Konkordanz lag zwischen 87 und 97% (► Tab. 1).

T790M-Mutationen

Die T790M-Mutation im Exon 20 des EGFR-Gens ist eine Resistenzmutation, die in ca. 50–60% der Fälle unter einer Therapie mit einem EGFR-TKI der ersten oder zweiten Generation auftritt [76] und bei ca. 1–5% der Patienten mit EGFR-Mutation als Primärresistenz auftritt. Passend für die T790M-Mutation wurden die EGFR-TKI der dritten Generation Osimertinib und Rociletinib entwickelt [77, 78]. Osimertinib ist durch die EMA bei Nachweis einer durch T790M vermittelten Primär- oder Sekundärresistenz auf EGFR gerichtete TKI zugelassen. Damit ist es bei Progress unter TKI nun klinisch relevant, eine Rebiopsie durchzuführen und auf das Vorliegen einer T790M-Mutation an Gewebe zu testen oder eine liquid biopsy zu veranlassen. Wie es in den aktuellen Leitlinien der DGHO und ESMO empfohlen wird. Neben der T790M-Mutation transformierten etwa 5% der ursprünglich Adenokarzinome der Lunge in ein kleinzelliges Lungenkarzinom (SCLC), wodurch sie ebenfalls resistent gegen TKI-Therapien mit Erst- und Zweitgeneration-TKIs werden [79]. Dies könnte von einer alleinigen liquid biopsy nicht detektiert werden. An dieser Stelle zeigt sich erneut die Komplementarität von Gewebeproben und liquid biopsy, die zusammen eine optimale Patientenversorgung erlauben. Auch hier kann die Analyse jedoch auch allein mithilfe einer liquid biopsy erfolgen, wenn eine Rebiopsie nicht möglich oder vom Patienten unerwünscht ist, denn es ist in jedem Fall zielführender, nur eine Komponente zu testen als gar keine Diagnostik durchzuführen.

In einer kleinen retrospektiven Studie an 40 Patienten, die unter EGFR-TKI-Therapie progredient waren, wurde untersucht, wie viele Patienten in derartigen Situationen rebiopsiert werden konnten [80]. Es zeigte sich, dass die Hälfte der Patienten den Progress an Lokalisationen hatten, die sehr schwer bis gar nicht zu biopsieren waren. An weiteren 15 Patienten wurde die Untersuchung nicht durchgeführt, weil die Patienten in diesen Eingriff nicht einwilligten. Somit wurden lediglich in fünf Fällen

► **Tab. 1** Vergleich verschiedener Verfahren zur Detektion von EGFR- und T790 M-Mutationen aus dem Plasma (aus [28, 32]).

	Cobas® EGFR-Mutationstest	Therascreen™ ARMS PCR	Droplet digital PCR	BEAMING digital PCR
Exon 19 Deletion				
Sensitivität	86 %	82 %	–	93 %
Spezifität	100 %	100 %	–	100 %
Konkordanz	89 %	87 %	–	95 %
L858R				
Sensitivität	90 %	78 %	90 %	100 %
Spezifität	100 %	100 %	100 %	93 %
Konkordanz	97 %	95 %	97 %	95 %
T790 M				
Sensitivität	41 %	29 %	71 %	71 %
Spezifität	100 %	100 %	83 %	67 %
Konkordanz	57 %	48 %	74 %	70 %

diagnostische Eingriffe durchgeführt (3× transbronchiale Biopsie und 2× Thorakozentese) und dabei eine T790 M-Mutation entdeckt. Dagegen konnte in Blutproben die T790 M-Resistenzmutation in 10 von 23 Patienten (43,5%) [81] oder 40% [82] nachgewiesen werden. Besonders gut geeignet war das Verfahren bei Rauchern, männlichen Patienten und Tumoren mit Exon 19-Deletionen im EGFR-Gen. Des Weiteren wurden liquid biopsies nicht nur zum Tumorprogress, sondern auch zu Zeitpunkten davor und danach gesammelt. In diesen Serienuntersuchungen zeigte sich, dass die T790 M-Mutation zwischen 30 Tagen vor und 70 Tagen nach dem radiologisch definierten Progress auftrat [82]. Diese Beobachtung könnte für manche Patienten unter TKI-Therapie von prädiktiver Relevanz sein.

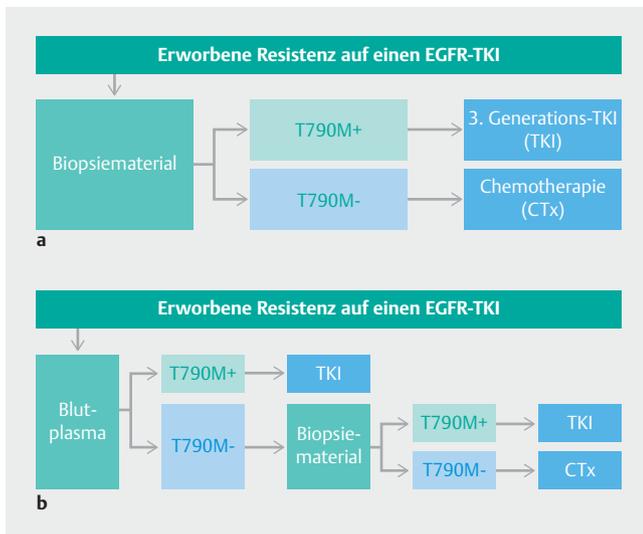
Für den Nachweis der T790 M-Mutation aus dem Blut ist es sinnvoll, die bekannte Primärmutation im EGFR-Gen mit zu untersuchen. T790 M-Mutationen sind dann relevant, wenn sie zusammen mit der Primärmutation auf demselben DNA-Strang vorkommen. Wenn die T790 M-Mutation und Primärmutation auf dem jeweils anderen Allel vorkämen, würden zwei Typen an EGFR-Proteinen synthetisiert: EGFR mit aktivierender und EGFR mit T790 M-Mutation. In diesem Falle bestünde aber keine Resistenz gegen den TKI der ersten oder zweiten Generation. Daher kann die Primärmutation als Referenz für eine ausreichende Sensitivität der Untersuchung herangezogen werden. Wenn die Primärmutation nachgewiesen werden kann, war die Menge an ctDNA in der cfDNA ausreichend hoch genug für den Nachweis einer Mutation im EGFR-Gen, somit ist in dieser Konstellation der Nachweis einer WT T790 T-Sequenz nicht Folge einer zu geringen Sensitivität des Tests. Eine auf dem diesjährigen ASCO vorgestellte Studie untersuchte T790 M-Mutationen bei Patienten nicht nur im Tumor und im Blutplasma, sondern auch im Urin [83]. Bei 181 untersuchten Fällen konnte in 57% in allen drei Proben die Mutation nachgewiesen werden (► **Abb. 2**). Des Weiteren war es weder für das progressionsfreie Überleben (PFS) noch für das Anhalten des Ansprechens

Tumorgewebe	8	16		18	104
Urin	5				
Blutplasma	4		19		

► **Abb. 2** T790 M-Mutationsnachweis im Tumor, Blutplasma und Urin. In 104/181 (57%) der untersuchten Patienten konnte aus allen drei Proben die T790 M-Mutation nachgewiesen werden. Die Spalten zeigen an, in welchen Materialien gleichzeitig die Mutation nachgewiesen wurde, die Zahlen in den Kästchen beziehen sich auf die Fallzahlen (nach [83]).

(DOR) unter einem Drittgeneration EGFR-TKI (Rociletinib) von Relevanz, woher die positive Probe stammte. Die Autoren folgerten daraus, dass der Nachweis der T790 M-Mutation sowohl aus Plasma als auch aus Urin eine gut anwendbare Diagnostikmöglichkeit ist, insbesondere, wenn kein Tumorgewebe vorliegt.

Die AURA-Studie ist eine prospektive Phase I-Studie, in der Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC und aktivierenden EGFR-Mutationen mit Osimertinib (3. Generations-TKI) behandelt wurden. Bei allen eingeschlossenen Patienten wurde die EGFR-Mutation sowohl im Tumor als auch im Blutplasma überprüft [84]. Es zeigte sich, dass das Ansprechen (62% und 63%) und PFS (9,7 m) für alle Patienten gleich war, die entweder in der Tumorprobe oder im Blut eine T790 M-Resistenzmutation aufwiesen. Konnte im Plasma T790 M nicht nachgewiesen werden, jedoch im Tumor des gleichen Patienten, so führte dies zu einem PFS von 16,2 Monaten. War dagegen neben der Plasma- probe auch der Tumor ohne T790 M-Mutation, so lag das PFS nur bei 2,8 m. Die Autoren entwickelten aus diesen Ergebnissen einen überarbeiteten Algorithmus, der in ► **Abb. 3 b** dargestellt ist. Es sollte entsprechend zunächst eine Plasma- probe auf das Vorliegen von T790 M getestet werden. Zeigt sich die Resistenz-



► **Abb. 3** Algorithmen für die T790M-Mutationstestung. **a** Im konventionellen Algorithmus wird bei EGFR-mutationspositiven NSCLC-Patienten bei Progress unter TKI eine Rebiopsie durchgeführt. Zeigt sich hier die T790M-Mutation, kommt eine Therapie mit dem 3. Generations-TKI Osimertinib in Frage, ansonsten ist die Chemotherapie die Behandlung der Wahl. **b** Im alternativen Algorithmus kann bei EGFR-mutationspositiven NSCLC-Patienten bei Resistenz auf einen TKI zunächst ein Screening auf T790M mittels Blutplasma durchgeführt werden. Zeigt sich hier eine Mutation, kann mit Osimertinib behandelt werden. Zeigt sich die T790M-Mutation nicht, sollte als nächster Schritt die Rebiopsie durchgeführt werden und diese auf T790M getestet werden. Zeigt sich nun die Resistenzmutation, kann mit dem Drittgenerations-TKI therapiert werden. Im Fall ohne T790M-Nachweis aus der Tumorbeprobe sollte eine Chemotherapie eingeleitet werden. Näheres dazu im Text (Algorithmus aus [84]).

mutation, ist eine Therapie mit Osimertinib sinnvoll. Zeigt sich im Plasma die Mutation nicht, sollte zusätzlich Tumormaterial untersucht werden. Wenn sich dann hier die Resistenzmutation zeigt, sollte mit dem zugelassenen Drittgenerations-TKI behandelt werden, ansonsten ist z. B. eine Chemotherapie zu erwägen.

Kürzlich konnte in einer prospektiv randomisierten Phase III-Studie (AURA 3) gezeigt werden, dass EGFR-mutationspositive Patienten, die nach Versagen einer TKI-Erstlinientherapie eine T790M in einer Rebiopsie aufwiesen, in der Zweitlinie signifikant besser von einer Osimertinib-Therapie profitierten als von einer platin-basierten Kombinations-Chemotherapie mit Pemetrexed [85]. Das PFS unter dem 3. Generations-TKI lag dabei im Median bei 10,1 Monaten, unter Chemotherapie bei 4,4 Monaten (HR 0,30; $p < 0,001$). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für die Patienten dieser Studie erzielt werden, in denen zusätzlich die T790M-Mutation im Plasma nachgewiesen wurde (mPFS 8,2m vs. 4,2m [HR 0,42]). Allerdings war die Sensitivität des mittels Cobas-Tests durchgeführten Nachweises im Plasma mit 51% überraschend gering. Anzumerken ist, dass die Substanz Osimertinib in Deutschland trotz bestehender EU-weiter Zulassung derzeit nur über die internationale Apotheke bezogen werden kann (Stand Dezember 2016). Erwartungsgemäß entwickeln die Lungenkarzinome mit T790M-Mutation unter Therapie mit Osimertinib weitere Resistenzen. So

KURZ GEFASST:

Das EGFR-Mutationscreening gehört heutzutage zum Standard der molekular-pathologischen Diagnostik beim metastasierten NSCLC, wenn eine nicht-plattenepitheliale Histologie und eine Therapieabsicht vorliegen. Wenn kein oder nur unzureichende Mengen an Tumormaterial vorliegen, um die EGFR-Mutationsanalyse durchzuführen, so kann diese Bestimmung in vielen Fällen mittlerweile auch aus dem Blutplasma erfolgen. Wenn während der Therapie eine Resistenz auf EGF-Rezeptor-TKIs auftritt, liegt zu ca. 60% eine T790M-Resistenzmutation vor. Seit Beginn dieses Jahres ist in Deutschland der Drittgenerations-TKI Osimertinib zugelassen, der bei Nachweis einer T790M-Mutation eingesetzt werden kann und eine gute Effektivität in der Zweitlinientherapie zeigt. Eine Rebiopsie ist in vielen Fällen jedoch nicht möglich oder wird vom Patienten aufgrund der Invasivität des Eingriffs abgelehnt. Hier kann eine „liquid biopsy“ helfen. Der alleinige Einsatz einer liquid biopsy ermöglicht es jedoch nicht, eine mögliche Konversion eines NSCLC in ein SCLC (etwa 5%) zu erkennen. Auch hier sind also Gewebeprobe und liquid biopsy nicht konkordant, sondern komplementäre Verfahren in der molekular-pathologischen Analyse von Lungentumoren.

zeigten sechs von 15 so behandelten Patienten eine C797S-Resistenzmutation im EGF-Rezeptor [86]. Eine gezielte Therapie für diese zweite Resistenzmutation gibt es bisher jedoch nicht.

ALK-Translokation

Eine weitere Subgruppe an Lungenkarzinomen ist durch Translokationen des ALK-Gens (anaplastic lymphoma kinase), des ROS1-Gens (rather often translocated in sarcoma) oder des RET-Gens (rearranged during transfection) charakterisiert. Diese Translokationen werden bei etwa 3–5% der Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge gefunden. Diese Patienten sind meistens Nie- oder Wenig-Raucher. Durch eine meist reziproke Translokation wird der Kinase kodierende Teil der in Epithelzellen der Lunge schwach exprimierten ALK-Rezeptor-Tyrosinkinase mit dem Promoterbereich eines stark exprimierten Gens (housekeeper Gen) zusammengebracht (Fusionsgen). Dieses housekeeping Gen ist in einer Vielzahl der Lungenkarzinom-Fälle das EML4 (echinoderm microtubuli like)-Gen. Durch die Translokation entsteht auf Ebene der mRNA und Proteine ein Fusionsgen-Produkt, das die ALK-Kinaseaktivität besitzt und dabei wegen der hohen Aktivität des EML4-Promoters in großen Mengen in den Zellen gebildet wird. Diese Mutation hat tumortreibende Wirkung, sodass dann bei Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge in der palliativen Erstlinientherapie oder Zweitlinie eine Therapie mit den TKIs Crizotinib oder Ceritinib in Betracht kommt [87–90]. Daher sollte vor Therapiebeginn überprüft werden, ob eine solche Translokation vorliegt. Dies kann zum einem am Gewebe mithilfe einer Immunhistochemie durchgeführt werden, da das Fusionsprotein in

den Tumorzellen stark überexprimiert wird. Zusätzlich kann eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-(FISH)Diagnostik erfolgen, die vergleichsweise aufwändig ist und erfahrene Untersucher erfordert. Weiterhin ist es ebenfalls möglich, durch NGS in einem „Multigen-Nachweis“ sowohl Mutationen als auch Fusionen parallel zu untersuchen.

Auch hier könnten blutbasierte Verfahren die Diagnostik vereinfachen. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass Translokationen auf Ebene der DNA/des Genoms nicht punktgenau identisch erfolgen, sodass der Nachweis der Genfusion am besten auf Ebene der mRNA erfolgt. Dazu bieten sich TEP oder Exosomen an. Beim Einsatz von Thrombozyten konnte in 38 NSCLC-Patienten die bekannte ALK-Translokation mit einer Sensitivität von 65% und einer 100%igen Spezifität nachgewiesen werden [91]. Eine Subgruppe von 29 Patienten dieser Studie, die mit dem TKI Crizotinib behandelt worden war, zeigte darüber hinaus einen signifikanten Zusammenhang zwischen PFS und dem in den Thrombozyten nachgewiesenen ALK-Status (PFS 3,7 Monate vs. 16 Monate; $p=0,02$). Auch beim Einsatz von ALK-zielgerichteten TKIs entwickeln die behandelten Lungenkarzinome Resistenzen, z. B. die sog. gatekeeper Mutation L1196M [92]. Auch diese kann über liquid biopsy nachgewiesen werden, wobei dieser Nachweis ggf. bereits ca. 2 Monate vor dem radiologisch sichtbaren Progress festgestellt werden kann. Analog zur Situation der T790M-Mutation sollte auch hier die primäre ALK-Translokation nachgewiesen werden, um ein falsch-negatives Testergebnis zu vermeiden. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass aufgrund der geringen Mengen an ctDNA in der cfDNA hoch sensitive (digitale) Verfahren für den Nachweis von tumorgenetischen Veränderungen aus liquid biopsies eingesetzt werden sollten.

KURZ GEFASST:

Tumoren mit ALK-Translokationen können sehr wirksam z. B. mit den Substanzen Crizotinib oder Ceritinib behandelt werden. Daher sollte bei fortgeschrittenem NSCLC und Therapieabsicht routinemäßig nach ALK-Translokationen gesucht werden. Erste Ergebnisse zeigen, dass ALK-Translokationen aus Tumor-RNA bestimmt werden können, die aus Thrombozyten oder Exosomen gewonnen wurde. Gerade Exosomen eignen sich nicht nur zur initialen Diagnostik, sondern aufgrund der Möglichkeit der Anreicherung potenziell auch im Therapieverlauf zum Monitoring der Wirksamkeit. Prospektive Studien müssen zeigen, in wie weit diese Daten valide sind und ob solche Tests in der klinischen Routine eingesetzt werden können.

Weitere klinische Anwendungsmöglichkeiten und Ausblick

Verfolgen (Monitoring) von Tumorresiduen

Nach kurativer Resektion von NSCLC-Tumoren im Stadium UICC IB–IIIA wird Patienten in gutem Allgemeinzustand mit adäquater postoperativer Erholung in den aktuellen Leitlinien eine adjuvante Chemotherapie empfohlen, um das Rezidiv-freie-Überleben (DFS) und das Gesamt-Überleben (OS) in dieser Patientenkohorte zu verbessern [93]. Jedoch hat sich in der JBR.10-Studie nach 10 Jahren Follow-up gezeigt, dass durch die adjuvante Therapie (im Vergleich zu einem Beobachtungsarm) eine Verbesserung der Prognose von lediglich 11% zu erreichen war [94]. Das 5-Jahres-Überleben betrug über alle Stadien 67% in der adjuvant therapierten Gruppe, 56% im Beobachtungsarm. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass trotz (zum Teil stark belastender) adjuvanter Chemotherapie ein Drittel der Patienten im Laufe der folgenden Jahre ein Tumorrezidiv erleidet. Dies ist vermutlich auf das Vorliegen von kleinsten Tumorresiduen zurückzuführen. Hier könnte in der Zukunft möglicherweise eine weitere Indikation zur liquid biopsy liegen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass die ctDNA-Spiegel von NSCLC-Patienten sehr gut mit dem klinischen Status der Tumorerkrankung assoziiert sind. Bei Tumorprogress kommt es zu einer Konzentrationserhöhung der ctDNA im Blutplasma, bei Ansprechen auf eine Therapie zu einer Reduktion [95]. In mehreren Tumorentitäten wie etwa dem Mammakarzinom, dem Melanom oder auch dem Lungenkarzinom konnten mittels ctDNA-Monitoring bereits erfolgreich Rezidive erkannt werden [96–99].

Beim NSCLC korreliert die ctDNA-Menge mit der Tumorlast [100], wie eine Untersuchung von Patienten mit NSCLC verschiedener Tumorstadien zeigte. Während in den UICC-Stadien II–IV 100% der Patienten nachweisbare Mengen von ctDNA im Blut hatten, waren es bei Patienten im Stadium I, also ohne Lymphknotenbeteiligung, immerhin 50%. Das Kernproblem der Testung in dieser Situation ist jedoch die Frage, mithilfe welcher Mutationen die cfDNA als ctDNA identifiziert werden kann. Hier kann eine Untersuchung des Primärtumors mithilfe von NGS eine Option sein, wenige Markermutationen zu identifizieren, die früh in der Karzinogenese auftreten und daher in allen Subklonen des Tumors vorkommen sollten, sodass diese dann später in einer liquid biopsy nachgewiesen werden können. Wie groß der Anteil an nicht erkannten Rezidiven ist, die keine der untersuchten Mutationen zeigen, ist unbekannt.

Auch mittels CTC-Analyse kann ein Rezidiv nach kurativer Resektion erkannt werden. Bei 56 Patienten mit NSCLC mit kurativer Resektion [101] fanden sich CTCs bei 51,8% der Patienten vor OP und bei 32,1% einen Monat nach OP. Der Nachweis von CTCs im Verlauf war signifikant mit einem frühen Rezidiv assoziiert ($p=0,018$) und zeigte darüber hinaus signifikant ein kürzeres krankheitsfreies Überleben (DFS) an ($p=0,008$). In der multivariaten Analyse war neben dem präoperativen Lymphknotenstatus der CTC-Nachweis einen Monat postoperativ ein unabhängiger ungünstiger prognostischer Faktor.

In-vivo-Diagnostik und Therapiesimulation

Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten wie Prostata-, Mamma- oder Ovarialkarzinomen zeigen Patienten mit NSCLC meist sehr viel weniger CTCs im Plasma [102, 103]. Nur bei 21 bis 39% aller NSCLC konnten CTCs nachgewiesen werden [104–107]. Eine Ausnahme sind kleinzellige Lungenkarzinome (SCLC), die möglicherweise aufgrund ihres extrem aggressiven Wachstumsmusters die höchsten Werte an CTCs von allen Tumorentitäten aufweisen [108]. In einem direkten Vergleich zwischen NSCLC- und SCLC-Blutproben konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der ersten Diagnose 85% der SCLC-Patienten (N=97) CTC-positiv waren, dagegen nur 21% von 101 Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC. Da CTCs bei kleinzelligen Lungenkarzinomen besonders häufig auftreten, wurden beim SCLC Untersuchungen durchgeführt. So wurden CTCs aus dem Blut von SCLC-Patienten in Mäusen als PDX angelegt und diese analog zu den Patienten mit Cisplatin und Etoposid chemotherapiert. Interessanterweise reflektierten die PDX das Ansprechen der entsprechenden Tumoren [40]. Darüber hinaus konnten diese PDX auch zum Testen der Effektivität verschiedener anderer Chemotherapie-Kombinationen eingesetzt werden, sodass dieses Modell ein „Patienten-Avatar“ darstellt [41, 109]. Diese ersten translationalen Studien zeigen, dass es in Zukunft möglich sein kann, die Therapie beim SCLC mithilfe von CTCs zu steuern.

KURZ GEFASST:

Die liquid biopsy eignet sich nicht nur zum Mutationsnachweis, sondern kann auch dazu benutzt werden, Rezidive nach kurativer Resektion zu erkennen. Sowohl ctDNAs als auch CTC-Konzentrationen steigen mit zunehmender Tumorlast und bei Progress an. Für den Nachweis von ctDNA müssen jedoch geeignete Biomarker bzw. Mutationen vorhanden sein, die zuvor aus dem Gewebe des Primärtumors gewonnen wurden. Wenn kleine Tumorresiduen so frühzeitig erkannt werden können, wäre das prädictiv für die Wirksamkeit einer adjuvanten bzw. längerfristig konsolidierenden Behandlung. Patienten, bei denen die liquid biopsy negativ ist, könnten von belastenden weiteren Behandlungen verschont bleiben. Allerdings müssen prospektive Untersuchungen erst die Validität der Diagnostik bestätigen, bevor sie Einzug in die Klinik halten kann. Auch bei kleinzelligen Lungenkarzinomen konnte das Ansprechen auf eine Chemotherapie durch die Analyse von CTCs im Blut gezeigt werden. PDX-Maus-Modelle mit CTCs wurden für die Überprüfung der Medikamentensensitivität bereits erfolgreich eingesetzt (Avatar-Modelle).

KONSEQUENZ FÜR DIE PRAXIS

Neben der Histologie spielen in der Diagnostik von (metastasierten) NSCLC immer häufiger auch genetische Analysen eine wichtige Rolle. Auch wenn für einen Teil der nachgewiesenen Mutationen derzeit keine Therapieoption existiert, so stellen aktivierende Mutationen im EGFR-Gen oder EML4-ALK-Translokationen bereits seit geraumer Zeit die Voraussetzung für effektive zielgerichtete Therapien mit TKIs dar. Unter Therapie mit EGFR-TKI kommt es in ca. 60% der Fälle zum Zeitpunkt der Resistenz zu einer zusätzlichen inhibitorischen Mutation im Exon 20, der sog. T790M-Mutation. Falls diese Genveränderung vorliegt, ist bereits heute mit Osimertinib eine Substanz der 3. Generation von TKI zugelassen, die eine gute Wirksamkeit zeigt. Weitere Mutationen oder Genveränderungen, die gezielt therapierbar sind, werden in den nächsten Jahren folgen. Da aber aufgrund der kleinen Biopsien zur Diagnosesicherung im metastasierten Stadium oft nur relativ wenig Gewebe vorliegt, stellt dies oft einen Engpass der molekular pathologischen Diagnostik dar. Hier sind in letzter Zeit bereits Verfahren in der Routine etabliert, um eine primäre Mutation im EGFR-Gen oder eine T790M-Mutation aus dem Blut des Patienten zu bestimmen. Während die Sensitivität dieser Diagnostik bei etwa 60–70% liegt, ist die Spezifität annähernd 100%. Durch den parallelen Nachweis der Primärmutation kann die Sensitivität ebenfalls auf fast 100% gesteigert werden. Neben der Mutationsbestimmung kann die sog. „liquid biopsy“ auch benutzt werden, um den Therapieverlauf, ähnlich wie in geeigneten Konstellationen mit Tumormarkern, zu begleiten, wenn entsprechende Marker-mutationen bekannt sind. Dann können Rezidive früher als in der Bildgebung erkannt werden. Allerdings macht die Erfassung der Daten nur dann Sinn, wenn sie mit der Tumordokumentation abgeglichen wird, um in Zukunft Risikopopulationen besser und früher zu identifizieren. Hier liegen aber noch nicht ausreichend Daten vor, um dies in der klinischen Praxis einzusetzen. Weitere Ausblicke für mögliche zukünftige Einsätze in diesem Bereich sind der Nachweis von Tumorzellen nach einer kurativen Resektion oder die Überprüfung der Wirksamkeit von Medikamenten aus den CTCs im Blut in vitro, bevor der Patient therapiert wird. Nach wie vor ist jedoch unklar, welchen Ursprung die ctDNA oder die CTCs haben und ob sie ein Abbild der Tumorzellen in den Geweben darstellen. Des Weiteren hat die Untersuchung der verschiedenen Bestandteile an Zellen bzw. Erbsubstanz im Blut Stärken und Schwächen. Die liquid biopsy bietet daher zusammen mit der klassischen Gewebebiopsie aufgrund der Komplementarität beider Verfahren die Möglichkeit, die molekular pathologische Nachsorge von Patienten mit Lungentumoren zu verbessern.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Kerstin Rauch für die Unterstützung bei der Manuskripterstellung und bei Dr. med. Valeska Brückl für kritische Diskussionen.

Interessenkonflikt

W. M. Brückl und J. H. Ficker haben in den vergangenen 3 Jahren Vortrags- und Beratungshonorare oder Reisekostenersatz erhalten von AstraZeneca Deutschland, BMS, Boehringer Ingelheim, Celgene, Lilly Deutschland, Lilly Global, MSD, Novartis, Nowel, Roche Pharma AG.

A. Jung hat in den vergangenen 3 Jahren Vortrags- und Beratungshonorare oder Reisekostenersatz erhalten von Amgen Deutschland GmbH, Amgen Global, AstraZeneca Deutschland, AstraZeneca Global, GlaxoSmithKline, Merck KGaA, Novartis, Pfizer, Qiagen, Roche Pharma AG.

R. M. Wirtz ist Gründer und CEO der STRATIFYER Molecular Pathology GmbH.

T. Bertsch gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- [1] Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1367–1380
- [2] Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes – the Achilles heel of cancer. *Science* 2002; 297: 63–64
- [3] De Luca A, Normanno N. Predictive biomarkers to tyrosine kinase inhibitors for the epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer. *Curr Drug Targets* 2010; 11: 851–864
- [4] Thatcher N, Hirsch FR, Luft AV et al. Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 763–774
- [5] Slavova-Azmanova NS, Lizama C, Johnson CE et al. Impact of the introduction of EBUS on time to management decision, complications, and invasive modalities used to diagnose and stage lung cancer: a pragmatic pre-post study. *BMC Cancer* 2016; 16: 44
- [6] Rooper LM, Nikolskaia O, Carter J et al. A single EBUS-TBNA procedure can support a large panel of immunohistochemical stains, specific diagnostic subtyping, and multiple gene analyses in the majority of non-small cell lung cancer cases. *Hum Pathol* 2016; 51: 139–145
- [7] Fenizia F, De Luca A, Pasquale R et al. EGFR mutations in lung cancer: from tissue testing to liquid biopsy. *Future Oncol* 2015; 11: 1611–1623
- [8] Hamilton G, Rath B, Klameth L et al. Receptor tyrosine kinase expression of circulating tumor cells in small cell lung cancer. *Oncoscience* 2015; 2: 629–634
- [9] Hamilton G, Rath B, Ulsperger E. How to target small cell lung cancer. *Oncoscience* 2015; 2: 684–692
- [10] Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem* 2015; 61: 112–123
- [11] Sparano A, Chernock R, Feldman M et al. Extending the inferior limits of supracricoid partial laryngectomy: a clinicopathological correlation. *Laryngoscope* 2005; 115: 297–300
- [12] Cai W, Lin D, Wu C et al. Intratumoral Heterogeneity of ALK-Rearranged and ALK/EGFR Coaltered Lung Adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2015; 33: 3701–3709
- [13] Jiang T, Ren S, Zhou C. Role of circulating-tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2015; 90: 128–134
- [14] Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 906: 161–168
- [15] Jahr S, Hentze H, Englisch S et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1659–1665
- [16] Diehl F, Li M, Dressman D et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 16368–16373
- [17] Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 16266–16271
- [18] Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014; 6: 224ra24
- [19] Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014; 32: 579–586
- [20] Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C et al. Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. *Cancer Treat Rev* 2014; 40: 648–655
- [21] Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 426–437
- [22] Jung M, Klotzek S, Lewandowski M et al. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem* 2003; 49: 1028–1029
- [23] Medina Diaz I, Nocon A, Mehnert DH et al. Performance of Streck cfDNA Blood Collection Tubes for Liquid Biopsy Testing. *PLoS One* 2016; 11: e0166354
- [24] Gaspare L, Machiwa JF, Mdachi SJ et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination of surface sediments and oysters from the inter-tidal areas of Dar es Salaam, Tanzania. *Environ Pollut* 2009; 157: 24–34
- [25] Thijssen MA, Swinkels DW, Ruers TJ et al. Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases. *Anticancer Res* 2002; 22: 421–425
- [26] Norton SE, Luna KK, Lechner JM et al. A new blood collection device minimizes cellular DNA release during sample storage and shipping when compared to a standard device. *J Clin Lab Anal* 2013; 27: 305–311
- [27] Ma M, Zhu H, Zhang C et al. “Liquid biopsy”-ctDNA detection with great potential and challenges. *Ann Transl Med* 2015; 3: 235
- [28] Thress KS, Brant R, Carr TH et al. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. *Lung Cancer* 2015; 90: 509–515
- [29] Ignatiadis M, Lee M, Jeffrey SS. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clinical Cancer Research* 2015; 21: 4786–4800
- [30] Powell AA, Talasz AH, Zhang H et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS One* 2012; 7: e33788
- [31] Krebs MG, Metcalf RL, Carter L et al. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11: 129–144
- [32] Dahl E, Jung A, Fassunke J et al. [Chances and risks of blood-based molecular pathological analysis of circulating tumor cells (CTC) and cell-free DNA (cfDNA) in personalized cancer therapy: positional paper from the study group on liquid biopsy of the working group for

- molecular pathology in the German Society of Pathology (DGP)]. *Pathologie* 2015; 36: 92–97
- [33] Alix-Panabieres C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip* 2014; 14: 57–62
- [34] Harouaka R, Kang Z, Zheng SY et al. Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacol Ther* 2014; 141: 209–221
- [35] Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med* 2012; 10: 138
- [36] Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3213–3221
- [37] Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781–791
- [38] de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6302–6309
- [39] Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S et al. Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. *Cancer Res* 2015; 75: 892–901
- [40] Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med* 2014; 20: 897–903
- [41] Yu M, Bardia A, Aceto N et al. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* 2014; 345: 216–220
- [42] Zhang L, Ridgway LD, Wetzel MD et al. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. *Sci Transl Med* 2013; 5: 180ra148
- [43] Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M et al. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. *Clin Chem* 2013; 59: 252–260
- [44] Muller C, Holtschmidt J, Auer M et al. Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Sci Transl Med* 2014; 6: 247ra101
- [45] Wang J, Wang K, Xu J et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in non-small-cell lung cancer patients: a meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8: e78070
- [46] George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 355: 1531–1539
- [47] Leslie M. Cell biology. Beyond clotting: the powers of platelets. *Science* 2010; 328: 562–564
- [48] Best Myron G, Sol N, Kooi I et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell* 2015; 28: 666–676
- [49] Klement GL, Yip TT, Cassiola F et al. Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood* 2009; 113: 2835–2842
- [50] Kuznetsov HS, Marsh T, Markens BA et al. Identification of luminal breast cancers that establish a tumor-supportive macroenvironment defined by proangiogenic platelets and bone marrow-derived cells. *Cancer Discov* 2012; 2: 1150–1165
- [51] McAllister SS, Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol* 2014; 16: 717–727
- [52] Nilsson RJ, Balaj L, Hulleman E et al. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood* 2011; 118: 3680–3683
- [53] Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013; 19: 1423–1437
- [54] Calverley DC, Phang TL, Choudhury QG et al. Significant downregulation of platelet gene expression in metastatic lung cancer. *Clin Transl Sci* 2010; 3: 227–232
- [55] Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 2014; 20: 430–435
- [56] Taverna S, Giallombardo M, Gil-Bazo I et al. Exosomes isolation and characterization in serum is feasible in non-small cell lung cancer patients: critical analysis of evidence and potential role in clinical practice. *Oncotarget* 2016; 7: 28748–28760
- [57] Gahr S, Stoehr R, Geissinger E et al. EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC patients: data from daily practice. *Br J Cancer* 2013; 109: 1821–1828
- [58] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361: 947–957
- [59] Rosell R, Carcereny E, Gervais R et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 239–246
- [60] Yang JC, Wu YL, Schuler M et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol* 2015; 16: 141–151
- [61] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129–2139
- [62] Brückl WM, Wiest GH, Ficker JH. [Current status of erlotinib and gefitinib in palliative therapy for NSCLC – does the EGF-R mutation state have any significance?]. *Pneumologie* 2010; 64: 727–735
- [63] Wiewrodt R, Serke M, Grohe C et al. [Employing tyrosine kinase inhibitors in the first line treatment of EGFR-positive metastatic NSCLC – state of the art and recent developments]. *Pneumologie* 2013; 67: 494–501
- [64] Douillard JY, Ostoros G, Cobo M et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* 2014; 110: 55–62
- [65] Kimura H, Suminoe M, Kasahara K et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer* 2007; 97: 778–784
- [66] He C, Liu M, Zhou C et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by mutant-enriched PCR assay for prediction of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 2009; 125: 2393–2399
- [67] Reck M, Hagiwara K, Han B et al. ctDNA Determination of EGFR Mutation Status in European and Japanese Patients with Advanced NSCLC: the ASSESS Study. *J Thorac Oncol* 2016; 11: 1682–1689
- [68] Camps C, Jantus-Lewintre E, Cabrera A et al. The identification of KRAS mutations at codon 12 in plasma DNA is not a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2011; 72: 365–369
- [69] Douillard JY, Ostoros G, Cobo M et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *J Thorac Oncol* 2014; 9: 1345–1353
- [70] Liu X, Lu Y, Zhu G et al. The diagnostic accuracy of pleural effusion and plasma samples versus tumour tissue for detection of EGFR mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer: comparison of methodologies. *J Clin Pathol* 2013; 66: 1065–1069
- [71] Narayan A, Carriero NJ, Gettinger SN et al. Ultrasensitive measurement of hotspot mutations in tumor DNA in blood using error-suppressed multiplexed deep sequencing. *Cancer Res* 2012; 72: 3492–3498

- [72] Nygaard AD, Garm Spindler KL, Pallisgaard N et al. The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013; 79: 312–317
- [73] Takeuchi K, Soda M, Togashi Y et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012; 18: 378–381
- [74] Weber B, Meldgaard P, Hager H et al. Detection of EGFR mutations in plasma and biopsies from non-small cell lung cancer patients by allele-specific PCR assays. *BMC Cancer* 2014; 14: 294
- [75] Mok T, Wu YL, Lee JS et al. Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 3196–3203
- [76] Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011; 3: 75ra26
- [77] Janne PA, Yang JC, Kim DW et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372: 1689–1699
- [78] Sequist LV, Soria JC, Goldman JW et al. Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372: 1700–1709
- [79] Ohashi K, Maruyka YE, Michor F et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistant disease. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1070–1080
- [80] Hasegawa T, Sawa T, Futamura Y et al. Feasibility of Rebiopsy in Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors. *Intern Med* 2015; 54: 1977–1980
- [81] Taniguchi K, Uchida J, Nishino K et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 7808–7815
- [82] Sueoka-Aragane N, Katakami N, Satouchi M et al. Monitoring EGFR T790M with plasma DNA from lung cancer patients in a prospective observational study. *Cancer Science* 2016; 107: 162–167
- [83] Wakelee HA, Gadgeel S, Goldman JW et al. Epidermal growth factor receptor genotyping of matched urine, plasma and tumor tissue from non-small cell lung cancer patients treated with rociletinib. *J Clin Oncol* 2016; 34: abstr 9001
- [84] Oxnard GR, Thress KS, Alden RS et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2016; 34: 3375–3382
- [85] Mok T, Wu YL, Ahn MJ et al. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M positive lung cancer. *N Engl J Med* 2016. DOI: 10.1056/NEJMoa1612674
- [86] Thress KS, Paweletz CP, Felip E et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med* 2015; 21: 560–562
- [87] Solomon BJ, Mok T, Kim DW et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371: 2167–2177
- [88] Shaw AT, Kim DW, Mehra R et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 370: 1189–1197
- [89] Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 2385–2394
- [90] Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist* 2013; 18: 865–875
- [91] Nilsson RJ, Karachaliou N, Berenguer J et al. Rearranged EML4-ALK fusion transcripts sequester in circulating blood platelets and enable blood-based crizotinib response monitoring in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 1066–1075
- [92] Politi K, Gettinger S. Perfect ALKemy: optimizing the use of ALK-directed therapies in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 5576–5578
- [93] Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M et al. Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer: interdisciplinary guideline of the German Respiratory Society and the German Cancer Society. *Pneumologie* 2011; 65: 39–59
- [94] Butts CA, Ding K, Seymour L et al. Randomized phase III trial of vinorelbine plus cisplatin compared with observation in completely resected stage IB and II non-small-cell lung cancer: updated survival analysis of JBR-10. *J Clin Oncol* 2010; 28: 29–34
- [95] Francis G, Stein S. Circulating Cell-Free Tumour DNA in the Management of Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2015; 16: 14122–14142
- [96] Bidard FC, Madic J, Mariani P et al. Detection rate and prognostic value of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. *Int J Cancer* 2014; 134: 1207–1213
- [97] Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 1199–1209
- [98] Forshew T, Murtaza M, Parkinson C et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 2012; 4: 136ra168
- [99] Shinozaki M, O'Day SJ, Kitago M et al. Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2068–2074
- [100] Newman AM, Bratman SV, To J et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature Medicine* 2014; 20: 548–554
- [101] Bayarri-Lara C, Ortega FG, Cueto Ladron de Guevara A et al. Circulating Tumor Cells Identify Early Recurrence in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Undergoing Radical Resection. *PLoS One* 2016; 11: e0148659
- [102] Allard WJ, Matera J, Miller MC et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6897–6904
- [103] Hanssen A, Loges S, Pantel K et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol* 2015; 5: 207
- [104] Hirose T, Murata Y, Oki Y et al. Relationship of circulating tumor cells to the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncol Res* 2012; 20: 131–137
- [105] Hofman V, Ilie MI, Long E et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer* 2011; 129: 1651–1660
- [106] Isobe K, Hata Y, Kobayashi K et al. Clinical significance of circulating tumor cells and free DNA in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2012; 32: 3339–3344
- [107] Tanaka F, Yoneda K, Kondo N et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6980–6986
- [108] Huang CH, Wick JA, Sittampalam GS et al. A multicenter pilot study examining the role of circulating tumor cells as a blood-based tumor marker in patients with extensive small-cell lung cancer. *Front Oncol* 2014; 4: 271
- [109] Yuan D, Chen L, Li M et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells from human gastric cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; 141: 647–660